



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεση & Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων

**Μελέτη παραγωγής πρεβιοτικών
γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού
και εφαρμογή σε προϊόν διατροφής**



Κωσταρέλης Σταύρος-Παναγιώτης
Επιβλέπων Καθηγητής: Ταούκης Πέτρος

ΙΟΥΝΙΟΣ 2023

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η διπλωματική εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 11/2022-06/23, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή ΕΜΠ κ. Πέτρου Ταούκη.

Με το τέλος αυτής της διαδρομής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη που μου πρόσφερε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας των τροφίμων, να εργαστώ και να αναπτύξω τις δεξιότητές μου εντός του εργαστηρίου. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάπτυξη και εφαρμογή των ιδεών μου καθώς και για την καθοδήγησή του για τη βελτιστοποίηση τους.

Ειδικές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στη Δρ. Μαρία Τσεβδού, επιστημονικό συνεργάτη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ και στον υποψήφιο διδάκτορα Αθανάσιο Λημναίο για την καθοδήγησή τους και τις συμβουλές τους σε σχέση με το κεντρικό θέμα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη ΕΔΙΠ Δρ. Βιργινία Γιάννου, Δρ. Έφη Δερμεσονλούογλου και Δρ. Δημήτρη Τσιμογιάννη για τις γνώσεις που μου μετέφεραν σε πλήθος θεμάτων σχετικών με την διπλωματική εργασία. Ευχαριστώ ακόμη τους Δρ. Μαρία Κατσούλη, Δρ. Αθηνά Τζιμάνη, Δρ. Γιώργο Δημόπουλο και τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννα Σεμένογλου, Αλέξανδρο Κατσιμίχα για την βοήθεια τους. Φυσικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συμφοιτητές μου που συνυπήρξαμε μαζί εντός του εργαστηρίου όλους αυτούς τους μήνες και έκαναν την διαδρομή ευχάριστη.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία Ελληνικά Γαλακτοκομεία Α.Ε. για την προμήθεια του όξινου ορού γιαουρτιού και την εταιρεία Natural Food Additives και όλο το προσωπικό της για τη φιλοξενία στις εγκαταστάσεις της και τη δυνατότητα που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό της για τη μελέτη της συμπύκνωσης του ορού σε πιλοτική κλίμακα.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους εντός και εκτός σχολής για την στήριξη και την υπομονή τους. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, τους γονείς μου, την αδερφή μου που διαμόρφωσαν τις συνθήκες ώστε να μείνω προσηλωμένος στους στόχους μου. Τους ευχαριστώ για την υποστήριξη τους και όλα όσα μου έχουν προσφέρει.

Σταύρος-Παναγιώτης Κωσταρέλης

Ιούνιος 2023

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού με τη χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση και της ενσωμάτωσής τους σε προϊόν διατροφής. Το προϊόν που επιλέχθηκε είναι η κρέμα βανίλιας. Κύριο κριτήριο επιλογής της αποτέλεσε η δυνατότητα παραγωγής της από τη γαλακτοβιομηχανία που παράγει τον όξινο ορό γιαουρτιού.

Για τη μελέτη της διεργασίας χρησιμοποιήθηκε η β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae*. Αρχικά, υπολογίστηκε η ενζυμική ενεργότητα του ενζύμου, η οποία βρέθηκε ίση με 5,18 Units/mL. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η διεργασία συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού μέχρι τελικής συγκέντρωσης λακτόζης 20 % w/v, διότι το προαναφερθέν ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε αυτή την περιεκτικότητα λακτόζης. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η πίεση και η θερμοκρασία λειτουργίας. Σε σχέση με την πίεση, μελετήθηκαν δύο διαφορετικές πιέσεις σε κάθε μια από τις θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν. Στους 45 °C, η πίεση λειτουργίας ορίστηκε στα 80 και 75 mbar, ενώ στους 50 °C στα 80 και 85 mbar. Η αύξηση της πίεσης λειτουργίας κατά 5 mbar είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού συμπύκνωσης κατά 53 % σε θερμοκρασία 45 °C (2,82 και 1,84 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου αντίστοιχα) και κατά 18 % σε θερμοκρασία 50 °C (4,25 και 3,60 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου αντίστοιχα). Όσον αφορά στη θερμοκρασία, διατηρώντας σταθερή πίεση 80 mbar και εξετάζοντας τον μέσο ρυθμό συμπύκνωσης των θερμοκρασιών 45 °C και 50 °C παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά 5 °C ο μέσος ρυθμός συμπύκνωσης αυξήθηκε κατά 2,42 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού.

Το επόμενο στάδιο της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών που μελετήθηκε ήταν η ενζυμική αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης μέσω της οποίας γίνεται η μετατροπή της λακτόζης σε πρεβιοτικά. Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν παρατηρήθηκε ότι η απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαριτές μετά από 8 h αντίδρασης ήταν 25,1 % w/v.

Με σκοπό την αξιολόγηση της δυνατότητας κλιμάκωσης της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση υπό κενό και ενζυμική αντίδραση σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα ταυτόχρονα στις ίδιες ακριβώς συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Σε σχέση με τη συμπύκνωση υπό κενό, οι συνθήκες λειτουργίας ήταν 60 °C και 100 mbar. Ο μέσος ρυθμός συμπύκνωσης ανά L μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού που επιτεύχθηκε στην περίπτωση της εργαστηριακής κλίμακας ήταν 5,41 mL/min ανά L ασυμπύκνωτου όξινου ορού, ενώ στην πιλοτική κλίμακα 2,94 mL/min ανά L ασυμπύκνωτου όξινου ορού. Αναφορικά με την ενζυμική αντίδραση, τα αποτελέσματα της ανάλυσης της συγκέντρωσης των σακχάρων ανέδειξαν πτώση της απόδοσης μετατροπής. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση μετατροπής μειώθηκε κατά 25 %.

Για την ένταξη του διαλύματος GOS που παράχθηκε στην κλασική κρέμα βανίλιας πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμές για την εύρεση της κατάλληλης μορφής και της ορθότερης αναλογίας των συστατικών. Τελικά, το καλύτερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα, σύμφωνα με τους δοκιμαστές, προέκυψε με τη χρήση εξουδετερωμένου συμπυκνωμένου διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών σε αναλογία 14 %.

Οι κρέμες που παράχθηκαν υποβλήθηκαν σε έλεγχο διατηρησιμότητας σε δύο θερμοκρασίες (4 και 8 °C) για 51 ημέρες. Τα αποτελέσματα μέτρησης της μικροβιολογικής ποιότητας έδειξαν ότι η προσθήκη διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών συνέβαλε στη καθυστέρηση ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, στις κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες, τα εντεροβακτήρια εμφάνισαν ανιχνεύσιμο μικροβιακό φορτίο 5 ημέρες αργότερα απ' ότι στα δείγματα αναφοράς (26^η και 21^η ημέρα αποθήκευσης αντίστοιχα), ανεξαρτήτως θερμοκρασίας αποθήκευσης. Στην περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών/μυκήτων, η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρέασε την ανάπτυξή τους, καθώς τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 8 °C, ανεξαρτήτως προσθήκης γαλακτοολιγοσακχαριτών, παρουσίασαν ανιχνεύσιμο μικροβιακό φορτίο την 21^η ημέρα αποθήκευσης. Παρ' όλα αυτά τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσίασαν ανιχνεύσιμο μικροβιακό φορτίο σε γαλακτικά βακτήρια και ζύμες/μύκητες την 26^η ημέρα αποθήκευσης, ενώ τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς την 21^η ημέρα αποθήκευσης. Στο σύνολο των 51 ημερών αποθήκευσης, τα δείγματα που περιείχαν γαλακτοολιγοσακχαρίτες και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές μικροβιακού φορτίου σε όλους τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς. Παράλληλα, εκτιμήθηκε ο χρόνος διατήρησης των δειγμάτων αξιοποιώντας το μοντέλο Baranyi & Roberts και θέτοντας ως όριο αλλοίωσης μικροβιακό φορτίο ολικής μικροβιακής χλωρίδας ίσο με $7 \log_{10} \text{CFU/g}$. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι οι κρέμες που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C είχαν χρόνο διατήρησης 81 ημέρες στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς και 80 στην περίπτωση των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 8 °C είχαν χρόνο διατήρησης 66 και 63 ημέρες, αντίστοιχα.

Τα δείγματα υποβλήθηκαν επίσης σε μετρήσεις χρώματος. Τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες είχαν υψηλότερη τιμή της παραμέτρου b των συντεταγμένων χρώματος λόγω της ριβοφλαβίνης που περιέχουν, ενώ το μέτρο ΔE παρέμεινε σταθερό σε όλα τα δείγματα κατά το διάστημα αποθήκευσης και στις δύο θερμοκρασίες. Η τιμή της μετρούμενης οξύτητας (pH) των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες ήταν 6,8 και των δειγμάτων αναφοράς 6,6. Οι τιμές αυτές παρέμειναν σταθερές σε όλο το διάστημα αποθήκευσης και δεν επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Αντίστοιχα, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες ήταν υψηλότερη κατά 15,8 % στην περίπτωση των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C και κατά 5,78 % στην περίπτωση των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 8 °C, την 51^η ημέρα αποθήκευσης (1,98 και 1,85 % γαλακτικό οξύ για τις κρέμες με GOS αντίστοιχα). Η αυξημένη αυτή τιμή οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που προϋπάρχει στον όξινο ορό γιαουρτιού.

Αναφορικά με τη συναίρεση, τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς παρουσίασαν υψηλότερη τιμή του ποσοστού αποβαλλόμενου ορού 24 h μετά την παραγωγή τους. Παρ' όλα αυτά, παρουσίασαν σταθερότητα σε όλο το διάστημα αποθήκευσης σε αντίθεση με τα δείγματα αναφοράς που παρουσίασαν αύξηση. Η μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών έδειξε ότι όλα τα δείγματα συμπεριφέρονταν σαν ψευδοπλαστικά ρευστά και το φαινόμενο ιξώδες τους παρουσιάζει τάση μείωσης με τον χρόνο αποθήκευσης. Η παρόμοια συμπεριφορά όλων των δειγμάτων απέδειξε ότι η προσθήκη διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών δεν επηρεάζει τα ρεολογικά χαρακτηριστικά των κρεμών.

Επιπλέον, μέσω της μέτρησης της αντικειμενικής υφής των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι οι κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν σταθερότητα στα υπολογισμένα μεγέθη (πηκτότητα, προσκολλησιμότητα, δείκτη ελαστικότητας, κομμιώδες). Αντίθετα, τα δείγματα

αναφοράς παρουσίασαν αρχικά μείωση και έπειτα αύξηση της τιμής της πηκτότητας και του κομμώδους λόγω του μεγάλου ποσοστού αποβαλλόμενου ορού. Από την άλλη πλευρά, η προσκολλησιμότητα των δειγμάτων αναφοράς παρουσίασε την αντίστροφη εξέλιξη με τον χρόνο αποθήκευσης ανεξαρτήτως θερμοκρασίας αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων. Οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες την 1^η ημέρα αποθήκευσης με υψηλότερη βαθμολογία στα χαρακτηριστικά συνεκτικότητα, κρεμμώδης και ζελατινώδης υφή. Μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσίασαν σταθερότητα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ενώ τα δείγματα αναφοράς αξιολογήθηκαν πιο όξινα και λιγότερο γλυκά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια συνολική οικονομική ανάλυση του κόστους παραγωγής των κρεμών με σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών σε πιλοτική κλίμακα. Η διεργασία παραγωγής των κρεμών δεν διαφοροποιήθηκε καθόλου από την κλασική παραγωγή τους. Η μοναδική διαφοροποίηση έγκειται στην αντικατάσταση μέρους του γάλακτος από σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών, οπότε η επιβάρυνση που θα έχει το κόστος παραγωγής αφορά αποκλειστικά και μόνο στην παραγωγή του διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών. Μέσω της ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι η συνολική επιβάρυνση που θα επιβληθεί επιπλέον είναι 0,25 € ανά κρέμα 130 g. Στο κόστος αυτό περιλαμβάνεται το κόστος λειτουργίας και εγκατάστασης με σκοπό την απόσβεση του νέου εξοπλισμού σε 10 χρόνια από την ημέρα έναρξης παραγωγής των κρεμών. Το μεγαλύτερο μέρος του κόστους καταλαμβάνει η ενεργειακή κατανάλωση, της οποίας το ποσοστό συμμετοχής στο συνολικό κόστος είναι 68%.

Production process of prebiotic galactooligosaccharides from yogurt acid whey and application in a food product

The aim of this thesis was to study the production process of galactooligosaccharides from yogurt acid whey using β -galactosidase enzyme and their incorporation into a food product. The product chosen is vanilla cream. Its main selection criterion was the possibility of its production by the dairy industry that produces the yogurt acid whey.

In order to evaluate the process, β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* was used. First, the activity of the enzyme was calculated, which was found to be 5.18 Units/mL. Next, the process of concentrating the yogurt acid whey to a final lactose concentration of 20 % w/v was studied. The condensation was carried out in a vacuum rotary evaporator and the parameters studied were the operating pressure and temperature. Regarding the pressure, two different pressures were studied at each of the selected temperatures. At 45 °C, the operating pressure was set at 80 and 75 mbar and at 50 °C at 80 and 85 mbar. Increasing the operating pressure by 5 mbar resulted in a reduction of the condensation rate by 35 % at 45 °C (2.82 and 1.84 mL/min per L non-condensed acid whey respectively) and by 15 % at 50 °C (4.23 and 3.60 mL/min per L non-condensate acid whey respectively). Regarding the temperature, keeping a constant pressure of 80 mbar and examining the average condensation rate at temperatures of 45 °C and 50 °C it was observed that with a temperature increase of 5 °C the average condensation rate increased by 2.42 mL/min per L of unconcentrated acid whey.

The next stage of the galactooligosaccharides production process that was studied was the transgalactosylation reaction which convert lactose into prebiotics. The enzyme (β -galactosidase from *A. oryzae*) was studied for the ability to produce galactooligosaccharides. After the analysis of the obtained results, it was observed that the conversion efficiency of lactose into galactooligosaccharides after 8 h of reaction was 25.1 % w/v.

In order to evaluate the possibility of scaling up the galactooligosaccharides production process, vacuum condensation and enzymatic reaction were carried out on a laboratory and semi-industrial scale at the same time under exactly the same pressure and temperature conditions. In relation to vacuum condensation, the operating conditions were 60 °C and 100 mbar. The average concentration rate per L of unconcentrated whey obtained in the laboratory scale case was 5.41 mL/min per L of unconcentrated whey, while at the semi-industrial scale it was 2.94 mL/min. Regarding the enzymatic reaction, the results of the analysis of the concentration of sugars showed an expected drop in the conversion efficiency. More specifically, the conversion rate decreased by 25%.

For the addition of the GOS solution in the classic vanilla cream, a series of tests were carried out to determine the appropriate form and the correct ratio of the ingredients. Finally, the best sensory result, according to the members of the sensory panel, was obtained by using a neutralized concentrated solution of galactooligosaccharides at a ratio of 14 %.

The shelf life of the produced cream samples was evaluated at two temperatures (4 and 8 °C). Microbial quality measurement results showed that the addition of galactooligosaccharides solution contributed to delaying the growth of microorganisms. More specifically, the enterobacteria was detected 5 days later than in the control samples (26th and 21st day of storage) regardless of the storage temperature. In the case of lactic acid bacteria and yeasts/fungi, storage temperature affected their growth, as samples stored at 8 °C, regardless of the addition of galactooligosaccharides, showed a detectable microbial load on the 21st day of storage. Nevertheless, the samples with galactooligosaccharides stored at 4 °C showed a detectable microbial load in lactic acid bacteria and yeasts and moulds on the 26th day of storage, while the corresponding control samples on the 21st day of storage. In the total of 51 days of storage, the samples containing galactooligosaccharides and stored at 4 °C presented the lowest microbial load values in all the studied microorganisms. At the same time, the shelf life of the samples was estimated by setting as a spoilage limit a microbial load of total microbial flora equal to 7 log₁₀CFU/g and utilizing the Baranyi and Roberts model. The results of the analysis showed that the creams stored at 4 °C had a shelf life of 81 days in the case of the reference samples and 80 in the case of the samples with galactooligosaccharides. On the other hand, samples stored at 8 °C had a shelf life of 66 and 63 days without and with the addition of galactooligosaccharides, respectively.

The samples were also subjected to color measurements. The samples with galactooligosaccharides had a higher value in the b parameter of the color coordinates due to the riboflavin they contain, while the ΔE measure remained constant in all samples during the storage period at both temperatures. The value of the measured acidity (pH) of the samples with galactooligosaccharides was 6.8, while that of the control samples was 6.6. These values remained constant throughout the storage period and were not affected by the storage temperature. Accordingly, the titratable acidity of samples with galactooligosaccharides was higher by 15.8 % in the case of samples stored at 4 °C and by 5.78 % in the case of samples stored at 8 °C on the 51st day of storage (1.98 and 1.85% lactic acid for creams with GOS respectively). This increased value is due to the lactic acid that pre-exists in the acid whey.

Regarding the whey separation, the samples with galactooligosaccharides compared to the control samples presented a higher value of the percentage of serum eliminated 24 h after their production. Nevertheless, they showed stability throughout the storage period in contrast to the control samples which showed an increase. The measurement of the rheological characteristics showed that all samples exhibited pseudoplastic behavior and their viscosity showed a tendency to decrease with storage time. The similar behavior of all samples showed that the addition of galactooligosaccharides solution does not affect the rheological characteristics of the cream samples.

In addition, through the measurement of the instrumental texture of the samples, it was found that the cream samples with galactooligosaccharides showed stability in the calculated sizes (Firmness, Adhesiveness, Springiness, Gumminess). In contrast, the reference samples showed a decrease of the viscosity and gumminess and an increase in adhesion with storage time regardless of storage temperature. These results were confirmed by the sensory evaluation of the samples. The testers evaluated the samples with galactooligosaccharides on the 1st day of storage with a higher score in the characteristics consistency, creaminess and gelatinous texture. After 26 days of storage, the samples with galactooligosaccharides showed stability in their characteristics, while the control samples were evaluated as more acidic and less sweet.

Finally, an overall economic analysis of the production cost of the cream samples with galactooligosaccharides syrup on a pilot scale was performed. The production process of the cream samples did not differ as compared to their classic production. The only difference lies in replacing part of the milk with galactooligosaccharides syrup, so the extra production cost concerns only the production of the galactooligosaccharides syrup. Through the analysis, it was found that the total additional charge to be imposed is €0.25 per 130 g cream. This cost includes the cost of operation and installation in order to amortize the new equipment in 10 years from the day cream production starts. The largest part of the cost is occupied by energy consumption, whose participation rate in the total cost is 68%.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	ii
Περίληψη	iv
English Summary	viii
Ευρετήριο Εικόνων.....	xvi
Ευρετήριο Πινάκων	xvii
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	xviii
Κεφάλαιο 1 ^ο : Όξινος Ορός Στραγγιστού Γιαουριού	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Παραγωγή Γιαουριού.....	2
1.3 Στραγγιστό Γιαούρτι ή Ελληνικού Τύπου Γιαούρτι.....	3
1.4 Όξινος Ορός Γιαουριού	4
1.4.1 Λακτόζη	4
1.4.2 Πρωτεΐνες.....	5
1.4.3 Γαλακτικό Οξύ	5
1.4.4 Μέταλλα.....	6
1.5 Όξινος Ορός Γιαουριού ως περιβαλλοντικό πρόβλημα	6
1.6 Χρήσεις του Όξινου Ορού Γιαουριού.....	7
1.6.1 Χρήση ως εδαφοβελτιωτικό	7
1.6.2 Χρήση ως ζωοτροφή.....	8
1.6.3 Αναερόβια Χώνευση-Παραγωγή Βιοκαυσίμων	8
1.6.4 Χρήση στην παραγωγή προϊόντων τύπου γιαουριού	8
1.6.5 Χρήση στην παραγωγή τυριών και άλλων προϊόντων με βάση το γάλα	9
1.6.6 Χρήση ως μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών	9
1.6.7 Παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης και διατροφικής αξίας.....	9
Κεφάλαιο 2 ^ο : Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της λακτόζης.....	11
2.1 Εισαγωγή.....	11
2.2 Βιομηχανική αξιοποίηση β-γαλακτοζιδάσης.....	11
2.3 Τρόποι Παραλαβής.....	13
2.3.1 Φυτικές Πηγές	13
2.3.2 Βακτήρια.....	13
2.3.3 Ζύμες	14
2.3.4 Μύκητες	14
Κεφάλαιο 3 ^ο : Γαλακτοολιγοσακχαρίτες.....	15
3.1 Δομή.....	15
3.2 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών	15

3.2.1 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω εκχύλισης φυτών	15
3.2.2 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω ενζυμικής σύνθεσης	16
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης.....	16
3.3.1 Συγκέντρωση Λακτόζης	16
3.3.2 Συγκέντρωση Γαλακτόζης	16
3.3.3 Συνθήκες Δράσεις Ενζύμου	16
3.3.4 Προέλευση β-γαλακτοζιδάσης	17
3.3.5 Ακινητοποίηση Ενζύμου	17
3.3.6.Τύπος Αντιδραστήρα	18
3.4 Απομόνωση GOS	18
3.4.1 Χρήση ενεργού άνθρακα	18
3.4.2 Χρήση στήλης ιοντοεναλλαγής.....	19
3.4.3 Επιλεκτική Ζύμωση.....	19
3.4.4 Χρήση νανοδιήθησης	19
3.4.5 Χρήση υπερκρίσιμου ρευστού	20
3.5 Τα οφέλη των γαλακτοολιγοσακχαριτών στον άνθρωπο	20
3.6 Χρήσεις των Γαλακτοολιγοσακχαριτών	20
3.6.1 Προσθήκη σε βρεφικά γάλατα	21
3.6.2 Χρήση ως γλυκαντικό μέσο	21
3.6.3 Χρήση για την παραγωγή προϊόντων με πρεβιοτική δράση	22
3.6.4 Χρήση ως ζωτροφή.....	22
Κεφάλαιο 4 ^ο : Πειραματικός σχεδιασμός - Υλικά και μέθοδοι.....	23
4.1 Σκοπός και στόχοι.....	23
4.2 Υλικά-Αντιδραστήρια.....	23
4.3 Μέτρηση της Ενζυμικής Ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης	24
4.4 Συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα	25
4.5 Μέτρηση περιεκτικότητας σακχάρων	26
4.5.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector, HPLC-RID).....	27
4.5.2 Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)	28
4.6 Ενζυμική Αντίδραση Τρανσγαλακτοζυλίωσης σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα.....	28
4.6 Εξουδετέρωση διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών	29
4.7 Συμπύκνωση σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών	30
4.8 Παραγωγή σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών	30

4.9 Παραγωγή κρέμας βανίλιας με σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	31
4.10 Έλεγχος διατηρησιμότητας προϊόντων.....	32
4.10.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	32
4.10.2 Μέτρηση Χρώματος	32
4.10.3 Μέτρηση Οξύτητας και pH	33
4.10.4 Μέτρηση Συναίρεσης	33
4.10.5 Μέτρηση Ιξώδους.....	34
4.10.6 Ανάλυση Υφής	35
4.10.7 Οργανοληπτική Αξιολόγηση.....	36
4.11 Μαθηματική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	37
4.11.1 Απόδοση Μετατροπής Λακτόζης σε Γαλακτοολιγοσακχαρίτες.....	37
4.11.2 Μικροβιακός Ρυθμός Ανάπτυξης	38
4.12 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	38
4.12.1 Κλασικές Τεχνικές Στατιστικής Επεξεργασίας.....	38
4.12.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	38
Κεφάλαιο 5 ^ο : Αποτελέσματα και συζήτηση.....	39
5.1 Καμπύλες αναφοράς λακτόζης, γαλακτόζης, γλυκόζης και ραφινόζης	39
5.1.1 Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης.....	39
5.1.2 Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης	39
5.1.3 Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης	40
5.1.4 Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης.....	41
5.1.5 Καμπύλη Αναφοράς Μίγματος Σακχάρων.....	41
5.1.6 Καμπύλες Αναφοράς Υγρης Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή	43
5.2 Καμπύλη Αναφοράς Ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης.....	44
5.3 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης.....	45
5.4 Μελέτη συμπίκνωσης όξινου ορού γιαουρτιού σε εργαστηριακή κλίμακα.....	45
5.4.1 Επίδραση πίεσης λειτουργίας στο ρυθμό συμπίκνωσης.....	46
5.4.2 Επίδραση θερμοκρασίας λειτουργίας στο ρυθμό συμπίκνωσης	47
5.4.3 Επίδραση πίεσης λειτουργίας στη συγκέντρωση λακτόζης και γαλακτόζης	48
5.4.4 Επίδραση θερμοκρασίας λειτουργίας στη συγκέντρωση λακτόζης και γαλακτόζης	50
5.5 Ενζυμική αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης.....	50
5.5.1 Μεταβολή συγκεντρώσεων σακχάρων και απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες με τη χρήση β-γαλακτοζιδάσης από <i>Aspergillus oryzae</i>	51
5.6 Κλιμάκωση διεργασίας ενζυμικής παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού	52

5.6.1 Συμπύκνωση όξινού ορού γιαουρτιού σε πιλοτική κλίμακα	52
5.6.2 Αντίδραση τρανσγαλακτοζύλιωσης σε μεγαλύτερη κλίμακα	54
5.7 Ενσωμάτωση γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού σε προϊόν διατροφής (κρέμα βανίλιας) – Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας	55
5.6.1 Αποτελέσματα Μικροβιολογικής Ανάλυσης	56
5.6.2 Μεταβολή Χρώματος	59
5.6.3 Μεταβολή μετρούμενης (pH) και τιτλοδοτούμενης οξύτητας	60
5.6.4 Συνείρεση	62
5.6.5 Μεταβολή του ιξώδους	62
5.6.6 Ανάλυση Υφής	63
5.6.7 Αποτελέσματα Οργανοληπτικής Αξιολόγησης	66
5.6.8 Σχέση αντικειμενικών μετρήσεων και οργανοληπτικής αξιολόγησης	71
5.7 Οικονομική ανάλυση παραγωγής κρέμας με γαλακτοολιγοσακχαρίτες	72
Συμπεράσματα	75
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	78
Βιβλιογραφία	79

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1. Προβλεπόμενη αύξηση της αγοράς γιαουρτιού μέχρι το 2027	1
Εικόνα 2.1. Δομή β-γαλακτοζιδάσης	11
Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση των δύο σταδίων της τρανσγαλακτοζυλίωσης	12
Εικόνα 3.1. Τυπική μορφή γαλακτοολιγοσακχαριτών	15
Εικόνα 4.1. Φωτόμετρο απλής δέσμης Unicam Helios α	25
Εικόνα 4.2. Εργαστηριακή διάταξη συμπίκνωσης υπό	26
Εικόνα 4.3. Διάταξη πιλοτικής κλίμακας για την συμπίκνωση υπό κενό	26
Εικόνα 4.4. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης	27
Εικόνα 4.5. Διάταξη αντίδρασης όξινου ορού γιαουρτιού με την χρήση β-γαλακτοζιδάσης από <i>A.oryzae</i>	29
Εικόνα 4.6. Διάταξη αντίδρασης όξινου ορού γιαουρτιού με την χρήση β-γαλακτοζιδάσης από <i>A.oryzae</i> σε αρχικό όγκο διαλύματος 3L	29
Εικόνα 4.7. Συσκευή ξήρανσης με ψεκασμό Büchi Mini Spray Dryer B-191	30
Εικόνα 4.8. Θέρμανση του μίγματος γάλακτος και διαλύματος GOS σε ειδικό θερμαινόμενο δοχείο	31
Εικόνα 4.9. Παραμονή των έτοιμων προϊόντων σε αποστειρωμένο περιβάλλον	32
Εικόνα 4.10. Χρωματόμετρο Minolta CR-200	33
Εικόνα 4.11. Φυγοκεντρικό σύστημα Thermo SCIENTIFIC MEGAFUGE 16R	34
Εικόνα 4.12. Περιστροφικό ιξωδόμετρο RC1 Rheometer	34
Εικόνα 4.13. Αναλυτής Υφής TA-XT2i	35
Εικόνα 4.14. Τυπικό διάγραμμα TPA	35
Εικόνα 5.1. Διάγραμμα Ροής της διεργασίας παραγωγής σιροπιού GOS	74

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1.1. Σύσταση όξινου ορού γιαουρτιού	4
Πίνακας 4.1 Πρόγραμμα διαβάθμισης διαλυτών του συστήματος HPAEC-PAD	28
Πίνακας 4.2. Έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης δειγμάτων κρέμας με ή χωρίς ενσωμάτωση GOS	37
Πίνακας 5.1. Συνθήκες επώασης και υπολογισμένες τιμές ενεργότητας του ενζύμου	45
Πίνακας 5.2. Υπολογισμός του χρόνου συμπύκνωσης 1 L όξινου ορού γιαουρτιού από αρχική συγκέντρωση λακτόζης 3,5 % w/v σε τελική συγκέντρωση λακτόζης 20 % w/v	47
Πίνακας 5.3. Τιμές των υπολογισμένων μεγεθών μικροβιακής ανάπτυξης από το μοντέλο Bayanji & Roberts για όλα τα δείγματα	58
Πίνακας 5.4. Κόστος εξοπλισμού βιομηχανικής κλίμακας για την παραγωγή GOS	74

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 5.1. Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης	39
Διάγραμμα 5.2. Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης.....	40
Διάγραμμα 5.3. Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης.....	40
Διάγραμμα 5.4. Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης	41
Διάγραμμα 5.5. Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης σε μίγμα σακχάρων	42
Διάγραμμα 5.6. Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης σε μίγμα σακχάρων	42
Διάγραμμα 5.7. Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης σε μίγμα σακχάρων	43
Διάγραμμα 5.8. Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης σε μίγμα σακχάρων	43
Διάγραμμα 5.9. Καμπύλες Αναφοράς Γαλακτόζης, Γλυκόζης, Λακτόζης, Ραφινόζης σε μίγμα σακχάρων	44
Διάγραμμα 5.10. Καμπύλη Αναφοράς oNP	45
Διάγραμμα 5.11. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε θερμοκρασία 45 °C και πίεση 80 και 75 mbar	46
Διάγραμμα 5.12. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε θερμοκρασία 50 °C σε πίεση 80 και 85 mbar	46
Διάγραμμα 5.13. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε πίεση 80 και θερμοκρασίες 45 °C και 50 °C.....	48
Διάγραμμα 5.14. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της γαλακτόζης (B) στους 45 °C σε πίεση 80 και 75 mbar	48
Διάγραμμα 5.15. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της γαλακτόζης (B) στους 50 °C σε πίεση 80 και 85 mbar	49
Διάγραμμα 5.16. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της γαλακτόζης (B) σε πίεση 80 mbar και θερμοκρασία 45 και 50 °C.....	50
Διάγραμμα 5.17. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και των μονοσακχαριτών γαλακτόζη-γλυκόζη (B) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A. oryzae</i>	51
Διάγραμμα 5.18. Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής της λακτόζης σε GOS με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A. oryzae</i>	51
Διάγραμμα 5.19. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα εργαστηριακής κλίμακας.....	53
Διάγραμμα 5.20. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα πιλοτικής κλίμακας.....	53

Διάγραμμα 5.21. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (B) με τον χρόνο υπο την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A. oryzae</i> σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L	54
Διάγραμμα 5.22. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης (A) και της γλυκόζης (B) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A. oryzae</i> σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L	54
Διάγραμμα 5.23. Επίδραση της περιεκτικότητας της κρέμας σε σιρόπι GOS (A) και της εξουδετέρωσης του σιροπιού (B) στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων.....	55
Διάγραμμα 5.24. Μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας εκφρασμένης ως \log_{10} CFU/g με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα	56
Διάγραμμα 5.25. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων εκφρασμένων ως \log_{10} CFU/g με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα.....	56
Διάγραμμα 5.26. Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και των μυκήτων εκφρασμένων ως \log_{10} CFU/g με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα.....	57
Διάγραμμα 5.27. Μεταβολή του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων εκφρασμένων ως \log_{10} CFU/g με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα.....	58
Διάγραμμα 5.28. Μεταβολή του μικροβιακού φορτίου με το χρόνο αποθήκευσης σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα και το μοντέλο Baranyi & Roberts για το Control 4 (A), Control 8 (B), GOS 4 (Γ), GOS 8 (Δ)	59
Διάγραμμα 5.29. Μεταβολή των παραμέτρων L (A), b (B) και του μέτρου ΔE (Γ) με τον χρόνο για όλα τα δείγματα	60
Διάγραμμα 5.30. Μεταβολή του pH με τον χρόνο των δειγμάτων.....	61
Διάγραμμα 5.31. Μεταβολή της οξύτητας εκφρασμένης ως ποσοστό γαλακτικού οξέος με τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων	61
Διάγραμμα 5.32. Μεταβολή της ποσότητας ορού που αποβάλλεται εκφρασμένο ως ποσοστό αποβαλλόμενου ορού με τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων.....	62
Διάγραμμα 5.33. Μεταβολή του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) (A), του συντελεστή συνεκτικότητας (k) (B) και του ιξώδους (Γ) όλων των δειγμάτων στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης	63
Διάγραμμα 5.34. Μεταβολή της πηκτότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης ..	64
Διάγραμμα 5.35. Μεταβολή της προσκολλησιμότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης	65
Διάγραμμα 5.36. Μεταβολή του κομμώδους των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης..	65
Διάγραμμα 5.37. Μεταβολή της συνεκτικότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης	66
Διάγραμμα 5.38. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 24 h μετά την παραγωγή τους	66

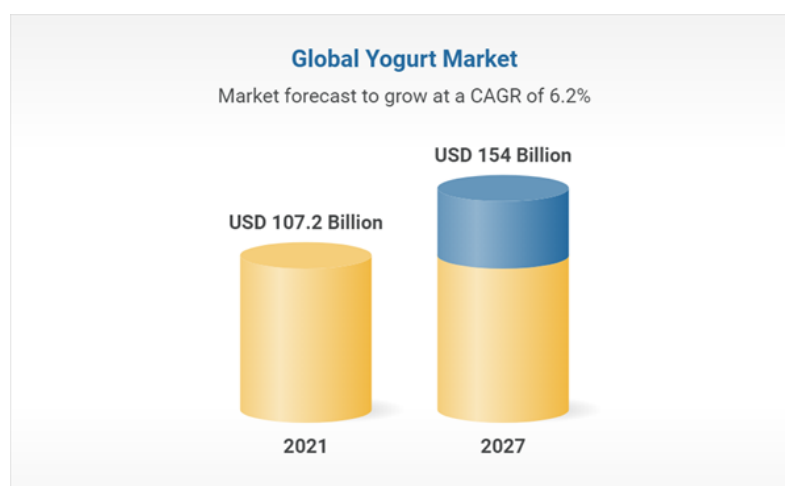
Διάγραμμα 5.39. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Άρωμα 24 h μετά την παραγωγή τους	67
Διάγραμμα 5.40. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Γεύση 24 h μετά την παραγωγή τους.....	67
Διάγραμμα 5.41. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο κουτάλι 24 h μετά την παραγωγή τους.....	68
Διάγραμμα 5.42. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο στόμα 24 h μετά την παραγωγή τους	68
Διάγραμμα 5.43. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους.....	69
Διάγραμμα 5.44. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Άρωμα 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους.....	69
Διάγραμμα 5.45. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Γεύση 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους	70
Διάγραμμα 5.46. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο κουτάλι 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους	70
Διάγραμμα 5.47. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο στόμα 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους.....	70
Διάγραμμα 5.48. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών για την συσχέτιση των αντικειμενικών μετρήσεων και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων	72
Διάγραμμα 5.49. Ποσοστό συμμετοχής της εκάστοτε διεργασίας στη συνολική ενεργειακή κατανάλωση για την παραγωγή GOS	73

Κεφάλαιο 1^ο

Όξινος Ορός Στραγγιστού Γιαουρτιού

1.1 Εισαγωγή

Το γιαούρτι είναι το πιο διαδεδομένο ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν. Η ύπαρξή του εντοπίζεται έως και το 5000 π.Χ. στη κεντρική Ασία και τη Μεσοποταμία (Desai et al. 2013). Από τους αρχές του 20^{ου} αιώνα μεταφέρθηκε στην αμερικανική ήπειρο και άρχισε να γίνεται δημοφιλές σε όλη την υφήλιο. Παράγεται με ζύμωση και πήξη του γάλακτος μέτουσσης δράσης μικτής καλλιέργειας που περιλαμβάνει υποχρεωτικά τους μικροοργανισμούς *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών προκειμένου το τελικό προϊόν να χαρακτηριστεί ως γιαούρτι θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10^7 CFU/g προϊόντος (ΦΕΚ 2467/2016) κατά την ημερομηνία ανάλωσής του. Η σύστασή του το καθιστά ιδιαίτερα επιθυμητό στους καταναλωτές αφού πρόκειται για προϊόν με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (5-8%) και ασβέστιο, ενώ παράλληλα το θερμιδικό του περιεχόμενο παραμένει σχετικά χαμηλό (Karastamatis et al. 2022). Το γιαούρτι αποτελεί μια καλή πηγή βιταμινών και ασβεστίου, καθώς διαθέτει μεγαλύτερη ποσότητα ασβεστίου ακόμη και από το γάλα από το οποίο προέρχεται. Τα γιαούρτια ενισχύονται τόσο θρεπτικά όσο και γευστικά. Οι γαλακτοβιομηχανίες προσθέτουν συστατικά όπως η σκόνη ορού γάλακτος, το οξείδιο του σιδήρου, το οξείδιο του ψευδαργύρου και πλήθος φρούτων και λαχανικών που εμπλουτίζουν το γιαούρτι με ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και σάκχαρα που το μετατρέπουν σε ένα πιο γευστικό προϊόν (Ahmad et al. 2022, Matumoto-Pintro et al. 2011). Η μεγάλη δημοφιλία του σε παγκόσμια κλίμακα τα τελευταία χρόνια επιβεβαιώνεται από τη ραγδαία αύξηση της παραγωγής του, καθώς το 2021 η αξία της παγκόσμιας αγοράς γιαουρτιού ανήρθε στα 107,2 δισεκατομμύρια δολάρια και αναμένεται να φτάσει τα 154 δισεκατομμύρια δολάρια το 2027, γνωρίζοντας ετήσια αύξηση της τάξης του 6,2% (εικόνα 1.1) (RandM, 2022).



Εικόνα 1.1. Προβλεπόμενη αύξηση της αγοράς γιαουρτιού μέχρι το 2027 (Πηγή: RandM, 2022)

Το γιαούρτι διαθέτει ορισμένα μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ελκυστικό στους καταναλωτές. Η σταθερή δομή, η γλυκιά γεύση και το έντονο άρωμα είναι χαρακτηριστικά που αναζητούν οι καταναλωτές σε ένα γιαούρτι (Desai et al. 2013, Ichimura et al. 2022). Πρόκειται για ένα εποχιακά μεταβλητό προϊόν, καθώς η περίοδος συλλογής του γάλακτος καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη δομή του. Με βάση αυτό έχει αποδειχθεί ότι γιαούρτια που παράγονται με τη χρήση γάλακτος πρώτης περιόδου έχουν τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αυτά που προέρχονται από γάλατα ενδιάμεσης περιόδου παρουσιάζουν εντονότερη συναίρεση και χαμηλότερη συγκράτηση νερού ενώ αυτά που προέρχονται από την τελευταία περίοδο είναι πιο ανθεκτικά στη διατηρητική τάση και διαθέτουν μοναδικά ιξωδοελαστικά χαρακτηριστικά (Li et al. 2021).

Η ιδιαίτερη μορφή του γιαουρτιού με τη χαρακτηριστική δομή πήγματος οφείλεται στο σύμπλοκο της καζεΐνης με το φωσφορικό ασβέστιο στο ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης (pH=4,6). Αναλυτικότερα, το πήγμα δημιουργείται λόγω των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσει η καζεΐνη, τις διασυνδέσεις (cross-links) που σχηματίζει με τη βοήθεια του φωσφορικού ασβεστίου και τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσει με τις άλλες πρωτεΐνες του γάλακτος. Την τελευταία δεκαετία έχουν εντατικοποιηθεί οι προσπάθειες βελτιστοποίησης του πήγματος του γιαουρτιού και μείωσης της ανεπιθύμητης συναίρεσης. Μια από αυτές περιλαμβάνει την προσθήκη στερεών πρωτεϊνών γάλακτος και σταθεροποιητών όπως η πηκτίνη, η ζελατίνη και το άμυλο (Gyawali & Ibrahim 2016). Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου είναι ενθαρρυντικά καθώς δημιουργούνται όχι μόνο πιο σταθερά πήγματα, αλλά συγχρόνως και πιο θρεπτικά αφού διαθέτουν υψηλότερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών. Μία εξίσου αποτελεσματική πρακτική που έχει ήδη εφαρμοστεί είναι η θέρμανση του γάλακτος σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 70°C, με σκοπό το ξετύλιγμα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και επομένως την καλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της καζεΐνης και των άλλων πρωτεϊνών όπως η β-γαλακτογλοβουλίνη (Matumoto-Pintro et al. 2011).

1.2 Παραγωγή Γιαουρτιού

Η παραγωγή γιαουρτιού σύμφωνα με την παραδοσιακή προσέγγιση περιλαμβάνει το βράσιμο του γάλακτος μέχρι ο όγκος του να μειωθεί κατά το 1/3, κατόπιν τοποθετείται σε κύπελλα, εμβολιάζεται με μαγιά και επωάζεται στους 30-40°C. Τέλος ψύχεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες ψυγείου. Ωστόσο, οι σύγχρονες γαλακτοβιομηχανίες με σκοπό την επίτευξη όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφου και σταθερού προϊόντος έχουν προσθέσει κάποια επιπλέον στάδια στην παραγωγική διαδικασία. Αυτά είναι η τυποποίηση των λιπαρών, η τυποποίηση των στερεών υλών άνευ λιπαρών (ΣΥΑΛ) και η προσθήκη γλυκαντικών και σταθεροποιητών. Παράλληλα γίνεται καλύτερος έλεγχος των θερμοκρασιών καθώς αρχικά προθερμαίνεται στους 60 °C, έπειτα ομογενοποιείται με πίεση 17 MPa και παστεριώνεται στους 90-95 °C για λίγα λεπτά πριν ψυχθεί στους 45°C και εμβολιαστεί με την καλλιέργεια εκκίνησης (Ichimura et al. 2022). Ανάλογα με τον τρόπο πήξης του γιαουρτιού διακρίνονται 3 διαφορετικοί τύποι, το συνεκτικό, το αναμεμιγμένο και το στραγγιστό γιαούρτι. Πιο συγκεκριμένα, στο συνεκτικό γιαούρτι η πήξη γίνεται εντός των κυπέλλων που θα καταναλωθεί, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις η πήξη γίνεται εντός ειδικής δεξαμενής πήξης και στη συνέχεια είτε πραγματοποιείται εκ νέου ανάμιξη (αναμεμιγμένο) είτε αποστράγγιση των μη πηγμένων συστατικών.

1.3 Στραγγιστό Γιαούρτι ή Ελληνικού Τύπου Γιαούρτι

Το στραγγιστό ή ελληνικού τύπου γιαούρτι είναι το πιο δημοφιλές προϊόν γιαουρτιού. Ο κύριος λόγος της επικράτησής του είναι η θρεπτική του αξία καθώς συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους γιαουρτιού διαθέτει υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών και μετάλλων, λιγότερη λακτόζη και περισσότερα συνολικά στερεά (Lange et al. 2020). Η παραγωγή του περιλαμβάνει τον διαχωρισμό του πηγματος από το μη πηγμένο υγρό που ονομάζεται όξινος ορός γιαουρτιού (ΟΟΓ) ή απλά ορός γιαουρτιού. Ο διαχωρισμός αυτός μπορεί να γίνει με τρεις κύριους τρόπους καθένα από τους οποίους έχει ορισμένα πλεονεκτήματα.

Ο πρώτος εξ αυτών καλείται παραδοσιακός και περιλαμβάνει τη χρήση ειδικών υφασμάτων σάκων. Η διεργασία διαχωρισμού προϋποθέτει την παραμονή του γιαουρτιού που έχει παραχθεί από τη γαλακτική ζύμωση εντός των σάκων για 15-20 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 10 °C. Σε αυτή την περίπτωση, ο διαχωρισμός οφείλεται είτε στη βαρυτική δύναμη είτε στην άσκηση πίεσης με σκοπό την απομάκρυνση του υγρού τμήματος. Προφανώς πρόκειται για μια εξαιρετικά αργή μέθοδο με χαμηλή απόδοση λόγω των υπολειμμάτων που παραμένουν στον υφασμάτινο σάκο. Επιπλέον, η χρήση των υφασμάτων σάκων αποτελεί επιπλέον μικροβιολογικό κίνδυνο για το παραγόμενο προϊόν και απαιτεί συνεχή έλεγχο και καθαρισμό (Aryana & Olson 2017). Παρά τα αρνητικά της μεθόδου έχει αποδειχθεί ότι το γιαούρτι που παράγεται με αυτό τον τρόπο έχει τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και είναι ιδιαίτερα επιθυμητό από τους καταναλωτές.

Ο δεύτερος τρόπος διαχωρισμού του πηγματος ονομάζεται μηχανικός διαχωρισμός και πραγματοποιείται με τη χρήση φυγοκέντρου. Η διεργασία αποτελείται από δύο κύρια στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η ζύμωση του γάλακτος μέχρι την επιθυμητή τιμή pH και ακολουθεί έντονη ανάδευση υπό θέρμανση στους 55-60 °C. Με τον τρόπο αυτό η καλλιέργεια των μικροοργανισμών παράγει το απαραίτητο γαλακτικό οξύ για την μείωση της τιμής του pH. Το δεύτερο στάδιο ξεκινά με τη ψύξη του προϊόντος στους 40°C και έπειτα την εισαγωγή στο φυγοκεντρικό σύστημα, όπου απομακρύνεται υγρό μέχρι το τελικό πήγμα να έχει την επιθυμητή περιεκτικότητα σε συνολικά στερεά. Πολύ συχνά προστίθεται ένα επιπλέον στάδιο όπου γίνεται προσθήκη λιπαρών, προκειμένου το τελικό προϊόν να είναι σύμφωνο με τις προδιαγραφές του και να έχει τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Το ζυμωμένο προϊόν που προκύπτει από αυτή τη μέθοδο δεν είναι εξίσου ποιοτικό με αυτό που παράγεται με τον παραδοσιακό τρόπο και επιπλέον απαιτεί αυξημένο κόστος θέρμανσης και ψύξης (Lange et al. 2020).

Η τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιείται κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια λόγω των πλεονεκτημάτων της σε θέματα απόδοσης, εξοικονόμησης χρόνου και μείωσης του αποβαλλόμενου ορού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση μεμβρανών και συγκεκριμένα μεμβρανών υπερδιήθησης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την ικανότητα ή όχι ορισμένων μορίων να διαπερνούν μία πολυμερική μεμβράνη με πόρους που δεν ξεπερνούν τα 10 nm. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν δύο προσεγγίσεις αξιοποίησης της υπερδιήθησης. Η πρώτη περιλαμβάνει την πραγματοποίηση υπερδιήθησης στο μη ζυμωμένο γάλα με σκοπό να προκύψει ένα συμπυκνωμένο γάλα με την επιθυμητή ποσότητα στερεών και επομένως ένα γιαούρτι με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος διαθέτει ένα σημαντικό μειονέκτημα το οποίο οφείλεται στη συμπύκνωση του γάλακτος. Κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης μέσω της διέλευσης από την πολυμερική μεμβράνη η ποσότητα του νερού, και κατ' επέκταση του διαλύματος, μειώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των υπόλοιπων συστατικών όπως το ασβέστιο. Μια σημαντική

αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε σχέση με τη γεύση του γιαουρτιού, καθώς ενισχύει την πικρή γεύση του. Η επόμενη προσέγγιση αυτής της μεθόδου στοχεύει στη συμπύκνωση του παραγόμενου γιαουρτιού. Αρχικά, παράγεται το γιαούρτι με την κλασική διεργασία, στη συνέχεια θερμαίνεται στους 40-50°C και διέρχεται μέσα από τη μεμβράνη υπερδιήθησης. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται συμπύκνωση του γιαουρτιού για να περιέχει την κατάλληλη περιεκτικότητα σε στερεά. Παρ' όλα αυτά σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται έντονη παρεμπόδιση της μεμβράνης και δυσκολία διέλευσης του πηγματος, με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγικότητα (Karastamatis et al. 2022, Lange et al. 2020).

1.4 Όξιнос Ορός Γιαουρτιού

Το υγρό που απομακρύνεται με την αποστράγγιση αποκαλείται ορός γιαουρτιού. Πρόκειται για ένα παραπροϊόν του γιαουρτιού και γενικότερα της γαλακτοβιομηχανίας με χαμηλή τιμή pH (περίπου 4,3-4,6) που συνήθως περιλαμβάνει το 55% των συστατικών του γάλακτος (Rocha-Mendoza et al. 2020). Λόγω της χαμηλής τιμής pH συχνά ονομάζεται όξιнос ορός γιαουρτιού (ΟΟΓ) ενώ το χρώμα είναι συνδυασμός κίτρινων και πράσινων αποχρώσεων και οφείλεται στη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη Β2). Η χημική σύστασή του παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Σύσταση όξινου ορού γιαουρτιού (Πηγή : Menchik et al. 2019)

Συστατικό	Περιεκτικότητα
Πρωτεΐνες (mg/g)	1,71-3,71
Λιπίδια (% w/w)	0-0,01
Τέφρα (% w/w)	0,64-0,75
Νερό (% w/w)	93,8-94
Ολικά Στερεά (% w/w)	6-6,2
Λακτόζη (% w/v)	3,35-3,5
Γαλακτικό Οξύ (% w/v)	0,64-0,65
Ασβέστιο (mg/100 g)	120-128
Φωσφόρος (mg/100 g)	66,5-69,2
Νάτριο (mg/100 g)	37,6-41,9
Κάλιο (mg/100 g)	156-169
Χλώριο (mg/100 g)	0,078-0,11

1.4.1 Λακτόζη

Η λακτόζη είναι το κύριο σάκχαρο του γάλακτος. Πρόκειται για ένα αναγωγικό σάκχαρο που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης. Τα δύο αυτά σάκχαρα συνδέονται μεταξύ τους με β-(1-4) γλυκοζιτικό δεσμό. Η γλυκαντική ικανότητα της λακτόζης αντιστοιχεί περίπου στο 30% της σακχαρόζης και το θερμιδικό της περιεχόμενο είναι 4 kcal/g. Σε σχέση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της έχει σχετικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (22g/100g νερού) σε σύγκριση με άλλους δισακχαρίτες (Gänzle 2022, Shendurse 2016). Εντός του ανθρώπινου οργανισμού βοηθά στην καλύτερη απορρόφηση μετάλλων όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο ψευδάργυρος και παράλληλα μπορεί να αναστείλει την δράση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών (Kwak et al. 2012). Προκειμένου όμως να γίνει εφικτή η απορρόφσή της είναι απαραίτητη η διάσπασή της από ένζυμα που ονομάζονται λακτάσες. Η δράση αυτών των ενζύμων έγκειται στην διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού και

την απελευθέρωση των δύο μονομερών. Σε περίπτωση απουσίας αυτού του ενζύμου καθίσταται αδύνατη η απορρόφηση της λακτόζης από τον άνθρωπο, γεγονός που οδηγεί σε στομαχικά και εντερικά προβλήματα. Η απουσία αυτού του ενζύμου χαρακτηρίζεται ως δυσανεξία στη λακτόζη και είναι μία παθολογική κατάσταση μη επικίνδυνη. Τα άτομα που πάσχουν από αυτή αδυνατούν να καταναλώσουν γαλακτοκομικά προϊόντα που περιέχουν λακτόζη. Τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη έχουν πολλαπλασιαστεί τα τελευταία χρόνια και για αυτό τον λόγο παράγονται όλο και περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς λακτόζη.

1.4.2 Πρωτεΐνες

Το περιεχόμενο του ορού σε πρωτεΐνες είναι σχετικά μικρό σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς περιέχει περίπου 2,5 mg πρωτεΐνης/g ορού. Οι κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον όξινο ορό είναι η α-γαλακτοαλβουμίνη και η β-γαλακτογλοβουλίνη. Η α-γαλακτοαλβουμίνη αποτελεί το 20% των πρωτεϊνών του όξινου ορού και βρίσκεται σε σημαντικό ποσοστό στο μητρικό γάλα. Η παρουσία της εντός του ανθρώπινου οργανισμού εξασφαλίζει την παροχή πλήθους σημαντικών αμινοξέων. Παράλληλα, η δράση της σχετίζεται με την καλή διάθεση και την σωστή λειτουργία του εγκεφάλου (Sharma 2019). Η συνεισφορά της αυτή οφείλεται στο υψηλό ποσοστό τρυπτοφάνης που περιέχει. Η παρουσία της τρυπτοφάνης συμβάλει στην αύξηση των επιπέδων σεροτονίνης και επομένως στην καταπολέμηση του άγχους και της κατάθλιψης. Από την άλλη, η β-γαλακτογλοβουλίνη αποτελεί περίπου το 65% των πρωτεϊνών του ορού και 10% των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος. Αποτελεί κύρια πρωτεΐνη του γάλακτος των θηλαστικών, αλλά δεν έχει ανιχνευθεί στο μητρικό γάλα των ανθρώπων. Η πρωτεόλυσή της εντός του ανθρώπινου οργανισμού είναι εφικτή μόνο με τη δράση ενζύμων αφού δεν καταστρέφεται από τα γαστρικά υγρά. Κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό του φωσφόρου και διαθέτει ισχυρή ικανότητα δέσμευσης της βιταμίνης A και D, του παλμικού οξέος και άλλων υδροφοβικών συστατικών. Η κυριότερη δράση της σχετίζεται με την σύνδεσή της με την ρετινόλη και κατ' επέκταση την καλύτερη απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σύστημα (Fenelon et al 2019). Σημαντική είναι επίσης η απουσία της καζεΐνης από τον όξινο ορό γιαουρτιού. Η καζεΐνη είναι η κυρία πρωτεΐνη του γιαουρτιού και είναι υπεύθυνη για την πήξη του σε όξινες τιμές pH. Η σχεδόν πλήρης απουσία της επηρεάζει σημαντικά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ορού και έχει σαν αποτέλεσμα ο όξινος ορός γιαουρτιού να είναι υγρός με χαμηλό ιξώδες.

1.4.3 Γαλακτικό Οξύ

Το γιαούρτι στηρίζει την παραγωγή του στην αναερόβια ζύμωση που προκαλούν οι μικροοργανισμοί *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι η μετατροπή της λακτόζης που περιέχεται στο γάλα σε γαλακτικό οξύ. Το παραγόμενο οξύ συμβάλει στη μείωση της τιμής του pH και στη συνέχεια την καταβύθιση της καζεΐνης και τον σχηματισμό του πήγματος γιαουρτιού. Ωστόσο, το γαλακτικό οξύ παραμένει εντός του συστήματός και όπως είναι λογικό διαπερνά τα φίλτρα στραγγισμού του γιαουρτιού και συσσωρεύεται στον παραγόμενο ορό. Λόγω της παρουσίας του, η τιμή pH του ορού είναι περίπου 4,3-4,6 και η επεξεργασία του από μικροοργανισμούς καθίσταται αρκετά δύσκολη. Η παρουσία του εντός του ανθρώπινου οργανισμού είναι φυσιολογική και παράγεται σε περιπτώσεις έντονης σωματικής άσκησης και αδυναμίας κάλυψης των κυτταρικών απαιτήσεων σε οξυγόνο. Έρευνες που διεξήχθησαν το 2010 έδειξαν ότι ο

εγκέφαλος των θηλαστικών προτιμά να μεταβολίζει γαλακτικό οξύ έναντι της γλυκόζης και να το μετατρέπει σε ενέργεια για να καλύψει τις μεγάλες ανάγκες του (Zilberter et al. 2010). Για αυτό τον λόγο θεωρείται σημαντικό συστατικό που πρέπει να λαμβάνουν τα παιδιά κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους.

1.4.4 Μέταλλα

Ο όξινος ορός γιαουρτιού περιέχει πλήθος μετάλλων, κυριότερα από τα οποία είναι το ασβέστιο, το κάλιο και το μαγνήσιο. Η πρόσληψή τους από την τροφή και η παρουσία τους εντός του οργανισμού σε μικρές ποσότητες είναι ευεργετική για την καλή λειτουργία του. Ο ρόλος τους εντός του ανθρώπινου οργανισμού είναι διευρυμένος, καθώς ορισμένες μόνο από τις δράσεις τους είναι ως κινητήριες δυνάμεις στις αντλίες ιόντων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και ως συνένζυμα, δηλαδή επιταχυντές της δράσης των ενζύμων, μέσω της ικανότητας λήψης ή απελευθέρωσης ηλεκτρονίων. Η πρόσληψή τους πρέπει να γίνεται σε περιορισμένες ποσότητες, διαφορετικά θα προκληθούν τοξικά φαινόμενα. Το κυριότερο μέταλλο που εντοπίζεται στον ορό είναι το ασβέστιο, το οποίο είναι δομικό συστατικό των οστών και κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των καρδιακών παλμών μέσω της δράσης αντλίας ασβεστίου. Η σημαντική ποσότητα των μετάλλων εντός του όξινου ορού έχει οδηγήσει σε προσπάθειες ανάκτησής τους μέσω της διεργασίας της ηλεκτροδιάλυσης με μεγάλη επιτυχία (Nielsen et al. 2021).

1.5 Όξινος Ορός Γιαουρτιού ως περιβαλλοντικό πρόβλημα

Η σύσταση του όξινου ορού αποδεικνύει ότι είναι ένα πολύτιμο υλικό με πλήθος σημαντικών συστατικών. Η παραγωγή του είναι περίπου 2-3 kg ορού για κάθε kg γιαουρτιού και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η περιεκτικότητα των στερεών του γάλακτος, η θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί, το είδος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση, οι μηχανικές διαταραχές κατά τον σχηματισμό του πηγμάτος και ο ρυθμός ψύξης (Menchik et al. 2019).

Παρά το πλήθος των σημαντικών συστατικών που περιέχει ο όξινος ορός γιαουρτιού αποτελεί ένα σημαντικό ρύπο για τις σύγχρονες γαλακτοβιομηχανίες και το περιβάλλον καθώς διαθέτει υψηλό δείκτη βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD). Η τιμή του ανέρχεται στα 52.400-62.400 mg/L γεγονός που αποδεικνύει ότι η επεξεργασία μέσω του βιολογικού καθαρισμού είναι ιδιαίτερα δύσκολη (Rocha-Mendoza et al. 2021). Καθοριστικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει η χαμηλή τιμή του pH του η οποία παρεμποδίζει την δράση των μικροοργανισμών. Παράλληλα η επεξεργασία γίνεται ακόμη πιο δύσκολη λόγω της παρουσίας του άλατος του φωσφορικού ασβεστίου, το οποίο επικάθεται στον εξοπλισμό και δημιουργεί προβλήματα διάβρωσης. Σημαντική είναι επίσης η επίδρασή του στο υδροβιότοπο, καθώς η παρουσία εκεί συμβάλει στη δραστική μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και κατ' επέκταση οδηγεί στο θάνατο μεγάλου αριθμού ψαριών (Korzendöfer & Hinrichs 2019). Η επίδραση αυτή βασίζεται στο πλούσιο θρεπτικό περιεχόμενο του όξινου ορού, δεδομένου ότι πρόκειται για ένα εξαιρετικό μέσο ανάπτυξης για την θαλάσσια χλωρίδα, η οποία με τη σειρά της δεσμεύει μεγάλο μέρος του διαθέσιμου οξυγόνου με αποτέλεσμα τον αρνητικό αντίκτυπο στη θαλάσσια πανίδα.

Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία οι γαλακτοβιομηχανίες είναι υπεύθυνες για το 40% των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με τον τομέα των τροφίμων, γεγονός

που σχετίζεται με τις διάφορες δράσεις μεταξύ των οποίων είναι και η απόρριψη του όξινου ορού (Houssard et al. 2021). Η διαρκώς αυξανόμενη παραγωγή γιαουρτιού συνέβαλε στην ραγδαία αύξηση της παραγωγής όξινου ορού, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του. Η πρώτη προσέγγιση που διερευνήθηκε σε σχέση με την οικολογική επιβάρυνση εξαιτίας της παραγωγικής διαδικασίας του γιαουρτιού ήταν η προσπάθεια μείωσης του παραγόμενου ορού. Σε αυτή την περίπτωση εξετάστηκαν τέσσερις κυρίως μέθοδοι. Η πρώτη εξ αυτών ήταν η χρήση φυγοκεντρικού συστήματος αμέσως μετά τη διεργασία της ζύμωσης του γιαουρτιού. Με αυτό τον τρόπο η ποσότητα του όξινου ορού που παράγεται μειώθηκε από 3 kg στα 2,13 kg (Houssard et al. 2021). Η επόμενη πρακτική που δοκιμάστηκε ήταν η προσθήκη σκόνης πρωτεΐνης γάλακτος πριν τη διεργασία της ζύμωσης μέσω της οποίας όχι μόνο μειώθηκε ο όξινος ορός στα 1,56 kg/kg γιαουρτιού, αλλά συγχρόνως παράχθηκε γιαούρτι με σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα πρωτεΐνης (Korzendöfer & Hinrichs 2019, Houssard et al. 2021). Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα που εμποδίζει την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Το ελάττωμα αυτό είναι η μη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου σε πρωτεΐνες και της σταθερότητας του πήγματος. Η τρίτη προσέγγιση που εφαρμόστηκε ήταν η πραγματοποίηση υπερδιήθησης, είτε πριν τη θερμική κατεργασία, είτε απευθείας στον όξινο ορό μετά τη ζύμωση. Τα αποτελέσματα αυτής της διεργασίας ήταν η μείωση του παραγόμενου ορού κατά περίπου 1 kg/kg γιαουρτιού. Η εφαρμογή αυτή όμως έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα που είναι το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να φράξουν τις πολυμερικές μεμβράνες. Για αυτό τον λόγο απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο απομάκρυνσης των πρωτεϊνών με φυγοκέντριση και πιθανότητα προσθήκη χλωριούχου νατρίου για αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος (Konrad et al. 2012). Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί η χρήση υπερήχων, ωστόσο η επίδρασή τους σχετίζεται περισσότερο με τα καλύτερα ρεολογικά και εμφανισιακά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού, παρά με τη μείωση της ποσότητας του όξινου ορού γιαουρτιού (Korzendöfer & Hinrichs 2019). Μέχρι σήμερα, οι βιομηχανίες παραγωγής γιαουρτιού είτε απορρίπτουν αυθαίρετα τον παραγόμενο ορό στο περιβάλλον, είτε τον οδηγούν στην ιδιαίτερα επιζήμια από οικονομική κυρίως άποψη βιολογική επεξεργασία. Παρ' όλα αυτά τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται ορισμένοι νέοι τρόποι επεξεργασίας και αξιοποίησης του ορού.

1.6 Χρήσεις του Όξινου Ορού Γιαουρτιού

1.6.1 Χρήση ως εδαφοβελτιωτικό

Τα φυτά προκειμένου να αναπτυχθούν χρειάζονται ανόργανα στοιχεία όπως το κάλιο, το ασβέστιο και ο φωσφόρος. Τα στοιχεία αυτά τα λαμβάνουν απευθείας από το χώμα που καλλιεργούνται. Συχνά, όμως, οι ανάγκες τους είναι υψηλότερες από τις ποσότητες που βρίσκονται στο έδαφος, με αποτέλεσμα την ανάγκη χρήσης συνθετικών λιπασμάτων τα οποία έχουν αποδειχθεί επιζήμια για την ανθρώπινη υγεία. Ο όξινος ορός είναι ένα υδατικό διάλυμα πλούσιο σε λακτόζη και ανόργανα στοιχεία όπως αυτά που προαναφέρθηκαν. Αποτελεί ένα εξαιρετικό βιολογικό λίπασμα που μπορεί είτε να προστεθεί απευθείας στο έδαφος είτε να αναμειχθεί με άλλα εδαφοβελτιωτικά ζωικής προέλευσης (Ketterings et al. 2017). Παρόλα αυτά η χρήση του παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα τα οποία σχετίζονται κυρίως με φαινόμενα απορροής. Συγχρόνως, η χαμηλή τιμή pH του μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη ορισμένων φυτών που προτιμούν την ανάπτυξη σε αλκαλικό ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον.

1.6.2 Χρήση ως ζωοτροφή

Αρκετά παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων οδηγούνται κατόπιν μικρής επεξεργασίας στο τομέα της κτηνοτροφίας, όπου αξιοποιούνται σαν επιπλέον συστατικά στην τροφή των ζώων. Κατά πλήρη αντιστοιχία, ο όξινος ορός γιαουρτιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα της ζωοτροφής για τα μηρυκαστικά. Παράλληλα, ο όξινος ορός χρησιμοποιείται και ως συμπλήρωμα ζωοτροφής για οικόσιτους χοίρους με εξίσου καλά αποτελέσματα (Shurson 2009). Η χρήση του ορού συμβάλλει στην ποιοτική αναβάθμιση της απλής τροφής, αφού προσθέτει επιπλέον πρωτεΐνες και ιχνοστοιχεία. Παρ' όλα αυτά, η ποσότητα του προς χρήση ορού οφείλει να είναι περιορισμένη, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι όταν η ποσότητα του ορού ξεπεράσει το 20% του ξηρού βάρους του ζώου προκαλούνται εντερικές διαταραχές (Schingoethe 1976). Πέρα αυτών των προβλημάτων, η αυξημένη ποσότητα ορού μπορεί να προκαλέσει τοξικά φαινόμενα στα ζώα, εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας σε άλατα.

1.6.3 Αναερόβια Χώνευση-Παραγωγή Βιοκαυσίμων

Όπως προαναφέρθηκε, ο όξινος ορός περιέχει 3-4% w/v λακτόζη, η οποία είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης. Η παρουσία αυτών των δύο μονομερών καθιστά τον όξινο ορό μία εξαιρετική πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς με σκοπό την μετατροπή του διαθέσιμου άνθρακα σε οργανικές ενώσεις υψηλής ενεργειακής αξίας. Προκειμένου όμως η διεργασία να είναι οικονομικά εφικτή, ο όξινος ορός θα πρέπει να προεπεξεργαστεί με μεθόδους συμπύκνωσης όπως η υπερδιήθηση και η αντίστροφη ώσμωση για να αυξηθεί η περιεκτικότητά του σε λακτόζη. Μικροοργανισμοί όπως ο *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* και ο *Candida pseudotropicalis* έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στην μετατροπή του όξινου ορού σε βιοκαύσιμο και συγκεκριμένα αιθανόλη. Μέσω της χρήσης του *Kluyveromyces marxianus* επιτεύχθηκε 90% μετατροπή του όξινου ορού σε αιθανόλη υπό ήπιες συνθήκες 33-38°C και επώαση 13 ωρών (Das et al. 2016, Diniz et al. 2013).

1.6.4 Χρήση στην παραγωγή προϊόντων τύπου γιαουρτιού

Ο όξινος ορός είναι ένα παραπροϊόν με υψηλή θρεπτική αξία εξαιτίας των μετάλλων που περιέχει. Ωστόσο, η άμεση κατανάλωσή του δεν είναι εφικτή λόγω της δυσάρεστης γεύσης του και των πιθανών εντερικών προβλημάτων που μπορεί να προκαλέσει. Ο συνδυασμός του όμως με γάλα, με σκοπό την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων που προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό το κλασικό γιαούρτι είναι ιδιαίτερα ελκυστικός και έχει ήδη εφαρμοστεί από αρκετές βιομηχανίες. Η ανάμιξη συμβάλλει ταυτοχρόνως σε δύο τομείς, στη μείωση των αναγκών σε γάλα και στην αξιοποίηση του όξινου ορού χωρίς να υπάρχει θρεπτική υποβάθμιση των τελικών προϊόντων. Σε αρκετές περιπτώσεις όμως παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, το έντονο άρωμα και ο όξινος χαρακτήρας του ορού κυριαρχούν στο τελικό προϊόν και αλλοιώνουν σε μεγάλο βαθμό την γεύση (Rocha-Mendoza et al. 2021). Για αυτό τον λόγο έχουν γίνει προσπάθειες μείωσης αυτών των χαρακτηριστικών με τη χρήση χυμών και γλυκαντικών. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα προϊόντα με όξινο ορό είναι αποδεκτά στο 90% των δοκιμαστών με το 54% αυτών να είναι πρόθυμο να τα αγοράσει (Lievore et al. 2015). Παρόλα αυτά, κανένας δοκιμαστής δεν αναγνώρισε το προϊόν που περιέχει όξινο ορό ως ποιοτικά ανώτερο από το πρωτότυπο. Επιπλέον, η χρήση του όξινου ορού επηρεάζει την ρεολογία του τελικού προϊόντος. Ο ορός είναι ένα υδατικό διάλυμα με χαμηλό ιξώδες (1,09 cP στους 25°C),

το οποίο αδυνατεί να αντικαταστήσει πλήρως το πιο πυκνόρρευστο γάλα (2 cP στους 25°C). Η διαφορά αυτή είναι χαρακτηριστική στα προϊόντα τύπου γιαουρτιού όπου παρατηρήθηκε ότι το φαινόμενο της συναίρεσης είναι εντονότερο στην περίπτωση της χρήσης του όξινου ορού. Τα παραπάνω μπορούν να αιτιολογηθούν από τη σχεδόν πλήρη απουσία καζεΐνης στον όξινο ορό.

1.6.5 Χρήση στην παραγωγή τυριών και άλλων προϊόντων με βάση το γάλα

Η μετατροπή του όξινου ορού σε σκόνη με τη χρήση διάφορων μεθόδων απομάκρυνσης του νερού έχει αποδειχθεί μη βιώσιμη από οικονομικής άποψης λόγω των φαινομένων κρυστάλλωσης της λακτόζης. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητη η χρήση του ως υγρό. Ωστόσο, η μεγάλη περιεκτικότητά του σε νερό και η όξινη γεύση του δημιουργεί πολλαπλά προβλήματα μορφοποίησης στα τελικά προϊόντα. Προκείμενου να εξαλειφθούν αυτά τα προβλήματα, ο όξινος ορός πρέπει να ενταχθεί σε τρόφιμα που είτε υφίστανται θέρμανση, είτε ζύμωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παραγωγή του κλασσικού ιταλικού τυριού ρικότα από όξινο ορό. Ένα άλλο τυρί το οποίο παράγεται με τη χρήση όξινου ορού είναι το νορβηγικό τυρί Mysost ή Brunost. Πρόκειται για ένα τυρί που εντοπίζεται στις σκανδιναβικές χώρες πάνω από 2500 χρόνια. Το Mysost είναι ένα μαλακό τυρί με χρώμα που παραπέμπει σε καραμέλα. Καταναλώνεται σαν επικάλυψη σε ψωμιά, κράκερ και μπισκότα, είναι πλούσιο σε ασβέστιο, πρωτεΐνες και βιταμίνη Β αλλά αρκετά ανθυγιεινό λόγω του υψηλού ποσοστού σακχάρων και λιπαρών που περιέχει. Η παραγωγή του γίνεται με βρασμό ενός μίγματος ορού-γάλακτος για αρκετές ώρες, μέχρι τα σάκχαρα του μίγματος να μετατραπούν σε καραμέλα. Ένα εξίσου γνωστό προϊόν που παράγεται για παραπάνω από 50 χρόνια είναι το Rivella. Το Rivella είναι ουσιαστικά ένα αναψυκτικό που αποτελείται από 35% όξινο ορό, νερό, ζάχαρη και άλλα πρόσθετα.

1.6.6 Χρήση ως μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών

Τα γαλακτικά βακτήρια αξιοποιούνται σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανία των τροφίμων. Οι ιδιαίτερες διατροφικές απαιτήσεις τους που περιλαμβάνουν ανάγκη για μεγάλες ποσότητες αζώτου οδήγησαν στη δημιουργία συνθετικών υποστρωμάτων όπως το MRS και το M17 τα οποία όμως έχουν σχετικά υψηλό κόστος (Dudkiewicz et al. 2016, Benaissa et al. 2017). Ο όξινος ορός διαθέτει πλήθος θρεπτικών συστατικών και μπορεί να αποτελέσει πηγή αζώτου, άνθρακα και μετάλλων. Επομένως, ο συνδυασμός του με ορισμένα άλλα συστατικά χαμηλού κόστους μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία φθηνών υποστρωμάτων για τα γαλακτικά βακτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η δημιουργία θρεπτικού μέσου που περιλαμβάνει 69% όξινο ορό, 30% χυμό τομάτας και 1% εκχύλισμα μαγιάς (Mondragon-Parada et al. 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων στο προαναφερθέν μέσο και στο εμπορικό μέσο είχαν παρόμοια αποτελέσματα.

1.6.7 Παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης και διατροφικής αξίας

Ο όξινος ορός γιαουρτιού περιέχει σημαντική ποσότητα λακτόζης και μετάλλων. Τα συστατικά αυτά μπορούν αποτελέσουν την βάση για την σύνθεση τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μετατροπής της λακτόζης που προϋπάρχει στον ορό σε πρεβιοτικά και συγκεκριμένα γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Η μετατροπή αυτή μπορεί να γίνει μέσω αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης, με την

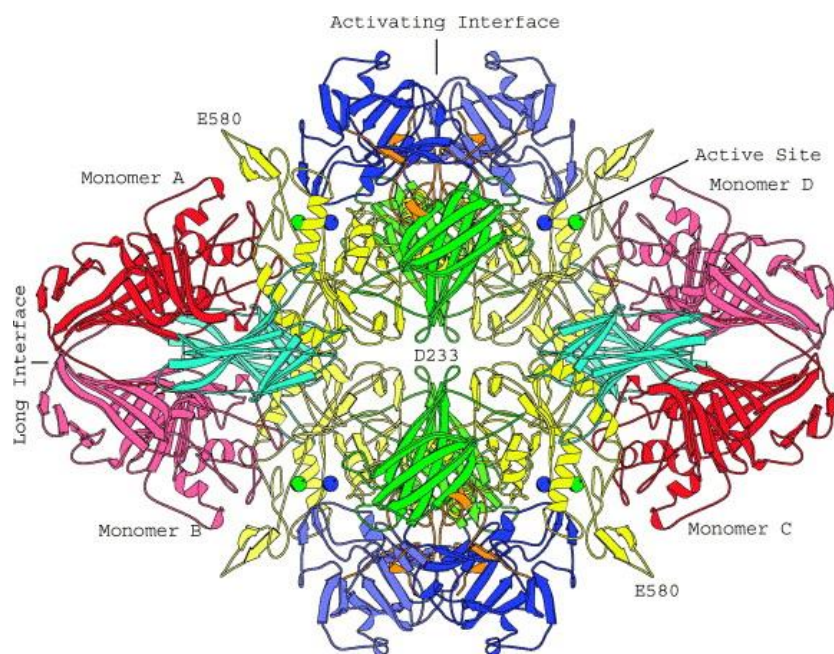
χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να παραχθεί σκόνη και διάλυμα γαλακτοολιγοσακχαριτών που μπορούν να προστεθούν σε τρόφιμα όπως οι σοκολάτες, τα προϊόντα αρτοποιίας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Rad et al. 2018, Costabile et al. 2015). Η προσθήκη γαλακτοολιγοσακχαριτών προσδίδει πρεβιοτικές ιδιότητες στα συγκεκριμένα τρόφιμα όπως ευεργετική δράση έναντι των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας, καλύτερη απορρόφηση ασβεστίου και μαγνησίου και πρόληψη ή αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών. Παράλληλα, η προσθήκη των γαλακτοολιγοσακχαριτών οδηγεί σε μείωση της προστιθέμενης ποσότητας σακχάρων λόγω της γλυκαντικής ικανότητας που διαθέτουν, η οποία ανέρχεται στο 0,6 σε σχέση με την σακχαρόζη (Panesar et al. 2018).

Κεφάλαιο 2^ο

Βιοτεχνολογική αξιοποίηση της λακτόζης

2.1 Εισαγωγή

Η β-γαλακτοζιδάση είναι μια υδρολάση που εντοπίζεται στα λυσοσώματα διαφόρων κυττάρων και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στο τομέα των τροφίμων. Ο κύριος λόγος αξιοποίησής της είναι η ικανότητα της να διασπά τα μόρια της λακτόζης στα δύο μονομερή που την απαρτίζουν, την γλυκόζη και την γαλακτόζη. Η δομή της (Εικόνα 2.1) περιλαμβάνει 4 όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από 1023 αμινοξέα (Saqib et. 2017). Πρόκειται για ένα τετραμερές που δρα ως ετεροδιμερές και αντιδρά μέσω μηχανισμού όξινης κατάλυσης δύο σταδίων. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου είναι το οπερόνιο *lacZ* και έχει αξιοποιηθεί για την παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από πλήθος μικροοργανισμών όπως ο πλέον χαρακτηρισμένος *Escherichia coli*.



Εικόνα 2.1. Δομή β-γαλακτοζιδάσης (Πηγή: Matthews 2005)

2.2 Βιομηχανική αξιοποίηση β-γαλακτοζιδάσης

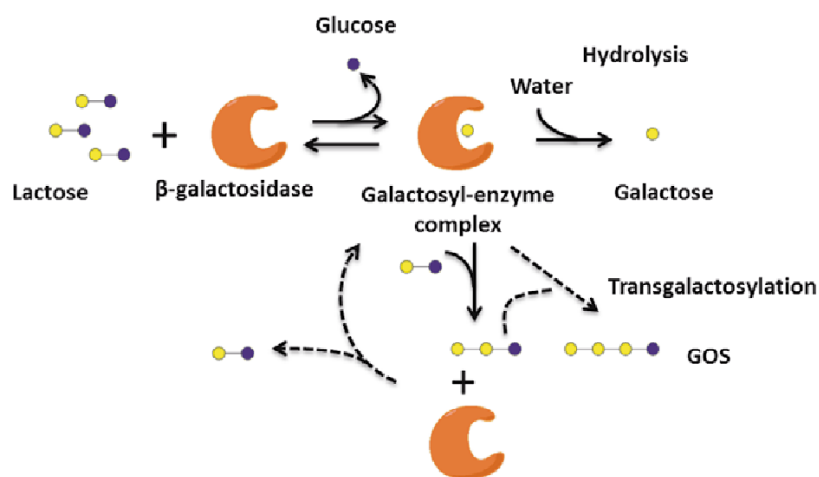
Το πεδίο εφαρμογών της είναι ήδη διευρυμένο και τείνει να επεκταθεί ακόμη περισσότερο στο μέλλον. Η κυριότερη χρήση της αφορά στην παραγωγή τροφίμων χωρίς λακτόζη. Τα προϊόντα αυτά βρίσκουν εφαρμογή σαν προϊόντα διατροφής για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη. Ταυτόχρονα, η δράση αυτού του ενζύμου αξιοποιείται για τη μείωση της περιεκτικότητας της λακτόζης σε προϊόντα κατάψυξης όπως το παγωτό. Η μείωση της λακτόζης συμβάλει στην αποφυγή του φαινομένου της κρυστάλλωσής της και την αλλοίωση

των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων στα οποία περιέχεται. Με αυτό τον τρόπο το τελικό προϊόν γίνεται πιο γλυκό και πιο εύπεπτο.

Η αντίδραση με την οποία η λακτόζη διασπάται σε μονοσακχαρίτες ονομάζεται υδρόλυση. Η υδρόλυση της λακτόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε θερμοκρασία 35-40 °C, με σκοπό την μείωση του κόστους λειτουργίας της διεργασίας, αλλά με κίνδυνό την μικροβιακή ανάπτυξη, είτε σε θερμοκρασία ψύξης με ολονύχτια παραμονή. Το ποσοστό μετατροπής της λακτόζης σε μονοσακχαρίτες που προτιμάται είναι 70-80 %, προκειμένου να αποτραπεί η έντονη γλυκιά γεύση του τελικού προϊόντος. Ο μηχανισμός της αντίδρασης υδρόλυσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του ενζύμου με την γαλακτόζη και έπειτα την σύνδεση του με ένα μόριο νερού, ενώ έχει ήδη απελευθερωθεί το μόριο της γλυκόζης.

Η ικανότητα της β-γαλακτοζιδάσης να διασπά την λακτόζη στα μονομερή και επομένως να ελευθερώνει σημαντική ποσότητα συμβάλει στη μετατροπή του αρχικού υποστρώματος όπως το γάλα ή ο όξινος ορός γιαουρτιού σε ένα γλυκό σιρόπι που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν γλυκαντικό μέσο και μπορεί να αντικαταστήσει προϊόντα όπως η σακχαρόζη, γνωστή και ως ζάχαρη, ή το σιρόπι φρουκτόζης. Το διάλυμα που προκύπτει συνήθως αποτελείται από 20% νερό, 68% γλυκόζη και γαλακτόζη, 11% λακτόζη και 1% άλατα (Lindsay et al. 2018) . Η γλυκαντική ικανότητα του παραπάνω σιροπιού έχει εκτιμηθεί ως 0,7 φορές της αντίστοιχης της σακχαρόζης και η θερμιδική αξία είναι μειωμένη κατά 0,9 θερμίδες/g (Majore et al. 2022).

Πέρα της υδρόλυσης της λακτόζης, η β-γαλακτοζιδάση έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί μια παράλληλη αντίδραση. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται τρανσγαλακτοζυλίωση και μέσω αυτής, η διαθέσιμη λακτόζη μετατρέπεται σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Κατά την διάρκεια αυτής της αντίδρασης η β-γαλακτοζιδάση μεταφέρει ένα μόριο γαλακτόζης σε ένα δέκτη που περιέχει ομάδα υδροξυλίου. Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο γίνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου γαλακτόζης και ταυτόχρονα απελευθερώνεται η γλυκόζη ενώ στο δεύτερο γίνεται η μεταφορά του συμπλόκου αυτού σε ένα πυρηνόφιλο δέκτη που περιέχει υδροξυλομάδα (εικόνα 2.2). Το είδος του δέκτη παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς αν ο δέκτης είναι ένα μόριο νερού τότε πραγματοποιείται αντίδραση υδρόλυσης, ενώ εάν ο δέκτης είναι κάποιο άλλο σάκχαρο τότε πραγματοποιείται η τρανσγαλακτοζυλίωση (Martins et al. 2019).



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση των δύο σταδίων της τρανσγαλακτοζυλίωσης (Πηγή :Bultema et al.2017)

Μια καινοτόμος προσέγγιση στην αξιοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης είναι η χρήση για την παραγωγή αιθανόλης είτε από απλά διαλύματα λακτόζης είτε γνωστά υποστρώματα-παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης οξειδοαναγωγικού μεταβολισμού (Gancedo & Serrano, 1989). Η παραγόμενη αιθανόλη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως βιοκαύσιμο όσο και ως πρώτη ύλη για φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα. Σε σχέση με την μετατροπή της καθαρής λακτόζης σε αιθανόλη, το ένζυμο που θεωρείται πιο αποδοτικό από θέμα μετατροπής είναι αυτό που προέρχεται από τη ζύμη *Kluyveromyces lactis*. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα σχεδιάστηκε ένα πρωτότυπο σχέδιο ταυτόχρονης παραγωγής ενζύμου και αιθανόλης με απόδοση σε αιθανόλη 33% v/v (You et al. 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συγκεκριμένης εφαρμογής είναι η δράση του ενζύμου στο τυρόγαλα, παραπροϊόν της παραγωγής τυριού που έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον όξινο ορό γιαουρτιού. Μέσω της β-γαλακτοζιδάσης επιτεύχθηκε απόδοση μετατροπής του τυρογάλακτος σε αιθανόλη μεγαλύτερη του 90% και συγκέντρωση αιθανόλης στο τελικό διάλυμα 13,5 g/L (Roukas & Lazarides 1991).

2.3 Τρόποι Παραλαβής

2.3.1 Φυτικές Πηγές

Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση εντοπίζεται φυσικά σε πλήθος φυτών και κυρίως καρπών. Ο λόγος ύπαρξής του είναι η συμβολή του στην ωρίμανση των φρούτων. Εντοπίζεται σε φρούτα όπως τα ροδάκινα, τα μήλα, τα βερίκοκα και οι φράουλες. Σε εξίσου σημαντικές ποσότητες βρίσκεται στα αμύγδαλα αλλά και στη παπάγια η οποία αποτελεί την κύρια φυτική πηγή του (Yang et al. 2018). Σε κυτταρικό επίπεδο, η β-γαλακτοζιδάση βρίσκεται στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος των φρούτων μαζί με άλλα ένζυμα όπως η ενδο-1,4-β-D-γλυκανάση και η μεθυλεστεράση. Η δράση της στην ωρίμανση των φρούτων αφορά στην αφαίρεση του μη αναγωγικού τερματικού γαλακτουπολοίπου της ημικυτταρίνης και της πηκτίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Péna et al. 2004). Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και επιτρέπεται η είσοδος ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα το φρούτο να γίνεται πιο μαλακό και να ωριμάζει.

2.3.2 Βακτήρια

Βακτήρια όπως τα *Bifidobacterium infantis* και *Bifidobacterium longum* αποτελούν μία εξαιρετική πηγή β-γαλακτοζιδασών, καθώς μπορούν να παράγουν ένζυμο υψηλής ενεργότητας και επομένως αποδοτικότητας (Hsu et al. 2007). Εξίσου αποδοτικά είναι και τα βακτήρια της οικογένειας των γαλακτοβάκιλλων. Ειδικά αυτά που προέρχονται από το γαστρεντερικό σύστημα χοίρων έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά στην παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων ακόμη και αν το γάλα προέρχεται από βοοειδή (Saqib et al. 2017). Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τα βακτήρια προτιμάται κυρίως για διεργασίες υδρόλυσης του γάλακτος, δηλαδή απομάκρυνση της λακτόζης για την παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη.

2.3.3 Ζύμες

Αντίστοιχα με τα βακτηρία, οι ζύμες μπορούν να παράγουν β-γαλακτοζιδάση υψηλής ενεργότητας. Οι κυριότερες ζύμες που χρησιμοποιούνται είναι οι *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis*. Μέσω αυτών παράγονται ενδοκυτταρικά ένζυμα με τιμή pH δράσης μεταξύ 6 και 7 και θερμοκρασία 30-35 °C (Roy 2003). Όσον αφορά στην θερμοκρασία, οι παραπάνω τιμές είναι επιθυμητές, καθώς δεν απαιτούν μεγάλη ενεργειακή κατανάλωση, ενώ αντίθετα οι τιμές του pH βέλτιστης δράσης μπορεί είτε να είναι επιθυμητές όπως σε περιπτώσεις του καθαρού διαλύματος λακτόζης, καθώς δεν απαιτείται ρύθμιση του pH, είτε αρνητικές όπως συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη όξινος ορός με τιμή pH μικρότερη του 5.

2.3.4 Μύκητες

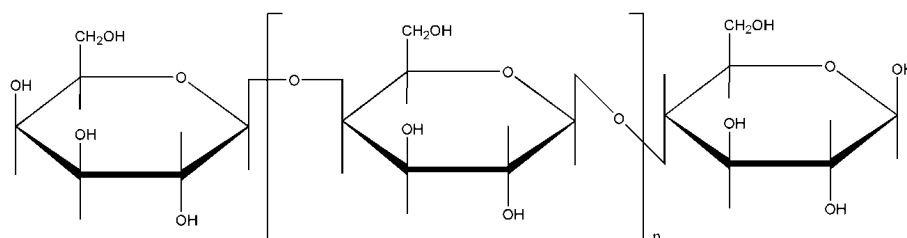
Οι μύκητες ιδιαιτέρως του γένους *Aspergillus* με πρωτεύοντα μέλη τους *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus* και *Aspergillus niger* αποτελούν μια πολύ καλή πηγή β-γαλακτοζιδάσης. Παράγουν ένζυμα υψηλής σταθερότητας που το κύριο πλεονέκτημά τους είναι η δράση τους σε όξινες τιμές pH. Τα ένζυμα που παράγονται από μύκητες όπως ο *Aspergillus oryzae* εμφανίζουν βέλτιστη τιμή pH δράσης σε τιμές από 3,5 έως 5,0. Η ικανότητα δράσης τους σε χαμηλές τιμές pH τα καθιστά ιδανικά για τη χρήση τους στην επεξεργασία παραπροϊόντων, όπως ο όξινος ορός γιαουρτιού, που η τιμή του pH του κυμαίνεται μεταξύ 4,3 και του 4,6. Επιπλέον, ένα σημαντικό πλεονέκτημά της παραγωγής β-γαλακτοζιδάσης από μύκητες είναι το γεγονός ότι τα παραγόμενα ένζυμα εντοπίζονται εξωκυτταρικά και επομένως η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού τους είναι ευκολότερη και οικονομικότερη. Σε σχέση με τη θερμοκρασία δράσης τους, η τιμή είναι σχετικά υψηλότερη από την αντίστοιχη των ζυμών καθώς η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από μύκητες έχει θερμοκρασιακό εύρος βέλτιστης δράσης μεταξύ 45-60°C (Roy 2003). Η κύρια αντίδραση που πραγματοποιεί η β-γαλακτοζιδάση από το γένος *Aspergillus* είναι η αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την υδρόλυση της λακτόζης. Η απόδοση μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες είναι υψηλότερη του 25 %, ενώ η απόδοση μετατροπής σε μονοσακχαρίτες μικρότερη από 20% στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης λακτόζης. Σε σχέση με τα υποστρώματα, η β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae* είναι πιο αποτελεσματική στη παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού, παρά σε διάλυμα καθαρής λακτόζης και γλυκού ορού (Fischer & Kleinschmidt 2015).

Κεφάλαιο 3^ο

Γαλακτοολιγοσακχαρίτες

3.1 Δομή

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharides, GOS) είναι σύνθετα μόρια που αποτελούνται από 2-7 μόρια γαλακτόζης και 1 μόριο γλυκόζης. Πρόκειται για αλυσίδες μορίων που συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς και η απλούστερη μορφή τους είναι η Gal[β1-4]Gal[β1-4]Glu (εικόνα 3.1). Οι δεσμοί που αναπτύσσονται μπορεί να είναι β-(1-2), β-(1-3), β-(1-4), β-(1-6) και ο βαθμός πολυμερισμού που μπορεί να εμφανίζουν είναι από 3 έως 8 (Böger et al. 2019). Οι GOS είναι υδατοδιαλυτά, άχρωμα και έχουν ιξώδες παρόμοιο με αυτό που έχει το σιρόπι καλαμποκιού (2.000-3.000 cP στους 21°C). Το διάλυμα των GOS είναι σταθερό σε τιμές pH κοντά στο 7,0 και εμφανίζει σημαντική θερμική σταθερότητα εξαιτίας των β-γλυκοζιτικών δεσμών που διαθέτει (Mei et al 2022).



Εικόνα 3.1. Τυπική μορφή γαλακτοολιγοσακχαριτών (Πηγή : Meyer 2014)

3.2 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών

3.2.1 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω εκχύλισης φυτών

Τα GOS εντοπίζονται σε πλήθος φυτών και κυρίως καρπών. Η παρουσία τους διευκολύνει την προσαρμογή των φυτών σε κρύα κλίματα και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της βλάστησης των σπόρων σε χαμηλές υγρασίες. Σε σχετικά μεγάλες ποσότητες βρίσκονται στη σόγια, το λούπινο, τα φασόλια και τις φακές. Η κύρια μέθοδος παραλαβής τους είναι μέσω διεργασίας εκχύλισης των σπόρων και απομόνωσής τους από το υπόλοιπο εκχύλισμα. Οι κύριοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το νερό και η αιθανόλη. Μέσω της διεργασίας αυτής επιτυγχάνεται παραλαβή περίπου 10% της συνολικής ποσότητας GOS που περιέχεται στους σπόρους. Ωστόσο, τα εκχυλισμένα GOS δεν παραλαμβάνονται καθαρά αλλά αναμειγμένα με άλλα σάκχαρα μεταξύ των οποίων και η σακχαρόζη. Επίσης πριν την διαδικασία της εκχύλισης είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των πολλών λιπαρών που περιέχουν οι σπόροι (Martins et al. 2019). Η εκχύλιση τους μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση υπερκρίσιμου CO₂ μαζί με συνδιαλύτες νερό και αιθανόλη. Οι αποδόσεις που επιτυγχάνονται μέσω αυτής της μεθόδου δεν έχουν απόδοση μεγαλύτερη του 20 % και γι αυτό τον λόγο η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη (Montanes et al. 2011).

3.2.2 Παραγωγή Γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω ενζυμικής σύνθεσης

Η σύνθεση GOS δεν είναι εφικτή με χημική σύνθεση, καθώς δεν γίνεται να παραχθούν από απλή υδρόλυση υδατανθράκων. Η παραγωγή τους όμως μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της δράσης ενζύμων και συγκεκριμένα της β-γαλακτοζιδάσης. Η αντίδραση σχηματισμού γαλακτοολιγοσακχαριτών ονομάζεται τρασγαλακτοζύλιωση. Η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και κατ' επέκταση η απόδοση της αντίδρασης επηρεάζεται από παράγοντες όπως η συγκέντρωση της λακτόζης και της γαλακτόζης, οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH που επικρατούν, η πηγή προέλευσης της β-γαλακτοζιδάσης, η ακινητοποίηση του ενζύμου και ο τύπος του αντιδραστήρα όπου πραγματοποιείται η αντίδραση.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση τρασγαλακτοζυλίωσης

3.3.1 Συγκέντρωση Λακτόζης

Η συγκέντρωση των σακχάρων και συγκεκριμένα της λακτόζης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση τρασγαλακτοζυλίωσης, καθώς αυξημένη συγκέντρωση λακτόζης συνεπάγεται λιγότερα μόρια νερού ικανά να προκαλέσουν υδρόλυση γεγονός που οδηγεί στην επικράτηση της τρασγαλακτοζυλίωσης και κατ' επέκταση την παραγωγή ολιγοσακχαριτών αντί μονομερών. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης της β-γαλακτοζιδάσης που αξιοποιείται, καθορίζεται η βέλτιστη συγκέντρωση λακτόζης στο ορό. Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τον *Aspergillus oryzae* παρουσιάζει βέλτιστο για συγκέντρωση λακτόζης 20%, ενώ η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από τον *Kluyveromyces lactis* παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε όξινο ορό γιαουρτιού με περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,5% w/v (Urrutia et al. 2013, Fischer & Kleinschmidt 2018).

3.3.2 Συγκέντρωση Γαλακτόζης

Η γαλακτόζη μαζί με τη λακτόζη αποτελούν τους κύριους υδατάνθρακες του όξινου ορού γιαουρτιού. Η περιεκτικότητα της στον ορό είναι σημαντικά μικρότερη της λακτόζης, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι δρα ανασταλτικά σε περιπτώσεις διαλυμάτων χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης και η επίδρασή της σε διαλύματα με συγκέντρωση λακτόζης μεγαλύτερη των 100 mM είναι μη αισθητή (Kim et al. 2004). Η παρεμπόδιση που προκαλεί στην αντίδραση τρασγαλακτοζυλίωσης είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίδραση υδρόλυσης. Η αναστολή αυτή περιγράφεται σε μεγάλο βαθμό μέσω κινητικού μοντέλου Michaelis-Menten με παρεμπόδιση (Vera et al. 2011).

3.3.3 Συνθήκες Δράσεις Ενζύμου

Η β-γαλακτοζιδάση όπως και όλα τα ένζυμα έχουν ορισμένες συνθήκες βέλτιστης δράσης. Οι συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η τιμή του pH καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή προέλευσης του ενζύμου. Για παράδειγμα, η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τον μεσόφιλο μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* έχει βέλτιστες συνθήκες δράσης σε θερμοκρασία 45 °C και pH 4,3, ενώ η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τον υπερθερμόφιλο μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana* έχει βέλτιστες συνθήκες δράσης σε θερμοκρασία 90 °C και pH 5,5. Η θερμοκρασία και το pH δεν είναι οι μόνες συνθήκες που επηρεάζουν την δράση της β-γαλακτοζιδάσης. Σημαντική επίδραση έχουν επίσης η παρουσία και η συγκέντρωση ορισμένων αλάτων. Άλατα όπως το NaCl, MgCl₂ και το KCl επηρεάζουν το

ρυθμό της αντίδρασης. Η δράσης τους αυτή οφείλεται στην παρουσία των ιόντων καλίου, μαγνησίου και νατρίου τα οποία προκύπτουν από την διάσταση των αλάτων εντός του διαλύματος. Στη περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *Aspergillus oryzae*, η παρουσία αλάτων δεν επηρεάζει την απόδοση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Αντίθετα, στη περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *Kluyveromyces lactis* η παρουσία των αλάτων καθορίζει τον βαθμό απόδοσης, καθώς η διαφοροποίηση της περιεκτικότητας σε άλατα έχει σαν αποτέλεσμα διαφορετικό βαθμός μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Fischer & Kleinschmidt et al.2015) .

3.3.4 Προέλευση β-γαλακτοζιδάσης

Η παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης μπορεί να γίνει από πλήθος διαφορετικών πηγών όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Ο κύριος τρόπος παραγωγής της είναι από μικροοργανισμούς και συγκεκριμένα βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Η προέλευση του ενζύμου επηρεάζει καθοριστικά όχι μόνο τις συνθήκες δράσεις του ενζύμου (pH, θερμοκρασία) αλλά και το είδος των δεσμών που θα διασπάσει. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης, η β-γαλακτοζιδάση αναγνωρίζει και διασπά διαφορετικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς και κατ'επέκταση δημιουργεί διαφορετικούς συνδυασμούς δεσμών. Για παράδειγμα η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από τον *Aspergillus oryzae* παράγει δεσμούς β-(1-3) και β-(1-6). Αντίθετα, η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από τον *Kluyveromyces lactis* σχηματίζει GOS με δεσμούς β-(1-6), ενώ τα ένζυμα που προέρχονται από την οικογένεια των βακίλων δημιουργούν δεσμούς β-(1-4) (Martins et al. 2019).

3.3.5 Ακίνητοποίηση Ενζύμου

Η ακίνητοποίηση των ενζύμων όπως η β-γαλακτοζιδάση σε κατάλληλο φορέα μπορεί να συνεισφέρει είτε θετικά είτε αρνητικά στην παραγωγή GOS μέσω αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Η θετική της επίδραση σχετίζεται με την ενίσχυση της καταλυτικής αποδοτικότητας του ενζύμου μέσα από τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών pH και θερμοκρασίας που επικρατούν στη περιοχή βέλτιστης δράσης του ενζύμου. Με άλλα λόγια επηρεάζει την σταθερότητα του ενζύμου και της κινητικής που ακολουθεί (Neto et al. 2021, Richardi et al. 2021). Συγχρόνως, προσφέρει πολλαπλά οφέλη κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας, καθώς μέσω αυτής δίνεται η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου, μειώνοντας έτσι το κόστος και διευκολύνοντας τον σχεδιασμό. Από την άλλη πλευρά, η ακίνητοποίηση του ενζύμου μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στη σύνθεση των GOS λόγω της αλλοίωσης του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η κύρια μέθοδος ακίνητοποίησης που χρησιμοποιείται στη περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης με σκοπό την παραγωγή GOS είναι με την ανάπτυξη ομοιοπολικού δεσμού με κατάλληλο φορέα όπως είναι τα βιοπολυμερή. Η ακίνητοποίηση σε πορώδης σωματίδια από αιθανοδιόλη αποδείχθηκε αποτελεσματική για την ακίνητοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης προερχόμενη από *Aspergillus oryzae* και μάλιστα επιτεύχθηκε αύξηση της απόδοσης σε GOS από 11% που ήταν για το ελεύθερο ένζυμο σε 20 % (Guerrero et al. 2018). Πέρα της ομοιοπολικής σύνδεσης, μία εξίσου δοκιμασμένη τεχνική είναι η ακίνητοποίηση με ιοντική αλληλεπίδραση η οποία έχει πραγματοποιηθεί μέσω αλληλεπίδρασης του ίδιου ενζύμου με φορέα τεταρτοταγούς αμμωνίου-αγαρόζης. Σε αυτή την περίπτωση η απόδοση σε GOS προσέγγισε το 24 % (Serey et al. 2021).

3.3.6. Τύπος Αντιδραστήρα

Ο τύπος του αντιδραστήρα είναι μια βασική σχεδιαστική παράμετρος σε κάθε είδους αντίδραση. Με ανάλογο τρόπο η επιλογή του τύπου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό και την απόδοση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Σε γενικές γραμμές η επιλογή ενός αντιδραστήρα διαλείποντος έργου στη συγκεκριμένη περίπτωση προσφέρει τη δυνατότητα εύκολης απενεργοποίησης του ενζύμου μέσω απλής θέρμανσης. Ωστόσο, η παραγωγικότητα και η απόδοση του είναι μειωμένη εξαιτίας των φαινομένων παρεμπόδισης από τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη που συσσωρεύονται εντός του συστήματος. Αντίθετα, ένας αντιδραστήρας συνεχούς ροής επιτρέπει την άμεση απομάκρυνση των παραπάνω μονοσακχαρίτων, μειώνοντας δραστικά την παρεμπόδιση της αντίδρασης αλλά συγχρόνως δημιουργεί πολυάριθμα προβλήματα σχεδιασμού όσον αφορά σε παραμέτρους όπως ο χρόνος παραμονής, ο ρυθμός ροής της τροφοδοσίας και του διηθήματος. Σε σχέση με την περίπτωση των αντιδραστήρων συνεχούς ροής, που προτιμώνται από την βιομηχανία, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγικότητά αντιδραστήρα σταθερής κλίνης είναι μεγαλύτερη από τον αντίστοιχο αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι η απόδοση σε GOS ήταν χαμηλότερη λόγω της ενισχυμένης απόδοσης της αντίδρασης υδρόλυσης. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε σε φαινόμενα περιορισμών λόγω διάχυσης (Warmerdam et al. 2014). Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα ρευστοστερεάς κλίνης εντοπίστηκαν τα αντίθετα φαινόμενα, δηλαδή ενίσχυση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης αντί της υδρόλυσης γεγονός που αποδόθηκε στον υδροφοβικό χαρακτήρα του φορέα. Μάλιστα η ενεργότητα του ενζύμου παρέμεινε στο 75% της αρχικής τιμής μετά από 10 κύκλους αντιδράσεων (Garevic et al. 2016).

3.4 Απομόνωση GOS

Τα GOS που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης δεν είναι πλήρως καθαρά αλλά είναι αναμιγμένα μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά του ορού που δεν αντέδρασαν. Τέτοια συστατικά είναι διάφοροι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, γαλακτόζη), χρωστικές που ουσίες όπως η ριβοφλαβίνη, ελάχιστες πρωτεΐνες, διάφορα μέταλλα (ασβέστιο, κάλιο κτλ.). Για την παραλαβή ενός διαλύματος GOS με υψηλή καθαρότητα με σκοπό την αξιοποίηση του στο τομέα των τροφίμων απαιτείται η εφαρμογή ορισμένων τεχνικών απομόνωσης των GOS. Τέτοιες είναι:

3.4.1 Χρήση ενεργού άνθρακα

Ο ενεργός άνθρακας είναι μια ευρέως διαδεδομένη ουσία με προσροφητικές ικανότητες. Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και το φιλτράρισμα του νερού και του αέρα. Με ανάλογο τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αύξηση της καθαρότητας του διαλύματός GOS που προκύπτει από την ενζυμική αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης. Η δράση του στηρίζεται στον υδροφοβικό χαρακτήρα του άνθρακα και την προσρόφηση των γαλακτοολιγοσακχαριτών, καθώς είναι πιο υδροφοβικά σωματίδια σε σχέση με τους απλούς μονοσακχαρίτες. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται διαχωρισμός των GOS από τους μονοσακχαρίτες που είτε προϋπήρχαν στον όξινο ορό γιαουρτιού είτε παράχθηκαν από την αντίδραση υδρόλυσης. Η συνιστώμενη ποσότητα ενεργού άνθρακα για την απομόνωση των GOS είναι 14-33g ενεργού άνθρακα / kg υδατανθράκων και η έκλυση γίνεται με διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 1-15%. Παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης

ναι μεν αυξάνει την καθαρότητα του τελικού προϊόντος αλλά συγχρόνως μειώνει την ποσότητα των GOS στο τελικό διάλυμα (Giacomini et al. 2009, Vera et al. 2016).

3.4.2 Χρήση στήλης ιοντοεναλλαγής

Οι στήλες ιοντοεναλλαγής χρησιμοποιούνται για περισσότερα από 100 χρόνια. Οι κύριες χρήσεις τους αφορούν την αποσκλήρυνση του νερού, την απομάκρυνση του αρσενικού και του εξασθενούς χρωμίου. Η λειτουργία της στηρίζεται στην αντιστρεπτή ανταλλαγή ιόντων μεταξύ διαλύματος και σταθερής φάσης μέσω της ανάπτυξης ιοντικών δεσμών ανάμεσα στα ανιόντα και τα κατιόντα. Στην περίπτωση του διαλύματος GOS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση μετάλλων όπως το ασβέστιο και το κάλιο που έχουν παραμείνει στον όξινο ορό γιαουρτιού. Η απομάκρυνση αυτή των μετάλλων μπορεί να γίνει με την χρήση στήλης κατιόντων μαζί με διάλυμα ασθενούς οξέος ως διάλυμα έκλουσης (Wiśniewski et al. 2014). Η επιτυχία της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα σάκχαρα είναι ασθενείς ηλεκτρολύτες και επομένως δεν συγκρατούνται από την στήλη σε αντίθεση με τα ιόντα των μετάλλων.

3.4.3 Επιλεκτική Ζύμωση

Η χρήση μικροοργανισμών για τον καθαρισμό διαλυμάτων είναι μια σύγχρονη μέθοδος που κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια. Οι μικροοργανισμοί που προστίθενται όπως *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν επιλεκτικά ουσίες που τους είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Τέτοιου είδους ουσίες είναι τα σάκχαρα τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας για τους οργανισμούς και καταναλώνονται άμεσα από αυτούς. Εντός του διαλύματός GOS υπάρχουν σημαντικές ποσότητες σακχάρων που προσεγγίζουν το 20%. Για παράδειγμα, ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να καταναλώσει όλη την ποσότητα της διαθέσιμης γλυκόζης και γαλακτόζης όχι όμως της λακτόζης την οποία δεν μπορεί να μεταβολίσει. Με αυτό τον τρόπο το διάλυμα απαλλάσσεται από αρκετούς μονοσακχαρίτες. Παρόλα αυτά η παρουσία της λακτόζης σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρεμποδίσει τις δράσεις μεταβολισμού του *Saccharomyces cerevisiae* και παράλληλα η μη δυνατότητα ανακύκλωσης του μικροοργανισμού καθιστά την διεργασία αρκετά δαπανηρή (Maraz et al. 2022). Εκτιμάται ότι για την παραγωγή διαλύματος GOS 50 % απαιτείται ποσότητα μαγιάς ίση με 50 mg/g συνολικών σακχάρων (Guerrero et al. 2014).

3.4.4 Χρήση νανοδιήθησης

Η νανοδιήθηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στην αποσκλήρυνση του νερού αφού μέσω αυτής απομακρύνονται τα μόρια του ασβεστίου και του μαγνησίου. Στηρίζεται στην ικανότητα διαπέρασης μίας πολυμερικής μεμβράνης πίεσης με όριο 10 nm κατόπιν εφαρμογής πίεσης. Με βάση το τελευταίο, σωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 10 nm, όπως το ασβέστιο (0,197 nm), η γλυκόζη (1,5 nm) και η λακτόζη (1,18 nm) διαπερνούν την μεμβράνη, ενώ τα GOS που είναι μια σειρά μονοσακχαριτών και έχουν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος συγκρατούνται. Ωστόσο η μεγάλη περιεκτικότητα του διαλύματός GOS σε λακτόζη δημιουργεί κίνδυνο φραγής της μεμβράνης και παρεμπόδισης της διεργασίας με αποτέλεσμα διαλύματα GOS χαμηλής καθαρότητας. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος μπορεί να αξιοποιηθεί μία σειρά τριών διαδοχικών μεμβρανών

νανοδιήθησης (Cordova et al. 2017) ή να πραγματοποιηθεί μια προεπεξεργασία υδρόλυσης του διαλύματός GOS με σκοπό την διάλυση της λακτόζης στους μονοσακχαρίτες της.

3.4.5 Χρήση υπερκρίσιμου ρευστού

Η εκχύλιση με την χρήση υπερκρίσιμου ρευστού όπως το διοξείδιο του άνθρακα είναι μία αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού. Εφαρμόζεται τόσο στο τομέα των τροφίμων για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τους κόκκους του καφέ όσο και πολλούς άλλους τομείς όπως αυτός των υφασμάτων όπου χρησιμοποιείται για στεγνό καθάρισμα των υλικών. Για την επιτυχή δράση της απαιτείται η χρήση ενός υπερκρίσιμου ρευστού δηλαδή ενός ρευστού σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας μεγαλύτερες από το κρίσιμο σημείο του και συχνά απαραίτητη είναι η παρουσία ενός συνδιαλύτη. Στην περίπτωση του καθαρισμού του διαλύματός των GOS ιδανικό ρευστό είναι το διοξείδιο του άνθρακα σε συνθήκες θερμοκρασίας μεγαλύτερες των 31°C και συνθήκες πίεσης μεγαλύτερες από 74 bar. Σημαντική είναι επίσης η χρήση διαλύματος αιθανόλης 50% ως συνδιαλύτη. Δεδομένου ότι το διάλυμα GOS περιλαμβάνει επιπλέον σημαντική ποσότητα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών απαιτείται εκχύλιση τριών σταδίων με σκοπό τη διαδοχική απομάκρυνσή τους και εν τέλει την παραλαβή διαλύματος GOS με καθαρότητα 75% w/w (Montanes et al. 2010).

3.5 Τα οφέλη των γαλακτοολιγοσακχαριτών στον άνθρωπο

Η πέψη των γαλακτοολιγοσακχαριτών είναι σχεδόν αδύνατη από τον ανθρώπινο οργανισμό και εντάσσονται στην κατηγορία των πρεβιοτικών. Ο κύριος λόγος του χαρακτηρισμού τους αυτού είναι τα ευεργετικά οφέλη τους στο εντερικό σύστημα του ανθρώπου, καθώς προάγει την αναπαραγωγή του επιθυμητού βακτηρίου *Bifidobacterium* και συγχρόνως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων. Η κατανάλωσή τους βοηθά στην καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών που σχετίζονται με το εντερικό σύστημα όπως η δυσκοιλιότητα (Sijbers et al 2020). Σε ορισμένες έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι επιδρά θετικά στην αποφυγή ορισμένων μορφών καρκίνου και βελτιώνει την απορρόφηση μετάλλων που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Η δράση αυτή επιβεβαιώθηκε μέσω της μειωμένης συγκέντρωσης χολικού οξέος στα κόπρανα των εθελοντών (Bruno-Barcelona 2015). Τα οφέλη τους όμως δεν περιορίζονται στην καταπολέμηση των εντερικών παθήσεων, αλλά συγχρόνως ως σάκχαρα μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτική γλυκαντική ουσία της εμπορικής ζάχαρης, καθώς το θερμιδικό τους περιεχόμενο είναι 2,7 kcal/g έναντι 3,6 kcal/g της σακχαρόζης και η γλυκαντική ικανότητά τους εκτιμάται στο 0,7 σε σχέση με τη ζάχαρη. Το χαμηλό ενεργειακό τους περιεχόμενο και η γλυκιά γεύση τα καθιστούν εξαιρετικό σύμμαχο για την καταπολέμηση της παχυσαρκίας και την μείωση του σωματικού βάρους (Meyer et al. 2015).

3.6 Χρήσεις των Γαλακτοολιγοσακχαριτών

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στο τομέα των τροφίμων κυρίως λόγω των λειτουργικών τους χαρακτηριστικών. Το πιο βασικό τους πλεονέκτημα είναι η σταθερότητα τους σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλές τιμές pH. Πιο συγκεκριμένα τα GOS παραμένουν αναλλοίωτα σε θερμική κατεργασία στους 160°C για 10 λεπτά. Επιπλέον, εμφανίζονται ιδιαίτερα σταθερά συστατικά σε σχέση με την τιμή pH και μπορούν να διατηρηθούν σε πολύ όξινες τιμές pH κοντά στο 2,0 και τους 37°C για αρκετούς μήνες (Sangwan et al. 2011). Σημαντική επίσης είναι η διαλυτότητα τους, η οποία είναι υψηλή τόσο

στο νερό όσο και στο γάλα. Ειδικά τα διαλύματα τους σε νερό παρουσιάζουν παρόμοιο ιξώδες με το σιρόπι φρουκτόζης (121 Pa s).

3.6.1 Προσθήκη σε βρεφικά γάλατα

Τα GOS εντοπίζονται φυσικά στο μητρικό γάλα και αποτελούν ένα από τα τρία πιο σημαντικά συστατικά του καθώς συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων. Για τον λόγο αυτό η κυρία χρήση τους αφορά στην προσθήκη τους σε βρεφικά γάλατα. Αρκετές εταιρείες όπως η Friesland's Food έχουν ήδη εντάξει τα GOS στα βρεφικά γάλατα που παράγουν σε περιεκτικότητα 0,3-0,5 g/100 mL. Τα αποτελέσματα ερευνών έδειξαν ότι βρέφη που καταναλώνουν βρεφικά γάλατα με προσθήκη GOS παρουσίασαν αυξημένο πληθυσμό βακτηρίων των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, των δύο κύριων βακτηρίων του εντέρου, σε σχέση με όσα τράφηκαν με γάλα χωρίς GOS. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη GOS δεν οδήγησε σε ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως κλάμα, εμετός και παλινδρόμηση και συγχρόνως εμφανίζουν προστασία των κυττάρων και αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Ben et al. 2004, Ambrogi et al. 2023). Σε άλλες έρευνες η προσθήκη των GOS είχε σαν αποτέλεσμα τα βρέφη να εμφανίζουν μειωμένα φαινόμενα ατοπικής δερματίτιδας (Moro et al. 2005). Η προσθήκη των GOS συνέβαλε στην δημιουργία βρεφικού γάλακτος που δεν διαφέρει σημαντικά από το μητρικό γάλα.

3.6.2 Χρήση ως γλυκαντικό μέσο

Τα βρεφικά γάλατα δεν είναι το μοναδικό προϊόν διατροφής στο οποίο μπορούν να προστεθούν τα GOS. Μια εξίσου καινοτόμα χρήση είναι σε χυμούς φρούτων όπου προστίθενται ως γλυκαντικό μέσο έναντι της σακχαρόζης ή του σιροπιού φρουκτόζης. Σημαντική παράμετρος στην εν λόγω εφαρμογή είναι η σταθερότητα των ολιγοσακχαρίτων στις όξινες συνθήκες που επικρατούν στους χυμούς. Η ποσότητα που προστίθεται είναι περίπου 2,5 g/240 mL χυμού. Η προσθήκη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του θερμιδικού περιεχομένου του χυμού κατά 10 kcal/μερίδα και έχει αποδειχθεί επιτυχημένη σε χυμούς από πορτοκάλι, μήλο, λεμόνι, ανανά και πεπόνι (Fonteles et al. 2018). Αντίστοιχα με τους χυμούς, τα GOS χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γιαουρτιού ή άλλων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων με χαμηλά λιπαρά. Η προσθήκη τους είναι περίπου 5% της συνολικής ποσότητας του προϊόντος και συμβάλει στην μείωση του ενεργειακού περιεχομένου κατά 14 kcal/μερίδα. Παράλληλα, γίνονται δοκιμές για την ένταξή τους στα προϊόντα αρτοποιίας τόσο λόγω του χαμηλότερου θερμιδικού φορτίου όσο και της σταθερότητας τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η προσθήκη των GOS σε ποσοστό μέχρι 11% όχι μόνο δεν αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ψωμιού, αλλά συγχρόνως συμβάλλει στην αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου αφού τα GOS διαθέτουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και δεν υδρολύονται από τα παγκρεατικά ένζυμα και τα γαστρικά υγρά (Costabile et al. 2015). Μία εξίσου επιτυχημένη εφαρμογή έχει πραγματοποιηθεί σε κέτσαπ όπου η προσθήκη 2,5% GOS μαζί με ξανθάνη και κόμμι γκουάρ μείωσε αισθητά τα φαινόμενα συναίρεσης, ενίσχυσε την ελαστική συμπεριφορά και δημιούργησε ένα προϊόν με λιγότερη ζάχαρη (Mansouripour et al. 2016).

3.6.3 Χρήση για την παραγωγή προϊόντων με πρεβιοτική δράση

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες διαθέτουν πρεβιοτική δράση, καθώς ενισχύουν την ανάπτυξη του ωφέλιμου μικροβιακού πληθυσμού που προϋπάρχει στο εντερικό σύστημα. Παρόλα αυτά δεν αποτελούν ένα ξεχωριστό τρόφιμο αλλά ένα συστατικό που μπορεί να προστεθεί σε κάποιο τρόφιμο προσδίδοντας του πρεβιοτική δράση. Δεδομένου ότι η σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών πραγματοποιείται μέσω αξιοποίησης υποστρωμάτων που είναι πλούσια σε λακτόζη, οι περισσότερες εφαρμογές τους σε προϊόντα διατροφής είναι σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι συνηθέστερες εφαρμογές τους είναι σε προϊόντα τύπου γιαουρτιού όπου είτε προστίθενται απευθείας ως σκόνη στο τελικό προϊόν, είτε παράγονται ενζυμικά στο γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή των προϊόντων τύπου γιαουρτιού. Επιπλέον, δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί σε προϊόντα όπως το σοκολατούχο γάλα αλλά και ορισμένα επιδόρπια όπως οι κρέμες βανίλιας. Σε σχέση με τις κρέμες βανίλιας, η προσθήκη του διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών διαθέτει διπλή δράση, καθώς όχι μόνο προσδίδει πρεβιοτική δράση αλλά συγχρόνως μειώνει την ποσότητα της προστιθέμενης ζάχαρης. Παράλληλα το προϊόν εμπλουτίζεται σε στοιχεία όπως ο φωσφόρος, το κάλιο και κυρίως το ασβέστιο, καθιστώντας το έτσι ένα προϊόν υψηλής διατροφικής αξίας χωρίς να χάνει τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Αντίστοιχη εφαρμογή έχει πραγματοποιηθεί σε παγωτό. Η προσθήκη γαλακτοολιγοσακχαριτών σε μορφή σκόνης σε ποσοστό έως 3% w/w σε παγωτό με γεύση βανίλια είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή παγωτού με μεγαλύτερη σταθερότητα και χαμηλότερο ρυθμό τήξης (Balthazar et al. 2015)

3.6.4 Χρήση ως ζωοτροφή

Η προσθήκη ολιγοσακχαριτών στην τροφή διαφόρων οικόσιτων ζώων έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει αντίστοιχα οφέλη με αυτά που παρέχει στους ανθρώπους. Χρήση σκόνης GOS στη τροφή σκύλων σε ποσοστό περίπου 1 % συνέβαλε στη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος των υπό μελέτη σκύλων και ενίσχυσε σημαντικά την ανάπτυξη χρήσιμων βακτηρίων (Renta et al. 2020). Αντίστοιχα, η προσθήκη GOS σε ποσοστό 3,37% στη τροφή κοτόπουλων που προορίζονται για κατανάλωση οδήγησε σε βελτίωση της υγεία του πεπτικού τους συστήματος, ενίσχυσε την ανάπτυξη των κυλικών κυττάρων τους και κυριότερα αύξησε την παραγωγή του σωματικού τους βάρους από 76,3 g/ημέρα σε 87,7 g/ημέρα (Richards et al. 2020).

Κεφάλαιο 4^ο

Πειραματικός σχεδιασμός - Υλικά και μέθοδοι

4.1 Σκοπός και στόχοι

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την διερεύνηση της κλιμάκωσης της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από την εργαστηριακή στην πιλοτική κλίμακα και τη μελέτη της ενσωμάτωσης αυτών σε προϊόν διατροφής. Για τη δυνατότητα κλιμάκωσης της διεργασίας χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*, η οποία εφαρμόστηκε στις βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης, όπως αυτές είχαν προκύψει από προηγούμενη πειραματική μελέτη σε μικρή, εργαστηριακή κλίμακα. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών πίεσης και θερμοκρασίας στον ρυθμό συμπίκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού σε εργαστηριακή κλίμακα, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες συμπίκνωσης και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες σε πιλοτική κλίμακα. Έπειτα, μελετήθηκε η παραγωγικότητα της β-γαλακτοζιδάσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες σε εργαστηριακή κλίμακα, προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων προηγούμενης μελέτης και μελετήθηκε η κλιμάκωση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης σε πιλοτική κλίμακα. Τέλος, σχεδιάστηκε και παράχθηκε κρέμα βανίλιας με περιεκτικότητα 0,73% w/v σε GOS ενσωματώνοντας το σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών που παράχθηκε στην πιλοτική κλίμακα, αξιολογήθηκε η μεταβολή των ποιοτικών της χαρακτηριστικών με το χρόνο σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και υπολογίστηκε το προστιθέμενο κόστος ενσωμάτωσης των GOS στο εν λόγω προϊόν.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν

1. Παραλαβή όξινου ορού γιαουρτιού
2. Μέτρηση ενεργότητας ενζύμου
3. Βελτιστοποίηση συνθηκών συμπίκνωσης υπό κενό σε εργαστηριακή κλίμακα
4. Σύγκριση ρυθμού συμπίκνωσης εργαστηριακής και πιλοτικής κλίμακας
5. Πραγματοποίηση ενζυμικής αντίδρασης σε εργαστηριακή κλίμακα
6. Πραγματοποίηση ενζυμικής αντίδρασης σε πιλοτική κλίμακα
7. Συμπύκνωση και μερική εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος στο προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης
8. Ανάπτυξη συνταγής κρέμας βανίλιας με ενσωμάτωση του σιροπιού GOS
9. Παραγωγή προϊόντων με και χωρίς την προσθήκη GOS ως δείγμα αναφοράς
10. Έλεγχος διατηρησιμότητας προϊόντων
11. Αξιολόγηση οικονομικής βιωσιμότητας του προτεινόμενου σχεδίου αξιοποίησης του όξινου ορού

4.2 Υλικά-Αντιδραστήρια

Υλικά

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν οι ακόλουθες :

- Παστεριωμένος όξινος ορός γιαουρτιού 0% w/w σε λιπαρά
- Εμπορικό γάλα μακράς διάρκειας με περιεκτικότητα 3,4% w/w σε πρωτεΐνες και 3,5% w/w σε λιπαρά
- Εμπορικό άμυλο καλαμποκιού
- Εμπορικό προϊόν βανιλίνης
- Σακχαρόζη
- Διττανθρακικό Νάτριο

Αντιδραστήρια

- Υδροξείδιο του Νατρίου (Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Κιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Λακτόζη (Lactose monohydrate, Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Γαλακτόζη (D(+)-Galactose extra pure, Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Γλυκόζη (D (+)-glucose anhydrous, Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Ραφινόζη (D(+)-Raffinose Pentahydrate puriss. p.a., Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (o-NPG, Sigma-Aldrich GmbH, Γερμανία)
- Ορθο-νιτροφαινόλη (o-NP) - (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- H₂O υψηλού βαθμού καθαρότητας για αναλύσεις HPLC (Sigma-Aldrich, Γερμανία)

Ένζυμα

- Ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. Oryzae*

4.3 Μέτρηση της Ενζυμικής Ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης

Ο ρόλος της β-γαλακτοζιδάσης είναι κυρίως να διασπά τον β-γλυκοζιτικό δεσμό που υπάρχει στο μόριο της λακτόζης και να απελευθερώνει το μόριο της γλυκόζης και το μόριο της γαλακτόζης. Ο έλεγχος της δράσης αυτής μπορεί να γίνει με ένα μόριο όμοιο της λακτόζης το οποίο ονομάζεται ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG). Η ένωση αυτή είναι όμοια με τη λακτόζη καθώς περιλαμβάνει ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης τα οποία είναι συνδεδεμένα με β-γλυκοζιτικό δεσμό ο οποίος αναγνωρίζεται και υδρολύεται από τη β-γαλακτοζιδάση. Με βάση αυτό ως ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης ίση με 1 Unit καλείται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μμολ ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος oNPG στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Οι συνθήκες αυτές καθορίζονται από την πηγή προέλευσης του ενζύμου και διαφέρουν ανάλογα τον μικροοργανισμό που έχει παραχθεί το ένζυμο. Η β-γαλακτοζιδάση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*.

Δημιουργία καμπύλης αναφοράς για την ενζυμική ενεργότητα

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς αρχικά παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα ορθο-νιτροφαινόλης συγκεντρώσεων 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν από διάλυση σκόνης ορθο-νιτροφαινόλης τόσο σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL όσο και των 1000 mL. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 2,7 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα ορθο-νιτροφαινόλης και προστίθενται 0,5 mL διαλύματος Na₂CO₃ 30% w/v. Παράλληλα σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 2,7 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL διαλύματος Na₂CO₃ 30% w/v. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται καλά με τη βοήθεια συσκευής Vortex. Τα προκύπτοντα διαλύματα

φωτομετρούνται σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 410 nm (Unicam Helios α, Γερμανία). Με βάση τις τιμές της απορρόφησης για το κάθε διάλυμα δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς που συσχετίζει τη συγκέντρωση σε ορθο-νιτροφαινόλη με την απορρόφηση του δείγματός.

β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae*

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης που προέρχεται από τον *Aspergillus oryzae* αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα ορθο-νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη συγκέντρωσης 0,3 mM με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος/NaOH με τιμή pH 4,5. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 2,5 mL από το παραπάνω διάλυμα και 0,2 mL ενζύμου κατάλληλης αραιώσης, ενώ σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για την ποσότητα του ενζύμου προστίθενται 0,2 mL απιονισμένου νερού, ως τυφλό δείγμα. Τα δείγματα αναδεύονται με τη βοήθεια συσκευής Vortex και επωάζονται για 10 min σε υδατόλουτρο στους 45°C. Μετά το πέρας των 10 min προστίθενται 0,5 mL διαλύματος Na₂CO₃ 30% w/v και τα δείγματα αναδεύονται καλά. Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών φωτομετρείται με φασματοφωτόμετρο στα 410 nm (Unicam Helios α, Γερμανία) (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Φωτόμετρο απλής δέσμης Unicam Helios α

4.4 Συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα

Ο όξινος ορός γιαουρτιού που παράγεται έχει περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,25% w/v. Για την καλύτερη δράση του ενζύμου και τη μεγιστοποίηση της παραγωγής ολιγοσακχαριτών σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί η συγκέντρωση της λακτόζης θα πρέπει να βρίσκεται στη μέγιστη δυνατή τιμή της. Η τιμή αυτή για τον όξινο ορό γιαουρτιού είναι 20% καθώς σε μεγαλύτερες τιμές γίνεται υπέρβαση της διαλυτότητας της λακτόζης στο νερό με αποτέλεσμα να εμφανίζονται φαινόμενα καταβύθισης. Παράλληλα, όπως έχει αναφερθεί, η λακτόζη είναι ευαίσθητη σε φαινόμενα θέρμανσης σε υψηλές θερμοκρασίες λόγω φαινομένων κρυστάλλωσής της. Για αυτό τον λόγο η συμπύκνωση όλες οφείλει να γίνει σε κατά το δυνατό ήπιες θερμοκρασίες. Προκειμένου να τηρηθούν όλες οι προηγούμενες προϋποθέσεις, η συμπύκνωση του παραλαμβανόμενου ορού πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε πιλοτική κλίμακα. Ο εργαστηριακής κλίμακας εξατμιστήρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Büchi Rotavapor RE 111 (Ελβετία) με θερμαινόμενο λουτρό Büchi 461 Water bath (Ελβετία) (Εικόνα 4.2). Το κενό επιτεύχθηκε με τη χρήση αντλίας Büchi Vacuum Pump V-100 (Ελβετία) και η ψύξη πραγματοποιήθηκε με τη

συσκευή Lauda ecoline RE 312 (Γερμανία). Στην εργαστηριακή κλίμακα πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση 1L όξινου ορού γιαουρτιού υπό συνθήκες πίεσης 75, 80, 85 και 100 mbar και συνθήκες θερμοκρασίας 45, 50 και 60°C με τη χρήση είτε απλού νερού (5°C), είτε πολυπροπυλενογλυκόλης (-10°C) ως ψυκτικού μέσου. Στην πιλοτική κλίμακα, η συμπύκνωση έγινε σε 20 L όξινου ορού γιαουρτιού και συνθήκες 100 mbar και 60°C με χρήση πολυπροπυλενογλυκόλης ως ψυκτικού μέσου (-10 °C) (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.2. Εργαστηριακή διάταξη συμπύκνωσης υπό κενό



Εικόνα 4.3. Διάταξη πιλοτικής κλίμακας για την συμπύκνωση υπό κενό

4.5 Μέτρηση περιεκτικότητας σακχάρων

Η ανάλυση της περιεκτικότητας του όξινου ορού γιαουρτιού και των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων σε σάκχαρα πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους υγρής χρωματογραφίας: την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Δείκτη

Διάθλασης και τη Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή.

4.5.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector, HPLC-RID)

Πρόκειται για μία μέθοδο διαχωρισμού που στηρίζεται σε δύο φάσεις, μία κινητή και μία στατική. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στήλη, όπου βρίσκεται η στατική φάση, με καθορισμένη ροή περιέχοντας την προς ανάλυση ουσία και ένα διαλύτη. Κατά τη διέλευση τα μόρια συγκρατούνται από τη στατική φάση λόγω των χαρακτηριστικών τους (πολικές ομάδες, μέγεθος κ.λπ.) οπότε διαχωρίζονται και εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Ανάλογα με τον χρόνο που εξέρχονται από τη στήλη κατηγοριοποιούνται και ταυτοποιούνται με βάση πρότυπα διαλύματα που έχουν διέλθει νωρίτερα από τη στήλη. Συγχρόνως με βάση το εμβαδόν της εκάστοτε καμπύλης γίνεται η ποσοτικοποίησή τους και πάλι με βάση τα πρότυπα διαλύματα. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων σύστημα HPLC (HPLC system Agilent series 1100, Γερμανία) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refraction Index, RI, Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία), απαερωτή (degasser Hewlett Packard series 1200G1379B, Ιαπωνία) και αντλία (iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία) (Εικόνα 4.4). Η στήλη και η προστήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hi Plex Ca (Duo). Ως διαλύτης αξιοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό υγρής χρωματογραφίας ενώ η εισαγωγή των δειγμάτων γινόταν με χρήση εισαγωγέα χωρητικότητας 25 μL . Τα προς ανάλυση δείγματα πριν εισέλθουν στη στήλη αραιώνονταν σε κατάλληλη συγκέντρωση και φιλτράρονταν με νάιλον φίλτρα 0,22 μm με σκοπό τη προστασία της στήλης. Οι συνθήκες λειτουργίας ήταν ροή διαλύτη 0,4 mL/min και θερμοκρασία λειτουργίας 85 °C.



Εικόνα 4.4. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης

4.5.2 Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography- Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)

Η χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή είναι μια σύγχρονη μέθοδος χρωματογραφίας που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στο διαχωρισμό υδατανθράκων. Η λειτουργία της στηρίζεται στη βασική αρχή της χρωματογραφίας, δηλαδή την αλληλεπίδραση μεταξύ κινητής και σταθερής φάσης. Η αλληλεπίδραση στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ιοντικής φύσεως και βασίζεται στην ασθενώς όξινη φύση των υδατανθράκων μέσω της οποίας μπορεί να επιτευχθεί επιλεκτικός διαχωρισμός σε υψηλή τιμή pH. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ήταν η CarboPac PA1 Analytical (Thermo Scientific, ΗΠΑ), συνοδευόμενη από όμοιου τύπου προ-στήλη CarboPac PA1 Guard (Thermo Scientific, ΗΠΑ). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν παλμικό αμπερόμετρο με ηλεκτρόδιο εργασίας χρυσού και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl.

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες με το πρόγραμμα διαβάθμισης που παρουσιάζεται παρακάτω. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι A: 12,5 mM NaOH, B: 125 mM NaOH, και C: 125 mM NaOH/500mM CH₃COONa.

Πίνακας 4.1 Πρόγραμμα διαβάθμισης διαλυτών του συστήματος HPAEC-PAD

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

4.6 Ενζυμική Αντίδραση Τρανσγαλακτοζυλίωσης σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης παραγωγής GOS χρησιμοποιήθηκε ως πηγή λακτόζης συμπυκνωμένος όξινος ορός γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα 20 % w/v σε λακτόζη και ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε 8 Units/mL συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού. Τα μίγμα ενζύμου-ορού με αρχικό όγκο 40 mL τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη εντός αναδευόμενου λουτρού (Grant GLS400) στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (45 °C) (Εικόνα 4.5). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 8 h και λαμβάνονταν δείγματα σε χρόνους 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540 min. Μετά το πέρας των 8 h πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου με βρασμό για 10 min. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με αντίστοιχο τρόπο σε πιλοτική κλίμακα όπου ο αρχικός όγκος του διαλύματος ήταν 3 L (Εικόνα 4.6)



*Εικόνα 4.5. Διάταξη αντίδρασης όξινου ορού γιαουρτιού με την χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *A.oryzae**



*Εικόνα 4.6.. Διάταξη αντίδρασης όξινου ορού γιαουρτιού με την χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *A.oryzae* σε αρχικό όγκο διαλύματος 3L.*

4.6 Εξουδετέρωση διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών

Το διάλυμα που προκύπτει από την ενζυμική αντίδραση διαθέτει επίσης σημαντική ποσότητα γαλακτικού οξέος που του προσδίδει όξινη γεύση, καθώς έχει τιμή pH 4,3. Για να βελτιωθεί η γεύση του και τα χαρακτηριστικά του πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση του

διαλύματος με τη χρήση σκόνης διττανθρακικού νατρίου. Η εξουδετέρωση έγινε με τη βοήθεια πεχάμετρου ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων (AMEL 338, Amel Instrument, Ιταλία) μέχρι τελικής τιμής pH 6,6. Κατόπιν, το εξουδετερωμένο διάλυμα φυλάσσεται εντός δοχείου μέχρι να μειωθεί ο παραγόμενος αφρός.

4.7 Συμπύκνωση σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών

Το σιρόπι GOS που παράχθηκε και εξουδετερώθηκε υποβλήθηκε σε εκ νέου συμπύκνωση υπό κενό στο περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi Rotavapor RE 111 (Ελβετία) με σκοπό την συμπύκνωση του διαλύματος σε GOS. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν πίεση 100 mbar και θερμοκρασία 60 °C. Η συμπύκνωση ολοκληρώθηκε όταν ο τελικός όγκος του διαλύματος μειώθηκε κατά 50%.

4.8 Παραγωγή σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών

Η παραγωγή σκόνης GOS πραγματοποιήθηκε τη μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Εικόνα 4.7). Οι συνθήκες λειτουργίας ορίστηκαν σε θερμοκρασία εισόδου 170 °C και θερμοκρασία εξόδου 90 °C. Η παροχή αέρα ήταν 500 L/h. Το δείγμα εισήχθη σε δόσεις των 500 mL. Η παραγόμενη σκόνη αφού παραλήφθηκε από το δοχείο συλλογής αποθηκεύτηκε σε αεροστεγές δοχείο, προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση με την υγρασία της ατμόσφαιρας και η υποβάθμιση του προϊόντος.



Εικόνα 4.7. Συσκευή ξήρανσης με ψεκασμό Büchi Mini Spray Dryer B-191

4.9 Παραγωγή κρέμας βανίλιας με σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών

Η κρέμα που παράχθηκε περιείχε: Αγελαδινό γάλα (69,7%), συμπυκνωμένο διάλυμα GOS με περιεκτικότητα σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες 0,73% w/v (14,0%), άμυλο καλαμποκιού (5,0%), σακχαρόζη (10,7%), βανιλίνη (0,1%), πρωτεΐνη ορού γάλακτος 75% (0,5%). Η παραγωγή της περιλάμβανε παστερίωση του γάλακτος και του σιροπιού GOS στους 95 °C για 1 min σε ειδικό θερμαινόμενο δοχείο (Εικόνα 4.8), κατόπιν διάλυση εντός αυτού αρχικά της ζάχαρης υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια της πρωτεΐνης του ορού γάλακτος. Έπειτα η θερμοκρασία του δοχείου ρυθμίζεται στους 80 °C και προστίθεται το άμυλο και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση για να ζελατινοποιηθεί το άμυλο και να πήξει το μίγμα. Όταν αρχίσει να πήξει το μίγμα προστίθεται η βανιλίνη, αναδεύεται και στη συνέχεια, αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μεταφέρεται στους αποστειρωμένους περιέκτες (130 mL), εντός θαλάμου νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων (Εικόνα 4.9). Το πήγμα αφήνεται εντός των περιεκτών για 30 min και στη συνέχεια σφραγίζεται με αλουμινόφυλλο. Το τελικό προϊόν τοποθετείται εντός θαλάμων σταθερής θερμοκρασίας στους 4 και 8 °C. Παράλληλα, παράχθηκε κρέμα αναφοράς που περιείχε Αγελαδινό γάλα (84,2%), άμυλο καλαμποκιού (5,0%), σακχαρόζη (10,7%), βανιλίνη (0,1%) με ακριβώς την ίδια διαδικασία παραγωγής.

Οι συνταγές που μελετήθηκαν είχαν τις ακόλουθες διαφοροποιήσεις :

- Αντικατάσταση του σιροπιού GOS από μη εξουδετερωμένο σιρόπι GOS σε περιεκτικότητα 50% και 33% στο αρχικό βάρος των συστατικών
- Χρήση του εξουδετερωμένου σιροπιού GOS σε περιεκτικότητα 33% και 14% στο αρχικό βάρος του γάλακτος
- Αντικατάσταση του σιροπιού GOS από παραγόμενη σκόνη του σιροπιού GOS σε περιεκτικότητα 10%



Εικόνα 4.8. Θέρμανση του μίγματος γάλακτος και διαλύματός GOS σε ειδικό θερμαινόμενο δοχείο



Εικόνα 4.9. Παραμονή των έτοιμων προϊόντων σε αποστειρωμένο περιβάλλον

4.10 Έλεγχος διατηρησιμότητας προϊόντων

4.10.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των τελικών προϊόντων 10 g δείγματος διαλύονταν εντός αποστειρωμένης σακούλας σε 90 g διαλύματος Ringer και ομογενοποιούνται για 1 min σε ομογενοποιητή σακουλών. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν οι διαδοχικές αραιώσεις εντός αποστειρωμένων δοκιμαστικών σωλήνων με διάλυμα Ringer και καλλιεργούνταν σε επιλεγμένα θρεπτικά υλικά εντός τρυβλίων Petri.

Η καταμέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό Tryptic Glucose Yeast Agar μετά από αερόβια επώαση για 72 h στους 25 °C

Η καταμέτρηση των ζυμών και των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) Agar μετά από αερόβια επώαση για 72 h στους 25 °C

Ο προσδιορισμός των γαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε μετά από αναερόβια επώαση στους 37 °C για 96 h σε θρεπτικό μέσο Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar.

Τέλος, ο προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού του *Enterobacteriaceae* spp. πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar μετά από αναερόβια επώαση στους 37 °C για 24 h.

4.10.2 Μέτρηση Χρώματος

Η μέτρηση του χρώματος πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματόμετρου Minolta CR200 (Minolta Co., Chuo-Ku, Ιαπωνία) (Εικόνα 4.10) στη χρωματική κλίμακα CIE Lab, η οποία εκφράζει τη μαθηματική προσέγγιση της μη γραμμικής απόκρισης του ματιού. Τα δείγματα ύστερα από ανάδευση τοποθετούνταν σε γυάλινα τρυβλία και μετρούνταν. Το χρωματόμετρο πριν από κάθε μέτρηση βαθμονομούταν με λευκή πλάκα αναφοράς του οργάνου. Η

μεταβολή του ολικού χρώματος των δειγμάτων κατά την αποθήκευση υπολογίστηκε μέσω της σχέσης:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

όπου, η παράμετρος L εκφράζει τη φωτεινότητα του χρώματος, θετική τιμή για την παράμετρο a υποδεικνύει κόκκινο χρώμα (redness) ενώ αρνητική τιμή πράσινο χρώμα (greenness) και, θετική τιμή για την παράμετρο b υποδεικνύει κίτρινο χρώμα (yellowness), ενώ αρνητική τιμή μπλε χρώμα (blueness). Οι τιμές L_0 , a_0 , b_0 αντιστοιχούν στις τιμές που μετρήθηκαν την 1^η ημέρα αποθήκευσης.



Εικόνα 4.10. Χρωματόμετρο Minolta CR-200

4.10.3 Μέτρηση Οξύτητας και pH

Η μέτρηση της οξύτητας πραγματοποιήθηκε με βάση την μεθοδολογία του IDF (IDF 1991). Για τη μέτρηση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας 20 g δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διαλύθηκαν σε 20 g απιονισμένου και απαερωμένου νερού. Στο διάλυμα προστίθενται 10 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλείνης και πραγματοποιείται τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0,1 N.

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα των δειγμάτων εκφράστηκε ως %γαλακτικό οξύ και προσδιορίστηκε από την σχέση :

$$\% \text{γαλακτικό οξύ} = 0,9 \cdot \frac{V}{m}$$

όπου, V, ο όγκος του καταναλισκόμενου NaOH 0,1N και, m, η μάζα του τιτλοδοτούμενου δείγματος (σε g).

Η μέτρηση της τιμής του pH πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πεχάμετρου ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων (AMEL 338, Amel Instrument, Ιταλία).

4.10.4 Μέτρηση Συναίρεσης

Για τη συγκεκριμένη μέτρηση 10 g δείγματος φυγοκεντρώνται στις 10.000 r.p.m. σε θερμοκρασία 20°C για 20 min. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης ζυγίζεται το

διαχωρισμένο υγρό. Το όργανο φυγοκέντρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Thermo SCIENTIFIC MEGAFUGE 16R (Γερμανία) (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Φυγοκεντρικό σύστημα Thermo SCIENTIFIC MEGAFUGE 16R

4.10.5 Μέτρηση Ιξώδους

Οι ρεολογικές ιδιότητες των δειγμάτων προσδιορίστηκαν με περιστροφικό ιξωδόμετρο (RC1 Rheometer, Rheotec Meßtechnik GmbH, Γερμανία) (Εικόνα 4.12) εφοδιασμένο με υδατόλουτρο ψύξης-θέρμανσης (RE312, Lauda GmbH, Γερμανία). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όταν η θερμοκρασία του δείγματος ήταν 8 °C. Ποσότητα δείγματος τοποθετούνταν σε κυλινδρικό εξάρτημα (MS-CC48 DIN/FTK). Η ποσότητα του δείγματός που τοποθετούνταν εντός του κυλινδρικού εξαρτήματος ήταν τέτοια ώστε να καλύπτει τον μισό διαθέσιμο όγκο του εξαρτήματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για δύο περιοχές ρυθμών διάτμησης, αρχικά για μεταβαλλόμενο ρυθμό διάτμησης από 5 έως 300 s⁻¹ και κατόπιν για σταθερό ρυθμό διάτμησης 300 s⁻¹.



Εικόνα 4.12. Περιστροφικό ιξωδόμετρο RC1 Rheometer

Προκειμένου να αναλυθεί η ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων, τα δεδομένα διατμητικής τάσης - ρυθμού διάτμησης προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Ostwald-de Waele:

$$\sigma = K * \dot{\gamma}^n$$

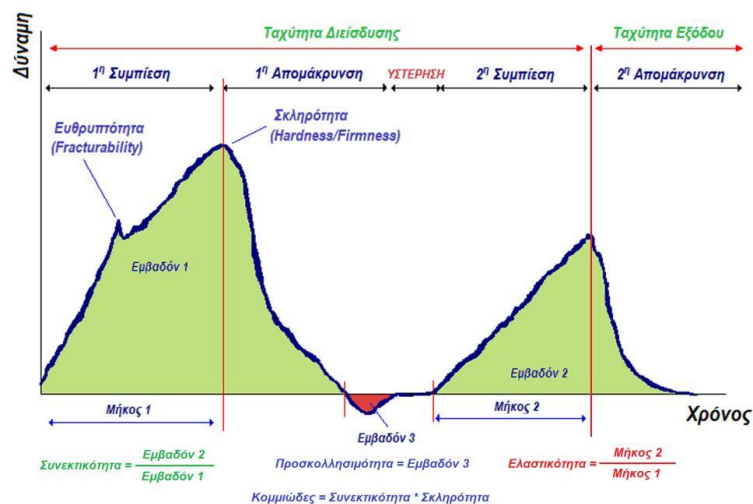
όπου, σ είναι η διατμητική τάση (Pa), K είναι η σταθερά συνεκτικότητας ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-n}$), $\dot{\gamma}$ είναι ο ρυθμός διάτμησης (s^{-1}) και, n είναι ο δείκτης ρεολογικής συμπεριφοράς.

4.10.6 Ανάλυση Υφής

Η ανάλυση υφής πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή υφής (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Αγγλία) (Εικόνα 4.13). Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν κύλινδρος διαμέτρου 12 mm και μήκους 35 mm. Η θερμοκρασία της δοκιμής ορίστηκε στους 10°C, η ταχύτητα δοκιμής στα 2 mm/s, η ταχύτητα πριν τη δοκιμή 10 mm/s και η ταχύτητα μετά τη δοκιμή 2 mm/s. Η ελάχιστη δύναμη καταγραφής (trigger point) ορίστηκε στα 4 g και το βάθος διείσδυσης στα 13 mm. Τα διαγράμματα δύναμης-χρόνου καταγράφονταν με τη βοήθεια του λογισμικού Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, Αγγλία) μέσω του οποίου υπολογίστηκαν οι ζητούμενες παράμετροι: πηκτότητα, συνεκτικότητα, προσκολλησιμότητα, δείκτης ελαστικότητας και το κομμιώδες (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.13. Αναλυτής Υφής TA-XT2i



Εικόνα 4.14. Τυπικό διάγραμμα TPA

4.10.7 Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από 4 εκπαιδευμένα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Οι δοκιμαστές αξιολογούσαν τα δείγματα σε ξεχωριστούς φωτιζόμενους θαλάμους, στους οποίους υπήρχε σταθερή θερμοκρασία του χώρου, ενώ τα αναλώσιμα (π.χ. κουτάλια, ποτήρια, εμφιαλωμένο νερό για την έκπλυση του στόματος μεταξύ της δοκιμής διαφορετικών δειγμάτων κ.α.) που χρησιμοποιούνταν είχαν σταθερά χαρακτηριστικά. Σε κάθε δοκιμαστή προσφέρονται δύο δείγματα στην εκάστοτε συνθήκη αποθήκευσης σε κωδικοποιημένους πλαστικούς περιέκτες των 130 g. Για την εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε ένας ικανοποιητικός αριθμός περιγραφικών όρων. Η εκτίμηση και βαθμολόγηση των περιγραφικών όρων έγινε με χρήση 9-βάθμιας κλίμακας, όπου: 1= ανεπαίσθητο/μη αντιληπτό, 5 = αρκετά αντιληπτό και 9 = εξαιρετικά αντιληπτό/πολύ έντονο χαρακτηριστικό (Πίνακας 4.2). Το έντυπο αξιολόγησης είχε την ακόλουθη μορφή.

Πίνακας 4.2. Έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης δειγμάτων κρέμας με ή χωρίς ενσωμάτωση GOS

ΙΔΙΟΤΗΤΑ		ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ – ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		1 = μη αποδεκτό-ακατάλληλο, 5= αποδεκτό, 9 = κανένα ελάττωμα								
ΧΡΩΜΑ – ΕΜΦΑΝΙΣΗ	ΑΦΥΣΙΚΟ ΧΡΩΜΑ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΧΡΩΜΑ ΚΑΜΜΕΝΟΥ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΑΝΩΜΑΛΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΣΥΝΑΙΡΕΣΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ΑΡΩΜΑ	FLAVOR ΚΑΜΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΤΑΓΓΟ FLAVOR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΕΥΧΑΡΙΣΤΟ ΑΡΩΜΑ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ΓΕΥΣΗ	ΟΞΙΝΗ ΓΕΥΣΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΓΛΥΚΥΤΗΤΑ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΓΕΥΣΗ ΟΡΟΥ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΠΙΚΡΗ ΓΕΥΣΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ΥΦΗ (τεμαχισμός με το κουτάλι)	ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΚΟΚΚΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΚΟΛΛΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΣΥΝΕΚΤΙΚΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΣΥΝΑΙΡΕΣΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΑΦΗΝΕΙ ΙΧΝΟΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΝΑΙ <input type="checkbox"/>		ΟΧΙ <input type="checkbox"/>						
ΥΦΗ (εκτίμηση στο στόμα)	ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΚΟΚΚΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΚΟΛΛΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΣΥΝΕΚΤΙΚΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΚΡΕΜΩΔΗΣ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΑΔΙΑΛΥΤΑ ΣΤΕΡΕΑ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ΛΙΠΑΡΗ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Παρατηρήσεις - Σχόλια:

4.11 Μαθηματική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

4.11.1 Απόδοση Μετατροπής Λακτόζης σε Γαλακτοολιγοσακχαρίτες

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

$$\% \text{ GOS yield} = \frac{C_{\text{GOS}}}{C_{\text{lactose}(t=0)}}$$

Όπου % GOS yield, η απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, C_{GOS} η συγκέντρωση των γαλακτοολιγοσακχαρίτων που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς και $C_{\text{lactose}(t=0)}$ η συγκέντρωση της λακτόζης στο αντιδρών μίγμα την χρονική στιγμή $t=0$.

Στη συγκέντρωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών συμπεριλαμβάνεται επίσης η συγκέντρωση της αλλολακτόζης που ποσοτικοποιείται με βάση την καμπύλη αναφοράς της λακτόζης.

4.11.2 Μικροβιακός Ρυθμός Ανάπτυξης

Για την εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts 1995), το οποίο περιλαμβάνει 3 φάσεις ανάπτυξης (λανθάνουσα, εκθετική και φάση στασιμότητας). Μέσω αυτού προσδιορίζεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, το αρχικό και τελικό μικροβιακό φορτίο και η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Με την χρήση αυτών εκτιμήθηκε ο χρόνος διατήρησης των δειγμάτων, λαμβάνοντας ως αποδεκτό όριο αλλοίωσης τους $7 \log_{10}\text{CFU/g}$.

4.12 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

4.12.1 Κλασσικές Τεχνικές Στατιστικής Επεξεργασίας

Προκειμένου να μελετηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης των σχεδιαστικών παραμέτρων στο μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS, τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε γραμμική παραμετρική ανάλυση διακύμανσης (Factorial ANOVA), με παράλληλη σύγκριση των μέσων όρων μέσω της δοκιμής Duncan (Duncan's means post hoc comparison test), προκειμένου να διαπιστωθούν οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ανά είδος σχεδιαστικής παραμέτρου και για τα επιμέρους πειράματα που διεξήχθησαν. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως στάθμη σημαντικότητας την τιμή $\alpha = 0,95$ ($p\text{-value} = 0,05$). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Statistica 7 (StatSoft Inc., Ταλσα, Οκλαχόμα, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής).

4.12.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Με σκοπό την διερεύνηση της συσχέτισης των οργανοληπτικών και των αντικειμενικών χαρακτηριστικών αλλά και την επίδραση της παρουσίας GOS, της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης, τα πειραματικά αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών.

Τα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, πριν την εφαρμογή της ανάλυσης κύριων συνιστωσών, κανονικοποιήθηκαν βάσει του κριτηρίου $1/SD$. Ο μέγιστος αριθμός συνιστωσών που απαιτείται για την επαρκή επεξήγηση της ολικής διακύμανσης καθορίστηκε με βάση το διάγραμμα ιδιοτιμών, ενώ οι συσχετίσεις των ποιοτικών παραμέτρων με τους εκάστοτε κύριους άξονες καθορίστηκε με βάση την τιμή $|\alpha| > 0,75$, όπου α είναι η επεξηγούμενη ολική διακύμανση ανά κύριο άξονα για την εκάστοτε ποιοτική παράμετρο.

Κεφάλαιο 5^ο

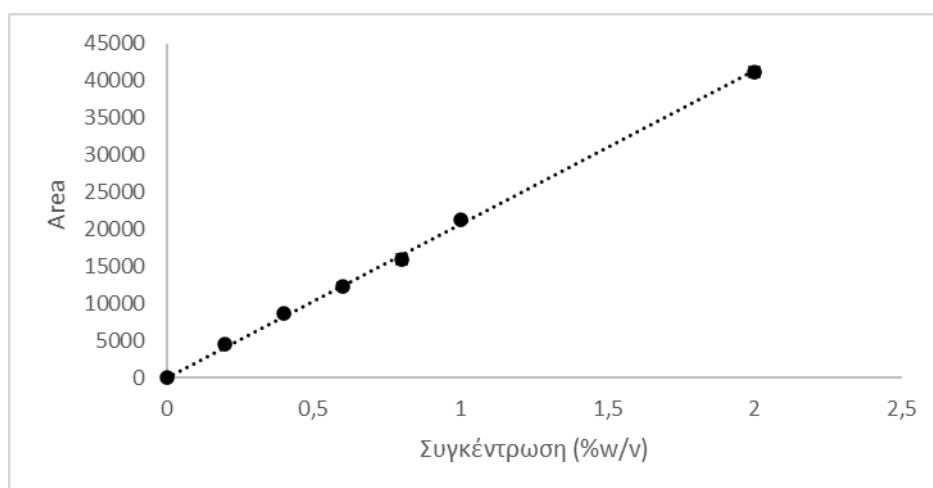
Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Καμπύλες αναφοράς λακτόζης, γαλακτόζης, γλυκόζης και ραφινόζης

Ο όξινος ορός γιαουρτιού περιέχει κυρίως λακτόζη και γαλακτόζη. Όταν το διάλυμα του όξινου ορού γιαουρτιού υποβληθεί σε ενζυμική αντίδραση τότε πραγματοποιούνται δυο αντιδράσεις, η υδρόλυση και η τρανσγαλακτοζυλίωση της λακτόζης. Κατά την υδρόλυση, η λακτόζη διασπάται σε γαλακτόζη και γλυκόζη, ενώ κατά τη τρανσγαλακτοζυλίωση παράγονται γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Η γλυκόζη, η γαλακτόζη και η λακτόζη που περιέχονται στον όξινο ορό και καταναλώνονται ή παράγονται κατά την ενζυμική αντίδραση ποσοτικοποιήθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Οι παραγόμενοι ολιγοσακχαρίτες που παράγονται μέσω της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση ενός προτύπου τρισακχαρίτη, τη ραφινόζη. Η ποσοτικοποίηση τους έγινε με βάση τις καμπύλες αναφοράς που δημιουργήθηκαν από καθαρά διαλύματα του εκάστοτε σακχάρου και τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.1-5.8.

5.1.1 Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς της λακτόζης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα λακτόζης συγκέντρωσης 0,2 - 2,0 % w/v και μετρήθηκαν μέσω της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.1.



Διάγραμμα 5.1. Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης

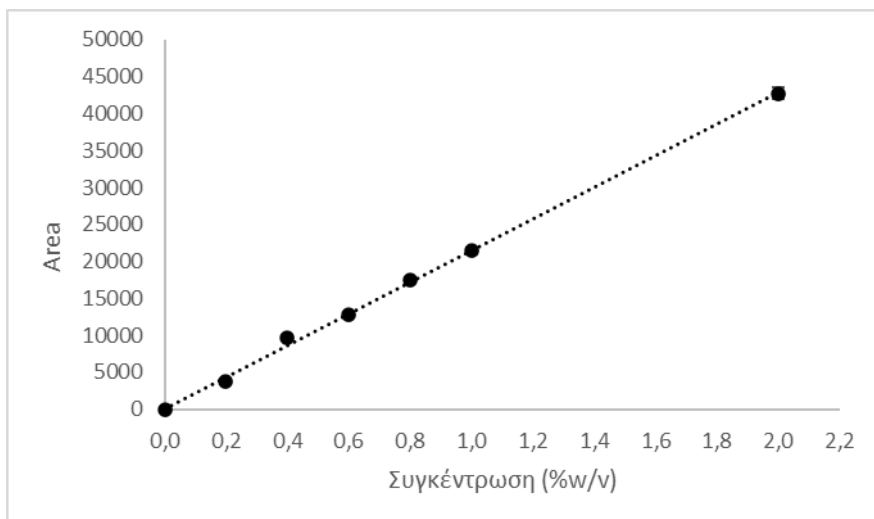
Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για τη λακτόζη είναι:

$$Area = 20687,04 * C_{lactose} \text{ με } R^2=0,99$$

5.1.2 Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς της γαλακτόζης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γαλακτόζης συγκέντρωσης 0,2 - 2,0 % w/v και μετρήθηκαν μέσω της

χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.2.



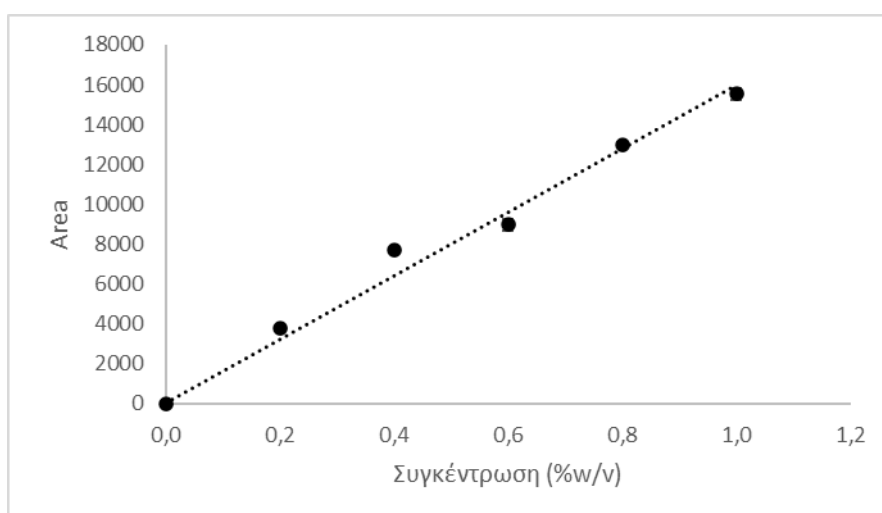
Διάγραμμα 5.2. Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για τη γαλακτόζη είναι:

$$Area = 21500,37 * C_{galactose} \text{ με } R^2=0,99$$

5.1.3 Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς της γλυκόζης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης 0,2 - 1 % w/v και μετρήθηκαν μέσω της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.3.



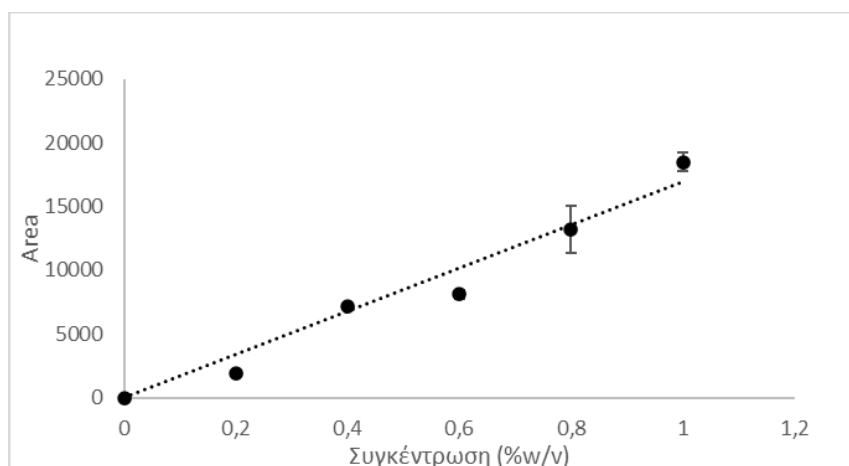
Διάγραμμα 5.3. Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για τη γλυκόζη είναι:

$$Area = 15974,72 * C_{glucose} \text{ με } R^2=0,99$$

5.1.4 Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αναφοράς της ραφινόζης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης 0,2 - 1,0 % w/v και μετρήθηκαν μέσω της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.4.



Διάγραμμα 5.4. Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης

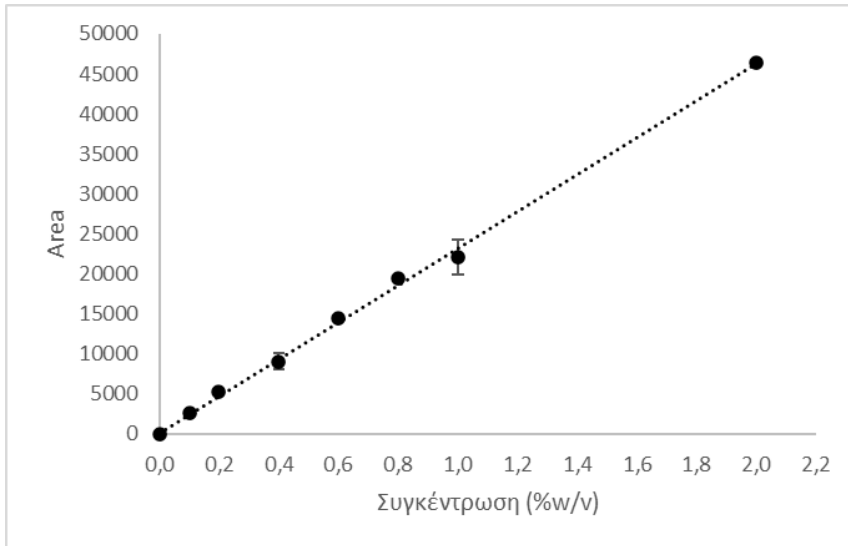
Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς για τη ραφινόζη είναι:

$$Area = 16900,64 * C_{\text{raffinose}} \text{ με } R^2=0,99$$

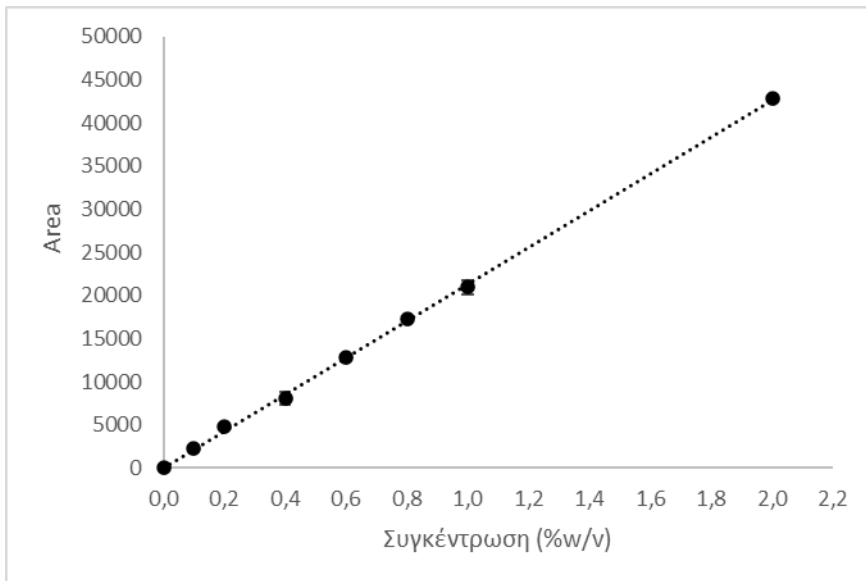
5.1.5 Καμπύλη Αναφοράς Μίγματος Σακχάρων

Στο διάλυμα του όξινου ορού γιαουρτιού συνυπάρχουν η λακτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Η συνύπαρξή πιθανόν να επηρεάσει τον χρόνο έκλουσης τους. Γι' αυτό τον λόγο παράχθηκε και μετρήθηκε η ποσότητα των σακχάρων σε ένα μίγμα που περιέχει τα 4 σάκχαρα αναφοράς στην ίδια συγκέντρωση. Για την κατασκευή της εν λόγω καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος σακχάρων που περιείχαν ποσότητα σακχάρου που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,1 - 2,0 % w/v. Οι καμπύλες που προέκυψαν παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.5-5.8.

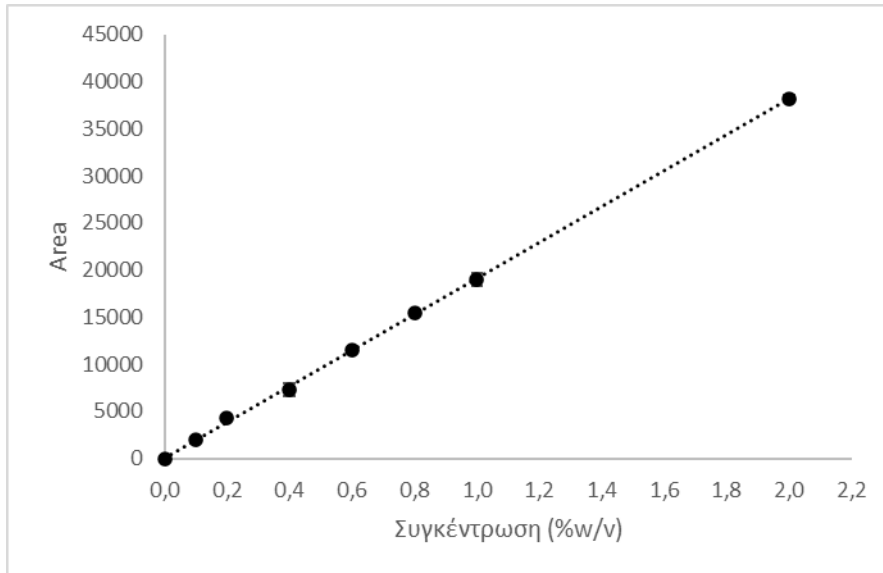
Παρατηρήθηκε ότι οι εξισώσεις των καμπύλων που προέκυψαν έχουν παρόμοια κλίση με πολύ μικρή απόκλιση οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι η συνύπαρξη των σακχάρων δεν επηρεάζει την ανάλυση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.



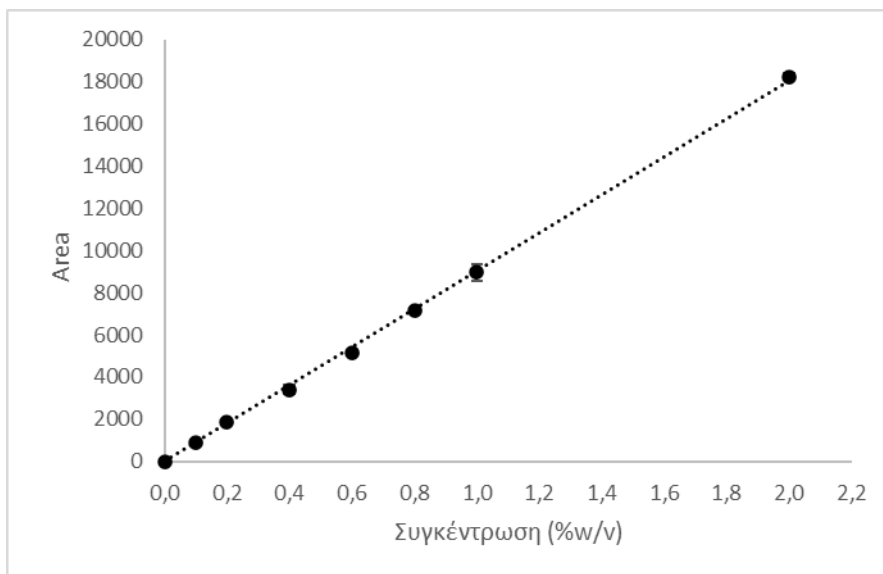
Διάγραμμα 5.5. Καμπύλη Αναφοράς Λακτόζης σε μίγμα σακχάρων



Διάγραμμα 5.6. Καμπύλη Αναφοράς Γαλακτόζης σε μίγμα σακχάρων



Διάγραμμα 5.7. Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης σε μίγμα σακχάρων

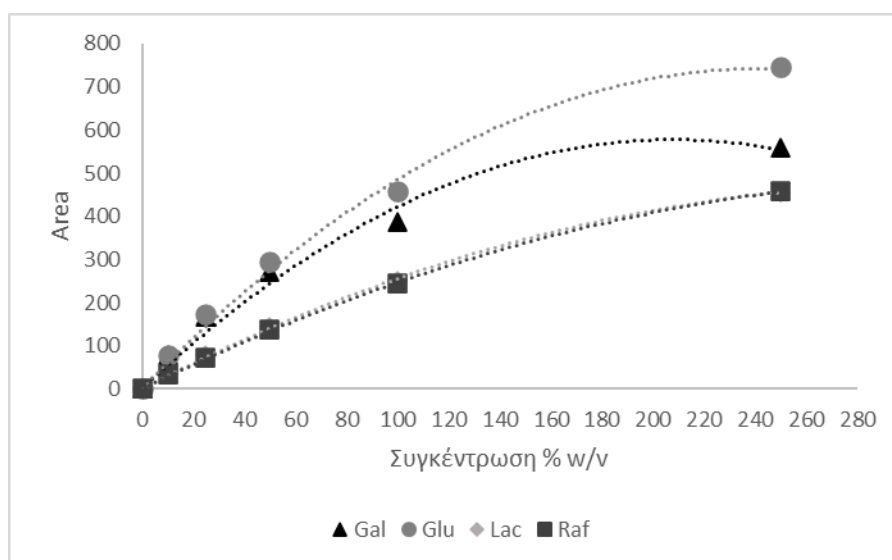


Διάγραμμα 5.8. Καμπύλη Αναφοράς Ραφινόζης σε μίγμα σακχάρων

5.1.6 Καμπύλες Αναφοράς Υγρης Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή παρουσιάζει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Τα σάκχαρα που μετρήθηκαν στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν η λακτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη και η ραφινόζη. Ο χρόνος έκλουσης των σακχάρων στην υγρή χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή διαφέρει από τον αντίστοιχο χρόνο στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη

διάθλασης λόγω της διαφορετικής σταθερής και κινητής φάσης που χρησιμοποιείται. Για τον προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης και την ποσοτικοποίηση των σακχάρων στη χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς των 4 σακχάρων. Οι καμπύλες κατασκευάστηκαν με βάση 5 πρότυπα διαλύματα που περιείχαν γαλακτόζη, λακτόζη, γλυκόζη και ραφινόζη σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100, 250 μg/mL. Η γραφική απεικόνιση τους παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.9.



Διάγραμμα 5.9. Καμπύλες Αναφοράς Γαλακτόζης, Γλυκόζης, Λακτόζης, Ραφινόζης σε μίγμα σακχάρων

Η προσαρμογή των πειραματικών σημείων έγινε με πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού σύμφωνα με (Hu & Rohrer, 2020) και οι σχέσεις που προέκυψαν είναι:

$$Area = -49 * 10^{-4} * C_{lactose}^2 + 3,1 * C_{lactose} \text{ με } R^2 = 0,99$$

$$Area = -134 * 10^{-4} * C_{galactose}^2 + 5,6 * C_{galactose} \text{ με } R^2 = 0,99$$

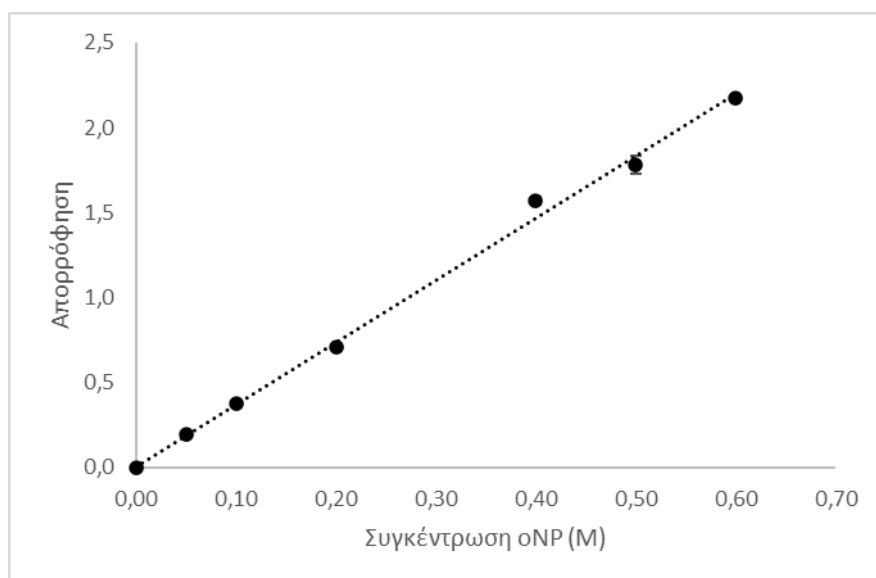
$$Area = -126 * 10^{-4} * C_{glucose}^2 + 6,1 * C_{glucose} \text{ με } R^2 = 0,99$$

$$Area = -43 * 10^{-4} * C_{raffinose}^2 + 2,9 * C_{raffinose} \text{ με } R^2 = 0,99$$

5.2 Καμπύλη Αναφοράς Ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης

Η β-γαλακτοζιδάση διασπά τον β-γλυκοζιτικό δεσμό που υπάρχει στο μόριο της λακτόζης και απελευθερώνει το μόριο της γλυκόζης και το μόριο της γαλακτόζης. Η ορθο-νιτροφαινόλη-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG) είναι ένα μόριο όμοιο της λακτόζης που αναγνωρίζεται από τη β-γαλακτοζιδάση και διασπάται σε ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης. Λόγω της ομοιότητας, η ορθο-νιτροφαινόλη-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Με βάση τη μεθοδολογία που

αναφέρθηκε στο πειραματικό (ενότητα 4.3) κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς οNP και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.10.



Διάγραμμα 5.10. Καμπύλη Αναφοράς οNP

Η γραμμική εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει είναι :

$$A_{410} = 3,66 * C_{oNP} \text{ με } R^2 = 0,99$$

5.3 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης

Από τον ορισμό για τη δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης, ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μμοί ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του εκάστοτε ενζύμου. Με βάση αυτό εκτιμήθηκαν η ενεργότητα του ενζύμου.

Πίνακας 5.1. Συνθήκες επώασης και υπολογισμένες τιμές ενεργότητας του ενζύμου

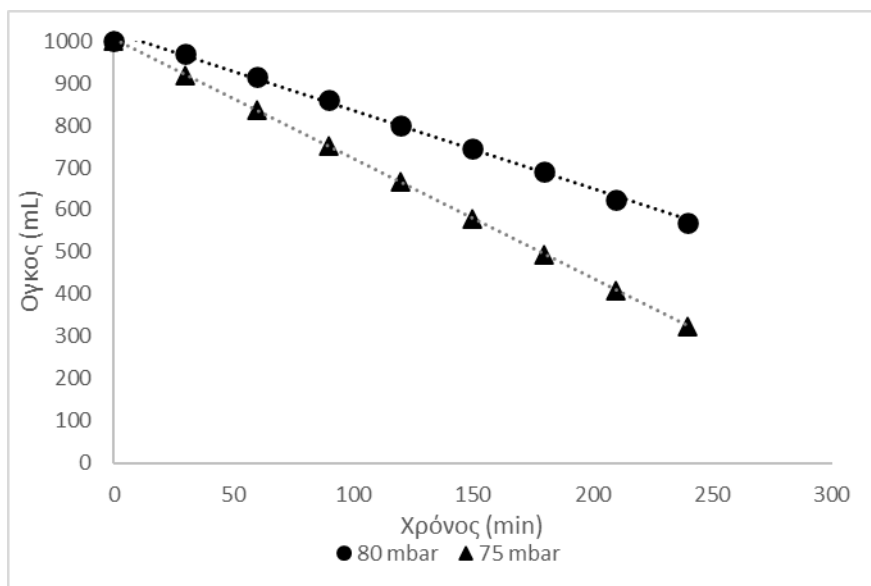
Ένζυμο	Συνθήκες Επώασης (pH/T (°C))	Ενεργότητα (Units/mL)
β-γαλακτοζιδάση από <i>A.oryzae</i>	4,5/45	5,18

5.4 Μελέτη συμπύκνωσης όξινου ορού γιαουρτιού σε εργαστηριακή κλίμακα

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae* παρουσιάζει βέλτιστη δράση στην περίπτωση της αντίδρασης τρανsgαλακτοζυλίωσης όταν η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 20 % w/v σε λακτόζη. Για την αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού από το 3,25 % w/v στο 20 % w/v πρέπει να πραγματοποιηθεί συμπύκνωση. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία από 45 έως 60 °C με σκοπό την αποφυγή φαινομένων κρυστάλλωσης της λακτόζης. Για τη μελέτη της διεργασίας εξετάστηκαν οι παράμετροι της πίεσης και της θερμοκρασίας και εκτιμήθηκε η επίδρασή τους στο ρυθμό συμπύκνωσης.

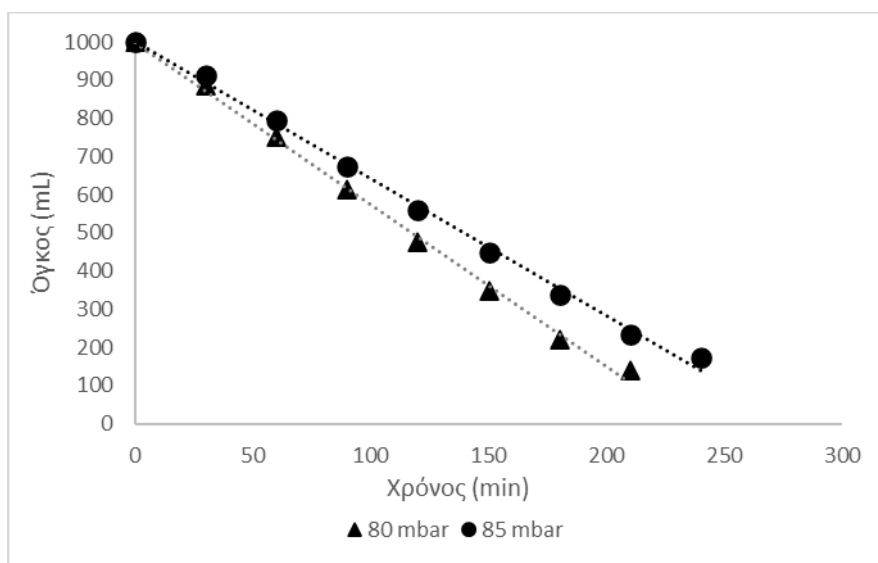
5.4.1 Επίδραση πίεσης λειτουργίας στο ρυθμό συμπύκνωσης

Η πίεση είναι ο πρώτος εκ των δύο παραγόντων της συμπύκνωσης υπό κενό που εξετάστηκαν. Προκειμένου να εξεταστεί η επίδρασή της στο ρυθμό συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού, διερευνήθηκαν 3 διαφορετικές πιέσεις σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα για σταθερή θερμοκρασία 45 °C και πιέσεις 80 και 75 mbar παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.11.



Διάγραμμα 5.11. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε θερμοκρασία 45 °C και πίεση 80 και 75 mbar

Αντίστοιχα για τη περίπτωση των 50 °C εξετάστηκαν οι πιέσεις 85 και 80 mbar και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.12.



Διάγραμμα 5.12. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε θερμοκρασία 50 °C σε πίεση 80 και 85 mbar

Στην περίπτωση της συμπύκνωσης σε θερμοκρασία 45 °C, ο μέσος ρυθμός συμπύκνωσης για πίεση 80 mbar είναι 1,84 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού, ενώ για πίεση 75 mbar είναι 2,82 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού, όπως προκύπτει από την κλίση της μεταβολής του όγκου του υπό συμπύκνωση ορού συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρείται ότι η μείωση της πίεσης κατά 5 mbar συνέβαλε στην αύξηση του μέσου ρυθμού συμπύκνωσης κατά 53%. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύεται γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής του όγκου και του χρόνου. Στην περίπτωση των 50 °C, η τελική συγκέντρωση λακτόζης του διαλύματος ήταν 20 % w/v και στις δύο πιέσεις εντός 4 h με τη διαφορά, όμως, ότι σε πίεση 80 mbar το επιθυμητό αποτέλεσμα επιτεύχθηκε 30 min νωρίτερα. Αυτά επιβεβαιώνονται από τους ρυθμούς συμπύκνωσης, όπου στην περίπτωση των 80 mbar είναι 4,25 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού και στην περίπτωση των 85 mbar 3,60 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού. Στους 50 °C ακολουθείται πάλι γραμμική συσχέτιση μεταξύ όγκου διαλύματος και χρόνου συμπύκνωσης. Στο πίνακα 5.2 παρουσιάζεται ο εκτιμώμενος χρόνος συμπύκνωσης 1 L όξινου ορού γιαουρτιού από αρχική συγκέντρωση λακτόζης 3,5 % w/v μέχρι τελική συγκέντρωση λακτόζης 20 % w/v για τις συνθήκες συμπύκνωσης που μελετήθηκαν.

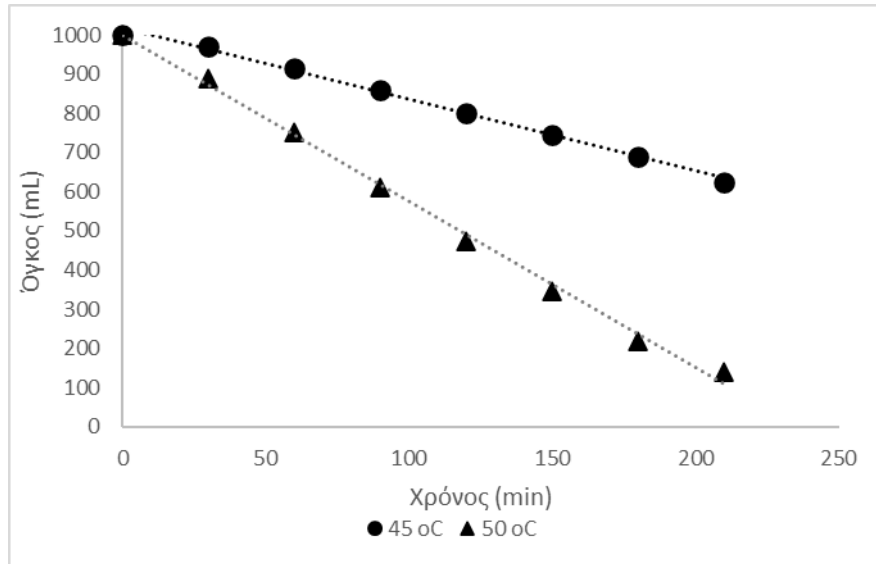
Πίνακας 5.2. Υπολογισμός του χρόνου συμπύκνωσης 1 L όξινου ορού γιαουρτιού από αρχική συγκέντρωση λακτόζης 3,5 % w/v σε τελική συγκέντρωση λακτόζης 20 % w/v

Συνθήκες Συμπύκνωσης	Μέσος Ρυθμός Συμπύκνωσης (mL/min)	Χρόνος για συμπύκνωση 1 L όξινου ορού γιαουρτιού μέχρι τελικής συγκέντρωσης λακτόζης 20 % w/v (h)
75 mbar/ 45 °C	2,82	4,87
80 mbar/ 45 °C	1,84	7,46
80 mbar/ 50 °C	4,25	3,23
85 mbar/ 50 °C	3,60	3,81

5.4.2 Επίδραση θερμοκρασίας λειτουργίας στο ρυθμό συμπύκνωσης

Η θερμοκρασία είναι ο δεύτερος παράγοντας που εξετάστηκε ως προς την επίδρασή του στο ρυθμό συμπύκνωσης. Για τη μελέτη της επίδρασής της στο ρυθμό συμπύκνωσης διατηρήθηκε σταθερή πίεση 80 mbar και εξετάστηκαν δύο ήπιες θερμοκρασίες, 45 και 50 °C. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.13.

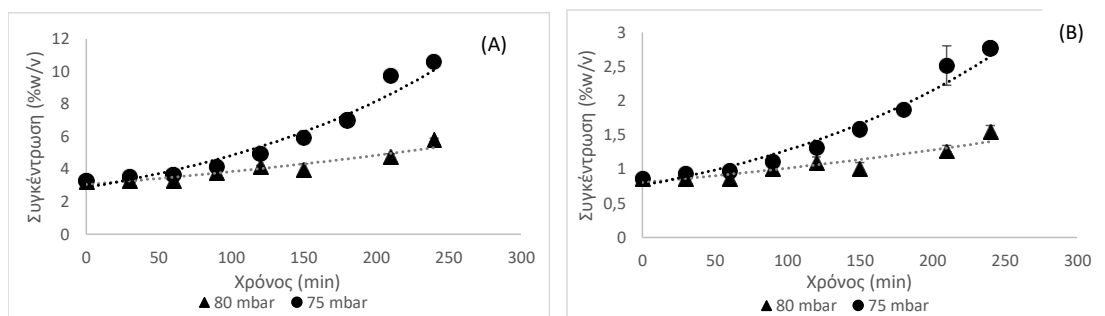
Ο ρυθμός συμπύκνωσης είναι υπερδιπλάσιος στην περίπτωση των 50 °C (4,25 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού έναντι 1,84 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού) γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μια αύξηση 5 °C μπορεί να επιτύχει υποδιπλασιασμό του χρόνου συμπύκνωσης. Το τελευταίο παρατηρείται στο διάγραμμα μεταβολής του όγκου του υπό συμπύκνωση διαλύματος όπου στις 4 h ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι μικρότερος από 185 mL στην περίπτωση των 50 °C και μεγαλύτερος από 600 mL στην περίπτωση των 45 °C.



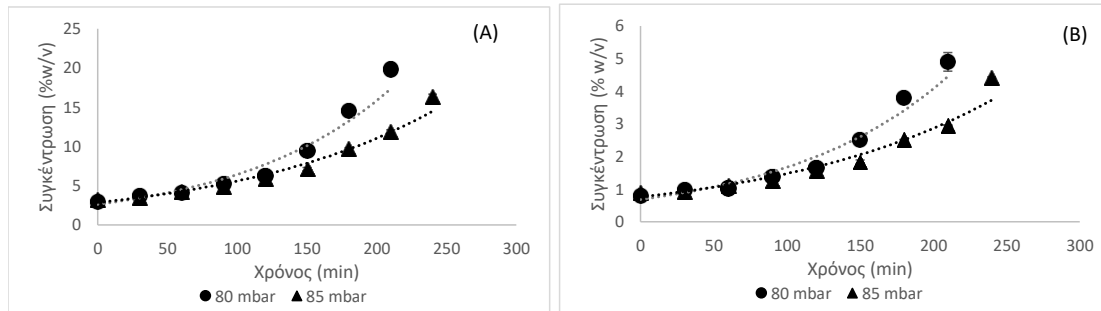
Διάγραμμα 5.13. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε πίεση 80 και θερμοκρασίες 45 °C και 50 °C

5.4.3 Επίδραση πίεσης λειτουργίας στη συγκέντρωση λακτόζης και γαλακτόζης

Σκοπός της συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού είναι να αυξηθεί η συγκέντρωση της λακτόζης του όξινου ορού στο επίπεδο του 20 % w/v, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή GOS από όξινο ορό με χρήση βιοκαταλυτών. Παράλληλα, όμως, πραγματοποιείται αύξηση της συγκέντρωσης των υπόλοιπων σακχάρων και συγκεκριμένα της γαλακτόζης που προϋπάρχει στον όξινο ορό γιαουρτιού. Για τον έλεγχο αυτής της μεταβολής εξετάστηκαν 3 διαφορετικές πιέσεις σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες συμπύκνωσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.14-5.15.



Διάγραμμα 5.14. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της γαλακτόζης (B) στους 45 °C σε πίεση 80 και 75 mbar



Διάγραμμα 5.15. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της γαλακτόζης (B) στους 50 °C σε πίεση 80 και 85 mbar

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με μέτρηση του δείκτη διάθλασης. Από τα παραπάνω διαγράμματα είναι εμφανές ότι όσο χαμηλότερη είναι πίεση λειτουργίας της αντλίας τόσο ταχύτερη είναι η διεργασία συμπύκνωσης. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι μετά από 3,5 h κατεργασίας το διάλυμα του ορού που συμπυκνώνεται σε πίεση 80 mbar έχει συγκέντρωση λακτόζης χαμηλότερη από 5 % w/v, ενώ το αντίστοιχο σε πίεση 75 mbar περίπου 10 % w/v. Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν για τη γαλακτόζη, όπου σε πίεση 80 mbar έχει διπλασιαστεί, ενώ σε πίεση 75 mbar έχει υπερτριπλασιαστεί η συγκέντρωσή της την ίδια χρονική στιγμή. Για τη θερμοκρασία των 50 °C ισχύουν τα ίδια συμπεράσματα με τη διαφοροποίηση ότι η απόκλιση μεταξύ των δύο συνθηκών είναι σημαντικά μικρότερη. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης λακτόζης και χρόνου είναι εκθετική σε όλες τις περιπτώσεις. Οι προσαρμογές των πειραματικών αποτελεσμάτων στο εκθετικό μοντέλο $C=A \cdot e^{b \cdot t}$ επιβεβαίωσαν την ταχύτερη δράση στην περίπτωση της χαμηλότερης πίεσης. Πιο συγκεκριμένα, η διαφορά των μοντέλων παρατηρείται στην τιμή της παραμέτρου b , όπου σε κάθε περίπτωση, ανεξαρτήτου θερμοκρασίας, η τιμή της είναι υψηλότερη στην περίπτωση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε χαμηλότερη πίεση.

Οι εξισώσεις που προέκυψαν για θερμοκρασία 45 °C είναι:

$$C_{lactose} = 2,87 * e^{0,0052 * t} \text{ με } R^2 = 0,97 \text{ (75 mbar)}$$

$$C_{lactose} = 3,05 * e^{0,0023 * t} \text{ με } R^2 = 0,91 \text{ (80 mbar)}$$

$$C_{galactose} = 0,76 * e^{0,0052 * t} \text{ με } R^2 = 0,97 \text{ (75 mbar)}$$

$$C_{galactose} = 0,80 * e^{0,0023 * t} \text{ με } R^2 = 0,91 \text{ (80 mbar)}$$

Οι εξισώσεις που προέκυψαν για θερμοκρασία 50 °C είναι:

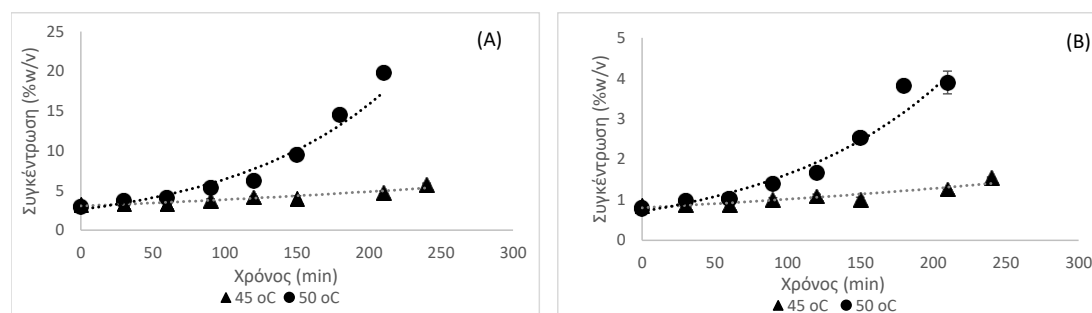
$$C_{lactose} = 2,84 * e^{0,0068 * t} \text{ με } R^2 = 0,97 \text{ (85 mbar)}$$

$$C_{lactose} = 2,60 * e^{0,009 * t} \text{ με } R^2 = 0,97 \text{ (80 mbar)}$$

$$C_{galactose} = 0,76 * e^{0,0066 * t} \text{ με } R^2 = 0,97 \text{ (85 mbar)}$$

$$C_{galactose} = 0,68 * e^{0,0089 * t} \text{ με } R^2 = 0,96 \text{ (80 mbar)}$$

5.4.4 Επίδραση θερμοκρασίας λειτουργίας στη συγκέντρωση λακτόζης και γαλακτόζης
 Η πίεση δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει την αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης και της γαλακτόζης. Η θερμοκρασία, όπως αποδείχθηκε στην ενότητα 5.3.2 επιδρά στο ρυθμό συμπύκνωσης του διαλύματός και κατ' επέκταση στη συγκέντρωση των σακχάρων. Για τον έλεγχο της επίδρασής της στη συγκέντρωση των σακχάρων του όξινου ορού γιαουρτιού εξετάστηκαν 2 θερμοκρασίες (45 °C και 50 °C) σε σταθερή πίεση 80 mbar και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.16.



Διάγραμμα 5.16. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (Α) και της γαλακτόζης (Β) σε πίεση 80 mbar και θερμοκρασία 45 και 50 °C

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στους αρχικούς χρόνους δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκρασιών. Ωστόσο, με τη πάροδο του χρόνου η διαφορά κλιμακώνεται και μάλιστα στην περίπτωση της λακτόζης η σχέση μεταξύ συγκέντρωση λακτόζης σε θερμοκρασία 45 °C και 50 °C φτάνει την αναλογία 1/4. Ανάλογα συμπεράσματα προκύπτουν για τη συγκέντρωση γαλακτόζης. Τα μοντέλα εκθετικής μορφής που προσαρμόστηκαν επιβεβαιώνουν την επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας, καθώς η παράμετρος b του μοντέλου είναι σχεδόν τετραπλάσια στην περίπτωση της συμπύκνωσης στους 50 °C.

Οι εξισώσεις που προέκυψαν για πίεση 80 mbar είναι:

$$C_{lactose} = 3,05 * e^{0,0023*t} \text{ } \mu\epsilon \text{ } R^2 = 0,91 \text{ (45 } ^\circ\text{C)}$$

$$C_{lactose} = 2,60 * e^{0,009*t} \text{ } \mu\epsilon \text{ } R^2 = 0,97 \text{ (50 } ^\circ\text{C)}$$

$$C_{galactose} = 0,80 * e^{0,0023*t} \text{ } \mu\epsilon \text{ } R^2 = 0,91 \text{ (45 } ^\circ\text{C)}$$

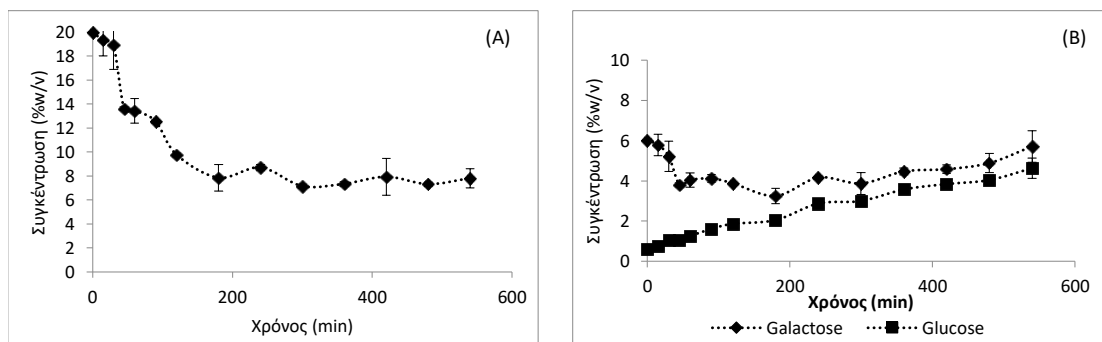
$$C_{galactose} = 0,68 * e^{0,0089*t} \text{ } \mu\epsilon \text{ } R^2 = 0,96 \text{ (50 } ^\circ\text{C)}$$

5.5 Ενζυμική αντίδραση τρανσγαλακτοζύλιωσης

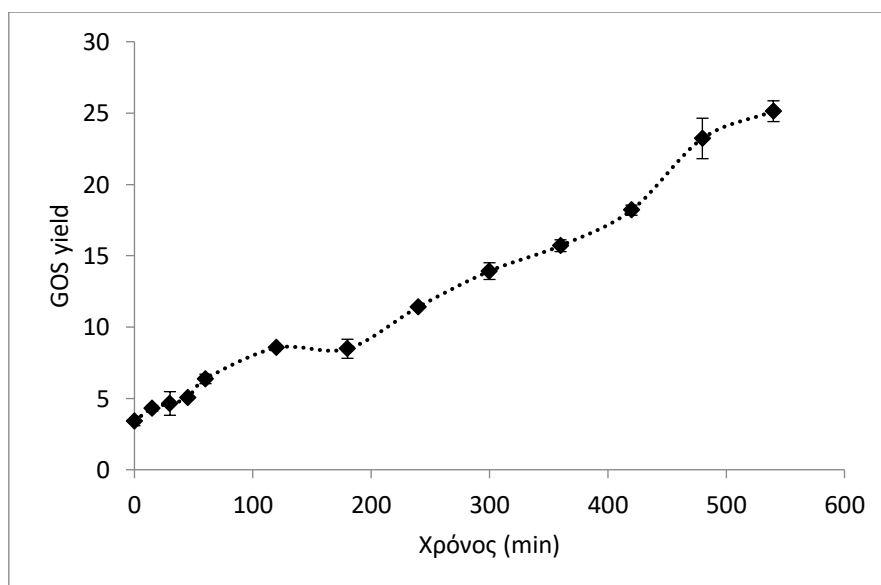
Βασικός στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι μελέτη της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαρίτων. Η συνολική διεργασία περιλαμβάνει 2 κύρια στάδια, την συμπύκνωση του όξινου ορού γιαουρτιού και την ενζυμική αντίδραση. Τα αποτελέσματα της συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού μελετήθηκαν στην ενότητα 5.3, ενώ η μελέτη της ενζυμικής σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαρίτων θα παρουσιαστεί σε αυτή την ενότητα. Για τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων αρχικά μελετήθηκε η β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μικρή κλίμακα, σε διαλύματα όγκου 40 mL στις βέλτιστες

συνθήκες δράσης του εκάστοτε ενζύμου. Η β-γαλακτοζιδάση από *A.oryzae* έδρασε σε διάλυμα ορού με περιεκτικότητα 20 % w/v σε λακτόζη, χωρίς ρύθμιση του pH, σε θερμοκρασία 45 °C.

5.5.1 Μεταβολή συγκεντρώσεων σακχάρων και απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες με τη χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *Aspergillus oryzae*
 Η β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae* είναι ένα ένζυμο που παρουσιάζει βέλτιστες συνθήκες δράσης σε θερμοκρασία 45 °C και τιμή pH 4,5. Για τη βέλτιστη δράση του ενζύμου και κατ' επέκταση την αυξημένη παραγωγή σε GOS, η αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 8 h και η απενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με βρασμό για 10 min. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων της λακτόζης, της γαλακτόζης, της γλυκόζης και των GOS παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.17-5.18.



Διάγραμμα 5.17. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και των μονοσακχαριτών γαλακτόζη-γλυκόζη (B) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A.oryzae*



Διάγραμμα 5.18. Μεταβολή της απόδοσης μετατροπής της λακτόζης σε GOS με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A.oryzae*

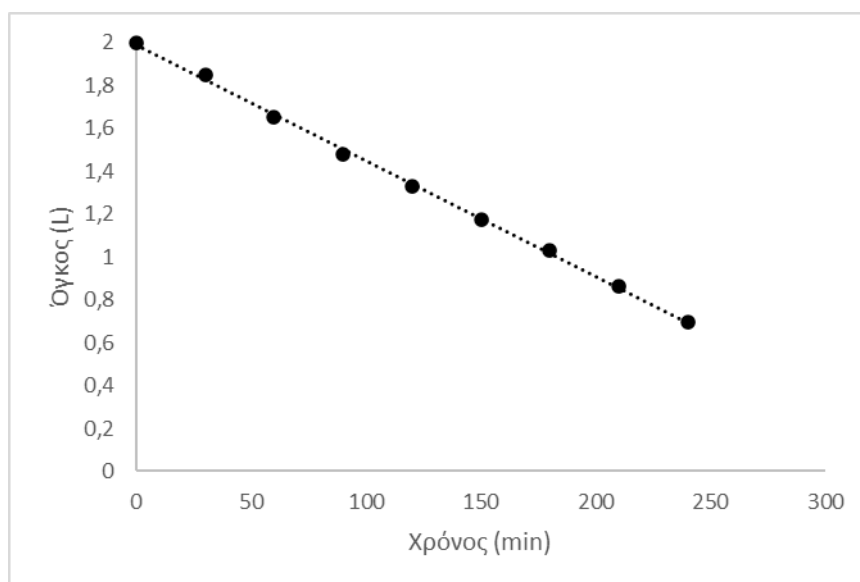
Από τα διαγράμματα είναι εμφανές ότι η λακτόζη καταναλώνεται σημαντικά και μετά από 8 h αντίδρασης είναι χαμηλότερη από 8 % w/v. Σύμφωνα με το διάγραμμα, η συγκέντρωση της λακτόζης παραμένει σταθερή στο διάστημα από τις 6 έως τις 8 ώρες της αντίδρασης. Αυτό υποδεικνύει ότι η δράση του ενζύμου και κατ' επέκταση της αντίδρασης σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν επιφέρει μακροσκοπικά μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης. Η σχετικά υψηλή συγκέντρωση λακτόζης αποκλείει το ενδεχόμενο έλλειψης υποστρώματος. Επιπλέον, η δραστική μείωση του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης λακτόζης δεν οφείλεται σε φαινόμενα παρεμπόδισης από τα άλλα σάκχαρα δεδομένου ότι δεν έχει προσεγγιστεί το όριο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Kim et al. 2004). Η λακτόζη, εκτός από υπόστρωμα της αντίδρασης υδρόλυσης από τη β-γαλακτοζιδάση, αποτελεί και προϊόν της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης, όταν το σύμπλοκο ενζύμου-γαλακτόζης αντιδράσει με ένα μόριο γλυκόζης στο αντιδρών μίγμα, προς σχηματισμό εκ νέου ενός μορίου λακτόζης. Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι από τις 6 h ενζυμικής αντίδρασης και έπειτα, ο ρυθμός υδρόλυσης και σύνθεσης της λακτόζης εξισώνεται, με αποτέλεσμα τη μακροσκοπική σταθεροποίηση της συγκέντρωσης λακτόζης. Σε σχέση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης, παρατηρείται αρχικά μείωση μέχρι μια ελάχιστη τιμή και κατόπιν αύξηση. Η μεταβολή αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από την ταυτόχρονη δράση υδρόλυσης και τρανσγαλακτοζυλίωσης, καθώς στη μία περίπτωση απελευθερώνεται γαλακτόζη από τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού της λακτόζης και στην άλλη χρησιμοποιείται σαν δομικό στοιχείο για την σύνθεση των GOS. Η αρχική μείωση της συγκέντρωσης γαλακτόζης στο αντιδρών μίγμα υποδηλώνει ότι κατά τα πρώτα στάδια της ενζυμικής αντίδρασης ο ρυθμός τρανσγαλακτοζυλίωσης είναι ταχύτερος από τον ρυθμό υδρόλυσης, γι' αυτό και η γαλακτόζη καταναλώνεται ταχύτερα απ' ό τι παράγεται, με το αποτέλεσμα αυτό να αποτυπώνεται μακροσκοπικά σαν μείωση της συγκέντρωσης γαλακτόζης. Από την άλλη πλευρά, η ποσότητα της γλυκόζης αυξάνεται διαρκώς χωρίς να εμφανίζει σταθεροποίηση της τιμής. Ο λόγος της συνεχούς αύξησης είναι το μικρό ποσοστό συμμετοχής της στους σχηματιζόμενους GOS, αφού συμμετέχει μόνο σαν άκρο της δομής των μορίων GOS, ενώ παράλληλα λόγω της δράσης της υδρόλυσης απελευθερώνεται με μεγάλο ρυθμό. Η συγκέντρωση των GOS που παράγονται από τη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου μετά από 8 ώρες αντίδρασης είναι 2,60 % w/v. Εντός αυτής της ποσότητας συγκαταλέγεται επίσης η αλλολακτόζη που έχει ποσοτικοποιηθεί μέσω της καμπύλης αναφοράς της λακτόζης. Η μετατροπή της λακτόζης σε GOS είναι 25,1 %. Η τιμή αυτή είναι ικανοποιητική και σύμφωνη με τη βιβλιογραφία και προηγούμενα αποτελέσματα σε εργαστηριακή κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα, στις μελέτες (Urrutia et. al 2013, Sass et al. 2020) επιτεύχθηκε απόδοση σε GOS 26,8 % και 27,7 % αντίστοιχα. Οι τιμές διαφέρουν ελάχιστα από την πειραματικά υπολογιζόμενη απόδοση και υποδεικνύουν τη σωστή δράση του ενζύμου.

5.6 Κλιμάκωση διεργασίας ενζυμικής παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού

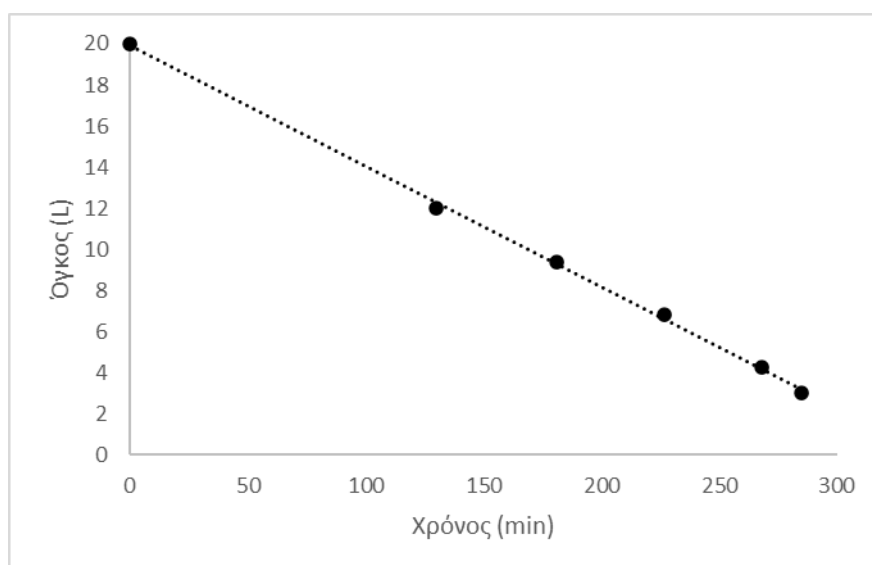
5.6.1 Συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού σε πιλοτική κλίμακα

Η πραγματοποίηση της συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού αποδείχθηκε αποτελεσματική σε εργαστηριακή κλίμακα. Ο όγκος του διαλύματος που συμπυκνώθηκε κάθε φορά ήταν 1 L σε σφαιρική φιάλη των 2 L, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Ο ελάχιστος χρόνος που απαιτήθηκε στις υπό δοκιμή συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας ήταν 3 ώρες. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο κλιμάκωσης της διεργασίας αρχικά σε πιλοτικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα με

σφαιρική φιάλη όγκου 50 L. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες θερμοκρασίας 60 °C και πίεσης 100 mbar, οι οποίες ήταν χαμηλότερες συνθήκες που μπορούσαν να επιτευχθούν στο συμπυκνωτήρα της πιλοτικής κλίμακας. Για τη σύγκριση μεταξύ πιλοτικής και εργαστηριακής κλίμακας πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση ακριβώς στις ίδιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας στο συμπυκνωτήρα εργαστηριακής κλίμακας, ενώ ο όγκος του διαλύματος εντός της φιάλης στην αρχική κατάσταση και στις δύο περιπτώσεις, ήταν στο 1/5 του ονομαστικού όγκου. Ο όγκος του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού συναρτήσει του χρόνου συμπύκνωσης για τις δύο περιπτώσεις παρουσιάζεται στα διαγράμματα 5.19-5.20.



Διάγραμμα 5.19. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα εργαστηριακής κλίμακας

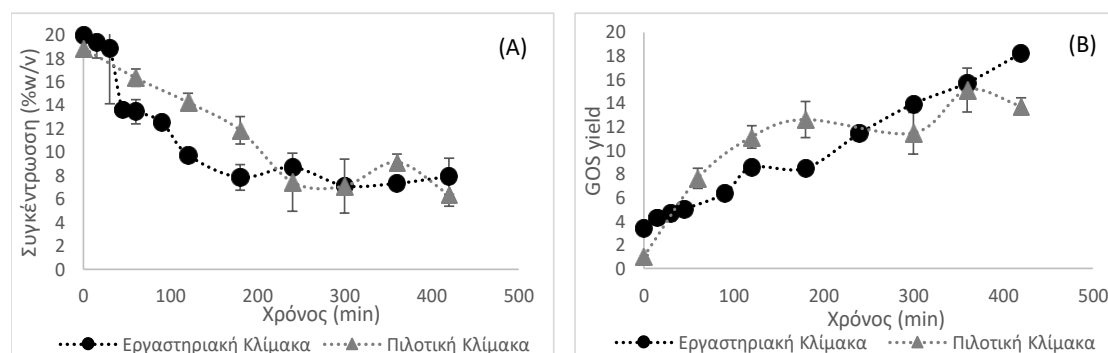


Διάγραμμα 5.20. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα πιλοτικής κλίμακας

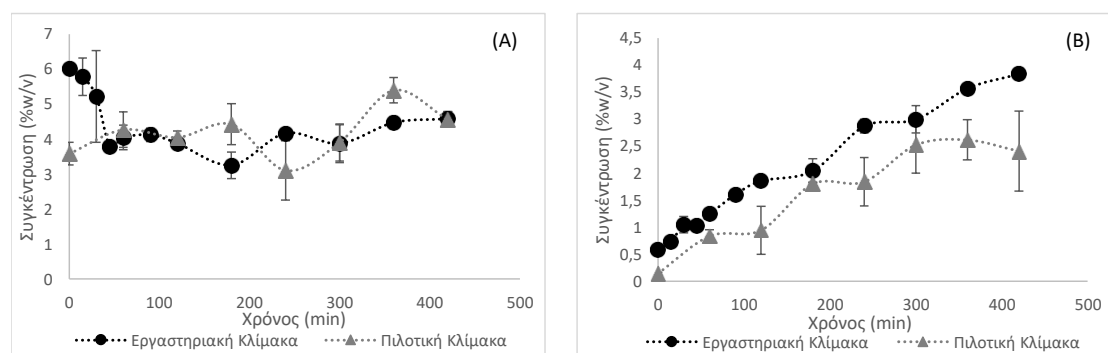
Με βάση το διάγραμμα 5.20 υπολογίστηκε ότι ο ρυθμός συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας είναι 2,94 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού. Η τιμή του μέσου ρυθμού συμπύκνωσης στην πιλοτική κλίμακα είναι 46 % χαμηλότερη συγκριτικά με την εργαστηριακή κλίμακα, όπου ο μέσος ρυθμός συμπύκνωσης ήταν 5,41 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού.

5.6.2 Αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης σε μεγαλύτερη κλίμακα

Εφόσον η συμπύκνωση του όξινου ορού γιαουρτιού σε πιλοτική κλίμακα αποδείχθηκε αποτελεσματική, το επόμενο στάδιο που αξιολογήθηκε σε σχέση με τη δυνατότητα κλιμάκωσης ήταν η αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 3 L εντός περιέκτη όγκου 5 L σε αναδευόμενο λουτρό. Το ένζυμο που επιλέχθηκε ήταν η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae*. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των τελικών συστατικών του διαλύματος μετά την απενεργοποίηση παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.21-5.22:



Διάγραμμα 5.21. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (B) με τον χρόνο υπο την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L



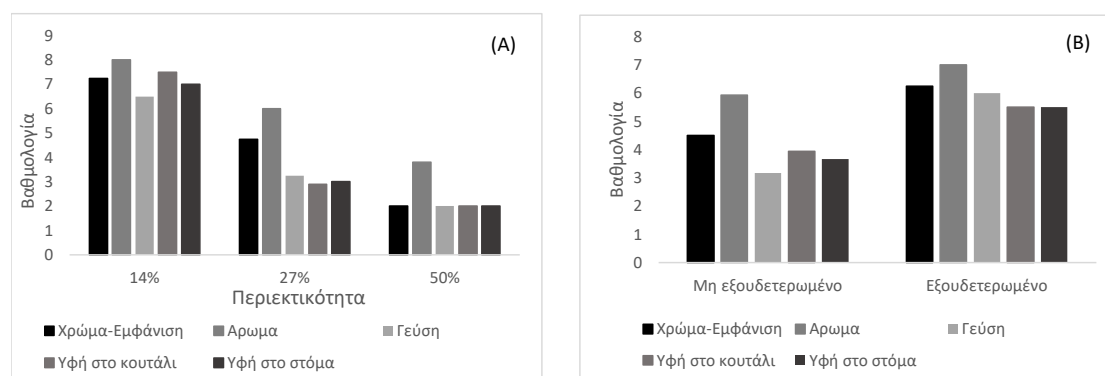
Διάγραμμα 5.22. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης (A) και της γλυκόζης (B) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζει μείωση κατά 25 %. Συγκεκριμένα, η απόδοση μετατροπής στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας είναι 13,7 %, ενώ στην εργαστηριακή κλίμακα 18,2 % μετά από 6 ώρες αντίδρασης. Σε σχέση με τη κατανάλωση λακτόζης στην

περίπτωση της ημιβιομηχανικής κλίμακας, καταναλώθηκε το 64% της αρχικής ποσότητας, ενώ στην περίπτωση της εργαστηριακής το 61 %. Ο συνδυασμός υψηλότερης κατανάλωσης λακτόζης και χαμηλότερης απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας η υδρόλυση της λακτόζης πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την εργαστηριακή κλίμακα. Αυτός ο ισχυρισμός επιβεβαιώνεται από τη μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης, καθώς στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας, η τελική συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την αρχική λόγω της υδρόλυσης της λακτόζης. Αναφορικά με τη γλυκόζη, παρατηρείται σημαντική και παρόμοια αύξηση στις δύο περιπτώσεις αντιδράσεων.

5.7 Ενσωμάτωση γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού σε προϊόν διατροφής (κρέμα βανίλιας) – Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας

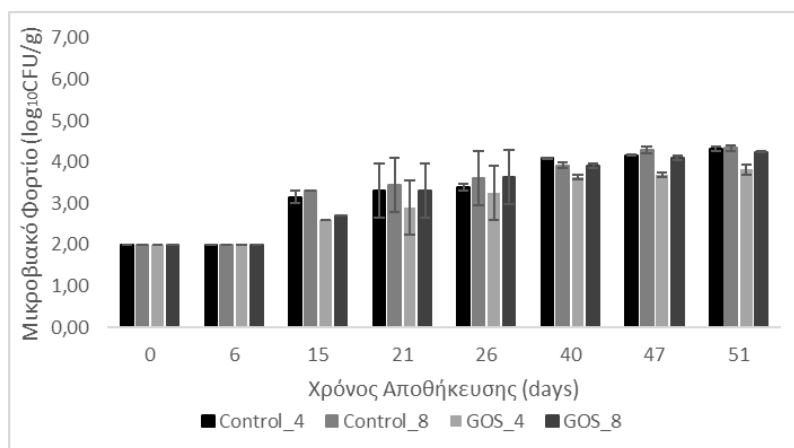
Η ενσωμάτωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών που παράχθηκαν σε ένα προϊόν διατροφής όπως οι κρέμες βανίλιας είναι μια δύσκολη διαδικασία λόγω κυρίως της όξινης γεύση του διαλύματος των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος δοκιμάστηκαν τρόποι ενσωμάτωσης του διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών είτε με τη μορφή υγρού είτε με τη μορφή σκόνης που παράχθηκε μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Παράλληλα, δοκιμάστηκε μερικώς εξουδετερωμένο σιρόπι GOS σε δύο διαφορετικές αναλογίες (27 και 14 % εντός της κρέμας) αλλά και μη εξουδετερωμένο σε τρεις διαφορετικές αναλογίες (50, 27 και 14 % εντός της κρέμας). Μέσω της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα με μη εξουδετερωμένο σιρόπι GOS παρουσίασαν έντονα όξινη γεύση που κρίθηκε μη αποδεκτή από τους δοκιμαστές, τα δείγματα με GOS σε μορφή σκόνης αξιολογήθηκαν με υψηλή τιμή στην περίπτωση του χαρακτηριστικού «αδιάλυτα στερεά» και απορρίφθηκαν, ενώ τα δείγματα με εξουδετερωμένο σιρόπι GOS σε ποσοστό 27 % παρουσίασαν έντονα αλμυρή γεύση που κρίθηκε μη αποδεκτή. Η προσθήκη εξουδετερωμένου σιροπιού GOS σε ποσοστό 14 % είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κρεμών με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με τις κλασικές κρέμες βανίλιας. Στο διάγραμμα 5.23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου σε σχέση με την επίδραση της εξουδετέρωσης και της περιεκτικότητας της κρέμας σε σιρόπι GOS, όπου παρατηρείται ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε σιρόπι GOS έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη βαθμολογία σε όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, η εξουδετέρωση επιδρά θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και κυρίως στη γεύση των δειγμάτων διότι περιορίζει την όξινη γεύση το διαλύματος.



Διάγραμμα 5.23. Επίδραση της περιεκτικότητας της κρέμας σε σιρόπι GOS (A) και της εξουδετέρωσης του σιροπιού (B) στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων

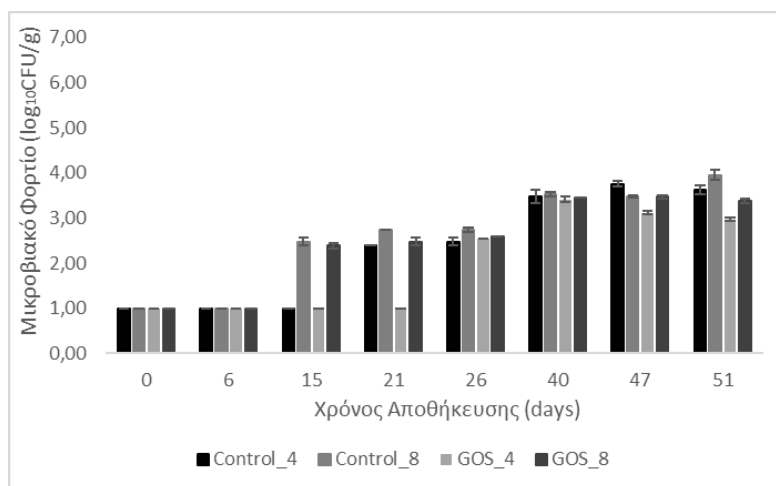
5.6.1 Αποτελέσματα Μικροβιολογικής Ανάλυσης

Η πρώτη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στις κρέμες που παράχθηκαν ήταν ο προσδιορισμός του μικροβιακού τους φορτίου σε όρους ολικής μικροβιακής χλωρίδας, γαλακτικών βακτηρίων, εντεροβακτηρίων και ζυμών/μυκήτων. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.24-5.27. Η ολική μικροβιακή χλωρίδα για όλα τα δείγματα μέχρι την 15^η ημέρα αποθήκευσης ήταν χαμηλότερη του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ($2 \log_{10}\text{CFU/g}$). Η τιμή του φορτίου στην περίπτωση των κρεμών αναφοράς ήταν 3,15 και 3,30 $\log_{10}\text{CFU/g}$ στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 και 8 °C αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων με GOS, 2,60 και 2,70 αντίστοιχα.



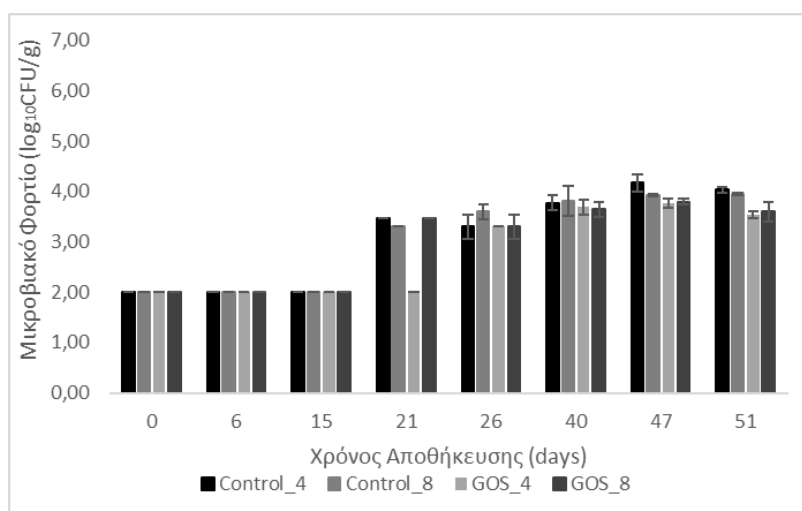
Διάγραμμα 5.24. Μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας εκφρασμένης ως $\log_{10}\text{CFU/g}$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

Η παρουσία γαλακτικών βακτηρίων εντοπίζεται για πρώτη φορά τη 15^η ημέρα αποθήκευσης μόνο στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 8 °C, ανεξαρτήτως της προσθήκης γαλακτοολιγοσακχαριτών. Στην περίπτωση των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, η παρουσία γαλακτικών βακτηρίων εντοπίστηκε την 21^η ημέρα αποθήκευσης με μικροβιακό φορτίο 2,39 $\log_{10}\text{CFU/g}$ στις κρέμες αναφοράς και την 26^η ημέρα αποθήκευσης με μικροβιακό φορτίο 2,54 $\log_{10}\text{CFU/g}$ στις κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες.



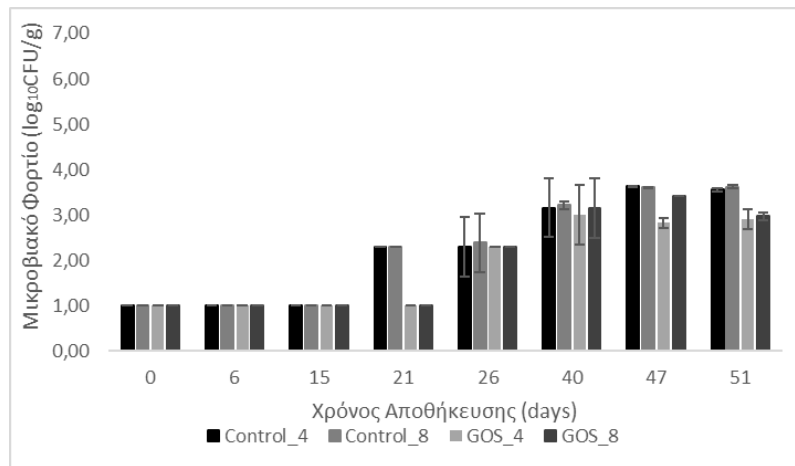
Διάγραμμα 5.25. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων εκφρασμένων ως $\log_{10}\text{CFU/g}$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

Αναφορικά με τις ζύμες και τους μύκητες, η παρουσία τους εντοπίζεται την 21^η ημέρα αποθήκευσης σε όλα τα δείγματα εκτός από την περίπτωση του δείγματος με γαλακτοολιγοσακχαρίτες που αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Στην περίπτωση του δείγματος με GOS που αποθηκεύτηκε στους 4 °C, το όριο ανίχνευσης ($2 \log_{10}\text{CFU/g}$) ξεπεράστηκε την 26^η ημέρα αποθήκευσης. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία και η παρουσία διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών καθυστερούν την ανάπτυξη των ζυμών και των μυκήτων. Το αποτέλεσμα αυτό, αναφορικά με την θερμοκρασία αποθήκευσης, οφείλεται στο γεγονός ότι τόσο οι ζύμες όσο και οι μύκητες είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μεταξύ 25 και 32 °C, οι οποίοι σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 5 °C παρουσιάζουν σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξής και της μεταβολικής τους δράσης (Liszkowska & Berlowska 2021). Όσον αφορά στην επίδραση της παρουσίας γαλακτοολιγοσακχαριτών, η παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους οφείλεται στο υψηλότερο ποσοστό ιόντων αλάτων που υπάρχει στις κρέμες με GOS και συμβάλει στην αύξηση της λανθάνουσας φάσης των μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 5.26. Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και των μυκήτων εκφρασμένων ως $\log_{10}\text{CFU/g}$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

Σε σχέση με τα εντεροβακτήρια, το μικροβιακό τους φορτίο παραμένει χαμηλότερο από το όριο ανίχνευσης ($1 \log_{10}\text{CFU/g}$) μέχρι την 21^η ημέρα αποθήκευσης στα δείγματα αναφοράς και μέχρι την 26^η ημέρα στα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης, το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες που αποθηκεύτηκε στους 4 °C είχε τις χαμηλότερες τιμές σε όλα τα είδη μικροοργανισμών λόγω του συνδυασμού χαμηλής θερμοκρασίας (< 5 °C) και υψηλότερης περιεκτικότητας σε ιόντα αλάτων, τα οποία δυσκόλεψαν την προσαρμογή των μικροοργανισμών στο περιβάλλον τους και μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης.

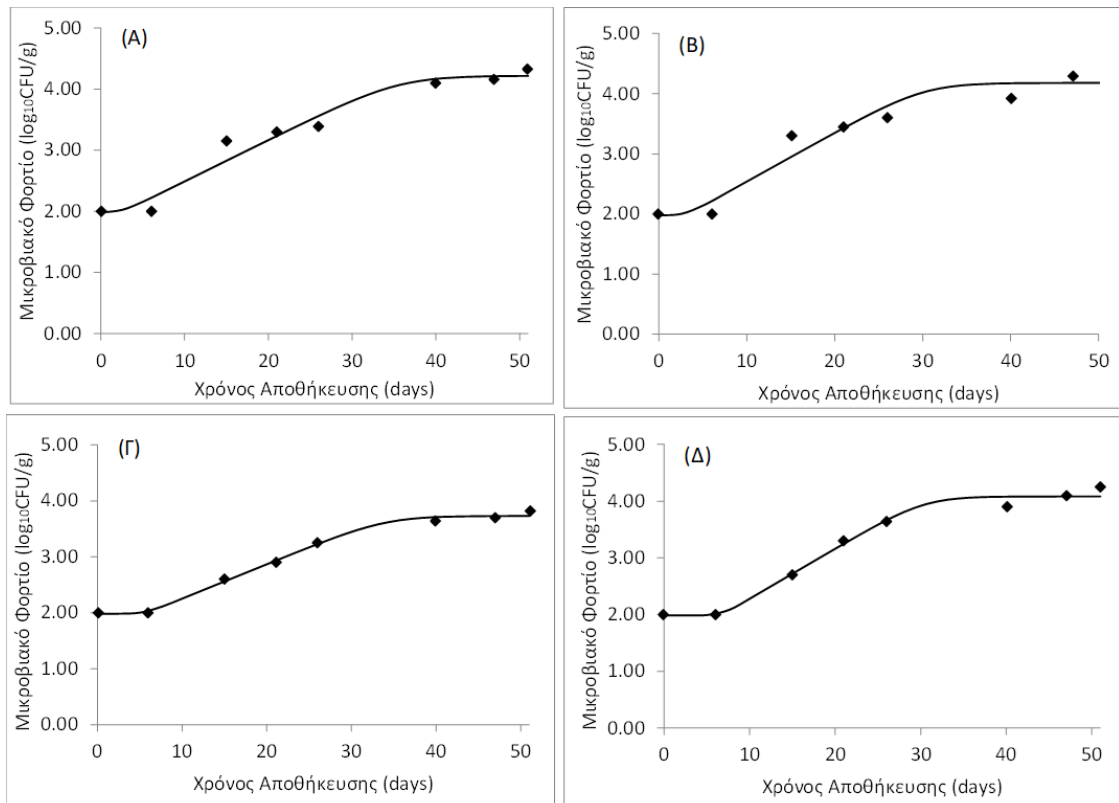


Διάγραμμα 5.27. Μεταβολή του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων εκφρασμένων ως $\log_{10}CFU/g$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

Για τον προσδιορισμό της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών των παραγόμενων δειγμάτων αξιοποιήθηκε το μοντέλο των Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts, 1995). Μέσω αυτού εκτιμήθηκε η αύξηση του μικροβιακού φορτίου της ολικής μικροβιακής χλωρίδας μετά τις 51 ημέρες αποθήκευσης με βάση τις πειραματικά δεδομένα. Η εκτίμηση των ημερών διατήρησης του προϊόντος έγινε θεωρώντας ως όριο αλλοίωσης το $7 \log_{10}CFU/g$. Οι υπολογισμένες τιμές του ρυθμού ανάπτυξης (k), της λανθάνουσας φάσης και των εκτιμώμενων μερών διατήρησης παρουσιάζονται στο πίνακα 5.3, ενώ στο διάγραμμα 5.28 παρουσιάζεται η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου με τον χρόνο αποθήκευσης σύμφωνα με το μοντέλο Baranyi & Roberts. Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους $4^\circ C$ ξεπερνούν το όριο αλλοίωσης και επομένως θεωρούνται μη αποδεκτά την 81^η για την περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς και την 80^η ημέρα για τα δείγματα με GOS. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα αναφοράς που αποθηκεύτηκαν στους $8^\circ C$ θεωρούνται μη αποδεκτά την 66^η ημέρα αποθήκευσης, ενώ τα αντίστοιχα δείγματα με GOS την 63^η ημέρα αποθήκευσης. Αντίθετα, σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η θερμοκρασία αποθήκευσης, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους $8^\circ C$ ξεπερνούν το όριο αλλοίωσης έως και 15 ημέρες νωρίτερα.

Πίνακας 5.3. Τιμές των υπολογισμένων μεγεθών μικροβιακής ανάπτυξης από το μοντέλο Baranyi & Roberts για όλα τα δείγματα

Δείγμα	Ρυθμός Ανάπτυξης k ($days^{-1}$)	Λανθάνουσα Φάση (days)	Συντελεστής Προσαρμογής (R^2)	Ημέρες Διατήρησης (days)
Control_4	0,063 ($\pm 0,018$)	2,48	0,94	81
Control_8	0,079 ($\pm 0,026$)	3,07	0,91	66
GOS_4	0,067 ($\pm 0,009$)	5,61	0,99	80
GOS_8	0,095 ($\pm 0,017$)	6,70	0,98	63

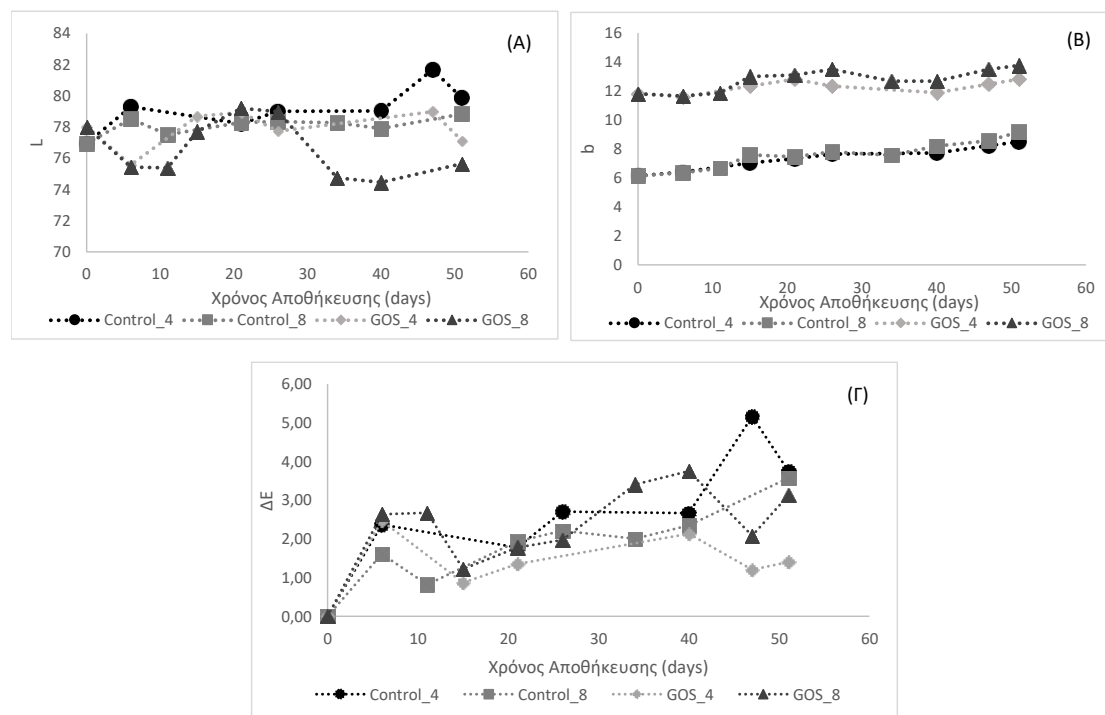


Διάγραμμα 5.28. Μεταβολή του μικροβιακού φορτίου με το χρόνο αποθήκευσης σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα και το μοντέλο Baranyi & Roberts για το Control 4 (Α), Control 8 (Β), GOS 4 (Γ), GOS 8 (Δ)

5.6.2 Μεταβολή Χρώματος

Οι παραγόμενες κρέμες υποβλήθηκαν σε μετρήσεις με τη χρήση χρωματόμετρου (Minolta CR200) με σκοπό την αξιολόγηση του χρώματός τους και της μεταβολής αυτού με τον χρόνο αποθήκευσης. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των παραμέτρων χρώματος L,a,b στη κλίμακα CIE Lab. Η μεταβολή του μέτρου ΔΕ και των παραμέτρων b,L παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.29. Παρατηρείται ότι τα δείγματα αναφοράς (control) και τα δείγματα με σιρόπι GOS έχουν παρόμοια αρχική τιμή έντασης φωτεινότητας (L), ενώ παρουσιάζουν διαφοροποίηση στη τιμή της παραμέτρου b (μπλε-κίτρινο), όπου στην περίπτωση των δειγμάτων με σιρόπι GOS είναι κατά 4 περίπου μονάδες υψηλότερη. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι έχουν ελαφρώς πιο κίτρινη απόχρωση, η οποία ήταν φανερή με απλή οπτική παρακολούθηση των δειγμάτων. Μέχρι τη 15^η ημέρα, οι τιμές των παραμέτρων χρώματος των δειγμάτων δεν παρουσίασαν μεταβολή σε σχέση με τις αρχικές τιμές τους. Από τη 40^η ημέρα και μετά παρατηρείται αύξηση της τιμής ΔΕ λόγω της αύξησης των παραμέτρων L,b τόσο στα δείγματα αναφοράς όσο και στα δείγματα με το σιρόπι GOS. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ενίσχυση της φωτεινότητας και των κίτρινων αποχρώσεων σε όλες τις κρέμες. Συγκριτικά, τα δείγματα αναφοράς παρουσιάζουν υψηλότερη τιμή ΔΕ στις δύο θερμοκρασίες με εξαίρεση το αρχικό σημείο. Σε όλο το χρονικό διάστημα αποθήκευσης, η τιμή του μέτρου ΔΕ ξεπέρασε τη τιμή 3 (όριο αισθητής μεταβολής χρώματος με οπτική παρακολούθηση) μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς τη 47^η και τη 51^η ημέρα αποθήκευσης. Σε σχέση με την παράμετρο b, μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης, τα δείγματα αναφοράς που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσιάζουν αύξηση κατά 38%, ενώ τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 8 °C κατά 49%. Από την άλλη πλευρά, στα δείγματα με GOS δεν

παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της παραμέτρου. Αναφορικά με την παράμετρο L, τα δείγματα αναφοράς παρουσιάζουν μικρή αύξηση (<4%), ενώ τα δείγματα με GOS μικρή μείωση (<4%). Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στις κρέμες με σιρόπι GOS, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στο χρώμα ($p>0,05$).

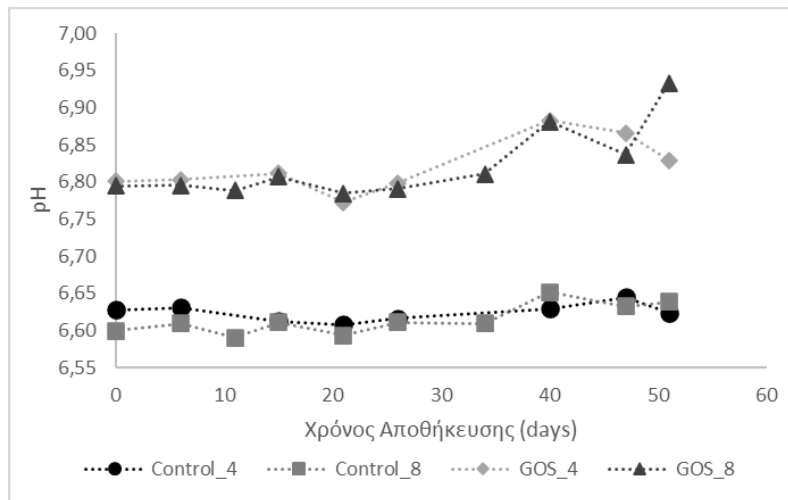


Διάγραμμα 5.29. Μεταβολή των παραμέτρων L (Α), b (Β) και του μέτρου ΔE (Γ) με τον χρόνο για όλα τα δείγματα

5.6.3 Μεταβολή μετρούμενης (pH) και τιτλοδοτούμενης οξύτητας

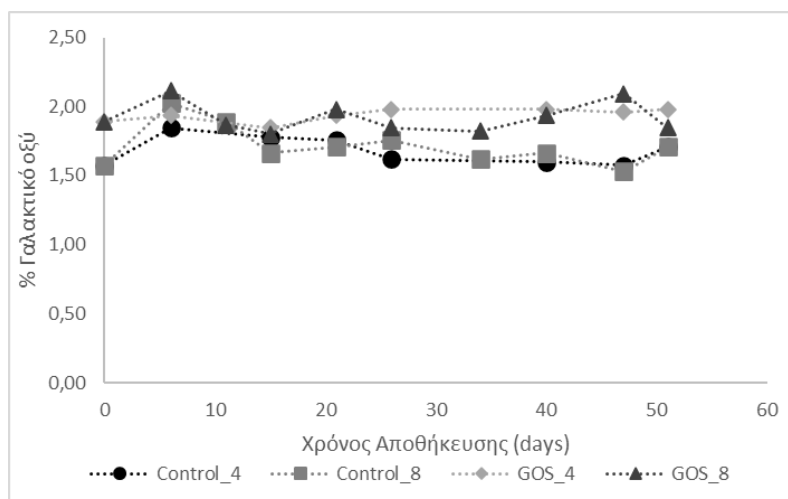
Μετά την αξιολόγηση του χρώματος οι κρέμες υποβλήθηκαν σε μετρήσεις για την εκτίμηση της οξύτητάς τους. Στα δείγματα μετρήθηκε τόσο η μετρούμενη οξύτητα με τη χρήση πεχάμετρου (AMEL 338, Amel Instrument) όσο και η τιτλοδοτούμενη οξύτητα μέσω τιτλοδότησης με διάλυμα NaOH 0,1 N.

Η μεταβολή του pH των δειγμάτων παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.30. Η αρχική τιμή των δειγμάτων αναφοράς είναι κατά 0,2 μονάδες χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη των δειγμάτων με σιρόπι GOS. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στη διεργασία της εξουδετέρωσης που πραγματοποιήθηκε στο σιρόπι GOS και την παρουσία της διττανθρακικής σόδας που συνέβαλε στην αύξηση του pH του σιροπιού GOS από το 4,3 στο 6,8, το οποίο με τη σειρά του επηρέασε την τιμή pH του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με τα διαγράμματα, η τιμή του pH παραμένει σταθερή, αφού οι διαφοροποιήσεις στις τιμές είναι μη σημαντικές. Η διαφορά του pH μεταξύ δειγμάτων αναφοράς και δειγμάτων με σιρόπι GOS παραμένει σταθερή, ενώ μεταξύ των θερμοκρασιών αποθήκευσης οι κρέμες με σιρόπι GOS παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, με την τιμή του pH να παραμένει πρακτικά αμετάβλητη με τον χρόνο.



Διάγραμμα 5.30. Μεταβολή του pH με τον χρόνο των δειγμάτων

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα των δειγμάτων μετρήθηκε μέσω τιτλοδότησης με καυστικό νάτριο 0,1 N και εκφράζεται ως % γαλακτικό οξύ. Το διάγραμμα 5.31 παρουσιάζει τη μεταβολή του γαλακτικού οξέος που περιέχεται στις κρέμες με τον χρόνο. Η αρχική περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ των κρεμών αναφοράς είναι 1,6 % ενώ των κρεμών με σιρόπι GOS 1,9 %. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που περιείχε ο όξινος ορός γιαουρτιού και δεν εξουδετερώθηκε με το διττανθρακικό νάτριο. Η αρχική περιεκτικότητα του όξινου ορού γιαουρτιού σε γαλακτικό οξύ είναι 0,65 % και κατόπιν των συμπυκνώσεων αναμένεται να είχε φτάσει στο 6,5 %. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διττανθρακική σόδα με σκοπό να περιοριστεί η ποσότητά του και η όξινη γεύση που προσέδιδε στο προϊόν. Με βάση το γεγονός ότι το σιρόπι GOS συμμετέχει σε ποσοστό 14 %, η τιμή αύξησης της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ στις κρέμες με σιρόπι GOS είναι λογική και αναμενόμενη. Η περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ παρουσιάζει αύξηση στο διάστημα των πρώτων 6 ημερών, κυρίως στην περίπτωση των κρεμών αναφοράς. Μετά το διάστημα της πρώτης εβδομάδας, η οξύτητα των κρεμών παρουσιάζει πτώση και επαναφορά στα αρχικά επίπεδα, όπου διατηρείται σε όλο το διάστημα αποθήκευσης.

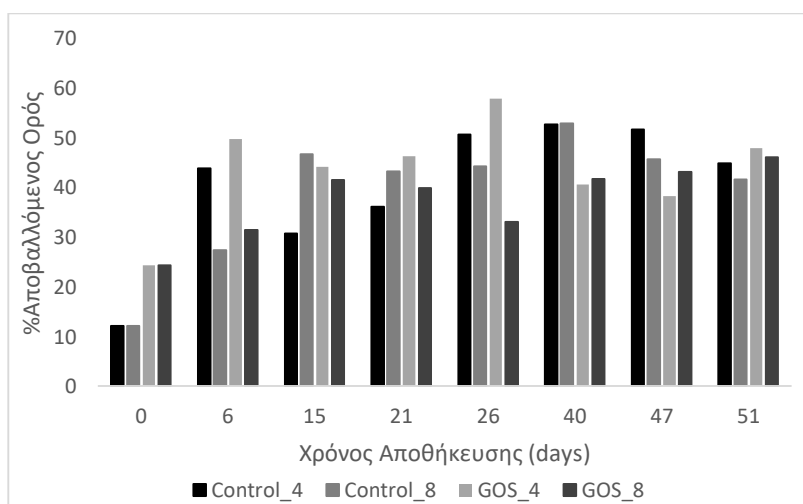


Διάγραμμα 5.31. Μεταβολή της οξύτητας εκφρασμένης ως ποσοστό γαλακτικού οξέος με τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων

Μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης, η περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ των δειγμάτων αναφοράς ήταν 1,71%, ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και των δειγμάτων με GOS 1,98% (4 °C) και 1,85% (8 °C).

5.6.4 Συναίρεση

Η συναίρεση και η αποβολή ορού είναι καθοριστική παράμετρος των πηγμάτων όπως οι κρέμες βανίλιας. Η μέτρηση σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φυγοκεντρικού συστήματος (Thermo SCIENTIFIC MEGAFUGE 16R) και ζύγιση του αποβαλλόμενου υγρού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.32. Το αρχικό ποσοστό αποβαλλόμενου ορού είναι διπλάσιο στην περίπτωση των δειγμάτων με σιρόπι GOS σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς. Η αυξημένη αποβολή ορού στηρίζεται στη διαφορετική σύσταση του γάλακτος από το σιρόπι GOS, αφού το τελευταίο αντικαθιστά μέρος του πρώτου. Μέχρι τη 15^η ημέρα, η ποσότητα του αποβαλλόμενου ορού υπερτριπλασιάζεται στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς και σχεδόν διπλασιάζεται στα δείγματα με σιρόπι GOS. Η τιμή αυτή σταθεροποιείται μετά την 15^η ημέρα και είναι παρόμοια σε όλα τα δείγματα. Συγκριτικά, μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης τα δείγματα είχαν παρόμοιο ποσοστό αποβαλλόμενου ορού, το οποίο ήταν περίπου 45%. Σε σχέση με τη θερμοκρασία αποθήκευσης, παρατηρείται ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία (4 °C) επιδρά αρνητικά στη σταθερότητα του προϊόντος, καθώς η συναίρεση είναι πιο έντονη ειδικά τις πρώτες 6 ημέρες. Η αρνητική επίδραση οφείλεται στην απότομη μεταβολή θερμοκρασίας που υφίσταται η κρέμα όταν μεταφέρθηκε από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στον θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας.

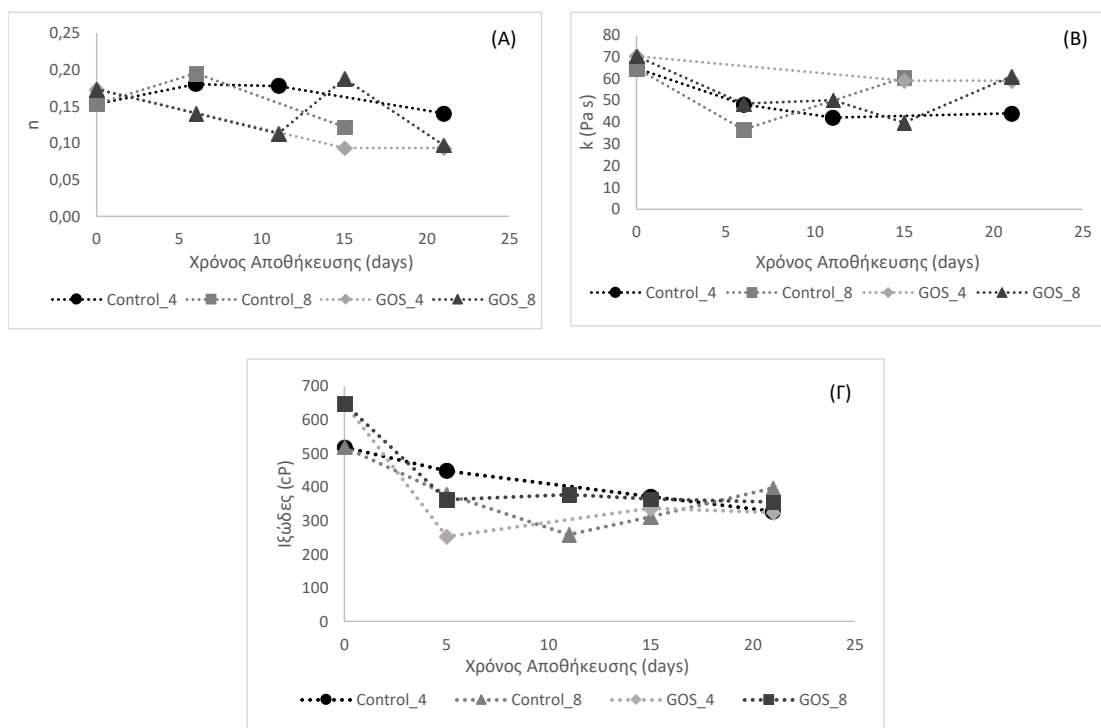


Διάγραμμα 5.32. Μεταβολή της ποσότητας ορού που αποβάλλεται εκφρασμένο ως ποσοστό αποβαλλόμενου ορού με τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων.

5.6.5 Μεταβολή του ιξώδους

Οι κρέμες που παράχθηκαν υποβλήθηκαν σε μετρήσεις για την εκτίμηση των ρεολογικών τους χαρακτηριστικών. Η μέτρηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση περιστροφικού ιξωδόμετρου (RC1 Rheometer, Rheotec Meßtechnik GmbH). Κατόπιν προσαρμογής των πειραματικών αποτελεσμάτων στο νόμο του Ostwald προέκυψαν τα διαγράμματα μεταβολής των σταθερών k και n με τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων. Η τιμή της σταθεράς n σε όλο το διάστημα αποθήκευσης παρέμεινε μεταξύ των τιμών 0,1 και

0,2. Η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη από 1 και επομένως μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα ψευδοπλαστικό ρευστό. Επιπλέον, εφόσον οι τιμές της συγκεκριμένης παραμέτρου ήταν παρόμοιες σε όλα τα δείγματα προκύπτει ότι η προσθήκη συμπυκνωμένου διαλύματος GOS δεν επηρεάζει τη ρεολογική συμπεριφορά των δειγμάτων. Ο τελευταίος ισχυρισμός επιβεβαιώνεται από την παράμετρο k , οι τιμές της οποίας παραμένουν υψηλές ($\gg 1$) και παρόμοιες για όλα τα δείγματα. Οι τιμές της παραμέτρου κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 30 και 70 Pa*sⁿ σε όλο το διάστημα αποθήκευσης και παρουσιάζουν δύο φάσεις, μια αρχική όπου παρατηρείται πτώση της τιμής και μια δεύτερη, όπου η τιμή παραμένει σχεδόν σταθερή. Η πτώση είναι παρόμοια σε όλα τα δείγματα ανεξάρτητα της προσθήκης GOS ή όχι και υποδεικνύει ότι οι κρέμες αποκτούν σταδιακά πιο ρευστή μορφή, καθώς το ιξώδες τους μειώνεται. Η αρχική τιμή του ιξώδους είναι 518 και 649 cP για τα δείγματα αναφοράς και για τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες αντίστοιχα, ενώ η τελική όλων των δειγμάτων είναι χαμηλότερη από 400 cP. Η μείωση του ιξώδους συνεπάγεται τη μείωση της συνεκτικότητας των προϊόντων και κατ'επέκταση τη μεγαλύτερη αποβολή ορού. Το αποτέλεσμα αυτά είναι σύμφωνα με τις μετρήσεις του αποβαλλόμενου ορού όπου παρατηρείται αρχικά μια αύξηση της ποσότητας του αποβαλλόμενου ορού και έπειτα σταδιακή σταθεροποίηση της τιμής του. Επίσης, από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των ρεολογικών παραμέτρων με τη θερμοκρασία αποθήκευσης ($p > 0,05$). Τα αποτελέσματα της μεταβολής των παραμέτρων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.33.



Διάγραμμα 5.33. Μεταβολή του δείκτη ρεολογικής συμπεριφοράς (n) (Α), του συντελεστή συνεκτικότητας (k) (Β) και του ιξώδους (Γ) όλων των δειγμάτων στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης

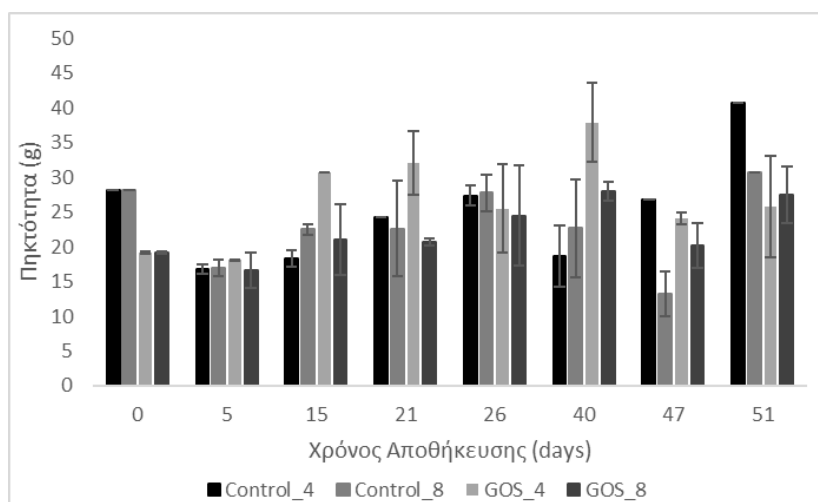
5.6.6 Ανάλυση Υφής

Οι κρέμες που παράχθηκαν αξιολογήθηκαν ως προς την αντικειμενική τους υφή με τη χρήση αναλυτή υφής (TA-XT2i, Stable Micro Systems) και υπολογίστηκαν τα μεγέθη πηκτότητα,

προσκολλησιμότητα, κομμώδες και δείκτης ελαστικότητας. Η μεταβολή των μετρούμενων μεγεθών με τον χρόνο αποθήκευσης παρουσιάζεται στα διαγράμματα 5.34-5.37.

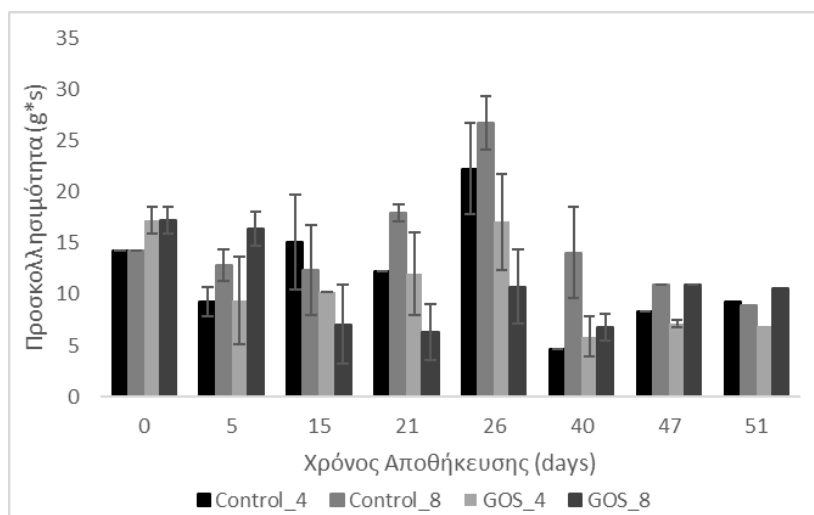
Ο δείκτης ελαστικότητας όλων δειγμάτων παρέμεινε σταθερός σε όλο το διάστημα αποθήκευσης. Η τιμή του ήταν χαμηλότερη από τη μονάδα και συγκεκριμένα ήταν 0,875. Από τη τιμή αυτή συμπεραίνεται ότι πρόκειται για ένα σχεδόν ελαστικό τρόφιμο, δηλαδή ένα τρόφιμο που έχει την ικανότητα να επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση μετά τη συμπίεση. Η τιμή αυτή δεν επηρεάστηκε ούτε από τη θερμοκρασία αλλά ούτε και από την περιεκτικότητα σε GOS.

Η πηκτικότητα των δειγμάτων αναφοράς ήταν μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή σε σχέση με την πηκτικότητα των δειγμάτων με GOS (μέσες τιμές: 39,34 και 19,18 g για τα δείγματα χωρίς GOS και με GOS αντίστοιχα). Η παρουσία του σιροπιού επηρεάζει την πηκτικότητα των δειγμάτων, καθώς η δύναμη του εμβόλου που μετράται είναι μικρότερη και επομένως τα δείγματα λιγότερο σκληρά. Με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, η τιμή της πηκτικότητας των δειγμάτων αναφοράς αρχικά μειώνεται μέχρι την 15^η ημέρα αποθήκευσης και έπειτα αυξάνεται σημαντικά λόγω της μεγαλύτερης αποβολής ορού. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν σταθερότητα ως προς την τιμή της πηκτικότητας σε όλο το διάστημα αποθήκευσης. Η θερμοκρασία αποθήκευσης δεν επηρεάζει την πηκτικότητα των δειγμάτων, αφού οι μεταβολές που υφίστανται τα δείγματα είναι παρόμοιες ανεξαρτήτου θερμοκρασίας αποθήκευσης.



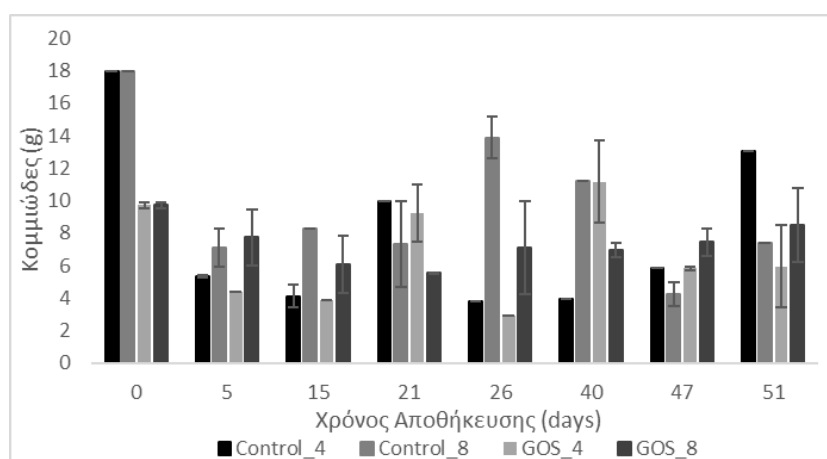
Διάγραμμα 5.34. Μεταβολή της πηκτικότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης.

Η αρχική προσκολλησιμότητα των δειγμάτων, δηλαδή η ικανότητα του δείγματός να προσκολλάται στην ανθρώπινη οδοντοστοιχία, υπολογίστηκε 14,2 g*s για τα δείγματα αναφοράς και 17,3 g*s για τα δείγματα με σιρόπι GOS. Η τιμή του μεγέθους παρουσιάζει αύξηση στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς και κυρίως στην περίπτωση της θερμοκρασίας αποθήκευσης των 8 °C. Μετά την 26^η ημέρα αποθήκευσης τα δείγματα αναφοράς παρουσιάζουν πτώση της τιμής και εν τέλει την 51^η ημέρα αποθήκευσης έχουν παρόμοια τιμή με αυτή των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Τα δείγματα με GOS παρουσιάζουν σταθερότητα στη τιμή της προσκολλησιμότητας σε όλο το χρονικό διάστημα αποθήκευσης χωρίς να επηρεάζονται από τη θερμοκρασία αποθήκευσης ($p > 0,05$).



Διάγραμμα 5.35. Μεταβολή της προσκολλησιμότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης

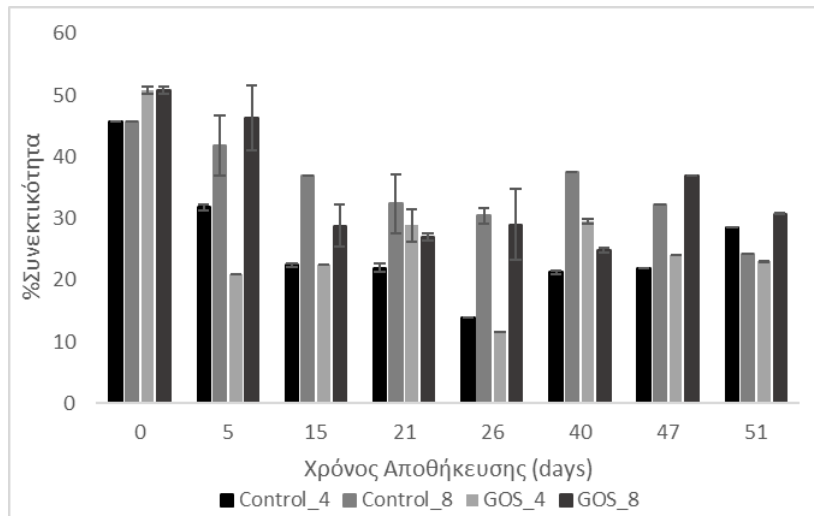
Το κομμίδες είναι ένα ιδιαίτερο μέγεθος που συνδυάζει τη συνεκτικότητα με τη σκληρότητα του προϊόντος και εκφράζει την ευκολία ή δυσκολία κατάποσης. Στην περίπτωση των κρεμών αναφοράς, το αρχικό κομμίδες ανερχόταν στα 18 g ενώ το αντίστοιχο των κρεμών με σιρόπι GOS μόλις στα 9,72 g. Μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης, τα δείγματα αναφοράς παρουσίασαν μείωση της τιμή του κομμίδους. Η τιμή τους την 6^η ημέρα ήταν παρόμοια με αυτή των δειγμάτων με GOS (5,34 και 4,42 g για τα δείγματα χωρίς και με GOS στους 4 °C αντίστοιχα, 7,10 και 7,73 g για τα δείγματα χωρίς και με GOS στους 8 °C αντίστοιχα). Τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσίασαν σταθερότητα στη τιμή του κομμίδους σε όλο το διάστημα αποθήκευσης, ενώ τα δείγματα αναφοράς αρχικά μείωση και έπειτα αύξηση λόγω της μεγάλης αποβολής ορού. Η θερμοκρασία αποθήκευσης δεν επηρέασε, από στατιστικής άποψης, το κομμίδες των δειγμάτων, καθώς η συμπεριφορά σε όλα τα δείγματα ήταν αντίστοιχη ανεξαρτήτως θερμοκρασίας αποθήκευσης ($p > 0,05$).



Διάγραμμα 5.36. Μεταβολή του κομμίδους των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης

Αναφορικά με την παράμετρο της συνεκτικότητας των δειγμάτων, παρατηρήθηκε ότι η τιμή όλων των δειγμάτων παρουσιάζει μείωση με τον χρόνο αποθήκευσης. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν στατιστικά μη σημαντική. Η τιμή αυτή την

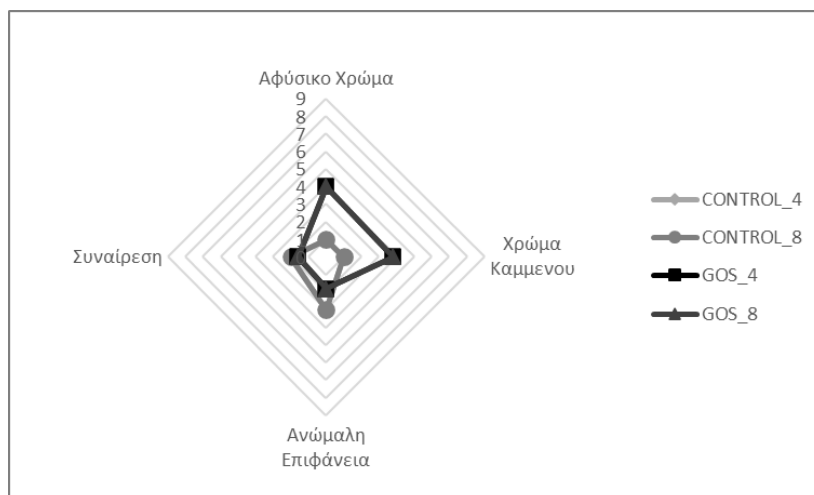
47^η ημέρα αποθήκευσης ήταν μειωμένη κατά 32 % σε σχέση με τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία, ενώ την 51^η ημέρα όλα τα δείγματα είχαν παρόμοια τιμή συνεκτικότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προσθήκη γαλακτοολιγοσακχαριτών δεν επηρέασε τη συνεκτικότητα των δειγμάτων σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης ($p>0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.37.



Διάγραμμα 5.37. Μεταβολή της συνεκτικότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης

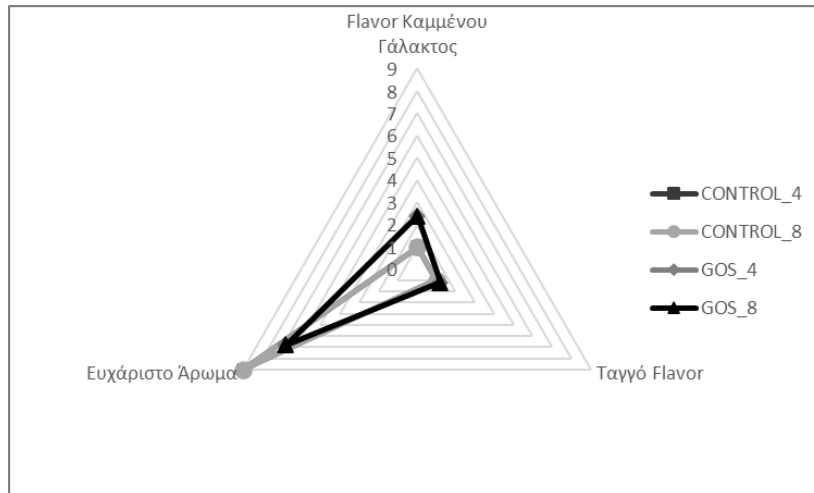
5.6.7 Αποτελέσματα Οργανοληπτικής Αξιολόγησης

Οι κρέμες που παράχθηκαν ελέγχθηκαν για τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά από 4 έμπειρους δοκιμαστές. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν τηρώντας όλα τα πρωτόκολλα της οργανοληπτικής δοκιμής με κλίμακα έντασης από το 0 έως το 9. Τα αποτελέσματα των αξιολογήσεων παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.38-5.47. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων γίνεται με διαγράμματα ιστού αράχνης για τη καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων. Τα χαρακτηριστικά που τέθηκαν προς αξιολόγηση κατατάχθηκαν σε 5 γενικές κατηγορίες. Χρώμα-Εμφάνιση, Άρωμα, Γεύση, Υφή στο κουτάλι, Υφή στο στόμα.



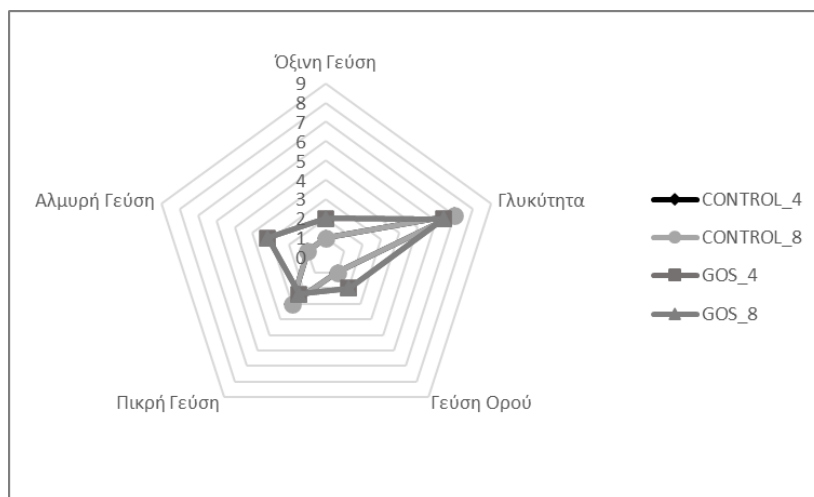
Διάγραμμα 5.38. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 24 h μετά την παραγωγή τους

Σε σχέση με το Χρώμα-Εμφάνιση, τα δείγματα με σιρόπι GOS διαθέτουν πιο ομοιόμορφη και λεία επιφάνεια συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς. Επιπλέον, παρουσιάζουν μικρότερη συναίρεση κατά το άνοιγμα της συσκευασίας. Αντίθετα, το κίτρινο χρώμα του διαλύματος GOS που οφείλεται στην παρουσία της ριβοφλαβίνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δείγματα με GOS διαφέρουν χρωματικά από τις κλασικές κρέμες βανίλιας. Η κίτρινη απόχρωση παράλληλα οδήγησε στην υψηλότερη βαθμολογία των δειγμάτων με GOS αναφορικά με την όψη καμένου.



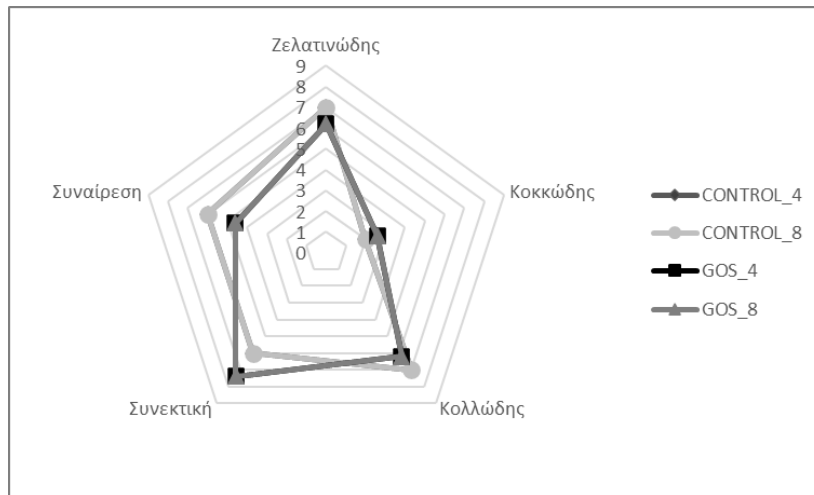
Διάγραμμα 5.39. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Άρωμα 24 h μετά την παραγωγή τους

Αναφορικά με την κατηγορία του αρώματος, τα δείγματα αναφοράς διέθεταν ανώτερα χαρακτηριστικά. Αυτό αντικατοπτρίζεται τόσο από την απουσία flavor καμμένου γάλακτος και ταγγό όσο και από την πολλή υψηλή βαθμολογία στο ευχάριστο άρωμα. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα με GOS παρουσίασαν ελάχιστα υψηλότερη βαθμολογία στα χαρακτηριστικά Flavor καμένου γάλακτος και ταγγό, ενώ το ευχάριστο άρωμα ήταν περίπου δύο μονάδες χαμηλότερο.



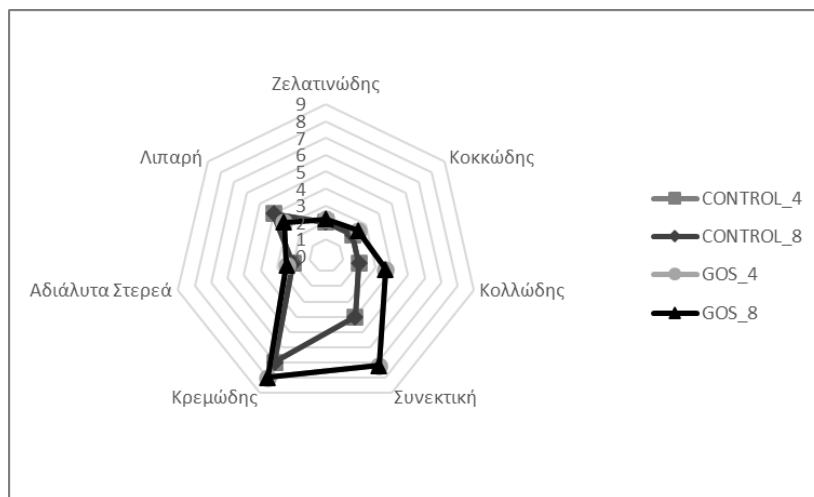
Διάγραμμα 5.40. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Γεύση 24 h μετά την παραγωγή τους

Όσον αφορά στη γεύση των δειγμάτων, οι δοκιμαστές εντόπισαν ελαφρώς πιο όξινη και αλμυρή γεύση στην περίπτωση των δειγμάτων με σιρόπι GOS. Η γλυκύτητα και η πικρή γεύση ήταν παρόμοια στις τέσσερις περιπτώσεις. Επίσης, η γεύση ορού/γιαουρτιού εντοπίστηκε μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων με GOS, αλλά σε πολύ μικρό βαθμό.



Διάγραμμα 5.41. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο κουτάλι 24 h μετά την παραγωγή τους

Οι δοκιμαστές έλεγξαν επίσης τα δείγματα αναφορικά με την υφή τους στο κουτάλι και μέσω των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η κρέμα με GOS είναι πιο συνεκτική αλλά με μεγαλύτερο βαθμό συναίρεσης μετά τον τεμαχισμό με κουτάλι. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά (ζελατινώδης, κοκκώδης και κολλώδης υφή) ήταν παρόμοια σε όλα τα δείγματα, ενώ όλα άφησαν ίχνος στο κουτάλι των δοκιμαστών.

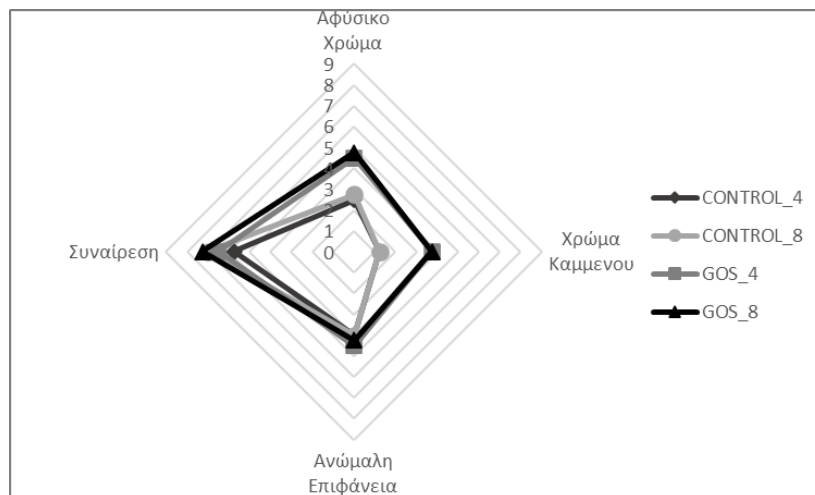


Διάγραμμα 5.42. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο στόμα 24 h μετά την παραγωγή τους

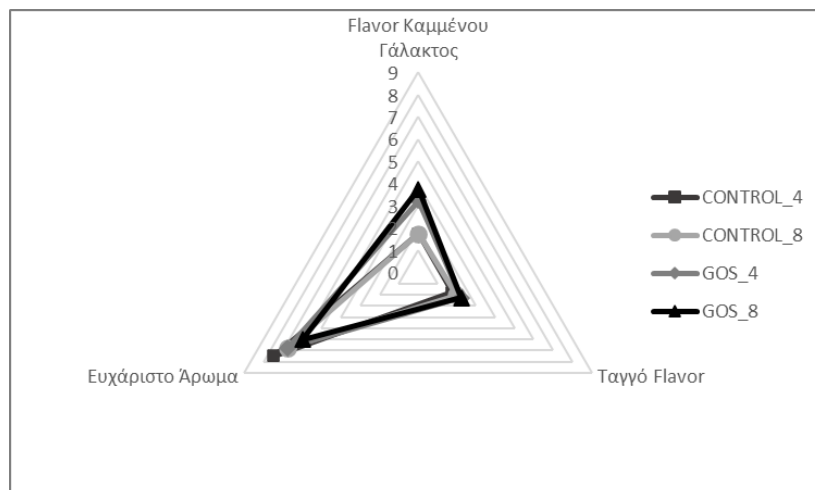
Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν σχετικά με την υφή τους στο στόμα και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική υπεροχή των δειγμάτων με GOS στα χαρακτηριστικά συνεκτικότητα, κολλώδης και κρεμώδης υφή. Συγχρόνως, η κρέμα αναφοράς συγκριτικά με τα δείγματα με

GOS ήταν πιο λιπαρή, ενώ η ζελατινώδης και η κοκκώδης υφή στο στόμα ήταν σχεδόν ίδια. Οι δύο κρέμες παρουσίασαν ένταση αδιάλυτων στερεών που αξιολογήθηκε με $2,0 (\pm 0,0)$ για την περίπτωση των κρεμών αναφοράς και $2,5 (\pm 0,5)$ για τα δείγματα με σιρόπι GOS.

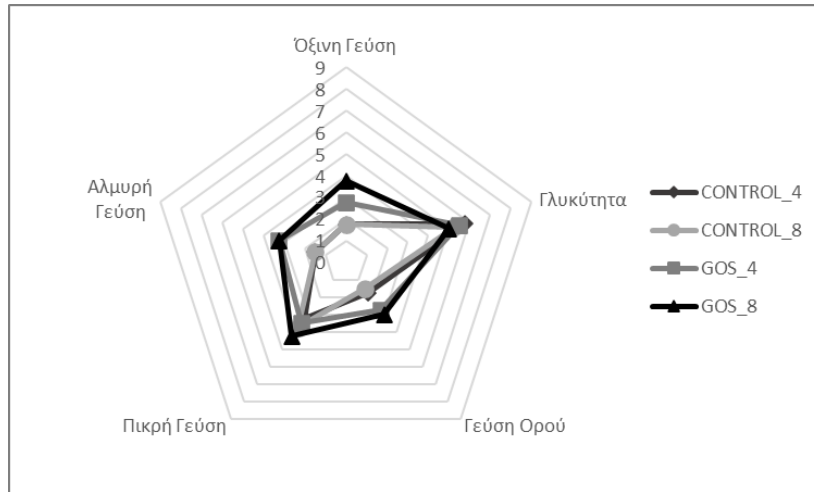
Τα δείγματα που περιείχαν γαλακτοολιγοσακχαρίτες δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια των 40 ημερών αποθήκευσης. Εξαίρεση αποτελούν τα χαρακτηριστικά της ζελατινώδους και κοκκώδους υφής στο κουτάλι των δοκιμαστών, όπου παρατηρήθηκε μείωση και αύξηση αντίστοιχα. Παράλληλα, μειώθηκε η συνεκτικότητα και αυξήθηκε η συναίρεση τους τόσο στο κουτάλι όσο και στο στόμα, ενώ μείωση παρατηρήθηκε επίσης στην περίπτωση της κρεμώδους υφής στο στόμα. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα αναφοράς παρουσίασαν μεταβολές στα περισσότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, καθώς αυξήθηκε σημαντικά η συναίρεση τους σε όλες τις κατηγορίες χαρακτηριστικών, η όξινη γεύση και η γεύση ορού, ενώ μειώθηκε το ευχάριστο άρωμα που διέθεταν και η γλυκύτητα τους. Παράλληλα, εμφάνισαν αντίστοιχη συμπεριφορά με τα δείγματα με GOS στην περίπτωση των χαρακτηριστικών υφή στο κουτάλι και υφή στο στόμα. Παρά την πάροδο 40 ημερών, η θερμοκρασία αποθήκευσης δεν επηρέασε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.



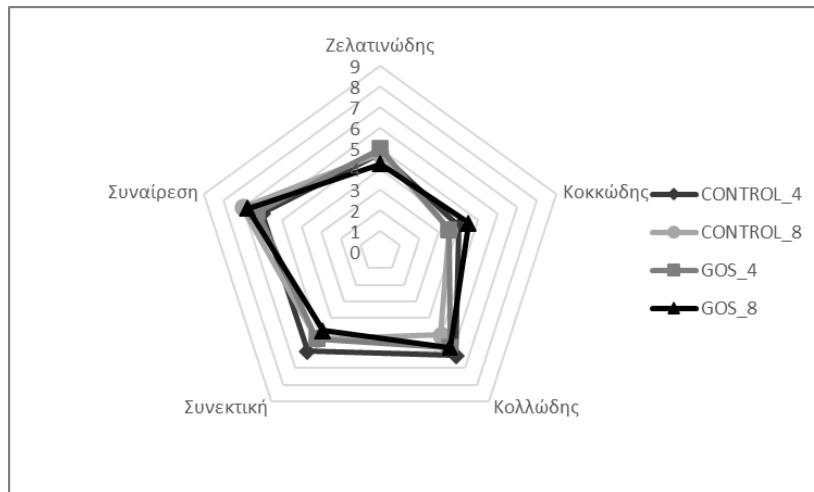
Διάγραμμα 5.43. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



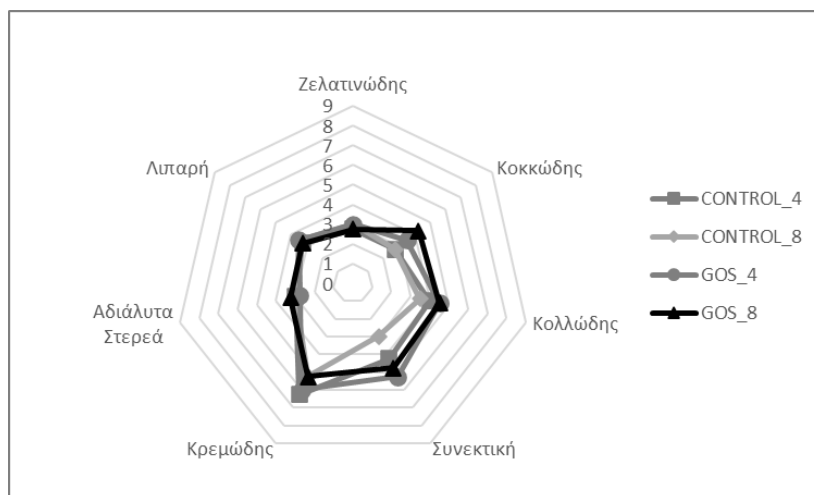
Διάγραμμα 5.44. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Άρωμα 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



Διάγραμμα 5.45. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Γεύση 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



Διάγραμμα 5.46. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο κουτάλι 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



Διάγραμμα 5.47. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο στόμα 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους

5.6.8 Σχέση αντικειμενικών μετρήσεων και οργανοληπτικής αξιολόγησης

Προκειμένου να αναγνωρισθούν οι συσχετίσεις μεταξύ των αντικειμενικών μετρήσεων των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων προϊόντων με τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, τα δεδομένα από τις αντικειμενικές μετρήσεις και τα αντίστοιχα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών. Στην ανάλυση αυτή δεν συμπεριλήφθηκαν τα μεγέθη L, ΔΕ, τιτλοδοτούμενη και μετρούμενη οξύτητα, δείκτης ελαστικότητας, καθώς και οι μετρήσεις της μικροβιολογικής ποιότητας, διότι δεν παρουσίαζαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δειγμάτων. Αντίστοιχα, δεν συμπεριλήφθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ταγγό flavor, λιπαρή υφή στο στόμα και αδιάλυτα στερεά για τον ίδιο λόγο.

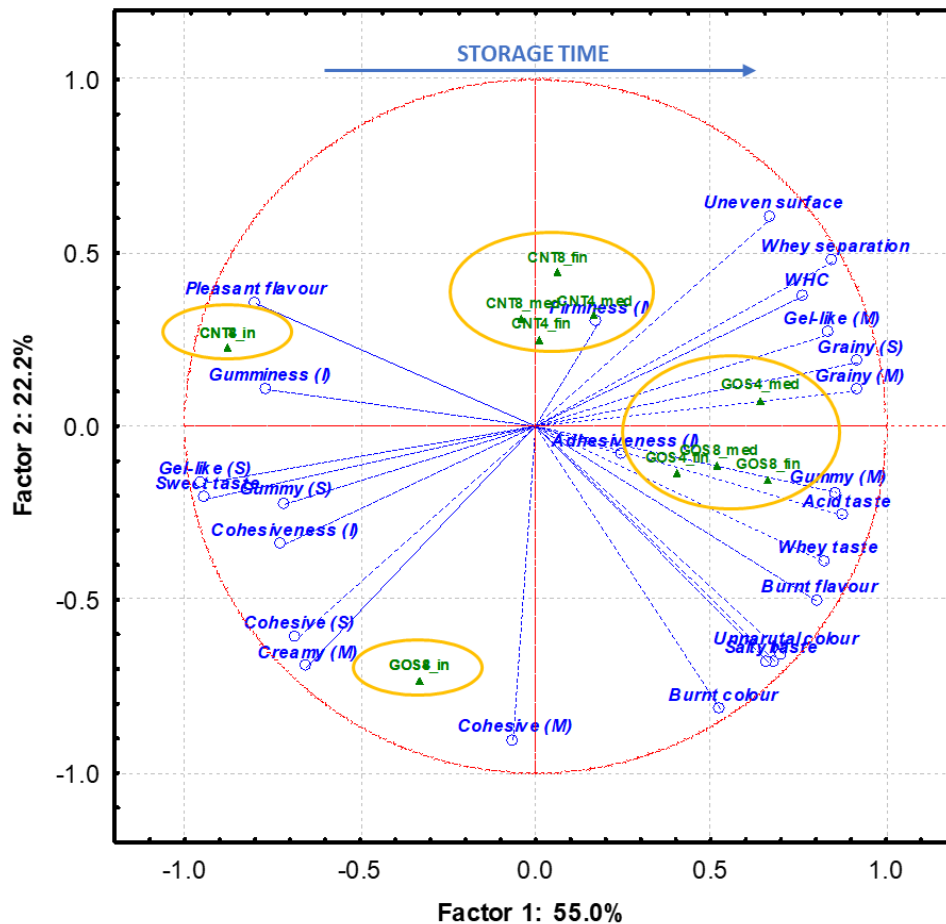
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν κατά προσέγγιση το 77,2 % της ολικής διακύμανσης. Στο διάγραμμα 5.48 παρουσιάζονται οι κύριες συνιστώσες 1 και 2. Η επιλογή αυτών των δύο συνιστωσών έγινε λόγω της μεγαλύτερης συσχέτισης των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με το διάγραμμα, η πρώτη κύρια συνιστώσα PCA1 συσχετίστηκε θετικά με την παράμετρο του χρώματος b, τη συναίρεση (WHC) και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αφύσικο χρώμα, flavour καμμένου γάλακτος, την όξινη γεύση, τη γεύση ορού, τη συναίρεση, την κοκκώδη υφή στο κουτάλι και το στόμα, τη ζελατινώδη και κολλώδη υφή στο στόμα. Ταυτόχρονα, παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με τη γλυκύτητα, το ευχάριστο άρωμα, το κομμώδες, τη συνεκτικότητα, τη ζελατινώδη, κολλώδη και συνεκτική υφή στο κουτάλι. Από την άλλη πλευρά, η δεύτερη κύρια συνιστώσα συνιστώσα παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το χρώμα καμμένου και τη συνεκτική υφή στο στόμα.

Με βάση το διάγραμμα παρατηρείται ότι τα χαρακτηριστικά ευχάριστο άρωμα και κομμώδες σχετίζονται αρνητικά με την κολλώδη υφή στο στόμα, την προσκολλησιμότητα, το flavour καμμένου γάλακτος, την όξινη γεύση αλλά και τη γεύση ορού. Από την άλλη πλευρά, τα χαρακτηριστικά ζελατινώδης και κολλώδης υφής στο κουτάλι, γλυκιά γεύση, συνεκτικότητα, συνεκτική υφή στο κουτάλι και κρεμμώδης υφή στο στόμα παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά, όμως, παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα χαρακτηριστικά ανώμαλη επιφάνεια, συναίρεση, ζελατινώδης υφή στο στόμα αλλά και την κοκκώδη υφή τόσο στο κουτάλι όσο και στο στόμα.

Τα δείγματα μπορούν να κατανεμηθούν σε 4 ομάδες. Η 1^η ομάδα περιλαμβάνει τα δείγματα αναφοράς που μετρήθηκαν 24 h μετά την παραγωγή και στις δύο θερμοκρασίες. Τα μέλη αυτής της ομάδας συσχετίζονται ισχυρά με το ευχάριστο άρωμα και το κομμώδες. Η 2^η ομάδα περιέχει τα δείγματα με GOS που μετρήθηκαν 24 h μετά την παραγωγή και στις δύο θερμοκρασίες. Τα δείγματα αυτά συσχετίζονται θετικά με την κρεμμώδη υφή στο στόμα και τη συνεκτική υφή τόσο στο κουτάλι όσο και στο στόμα. Η 3^η ομάδα αποτελείται από τα δείγματα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες που αποθηκεύτηκαν και στις δύο θερμοκρασίες, 26 και 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους. Τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με την προσκολλησιμότητα και τη κολλώδη υφή στο στόμα αλλά και την όξινη γεύση. Τέλος, η τελευταία ομάδα αποτελείται από τα δείγματα αναφοράς που αποθηκεύτηκαν και στις δύο θερμοκρασίες, 26 και 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους. Τα μέλη αυτής της ομάδας σχετίζονται ισχυρά με την πηκτικότητα.

Σε σχέση με τη θερμοκρασία αποθήκευσης, η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κρεμών, αφού τα δείγματα διαθέτουν παρόμοια χαρακτηριστικά ανεξαρτήτου θερμοκρασίας αποθήκευσης. Αντίθετα, μέσω της ανάλυσης

διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος αποθήκευσης επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των κρεμών. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση παρατηρείται μεταξύ της 1^{ης} ημέρας αποθήκευσης και των υπόλοιπων. Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι τα δείγματα με την πάροδο του χρόνου μετατοπίζονται προς τα επάνω και δεξιά, όπως υποδεικνύει και το βελάκι «Storage time», που δείχνει τη μεταβολή με το χρόνο αποθήκευσης. Με βάση αυτή τη μετατόπιση τα δείγματα αναφοράς μετατρέπονται σταδιακά σε δείγματα που σχετίζονται θετικά με την ανώμαλη επιφάνεια, τη συναίρεση και τη κοκκώδη υφή. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα με GOS αποκτούν ισχυρή θετική συσχέτιση με τη κολλώδη υφή στο κουτάλι και την όξινη γεύση.



Διάγραμμα 5.48. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών για την συσχέτιση των αντικειμενικών μετρήσεων και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων

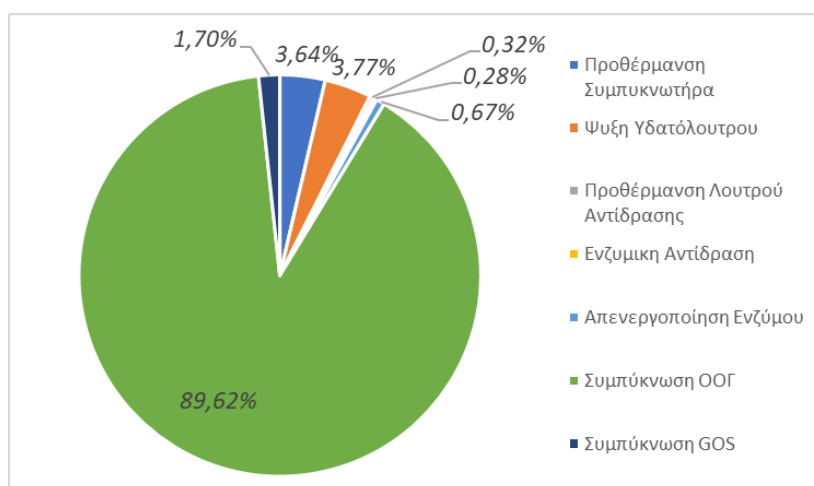
5.7 Οικονομική ανάλυση παραγωγής κρέμας με γαλακτοολιγοσακχαρίτες

Η παραγωγή GOS από όξινο ορό γιαουρτιού και η ενσωμάτωσή τους σε γαλακτοκομικό προϊόν όπως οι κρέμες με άρωμα βανίλιας αποδείχθηκε εφικτή τόσο σε εργαστηριακή όσο και πιλοτική κλίμακα. Σε αυτή την παράγραφο αναλύεται η οικονομική αξιολόγηση της συνολικής διεργασίας παραγωγής και εξετάζεται το προστιθέμενο κόστος της παραγωγής του κλασικού προϊόντος “κρέμα βανίλιας” αν σε αυτό ενσωματωθεί συμπυκνωμένο σιρόπι GOS.

Η παραγωγή κρέμας βανίλιας με γαλακτοολιγοσακχαρίτες σύμφωνα με την διαδικασία που αναπτύχθηκε στην ενότητα 4.9 επιφέρει ορισμένες οικονομικές επιβαρύνσεις στο εμπορικό

προϊόν. Οι επιβαρύνσεις αυτές αφορούν το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας μιας μονάδας ικανής να παράγει το σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαρίτων, καθώς η διεργασία παραγωγής κρέμας δεν διαφοροποιείται σε κανένα στάδιο. Με γνώμονα ότι η μέση παραγωγή κρεμών μιας γαλακτοβιομηχανίας είναι 300000 κρέμες των 130 g/έτος τότε το επιπλέον κόστος των πρώτων υλών εκτιμάται ως 4097 €/ έτος, το οποίο αντιστοιχεί σε 0,11 €/kg παραγόμενης κρέμας (Indicative Chemical Prices A-Z, Scott et al. 2016). Οι πρώτες ύλες που προστέθηκαν είναι η διττανθρακική σόδα (0,27 €/kg) που προστίθεται στο διάλυμα των γαλακτοολιγοσακχαρίτων για την αύξηση της τιμής του pH και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος (20,38 €/kg), ενώ στο κόστος περιλαμβάνεται επίσης το κόστος του ενζύμου (320 €/kg).

Στη συνολική επιβάρυνση του κόστους παραγωγής περιλαμβάνεται επίσης το κόστος λειτουργίας της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών, το οποίο είναι 1,3 €/kg παραγόμενης κρέμας. Στο κόστος αυτός περιλαμβάνεται η ενεργειακή κατανάλωση των διεργασιών της συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού, της αντίδρασης τρανσαλακτοζυλίωσης, της απενεργοποίησης του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση και της περαιτέρω συμπύκνωσης του προϊόντος της αντίδρασης. Η μέτρηση της ενεργειακής κατανάλωσης πραγματοποιήθηκε με ειδικό καταγραφικό ηλεκτρικής ενέργειας. Ο υπολογισμός του κόστους έγινε με βάση το κόστος kWh για βιομηχανική κλίμακα (0,208 €/kWh). Η κατανομή του κόστους παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.49:

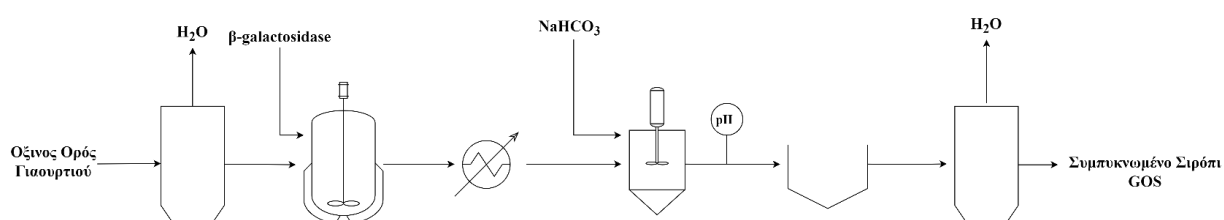


Διάγραμμα 5.49. Ποσοστά συμμετοχής της εκάστοτε διεργασίας στη συνολική ενεργειακή κατανάλωση για την παραγωγή GOS

Παρατηρείται ότι η συμπύκνωση του ορού προκαλεί τη μεγαλύτερη ενεργειακή και οικονομική επιβάρυνση με ποσοστό που προσεγγίζει το 90 % και αν μάλιστα προστεθεί σε αυτό η κατανάλωση ενέργειας για την προθέρμανση του συμπυκνωτήρα και τη ψύξη του ψυκτικού υγρού τότε το συνολικό ποσοστό επιβάρυνσης από τη διεργασία της συμπύκνωσης του ορού αγγίζει το 97 %. Από την άλλη πλευρά, η ενζυμική αντίδραση αποτελεί μόνο το 0,28% της συνολικής ενεργειακής κατανάλωσης παρότι πραγματοποιείται για 8 h. Η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας στην περίπτωση της ενζυμικής αντίδρασης στηρίζεται στη δράση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae* σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας (45 °C).

Τέλος, η παραγωγή διαλύματος γαλακτοολιγοσακχαριτών προϋποθέτει την δημιουργία μιας μονάδας που θα διαθέτει όλο τον κατάλληλο εξοπλισμό για τις απαιτούμενες διεργασίες. Η

δημιουργία αυτής της μονάδας συνεπάγεται επιπλέον κόστος εγκατάστασης. Η απόσβεση του συγκεκριμένου κόστους μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ενσωμάτωσής του στο κόστος της κρέμας. Η επιλογή του εξοπλισμού έγινε με γνώμονα ότι η ετήσια παραγωγή κρεμών βανίλιας ανέρχεται στις 300.000 κρέμες των 130 g και επομένως η ποσότητα του όξινου ορού που θα επεξεργαστεί η μονάδα είναι 62.400 L/ έτος. Με βάση αυτά και τις διεργασίες που έχουν προταθεί το διάγραμμα ροής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.49 και το κόστος εξοπλισμού στο πίνακα 5.3. Ο εξοπλισμός είναι κατασκευασμένος με ανοξείδωτο ατσάλι 304 και εντός του κόστους περιλαμβάνεται ο βοηθητικός εξοπλισμός (μηχανισμοί ανάδευσης, όργανα μέτρησης pH και θερμοκρασίας) Η εκτίμηση του κόστους εξοπλισμού πραγματοποιήθηκε με βάση το μοντέλο (Peters et al. 2020).



Εικόνα 5.1. Διάγραμμα Ροής της διεργασίας παραγωγής σιροπιού GOS

Πίνακας 5.4. Κόστος εξοπλισμού βιομηχανικής κλίμακας για την παραγωγή GOS

Εξοπλισμός	Δυναμικότητα	Κόστος Αγοράς (€)
Συμπυκνωτήρας Κενού	1000 L	93546
Συμπυκνωτήρας Κενού	200 L	33462
Δοχείο Ανάμιξης με μανδύα	1000 L	21216
Εναλλάκτης Θερμότητας	4,98 m ²	3879
Σιλό Παραμονής	500 L	6468
Σιλό Ρύθμισης pH	500 L	6468
Συνολικό Κόστος		165039

Το συνολικό κόστος εγκατάστασης είναι 165.039€ και το μεγαλύτερο ποσοστό του καταλαμβάνει ο συμπυκνωτήρας κενού που θα χρησιμοποιηθεί για την συμπύκνωση του όξινου ορού γιαουρτιού μέχρι τελική συγκέντρωση λακτόζης 20% w/v. Με σκοπό την απόσβεση του εξοπλισμού εντός 10 ετών, η επιβάρυνση στη κρέμα ανέρχεται στα 0,46 €/kg παραγόμενης κρέμας.

Συνολικά, το επιπλέον κόστος που θα προστεθεί στη κρέμα βανίλιας είναι το κόστος πρώτων υλών, λειτουργίας και εγκατάστασης. Η συνολική επιβάρυνση στη κάθε κρέμα 130 g είναι 0,25€. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής κατέχει το κόστος της ενέργειας, το οποίο ανέρχεται στο 68% και οφείλεται κυρίως στη διεργασία της συμπύκνωσης υπό κενό. Συμπερασματικά, η παραγωγή κρεμών με γαλακτοολιγοσακχαρίτες από μια γαλακτοβιομηχανία με μέση παραγωγή κρεμών 300000/έτος σύμφωνα με την διαδικασία που έχει αναπτυχθεί στην ενότητα 4.9 έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος με πρεβιοτική δράση με επιπλέον κόστος παραγωγής 1,92€/kg παραγόμενης κρέμας ή 0,25€/ κρέμα 130 g. Συγχρόνως, λόγω της υποκατάστασης του γάλακτος από σιρόπι GOS μειώνεται η ποσότητα γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή κρεμών κατά 41.400 L/έτος και παράλληλα αξιοποιούνται 62.400 L όξινου ορού γιαουρτιού/ έτος.

Συμπεράσματα

Ο όξινος ορός γιαουρτιού αποτελεί ένα από τα πιο πλούσια και δύσκολα διαχειρίσιμα παραπροϊόντα της σύγχρονης βιομηχανίας τροφίμων. Στο παρελθόν έχουν δοκιμαστεί πολυάριθμες μέθοδοι για την αξιοποίηση του, οι οποίες όμως συνέβαλαν μόνο στο μερικό περιορισμό του προβλήματος. Οι προσπάθειες αυτές εστίασαν κυρίως στην αξιοποίησή του ως καύσιμο ή εδαφοβελτιωτικό. Μόνο ελάχιστες εξ αυτών επιχείρησαν να επαναφέρουν το πλήθος θρεπτικών συστατικών του στην ανθρώπινη διατροφή. Οι περισσότερες από αυτές αποδείχθηκαν αποτυχημένες, καθώς η έντονη οξύτητα και το χαμηλό pH του καθιστά σχεδόν αδύνατη την ένταξή του σε προϊόντα διατροφής δίχως προηγούμενη επεξεργασία. Μέσω της παρούσας διπλωματικής παρουσιάστηκε μια καινοτόμα προσέγγιση που αναβαθμίζει τον όξινο ορό γιαουρτιού από παραπροϊόν σε ένα προϊόν υψηλής διατροφικής και οικονομικής αξίας, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Αποδείχθηκε ότι ο όξινος ορός γιαουρτιού με τη μορφή πρεβιοτικών μπορεί να ενταχθεί σε ένα γαλακτοκομικό προϊόν όπως οι κρέμες βανίλιας με μεγάλη επιτυχία και μάλιστα να παραχθεί σε πιλοτική κλίμακα με χαμηλό κόστος.

Η παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών στηρίζεται στη χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση για την πραγματοποίηση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Το ένζυμο που εξετάστηκε προέρχονταν από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*. Η β-γαλακτοζιδάση προερχόμενη από τον *A. oryzae* παρουσίασε ενζυμική ενεργότητα ίση 5,18 U/mL.

Η βέλτιστη δράση του ενζύμου, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είναι για διάλυμα όξινου ορού γιαουρτιού με συγκέντρωση σε λακτόζη 20 % w/v. Μέσα από τη διεργασία ελέγχου των συνθηκών συμπύκνωσης που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκε ότι τόσο η πίεση όσο και η θερμοκρασία επιδρούν καθοριστικά στο ρυθμό συμπύκνωσης. Σε σχέση με την πίεση, η μείωση της τιμής της από τα 80 mbar στα 75 mbar συνέβαλε στην αύξηση του ρυθμού συμπύκνωσης τουλάχιστον κατά 0,98 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της θερμοκρασίας συμπύκνωσης από τους 45 °C στους 50 °C είχε σαν αποτέλεσμα τον υπερδιπλασιασμό του ρυθμού συμπύκνωσης, από 1,84 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού (45 °C) στα 4,25 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού (50 °C).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης με την χρήση της β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae*. Μέσα από την διαρκή μελέτη της συγκέντρωσης των σακχάρων κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης διαπιστώθηκε ότι η δράση της β-γαλακτοζιδάσης παρουσιάζει βαθμό μετατροπής της λακτόζης σε GOS ίσο με 25,1 %.

Η δυνατότητα κλιμάκωσης της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών εξετάστηκε μέσω της σύγκρισης της συμπύκνωσης και της ενζυμικής αντίδρασης σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες 100 mbar και 60 °C σε συμπυκνωτήρα κενού 2 L και 50 L. Μέσω των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η συμπύκνωση σε πιλοτική κλίμακα παρουσίασε μειωμένη αποδοτικότητα. Στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας, ο ρυθμός συμπύκνωσης ήταν 2,96 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού, 46% μικρότερος του αντίστοιχου στην εργαστηριακή κλίμακα. Στην περίπτωση της ενζυμικής αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL (εργαστηριακή κλίμακα) και σε αρχικό όγκο 3 L (κλιμάκωση). Οι αναλύσεις των συγκεντρώσεων των σακχάρων κατέδειξαν ότι η συμπεριφορά της λακτόζης και της γαλακτόζης είναι ίδια στις δύο περιπτώσεις, ενώ η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν υψηλότερη στην περίπτωση της εργαστηριακής κλίμακας. Στην περίπτωση της κλιμάκωσης,

η απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε GOS ήταν χαμηλότερη κατά 25 %, καθώς η τιμή της μειώθηκε από το 18,2 % (6^η ώρα αντίδρασης-εργαστηριακή κλίμακα) στο 13,7 % (6^η ώρα αντίδρασης-πυλοτική κλίμακα).

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που παράχθηκαν επιλέχθηκαν να ενσωματωθούν σε ένα προϊόν διατροφής, τις κρέμες βανίλιας. Κατά τον καθορισμό της σύστασης των προϊόντων διατροφής που παράχθηκαν δοκιμάστηκαν διάφορες περιεκτικότητες και μορφές GOS. Η επιλογή της τελικής συνταγής πραγματοποιήθηκε μέσω οργανοληπτικής δοκιμής. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης έδειξαν ότι η προσθήκη μη εξουδετερωμένου διαλύματος GOS σε διάφορα ποσοστά παρουσίασε σημαντικά προβλήματα λόγω της έντονης οξύτητας που είχε, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα σε εξουδετερωμένο διάλυμα GOS παρουσίασε έντονα αλμυρή γεύση. Η χρήση σκόνης από το διάλυμα GOS απέδωσε ένα προϊόν με υψηλό ποσοστό αδιάλυτων στερεών και κρίθηκε μη αποδεκτό από τους δοκιμαστές. Τελικά, επιλέχθηκε η περιεκτικότητα σε εξουδετερωμένο σιρόπι GOS να είναι 14 %.

Το παραγόμενο σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών που παράχθηκε μέσω της ενζυμικής αντίδρασης με τη β-γαλακτοζιδάση από τον *Aspergillus oryzae* προστέθηκε στις κρέμες βανίλιας σύμφωνα με τη συνταγή που σχεδιάστηκε. Οι κρέμες με GOS που παράχθηκαν υποβλήθηκαν σε ένα σύνολο μετρήσεων με σκοπό τη μελέτη της μεταβολής των χαρακτηριστικών με τον χρόνο και την θερμοκρασία αποθήκευσης. Μέσω των αποτελεσμάτων της μέτρησης της μικροβιακής ποιότητας τους διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών καθυστέρησε την ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων στις κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες, καθώς το μικροβιακό φορτίο ήταν μη ανιχνεύσιμο μέχρι την 26^η ημέρα αποθήκευσης. Αντίθετα, οι κρέμες αναφοράς παρουσίασαν ανιχνεύσιμο φορτίο από την 21^η ημέρα. Σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, οι κρέμες με GOS που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσίασαν ανιχνεύσιμο μικροβιακό φορτίο 5 ημέρες αργότερα από τις αντίστοιχες κρέμες αναφοράς, όπου τα γαλακτικά βακτήρια εντοπίστηκαν για πρώτη φορά την 21^η ημέρα αποθήκευσης. Αναφορικά με τις ζύμες και τους μύκητες, το μικροβιακό φορτίο των κρεμών με GOS που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C ήταν χαμηλότερο από το όριο ανίχνευσης μέχρι την 26^η ημέρα, ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα είχαν ανιχνεύσιμο φορτίο από την 21^η ημέρα. Το μικροβιακό φορτίο των Στο σύνολο των 51 ημερών αποθήκευσης, τα δείγματα που περιείχαν γαλακτοολιγοσακχαρίτες και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές μικροβιακού φορτίου σε όλους τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς. Επιπλέον, εκτιμήθηκε ο χρόνος διατήρησης των κρεμών, θεωρώντας ως όριο αλλοίωσης μικροβιακό φορτίο ολικής μικροβιακής χλωρίδας ίσο με 7 log₁₀CFU/g. Η εκτίμηση του ρυθμού πραγματοποιήθηκε με την χρήση του μοντέλου Baranyi & Roberts και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι κρέμες που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, ανεξαρτήτως προσθήκης GOS, είχαν χρόνο διατήρησης μεγαλύτερο κατά τουλάχιστον 15 ημέρες (81, 80 ημέρες για τα δείγματα χωρίς και με GOS στους 4 °C και 66, 63 ημέρες για τα δείγματα χωρίς και με GOS στους 8 °C αντίστοιχα)

Σε σχέση με τις υπόλοιπες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στις κρέμες, το μέτρο της μεταβολής του χρώματος δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή με τον χρόνο αποθήκευσης, ενώ η τιμή της παραμέτρου b παρέμεινε υψηλότερη για τα δείγματα με GOS σε όλο το διάστημα αποθήκευσης (p>0,05). Η υψηλότερη τιμή οφείλεται στην πιο έντονη κίτρινη απόχρωση που είχαν οι κρέμες με GOS εξαιτίας της ριβοφλαβίνης. Αναφορικά με τη μετρούμενη οξύτητα των δειγμάτων, οι κρέμες με GOS είχαν υψηλότερη τιμή pH λόγω της μερικής εξουδετέρωσης που είχε προηγηθεί κατά την παραγωγή τους, ενώ η τιτλοδοτούμενη οξύτητα τους, την 51^η ημέρα αποθήκευσης, ήταν υψηλότερη κατά 15,8 % στα δείγματα που

αποθηκεύτηκαν στους 4 °C και κατά 7,89 % στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 8 °C εξαιτίας του ποσοστού γαλακτικού οξέος που προϋπήρχε στον όξινο ορό γιαουρτιού και δεν εξουδετερώθηκε με το διττανθρακικό νάτριο. Τα δύο μεγέθη της οξύτητας παρέμειναν σταθερά σε όλο το διάστημα αποθήκευσης.

Η συναίρεση των δειγμάτων με γαλακτοολιγοσακχαρίτες ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς 24 h μετά την παραγωγή τους. Με την πάροδο των ημερών, οι κρέμες με GOS παρουσίασαν σταθεροποίηση της τιμής του ποσοστού αποβαλλόμενου ορού, ενώ οι κρέμες αναφοράς παρουσίασαν συνεχή αύξηση. Τα δείγματα εν τέλει παρουσίασαν παρόμοιο βαθμό συναίρεσης μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης. Σε σχέση με τα ρεολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, διαπιστώθηκε ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν ψευδοπλαστική συμπεριφορά. Το ιξώδες τους, όπως αποτυπώνεται από τον συντελεστή συνεκτικότητας k και την μέτρηση της τιμής του, μειώνεται διαρκώς αποδεικνύοντας ότι τα δείγματα γίνονται λιγότερο συνεκτικά. Η ομοιομορφία των παραπάνω αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη διαλύματος δεν επηρεάζει τα ρεολογικά χαρακτηριστικών των κρεμών βανίλιας.

Μέσω της ανάλυσης της αντικειμενικής υφής των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι τα μεγέθη της ηχητικότητας, της προσκολλησιμότητας, του δείκτη ελαστικότητας και του κομμιδίου παρουσιάζουν σταθερότητα στην περίπτωση των δειγμάτων με GOS, αφού η τιμή τους δεν μεταβάλλεται σημαντικά σε όλο το διάστημα αποθήκευσης. Αντίθετα, τα δείγματα αναφοράς παρουσιάζουν αρχικά μείωση και έπειτα αύξηση λόγω της μεγάλης αποβολής ορού στην περίπτωση της ηχητικότητας και του κομμιδίου και το αντίστροφο στην περίπτωση της προσκολλησιμότητας. Παρ' όλα αυτά όλα τα δείγματα παρουσίασαν μείωση της συνεκτικότητας τους με τον χρόνο αποθήκευσης. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη συγκεκριμένη περίπτωση παρουσιάστηκε στατιστικά μη σημαντική ($p > 0,05$). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων. Οι δοκιμαστές παρατήρησαν ότι την 1^η ημέρα αποθήκευσης, τα δείγματα με GOS παρουσίασαν συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς πιο συνεκτική και κρεμώδη υφή. Μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης, όλα τα δείγματα παρουσίασαν αύξηση της συναίρεσης, ενώ σε σχέση με την υφή στο κουτάλι και το στόμα εντοπίστηκε αύξηση της κοκκώδους και μείωση της ζελατινώδους και κρεμώδους υφής. Η μεταβολή ήταν πιο έντονη στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς. Στα υπόλοιπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα δείγματα με GOS παρουσίασαν σταθερότητα σε όλο το διάστημα αποθήκευσης. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα αναφοράς παρουσίασαν αύξηση της όξινης γεύσης και της γεύσης ορού. Συγχρόνως, στην περίπτωση των δειγμάτων αναφοράς παρατηρήθηκε μείωση τους ευχάριστου αρώματος και της γλυκύτητας.

Τέλος, μέσω της οικονομικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η οικονομική επιβάρυνση της παραγωγής της κλασικής κρέμας βανίλιας. Η διεργασία παραγωγής της κρέμας δεν διαφοροποιήθηκε σε κανένα στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. Οι μόνες επιπλέον διεργασίες που πραγματοποιήθηκαν ήταν η παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Από την ανάλυση αυτή εκτιμήθηκε ότι η οικονομική επιβάρυνση που θα επιφέρει η παραγωγή GOS θα είναι 0,25 €/κρέμα 130 g. Εντός αυτού του κόστους περιλαμβάνεται το κόστος λειτουργίας και εγκατάστασης του εξοπλισμού με γνώμονα την απόσβεσή του σε 10 χρόνια από τη ημέρα έναρξης της παραγωγής. Το μεγαλύτερο μέρος του κόστους καταλαμβάνει η ενεργειακή κατανάλωση, καθώς το ποσοστό συμμετοχής της ανέρχεται στο 68 % του συνολικού κόστους.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Μέσω της παρούσας διπλωματικής έρευνας αποδείχθηκε ότι η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών και η ένταξη τους σε ένα προϊόν διατροφής είναι εφικτή σε πιλοτική κλίμακα. Ως συνέχεια της συγκεκριμένης έρευνας, σκόπιμη κρίνεται η διερεύνηση της δυνατότητας ένταξης των γαλακτοολιγοσακχαριτών με τη μορφή συμπυκνωμένου διαλύματος σε ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων.

Επίσης, αντικείμενο μελλοντικής έρευνας μπορεί να αποτελέσει η μελέτη διαφορετικών ειδών β-γαλακτοζιδάσης από διαφορετικούς οργανισμούς προέλευσης, καθώς όπως αποδείχθηκε η πηγή προέλευσής της καθορίζει τις συνθήκες δράσεις, το είδος των ολιγοσακχαριτών που δημιουργεί και την απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Συγχρόνως, θα μπορούσε να εξεταστεί το ενδεχόμενο της ακινητοποίησης του ενζύμου με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή του και τη μείωση του κόστους παραγωγής της.

Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η υψηλότερη ενεργειακή κατανάλωση εντοπίζεται στην περίπτωση της συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού, η μελέτη νέων τρόπων συμπύκνωσης του σε ήπιες συνθήκες αποτελεί αντικείμενου ιδιαίτερου ενδιαφέροντος το οποίο μπορεί να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση της διεργασίας και τη μείωση του κόστους παραγωγής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας μεθόδου συμπύκνωσης που θα μπορούσε να μελετηθεί είναι η υπερδιήθηση. Παράλληλα οφείλει να αξιολογηθεί η οικονομική εφικτότητα της νέας μεθόδου συμπύκνωσης συγκρίνοντας το κόστος λειτουργίας και το κόστος εξοπλισμού της εκάστοτε μεθόδου.

Βιβλιογραφία

- Ahmad I, Hao M, Li Y, Jianyou Z, Yuting D, Lyu F. Fortification of yogurt with bioactive functional foods and ingredients and associated challenges - A review. *Trends in Food Science & Technology*. Published online November 2022. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.003>
- Ambrogi V, Bottacini F, Cao L, Kuipers B, Schoterman M, van Sinderen D. Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: production, application, bioactive activities and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Published online September 3, 2021;1-14. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1953437>
- Aktar T. Physicochemical and sensory characterisation of different yoghurt production methods. *International Dairy Journal*. Published online October 16, 2021;105245. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105245>
- Aryana KJ, Olson DW. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(12):9987-10013. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Balthazar CF, Silva HLA, Celeguini RMS, et al. Effect of galactooligosaccharide addition on the physical, optical, and sensory acceptance of vanilla ice cream. *Journal of Dairy Science*. 2015;98(7):4266-4272. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9018>
- Baranyi J, Roberts TA. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 1995;26(2):199-218. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-1)
- Bruno-Barcena JM, Azcarate-Peril MA. Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods*. 2015;12:92-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.029>
- Boger M, Leeuwen van, Lammerts A, Lubbert Dijkhuizen. Structural Identity of Galactooligosaccharide Molecules Selectively Utilized by Single Cultures of Probiotic Bacterial Strains. 2019;67(50):13969-13977. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05968>
- Bosso A, Cínthia, Batista De Souza H, Hélio, Suguimoto H. *Enzyme Activity of β -Galactosidase from Kluyveromyces Lactis and Aspergillus Oryzae on Simulated Conditions of Human Gastrointestinal System*.
- Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Science; 2015.
- Carević M, Ćorović M, Mihailović M, et al. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal*. 2016;54:50-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.10.002>
- Costabile A, Walton GE, Tzortzis G, Vulevic J, Charalampopoulos D, Gibson GR. Development of a bread delivery vehicle for dietary prebiotics to enhance food functionality targeted at those with metabolic syndrome. *Gut Microbes*. 2015;6(5):300-309. doi:<https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1064577>
- Córdova A, Astudillo C, Santibañez L, Cassano A, Ruby-Figueroa R, Illanes A. Purification of galacto-oligosaccharides (GOS) by three-stage serial nanofiltration units under critical transmembrane pressure conditions. *Chemical Engineering Research and Design*. 2017;117:488-499. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.11.006>
- Desai NT, Shepard L, Drake MA. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(12):7454-7466. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6973>

- Deeth H, Nidhi Bansal. *Whey Proteins : From Milk to Medicine*. London Academic Press, An Imprint Of Elsevier; 2019.
- Fenelon M, Hickey R, Buggy A, McCarthy N, Murphy E. Whey Proteins in Infant Formula. *Whey Proteins*. Published online January 1, 2019:439-494. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00013-8>
- Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*. 2015;48:15-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
- Fischer C, Kleinschmidt T. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(3):678-697. doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12344>
- Fonteles TV, Rodrigues S. Prebiotic in fruit juice: processing challenges, advances, and perspectives. *Current Opinion in Food Science*. 2018;22:55-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.001>
- International Dairy Federation, IDF (1991). Yogurt: Determination of titratable acidity. International, IDF Standard, ISO
- Irazoqui G, Giacomini C, Batista-Viera F, et al. Characterization of Galactosyl Derivatives Obtained by Transgalactosylation of Lactose and Different Polyols Using Immobilized β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. 2009;57(23):11302-11307. doi:<https://doi.org/10.1021/jf901834k>
- Guerrero C, Aburto C, Suarez S, Carlos Roman Vera, Andrés Illanes. Effect of the type of immobilization of β -galactosidase on the yield and selectivity of synthesis of transgalactosylated oligosaccharides. 2018;16:353-363. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.021>
- Gyawali R, Ibrahim SA. Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;56:61-76. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.013>
- Harju M, Kallioinen H, Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*. 2012;22(2):104-109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>
- Husain Q, Ansari SA, Alam F, Azam A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;49(1):37-43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.011>
- Houssard C, Maxime D, Pouliot Y, Margni M. Allocation is not enough! A system boundaries expansion approach to account for production and consumption synergies: The environmental footprint of Greek yogurt. *Journal of Cleaner Production*. 2021;283:124607. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124607>
- Ichimura T, Osada T, Yonekura K, Horiuchi H. A new method for producing superior set yogurt, focusing on heat treatment and homogenization. *Journal of Dairy Science*. 2022;105(4):2978-2987. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21326>
- Karastamatis S, Zoidou E, Moatsou G, Moschopoulou E. Effect of Modified Manufacturing Conditions on the Composition of Greek Strained Yogurt and the Quantity and Composition of Generated Acid Whey. *Foods*. 2022;11(24):3953. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11243953>
- Ketterings Q, Czymmek K, Gami S, Godwin G, Ganoe K. *Guidelines for Land Application of Acid Whey*; 2017.

- Konrad G, Kleinschmidt T, Faber W. Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. *International Dairy Journal*. 2012;22(1):73-77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.005>
- Körzendörfer A, Hinrichs J. Manufacture of high-protein yoghurt without generating acid whey – Impact of the final pH and the application of power ultrasound on texture properties. *International Dairy Journal*. Published online August 2019:104541. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104541>
- Kim CS, Ji ES, Oh DK. A new kinetic model of recombinant β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;316(3):738-743. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.118>
- Kwak HS, Lee WJ, Lee MR. Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*. 2012;22(2):147-151. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.002>
- Lange I, Mleko S, Tomczyńska-Mleko M, Polischuk G, Janas P, Ozimek L. Technology and factors influencing Greek-style yogurt – a Review. *Ukrainian Food Journal*. 2020;9(1):7-35. doi:<https://doi.org/10.24263/2304-974x-2020-9-1-3>
- Leili A-M, Azizi A, Darghahi R, et al. Development of Synbiotic Milk Chocolate Enriched with *Lactobacillus paracasei*, D-tagatose and Galactooligosaccharide. 2018;5(2):59-68. doi:<https://doi.org/10.22037/afb.v5i2.19955>
- Li S, Ye A, Singh H. Effects of seasonal variations on the quality of set yogurt, stirred yogurt, and Greek-style yogurt. *Journal of Dairy Science*. Published online December 2020. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19071>
- Lievore P, Simões DRS, Silva KM, et al. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*. 2013;52(4):2083-2092. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
- Lindsay MJ, Walker TW, Dumesic JA, Rankin SA, Huber GW. Production of monosaccharides and whey protein from acid whey waste streams in the dairy industry. *Green Chemistry*. 2018;20(8):1824-1834. doi:<https://doi.org/10.1039/C8GC00517F>
- Liszkowska W, Berlowska J. Yeast Fermentation at Low Temperatures: Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. *Molecules*. 2021;26(4):1035. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26041035>
- Majore K, Ciprovica I. Bioconversion of Lactose into Glucose–Galactose Syrup by Two-Stage Enzymatic Hydrolysis. *Foods*. 2022;11(3):400. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11030400>
- Mansouripour S, Mizani M, Rasouli S, Gerami A, Sharifan A. Effect of inulin and galactooligosaccharides on particle size distribution and rheological properties of prebiotic ketchup. *International Journal of Food Properties*. 2016;20(1):157-170. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1152478>
- Maráz A, Zoltán Kovács, Benjamins E, Pázmándi M. Recent developments in microbial production of high-purity galacto-oligosaccharides. 2022;38(6). doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03279-4>
- Martins GN, Ureta MM, Tymczyszyn EE, Castilho PC, Gomez-Zavaglia A. Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6. doi:<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>
- Matthews BW. The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus Biologies*. 2005;328(6):549-556. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.03.006>

- Matumoto-Pintro PT, Rabiey L, Robitaille G, Britten M. Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal*. 2011;21(1):21-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.07.003>
- Mcnamara JP, P L H Mcsweeney. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam, Netherlands Elsevier Academic Press; 2021.
- Mei Z, Yuan J, Li D. Biological activity of galacto-oligosaccharides: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.993052>
- Menchik P, Zuber T, Zuber A, Moraru CI. Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(5):3978-3984. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15951>
- Miloud B, Halima ZK and, Nour-Eddine K. Development of a sweet whey-based medium for culture of Lactobacillus. *African Journal of Biotechnology*. 2017;16(30):1630-1637. doi:<https://doi.org/10.5897/ajb2017.16088>
- Mondragón-Parada ME, Nájera-Martínez M, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer J, Ruiz-Ordaz N, Cristiani-Urbina E. Lactic Acid Bacteria Production From Whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006;134(3):223-232. doi:<https://doi.org/10.1385/abab:134:3:223>
- Montañés F, Fornari T, Olano A, Cifuentes A. Supercritical fluid purification of complex carbohydrate mixtures produced by enzymatic transglycosilation and isomerized with complexating reagents. 2010;53(1-3):25-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.02.011>
- Moro G, Stahl B, Fanaro S, Jelinek J, Boehm G, Coppa G. Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed infants. *Acta Paediatrica*. 2005;94(0):27-30. doi:<https://doi.org/10.1080/08035320510043510>
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2001;26(3):171-177. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- Neto CP, Silva NCG, Costa T, et al. The β -galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. 2021;176:468-478. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>
- Panesar PS, Kaur R, Singh RS, Kennedy JF. Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;111:667-679. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.062>
- Peña MJ, Carpita NC. Loss of Highly Branched Arabinans and Debranching of Rhamnogalacturonan I Accompany Loss of Firm Texture and Cell Separation during Prolonged Storage of Apple. *Plant Physiology*. 2004;135(3):1305-1313. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.104.043679>
- Peters M, Timmerhaus K, West R. *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. 5th Edition. McGraw-Hill; 2020.
- Rentas MF, Pedreira RS, Perini MP, et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. Harmon DL, ed. *PLOS ONE*. 2020;15(8):e0238006. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238006>
- Ricardi NC, Arenas LT, Benvenuti EV, et al. High performance biocatalyst based on β -d-galactosidase immobilized on mesoporous silica/titania/chitosan material. *Food Chemistry*. 2021;359:129890-129890. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129890>
- Richards PJ, Flaujac Lafontaine GM, Connerton PL, et al. Galacto-Oligosaccharides Modulate the Juvenile Gut Microbiome and Innate Immunity To Improve Broiler Chicken

- Performance. Cleary DW, ed. *mSystems*. 2020;5(1). doi:https://doi.org/10.1128/msystems.00827-19
- Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Krentz A, et al. Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*. 2021;104(2):1262-1275. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038
- Roukas T, Lazarides HN. Ethanol production from deproteinized whey by β -galactosidase coimmobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1991;7(1):15-18. doi:https://doi.org/10.1007/bf01575597
- Roy I, Gupta MN. Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*. 2003;39(3):325-332. doi:https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00086-4
- Sangwan V, Tomar SK, Singh RRB, Singh AK, Ali B. Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. *Journal of Food Science*. 2011;76(4):R103-R111. doi:https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x
- Saqib S, Akram A, Halim SA, Tassaduq R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*. 2017;7(1). doi:https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5
- Schingoethe DJ. Whey Utilization in Animal Feeding: A Summary and Evaluation. *Journal of Dairy Science*. 1976;59(3):556-570. doi:https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(76)84240-3
- Souza T, Miguel, Daniel Ernesto Rodríguez Fernández, Maria G. Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry. Published online October 22, 2015. doi:https://doi.org/10.5772/60934
- Sijbers AM, Schoemaker RJW, Nauta A, Alkema W. Revealing new leads for the impact of galacto-oligosaccharides on gut commensals and gut health benefits through text mining. *Beneficial Microbes*. 2020;11(3):283-302. doi:https://doi.org/10.3920/bm2019.0105
- Urrutia P, Rodriguez-Colinas B, Fernandez-Arrojo L, et al. Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(5):1081-1087. doi:https://doi.org/10.1021/jf304354u
- Vera C, Guerrero C, Illanes A, Conejeros R. A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011;108(10):2270-2279. doi:https://doi.org/10.1002/bit.23201
- Vera C, Córdova A, Aburto C, Guerrero C, Suárez S, Illanes A. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(12):197. doi:https://doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4
- Warmerdam A, Benjamins E, De TFL, Broekhuis TA, Boom RM, Janssen AEM. Galacto-oligosaccharide production with immobilized β -galactosidase in a packed-bed reactor vs. free β -galactosidase in a batch reactor. *Food and Bioprocess Processing*. 2014;92(4):383-392. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.014
- What We Know About Feeding Liquid By-Products to Pigs. www.thepigsite.com. Accessed June 13, 2023. <https://thepigsite.com/articles/what-we-know-about-feeding-liquid-byproducts-to-pigs>
- Wojciechowska A, Klewicki R, Sójka M, Grzelak-Błaszczak K. Application of Transgalactosylation Activity of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for the Synthesis of Ascorbic Acid Galactoside. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017;184(1):386-400. doi:https://doi.org/10.1007/s12010-017-2551-z

- Yang H, Liu J, Dang M, et al. Analysis of β -Galactosidase During Fruit Development and Ripening in Two Different Texture Types of Apple Cultivars. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00539>
- Yin H, Bultema JB, Lubbert Dijkhuizen, Leeuwen van. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. 2017;225:230-238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>
- You S, Zhang J, Yin Q, Qi W, Su R, He Z. Development of a novel integrated process for co-production of β -galactosidase and ethanol using lactose as substrate. 2017;230:15-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.019>