



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ
ΠΡΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ
ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΚΑΙ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Γ. ΛΗΜΝΑΙΟΣ

Χημικός Μηχανικός Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2023

Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η αξιοποίηση του όξινου και του γλυκού ορού, των δύο κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας πλούσιων σε λακτόζη, για την παραγωγή πρεβιοτικών γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS), με εφαρμογή εμπορικών και καινοτόμων βιοκαταλυτών. Στόχος ήταν η αριστοποίηση της παραγωγής GOS απευθείας από όξινο και γλυκό ορό και η ενσωμάτωση των παραγόμενων πρεβιοτικών σε γαλακτοκομικό προϊόν, αποσκοπώντας σε μια ολοκληρωμένη πρόταση αξιοποίησης των παραπροϊόντων από μια γαλακτοβιομηχανία, με παράλληλη αξιολόγηση του κύκλου ζωής της προτεινόμενης διεργασίας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του όξινου και του γλυκού ορού, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των κύριων συστατικών αυτών. Η ανάλυση αυτή ήταν απαραίτητη, καθώς η συγκέντρωση τόσο της λακτόζης, όσο και των άλλων συστατικών των ορών επηρεάζουν σημαντικά τη δράση των λακτασών, άρα και την απόδοση των αντιδράσεων σε GOS. Κύριο συστατικό και των δύο ορών αποτελεί η λακτόζη, με την περιεκτικότητά της στον όξινο και στον γλυκό ορό να ανέρχεται σε 31,18 και 50,76 g/L, αντίστοιχα. Πέρα από τη λακτόζη, βασικό συστατικό του όξινου ορού αποτελεί το γαλακτικό οξύ (1,37 g/L) που του προσδίδει τιμή pH ίση με 4,4, ενώ ο γλυκός ορός περιέχει σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών (14,06 g/L). Και οι δύο τύποι ορού περιέχουν πλήθος μετάλλων, με κυριότερα το K^+ , το Na^+ , το Ca^{2+} και το Mg^{2+} .

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι βιοτεχνολογικές ιδιότητες δύο εμπορικών, βιομηχανικά εφαρμοζόμενων λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Kluyveromyces lactis* και *Aspergillus oryzae* και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης τους. Η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* παρουσίασε βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία 35 °C και τιμή pH ίση με 7,2, ενώ οι αντίστοιχες βέλτιστες συνθήκες δράσης για τη β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* προσδιορίστηκαν σε θερμοκρασία 45 °C και τιμή pH ίση με 4,5. Παράλληλα, παράχθηκαν και απομονώθηκαν δύο καινοτόμες, θερμόφιλες λακτάσες από τον μύκητα *Thermothielavioides terrestris* και το βακτήριο *Thermotoga neapolitana*, των οποίων οι βέλτιστες συνθήκες δράσης προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Η β-γαλακτοζιδάση από τον *T. terrestris* παρουσίασε βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία 50 °C και τιμή pH ίση με 4,0 και η β-γλυκοζιδάση από τον *T. neapolitana* είχε βέλτιστες συνθήκες δράσης σε θερμοκρασία 90 °C και τιμή pH ίση με 5,5.

Μετά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης κάθε βιοκαταλύτη, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των τεσσάρων λακτασών σε όξινο ορό, συμπυκνωμένο ή μη, με στόχο τη μελέτη της μετατροπής της περιεχόμενης λακτόζης σε GOS και τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών που μεγιστοποιούν τον βαθμό απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* οδήγησε σε μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 27,4 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 0,13 U/mL σε μη συμπυκνωμένο όξινο ορό, έπειτα από 1,5 h αντίδρασης. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παρήχθησαν με αυτό το ένζυμο ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η αλλολακτόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 31,5, 13,6 και 7,13 %, αντίστοιχα. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* οδήγησε σε μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 28,2 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 4,0 U/mL σε συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v, έπειτα από 7 h αντίδρασης. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παρήχθησαν και σε αυτή την περίπτωση ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η αλλολακτόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 41,9, 17,0 και 5,72 %, αντίστοιχα.

Μετά την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών στον όξινο ορό ακολούθησε η μελέτη με τις δύο καινοτόμες, θερμόφιλες λακτάσες. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *T. terrestris* οδήγησε σε μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 31,8 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 8,0 U/mL σε συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v, έπειτα από 7 h αντίδρασης. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παράχθηκαν ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η αλλολακτόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 45,6, 19,1 και 3,97 %, αντίστοιχα. Η β-γλυκοζιδάση από τον *T. neapolitana* εφαρμόστηκε μόνο σε μη συμπυκνωμένο όξινο ορό και οδήγησε σε παραγωγή GOS με μέγιστο βαθμό απόδοσης ίσο με 18,2 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 1,0 U/mL, έπειτα από 8 h αντίδρασης. Η παραγωγή GOS με εφαρμογή αυτής της λακτάσης σε συμπυκνωμένο ορό φάνηκε να παρεμποδίζεται από την παρουσία ιόντων μετάλλων, των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται με τη συμπύκνωση του ορού.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής της παραγωγής GOS με αξιοποίηση του όξινου ορού. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των καινοτόμων μεθόδων αξιοποίησης του όξινου ορού και της συμβατικής τεχνικής διαχείρισης του ορού για την παραγωγή βιοαερίου. Συνολικά, οι καινοτόμες μέθοδοι υπερέχουν από τη συμβατική όταν λαμβάνεται υπόψη το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα σε πολλές

κατηγορίες επιπτώσεων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν ληφθεί υπόψη ότι οι ενεργειακές καταναλώσεις υπολογίζονται σε εξοπλισμό εργαστηριακής κλίμακας με συγκεκριμένες αποδόσεις και περιορισμένες δυνατότητες ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης νερού και ατμών. Εάν ληφθεί υπόψη η κλιμάκωση σε βιομηχανικό εξοπλισμό, τα περιβαλλοντικά προτερήματα των προτεινόμενων μεθόδων θα γίνουν ακόμα πιο εμφανή.

Κατόπιν, οι GOS που παρήχθησαν με αξιοποίηση του όξινου ορού ενσωματώθηκαν σε κρέμα με άρωμα βανίλιας και μελετήθηκε η ποιότητά της, με παράλληλη πραγματοποίηση πειραμάτων διατηρησιμότητας. Το καλύτερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα προέκυψε με τη χρήση εξουδετερωμένου συμπυκνωμένου διαλύματος GOS σε αναλογία 14 % w/w. Τα αποτελέσματα μέτρησης της μικροβιολογικής ποιότητας έδειξαν ότι η προσθήκη GOS οδήγησε στην καθυστέρηση μικροβιακής ανάπτυξης, με τις κρέμες να έχουν χρόνο ζωής 81 d στους 4 °C, παρόμοιο με τον χρόνο ζωής των δειγμάτων αναφοράς, χωρίς την προσθήκη GOS. Αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των κρεμών, αυτές με προσθήκη GOS εμφάνισαν πιο κίτρινο χρώμα, λόγω της παρουσίας ριβοφλαβίνης από τον όξινο ορό, με το χρώμα τους να παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Επίσης, η τιμή pH των κρεμών με GOS ήταν ίση με 6,8, ελαφρώς υψηλότερη από την τιμή pH των δειγμάτων αναφοράς (6,6), λόγω της χρήσης σιροπιού GOS εξουδετερωμένου με αλκαλικό διτανθρακικό νάτριο. Επιπλέον, μέσω της μέτρησης της αντικειμενικής υφής των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι οι κρέμες με GOS παρουσιάζουν σταθερές τιμές των χαρακτηριστικών μεγεθών της υφής (πηκτότητα, προσκολλησιμότητα, ελαστικότητα, κομμιώδες). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων.

Παράλληλα, οι δύο βιομηχανικές λακτάσες από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae* εφαρμόστηκαν σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης και μελετήθηκε η μετατροπή της περιεχόμενης λακτόζης σε GOS, προσδιορίζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που μεγιστοποιούν τον βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσου με 21,7 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 0,13 U/mL σε συμπυκνωμένο τυρόγαλα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v, έπειτα από 5 h αντίδρασης. Οι κυριότεροι GOS που παρήχθησαν ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η αλλολακτόζη και η 6-γαλακτοβιόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 31,6, 21,6 και 14,8 %, αντίστοιχα. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου

βαθμού απόδοσης σε GOS ίσου με 17,9 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 2,0 U/mL σε συμπυκνωμένο τυρόγαλα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v, έπειτα από 1 h αντίδρασης. Τα κυριότερα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη και η 6-γαλακτοβιόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 68,0 και 2,05 %, αντίστοιχα.

Στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε και η μελέτη των θερμοφυσικών ιδιοτήτων της λακτόζης και του φαινομένου κρυστάλλωσης αυτής. Η κρυστάλλωση και καταβύθιση της λακτόζης μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε ενζυμικές διεργασίες μετατροπής της σε GOS, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες. Μελετήθηκε η επίδραση των κυριότερων συστατικών του όξινου και γλυκού ορού (γαλακτικό οξύ και πρωτεΐνες ορού) στο φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης, μέσω της κατασκευής δυναμικών καμπυλών ισόθερμης ρόφησης νερού. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι σε συστήματα καθαρής λακτόζης δεν παρατηρήθηκε κρυστάλλωση σε τιμές ενεργότητας νερού μικρότερες από 0,43. Αντίθετα, σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας νερού έλαβε χώρα κρυστάλλωση της λακτόζης, η οποία γινόταν ταχύτερα με αύξηση της ενεργότητας νερού και της θερμοκρασίας. Η προσθήκη γαλακτικού οξέος στα συστήματα καθαρής λακτόζης ενίσχυσε την κρυστάλλωσή της, λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητάς του. Υψηλότερα ποσοστά γαλακτικού οξέος οδήγησαν στην ταχύτερη κρυστάλλωση της λακτόζης σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού. Από την άλλη, η προσθήκη πρωτεϊνών έδρασε παρεμποδιστικά προς την κρυστάλλωση της λακτόζης σε τιμές ενεργότητας νερού έως 0,43, ενώ δεν φάνηκε να έχει επίδραση σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας νερού. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από αναλύσεις των συστημάτων λακτόζης με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, καθώς η προσθήκη γαλακτικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των θερμοκρασιών υαλώδους μετάπτωσης και κρυστάλλωσης της λακτόζης, ενώ η προσθήκη πρωτεϊνών είχε ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση της μείωσης των δύο μεγεθών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καταδεικνύουν την εφικτότητα και την υψηλή αποδοτικότητα της μετατροπής του όξινου και του γλυκού ορού από δύο χαμηλής αξίας παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας σε συστατικά με υψηλή θρεπτική και προστιθέμενη αξία, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, μέσω εφαρμογής καινοτόμων διεργασιών και βιοκαταλυτών. Η προτεινόμενη διεργασία μπορεί να εφαρμοσθεί άμεσα από κάθε γαλακτοβιομηχανία, για την παραγωγή νέων ή την αναβάθμιση υπάρχοντων γαλακτοκομικών προϊόντων, μέσω μιας διαδικασίας πρακτικά μηδενικών εκροών που ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας.

Valorization of dairy industry by-products for the production of ingredients with high nutritional value via the utilization of innovative processes and biocatalysts

In this PhD thesis, the utilization of acid and sweet whey, the two main lactose-rich by-products of the dairy industry, was studied for the production of prebiotic galactooligosaccharides (GOS), via the application of commercial and innovative biocatalysts. The objective was to optimize the production of GOS directly from acid and sweet whey and to incorporate the produced prebiotics into a dairy product, aiming at the development of a wholistic process for the valorization of the by-products by a dairy industry, with a simultaneous evaluation of the life cycle of the bioprocess.

Initially, an analysis of the composition of the acid and sweet whey was carried out, to determine the concentrations of their main components. This is necessary for enzymatic processes, since the concentration of both lactose and the other whey components affect the enzymatic activity of lactases, thus the performance of the enzymatic reactions in terms of GOS yield. The main component of both types of whey is lactose, with its content in acid and sweet whey being 31.18 and 50.76 g/L, respectively. Apart from lactose, the main component of acid whey is lactic acid (1.37 g/L), which gives it a pH value of 4.4, while sweet whey contains a significant amount of proteins (14.06 g/L). Both types of whey contain several minerals, particularly K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} .

Then, the biotechnological properties of two commercial, industrially applied lactases from the microorganisms *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae* were studied and their optimal activity conditions were determined. The β -galactosidase from *K. lactis* showed optimal activity at a temperature of 35 °C and a pH value of 7.2, while the corresponding optimal activity conditions for the β -galactosidase from *A. oryzae* were measured at a temperature of 45 °C and a pH value of 4.5. Additionally, two innovative, thermophilic lactases were produced and isolated from the fungus *Thermothielavioides terrestris* and the bacterium *Thermotoga neapolitana*, whose optimal activity conditions were also determined. The β -galactosidase from *T. terrestris* showed optimal activity at a temperature of 50 °C and a pH value of 4.0, and the β -glucosidase from *T. neapolitana* had optimal activity conditions at a temperature of 90 °C and a pH value of 5.5.

After the determination of the optimal activity conditions for each biocatalyst, the application of the four lactases was carried out in acid whey, concentrated or not, with

the aim of studying the conversion of the contained lactose into GOS and determining the optimal conditions that maximize the efficiency of the enzyme reactions. The application of β -galactosidase from *K. lactis* resulted in a maximum GOS yield of 27.4 %, by applying an enzyme load of 0.13 U/mL in non-concentrated acid whey, after 1.5 h of enzymatic. The three main GOS produced by this enzyme were 6'-O- β -galactosyl-lactose, 6-galactobiose and allolactose and their percentage in the GOS mixture was 31.5, 13.6 and 7.13 %, respectively. Accordingly, the application of β -galactosidase from *A. oryzae* resulted in a maximum GOS yield of 28.2 %, with the application of an enzyme load equal to 4.0 U/mL in concentrated acid whey with an initial lactose content of 20 % w/v, after 7 h of enzymatic reaction. The three main GOS produced in this case were also 6'-O- β -galactosyl-lactose, 6-galactobiose, and allolactose and were contained in the GOS mixture in percentages of 41.9, 17.0, and 5,72 %, respectively.

After the application of the two industrial lactases to the acid whey followed the study with the two innovative, thermophilic lactases. The application of β -galactosidase from *T. terrestris* resulted in a maximum GOS yield of 31.8 %, by applying an enzyme load of 8.0 U/mL in concentrated acid whey with an initial lactose content of 20 % w/v, after 7 h of enzymatic reaction. The three main GOS produced were 6'-O- β -galactosyl-lactose, 6-galactobiose, and allolactose, with their percentages in the GOS mixture being equal to 45.6, 19.1 and 3.97 %, respectively. The β -glucosidase from *T. neapolitana* was applied only in non-concentrated acid whey and resulted in GOS production with a maximum yield of 18.2 %, by applying an enzyme load of 1.0 U/mL, after 8 h of enzymatic reaction. The production of GOS via the application of this lactase to concentrated whey appeared to be hindered by the presence of metal ions, the concentration of which increases with whey condensation.

Afterwards, an environmental impact study and life cycle analysis of GOS production using acid whey was carried out. An assessment of the environmental footprint of the innovative methods of acid whey valorization in comparison to the conventional management techniques of acid whey utilization for biogas production was carried out. Overall, the innovative methods outperform the conventional ones when considering their environmental footprint in several impact categories and this is particularly important if one considers that energy consumptions are calculated on energy-scale equipment with specific efficiencies and limited possibilities for water and steam recycling and reuse. If scale-up to industrial equipment is considered, the environmental advantages of the proposed methods will become even more apparent.

Then, the GOS produced from acid whey were incorporated into a vanilla-flavored cream and its quality was studied, while carrying out shelf-life experiments. The best organoleptic result was obtained using a neutralized concentrated GOS syrup at a ratio of 14 % w/w. Microbiological quality measurement results showed that the addition of GOS led to microbial growth delay, with the products with GOS having a shelf life of 81 d at 4 °C, similar to the shelf life of the reference samples without the addition of GOS. Regarding the quality characteristics of the creams, those with GOS showed a yellow color, due to the presence of riboflavin from the acid whey, with their color remaining stable throughout their shelf life. Additionally, the pH value of the GOS-containing creams was equal to 6.8, slightly higher than the pH value of the reference samples (6.6), due to the use of GOS syrup neutralized with alkaline sodium bicarbonate. In addition, by measuring the objective texture of the samples it was found that creams with GOS present constant values of the characteristic texture parameters (gelatinity, adhesion, elasticity, gumminess). These results were confirmed through organoleptic evaluation of the samples.

Furthermore, the two industrial lactases from the microorganisms *K. lactis* and *A. oryzae* were applied to sweet whey and the conversion of the contained lactose into GOS was studied, determining the optimal conditions that maximize the efficiency of the transgalactosylation reaction in terms of GOS yield. The application of β -galactosidase from *K. lactis* led to the achievement of a maximum GOS yield of 21.7 %, by applying an enzyme load of 0.13 U/mL in concentrated sweet whey with an initial lactose content of 15 % w/v, after 5 h of enzymatic reaction. The main GOS produced were 6'-O- β -galactosyl-lactose, allolactose and 6-galactobiose and were present in the GOS mixture at 31.6, 21.6 and 14.8 %, respectively. On the other hand, the application of β -galactosidase from *A. oryzae* led to the achievement of a maximum GOS yield equal to 17.9 %, by applying an enzyme load of 2.0 U/mL in concentrated sweet whey with an initial content in lactose equal to 15 % w/v, after 1 h of enzymatic reaction. The main transgalactosylation products were 6'-O- β -galactosyl-lactose and 6-galactobiose and were present in the GOS mixture at 68.0 and 2.05 %, respectively.

Another aim of this PhD thesis was to study the thermophysical properties of lactose and its crystallization phenomenon. Crystallization and precipitation of lactose can create problems in enzymatic processes of converting it to GOS, especially at high lactose concentrations and temperatures. The effect of the main components of acid and sweet whey (lactic acid, proteins, galactose) on lactose crystallization was studied, through the construction of dynamic water sorption isotherm curves. The results showed

that in pure lactose systems no crystallization was observed at water activity values lower than 0.43. On the contrary, at higher water activity values lactose crystallization took place, which occurred faster with increasing water activity and temperature. The addition of lactic acid to pure lactose systems enhanced its crystallization, due to the high hygroscopicity of lactic acid. Higher percentages of lactic acid led to faster crystallization of lactose at lower water activity values. On the other hand, the addition of proteins inhibited the crystallization of lactose at water activity values up to 0.43, while it did not appear to have an effect at higher water activity values. The above results are also confirmed by analyses of the lactose systems with differential scanning calorimetry, as the addition of lactic acid resulted in a rapid decrease in the glass transition and crystallization temperatures of lactose, while the addition of proteins resulted in a delay in the reduction of both sizes.

The results of this PhD thesis demonstrate the feasibility and high efficiency of the conversion of acid and sweet whey from low-value by-products of the dairy industry into components with high nutritional and added value (GOS), through the application of innovative processes and biocatalysts. The proposed process can be directly applied by any dairy industry, to produce new or upgrade existing dairy products, through a process with practically zero effluents that is aligned with the principles of the circular economy.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή Πέτρου Ταούκη. Κάθε διδακτορική διατριβή είναι μια μεγάλη διαδρομή στην οποία βαδίζουμε κυρίως μόνοι μας, αλλά έχουμε και συνοδοιπόρους. Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτού του ταξιδιού θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν έμπρακτα αλλά και συναισθηματικά να ολοκληρώσω αυτή τη διατριβή.

Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή ΕΜΠ και μέντορά μου Πέτρο Σ. Ταούκη. Τον ευχαριστώ από καρδιάς και του οφείλω ευγνωμοσύνη για την εμπιστοσύνη που έδειξε από την πρώτη στιγμή στο πρόσωπό μου, ήδη από την ανάθεση εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου, για την καθοδήγηση και για όλες τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, την Καθηγήτρια ΕΜΠ Μαγδαληνή Κροκίδα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα, για την συμβολή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου. Ακόμα, θερμές ευχαριστίες απευθύνω και στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ Μαρία Γιαννακούρου, την Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ Διομή Μαμμά, την Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ Θεοφανία Τσιρώνη και την Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ Αναστασία Ζέρβα, για την αξιολόγηση και την κρίση τους επί της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερη μνεία και ευχαριστίες αξίζουν στους δύο συναδέλφους που χάραξαν την πορεία μου στον ακαδημαϊκό χώρο και η συμβολή τους στην περάτωση της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική, τους οποίους αποκαλώ δασκάλους μου. Στον Δρ. Γεώργιο Δημόπουλο για την σπουδαία βοήθεια και υποστήριξη που μου προσέφερε και την άψογη συνεργασία που είχαμε από τον καιρό της διπλωματικής μου εργασίας και εφεξής, για όλες τις συμβουλές και την ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε και για όλα τα ξενύχτια στο Εργαστήριο πασχίζοντας για πειράματα και κάνοντας εκτενείς συζητήσεις με επιστημονικό, φιλοσοφικό, αλλά και φιλολογικό περιεχόμενο. Και φυσικά στην Δρ. Μαρία Τσεβδού, τον έτερο πυλώνα αυτής της διατριβής, για όλα τα εφόδια και τις γνώσεις που μου προσέφερε προκειμένου να βρω τα πατήματά μου στην αρχή και να ολοκληρώσω επιτυχώς την πορεία μου προς την απόκτηση του τίτλου του Διδάκτορα, αλλά και για όλη τη χαρτούρα που διεκπεραίωσε προκειμένου εγώ να προχωρώ απερίσπαστος τη διδακτορική μου έρευνα.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, συνάδελφο και φίλο μου Αλέξανδρο Κατσιμίχα, ο οποίος κρύβει μέσα του την ίδια αγάπη και τον ίδιο ενθουσιασμό για την έρευνα με εμένα. Μαζί μοιραστήκαμε προβληματισμούς και ανησυχίες τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο και μαζί καταφέραμε να ξεπεράσουμε τα όποια εμπόδια, να διδαχθούμε ο ένας από τον άλλον και να συνεργαστούμε δημιουργικά.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ, για την όμορφη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Τα μέλη ΕΔΙΠ Δρ. Ευφημία Δερμεσονλούογλου, Δρ. Βιργινία Γιάννου και Δρ. Δημήτριο Τσιμογιάννη, τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Δρ. Ελένη Γώγου, Δρ. Αθηνά Ντζιμάνη και Δρ. Μαρία Κατσούλη και τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννα Σεμένογλου και Ιωάννα Θάνου. Αισθάνομαι τυχερός που υπήρξα μέλος αυτής της ομάδας στο ταξίδι της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου και τους οφείλω πολλά.

Ξεχωριστή θέση κατέχουν φυσικά οι προπτυχιακοί φοιτητές Έλενα Τσίκα, Ειρήνη Ζαφείρη, Ναυσικά Κοριαλού, Χριστίνα Χαϊδά, Άννα Χριστοδούλου, Κωνσταντίνος Δημητρακόπουλος και Σταύρος Κωσταρέλλης, με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ στα πλαίσια της εκπόνησης της διπλωματικής τους εργασίας. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία μας και για το μεράκι και την όρεξή τους για την έρευνα.

Κλείνοντας, πρέπει να ευχαριστήσω και να τιμήσω τη μητέρα μου Κούλα και την οικογένειά μου για την αμέριστη αγάπη και βοήθεια που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια και για τη συμβολή τους στη διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου. Μου έδωσαν πολλή αγάπη ως παιδί και κυρίως μου ενέπνευσαν την αγάπη τους για τη γνώση. Αυτό είναι ίσως η μεγαλύτερη σφραγίδα τους σε εμένα.

Αθήνα, Νοέμβριος 2023

Αθανάσιος Γ. Λημναίος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	I
Valorization of dairy industry by-products for the production of ingredients with high nutritional value via the utilization of innovative processes and biocatalyts	V
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	IX
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	XI
Ευρετήριο πινάκων	XVII
Ευρετήριο σχημάτων	XXI
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Τα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας	1
1.1. Εισαγωγή.....	2
1.2. Όξινος ορός	2
1.2.1. Παραγωγή	2
1.2.2. Ιδιότητες.....	5
1.2.3. Υφιστάμενες μέθοδοι διαχείρισης και αξιοποίησης του όξινου ορού	10
1.3. Γλυκός ορός.....	15
1.3.1. Παραγωγή	15
1.3.2. Ιδιότητες.....	17
1.3.3. Υφιστάμενες μέθοδοι διαχείρισης και αξιοποίησης του γλυκού ορού	20
1.4. Καινοτόμες μέθοδοι αξιοποίησης των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας - Δυνατότητες και προκλήσεις	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η λακτόζη	27
2.1. Εισαγωγή.....	28
2.2. Ιδιότητες.....	28
2.3. Παραγωγή.....	31
2.3.1. Παραγωγική διαδικασία λακτόζης κατάλληλης για τρόφιμα	32
2.4. Το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης.....	35

2.4.1. Εισαγωγή	35
2.4.2. Η δομή της λακτόζης	36
2.4.3. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης	40
2.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση της λακτόζης.....	41
2.4.5. Κρυστάλλωση: Χρησιμότητα και Προβλήματα	45
2.4.6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της μελέτης του φαινομένου κρυστάλλωσης της λακτόζης	47
2.5. Εφαρμογές της λακτόζης στη βιομηχανία τροφίμων	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Οι β-γαλακτοζιδάσες και ο ρόλος τους στη βιομηχανία τροφίμων	57
3.1. Εισαγωγή.....	58
3.2. Πηγές ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης.....	59
3.2.1. Βακτηριακές β-γαλακτοζιδάσες.....	60
3.2.2. Μυκητιακές β-γαλακτοζιδάσες	60
3.2.3. Φυτικές β-γαλακτοζιδάσες	61
3.3. Μηχανισμός δράσης της β-γαλακτοζιδάσης.....	61
3.4. Βιομηχανικές εφαρμογές της β-γαλακτοζιδάσης	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες	71
4.1. Εισαγωγή.....	72
4.2. Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	72
4.2.1. Οι μέθοδοι παραγωγής.....	72
4.2.2. Μέθοδοι βελτίωσης της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών	73
4.2.3. Βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και μετατροπή της λακτόζης.....	76
4.2.4. Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών υψηλής καθαρότητας	76
4.2.5. Εμπορικά διαθέσιμοι γαλακτοολιγοσακχαρίτες.....	78
4.3. Ιδιότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών	80
4.3.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες	80

4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες	80
4.4. Εφαρμογές σε τρόφιμα	86
4.5. Το νομοθετικό πλαίσιο σχετικά με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες.....	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Υλικά και μέθοδοι	89
5.1. Πειραματικός σχεδιασμός	90
5.2. Χαρακτηρισμός όξινου ορού γιαουτιού και τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης	92
5.2.1. Σάκχαρα	92
5.2.2. Πρωτεΐνες	93
5.2.3. Λιπαρά.....	94
5.2.4. Γαλακτικό οξύ	96
5.2.5. Στερεό Υπόλειμμα και Τέφρα	96
5.2.6. Ιόντα μετάλλων	97
5.2.7. Θειικά Ιόντα	97
5.3. Προεπεξεργασία όξινου ορού και τυρογάλακτος.....	98
5.4. Παραγωγή καινοτόμων θερμόφιλων λακτασών	99
5.4.1. Παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Thermothielavioides terrestris</i>	100
5.4.2. Παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Thermotoga neapolitana</i>	102
5.5. Χαρακτηρισμός εμπορικών και καινοτόμων λακτασών	105
5.6. Ενζυμικές αντιδράσεις για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών .	107
5.7. Ανάλυση των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης.....	108
5.8. Κλιμάκωση της διεργασίας συμπύκνωσης του όξινου ορού και παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών	110
5.9. Ενσωμάτωση των παραγόμενων από όξινο ορό γαλακτο- ολιγοσακχαριτών σε κρέμες βανίλιας – Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας.....	111

5.9.1. Παραγωγή σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών και ενσωμάτωσή του σε κρέμες βανίλιας	111
5.9.2. Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας των κρεμών.....	112
5.10. Μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού.....	115
5.10.1. Μεθοδολογία της αξιολόγησης κύκλου ζωής	116
5.10.2. Εργαλεία λογισμικού και μέθοδοι αξιολόγησης περιβαλλοντικών επιπτώσεων	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Αποτελέσματα και σχολιασμός.....	121
6.1. Προσδιορισμός σύστασης όξινου και γλυκού ορού.....	122
6.2. Βιοτεχνολογικός χαρακτηρισμός βιομηχανικά διαθέσιμων και καινοτόμων λακτασών.....	123
6.2.1. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i>	123
6.2.2. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό <i>Aspergillus oryzae</i>	126
6.2.3. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό <i>Thermothielavioides terrestris</i>	129
6.2.4. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό <i>Thermotoga neapolitana</i>	130
6.3. Αξιοποίηση του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	132
6.3.1. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i>	132
6.3.2. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Aspergillus oryzae</i>	138
6.3.3. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Thermothielavioides terrestris</i>	143
6.3.4. Σύνοψη αποτελεσμάτων – Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού	151

6.3.5.	Ανάλυση της σύστασης των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού στις βέλτιστες συνθήκες.	153
6.3.6.	Κλιμάκωση της διεργασίας ενζυμικής παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού	156
6.3.7.	Ενσωμάτωση γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού σε προϊόν διατροφής (κρέμα βανίλιας) – Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας.....	159
6.3.8.	Μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού	177
6.4.	Αξιοποίηση του γλυκού ορού αιγοπρόβειας προέλευσης για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών	196
6.4.1.	Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i>	196
6.4.2.	Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Aspergillus oryzae</i>	200
6.4.3.	Σύνοψη αποτελεσμάτων – Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από γλυκό ορό αιγοπρόβειας προέλευσης	202
6.4.4.	Ανάλυση της σύστασης των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών από γλυκό ορό αιγοπρόβειας προέλευσης στις βέλτιστες συνθήκες	203
6.5.	Επίδραση των συστατικών του όξινου και γλυκού ορού και των γαλακτοολιγοσακχαριτών στο φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης	206
6.5.1.	Επίδραση της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ	206
6.5.2.	Επίδραση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ορού.....	226
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Σύνοψη αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα Error! Bookmark not defined.		
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		253

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1.1. Χημική ανάλυση όξινου ορού γιαουρτιού. ΔΑ: δεν ανιχνεύθηκε. (Menchik et al., 2019).....	8
Πίνακας 1.2. Βιομηχανικές τάσεις εμπορικής αξιοποίησης του όξινου ορού. ...	11
Πίνακας 1.3. Τυπική σύσταση τυρογάλακτος (Fischer & Kleinschmidt, 2015). .	20
Πίνακας 2.1. Κατάσταση και μορφές λακτόζης (Πηγή: Lisiohad, 2009).....	37
Πίνακας 2.2. Φυσικές ιδιότητες της α - και β -λακτόζης (Πηγή: Harper, 1992). ...	37
Πίνακας 2.3. Επίδραση πρόσθετων συστατικών στην κρυστάλλωση της λακτόζης (Πηγή: Wong, Hartel, 2014).	44
Πίνακας 2.4. Κρίσιμες τιμές περιεχόμενου νερού και σχετικής υγρασίας (Πηγή: Eliasson, 2006).	45
Πίνακας 3.1. Σύγκριση των συνθηκών παραγωγής και των μέγιστων αποδόσεων σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες που επιτυγχάνονται με εφαρμογή ενζύμων β -γαλακτοζιδάσης από διαφορετικές πηγές σε διάφορα υποστρώματα λακτόζης.	67
Πίνακας 4.1. Σύσταση των εμπορικών σκευασμάτων GOS (% w/w επί ξηρού) (Torres et al., 2010).....	79
Πίνακας 4.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	80
Πίνακας 5.2. Ρυθμιστικά διαλύματα και εύρη pH και θερμοκρασίας στα οποία προσδιορίστηκαν η ενζυμική ενεργότητα και η θερμοσταθερότητα των λακτασών από τους μικροοργανισμούς <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Thermothielavioides terrestris</i> και <i>Thermotoga neapolitana</i>	106
Πίνακας 5.3. Ενδιάμεσα σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe.....	119
Πίνακας 5.4. Τελικά σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe.....	120
Πίνακας 6.1. Σύσταση όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού και τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης.	123
Πίνακας 6.2. Επίδραση διαφόρων κατιόντων μετάλλων στην ενζυμική ενεργότητα (\pm τυπική απόκλιση) της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i>	126
Πίνακας 6.3. Επίδραση διαφόρων κατιόντων μετάλλων στην ενζυμική ενεργότητα (\pm τυπική απόκλιση) της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Aspergillus oryzae</i>	128
Πίνακας 6.3. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ GOS _{max}), χρόνος ενζυμικής αντίδρασης για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού	

απόδοσης σε GOS ($tGOS_{max}$), βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης κατά τον χρόνο επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS (h_{lac}) και βαθμός απόδοσης σε 6-γαλακτοβιόζη ($y_{gal} - gal$) για όλα τα συστήματα παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαρίτων από όξινο ορό γιαουρτιού που μελετήθηκαν.	151
Πίνακας 6.4. Απογραφή κύκλου ζωής με δεδομένα εισόδου και εξόδου για τις διεργασίες παραγωγής συμπυκνώματος από 1 kg αρχικού ΟΟΓ.	185
Πίνακας 6.5. Απογραφή κύκλου ζωής με δεδομένα εισόδου και εξόδου για τις διεργασίες παραγωγής σκόνης ολιγοσακχαριτών από 1 kg αρχικού ΟΟΓ.	186
Πίνακας 6.6. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την παραγωγή και αξιοποίηση για τη συνολική ποσότητα ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) στην υφιστάμενη κατάσταση στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe...	187
Πίνακας 6.7. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την αξιοποίηση της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.	188
Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για τη συνολική αξιοποίηση του ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.	190
Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την αξιοποίηση της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα σκόνης ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.....	191
Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για τη συνολική αξιοποίηση του ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.....	193
Πίνακας 6.11. Ποσοστά αλλαγών των περιβαλλοντικών αποτυπωμάτων των μεθόδων αξιοποίησης ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (Future 1) και σκόνης ολιγοσακχαριτών (Future 2) σε σχέση με τη συμβατική [(ΠΑ καινοτ- ΠΑ συμβ)/ ΠΑ συμβ] στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.	195
Πίνακας 6.12. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες ($yGOS_{max}$), χρόνος ενζυμικής αντίδρασης για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ($tGOS_{max}$) και βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης κατά τον χρόνο	

επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS (*hlac*) για όλα τα συστήματα παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαρίτων από τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης που μελετήθηκαν.....202

Πίνακας 6.13: Θερμοκρασία υάλωδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για λακτόζη-5% w/w γαλακτικό οξύ.....224

Πίνακας 6.14: Θερμοκρασία υάλωδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για για λακτόζη-10% w/w γαλακτικό οξύ (Τ_{αποθήκευσης} = 20°C και 30°C).....224

Πίνακας 6.15: Θερμοκρασία υάλωδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για για λακτόζη-10% w/w πρωτεΐνες ορού (Τ_{αποθήκευσης} = 20°C και 30°C).
.....240

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 6.1. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (7,2) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*..... 125

Σχήμα 6.2. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (4,5) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*..... 128

Σχήμα 6.3. Επίδραση (Α) της τιμής του pH στη βέλτιστη θερμοκρασία (50 °C), (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (4,0) και (Γ) της θερμοκρασίας επώασης για 24 h στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*..... 130

Σχήμα 6.4. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (5,5) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*..... 132

Σχήμα 6.5. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (yGOS) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % wv, (Β) 10 % wv, (Γ) 14 % wv και (Δ) 18 % wv..... 138

Σχήμα 6.6. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (yGOS) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % wv, (Β) 10 % wv, (Γ) 15 % wv και (Δ) 20 % wv. 143

Σχήμα 6.7. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (yGOS) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % wv, (Β) 10 % wv, (Γ) 15 % wv και (Δ) 20 % wv. 149

Σχήμα 6.8. Χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα HPAEC-PAD των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των β-γαλακτοζιδασών από τους μικροοργανισμούς (Α) <i>Kluyveromyces lactis</i> (αραίωση δείγματος 1:200) και (Β) <i>Aspergillus oryzae</i> (αραίωση δείγματος 1:1000) και (Γ) <i>Thermothielavioides terrestris</i> (αραίωση δείγματος 1:1000) στον όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι κορυφές της αλλολακτόζης και της 6'-Ο-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης ταυτοποιήθηκαν με βάση την μελέτη από τους Urrutia et al. (2013) που ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία για τον διαχωρισμό των γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	156
Σχήμα 6.9. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα εργαστηριακής κλίμακας.....	157
Σχήμα 6.10. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα πιλοτικής κλίμακας.....	157
Σχήμα 6.11. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (Α) και της απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Β) με τον χρόνο υπο την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A.oryzae</i> σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L.....	158
Σχήμα 6.12. Μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης (Α) και της γλυκόζης (Β) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον <i>A.oryzae</i> σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L.....	158
Σχήμα 6.10. Διάγραμμα ροής της διεργασίας παραγωγής σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.....	179
Σχήμα 6.11. Ροές GABI της διεργασίας παραγωγής σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.....	179
Σχήμα 6.12. Διάγραμμα ροής της διεργασίας παραγωγής σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.....	180
Σχήμα 6.13. Ροές GABI της διεργασίας παραγωγής σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.....	181
Σχήμα 6.14. Γενικό διάγραμμα ροής των παραγωγικών διεργασιών μιας γαλακτοβιομηχανίας.....	183
Σχήμα 6.15. Ροές GABI της παραγωγής ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας..	183
Σχήμα 6.16. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την παραγωγή και αξιοποίηση για τη συνολική ποσότητα ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) στην κατηγορία των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής (εκφρασμένες σε kg ισοδύναμου διοξειδίου του άνθρακα — kg ισοδύναμου CO ₂) (α) συμπεριλαμβανομένης και (β) χωρίς την παραγωγή γάλακτος.....	187

Σχήμα 6.17. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (yGOS) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (hlac) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 5,1 % wv, (Β) 10 % wv και (Γ) 15 % wv..... 199

Σχήμα 6.18. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (yGOS) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (hlac) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 5,1 % wv, (Β) 10 % wv και (Γ) 15 % wv.202

Σχήμα 6.19. Χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα ΗΡΑΕC-PAD των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των β-γαλακτοζιδασών από τους μικροοργανισμούς (Α) *Kluyveromyces lactis* (αραίωση δείγματος 1:800) και (Β) *Aspergillus oryzae* (αραίωση δείγματος 1:200) στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι κορυφές της αλλολακτόζης και της 6'-Ο-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης ταυτοποιήθηκαν με βάση την μελέτη από τους Urrutia et al. (2013) που ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία για τον διαχωρισμό των γαλακτοολιγοσακχαριτών.....205

Σχήμα 6.20. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπύλων ρόφησης, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.....207

Σχήμα 6.21. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.208

Σχήμα 6.22. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.208

Σχήμα 6.23. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.209

Σχήμα 6.24. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.209

Σχήμα 6.25. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.210

Σχήμα 6.26. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.	211
Σχήμα 6.27. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.	211
Σχήμα 6.28. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.	212
Σχήμα 6.29. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.	212
Σχήμα 6.30. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.	213
Σχήμα 6.31. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.	213
Σχήμα 6.32. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.	214
Σχήμα 6.33. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.	214
Σχήμα 6.34. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.	215
Σχήμα 6.35. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.	216
Σχήμα 6.36. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.	216

Σχήμα 6.37. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.	217
Σχήμα 6.38. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.	217
Σχήμα 6.39: Θερμογράφημα για λακτόζη- 5% w/w γαλακτικό οξύ (0 d αποθήκευσης).....	218
Σχήμα 6.40: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ (0 d αποθήκευσης).....	219
Σχήμα 6.41: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).....	220
Σχήμα 6.42: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).....	221
Σχήμα 6.43: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).....	221
Σχήμα 6.44: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).....	222
Σχήμα 6.45: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).....	222
Σχήμα 6.46: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).....	223
Σχήμα 6.47: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος.....	224
Σχήμα 6.48: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου (Ταποθήκευσης = 20°C).....	225
Σχήμα 6.49: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου (Ταποθήκευσης = 30°C).....	225
Σχήμα 6.50. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.	226

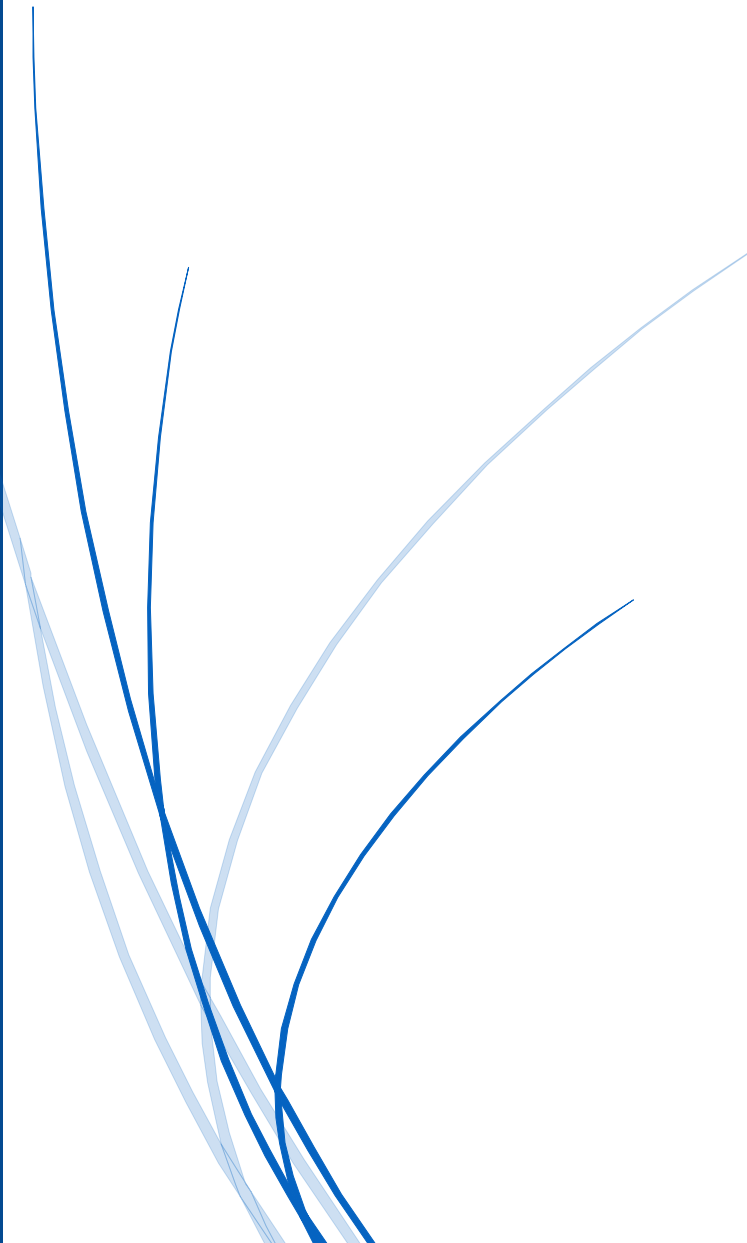
Σχήμα 6.51. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.	227
Σχήμα 6.52. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.	227
Σχήμα 6.53. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.	228
Σχήμα 6.54. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.	228
Σχήμα 6.55. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.	229
Σχήμα 6.56. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.	229
Σχήμα 6.57. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.	230
Σχήμα 6.58. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.	230
Σχήμα 6.59. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.	231
Σχήμα 6.60. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.	232
Σχήμα 6.61. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.	232

Σχήμα 6.62. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.	233
Σχήμα 6.63. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.	233
Σχήμα 6.64. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.	234
Σχήμα 6.65: Θερμογράφημα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού (0 d αποθήκευσης).....	235
Σχήμα 6.66: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 20^{\circ}\text{C}$).....	236
Σχήμα 6.67: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 20^{\circ}\text{C}$).....	236
Σχήμα 6.68: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,54 (1, 2 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 20^{\circ}\text{C}$).....	237
Σχήμα 6.69: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,23 (1, 3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).....	238
Σχήμα 6.70: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).....	239
Σχήμα 6.71: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).....	239
Σχήμα 6.72: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου ($T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).....	240
Σχήμα 6.73: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης- πρωτεΐνες ορού συναρτήσει του χρόνου ($T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).....	241



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Τα παραπροϊόντα
της γαλακτοβιομηχανίας



1. Τα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας

1.1. Εισαγωγή

Το υγρό κλάσμα του γάλακτος που απομένει μετά την πήξη των καζεϊνών και τη στράγγιση του σχηματιζόμενου πήγματος ονομάζεται «ορός» (de Wit, 2001). Ο ορός αντιπροσωπεύει περίπου το 85-95 % του όγκου του γάλακτος και περιέχει περίπου το 55 % των θρεπτικών συστατικών του, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, της λακτόζης, των διαλυτών αλάτων και των σφαιρικών πρωτεϊνών (González Siso, 1996; Guimarães et al., 2010). Ανάλογα με το τελικό παραγόμενο προϊόν και την παραγωγική διαδικασία που ακολουθείται διακρίνονται διάφοροι τύποι ορού (Nishanthi et al., 2017). Τις δύο κύριες κατηγορίες ορού, ωστόσο, αποτελούν ο «όξιнос ορός» και ο «γλυκός ορός» ή «τυρόγαλα». Ο όξιнос ορός προέρχεται από την όξινη καταβύθιση των καζεϊνών κατά την παραγωγική διαδικασία του στραγγιστού γιαουρτιού, το οποίο είναι γνωστό στην παγκόσμια βιβλιογραφία ως ελληνικού τύπου γιαούρτι (Greek style yoghurt), καθώς και ορισμένων φρέσκων τυριών, όπως τα τυριά Cottage και Ricotta (Chandrapala et al., 2015; Jelen, 2011; Nishanthi et al., 2017). Η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει είτε τη δράση θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων μέσω ζύμωσης, είτε την προσθήκη οργανικών οξέων, όπως το κιτρικό, το οξικό, ή το γαλακτικό οξύ, ή ανόργανων οξέων, όπως το υδροχλωρικό και το θειικό οξύ (Ryan & Walsh, 2016). Από την άλλη, ο γλυκός ορός προέρχεται από την παραγωγική διαδικασία σκληρών τυριών με χρήση πητιάς, ενός ενζυμικού μείγματος που περιέχει χυμοσίνη και πεψίνη ή άλλα ένζυμα που προκαλούν πήξη των καζεϊνών του γάλακτος. Με τον όρο «αλμυρός ορός» χαρακτηρίζεται ένα δευτερεύον παραπροϊόν που αποβάλλεται κατά την πήξη ορισμένων τυριών που στην παραγωγική τους διαδικασία περιλαμβάνεται το στάδιο του αλατισμού, όπως στα τυριά Cheddar και Colby (Chandrapala et al., 2015; Jelen, 2011; Nishanthi et al., 2017).

1.2. Όξιнос ορός

1.2.1. Παραγωγή

Η ποσότητα όξινου ορού που παράγεται τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί πολύ, λόγω της αύξησης της παραγωγής του στραγγιστού γιαουρτιού. Από το 2009 η ζήτηση στραγγιστού γιαουρτιού στις ΗΠΑ αυξήθηκε, λόγω της αύξησης των καταναλωτών που αναζητούν υγιεινά προϊόντα τροφίμων με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και χαμηλά

λιπαρά που μπορούν να καταναλωθούν και εκτός σπιτιού . Το στραγγιστό γιαούρτι αποτελεί πάνω από το ήμισυ της αγοράς γιαουρτιού των ΗΠΑ και ήταν ο πλέον δημοφιλής τύπος γιαουρτιού το 2019 (Rocha-Mendoza et al., 2021).

Το στραγγιστό γιαούρτι παράγεται σύμφωνα με την παραγωγική διαδικασία που παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής της Εικόνα 1.1 και περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω. Το γάλα αναμειγνύεται με τα απαραίτητα συστατικά για την τυποποίησή του, παστεριώνεται, ομογενοποιείται και ψύχεται στη θερμοκρασία επώασης. Κατόπιν, ακολουθεί ο εμβολιασμός του με την οξυγαλακτική καλλιέργεια. Η ζύμωση πραγματοποιείται εντός δεξαμενής, η οποία διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία κατά την επώαση. Στην συνέχεια, όταν επιτευχθεί η επιθυμητή οξύτητα, διαταράσσεται το πήγμα με αναδευτήρα και οδηγείται προς ψύξη στους 20 °C. Μετά το πέρας της ζύμωσης απομακρύνεται ο ορός. Ο πιο παραδοσιακός τρόπος απομάκρυνσης του ορού γάλακτος είναι με στράγγιση του γιαουρτιού σε υφασμάτινα φίλτρα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες στην παραγωγική διαδικασία και δεν είναι αποδοτική, καθώς υπολείμματα γιαουρτιού παραμένουν στα υφάσματα. Για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί άλλες μέθοδοι βιομηχανικής στράγγισης του γιαουρτιού οι οποίες αναφέρονται εν συντομία παρακάτω.

- Υφασμάτινοι σάκοι ή σύστημα Berge

Το αναμειγμένο γιαούρτι που έχει ψυχθεί στους 20 °C, μεταφέρεται σε υφασμάτινους σάκους των 25 Kg οι οποίοι στοιβάζονται ο ένας πάνω στον άλλον, ασκώντας κάθετη πίεση. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε έναν ψυχόμενο θάλαμο. Η πίεση ασκείται με σκοπό να αποβληθεί ο ορός γάλακτος σε σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 6 h). Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθούν οριζόντια υφασμάτινα φίλτρα τα οποία αναταράσσονται ελαφρά και στα οποία μπορεί να ασκείται πλευρικά μία μικρή πίεση. Η τελευταία μέθοδος ονομάζεται σύστημα Berge και εφαρμόστηκε αρχικά στην Γαλλία το 1960.

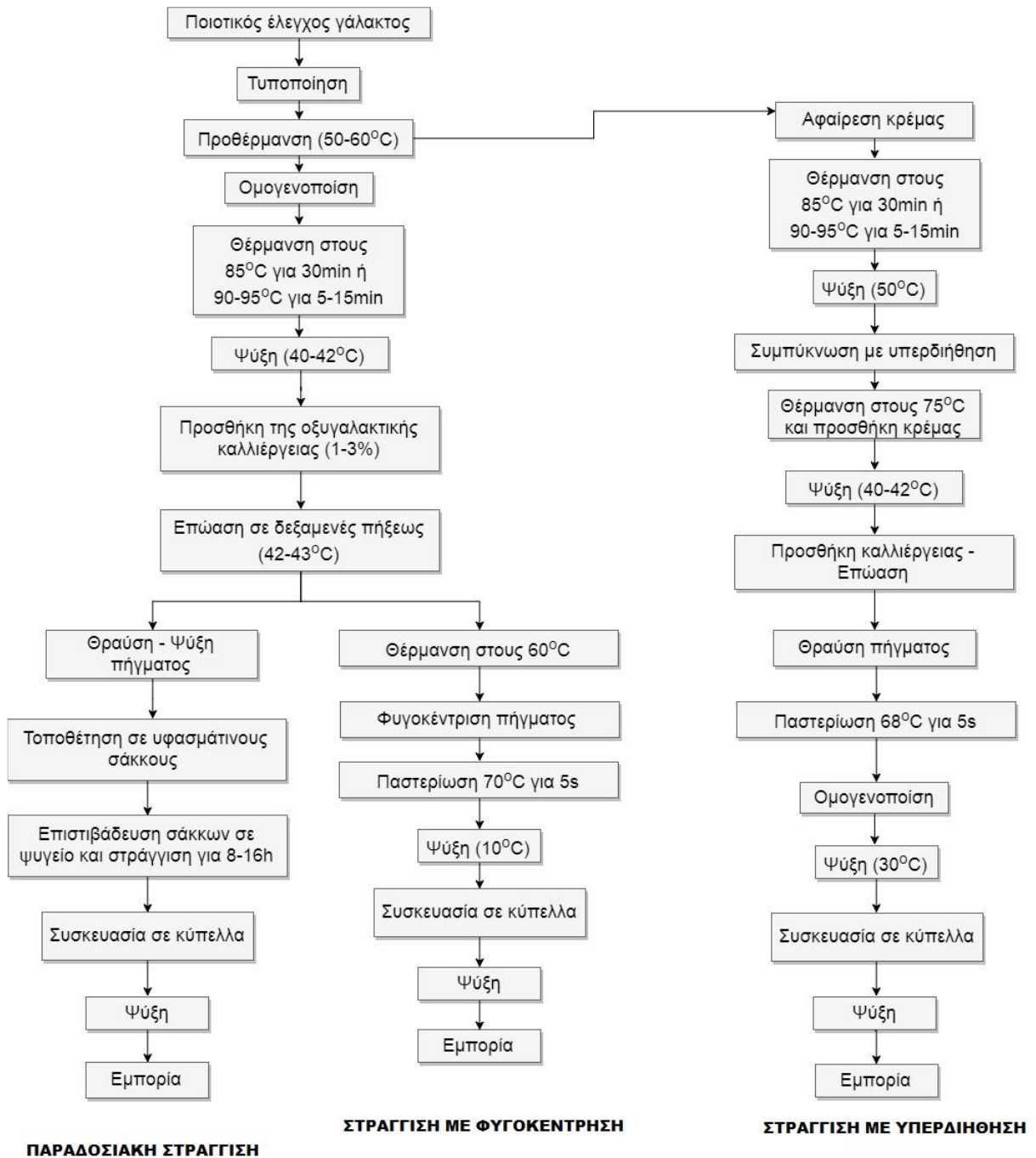
- Μηχανικός διαχωριστής με φυγοκέντριση

Μετά το πέρας της ζύμωσης του γάλακτος και πριν το στάδιο του διαχωρισμού πραγματοποιείται αερισμός για 15-20 min, ώστε να βοηθήσει στον διαχωρισμό του ορού. Στη συνέχεια, το γιαούρτι οδηγείται σε φυγοκέντρους για την αποβολή του ορού.

- Υπερδιήθηση

Σε αυτήν την διαδικασία, ο ορός διαχωρίζεται από το γιαούρτι με ειδικά σχεδιασμένα φίλτρα. Συγκεκριμένα, αμέσως μετά τη ζύμωση, το γιαούρτι

θερμαίνεται στους 50 °C και διαβιβάζεται από συσκευή υπερδιήθησης. Η χρήση των φίλτρων υπερδιήθησης συμβάλλει στη διατήρηση περισσότερων πρωτεϊνών στο τελικό προϊόν, κάτι το οποίο δεν μπορεί να επιτύχει ο φυγοκεντρικός διαχωριστής (Bylund, 1995; Tamime & Robinson, 2000).



Εικόνα 1.1. Διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας στραγγιστού γιαουρτιού με τις διάφορες μεθόδους στράγγισης (Bylund, 1995; Tamime & Robinson, 2000).

Κατά την παραγωγή του στραγγιστού γιαουρτιού, για κάθε 100 Kg γάλακτος που χρησιμοποιούνται, τα 33 Kg καταλήγουν σαν τελικό προϊόν, ενώ τα 67 Kg αποβάλλονται ως όξινος ορός. Το 2015 παρήχθησαν 771.000 tn στραγγιστού γιαουρτιού, με συνακόλουθη αποβολή περίπου 1.500.000 tn όξινου ορού (Erickson, 2017).

Επιπροσθέτως, η πρόσφατη αναζωπύρωση της παραγωγής τυριού cottage από τις γαλακτοβιομηχανίες της Βορείου Αμερικής προβλέπεται ότι θα ενταθεί, καθώς η αγορά εύκολων και γρήγορων σνακ με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και καινοτόμων γαλακτοκομικών προϊόντων συνεχίζει να αναπτύσσεται. Η αυξημένη ζήτηση τέτοιων προϊόντων οδηγεί στην παραγωγή όξινου ορού ο οποίος θα πρέπει είτε να απορριφθεί, είτε να επαναχρησιμοποιηθεί (Rocha-Mendoza et al., 2021).

1.2.2.Ιδιότητες

Με τη βοήθεια της σύγχρονης τεχνολογίας, έχει επέλθει μία ολοένα αυξανόμενη τάση συνειδητοποίησης ότι ο όξινος ορός είναι ένα χρήσιμο παράπλευρο ρεύμα της γαλακτοβιομηχανίας, με λειτουργικές πρωτεΐνες και πεπτίδια, λακτόζη, λιπίδια, βιταμίνες και μέταλλα. Η σύσταση του όξινου ορού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η πηγή του γάλακτος, ο τύπος του τυριού ή του γιαουρτιού που παράγεται, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος, η αποθήκευση του γάλακτος μετά την άμελη κ.ά.. Ακόμα και ο όξινος ορός που συλλέγεται από την ίδια πηγή και υπό τις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας μπορεί να έχει διαφορετικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο από εποχή σε εποχή. Παρόμοια, ο όξινος ορός από στραγγιστό γιαούρτι και από τυρί cottage διαφέρουν στη σύσταση. Γενικά, ο όξινος ορός στραγγιστού γιαουρτιού έχει υψηλότερη συγκέντρωση τέφρας, ολικών στερεών, λακτόζης και γαλακτικού οξέος, συνεπώς έχει υψηλότερη οξύτητα, σε σύγκριση με τον όξινο ορό από τυρί cottage, ενώ ο όξινος ορός από τυρί cottage έχει, συνήθως, υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Η συγκέντρωση λιπαρών είναι γενικά ίδια και στους δύο τύπους όξινου ορού, καθώς και οι δύο παράγονται από αποβουτυρωμένο γάλα. Λόγω των ειδικών ιδιοτήτων του, ο όξινος ορός έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αφεψημάτων, όπως αφεψήματα ξιδιού, με αυξημένα οφέλη για την υγεία. Ενώ ο όξινος ορός από τυρί cottage έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιολειτουργικών αφεψημάτων και βιοσυσκευασιών, ο όξινος ορός γιαουρτιού έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γλυκίνης, βεταΐνης και τρεχαλόζης για εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων, γεωργικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Rocha-Mendoza et al., 2021).

Κύριο συστατικό του όξινου ορού γιαουρτιού, εκτός από το νερό που αποτελεί περίπου το 93 % (Jelen, 2011), αποτελεί η λακτόζη. Η περιεκτικότητα του όξινου ορού γιαουρτιού σε λακτόζη κυμαίνεται μεταξύ 3,33 και 3,50 % w/v. Εκτός από λακτόζη, ο όξινος ορός γιαουρτιού περιέχει και γαλακτόζη σε ποσοστό 0,56 – 0,65 % w/v, η περιεκτικότητα σε γλυκόζη δεν ανιχνεύεται (< 0,1 % w/v) και η συνολική περιεκτικότητά του σε σάκχαρα κυμαίνεται μεταξύ 3,92 και 4,11 % w/v. Επιπλέον, ο όξινος ορός περιέχει πρωτεΐνες ορού σε μικρές συγκεντρώσεις, με περιεκτικότητα 3,71 – 3,71 mg/g, ενώ δεν ανιχνεύονται καζεΐνες από το γάλα που παράγεται το στραγγιστό γιαούρτι. Ο όξινος ορός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, μεταξύ 0,42 και 0,53 % w/v (τιτλοδοτούμενη οξύτητα εκφρασμένη ως γαλακτικό οξύ), με αποτέλεσμα τη χαμηλή τιμή του pH του, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 4,21 και 4,48. Άλλα δευτερεύοντα συστατικά του όξινου ορού γιαουρτιού αποτελούν διάφορα μέταλλα (τέφρα), με περιεκτικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 0,64 και 0,75 % w/w (Menchik et al., 2019). Η περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λιπαρά εξαρτάται από τα λιπαρά του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του στραγγιστού γιαουρτιού. Για παράδειγμα, η χρήση άπαχου γάλακτος οδηγεί σε μηδενική περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λιπαρά, που είναι και η συνηθέστερη περίπτωση σε έρευνες όπως η παρούσα, καθώς η απουσία λιπαρών διευκολύνει τη μελέτη των διεργασιών και την ανάλυση των δειγμάτων. Στον

Πίνακας 1.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα συστατικά του όξινου ορού γιαουρτιού, σύμφωνα με την μελέτη των Menchik et al. (2019).

Πίνακας 1.1. Χημική ανάλυση όξινου ορού γιαουρτιού. ΔΑ: δεν ανιχνεύθηκε. (Menchik et al., 2019)

Ανάλυση (μονάδες μέτρησης)	Τιμή	Ανάλυση (μονάδες μέτρησης)	Τιμή
Ολικά στερεά (% w/w)	6,1 ± 0,1	Ισολευκίνη (%)	0,008 ± 0,002
Τέφρα (% w/w)	0,69 ± 0,04	Λευκίνη (%)	0,012 ± 0,004
Ολικό άζωτο (mg/Kg)	422 ± 107	Τυροσίνη (%)	0,004 ± 0,002
Άζωτο αμμωνίας (mg/Kg)	79 ± 8	Φαινυλαλανίνη (%)	0,006 ± 0,002
Άζωτο ουρίας (mg/Kg)	< 5	Λυσίνη (%)	0,012 ± 0,004
Νιτρικό άζωτο (mg/Kg)	ΔΑ	Ιστιδίνη (%)	0,005 ± 0,001
Μη πρωτεϊνικό άζωτο (% ολικού αζώτου)	0,17 ± 0,01	Αργινίνη (%)	0,004 ± 0,001
Ολικές πρωτεΐνες (υπολογισμένες) (mg/g)	2,69 ± 0,68	Ολικά υδρολυμένα αμινοξέα (%)	0,128 ± 0,037
α-λακταλβουμίνη (mg/g)	0,47 ± 0,23	Κυστεΐνη (%)	0,003 ± 0,001
β-γαλακτογλοβουλίνη (mg/g)	0,10 ± 0,08	Μεθειονίνη (%)	0,002 ± 0,001
Ολική καζεΐνη (mg/g)	ΔΑ	Ταυρίνη (%)	ΔΑ
Άλλα πεπτίδια (mg/g)	0,24 ± 0,02	Ασπαραγίνη	ΔΑ
Ολικές πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (mg/g)	2,04 ± 0,57	Γλουταμίνη (%)	ΔΑ
Αμινοξέα		Κιτρουλίνη (%)	ΔΑ
Υδροξυπρωλίνη (%)	δεν ανιχνεύθηκε	γ-αμινοβουτυρικό οξύ (%)	0,004 ± 0,001
Ασπαρτικό οξύ (%)	0,015 ± 0,005	Αιθανολαμίνη (%)	0,001 ± 0,000
Θρεονίνη (%)	0,007 ± 0,001	Ορνιθίνη (%)	ΔΑ
Σερίνη (%)	0,007 ± 0,001	Ολικά ελεύθερα αμινοξέα (%)	0,018 ± 0,006
Γλουταμινικό οξύ (%)	0,026 ± 0,006	Τρυπτοφάνη (%)	< 0,01
Προλίνη (%)	0,010 ± 0,02	Μέταλλα	
Γλυκίνη (%)	0,003 ± 0,001	Ασβέστιο (mg/100 g)	123 ± 3
Αλανίνη (%)	0,006 ± 0,001	Σίδηρος (mg/100 g)	< 1,00
Βαλίνη (%)	0,007 ± 0,002	Νάτριο (mg/100 g)	39,0 ± 1,5

Φωσφόρος (mg/100 g)	68,0 ± 1,1	Σακχαρόζη (%)	< 0,1
Χαλκός (mg/100 g)	< 1,00	Μαλτόζη (%)	< 0,1
Κάλιο (mg/100 g)	161 ± 5	Ολικές διαιτητικές ίνες (%)	0,4 ± 0,1
Μαγνήσιο (mg/100 g)	10,6 ± 0,2	Μη διαλυτές διαιτητικές ίνες (%)	ΔΑ
Μαγγάνιο (mg/100 g)	< 1,00	Διαλυτές διαιτητικές ίνες (%)	0,4 ± 0,1
Ψευδάργυρος (mg/100 g)	< 1,00	Ολικά λιπαρά (χρωματογραφική ανάλυση) (%)	ΔΑ
Βιταμίνες		Κορεσμένα λιπαρά (%)	ΔΑ
Νιασίνη (mg/100 g)	0,12 ± 0,01	Μονοακόρεστα λιπαρά (%)	ΔΑ
Βιταμίνη B1 (θειαμίνη-HCl US) (mg/100 g)	0,08 ± 0,03	cis-cis πολυακόρεστα λιπαρά (%)	ΔΑ
Βιταμίνη B1 (θειαμίνη EU) (mg/100 g)	0,077 ± 0,004	trans λιπαρά	ΔΑ
Βιταμίνη B2 (ριβοφλαβίνη) (mg/100 g)	0,09 ± 0,04	Ολικά λιπαρά (σταθμική ανάλυση)	ΔΑ
Βιταμίνη B6 (mg/100 g)	< 0,02	Τιτλοδοτούμενη οξύτητα (γαλακτικό οξύ) (%)	0,46 ± 0,04
Παντοθενικό οξύ (mg/100 g)	0,364 ± 0,135	pH (-)	4,34 ± 0,11
Βιταμίνη C (mg/100 g)	< 0,5	Οργανικά οξέα	
Βιταμίνη B12 (μg/100 g)	< 0,10	Οξαλικό οξύ (%)	< 0,01
Φολικό οξύ (μg/100 g)	< 5,00	Κιτρικό οξύ (%)	0,18 ± 0,001
Βιταμίνη A (IU/100 g)	< 50	Ταρταρικό οξύ (%)	< 0,01
Βιταμίνη D (IU/100 g)	< 40	Μηλικό οξύ (%)	< 0,01
Ολικό χλώριο (%)	0,090 ± 0,011	Ηλεκτρικό οξύ (%)	< 0,01
Φωσφορικά ανιόντα (mg/L)	544 ± 20	Γαλακτικό οξύ (%)	0,65 ± 0,01
Ολικά σάκχαρα (%)	4,00 ± 0,06	Γλουταρικό οξύ (%)	0,06 ± 0,00
Λακτόζη (%)	3,40 ± 0,06	Οξικό οξύ (%)	< 0,01
Γαλακτόζη (%)	0,60 ± 0,03	Φουμαρικό οξύ (%)	< 0,01
Φρουκτόζη	< 0,1	Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (mg/L)	57.300 ± 4.900
Γλυκόζη (%)	< 0,1	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (mg/L)	47.100 ± 2.300

1.2.3. Υφιστάμενες μέθοδοι διαχείρισης και αξιοποίησης του όξινου ορού

1.2.3.1. Χρήση ως εδαφοβελτιωτικό

Η πιο κοινή εφαρμογή του όξινου ορού εντοπίζεται στη γεωργία. Ο όξινος ορός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν λίπασμα και μπορεί είτε να ενσωματωθεί απευθείας στο έδαφος, είτε να αναμιχθεί με κοπριά πριν την ενσωμάτωσή του. Οι εδαφικές συνθήκες, μαζί με το θρεπτικό περιεχόμενο, τον ρυθμό εφαρμογής και την τιμή του pH του όξινου ορού θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης του όξινου ορού στο έδαφος (Ketterings et al., 2017). Ωστόσο, η αξιοποίηση του όξινου ορού ως εδαφοβελτιωτικό πρέπει να είναι περιορισμένη, λόγω των έντονων οσμών που αναδίδονται (Ketterings et al., 2017) και των πιθανών κινδύνων διαφυγής του όξινου ορού στους υδάτινους ορίζοντες που μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα ευτροφισμού, λόγω του υψηλού βιολογικού φορτίου του, καθώς περιέχει 47.100 ± 2.300 mg/L βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Menchik et al., 2019).

1.2.3.2. Χρήση ως ζωοτροφή

Άλλη μία κοινή εφαρμογή του όξινου ορού αποτελεί η χρήση του ως ζωοτροφή. Ο όξινος ορός μπορεί να αναμειχθεί με φρέσκο χορτάρι και να ταϊστεί στα ζώα. Ωστόσο, δεν μπορεί να προστεθεί σε μεγάλες ποσότητες παρά μόνο για τη διαβροχή της ζωοτροφής, λόγω της πιθανής τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσουν τα άλατα στα ζώα, καθώς και την υποβάθμιση του κτηνοτροφικού εξοπλισμού (Rocha-Mendoza et al., 2021).

1.2.3.3. Απομόνωση συστατικών

Περιβαλλοντικά ευαίσθητοποιημένες γαλακτοβιομηχανίες εργάζονται για την ανάπτυξη μιας βιώσιμης λύσης για τον όξινο ορό. Αυτές οι προσπάθειες εκτείνονται από την απομόνωση πολύτιμων συστατικών από τον όξινο ορό έως τη διήθησή του για τη μείωση του κόστους διαχείρισης (Smithers, 2015). Οι εταιρείες Chobani και Danone έχουν δεσμευτεί για την εύρεση καλύτερων πρακτικών διαχείρισης του όξινου ορού. Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι μέθοδοι διαχείρισης του παραγόμενου όξινου ορού από διάφορες γαλακτοβιομηχανίες. Οι βιομηχανίες προσπαθούν να αξιοποιήσουν τον όξινο ορό στις εγκαταστάσεις τους, παρά να τον στείλουν στις φάρμες. Για παράδειγμα, το 2014 η εταιρεία Chobani εγκατέστησε μία επιτόπια μονάδα αντίστροφης ώσμωσης για την ανάκτηση νερού από τον όξινο ορό και τελικά μείωσε το κόστος μεταφοράς του συμπυκνωμένου όξινου ορού. Το ανακτώμενο νερό ακολούθως περνούσε από

μεθόδους επεξεργασίας και επανεχρησιμοποιείται. Σύμφωνα με την αναφορά βιωσιμότητας της εταιρείας Chobani για το 2019, γίνεται ανακύκλωση του 100 % του όξινου ορού που παράγεται από την εταιρεία. Η εταιρεία General Mills εγκατέστησε μία επιτόπια μονάδα αναερόβιας χώνευσης για τη μετατροπή του όξινου ορού σε βιοαέριο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας (Rocha-Mendoza et al., 2021).

Πίνακας 1.2. Βιομηχανικές τάσεις εμπορικής αξιοποίησης του όξινου ορού.

Μέθοδος επεξεργασίας του όξινου ορού	Πλεονεκτήματα	Εταιρεία εφαρμογής
Αντίστροφη ώσμωση	Οικονομικότερη μεταφορά του συμπυκνωμένου όξινου ορού, επαναχρησιμοποίηση του νερού	Chobani (Norwich, NY)
Τυποποίηση του όξινου ορού με σταθερή συγκέντρωση λακτόζης	Σταθερή πηγή απομόνωσης λακτόζης	Danone (Paris, France)
Αναερόβια χώνευση	Παραγωγή ενέργειας	General Mills (Minneapolis, MN)
Εξουδετέρωση	Επέκταση της χρήσης του όξινου ορού σε προϊόντα τροφίμων	General Mills (Minneapolis, MN)
Αξιοποίηση πρωτεϊνικών διαλυμάτων για την μείωση της παραγωγής όξινου ορού	Παραγωγή λιγότερης ποσότητας όξινου ορού, αύξηση της απόδοσης παραγωγής	Arla Foods Ingredients (Viby, Denmark)
Υπερδιήθηση για την μείωση της παραγωγής όξινου ορού	Παραγωγή λιγότερης ποσότητας όξινου ορού, αύξηση της απόδοσης παραγωγής	Ultima Foods (Quebec, Canada)

1.2.3.4. Εφαρμογές σε αφεψήματα ζυμωμένου γάλακτος

Λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας, ο όξινος ορός δύναται να χρησιμοποιηθεί ως κύριο συστατικό σε προϊόντα ζυμωμένου γάλακτος. Στοχεύοντας στην παραγωγή αφεψημάτων ζυμωμένου γάλακτος παρόμοια με το πόσιμο γιαούρτι, είναι τεχνολογικά βιώσιμη η ανάμειξη του όξινου ορού με γάλα. Ωστόσο, η επίτευξη των απαιτήσεων των καταναλωτών σε σχέση με το άρωμα και τη θρεπτικότητα αποτελεί έναν ακόμα κρίσιμο παράγοντα στη χρησιμοποίηση του όξινου ορού για την παραγωγή αφεψημάτων ζυμωμένου γάλακτος. Η ξινή και αλμυρή γεύση του όξινου ορού αποτελεί την πρώτη πρόκληση στην ενσωμάτωσή του σε προϊόντα τροφίμων. Επιπλέον, ο όξινος ορός δεν είναι ένα τυποποιημένο προϊόν και οι μεταβολές στη σύσταση επηρεάζουν με τη σειρά τους την οσμή, το άρωμα και τη μετάγευση των τελικών προϊόντων. Έτσι, αν το

επιδιωκόμενο άρωμα του όξινου ορού μπορεί να επικαλυφθεί με την προσθήκη άλλων συστατικών, όπως αρώματα φρούτων και γλυκαντικά, η χρήση του όξινου ορού σε εφαρμογές τροφίμων μπορεί να αυξηθεί (Rocha-Mendoza et al., 2021). Οι Lievore et al. (2015) χρησιμοποίησαν όξινο ορό από την παραγωγή τυριού τύπου Petit Suisse, προκειμένου να αντικαταστήσουν όλο το νερό στην αρχική συνταγή ενός εμπορικού βραζιλιάνικου αφεψήματος ζυμωμένου γάλακτος. Στη συνταγή τους προσέθεσαν σιρόπι γλυκόζης, άρωμα κίτρου και χυμό πορτοκαλιού για την επικάλυψη του αρώματος που προκύπτει κατά τη ζύμωση του βασικού προϊόντος. Η ενσωμάτωση αυτών των αρωματικών συστατικών προτάθηκε για την εξισορρόπηση των αρνητικών επιπτώσεων της προσθήκης του όξινου ορού και της μείωσης του χρόνου ζύμωσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Γενικά, όλα τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης ήταν θετικά και η εμπορική χρήση του όξινου ορού για την αντικατάσταση του νερού στην αρχική συνταγή θα μπορούσε να μειώσει την κατανάλωση νερού, να μειώσει τον χρόνο ζύμωσης και να οδηγήσει σε ένα πιο συνεκτικό και θρεπτικό προϊόν. Στον αντίποδα, η Villarreal (2017) δεν προσέθεσε κανένα αρωματικό συστατικό στο ζυμωμένο προϊόν του με όξινο ορό, αλλά χρησιμοποίησε ένα γιαούρτι με άρωμα μάνγκο ως βάση της ζύμωσης. Σε αυτή τη μελέτη, καμία σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύτηκε μεταξύ του δείγματος με προσθήκη ορού σε ποσοστό 45 % και αυτού με προσθήκη νερού στο ίδιο ποσοστό στη δοκιμή προτίμησης και συνολικής αρέσκειας. Ωστόσο, η προσθήκη αρωματικών συστατικών θα μπορούσε να επικαλύψει την ξινή και αλμυρή γεύση του όξινου ορού. Σε μίαν άλλη μελέτη χωρίς προσθήκη αρωματικών συστατικών, το άρωμα του προϊόντος τροποποιήθηκε από 2 καλλιέργειες εκκίνησης με *Lactobacillus acidophilus* LA-5 και *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι όλα τα δείγματα είχαν μία έντονη όξινη γεύση, αλλά ο *L. acidophilus* LA-5 είχε καλύτερη οργανοληπτική ποιότητα σε σύγκριση με το *B. animalis* Bb-12. Σε μία περίοδο αποθήκευσης 12 εβδομάδων παρατηρήθηκε υποβάθμιση της γεύσης και της οσμής σε όλα τα δείγματα (Skryplonek et al., 2019; Skryplonek & Jasińska, 2015). Γενικά, καμία από αυτές τις μελέτες δεν πραγματοποίησε άμεσες δοκιμές της επίδρασης των αρωματικών συστατικών στη συνολική αρέσκεια ως προς τα προϊόντα με προσθήκη όξινου ορού, αλλά η επίδραση των αρωματικών συστατικών και των καλλιεργειών εκκίνησης μπορεί να τροποποιηθεί και να μελετηθεί σε μελλοντικές μελέτες, προκειμένου να γίνουν τα αφεψήματα με όξινο ορό περισσότερο ελκυστικά (Rocha-Mendoza et al., 2021).

Οι αλλαγές στην υφή είναι άλλη μία πρόκληση η οποία θα πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν προστίθεται όξινο ορό στο μείγμα των ζυμούμενων προϊόντων γάλακτος με στόχο την επίτευξη παρόμοιων χαρακτηριστικών με αυτά του πρωτότυπου προϊόντος. Οι Lievore et al. (2015) βρήκαν ότι τα επίπεδα προτίμησης του ζυμωμένου γαλακτοκομικού προϊόντος με όξινο ορό από την παραγωγή τυριού τύπου Petit Suisse επηρεάστηκαν αρνητικά από το χαμηλό ιξώδες του προϊόντος. Γενικά, η αντικατάσταση του γάλακτος με όξινο ορό οδηγεί σε προϊόντα με χαμηλότερα ιξώδη. Οι Skryplonek & Jasińska (2015) συνδύασαν όξινο ορό από τυρί Twaróg και γάλα σε αναλογία 1:1 για την παραγωγή ενός ζυμωμένου γαλακτοκομικού προϊόντος παρόμοιου με το γιαούρτι. Ωστόσο, τα προϊόντα τους είχαν χαμηλή αξιολόγηση στην εμφάνιση λόγω του φαινομένου της συναίρεσης του ορού. Η συνεκτικότητα ενός προϊόντος ζυμωμένου γάλακτος εξαρτάται από τον σχηματισμό του καζεϊνικού πήγματος (Lievore et al., 2015). Επειδή ο όξινο ορός δεν περιέχει καθόλου καζεΐνη, η αντικατάσταση μέρους του γάλακτος με όξινο ορό μειώνει την αντοχή του πήγματος και το ιξώδες του προϊόντος (Skryplonek & Jasińska, 2015). Για την βελτίωση της υφής, οι Skryplonek et al. (2019) προσέθεσαν περισσότερα στερεά γάλακτος στα προϊόντα τους είτε αντικαθιστώντας το 25 % του γάλακτος με 25 % συμπυκνωμένο γάλα, είτε προσθέτοντας 5 % w/w σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος. Παρόλο που η συναίρεση του αρχικού προϊόντος μειώθηκε, παρόλα αυτά αυξήθηκε και πάλι πολύ κατά την αποθήκευση των δειγμάτων. Στη μελέτη της Villarreal (2017) προστέθηκε 0,4 % σταθεροποιητής, οδηγώντας σε προϊόντα με υψηλό ιξώδες και 100 % ικανότητα συγκράτησης νερού σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα. Επιπροσθέτως, από τη μελέτη φάνηκε ότι και η ομογενοποίηση μετά τη ζύμωση θα μπορούσε να βελτιώσει τη σταθερότητα του προϊόντος και να δώσει μία πιο κρεμμώδη υφή στο στόμα. Επίσης, οι Lievore et al. (2015) δημιούργησαν ένα αφέψημα στο οποίο ο όξινο ορός αντικατέστησε το νερό, οδηγώντας σε ένα πιο συνεκτικό προϊόν. Κατά την ανάπτυξη προϊόντων ζύμωσης γάλακτος με προσθήκη όξινου ορού, η προσθήκη ενός σταθεροποιητή, η διεργασία της ομογενοποίησης και ο τύπος του αφεψήματος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την αντιστάθμιση των αρνητικών επιπτώσεων που επέρχονται στην υφή του προϊόντος λόγω της προσθήκης του ορού (Rocha-Mendoza et al., 2021).

1.2.3.5. Χρήση σε υποστρώματα για καλλιέργεια μικροοργανισμών

Η χρήση όξινου ορού για καλλιέργεια μικροοργανισμών αποτελεί άλλη μία εναλλακτική, επειδή όχι μόνο μειώνει το βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο του όξινου

ορού κατά 90-95 %, αλλά επίσης οδηγεί στην παραγωγή υψηλής αξίας βιοδραστικών συστατικών για τις βιομηχανίες τροφίμων. Ο όξινο ορός έχει φιλτραριστεί και αποστειρωθεί για την καλλιέργεια διαφόρων στελεχών ζύμης. Η βιομάζα γαλακτικών βακτηρίων έχει, επίσης, πολυάριθμες εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων (Rocha-Mendoza et al., 2021). Επί του παρόντος, εμπορικά υποστρώματα καλλιέργειας, όπως το MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) και το M17, σχεδιάζονται για την καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων και συνήθως έχουν υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο με προσθήκη εκχυλίσματος μαγιάς ή πρωτεολυμάτων (Kirmaci et al., 2016). Ωστόσο, το υψηλό κόστος αυτών των υποστρωμάτων περιορίζει τη χρήση τους σε εξειδικευμένες εργαστηριακές συνθήκες και έχει οδηγήσει στη διερεύνηση της αριστοποίησης των υποστρωμάτων καλλιέργειας των γαλακτικών βακτηρίων. Ο ορός περιέχει λακτόζη, βιταμίνες και μέταλλα τα οποία μπορούν να βελτιώσουν τη φυσιολογική δραστηριότητα των καλλιεργούμενων κυττάρων, οπότε η χρήση όξινο ορού στην καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων αποτελεί άλλη μία εφαρμογή με υψηλή προστιθέμενη αξία. Μέχρι τώρα, σε λίγες δημοσιεύσεις έχει αναφερθεί η χρήση όξινο ορού για την προετοιμασία υποστρωμάτων καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων. Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε αποπρωτεϊνωμένος και φιλτραρισμένος γλυκός ορός με προσθήκη $MgSO_4$, $MnSO_4$ και διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος μαγιάς και χυμού τομάτας για την καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων (Benaissa et al., 2017). Ένα υπόστρωμα καλλιέργειας οξυγαλακτικών βακτηρίων με βάση τον όξινο ορό που περιείχε 30 % χυμό τομάτας και 1 % εκχύλισμα μαγιάς παρήγαγε συγκρίσιμη ποσότητα βιομάζας οξυγαλακτικών βακτηρίων με αυτή που παρήχθη χρησιμοποιώντας υπόστρωμα MRS (Elena Mondragón-Parada et al., 2006). Οι διαφορές στη σύσταση μεταξύ του όξινο ορού και του γλυκού ορού θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη, καθώς η παραγωγή βιομάζας γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιώντας όξινο ορό έχει, συνήθως, υψηλότερα επίπεδα οξύτητας και αλάτων και χαμηλότερες συγκεντρώσεις λακτόζης και πρωτεϊνών, σε σύγκριση με τον γλυκό ορό (Rocha-Mendoza et al., 2021).

1.2.3.6. Αξιοποίηση για παραγωγή βιοκαυσίμων

Άλλη μία σημαντική εφαρμογή του όξινο ορού αποτελεί η χρήση της λακτόζης ως υπόστρωμα για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων μέσω ζύμωσης. Από τη διεργασία της ζύμωσης, διάφορα βιοπροϊόντα μπορούν να παραληφθούν, όπως αιθανόλη, οργανικά οξέα, μεθάνιο, υδρογόνο, αμινοξέα και βιταμίνες, μεταξύ άλλων.

Κατά τη διεργασία αυτή, η λακτόζη καταναλώνεται απευθείας ως πηγή άνθρακα από μικροοργανισμούς οι οποίοι παράγουν τα υψηλής αξίας προϊόντα. Η παραγωγή αιθανόλης από όξινο ορό είναι οικονομικά ανταγωνιστική προς τις άλλες διεργασίες. Ωστόσο, για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων, ο όξινος ορός πρέπει να υποστεί προεπεξεργασία, χρησιμοποιώντας υπερδιήθηση ή αντίστροφη ώσμωση ή συνδυασμό αυτών των τεχνικών, για τη συμπύκνωση της λακτόζης (Rocha-Mendoza et al., 2021). Μικροοργανισμοί όπως ο *Kluyveromyces marxianus* και ο *Candida pseudotropicalis* έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον σκοπό (Das et al., 2016). Η ζύμη *K. marxianus* έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης μέσω αναερόβιας ζύμωσης του όξινου ορού: μετά από 13 h επώασης, το 97 % της θεωρητικώς αναμενόμενης ποσότητας παράχθηκε (Sansonetti et al., 2009). Υπό αναερόβιες συνθήκες, η επώαση του *K. marxianus* σε θερμοκρασίες μεταξύ 33 και 38 °C, τιμές pH μεταξύ 4,7 και 5,7 και συγκεντρώσεις λακτόζης μεταξύ 50 και 108 g/L οδηγεί στην παραγωγή αιθανόλης από όξινο ορό με απόδοση 90 % (Diniz et al., 2014). Ο όξινος ορός μπορεί, επίσης, να υποστεί αναερόβια χώνευση προς παραγωγή βιοαερίου (μεθάνιο), το οποίο μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας (Erickson, 2017).

1.3. Γλυκός ορός

1.3.1. Παραγωγή

Οι ποσότητες γλυκού ορού που αποβάλλονται σε ετήσια βάση κατά την τυροκόμηση σε παγκόσμιο επίπεδο είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από αυτές του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού. Σε αντίθεση με το στραγγιστό γιαούρτι, για κάθε 1 Kg σκληρού ή ημίσκληρου τυριού που παράγεται αποβάλλονται 9 Kg τυρογάλακτος ως παραπροϊόν (Božanić et al., 2014). Η παγκόσμια παραγωγή τυροκομικών προϊόντων ανήλθε το έτος 2022 σε 20.376.000 tn, με ισοδύναμη αποβολή 183.400.000 tn γλυκού ορού, ενώ η παγκόσμια αγορά τυροκομικών προϊόντων αναμένεται να παρουσιάσει αύξηση της τάξεως του 9,4 % μέσα στην επόμενη δεκαετία (*OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*, 2023).

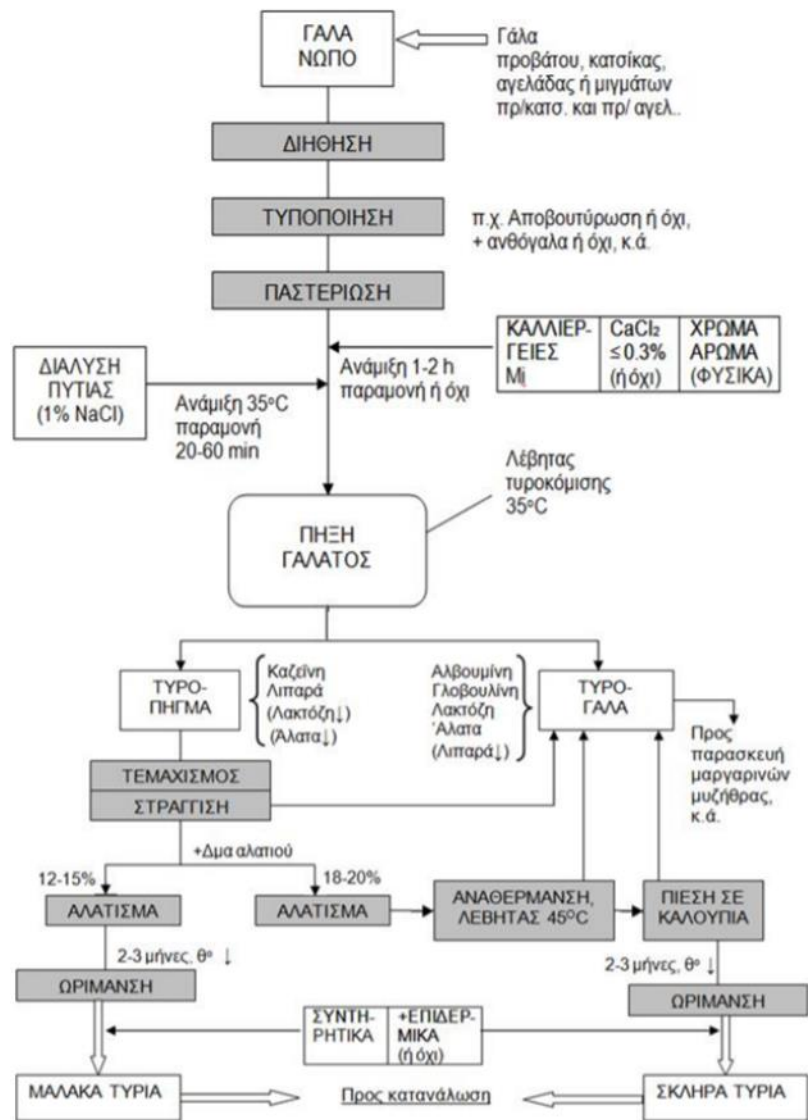
Για την παραγωγή των περισσότερων ειδών τυριού ακολουθούνται τα ακόλουθα στάδια στις τυροκομικές μονάδες. Πρώτο στάδιο είναι η μεταφορά του γάλακτος από τους παραγωγούς και τους σταθμούς συγκέντρωσης στην τυροκομική μονάδα, σε θερμοκρασία 4 °C. Κατά την παραλαβή του γάλακτος στη μονάδα, το γάλα αποθηκεύεται προσωρινά σε δεξαμενές θερμοκρασίας 4 °C και πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος του, που περιλαμβάνει τον έλεγχο θερμοκρασίας, οξύτητας και

αντιβιοτικών του γάλακτος και μετριέται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη, πρωτεΐνες, λίπη και στερεά υπολείμματα. Το γάλα μεταφέρεται στη δεξαμενή αποθήκευσης, αφού πρώτα θερμανθεί στους 35 °C και φυγοκεντρηθεί με στόχο τον καθαρισμό του.

Επόμενο στάδιο στην παραγωγή τυριού αποτελεί η παστερίωση του γάλακτος. Σε αυτό το στάδιο, το γάλα θερμαίνεται στους 75 °C για λίγα λεπτά. Στην συνέχεια, το γάλα εισέρχεται στο σύστημα ψύξης, όπου η θερμοκρασία του πέφτει γρήγορα στους 35 °C, και τελικά το γάλα τροφοδοτείται στον τυρολέβητα, όπου επιτυγχάνεται η πήξη του γάλακτος είτε με την προσθήκη πτυιάς, είτε με όξυνση του γάλακτος με χρήση οξυπαραγωγικών μικροοργανισμών. Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο ρεννίνη, που περιέχεται στην πτυιά, προσβάλλει την καζεΐνη σχηματίζοντας παρα-κ-καζεΐνη και στη συνέχεια παρουσία ιόντων ασβεστίου, λόγω της προσθήκης χλωριούχου ασβεστίου, γίνεται η πήξη. Η διαδικασία αυτή διαρκεί από 20-60 min ανάλογα με τον τύπο του τυριού. Στη δεύτερη μέθοδο πήξης, οι μικροοργανισμοί που προστίθενται στο γάλα μειώνουν την τιμή pH αυτού στο ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης οδηγώντας στην πήξη. Η μέθοδος αυτή διαρκεί περισσότερη ώρα (1-2 h). Στο στάδιο αυτό παράγεται και το τυρόγαλο, το οποίο περιέχει όλη σχεδόν την ποσότητα των πρωτεϊνών ορού, τη μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης, τα άλατα και μικρότερη ποσότητα από το λίπος.

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

Τελευταίο και ίσως πιο σημαντικό στάδιο είναι η ωρίμανση του τυριού. Κατά την περίοδο ωρίμανσης το τυρί αποκτά τα μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (οσμή, γεύση, άρωμα, υφή, χρώμα) ανάλογα με το είδος του. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες διασπώνται σε αμινοξέα, η λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και το λίπος υδρολύεται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζεται ένα γενικό διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας τυροκόμησης (Ανδρικόπουλος, 2015).



Εικόνα 1.2. Διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας τυροκόμησης (Ανδρικόπουλος, 2015).

1.3.2. Ιδιότητες

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

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

- Λακτόζη

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

- Πρωτεΐνες

Το τυρόγαλα περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό 0,5-1% w/v και είναι κυρίως πρωτεΐνες ορού. Έχουν σφαιροειδή μορφή και χωρίζονται σε δύο ομάδες, κύριας και δευτερεύουσας αξίας πρωτεΐνες. Η πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη στον ορό είναι η β-γαλακτογλοβουλίνη, η οποία αποτελεί το 10 % των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος και το 58% των πρωτεϊνών του ορού. Αποτελείται από 162 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 18,3 kDa. Εμφανίζεται σε δύο μορφές που διαφέρουν σε έναν υποκαταστάτη. Η μορφή Α έχει ένα ασπαρτικό οξύ και η μορφή Β μία γλυκίνη. Ακόμη, το μόριο περιέχει δύο δισουλφιδικές ομάδες και μία ελεύθερη ομάδα σουλφυδρυλίου, ενώ δεν περιέχει κανένα μόριο φωσφόρου. Σε τιμή pH χαμηλότερη του 3 και υψηλότερη από 8 εμφανίζεται ως μονομερές. Η δεύτερη πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη είναι η α-γαλακτοαλβουμίνη και αποτελεί το 2 % του συνόλου των πρωτεϊνών του γάλακτος και το 13 % των πρωτεϊνών του ορού. Αποτελείται από 123 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ίσο με 14,1 kDa. Το μόριό της περιέχει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ δεν περιέχει καμία φωσφορική ομάδα. Έχει αποδειχθεί ότι η α-γαλακτοαλβουμίνη τροποποιεί τη δράση του ενζύμου γαλακτοζυλοτρανσφεράση. Στις δευτερεύουσας αξίας πρωτεΐνες εντάσσονται τα γλυκομακροπεπτίδια, η αλβουμίνη ορού, η λακτοφερρίνη, η ανοσοσφαιρίνη και οι φωσφολιποπρωτεΐνες (Kilara & Vaghela, 2017; Zall, 1992).

- Λιπαρά
Στον γλυκό ορό περιέχεται λίπος σε ποσοστό 0,09-0,35% w/v και εξαρτάται από τα λιπαρά του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε (Altuntas & Haroglu, 2019; Zall, 1992).
- Άλατα
Ο γλυκός ορός περιέχει μια ποικιλία αλάτων. Συγκεκριμένα, είναι πλούσιος σε νάτριο, κάλιο και χλώριο, ενώ περιέχονται σε αυτόν σε μικρότερη συγκέντρωση και μαγγάνιο, ασβέστιο, φωσφόρος και άλλα. Η σύστασή του εμφανίζει διαφορές από τον όξινο ορό κάτι που αποδίδεται στη διαφορετική παραγωγική τους διαδικασία (Fischer & Kleinschmidt, 2015).
- Βιταμίνες
Στο τυρόγαλα μεταφέρονται οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες που δεν εγκλωβίζονται στο τυρόπηγμα κατά την παραγωγική διαδικασία. Από τη χημική ανάλυση του γλυκού ορού έχει βρεθεί ότι περιέχει θειαμίνη, φολικό οξύ, νιασίνη, ριβοφλαβίνη, χολίνη και παντοθενικό οξύ. Ο κύριος ρόλος της θειαμίνης, γνωστή και ως βιταμίνη B1, είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε ενέργεια στο αίμα, καθώς και η σωστή απελευθέρωση του υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι. Το φολικό οξύ (βιταμίνη B9 ή φυλλικό οξύ) είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοκυστεΐνης. Ακόμη, η νιασίνη (βιταμίνη B3) συνδέεται με την πρόληψη της καρδιοπάθειας και της απώλειας μνήμης, διευκολύνει την πέψη και διατηρεί υγιή τα κύτταρα του δέρματος. Η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2) ανήκει και αυτή στο σύμπλεγμα των βιταμινών B και συμμετέχει στο σχηματισμό των απαραίτητων συνενζύμων FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) και FMN (Flavin MonoNucleotide). Η χολίνη παρότι δεν είναι βιταμίνη συμπεριλαμβάνεται στο σύμπλεγμα των βιταμινών B λόγω της παρόμοιας δράσης της. Τέλος, το παντοθενικό οξύ, γνωστό και ως βιταμίνη B5, είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των επινεφριδίων και το σχηματισμό των αντισωμάτων και αποτελεί τμήμα του συνενζύμου A, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απελευθέρωση της ενέργειας από τις τροφές (Zall, 1992).

Πίνακας 1.3. Τυπική σύσταση τυρογάλακτος (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

Συστατικό	Περιεκτικότητα
Ολικά σάκχαρα (g·L ⁻¹)	38,7 ± 0,75
Γλυκόζη (g·L ⁻¹)	0,30 ± 0,02
Γαλακτόζη (g·L ⁻¹)	0,43 ± 0,05
Λακτόζη (g·L ⁻¹)	38,0 ± 0,68
Ολική πρωτεΐνη (g·L ⁻¹)	5,56 ± 0,08
Πρωτεΐνη ορού (g·L ⁻¹)	5,11 ± 0,07
Καζεΐνη (g·L ⁻¹)	0,45 ± 0,09
NPN (g·L ⁻¹)	0,71 ± 0,02
Τέφρα (g·L ⁻¹)	4,33 ± 0,01
Γαλακτικό οξύ (g·L ⁻¹)	0,58 ± 0,01
Λίπη (g·L ⁻¹)	0,47 ± 0,01
Na ⁺ (mM)	16,5 ± 0,35
NH ₄ ⁺ (mM)	2,41 ± 0,05
K ⁺ (mM)	29,6 ± 0,95
Mg ²⁺ (mM)	2,81 ± 0,09
Ca ²⁺ (mM)	8,44 ± 0,22
Cl ⁻ (mM)	21,5 ± 0,53
NO ₃ ⁻ (mM)	0,81 ± 0,04
PO ₄ ²⁻ (mM)	8,35 ± 0,19
SO ₄ ²⁻ (mM)	1,14 ± 0,18

1.3.3. Υφιστάμενες μέθοδοι διαχείρισης και αξιοποίησης του γλυκού ορού

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

Η αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών γίνεται από μικροοργανισμούς και μπορεί να πραγματοποιείται όσο η ποσότητα των οργανικών ουσιών δεν ξεπερνά τα επίπεδα ικανότητας αποικοδόμησής τους από το οικοσύστημα. Έτσι, με τη διαρκή παρουσία του οξυγόνου τα υδατοδιαλυτά συστατικά των αποβλήτων χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς ως θρεπτικά συστατικά. Τα προϊόντα της οξειδωσης απελευθερώνονται στο περιβάλλον, ενώ ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυξάνεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η μείωση των οργανικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς με κατανάλωση οξυγόνου. Ωστόσο, για να αποφανθεί εάν πραγματοποιείται ή όχι ρύπανση του περιβάλλοντος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η απαίτηση σε οξυγόνο. Προκειμένου να μην επηρεάζεται το οικοσύστημα θα πρέπει το οξυγόνο που απομένει στο σύστημα να είναι επαρκές για την επιβίωση των οργανισμών του συστήματος (Jelen, 2011; Smithers, 2008).

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

Ιστορικά, το τυρόγαλα θεωρήθηκε ένα απόβλητο με χαμηλή οικονομική αξία. Για το λόγο αυτό, δεν αξιοποιούταν και προκειμένου οι γαλακτοβιομηχανίες να απαλλαγούν από αυτό είτε το ψεκάζανε σε χωράφια, το απέρριπταν σε λίμνες και ποτάμια, είτε το πουλούσαν ως συστατικό για ζωοτροφές. Σήμερα, η κατανόηση της σοβαρότητας της περιβαλλοντικής ρύπανσης που δημιουργούν οι παραπάνω μέθοδοι διαχείρισης του τυρογάλακτος, καθώς και η εξέλιξη της τεχνολογίας, έστρεψαν την επιστημονική κοινότητα σε νέα ερευνητικά μονοπάτια. Σήμερα, ο γλυκός ορός έχει αναλυθεί και χαρακτηριστεί πλήρως ανακαλύπτοντας τις χημικές, φυσικές, βιολογικές και θρεπτικές ιδιότητές του, οι γαλακτοβιομηχανικές μονάδες έχουν εξελιχθεί στην επεξεργασία του και η διαρκής ανάγκη εξέλιξης στον τομέα των τροφίμων έχουν οδηγήσει στην εκμετάλλευση του τυρογάλακτος προς παραγωγή νέων συστατικών (Smithers, 2008).

Η χρήση του γλυκού ορού ως υπόστρωμα σε διάφορες φυσικοχημικές και βιοτεχνολογικές διεργασίες οδηγεί στην παραγωγή πολύτιμων προϊόντων. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες και λακτόζη τον καθιστούν εξαιρετική επιλογή για την παραγωγή βρεφικών τροφίμων και ροφημάτων, αλλά και την απομόνωση των παραπάνω συστατικών σε καθαρή μορφή (Jelen, 2011). Επίσης, λόγω των ανόργανων συστατικών και της λακτόζης που περιέχει, έχει δοκιμαστεί η παραγωγή αλκοολούχων ποτών από γλυκό ορό, όπως κρασί, μπίρα και σαμπάνια. Φυσικά, το τυρόγαλα μπορεί να εκμεταλλευτεί και από άλλους τομείς πέρα από τα τρόφιμα, όπως από τον τομέα των καυσίμων όπου μελετάται η χρήση του για παραγωγή βιοαερίου (Altuntas & Haroglu, 2019; Smithers, 2008).

1.4. Καινοτόμες μέθοδοι αξιοποίησης των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας – Δυνατότητες και προκλήσεις

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι οι πολύ μεγάλες ποσότητες όξινου και γλυκού ορού που παράγονται σε ετήσια βάση παγκοσμίως, σε συνδυασμό με τις τάσεις μεγέθυνσης που παρουσιάζουν οι αγορές γαλακτοκομικών προϊόντων σε παγκόσμιο επίπεδο καθιστούν αναγκαία την ανεύρεση λύσεων αναφορικά με τη διαχείριση των παραπροϊόντων αυτών από τις γαλακτοβιομηχανίες. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε τύπου ορού, ειδικά του όξινου ορού που δεν είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες και δεν μπορεί να οδηγηθεί στην παραγωγή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, σε συνδυασμό με το υψηλό βιολογικό φορτίο που περιέχει, δυσχεραίνουν τη διαχείρισή του σε συμβατικά συστήματα βιολογικού καθαρισμού. Έτσι, καθώς όλες οι λύσεις αξιοποίησης του ορού που περιγράφηκαν παραπάνω παρουσιάζουν συγκεκριμένα μειονεκτήματα στην εφαρμογή τους, οι βιομηχανίες και η ακαδημαϊκή κοινότητα σε όλο τον κόσμο αναζητά καινοτόμες λύσεις για την εναλλακτική αξιοποίηση του όξινου και του γλυκού ορού που θα προσδώσουν προστιθέμενη αξία στα παραπροϊόντα αυτά.

Τόσο ο όξινος, όσο και ο γλυκός ορός περιέχουν πλήθος συστατικών τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους, είτε με την απομόνωσή τους, είτε με την εφαρμογή καινοτόμων διεργασιών για την μετατροπή τους σε άλλα, πολύτιμα συστατικά. Ανάμεσα σε πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων που αφορούν στην αξιοποίηση κυρίως συστατικών που περιέχονται στο τυρόγαλα διακρίνεται ένα, το οποίο αφορά στην μετατροπή του όξινου ορού γιαούρτης από ένα περιβαλλοντικό πρόβλημα σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (ακρωνύμιο: ΠΕΡΙΟΡΟΥ). Αυτό το

ερευνητικό πρόγραμμα αφορά στη μελέτη διαφόρων καινοτόμων μεθόδων αξιοποίησης του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού είτε προς παραγωγή νέων τροφίμων ή συστατικών τροφίμων υψηλής αξίας, είτε στην ενσωμάτωση του όξινου ορού στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων.

Μια καινοτόμος μέθοδος αξιοποίησης του όξινου ορού είναι η βελτίωση της σύστασής του με σκοπό τη χρήση του στην παραγωγή καινοτόμων γαλακτοκομικών προϊόντων με βάση υφιστάμενα προϊόντα. Κομβικής σημασίας σε αυτή τη στρατηγική αποτελεί η υδρόλυση της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό γιαουρτιού, ώστε να παρακαμφθεί το πρόβλημα της διαλυτότητάς του, με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτόζης. Ένα χαρακτηριστικό της σύστασης του όξινου ορού γιαουρτιού είναι η υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, η οποία δημιουργεί πρόβλημα στη ρεολογία της σκόνης του ορού αυτού. Για την απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος και τη βελτίωση της σύστασής του (π.χ. απομάκρυνση μικροοργανισμών, λίπους κ.ά.) προτείνεται η επεξεργασία του ορού με μεμβράνες μικροδιήθησης, υπερδιήθησης, ή νανοδιήθησης. Περαιτέρω, η αξιοποίηση του ορού μπορεί να κινηθεί προς την κατεύθυνση παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων με την ενσωμάτωσή του σε υφιστάμενα προϊόντα, με χρήση του πιο κατάλληλου ανά περίπτωση ορού, μετά από υδρόλυση της λακτόζης με β-γαλακτοζιδάση. Ακόμα, ερευνάται η επίδραση του όξινου ορού γιαούρτης στην τρυφερότητα του κρέατος και ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων προϊόντων τύπου σαλτσών-αλειμμάτων με ενσωμάτωση του όξινου ορού, με σκοπό την αξιοποίηση της παραπάνω ιδιότητας.

Άλλη μέθοδος αξιοποίησης του όξινου ορού γιαουρτιού αφορά στη διερεύνηση της δυνατότητάς του να βελτιώνει τη βιοδιαθεσιμότητα ασβεστίου και σιδήρου, χαρακτηριστικό που θα επιτρέψει την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα που απευθύνονται σε βρέφη και παιδιά σχολικής και προσχολικής ηλικίας. Για την πλήρη και λεπτομερή μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας ασβεστίου και σιδήρου κρίνεται απαραίτητη η χρήση της κυτταρικής σειράς Caco-2, η οποία επιδεικνύει δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου του ανθρώπου, και πλέον χρησιμοποιείται ευρέως ως *in vitro* μοντέλο σε μελέτες βιοδιαθεσιμότητας ασβεστίου και σιδήρου. Για τη μέτρηση της πρόσληψης και απορρόφησης των στοιχείων χρησιμοποιούνται κατάλληλα πρωτόκολλα κυτταρικής καλλιέργειας τα οποία περιλαμβάνουν μετρήσεις πρωτεϊνικής έκφρασης της φερριτίνης για το σίδηρο και ατομικής απορρόφησης για το ασβέστιο. Για τον έλεγχο του μηχανισμού μέσω του οποίου επηρεάζεται η βιοδιαθεσιμότητα ασβεστίου και σιδήρου μετρείται η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη και απορρόφηση των δύο στοιχείων. Τόσο

η συγκέντρωση του όξινου ορού, όσο και τα επί μέρους συστατικά του (γαλακτικό οξύ, λακτοφερρίνη κ.ά.) μελετώνται αναφορικά με τη δραστικότητα τους στην απορρόφηση ασβεστίου και σιδήρου.

Επιπλέον, μελετάται η αξιοποίηση του όξινου ορού με ενσωμάτωση αυτού στα σιτηρέσια αγροτικών ζώων, με ταυτόχρονη επίλυση του προβλήματος της υγροσκοπικότητας του όξινου ορού. Μελετάται η διατροφή του όξινου ορού σε παχυνόμενα ορνίθια και προσδιορίζεται η αύξηση του σωματικού βάρους, η κατανάλωση και η εκμετάλλευση της τροφής, η θνησιμότητα και η απόδοση σε σφάγιο. Επιπροσθέτως, μελετώνται επιλεγμένοι βιοδείκτες που άπτονται της εντερικής οικολογίας και λειτουργίας, όπως η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών της τροφής, η σύνθεση και μεταβολική δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας καθώς και η έκφραση γονιδίων που ελέγχουν τον εντερικό φραγμό χρησιμοποιώντας τα παχυνόμενα ορνίθια ως μοντέλο. Τέλος, για τη χρήση του όξινου ορού ως βελτιωτικού ενσίρωσης προτείνεται η ενσωμάτωσή του υπό υγρή ή αφυδατωμένη μορφή στη μάζα της προς ενσίρωση φυλλώδους χλωρής νομής και μελετάται η καταλληλότητα χρήσης του στη διατροφή των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.

Όλες οι παραπάνω μελέτες καταδεικνύουν το πλήθος των δυνατοτήτων που μπορούν να προκύψουν αναφορικά με την ολιστική προσέγγιση της αξιοποίησης του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού προς διάφορες κατευθύνσεις και με πλήθος προκλήσεων στην αποτελεσματική εφαρμογή των προτεινόμενων μεθόδων αξιοποίησης. Ωστόσο, η βιοτεχνολογική αξιοποίηση του όξινου ορού γιαουρτιού, αλλά και του γλυκού ορού, μέσω καινοτόμων και βιομηχανικά διαθέσιμων βιοκαταλυτών, με στόχο την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας, και κατ' επέκταση τρόφιμων με νέα συστατικά και αυξημένες λειτουργικές ιδιότητες αποτελεί ίσως τη μέθοδο που προσδίδει στα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας την μεγαλύτερη προστιθέμενη αλλά και διατροφική αξία, με παράλληλο έλεγχο της μείωσης των ποσοτήτων των παραπροϊόντων που απορρίπτονται. Αυτή η μελέτη αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

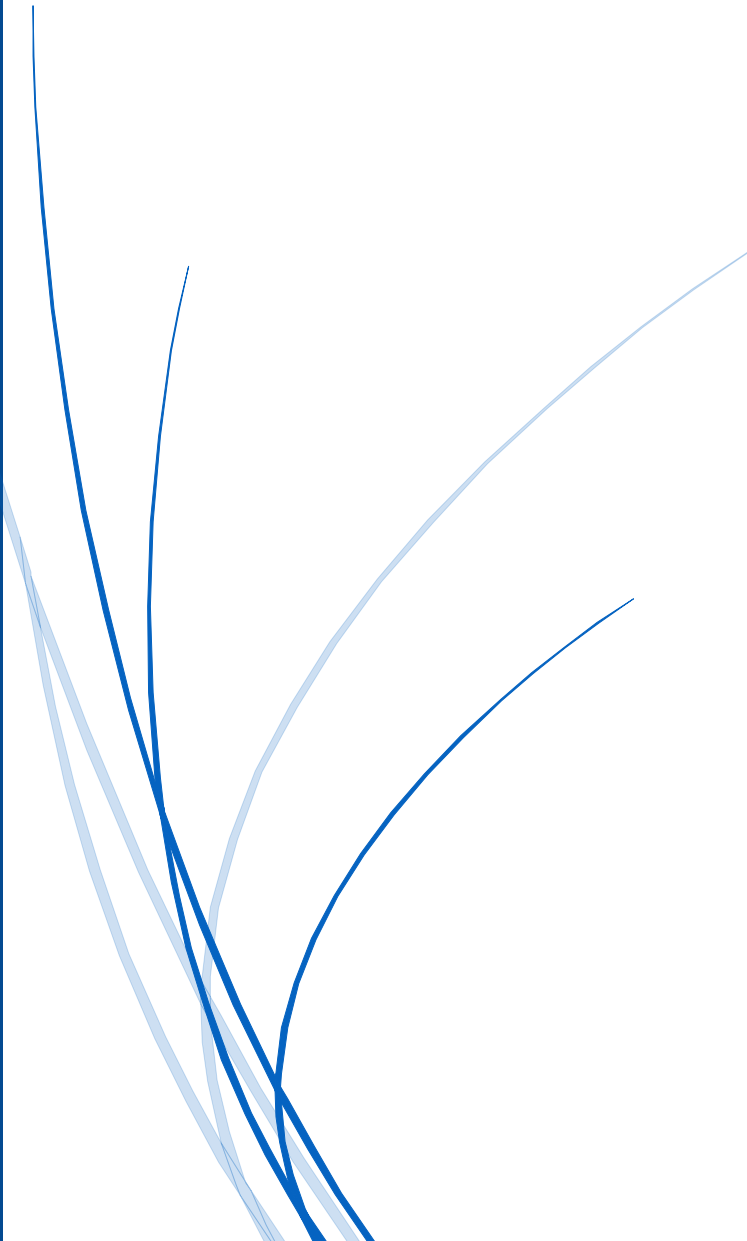
Για την ανάπτυξη νέων λακτασών με ενδιαφέρουσες βιοτεχνολογικά ιδιότητες, αναζητούνται κατάλληλες αμινοξικές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων γονιδιωμάτων μικροοργανισμών. Τα γονίδια που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον συντίθενται με βελτιστοποιημένες τριπλέτες κωδικωνίων για τον κατάλληλο ξενιστή και εκφράζονται ετερόλογα με στόχο την απομόνωσή τους σε ένα στάδιο. Τα απομονωμένα ένζυμα θα χακακτηρίζονται πλήρως σε ότι αφορά στα φυσικοχημικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά. Οι καινοτόμες ανασυνδυασμένες λακτάσες μελετώνται

σε συνδυασμό με τα διαθέσιμα βιομηχανικά παρασκευάσματα λακτασών και αξιολογούνται ως προς την ικανότητά τους να παράγουν γαλακτοολιγοσακχαρίτες, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων αναφορικά με μια ποικιλία παραμέτρων. Ταυτόχρονα διερευνάται ο ανασχεδιασμός και η ανάπτυξη υπαρχόντων και νέων προϊόντων με χρήση υδρολυμένου ή μη όξινου ορού και συστατικών υψηλής αξίας. Τέλος, εφαρμόζεται Ανάλυση Κύκλου Ζωής κατά την αξιοποίηση του όξινου ορού προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας για την εξακρίβωση της δυνατότητας βελτίωσης των υφιστάμενων περιβαλλοντικών επιπτώσεων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η λακτόζη



2. Η λακτόζη

2.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, βασικό συστατικό των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας είναι η λακτόζη, η οποία μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο συστατικό για την αναβάθμιση της αξίας των παραπροϊόντων αυτών, μέσω της παραγωγής άλλων πολύτιμων συστατικών. Η λακτόζη (β -D-γαλακτοπυρανοζυλο-(1 \rightarrow 4)- α -D-γλυκοπυρανόζη) είναι ένας αναγωγικός δισακχαρίτης ο οποίος απαντάται στο γάλα όλων των θηλαστικών, με ελάχιστες εξαιρέσεις, στο εύρος περιεκτικότητας μεταξύ 2,0 και 10 % w/v. Η μέση περιεκτικότητα της λακτόζης στο αγελαδινό γάλα είναι κατά μέσον όρο 4,8 % w/v, κυμαινόμενη από 4,4 έως 5,2 %. Κατά την διαδικασία της τυροκόμησης, σχεδόν όλη η λακτόζη του γάλακτος μεταφέρεται στον αποβαλόμενο ορό (τυρόγαλα). Σε αντίθεση με το παρελθόν, ο ορός δεν θεωρείται πλέον απόβλητο. Στις μέρες μας, οικονομικές και περιβαλλοντικές μελέτες υπαγορεύουν ότι ο ορός πρέπει να χρησιμοποιείται αποτελεσματικά. Ο ορός δύναται να ξηραθεί προς παραγωγή διαφόρων σκονών ορού ή να κλασματωθεί με εφαρμογή της τεχνολογίας μεμβρανών, από την οποία παράγονται προϊόντα πρωτεϊνών ορού και ένα ρεύμα διηθήματος πλούσιο σε λακτόζη. Η πλέον κοινή μέθοδος παραγωγής λακτόζης σε μεγάλη κλίμακα από ορό ή διήθημα ορού είναι η κρυστάλλωση ενός υπέρκορου διαλύματος (Torres et al., 2010).

2.2. Ιδιότητες

Ενώ οι ιδιότητες της λακτόζης είναι γενικά παρόμοιες με αυτές άλλων σακχάρων, διαφέρει σε ορισμένα τεχνολογικά σημαντικά σημεία. Μερικά σημαντικά χαρακτηριστικά της λακτόζης παρουσιάζονται παρακάτω.

Η λακτόζη είναι ένα αναγωγικό σάκχαρο, διαθέτει, δηλαδή, μια ελεύθερη ή πιθανά ελεύθερη καρβονυλομάδα, μια αλδεϋδομάδα στην περίπτωση της λακτόζης. Όπως και άλλα αναγωγικά σάκχαρα, η λακτόζη υπάρχει κυρίως στην μορφή ανοιχτής αλυσίδας με μια αλδεϋδομάδα, η οποία μπορεί να σχηματίσει έναν ημιακεταλικό δακτύλιο. Ο σχηματισμός του ημιακεταλικού δακτυλίου δημιουργεί ένα νέο χειρομορφικό κέντρο (ασύμμετρος άνθρακας), το οποίο μπορεί να υπάρχει ως δύο εναντιομερή, το α και το β . Με διαδοχική διάσπαση και επανασχηματισμό του δακτυλίου, το μόριο της λακτόζης μπορεί να εναλλάσσεται μεταξύ των α και β ανωμερών, μια διαδικασία γνωστή ως πολυμορφισμός.

Η α - και η β -λακτόζη έχουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες, η κυριότερη εκ των οποίων είναι η ειδική γωνία στρέψης $[\alpha]_D^{20}$ (+89° και +35° για την α - και β -λακτόζη, αντίστοιχα) και η διαλυτότητα στο νερό (70 και 500 g/L στους 20 °C για την α - και β -λακτόζη, αντίστοιχα).

Η λακτόζη λαμβάνει μέρος στις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης (αντιδράσεις Maillard), με αποτέλεσμα την παραγωγή (δυσάρεστων) αρωματικών ενώσεων και πολυμερών με καφετί χρώμα. Η αντίδραση Maillard συνεισφέρει θετικά στο άρωμα και το χρώμα πολλών τροφίμων, όπως η κρούστα του ψωμιού και των προϊόντων βαθέος τηγανίσματος, αλλά τα αποτελέσματα αυτής στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι συνήθως αρνητικά και πρέπει να αποφεύγονται.

Η οξειδοαναγωγική τιτλοδότηση χρησιμοποιώντας αλκαλικό θειικό χαλκό (αντιδραστήριο Fehling) ή χλωραμίνη-Τ αποτελεί την πρότυπη μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λακτόζης, παρόλο που σε μεγάλα εργαστήρια προσδιορίζεται πλέον μέσω φασματοφωτομετρίας υπερύθρου. Μπορεί, επίσης, να μετρηθεί με πολωσιμετρία, φασματοφωτομετρία ορατού μετά από αντίδραση με φαινόλη ή ανθρόνη σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, μέσω ενζυμικής αντίδρασης ή με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

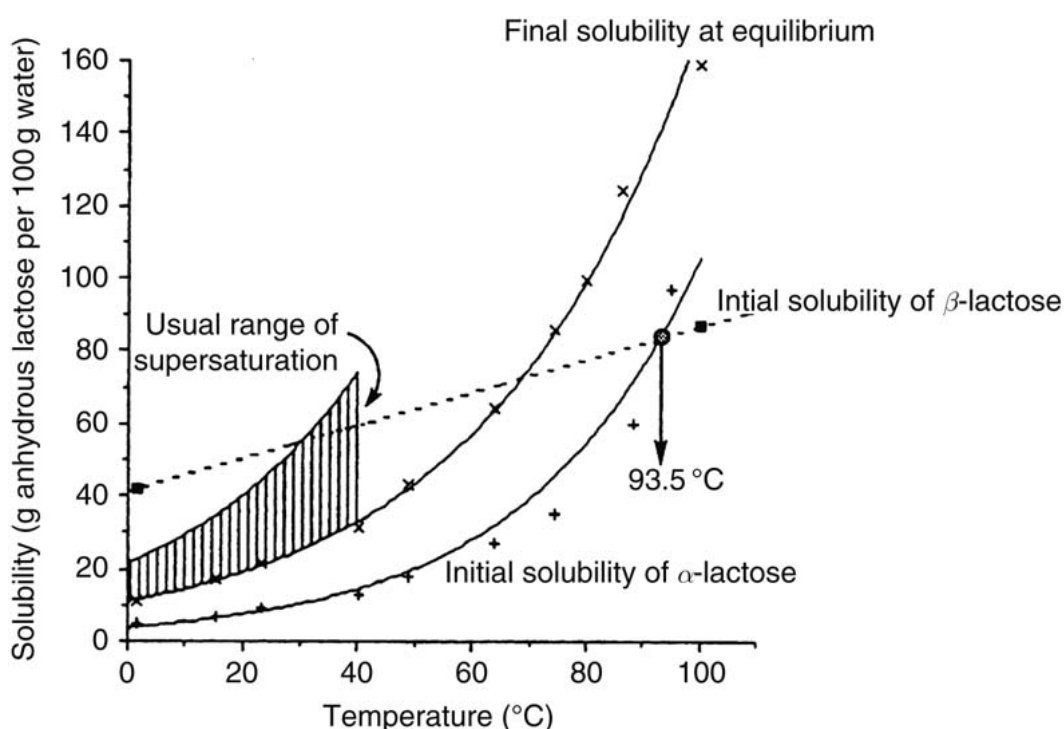
Μεταξύ των σακχάρων, η λακτόζη, ειδικά το α εναντιομερές, έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, αλλά εν διαλύσει είναι δύσκολο να κρυσταλλωθεί, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε γαλακτοκομικά προϊόντα πλούσια σε λακτόζη, όπως η σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος, εκτός αν ληφθούν μέτρα για την πρόκληση και τον έλεγχο της κρυστάλλωσης.

Η α - και β -λακτόζη είναι διαλυτή στο νερό στους 20 °C έως και 70 και 500 g/L, αντίστοιχα. Στην ισορροπία, η αναλογία α - προς β -λακτόζη είναι περίπου 37:63, με αποτέλεσμα η ολική διαλυτότητα της λακτόζης να είναι ίση με 180 g/L στους 20 °C. Η διαλυτότητα της α -λακτόζης εξαρτάται πιο έντονα από τη θερμοκρασία, σε σχέση με την β -λακτόζη και η α -λακτόζη είναι το ανωμερές με τη μεγαλύτερη διαλυτότητα σε θερμοκρασία άνω των 93,3 °C. Έτσι, η α -λακτόζη είναι η μορφή της λακτόζης που κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασία μικρότερη των 93,3 °C και αποτελεί την εμπορική μορφή της λακτόζης, ενώ η β -λακτόζη μπορεί να παραχθεί με κρυστάλλωση σε θερμοκρασίες άνω των 94 °C (Εικόνα 2.1). Η α -λακτόζη κρυσταλλώνεται ως μονοένυδρη, ενώ η β -λακτόζη σχηματίζει άνυδρους κρυστάλλους. Έτσι, ο βαθμός απόδοσης της α -λακτόζης είναι περίπου 5 % υψηλότερος από αυτόν της β -λακτόζης.

Όταν το γάλα ή ο ορός ξηραίνονται με ψεκασμό, όση λακτόζη δεν έχει προκρυσταλλωθεί σχηματίζει μια άμορφη υαλώδη μορφή, η οποία είναι σταθερή αν η

περιεχόμενη υγρασία στη σκόνη διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο, αν η περιεχόμενη υγρασία αυξηθεί πάνω από 6 %, η λακτόζη κρυσταλλώνεται ως ένυδρη α-λακτόζη, οι κρύσταλλοι της οποίας χρηματίζουν αλληλένδετες μάζες και συστάδες, οι οποίες μπορούν να καταστήσουν τη σκόνη μη χρησιμοποιήσιμη εάν είναι πολύ εκτεταμένοι, καθώς η ανεπαρκώς κρυσταλλωμένη σκόνη είναι υγροσκοπική. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αποφευχθεί με επαρκή κρυστάλλωση της λακτόζης πριν την ξήρανση ή με χρήση αποτελεσματικής συσκευασίας.

Η κρυσταλλική λακτόζη έχει πολύ χαμηλή υγροσκοπικότητα και χρησιμοποιείται σε μείγματα άχνης ζάχαρης. Μεταξύ των σακχάρων, η λακτόζη έχει χαμηλό επίπεδο γλυκύτητας. Η γλυκύτητα της λακτόζης ισούται μόλις με το 16 % της γλυκύτητας της σακχαρόζης σε διάλυμα 1 %, με αποτέλεσμα να έχει χαμηλή αξία ως γλυκαντικό, την κύρια εφαρμογή των σακχάρων στα τρόφιμα. Ωστόσο, αποτελεί έναν χρήσιμο πληρωτικό παράγοντα, όταν η υπερβολική γλυκύτητα είναι ανεπιθύμητη. Η λακτόζη είναι σημαντική στην παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου αποτελεί πηγή άνθρακα για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ (Fox, 2011).



Εικόνα 2.1. Διαλυτότητα της α - και β -λακτόζης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.

Οι περισσότεροι ενήλικες αδυνατούν να καταναλώσουν τη λακτόζη δίχως προβλήματα, λόγω της ανεπάρκειας σε εντερική β -γαλακτοζιδάση. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα πολλοί άνθρωποι να αποκλείουν προϊόντα που περιέχουν λακτόζη από τη διατροφή τους. Ωστόσο, η λακτόζη μπορεί να αφαιρεθεί από τα γαλακτοκομικά προϊόντα μέσω της τεχνολογίας μεμβρανών ή μέσω υδρόλυσης με εφαρμογή εξωγενών β-γαλακτοζιδασών (Fox, 2011).

Στους ανθρώπους, η δυσανεξία στην λακτόζη αυξάνεται με την ηλικία, με αναφορές ότι προκαλείται στο 70 % περίπου του ενήλικου παγκόσμιου πληθυσμού (Paige 2005). Αυτά τα άτομα τείνουν να αποφεύγουν την κατανάλωση γάλακτος, λόγω των κινδύνων οξείας κοιλιακής δυσφορίας. Η παρατήρηση αυτού του φυσιολογικού συμπτώματος υπήρξε η κινητήριος δύναμη για την ανάπτυξη εμπορικών ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης που επιτρέπουν την παραγωγή προϊόντων με μειωμένη περιεκτικότητα σε λακτόζη. Καθώς η λακτόζη έχει χαμηλή διαλυτότητα και χαμηλή γλυκύτητα, η υδρόλυσή της μπορεί να πραγματοποιηθεί για τη μείωση ανεπιθύμητων φαινομένων κρυστάλλωσης σε προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη κατά τη διάρκεια της συντήρησης αυτών των τροφίμων, καθώς και για την αύξηση του εύρους εφαρμογών της λακτόζης όταν η αυξημένη γλυκύτητα είναι επιθυμητή (Torres et al., 2010).

Λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της, του φαινομένου της κρυστάλλωσης και της υγροσκοπικότητάς της, η λακτόζη προκαλεί προβλήματα σε συμπυκνωμένα, αφυδατωμένα και κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να αποφευχθούν με την εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών επεξεργασίας.

Ως αναγωγικό σάκχαρο, η λακτόζη μπορεί να λάβει μέρος στις αντιδράσεις Maillard, κυρίως με την ε-αμινομάδα της λυσίνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό χρωστικών καφέ χρώματος και πτητικών αρωματικών ενώσεων με μειωμένη λειτουργική και διατροφική αξία. Η αντιδράσεις Maillard είναι ιδιαίτερα έντονες σε προϊόντα που παραμένουν σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά λαμβάνουν χώρα και σε γαλακτοκομικές σκόνες, ειδικά κατά την αποθήκευσή τους σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και υγρασίας (Fox, 2011).

2.3. Παραγωγή

Όπως προαναφέρθηκε, η λακτόζη αποτελεί τον κύριο δισακχαρίτη που απαντάται στο γάλα των περισσότερων θηλαστικών (Torres et al., 2010). Ωστόσο, βασική πηγή για την βιομηχανική παραγωγή λακτόζης αποτελούν τα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας που προκύπτουν από την επεξεργασία του γάλακτος για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης, με κυρίαρχη πηγή τον γλυκό ορό που αποβάλλεται κατά την τυροκόμηση (Johnson & Conforti, 2003). Άλλη πηγή λακτόζης αποτελεί και ο

όξινος ορός που αποβάλλεται από την παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού (Jelen, 2011; Menchik et al., 2019). Οι ποσότητες του όξινου και γλυκού ορού που αποβάλλονται κατά την παραγωγική διαδικασία στραγγιστού γιαουρτιού και τυροκομικών προϊόντων είναι πολύ μεγάλες. Κατά την παραγωγή του στραγγιστού γιαουρτιού, για κάθε Kg γάλακτος που χρησιμοποιούνται, το 1/3 αυτού καταλήγει σαν τελικό προϊόν, ενώ τα 2/3 αποβάλλονται ως όξινος ορός (Erickson, 2017). Πρακτικά, ο όξινος ορός που παράγεται είναι διπλάσιος σε ποσότητα από την παραγωγή στραγγιστού γιαουρτιού. Αντίστοιχα, κατά την τυροκόμηση, για για κάθε Kg γάλακτος που χρησιμοποιούνται, το 1/10 αυτού καταλήγει σαν τελικό προϊόν, ενώ το 90 % αποβάλλεται ως γλυκός ορός ή τυρόγαλα (Božanić et al., 2014). Χαρακτηριστικά, το 2015 παρήχθησαν 771.000 tn στραγγιστού γιαουρτιού, με συνακόλουθη αποβολή περίπου 1.500.000 tn όξινου ορού (Erickson, 2017). Αντίστοιχα, η παγκόσμια παραγωγή τυροκομικών προϊόντων ανήλθε το έτος 2022 σε 20.376.000 tn, με ισοδύναμη αποβολή 183.400.000 tn γλυκού ορού (OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032, 2023).

Στο παρελθόν, ο ορός θεωρείτο ως απόβλητο και χρησιμοποιείτο ως ζωοτροφή, λίπασμα ή απορριπτότα στα αστικά λύματα (Smithers, 2008). Οικονομικοί και περιβαλλοντικοί λόγοι επιβάλλουν τώρα την πιο αποδοτική χρήση του ορού. Τα κύρια προϊόντα που παράγονται από ορό είναι διάφορες σκόνες ορού, πρωτεΐνες ορού που παράγονται κυρίως μέσω της τεχνολογίας μεμβρανών, λακτόζη και τα παράγωγα αυτής. Η τεχνολογία μεμβρανών χρησιμοποιείται εκτενώς για τη συμπύκνωση και την κλασμάτωση του γάλακτος. Το παραγόμενο διήθημα τυγχάνει διαφόρων εφαρμογών, περιλαμβανομένης της παραγωγής λακτόζης.

Η λακτόζη παράγεται εμπορικά με κρυστάλλωση από συμπυκνωμένο ορό. Οι κρύσταλλοι διαχωρίζονται, συνήθως, με φυγοκέντριση. Αυτή η διεργασία είναι πρακτικά όμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για τη σακχαρόζη και άλλα σάκχαρα. Ετησίως παράγονται περίπου 400.000 tn κρυσταλλικής λακτόζης (σε σύγκριση με τους περίπου 108 tn σακχαρόζης (Fox, 2011)).

2.3.1. Παραγωγική διαδικασία λακτόζης κατάλληλης για τρόφιμα

Η πρώτη περιγραφή της παραγωγικής διαδικασίας της λακτόζης κατάλληλη για τρόφιμα δόθηκε από τον Weisberg (1954). Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζεται το διάγραμμα μίας τυπικής σύγχρονης βιομηχανικής μονάδας παραγωγής βρώσιμης λακτόζης. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκαν οι μεμβράνες υπερδιήθισης για την παραγωγή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων από ορό (whey protein concentrate, WPC),

πριν την διοχέτευσή του στην μονάδα παραγωγής λακτόζης. Το ρεύμα που φθάνει στη μονάδα παραγωγής της λακτόζης αναφέρεται ως διήθημα ορού (το ρεύμα που διαπερνά τις μεμβράνες υπερδιήθισης) και αποτελείται, κυρίως, από λακτόζη και άλατα. Οι πρωτεΐνες ορού είναι πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας και οι κύριες περιοχές κατανάλωσης εντοπίζονται στα αθλητικά ποτά και συμπληρώματα διατροφής.

Όταν το διήθημα ορού φθάνει στη μονάδα παραγωγής λακτόζης, η περιεκτικότητα σε λακτόζη θα πρέπει να μετριέται, ώστε να καταγράφεται η απόδοση σε λακτόζη στη μονάδα. Τα βασικά στάδια στην παραγωγική διαδικασία της λακτόζης παρουσιάζονται παρακάτω.

2.3.1.1. Συμπύκνωση του διηθήματος ορού

Αυτή επιτυγχάνεται με έναν συνδυασμό αντίστροφης ώσμωσης ακολουθούμενη από εξάτμιση, μέχρι την επίτευξη συγκέντρωσης λακτόζης περί τα 110 g λακτόζης ανά 100 g νερού (58 % ολικά στερεά για διηθήματα ορού). Όσο υψηλότερη συγκέντρωση ολικών στερεών επιτυγχάνονται στον εξατμιστήρα, τόσο υψηλότερος βαθμός απόδοσης σε λακτόζης μπορεί να επιτευχθεί στο στάδιο της κρυστάλλωσης που ακολουθεί.

2.3.1.2. Κρυστάλλωση

Οι περισσότερες μονάδες παραγωγής λακτόζης χρησιμοποιούν έναν διαλείποντος έργου ψυχόμενο κρυσταλλωτήρα. Το κορεσμένο μητρικό υγρό που βγαίνει από τον εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 70 °C ψύχεται στον κρυσταλλωτήρα στους 15 °C. Η τελική θερμοκρασία εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στη μονάδα και από τα διαθέσιμα συστήματα ψύξης. Αν είναι διαθέσιμο ψυχρό νερό, τότε στοχεύεται μία χαμηλότερη θερμοκρασία, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκής χρόνος στους κρυσταλλωτήρες για περαιτέρω ανάπτυξη των κρυστάλλων. Υπάρχει μία απευθείας συσχέτιση μεταξύ του βαθμού απόδοσης της μονάδας σε λακτόζη και της τελικής θερμοκρασίας που επιτυγχάνεται.

Ορισμένες μονάδες παραγωγής λακτόζης χρησιμοποιούν κρυσταλλωτήρες εξάτμισης, οι οποίοι επιτρέπουν την επίτευξη υψηλότερης περιεκτικότητας σε ολικά στερεά και υψηλότερους βαθμούς απόδοσης σε λακτόζη. Σε αυτά τα συστήματα, η πυρηνογένεση και η ανάπτυξη των κρυστάλλων λαμβάνει χώρα στον εξατμιστήρα, μειώνοντας το κίνδυνο καταιγισμού κρυστάλλων (crystal showering) λόγω υπερβολικού υπερκορεσμού.

Το στάδιο της κρυστάλλωσης αποτελεί την καρδιά της διεργασίας παραγωγής λακτόζης και το πλέον δύσκολο να διεκπεραιωθεί ορθά. Υπάρχουν πολλές παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν τη διεργασία και συχνά αλληλεπιδρούν, καθιστώντας δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό της επίδρασης καθεμιάς παραμέτρου στη διεργασία. Έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες και διατριβές στο αντικείμενο της διεργασίας κρυστάλλωσης της λακτόζης. Από αυτές έχει καταστεί σαφές ότι το κρίσιμο στάδιο είναι αυτό της πυρηνογένεσης και είναι αυτό που πρέπει να ελέγχεται για την παραγωγή κρυστάλλων με το επιθυμητό μέγεθος.

2.3.1.3. Διαχωρισμός των κρυστάλλων και έκπλυση

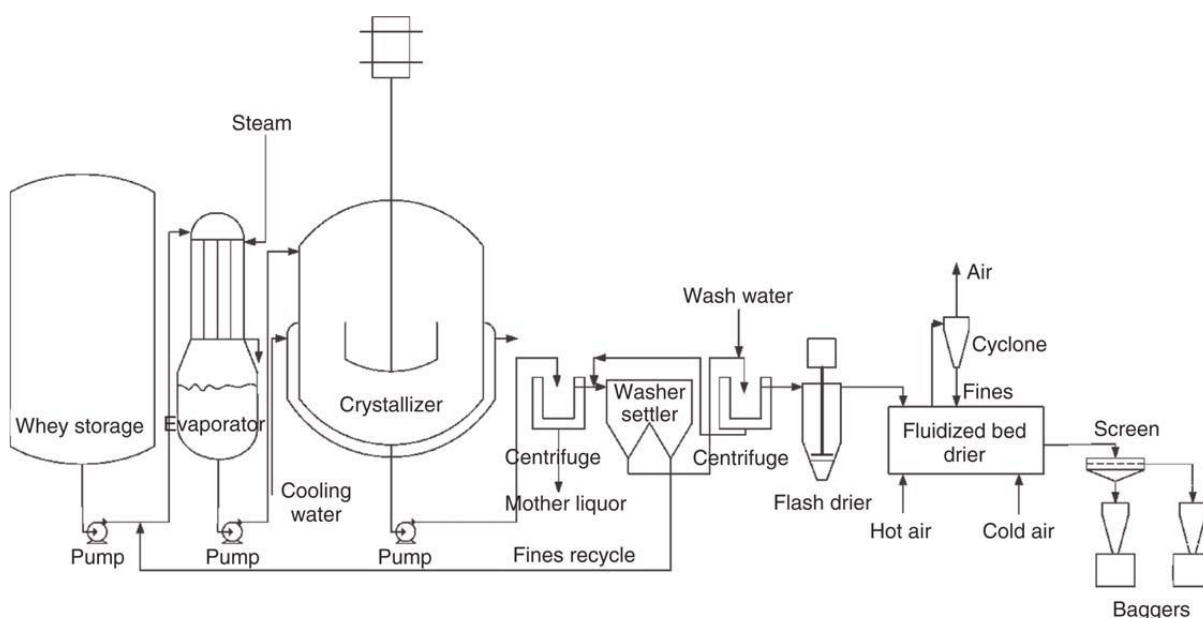
Οι κρύσταλλοι που παράγονται στον κρυσταλλωτήρα διαχωρίζονται από το υγρό με φυγοκέντριση. Ορισμένες μονάδες παρεμβάλουν και ένα στάδιο έκπλυσης κατά τη φυγοκέντριση, αλλά οι περισσότερες διαβιβάζουν τους κρυστάλλους σε ένα θάλαμο έκπλυσης όπου ξεπλένονται με καθαρό νερό για την απομάκρυνση όποιων ακαθαρσιών του μητρικού υγρού που έχουν επικαθίσει σε αυτούς.

Η αποδοτικότητα της έκπλυσης επηρεάζεται από το μέγεθος των κρυστάλλων που επιτυγχάνεται στον κρυσταλλωτήρα. Όταν σχηματίζονται πολλοί μικροί κρύσταλλοι, τότε το στάδιο της έκπλυσης είναι λιγότερο αποτελεσματικό και οδηγεί στην παραγωγή ενός χαμηλής ποιότητας προϊόντος. Η αυξημένη δυσκολία στον διαχωρισμό αυτών των μικρού μεγέθους κρυστάλλων από τα υγρά ρεύματα οδηγεί, επίσης, σε μειωμένες αποδόσεις στη μονάδα παραγωγής λακτόζης.

2.3.1.4. Ξήρανση και συσκευασία

Οι κρύσταλλοι ανακτώνται από το ρεύμα της έκπλυσης με εκ νέου φυγοκέντριση και οι κρύσταλλοι οδηγούνται σε ξηραντήρα ακαριαίας δράσης (flash dryer) με ποσοστό ελεύθερης περιεχόμενης υγρασίας 4-10 % (αυτό το ποσοστό δεν περιλαμβάνει το 5 % υγρασίας που σχετίζεται με το χημικά δεσμευμένο νερό στον κρύσταλλο). Στον ξηραντήρα ακαριαίας δράσης έρχονται σε επαφή με θερμό αέρα (120-150 °C), ο οποίος ξηραίνει το σιρόπι λακτόζης στην επιφάνεια των κρυστάλλων, δημιουργώντας ένα λεπτό στρώμα άμορφης λακτόζης στην επιφάνεια των κρυστάλλων. Αν το στρώμα άμορφης λακτόζης παραμείνει άθικτο κατά τη διάρκεια της εναπομένουσας διεργασίας ξήρανσης και της συσκευασίας, τότε, αν η περιεχόμενη υγρασία δεν παραμείνει σε χαμηλά επίπεδα στο προϊόν, μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα συσσωμάτωσης (caking). Από τον ξηραντήρα ακαριαίας δράσης οι κρύσταλλοι οδηγούνται σε έναν ξηραντήρα

ρευστοστερεάς κλίνης. Ένας ξηραντήρας ρευστοστερεάς κλίνης έχει συνήθως δύο τμήματα. Το πρώτο είναι το τμήμα τελικής ξήρανσης, στο οποίο πραγματοποιείται η ξήρανση της λακτόζης από αρχική περιεκτικότητα σε ελεύθερη υγρασία από περίπου 1 % στο τελικό επιδιωκόμενο περιεχόμενο σε υγρασία. Το δεύτερο τμήμα του ξηραντήρα ρευστοστερεάς κλίνης χρησιμοποιείται για την ψύξη του προϊόντος πριν το κοσκίνισμα και τη συσκευασία. Η αστοχία στην ψύξη του προϊόντος πριν αυτό μεταφερθεί στους ασκούς οδηγεί σε συσσωμάτωση εντός του ασκού, προκαλούμενη από τις θερμοκρασιακές μεταβολές. Για την αποφυγή της συσσωμάτωσης, η τελική περιεχόμενη υγρασία θα πρέπει να είναι πολύ χαμηλή για να εξασφαλιστεί ότι η ενεργότητα νερού (a_w) του τελικού προϊόντος είναι μικρότερη από 0,3 και η θερμοκρασία του προϊόντος μικρότερη από 30 °C (Paterson, 2011).



Εικόνα 2.2. Διάγραμμα ροής μιας μονάδας παραγωγής κρυσταλλικής μονοένυδρης α-λακτόζης κατάλληλης για τρόφιμα (Paterson, 2011).

2.4. Το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης

2.4.1. Εισαγωγή

Η κρυστάλλωση των άμορφων σακχάρων μικρού μοριακού βάρους αποτελεί μία μετάπτωση φάσεως που λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία, μεταξύ της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και της θερμοκρασίας τήξης και είναι μία διεργασία που σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα των τροφίμων (Levenson & Hartel, 2005). Το φαινόμενο αυτό ευθύνεται για μία σειρά σημαντικών αλλαγών που συμβαίνουν στα

τρόφιμα τα οποία περιέχουν σάκχαρα και μπορεί να προκαλέσει την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους (Hartel., 2011). Η κρυστάλλωση αποτελεί είτε μία επιδιωκόμενη είτε μία ανεπιθύμητη διεργασία, ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του (Roos, 2002). Συγκεκριμένα για τη λακτόζη, ο ρυθμός αύξησης των κρυστάλλων της ρυθμίζεται από τη μετάβασή της από την α-λακτόζη με χαμηλή διαλυτότητα (70 g/L στους 20 °C) στη β-λακτόζη με υψηλή διαλυτότητα (500 g/L στους 20 °C), προκαλώντας τελικά υπερκορεσμό α-λακτόζης (Wang, 2015). Η διαλυτότητα της λακτόζης είναι μία ιδιότητα που επηρεάζει τη χρήση της σε εφαρμογές σε τρόφιμα ή και σε άλλους τομείς, με τη β-λακτόζη να κυριαρχεί σε εφαρμογές σε προϊόντα που απαιτούν τη γρήγορη διαλυτοποίηση της λακτόζης (Yang & Silva, 1995).

2.4.2. Η δομή της λακτόζης

Ανάλογα με τη μοριακή διάταξη της λακτόζης, η δομή της μπορεί να ταξινομηθεί, ως κρυσταλλική και άμορφη. Στην κρυσταλλική κατάσταση, τα μόρια λακτόζης είναι διατεταγμένα σε πλέγμα, ενώ στην άμορφη κατάσταση, τα μόρια λακτόζης δεν διατάσσονται οργανωμένα (Mullin, 2001). Η μετάβαση της λακτόζης από την κρυσταλλική κατάσταση στην άμορφη (μη κρυσταλλική) κατάσταση και αντίστροφα, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το περιεχόμενο νερό στο σύστημα. Η μη κρυσταλλική κατάσταση της λακτόζης είναι ένα σύστημα που δεν είναι σε ισορροπία, το οποίο κατά την απορρόφηση του νερού μεταβαίνει σε σταθερή μορφή λακτόζης, ενώ η μετάβαση από άμορφη σε κρυσταλλική μορφή είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από το χρόνο και συχνά επιταχύνεται από παράγοντες, όπως η σχετική υγρασία (RH) και η θερμοκρασία (Roos, 2002). Η άμορφη λακτόζη σχηματίζεται κατά την ξήρανση ενός διαλύματος λακτόζης, όταν συμβαίνει μία ταχεία αύξηση του ιξώδους και αποτρέπει την κρυστάλλωση. Η μετάβαση της άμορφης κατάστασης στην ελαστική κατάσταση ονομάζεται υαλώδης μετάπτωση και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται αυτή η μετάβαση αναφέρεται ως η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) (McSweeney and Fox, 2009). Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της άνυδρης λακτόζης είναι 101°C, αλλά μειώνεται, όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα σε υγρασία. Η T_g μειώνεται στους 24 °C σε ενεργότητα νερού 0,37, που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα σε νερό 6,8% w/w. Όταν η άμορφη λακτόζη απορροφά υγρασία, αυξάνεται η κινητικότητα των μορίων λακτόζης. Σε ορισμένο σημείο, μία κατάρρευση στη δομή οδηγεί στην κρυσταλλική μορφή. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κρυστάλλωση, συνοδευόμενη από απελευθέρωση προσροφημένου νερού. Η προκύπτουσα κρυσταλλική λακτόζη είναι ένα

μείγμα άνυδρων και ένυδρων μορφών σε αναλογίες ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος (Carpin et. al, 2016). Οι έξι γνωστές μορφές λακτόζης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Κατάσταση και μορφές λακτόζης (Πηγή: Lisiohadi, 2009).

Κατάσταση της λακτόζης	Μορφή της λακτόζης
Άμορφη	Μίγμα από α- και β- λακτόζη
Κρυσταλλική	μονοένυδρη α-λακτόζη
	άνυδρη σταθερή α-λακτόζη
	άνυδρη α-λακτόζη – ασταθής
	σύνθεση β-/α- λακτόζη β-λακτόζη

Παρά το γεγονός ότι η α-λακτόζη και η β-λακτόζη διαφέρουν μόνο ως προς το ανωμερές της γλυκόζης και όχι ως προς τον δεσμό των μονομερών, οι διαφορετικές μορφές της λακτόζης παρουσιάζουν και διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες αναγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Φυσικές ιδιότητες της α- και β-λακτόζης (Πηγή: Harper ,1992).

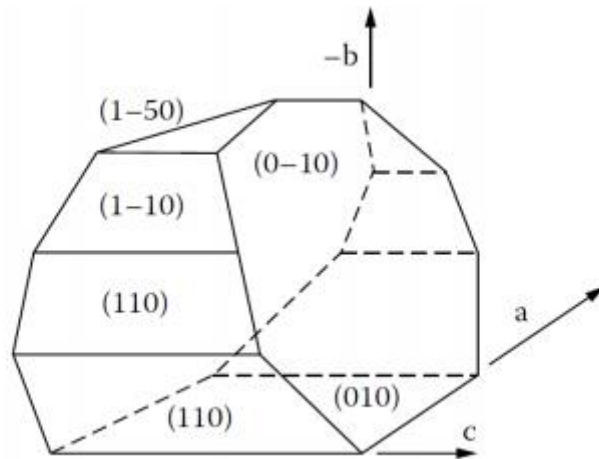
Ιδιότητες	α-λακτόζη	β-λακτόζη
Μοριακό βάρος (Da)	360	342
Πυκνότητα (g/mL)	1,54	1,59
Σημείο τήξης (°C)	202	252
Θερμότητα διαλυτοποίησης (J/g)	-50,2	9,62
Ειδική στροφική ικανότητα (°)	+88	+34
Διαλυτότητα σε νερό στους 20°C (g/ 100 g)	7,40	55,0

Στα υδατικά διαλύματα, η α- και β- λακτόζη συνυπάρχουν σε ισορροπία. Ανεξάρτητα από τη μορφή λακτόζης που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία του διαλύματος, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του πολυστροφισμού και έτσι υπάρχουν στο διάλυμα και οι δύο ανωμερείς μορφές της λακτόζης, μέχρι στην ισορροπία να υπάρχει 37,3% α-λακτόζη και 62,7% β-λακτόζη. Αυτή η αναλογία ισορροπίας επηρεάζεται ελαφρώς από τις διαφορές στη θερμοκρασία, αλλά όχι από τις διαφορές στην τιμή του pH. Ο ρυθμός της μετάβασης αυτής είναι αργός σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά αυξάνεται 2,8 φορές με κάθε 10 °C αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ γίνεται σχεδόν

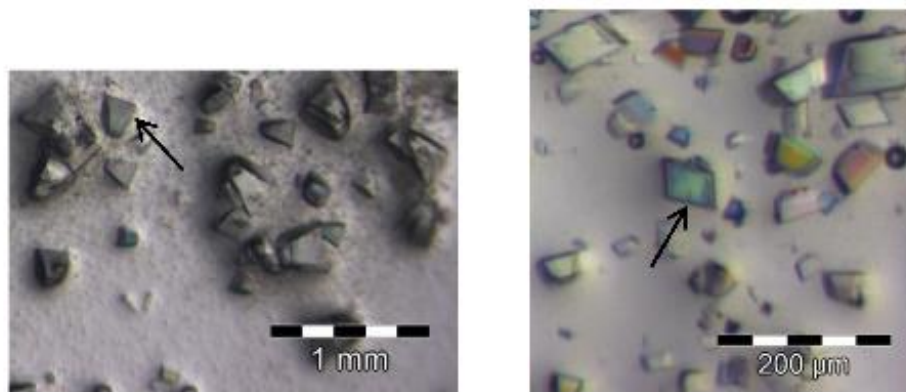
στιγμιαίος στους 75 °C. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, μειώνεται η β-λακτόζη (Gänzle et al., 2008).

Σημαντική διαφορά υπάρχει, επίσης, στη δομή των κρυστάλλων των δύο ανωμερών μορφών της λακτόζης. Η α-λακτόζη κρυσταλλώνεται σχηματίζοντας σκληρούς κρυστάλλους που διαλύονται αργά, δεν εμφανίζουν υγροσκοπικότητα και έχουν διαφορετικά σχήματα με επικρατέστερο το σχήμα πέλεκου. Αντιθέτως, η β-λακτόζη σχηματίζει κρυστάλλους άνυδρης μορφής σε θερμοκρασία υψηλότερη των 93,5 °C. Οι κρύσταλλοι της β-λακτόζης είναι πιο μικρού μεγέθους και έχουν σχήμα διαμαντιού (McSweeney & Fox 2009). Η διαλυτότητά τους είναι έως και 10 φορές υψηλότερη από εκείνη της α-λακτόζης και, λόγω αυτής της υψηλότερης διαλυτότητας, η β-λακτόζη είναι πιο γλυκιά (Johnson, 2003). Γρήγορη ξήρανση διαλύματος λακτόζης, όπως στην παραγωγή σκόνης γάλακτος, αποδίδει ένα υγροσκοπικό και άμορφο μείγμα α- και β-λακτόζης σε χημική ισορροπία.

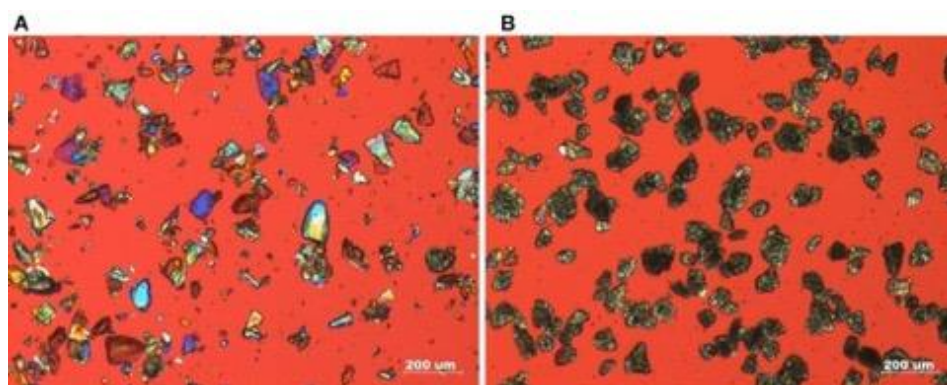
Οι μορφές πυραμίδας, πέλεκου και πρίσματος (Εικόνα 2.3 και Εικόνα 2.4) είναι οι πιο κοινές μορφές των κρυστάλλων, αλλά οι κρύσταλλοι λακτόζης μπορούν να παρατηρηθούν σε μία ποικιλία από άλλα σχήματα, ανάλογα με τις συνθήκες της κρυστάλλωσης. Ο κύριος παράγοντας που διέπει τη μορφή των κρυστάλλων λακτόζης είναι ο υπερκορεσμός του διαλύματος. Ο υψηλός υπερκορεσμός οδηγεί σε σχηματισμό μόνο πρισμάτων, ενώ όσο ο υπερκορεσμός μειώνεται παρατηρείται δημιουργία κρυστάλλων σε σχήματα διαμαντιού, πυραμίδας και τέλος πέλεκου (Nickerson, 1979, Jelen and Coulter, 1973). Οι κρύσταλλοι της α-λακτόζης είναι μονοκλινικοί, σφαιροειδείς και έχουν μόνο έναν άξονα συμμετρίας. Έχουν τραπεζοειδείς πλευρικές όψεις, ρομβικές κορυφές και λοξή όψη στη βάση και την κορυφή, δίνοντας στον κρύσταλλο μία ξεχωριστή εμφάνιση. Η δομή των κρυστάλλων τόσο της α- όσο και της β-λακτόζης παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.5 και τα σχήματα και χρώματα ποικίλουν, ανάλογα με τον τύπο και τις συνθήκες της κρυστάλλωσης (Wong & Hartel 2014).



Εικόνα 2.3. Μορφή πέλεκου κρυστάλλου της λακτόζης (Jane Selia dos Reis Coimbra, 2009).



Εικόνα 2.4. Τυπικά σχήματα πέλεκου (αριστερή εικόνα) και πρίσματος (δεξιά εικόνα) μονοϋδρικής α-λακτόζης.



Εικόνα 2.5. Απεικόνιση σε μικροσκόπιο της δομής της α-μονοϋδρικής λακτόζης (A) και της β-άνυδρης λακτόζης (B) (Wong & Hartel 2014).

2.4.3. Η διαδικασία της κρυστάλλωσης

Η κρυστάλλωση είναι μια διεργασία κυρίως δύο σταδίων, που περιλαμβάνει την πυρηνογένεση (σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης) και την κρυσταλλική ανάπτυξη (ανάπτυξη και τελειοποίηση των σχηματιζόμενων κρυστάλλων). Για την κρυστάλλωση ενός μορίου, κινητήρια δύναμη είναι η διαφορά στο χημικό δυναμικό μεταξύ ενός μορίου που βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας και ενός μορίου στην υπερκορεσμένη του κατάσταση (Hartel, 2001).

2.4.3.1. Πυρηνογένεση

Η διαδικασία της αρχικής δημιουργίας κρυστάλλων (πυρήνες) ονομάζεται πυρηνογένεση και εξαρτάται από τον υπερκορεσμό. Η πυρηνογένεση αποτελεί τον σχηματισμό μοριακών συμπλεγμάτων, τα οποία έχουν ένα κρίσιμο μέγεθος πάνω από το οποίο συνεχίζουν να αναπτύσσονται, ενώ κάτω από αυτό είναι πολύ ασταθή. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων προϋποθέτει την παρουσία αυτών των μικροσκοπικών στερεών σωματιδίων που θα δράσουν ως κέντρα κρυστάλλωσης και καλούνται έμβρυα ή φύτερες ή πυρήνες των κρυστάλλων. Κατά την πυρηνογένεση, τα συσσωματώματα που δημιουργούνται είναι σταθερά και αναπτύσσονται σε ανιχνεύσιμο μέγεθος. Η πυρήνωση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε πρωτογενή και δευτερογενή πυρήνωση. Η πρωτογενής πυρήνωση συμβαίνει είτε παρουσία (ετερογενής πυρήνωση) είτε απουσία (ομοιογενής) αιωρούμενων σωματιδίων που καταλύουν το σχηματισμό των σταθερών συσσωματωμάτων. Σε χαμηλά επίπεδα υπερκορεσμού και χαμηλές θερμοκρασίες, η διαθέσιμη ενέργεια στο υπερκορεσμένο διάλυμα δεν επαρκεί για να προκαλέσει σχηματισμό των πυρήνων με ομοιογενή πυρήνωση, με αποτέλεσμα η ετερογενής πυρήνωση να είναι η κύρια πηγή της αρχικής παραγωγής πυρήνων. Μετά από αυτό το στάδιο κυριαρχεί η δευτερογενής πυρήνωση.

Μεταξύ των κυριότερων παραγόντων που επηρεάζουν την πυρηνογένεση συγκαταλέγονται ο βαθμός υπερκορεσμού, η θερμοκρασία, ο ρυθμός ψύξης, το ιξώδες του διαλύματος, η ταχύτητα ανάδευσης, η παρουσία άλλων ουσιών καθώς και η φύση του σακχάρου. Είναι γεγονός ότι, η πυρηνογένεση καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την μετέπειτα κρυσταλλική ανάπτυξη. Αναλυτικότερα, η αύξηση του βαθμού υπερκορεσμού συνιστά αύξηση του ρυθμού πυρηνογένεσης. Όμως, υπάρχει μία μέγιστη τιμή υπερκορεσμού που μπορεί να αποκτήσει το διάλυμα σε δεδομένες συνθήκες, με αποτέλεσμα, όταν ξεπεραστεί η τιμή αυτή, να παρατηρείται μείωση του ρυθμού (Hartel, 2001).

2.4.3.2. Κρυσταλλική ανάπτυξη

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων, αποτελεί το επόμενο στάδιο της διεργασίας της κρυστάλλωσης, όπου οι σταθεροί πυρήνες κρυστάλλωσης συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέχρι να δημιουργηθούν οι κρύσταλλοι. Η κρυσταλλική ανάπτυξη των περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Hartel & Shastry, 1991):

1. Διάχυση των δομικών μονάδων (συστάδες μορίων σακχάρου) από τον κύριο όγκο της υδατικής φάσης, στη στερεά διεπιφάνεια.
2. Πολυστροφισμός των σακχάρων, ώστε να μετασχηματιστούν στις κατάλληλες ανωμερείς μορφές.
3. Αποβολή των μορίων του νερού που συνδέονται με τα μόρια των σακχάρων, προερχόμενα από την υδατική φάση.
4. Απομάκρυνση των μορίων του νερού, που έχουν επικαθήσει πάνω στο κρυσταλλικό πλέγμα.
5. Προσανατολισμός των δομικών μονάδων στη στοιβάδα διάχυσης που δημιουργείται, μεταξύ της υδατικής και κρυσταλλικής φάσης.
6. Επιφανειακή διάχυση των δομικών μονάδων σε κατάλληλο σημείο ενσωμάτωσης στο κρυσταλλικό πλέγμα.
7. Ενσωμάτωση στο κρυσταλλικό πλέγμα με ταυτόχρονη αποβολή λανθάνουσας θερμότητας.

2.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση της λακτόζης

Τα άμορφα σάκχαρα, βρίσκονται σε μία μετασταθή κατάσταση και είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε αλλαγές της θερμοκρασίας ή υγρασίας, καθώς τείνουν πάντα να μεταβούν σε μία θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση, όπως η κρυσταλλική. Η θερμοκρασία καθώς και το μέγεθος της διακύμανσής της, η σχετική υγρασία του αέρα, ο βαθμός υπερκορεσμού αλλά και η παρουσία διαλυτών, προσθέτων και γενικά ξένων διεπαφών επιδρούν σημαντικά στις αλλαγές ήδη υφιστάμενων κρυσταλλικών δομών, αλλά και στο ρυθμό κρυστάλλωσης που λαμβάνει χώρα κατά την αποθήκευση και διανομή των τροφίμων. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός κρυστάλλωσης επηρεάζεται από τη σύνθεση του τροφίμου, δεδομένου ότι πολλά συστατικά επηρεάζουν τόσο την πυρηνογένεση, όσο και την κρυσταλλική ανάπτυξη (Hartel, 2001). Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση αναλύονται παρακάτω.

2.4.4.1. Επίδραση του βαθμού υπερκορεσμού

Ομοίως με τη διεργασία της πυρηνογένεσης, ο ρυθμός κρυσταλλικής ανάπτυξης επηρεάζεται σημαντικά από τον βαθμό υπερκορεσμού του συστήματος. Αρχικά, καθώς αυξάνεται ο βαθμός υπερκορεσμού, αυξάνεται και ο ρυθμός κρυσταλλικής ανάπτυξης. Υπάρχει όμως, ένα κρίσιμο σημείο υπερκορεσμού, στο οποίο παρατηρείται μείωση της μοριακής κινητικότητας και κατ' επέκταση της διάχυσης των μορίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός κρυστάλλωσης (Hartel, 2001). Για παράδειγμα, σε θερμοκρασία δωματίου η αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου πάνω από τη διαλυτότητά του (συγκέντρωση στο κορεσμένο διάλυμα), θα επιφέρει την αύξηση του βαθμού κρυστάλλωσης. Μόλις όμως η συγκέντρωση αυξηθεί τόσο, ώστε να περιορίζει τη διάχυση των μορίων, λόγω σημαντικής αύξησης του ιξώδους, ο ρυθμός κρυστάλλωσης θα αρχίσει να μειώνεται. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση του σακχάρου είναι αρκετά υψηλή (ελάχιστη περιεκτικότητα υγρασίας), η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης θα εξισωθεί με τη θερμοκρασία δωματίου, οπότε η μοριακή κινητικότητα θα μειωθεί δραστικά και ο ρυθμός κρυστάλλωσης σχεδόν θα μηδενιστεί.

2.4.4.2. Επίδραση της οξύτητας και της αλκαλικότητας

Η τιμή του pH είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την κρυστάλλωση της λακτόζης. Η επίδρασή της έχει αποδοθεί στην επίδραση που έχει στο ρυθμό του πολυστροφισμού, καθώς η κρυστάλλωση απομακρύνει μόνο ένα ανωμερές από την ισορροπία, το οποίο μπορεί να εξαντληθεί στην κρυσταλλική μορφή, εάν ο πολυστροφισμός είναι αργός. Η μετάβαση από α- σε β-λακτόζη επιταχύνεται σε αλκαλικό περιβάλλον ($\text{pH} > 7$) και σε αρκετά όξινο περιβάλλον ($\text{pH} < 1$). Ωστόσο, τα οργανικά οξέα που απαντώνται συνήθως στον ορό, όπως το οξικό και γαλακτικό οξύ, δεν παράγουν τη χαμηλή απαιτούμενη τιμή pH και ως εκ τούτου, δρουν ως αναστολείς στην κρυστάλλωση της λακτόζης. Στην ιδανική περίπτωση, η λακτόζη πρέπει να κρυσταλλώνεται από γλυκό ορό με όσο το δυνατόν υψηλότερη τιμή pH. Με βάση μελέτες που έχουν γίνει, οι αλκαλικές συνθήκες επιταχύνουν την κρυστάλλωση, αλλά επίσης ευνοούν τον σχηματισμό προϊόντων αποδόμησης της λακτόζης, που μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή της κρυστάλλωσης. Ωστόσο, η προσθήκη γαλακτικού ασβεστίου ή όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4), (και τα δύο αυξάνουν την τιμή pH), οδήγησε σε αντίθετα αποτελέσματα στην κρυστάλλωση, δείχνοντας επιπρόσθετα αποτελέσματα της μεταλλικής σύνθεσης και της ιοντικής ισχύος (Gänzle, 2008, Wong & Hartel 2014).

2.4.4.3. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η κρυστάλλωση των άμορφων ελαστοπλαστικών σακχάρων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) και μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης (T_m). Η επίδραση της θερμοκρασίας στη διεργασία της κρυστάλλωσης σχηματικά αποδίδεται με μία καμπύλη σχήματος καμπάνας, όπου η μέγιστη κορυφή βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές T_g και T_m . Η κρυστάλλωση των άμορφων σακχάρων επιταχύνεται με τη μείωση του ιξώδους και την αύξηση της διαχυτότητας και μοριακής κινητικότητας, ως αποτέλεσμα της αύξησης της θερμοκρασιακής διαφοράς $T - T_g$ (Eliasson, 2006).

Γενικότερα, εφόσον η κρυσταλλική ανάπτυξη είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού διαφορετικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα, η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό αφενός τον ρυθμό ενσωμάτωσης στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος και αφετέρου τη μεταφορά μάζας (διάχυση) από το σύστημα προς την κρυσταλλική επιφάνεια. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι κρύσταλλοι αυξάνουν κυρίως λόγω του μηχανισμού ενσωμάτωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες η μεταφορά μάζας αποτελεί τον κυρίαρχο μηχανισμό, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας συντελεί στη μείωση του ιξώδους του συστήματος και συνεπώς στην αύξηση της μοριακής κινητικότητας. Συνεπώς, η τιμή της θερμοκρασίας καθορίζει τον μηχανισμό που αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα της διεργασίας της κρυστάλλωσης (Hartel, 2001).

2.4.4.4. Επίδραση της παρουσίας πρόσθετων συστατικών

Οι τιμές της διαλυτότητας της λακτόζης σε διαλύματα ορού σχετίζονται άμεσα με τους ρυθμούς της κρυσταλλικής ανάπτυξης της λακτόζης. Ειδικότερα, ο ρυθμός ανάπτυξης των κρυστάλλων είναι χαμηλότερος σε διαλύματα ορού από ότι σε καθαρά διαλύματα λακτόζης. Η παρουσία πρόσθετων συστατικών, όπως η ριβοφλαβίνη ή το χλωριούχο κάλιο (KCl) θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για αυτό το αποτέλεσμα. Επίσης, το γαλακτικό οξύ θεωρείται αναστολέας της κρυστάλλωσης της λακτόζης, αν και δεν έχει γίνει ακόμη συστηματική μελέτη για να αποδειχθεί (Chandrapala, Wijayasinghe, Vasiljevic, 2016). Πολλά είδη αλάτων, όπως το χλωριούχο λίθιο (LiCl), το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το διυδροφωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), αναστέλλουν την κρυστάλλωση της λακτόζης μεταβάλλοντας τη διαλυτότητά της. Η προσθήκη διαφόρων αλάτων σε καθαρά διαλύματα λακτόζης έχει πολύ διαφορετικά αποτελέσματα στους

ρυθμούς ανάπτυξης των κρυστάλλων. Ορισμένα άλατα οδηγούν σε σημαντικά υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης κρυστάλλων και το αποτέλεσμά τους εξαρτάται και από τη συγκέντρωση των αλάτων. Έτσι, οι συγκεντρώσεις των αλάτων φαίνεται να είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τους ρυθμούς ανάπτυξης, με κάθε άλας να ασκεί διαφορετικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, ορισμένα άλατα φαίνεται να αλλάζουν και το σχήμα των κρυστάλλων (Gänzle, 2008, Wong, Hartel, 2014).

Επιπρόσθετα, η παρουσία άλλων σακχάρων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει ελαφρώς το ρυθμό κρυστάλλωσης. Αποτελέσματα από μελέτες των Nickerson και Moore (1974) δείχνουν ότι τουλάχιστον σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (5%), τα σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η μαλτόζη έχουν μόνο μία μικρή επίδραση στη συνολική ανάπτυξη της μονοϋδρικής α-λακτόζης, και πιο συγκεκριμένα αυξάνουν ελαφρώς το ρυθμό κρυσταλλικής ανάπτυξης.

Πέρα από τα παραπάνω, η παρουσία πρωτεϊνών προωθεί την πυρήνωση, αλλά επιβραδύνει την ανάπτυξη των κρυστάλλων λακτόζης (Mimouni et al., 2005). Η κρυστάλλωση της λακτόζης μπορεί, επίσης, να επιβραδυνθεί με την παρουσία πολυσακχαριτών ή άλλων μακρομορίων (Elliason, 2006). Οι πολυσακχαρίτες ενδέχεται να παρεμποδίσουν τη διάχυση των μορίων της λακτόζης και να οδηγήσουν σε μειωμένη πυρήνωση και ανάπτυξη κρυστάλλων. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία GOS οδηγεί σε αξιοσημείωτη επιβράδυνση στην κρυστάλλωση της λακτόζης (Smart & Smith, 1991). Η επίδραση ορισμένων πρόσθετων συστατικών παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Επίδραση πρόσθετων συστατικών στην κρυστάλλωση της λακτόζης (Πηγή: Wong, Hartel, 2014).

Πρόσθετα	Επίδραση
Χλωριούχο λίθιο (LiCl), Θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄)	Αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, μείωση της διαλυτότητας της λακτόζης.
Όξινο φωσφορικό κάλιο (K ₂ HPO ₄)	Μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, αύξηση της διαλυτότητας της λακτόζης.
Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂)	Αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, μείωση της διαλυτότητας της λακτόζης. Προωθεί (περιεκτικότητα <10%) και αναστέλλει την ανάπτυξη (περιεκτικότητα > 10%).
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	Προωθεί (περιεκτικότητα <5%) και αναστέλλει την ανάπτυξη (περιεκτικότητα > 5%).
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH ₂ PO ₄)	Προωθεί την ανάπτυξη.

Γαλακτικό οξύ	Επιβραδύνει την κρυστάλλωση της λακτόζης.
Πρωτεΐνες	Ευνοεί την πυρηνογένεση τοπικά, με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών κρυστάλλων/πυρήνων και καθυστερεί την ανάπτυξη των κρυστάλλων.
Ριβοφλαβίνη	Αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των κρυσταλλικών επιφανειών.

2.4.4.5. Επίδραση της ενεργότητας νερού

Η κρυστάλλωση της λακτόζης μπορεί να συμβεί, όταν η σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης είναι υψηλότερη από την κρίσιμη σχετική υγρασία αποθήκευσης στη θερμοκρασία αποθήκευσης. Τέτοιες κρίσιμες σχετικές υγρασίες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου φαίνονται στον Πίνακα 2.4. Ο ρυθμός κρυστάλλωσης έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται με την αύξηση της σχετικής υγρασίας αποθήκευσης σε σταθερή θερμοκρασία ή με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης σε σταθερή περιεκτικότητα σε νερό (Eliasson, 2006).

Πίνακας 2.4. Κρίσιμες τιμές περιεχόμενου νερού και σχετικής υγρασίας (Πηγή: Eliasson, 2006).

	Θερμοκρασία (°C)	Κρίσιμη τιμή περιεχόμενου νερού (g H ₂ O/100 g στερεού)	Κρίσιμη σχετική υγρασία (%)
Λακτόζη ξήρανση με λυοφιλίωση	24	6,8	37
Λακτόζη, ξήρανση με ψεκασμό	23	7,5	37
Λακτόζη	25	7,2	33
Λακτόζη με πρωτεΐνες ορού, ξήρανση με ψεκασμό	23	6,9	36

2.4.5. Κρυστάλλωση: Χρησιμότητα και Προβλήματα

Στη βιομηχανία τροφίμων η διαδικασία της κρυστάλλωσης χρησιμοποιείται για δύο συγκεκριμένους σκοπούς. Πρώτον, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μιας στερεάς φάσης διαφορετικής σύνθεσης από την υγρή φάση, όπου το ένα ή και τα δύο κλάσματα μπορεί να είναι πολύτιμα. Εναλλακτικά, η κρυστάλλωση χρησιμοποιείται χωρίς να πραγματοποιείται διαχωρισμός των κλασμάτων, για τον έλεγχο ή την επίτευξη επιθυμητών αλλαγών στην υφή που έχει το στερεό προϊόν. Η κρυστάλλωση μπορεί να χρησιμεύσει για την ανάκτηση κρυσταλλικών προϊόντων (γλυκόζη, λακτόζη, κιτρικό οξύ, άλας), για την απομάκρυνση ορισμένων ανεπιθύμητων συστατικών ή για τροποποίηση ορισμένων προϊόντων διατροφής προκειμένου να ληφθεί μία επιθυμητή δομή.

Ο έλεγχος της διαδικασίας κρυστάλλωσης μπορεί να επηρεάσει εάν ένα συγκεκριμένο προϊόν μπορεί να έχει απαλή υφή ή εάν θα προσδίδει χαλικιώδη αίσθηση στο στόμα. Αυτή η δομή, μαζί με άλλα δομικά στοιχεία (γαλακτώματα, κυψέλες αέρα, κ.λπ.), καθορίζουν την εμφάνιση του προϊόντος (π.χ., δημητριακά), τις μηχανικές ιδιότητες κατά τη διάρκεια του χειρισμού (π.χ. ικανότητα επάλειψης του βουτύρου), την αίσθηση στο στόμα κατά την κατανάλωση (π.χ. απαλότητα του παγωτού), και σταθερότητα στο ράφι (π.χ. λιπαρότητα). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η δημιουργία κρυστάλλων είναι κάτι επιθυμητό, σε άλλες είναι κάτι που πρέπει να αποφευχθεί. Είναι σημαντικό να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά και η ποιότητα των κρυστάλλων σε διαφορετικά τρόφιμα. Το βούτυρο, η μαργαρίνη, το παγωτό, η ζάχαρη και η σοκολάτα περιέχουν διαφορετικούς τύπους κρυστάλλων, αν και όλοι περιέχουν κρυστάλλους λίπους. Για παράδειγμα, το παγωτό έχει κρυστάλλους λίπους, κρυστάλλους πάγου και μερικές φορές κρυστάλλους λακτόζης.

Οι αρχές κρυστάλλωσης και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κρυστάλλων λακτόζης έχουν εφαρμοστεί στα γαλακτοκομικά προϊόντα για να γίνουν κατανοητές οι συνέπειες των συνθηκών επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν λακτόζη, στην ποιότητά τους. Ένα από τα πιο δυσάρεστα ελαττώματα υφής στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η αίσθηση «άμμου» κατά τη γεύση, που μπορεί να εμφανιστεί ιδιαίτερα στο παγωτό και το Νορβηγικό τυρί. Το πρόβλημα αυτό προκαλείται από κρύσταλλους λακτόζης που είναι αρκετά μεγάλοι για να είναι ανιχνεύσιμοι στο στόμα, αλλά δεν διαλύονται εύκολα, δημιουργώντας έτσι ακατέργαστη ή κοκκώδη αίσθηση. Το «αμμώδες» παγωτό προκαλείται από την παρουσία κρυστάλλων α-λακτόζης. Αν ένα διάλυμα που περιέχει α- και β-λακτόζη σε ισορροπία συμπυκνώνεται μέχρι να ξεπεραστεί το σημείο κορεσμού της α-λακτόζης και όχι της β-λακτόζης, τότε κρυσταλλώνεται μόνο η α-μορφή. Σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, η κρυστάλλωση λακτόζης μπορεί να αποφευχθεί. Σε άλλα, αυτό είναι αδύνατο ή ανεπιθύμητο, έτσι ώστε η προσοχή να εστιάζεται απαραίτητως στον περιορισμό του μεγέθους των κρυστάλλων σε ακατάλληλα μεγέθη.

Η εμφάνιση συσσωματωμάτων διαφόρων μεγεθών σε σκόνη λακτόζης, που αναφέρεται ως «caking» είναι ένα ακόμη πρόβλημα που σχετίζεται με την κρυστάλλωση της λακτόζης και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό στερεών γεφυρών μεταξύ των μορίων της, λόγω υγρασίας, μεταβολών θερμοκρασίας και πίεσης. Η συσσωμάτωση είναι ένα επαναλαμβανόμενο πρόβλημα σε διάφορες βιομηχανίες, είτε συμβαίνει κατά την παραγωγή, αποθήκευση ή μεταφορά σκόνης. Η κονιοποιημένη σκόνη έχει ως

αποτέλεσμα μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας και μειωμένη ποιότητα προϊόντος, οδηγώντας σε σημαντική οικονομική απώλεια (Carpin et. al,2016).

Κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων ενζυμικών αντιδράσεων, έχει παρατηρηθεί ότι η κρυστάλλωση της λακτόζης μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα και να δράσει παρεμποδιστικά για τη δημιουργία γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η κρυστάλλωση συνδέεται γενικά με τη διαχείριση των ορών πριν και μετά τις ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για τη σύνθεση των GOS. Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται διαχείριση του ορού με διάφορες εναλλαγές της θερμοκρασίας και πιο συγκεκριμένα, η κατάψυξη αυτού ή η θέρμανσή του σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες έως και 60 °C, καθώς επίσης και συμπύκνωσή του κοντά στο σημείο κορεσμού της λακτόζης, για την επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης των αντιδράσεων ολιγομερισμού. Επίσης, μετά την ενζυμική αντίδραση απαιτείται απενεργοποίηση του ενζύμου, με θέρμανση του ορού στους 100°C. Οι διεργασίες πριν και μετά την ενζυμική αντίδραση επιταχύνουν την κρυστάλλωση, η οποία είναι ανεπιθύμητη καθώς μετά ο ορός δε μπορεί να είναι χρήσιμος.

2.4.6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση της μελέτης του φαινομένου κρυστάλλωσης της λακτόζης

Οι Mazzobre, Aguilera και Buera, (2001,2003) μελέτησαν την κινητική της κρυστάλλωσης άμορφης λακτόζης και μείγματος λακτόζης-τρεαλόζης, σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και παρατήρησαν ότι υπήρξε μία ξεκάθαρη τάση αύξησης του ρυθμού κρυστάλλωσης, αυξανομένης της θερμοκρασίας. Ωστόσο ανέφεραν ότι η προσθήκη της τρεχαλόζης σε άμορφο σύστημα λακτόζης καθυστέρησε την κρυστάλλωση, χωρίς να επηρεάσει την T_g . Η αιτιολόγηση βασίστηκε σε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο σακχάρων στο κρυσταλλικό πλέγμα ή στη στερεοχημική παρεμπόδιση (steric hindrance), που επιβράδυναν τόσο το ρυθμό πυρηνογένεσης όσο και της κρυστάλλωσης. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι τιμές της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης των δύο αυτών σακχάρων είναι παρόμοιες, όποτε η ανάμειξή τους σε οποιοδήποτε ποσοστό δεν έχει άμεση επίδραση στη T_g του μείγματος.

Οι Elmonsef-Omar και Roos (2007), προσδιόρισαν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης σε λυοφιλωμένα δείγματα λακτόζης και μείγματος λακτόζης με άλατα (διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο, ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο και χλωριούχο κάλιο) (9:1 w/w) σε διάφορες περιεκτικότητες υγρασίας. Το νερό είναι γνωστό

ότι λειτουργεί ως πλαστικοποιητής και διευκολύνει την κρυστάλλωση. Η κρυστάλλωση στην παρούσα μελέτη είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια ροφημένου νερού από τη λακτόζη. Η κρυστάλλωση των καθαρών μειγμάτων λακτόζης και λακτόζης-άλατος παρατηρήθηκε σε $RVP \geq 44,0\%$ εντός 24 h. Σε $RVP \geq 54,4\%$ το περιεχόμενο νερού ήταν μεγαλύτερο σε μείγματα λακτόζης/ $CaCl_2$ και λακτόζης / $MgCl_2$ από ότι στην καθαρή λακτόζη και σε μείγματα λακτόζης/ $NaCl$, λακτόζης/ KCl . Τα μείγματα άνδυρης λακτόζης/ $CaCl_2$ και λακτόζης/ $MgCl_2$ είχαν υψηλότερες θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης από την καθαρή λακτόζη, αλλά τα άλλα άλατα ($NaCl$ και KCl) μαζί με τη λακτόζη είχαν χαμηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης από την άμορφη λακτόζη. Φαίνεται ότι τα δισθενή άλατα σε μείγματα με λακτόζη έχουν υψηλότερη T_g από τα μικρότερα μονοσθενή ιόντα. Τελικά, συμπεράναν ότι η επίδραση στην κρυστάλλωση της λακτόζης ήταν υψηλότερη με χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) και χαμηλότερη με χλωριούχο κάλιο (KCl). Φαίνεται ότι διαφορετικά άλατα αλληλεπιδρούν με τη λακτόζη σε διαφορετικά επίπεδα και κατέληξαν η τιμή της T_g μειώνεται, αυξανόμενη της περιεχόμενης υγρασίας.

Οι Roos και Karel (1992) μελέτησαν την κρυστάλλωση άμορφης λακτόζης σε σταθερή περιεκτικότητα σε νερό και σε σταθερή σχετική υγρασία πάνω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g). Ο ρυθμός κρυστάλλωσης μελετήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Η κρυστάλλωση σε σταθερό υγρό περιεχόμενο αύξησε την ποσότητα νερού στην υπόλοιπη άμορφη μήτρα, η οποία μείωσε την T_g και επιτάχυνε την κρυστάλλωση. Σε σταθερή σχετική υγρασία η κρυστάλλωση προχώρησε με ρυθμό που καθορίστηκε από $T-T_g$ ο οποίος αυξήθηκε με την κρυσταλλικότητα. Επιβεβαιώθηκε ότι η εξάρτηση της θερμοκρασίας από το χρόνο ολοκλήρωσης της κρυστάλλωσης ακολουθεί την εξίσωση Williams-Landel-Ferry (WLF).

Οι Chandrapala, Wijayasinghe και Vasiljevic (2016) μελέτησαν τη φυσική κατάσταση και τη θερμική συμπεριφορά της λακτόζης κατά την κρυστάλλωση παρουσία γαλακτικού οξέος (LA) και ασβεστίου (Ca), προκειμένου να αναπτυχθούν κατάλληλες στρατηγικές για τη βελτίωση της επεξεργασίας του ορού. Συγκεκριμένα, η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης LA (1% w/w) οδήγησε σε μείωση των κρυστάλλων λακτόζης (~ 59%). Αυτό το αποτέλεσμα μετριάστηκε μειώνοντας την περιεκτικότητα σε LA (0,2% w/w) που βελτίωσε την απόδοση (~ 77%). Σε υψηλή περιεκτικότητα σε LA, μικρές ποσότητες Ca (0,072% w/w) φάνηκαν να μειώνουν την αρνητική επίδραση της παρουσίας LA αυξάνοντας την απόδοση. Το καθαρό διάλυμα λακτόζης απέδωσε σωματίδια λακτόζης ~ 84 μm . Το μέγεθος των κρυστάλλων αυξήθηκε ελαφρώς στα ~ 91 μm στο σύστημα που περιείχε υψηλές συγκεντρώσεις LA μαζί με χαμηλή συγκέντρωση

Ca παρόλο που η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων τόσο LA (0,2% w/ w) όσο και Ca (0,072% w/ w) είχε ως αποτέλεσμα κρυστάλλους μεγέθους ~ 163 μm. Τα μόρια νερού στο στρώμα ενυδάτωσης γύρω από τα μόρια λακτόζης φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο που διέπει τη συμπεριφορά κρυστάλλωσης και τα χαρακτηριστικά των κρυστάλλων λακτόζης παρουσία LA και Ca. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνση κάποιου Ca σε συγκεντρώσεις 0,072% w/w από όξινο ορό μπορεί να βελτιώσει την κρυστάλλωση της λακτόζης και έτσι να οδηγήσει σε βελτίωση της επεξεργασίας του ορού.

Οι Fu, Miao, Ma, Ding, Ye και Liu (2019) διερεύνησαν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της άμορφης λακτόζης αναμεμειγμένης με γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS). Συγκεκριμένα, η απορρόφηση νερού, η θερμοκρασία μετάπτωσης T_g και η συμπεριφορά κρυστάλλωσης της λακτόζης με την παρουσία GOS (1:1 w/w) μετρήθηκαν σε διάφορες ενεργότητες νερού (0,11-0,75 a_w , 25 °C) και αξιολογήθηκε επίσης ο πολυστροφισμός της λακτόζης. Όλα συγκρίθηκαν με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστημάτων τρεαλόζης-λακτόζης (1:1 w/w). Η προσθήκη GOS στη λακτόζη αύξησε την υγροσκοπικότητα του μείγματος, καθώς επίσης αύξησε ελαφρώς τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης σε σύγκριση με την καθαρή λακτόζη. Η κρίσιμη ενεργότητα νερού ($a_w = 0,68$) κατά την κρυστάλλωση της λακτόζης αυξήθηκε με την προσθήκη GOS σε σύγκριση με εκείνη της τρεαλόζης-λακτόζης (1:1 w/w) ($a_w = 0,58$) ή της καθαρής λακτόζης ($a_w = 0,44$). Μελετήθηκε η αναστολή της κρυστάλλωσης της λακτόζης με μία χαμηλότερη κινητική σταθερά κρυστάλλωσης και η εναλλαγή των κρυσταλλικών μορφών λακτόζης παρουσία GOS σε σύγκριση με τη συμπεριφορά κρυστάλλωσης της τρεαλόζης-λακτόζης (1:1 w/w) και της καθαρής λακτόζης σε ενεργότητα 0,68 και 0,75 στους 25 °C. Συμπέραναν ότι, χωρίς να επηρεάζεται η T_g , κρυστάλλωση της λακτόζης, με σημαντική χρονική καθυστέρηση, στο μείγμα GOS-λακτόζης (1:1 w/w) ήταν πιο πιθανή λόγω της αλλαγής στον πολυστροφισμό της λακτόζης. Σε σύγκριση με την τρεαλόζη που είναι αποτελεσματικός αναστολέας, οι GOS έχουν ισχυρότερη ικανότητα να αποτρέπουν τη λακτόζη από την κρυστάλλωση σε ένυδρες μήτρες.

Οι Jelen και Coulter (2006) μελέτησαν την επίδραση του χλωριούχου ασβεστίου, του φωσφορικού νατρίου και του χλωριούχου καλίου στο ρυθμό ανάπτυξης κρυστάλλων μονοένυδρης α-λακτόζης από γλυκό ορό (η πρωτεΐνη αφαιρείται) στους 50 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες, βρέθηκε ότι καθένα από τα άλατα προκάλεσε σημαντική αύξηση του ρυθμού κρυσταλλικής ανάπτυξης. Για το χλωριούχο ασβέστιο και το χλωριούχο κάλιο, υψηλότερες συγκεντρώσεις (> 5 έως 10 %) οδήγησαν σε επακόλουθες μειώσεις του ρυθμού ανάπτυξης. Δηλαδή, η επίδραση του ρυθμού ανάπτυξης βρέθηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του άλατος, με τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης να εμφανίζεται

μεταξύ 5 έως 10% προσθήκης αυτών των αλάτων. Το φωσφορικό νάτριο, από την άλλη πλευρά, έδειξε μία συνεχή αύξηση του ρυθμού κρυσταλλικής ανάπτυξης για συγκέντρωση του άλατος έως και 20%.

Γενικά, η επίδραση των αλάτων, των πρωτεϊνών και της ενεργότητας νερού στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και στην κρυστάλλωση της λακτόζης δεν είναι αρκετά κατανοητές. Επιπλέον, επειδή μία από τις κύριες διαφορές σύνθεσης μεταξύ όξινου και γλυκού ορού γάλακτος είναι η παρουσία γαλακτικού οξέος, θα ήταν ωφέλιμο να διαπιστωθεί η επίδραση της παρουσίας γαλακτικού οξέος στην αλλαγή της συμπεριφοράς του νερού και έτσι να προβλεφθεί η συμπεριφορά κρυστάλλωσης της λακτόζης. Από αυτή την άποψη, λείπει μία συστηματική μελέτη, που θα συμβάλλει επίσης στην επεξεργασία του ορού και κατά συνέπεια στην ανάκτηση κρυστάλλων λακτόζης.

Συνεπώς, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, παράλληλα με την μελέτη της αξιοποίησης των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας για την παραγωγή πρεβιοτικών γαλακτοολιγοσακχαριτών, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη του φαινομένου κρυστάλλωσης της λακτόζης, του κύριου συστατικού του όξινου και γλυκού ορού, το οποίο μπορεί να δράσει παρεμποδιστικά προς τον ενζυμικό ολιγομερισμό της λακτόζης. Κατά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων λακτόζης στον ορό οδηγούν συχνά στην κρυστάλλωση και καταβύθιση της λακτόζης, με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμη ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων, μειώνοντας τον βαθμό απόδοσής τους. Προκειμένου, λοιπόν, για τον ολοκληρωμένο σχεδιασμό και την αριστοποίηση της ενζυμικής διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο και γλυκό ορό, κρίνεται απαραίτητη η διεξοδική μελέτη των τεχνολογικών χαρακτηριστικών και του φαινομένου της κρυστάλλωσης της λακτόζης, καθώς και των παραγόντων που το επηρεάζουν, σαν συνάρτηση της παρουσίας των κυριότερων συστατικών του ορού (πρωτεΐνες, γαλακτικό οξύ, γαλακτόζη) σε μείγματα λακτόζης.

2.5. Εφαρμογές της λακτόζης στη βιομηχανία τροφίμων

Η λακτόζη τυγχάνει πληθώρας χρήσεων σε τρόφιμα, όπως βρεφικές τροφές, προϊόντα σοκολατοποιίας και ζαχαροπλαστικής, αρτοσκευάσματα και άλλα επεξεργασμένα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων κρέατος (Torres et al.,

2010). Λόγω της σχετικά χαμηλής γλυκύτητας και της χαμηλής διαλυτότητας της λακτόζης, οι εφαρμογές της είναι πολύ πιο περιορισμένες από αυτές της σακχαρόζης και της γλυκόζης. Η κύρια εφαρμογή της είναι στην παραγωγή βρεφικών τροφών με βάση το αγελαδινό γάλα (το ανθρώπινο μητρικό γάλα περιέχει περίπου 7 % λακτόζη σε σύγκριση με το 4,8 % στο αγελαδινό γάλα). Η λακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως κρυσταλλικό προϊόν, είτε ως αφυαλατωμένος ορός (για βιολογικούς λόγους, είναι απαραίτητο να μειωθεί η συγκέντρωση των οργανικών αλάτων στον ορό αγελαδινού γάλακτος) (Fox, 2011).

Για την κατανόηση της παραγωγής της λακτόζης, είναι χρήσιμο να κατανοηθούν οι αγορές που υπάρχουν για αυτό το προϊόν και οι απαιτήσεις τους αναφορικά με την ποιότητα του προϊόντος. Οι κύριες αγορές της λακτόζης είναι ως συμπλήρωμα για βρεφικές τροφές από σκόνη γάλακτος και ως συστατικό στην ζαχαροπλαστική, την αρτοποιία και άλλα τρόφιμα.

Ο Henry Nestlé ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε ότι το αγελαδινό γάλα, το οποίο περιέχει κατά μέσον όρο λακτόζη σε ποσοστό 4,5 %, θα ήταν πιο θρεπτικό αν το περιεχόμενο σε λακτόζη αυξανόταν στο 7 %, το οποίο αντιστοιχεί το ποσοστό της λακτόζης στο μητρικό γάλα. Ήταν εκείνος που παρήγαγε την πρώτη βρεφική τροφή με αυξημένη περιεκτικότητα σε λακτόζη και ανακάλυψε ότι τα προβλήματα που προηγουμένως σχετίζονταν με τη διατροφή των βρεφών με γάλα που παρασκευαζόταν απευθείας από σκόνη πλήρους αγελαδινού γάλακτος επιλύθηκαν εν πολλοίς λόγω του αυξημένου ενεργειακού περιεχομένου αυτής, λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε λακτόζη.

Η απαίτηση για βρεφικές τροφές που να είναι όμοιες με το μητρικό γάλα ανοίγει μια νέα αγορά για τη λακτόζη, καθώς αυτή είναι το πιο λογικό υπόστρωμα για την παραγωγή ολιγοσακχαριτών. Έχει αναγνωριστεί εδώ και μερικά χρόνια ότι ο αριθμός των ολιγοσακχαριτών του μητρικού γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 50 και 200. Η συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών στο μητρικό γάλα ανέρχεται σε 5-8 g/L, ενώ υπάρχουν μόνο σε ίχνη στο αγελαδινό γάλα. Αυτοί έχουν αναγνωριστεί ως η αιτία της διαφοράς στην ποιότητα των κοπράνων μεταξύ των βρεφών που τρέφονται με βρεφικές τροφές και αυτών που θηλάζονται. Έρευνες των τελευταίων ετών έχουν δείξει ότι αυτοί οι ολιγοσακχαρίτες έχουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις στο κατώτερο έντερο, καθώς και πρεβιοτικές ιδιότητες. Έτσι, υπάρχει κίνητρο για την προσθήκη ενός μείγματος ολιγοσακχαριτών στις βρεφικές τροφές. Η έρευνα διεξάγεται διαρκώς για τον προσδιορισμό εκείνων των ολιγοσακχαριτών που είναι περισσότερο επωφελείς για το

βρέφος και τη βέλτιστη πηγή β-γαλακτοζιδάσης για την παραγωγή ολιγοσακχαριτών από λακτόζη.

Στην αρτοποιία, η λακτόζη χρησιμοποιείται λόγω της ικανότητάς της να επιβιώνει της ζύμωσης από τη μαγιά και να αποτελεί ένα αναγωγικό σάκχαρο για τις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης (Maillard) που δίνει τη δυνατότητα για την παραγωγή αρτοποιημάτων με την επιθυμητή καφέ κρούστα. Στην παραγωγή ορισμένων ειδών ζαχαροπλαστικής, η ικανότητα της λακτόζης να παράγει μια ανώτερης ποιότητας καραμέλα την καθιστά μια πιο ελκυστική επιλογή ανάμεσα σε άλλα σάκχαρα. Άλλος ένας λόγος για την επιλογή της λακτόζης στην αρτοποιία και τη ζαχαροπλαστική αποτελεί το γεγονός ότι έχει χαμηλότερη γλυκύτητα από τη σακχαρόζη και προσφέρει καλύτερη αίσθηση στο στόμα. Η λακτόζη που απαιτείται για την παρασκευή τροφίμων πρέπει να είναι επιπέδου καθαρότητας που να χαρακτηρίζεται ως βρώσιμη, αλλά δεν χρειάζεται να είναι υπερκαθαρή. Αυτή η αγορά καταναλώνει περί τους 780.000 tn λακτόζης ετησίως (Paterson, 2011).

Η λακτόζη τυγχάνει μιας σειράς περιορισμένων, εξειδικευμένων εφαρμογών στην βιομηχανία τροφίμων, για παράδειγμα ως παράγοντας ελεύθερης ροής (free-flowing agent) ή παράγοντας συσσωμάτωσης (agglomerating agent), για την ενίσχυση του αρώματος ορισμένων τροφίμων, για τη βελτίωση της λειτουργικότητας μαγειρικών λιπών και ως φορέας διασποράς για χρωστικές και αρωματικές ουσίες ή ένζυμα.

Διάφορα υψηλής αξίας βρώσιμα παράγωγα της λακτόζης μπορούν να παραχθούν, εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι τα ακόλουθα:

- Σιρόπια γλυκόζης-γαλακτόζης, τα οποία είναι περίπου 3 φορές πιο γλυκά από τη λακτόζη, μπορούν να παραχθούν μέσω υδρόλυσης με ισχυρά οξέα ή, συνηθέστερα, μέσω της δράσης μιας β-γαλακτοζιδάσης. η τεχνολογία παραγωγής σιροπιών γλυκόζης-γαλακτόζης έχει αναπτυχθεί αρκετά, αλλά τα προϊόντα δεν είναι οικονομικά ανταγωνιστικά προς άλλα γλυκαντικά (σιρόπια σακχαρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης ή συνθετικά γλυκαντικά).
- Οι πολλές αλκοολικές ομάδες των σακχάρων, περιλαμβανομένης της λακτόζης, έχουν υψηλή δραστικότητα και επιτρέπουν την παραγωγή πολλών παραγώγων. Ωστόσο, τα χημικά παράγωγα της λακτόζης δεν παράγονται εμπορικά, πιθανώς λόγω της δυνατότητας παραγωγής παρόμοιων προϊόντων από άλλα, φθηνότερα σάκχαρα. Για παράδειγμα, το τριχλωριωμένο παράγωγο της σακχαρόζης, η σουκραλόζη, γνωστή με το εμπορικό όνομα «Splenda» (E955), αποτελεί ένα πολύ επιτυχημένο τεχνητό γλυκαντικό, η οποία είναι έως και 1000 φορές πιο γλυκιά από

την σακχαρόζη, 2 φορές πιο γλυκιά από την ζαχαρίνη και 4 φορές πιο γλυκιά από την ασπαρτάμη.

- Το εμπορικά πιο επιτυχημένο παράγωγο της λακτόζης είναι η λακτουλόζη (γαλακτόζη-φρουκτόζη) που παράγεται με επιμερισμό του μονομερούς της γλυκόζης στο μόριο της λακτόζης προς φρουκτόζη, υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες. Η λακτουλόζη τυγχάνει πληθώρας εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης της ως πρεβιοτικό και ήπιο καθαρτικό.
- Η καρβονυλομάδα της λακτόζης μπορεί να αναχθεί προς λακτιτόλη. Η λακτιτόλη, η οποία χρησιμοποιείται ως ένα χαμηλού θερμιδικού φορτίου γλυκαντικό κατάλληλο για διαβητικούς, μπορεί να εστεροποιηθεί με διάφορα λιπαρά οξέα και τα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γαλακτωματοποιητές ανάλογοι προς τις σορβιτάνες (εστέρες της σορβιτόλης).
- Η καρβονυλομάδα της λακτόζης μπορεί να οξειδωθεί προς λακτοβιονικό οξύ. Το λακτοβιονικό οξύ είναι ένα οξύ με γλυκιά γεύση, μια πολύ σπάνια ιδιότητα η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Το λακτοβιονικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω ηλεκτροχημικής οξειδωσης, μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας οξειδοαναγωγάσες γλυκόζης-φρουκτόζης, ή μέσω καλλιέργειας μικροοργανισμών.
- Η ταγατόζη, το κετο-ανάλογο της γαλακτόζης, υπάρχει σε μικρές ποσότητες στη ρητίνη του αιθαλούς δένδρου *Sterculia setigera*, σε υπερβολικά θερμασμένο γάλα, ή σε αποθηκευμένη σκόνη γάλακτος. Μπορεί να παραχθεί με επεξεργασία υδρολυμένης λακτόζης (μέσω ενζυμικής αντίδρασης με β-γαλακτοζιδάση) με ασθενή βάση, όπως το $\text{Ca}(\text{OH})_2$, το οποίο μετατρέπει τη γαλακτόζη σε ταγατόζη. Η ταγατόζη είναι σχεδόν όσο γλυκιά είναι η σακχαρόζη, έχει μια «καλής ποιότητας» γλυκιά γεύση και ενισχύει το άρωμα άλλων γλυκαντικών. Δεν απορροφάται σημαντικά από το λεπτό έντερο, οπότε έχει πρεβιοτικές ιδιότητες, ενώ δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την γλυκόζη του αίματος. Η ταγατόζη ζυμώνεται στο κατώτερο έντερο προς λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, τα οποία απορροφώνται και παρέχουν περίπου το 35 % της ενέργειας που αποκτάται από τα σάκχαρα που καταβλίζονται με τον κλασικό τρόπο. Η ταγατόζη είναι αναγνωρισμένη γενικά ως ασφαλής (Generally Recognized As Safe, GRAS) και παράγεται εμπορικά από την «SweetGredients», μια εταιρεία που σχηματίστηκε από τις εταιρείες «Arla Dairies» και «Nordzucker» στην Δανία.

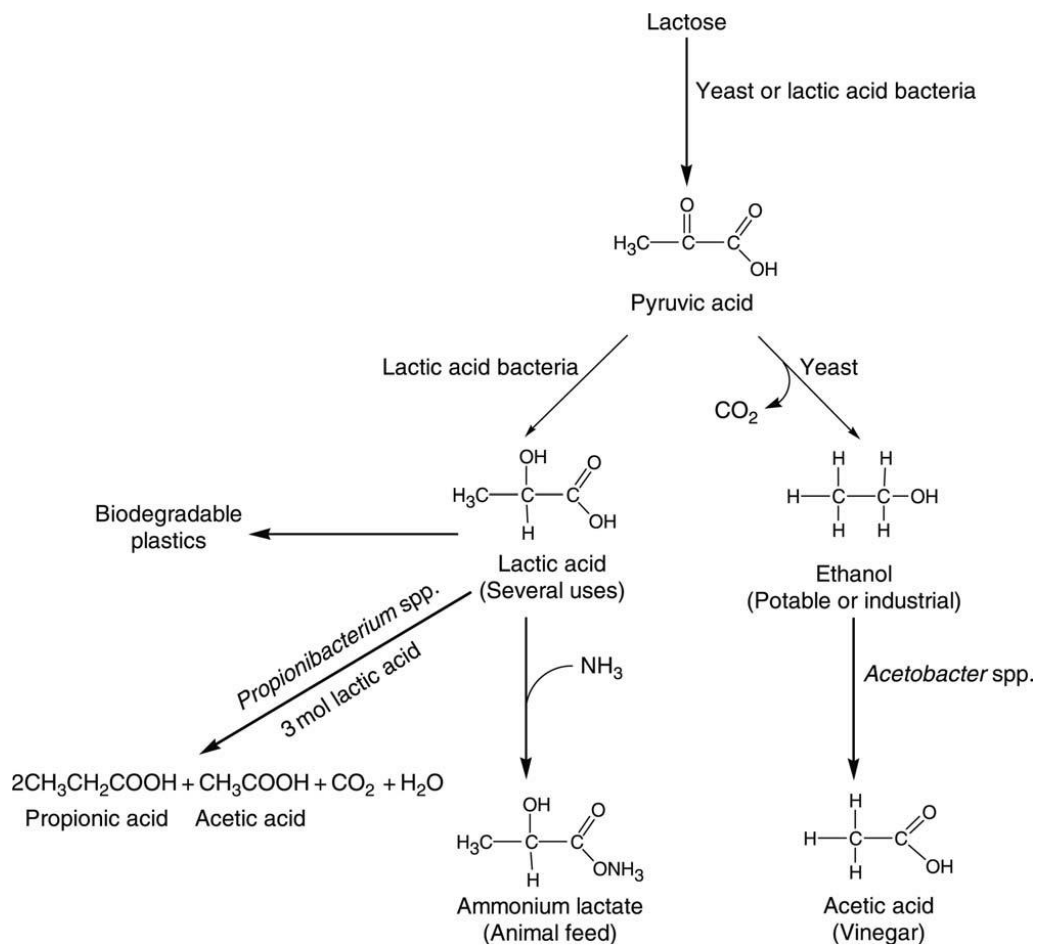
- Η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα ένζυμο που κανονικά δρα ως υδρολάση, ωστόσο έχει και ενεργότητα τρανσφεράσης και, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, αυτή η ενεργότητα επικρατεί, οπότε παράγονται ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από 2-10 μονομερή σάκχαρα. Αυτοί οι ολιγοσακχαρίτες έχουν ενδιαφέρουσες φυσικοχημικές ιδιότητες και αποτελούν πολύτιμα συστατικά τροφίμων, αλλά το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στρέφεται στις πρεβιοτικές ιδιότητές τους, όπως παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο XX. Οι ολιγοσακχαρίτες που παράγονται μέσω της δράσης μιας β-γαλακτοζιδάσης δεν θα πρέπει να μπερδεύονται με τους ενδογενείς ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος.
- Η λακτόζη μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων ζύμωσης, από τα οποία ξεχωρίζουν η αιθανόλη, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και τα πλαστικά με βάση το γαλακτικό οξύ.

Η παραγωγή αιθανόλης από λακτόζη μέσω ζύμωσης με χρήση των μικροοργανισμών *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis* πραγματοποιείται εμπορικά τα τελευταία 40 χρόνια. Αν η αιθανόλη χρησιμοποιηθεί σε πόσιμα προϊόντα, αυτή η διεργασία είναι οικονομικά βιώσιμη. Ωστόσο, η αιθανόλη που παράγεται από ορό δεν είναι αναγνωρισμένη ως πόσιμη σε κάποιες χώρες.

Η οξειδωση της αιθανόλης από τα είδη του γένους *Acetobacter* προς οξικό οξύ για την παραγωγή ξιδιού ή άλλες εφαρμογές είναι τεχνικά εφικτή, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι οικονομικά βιώσιμη.

Η in situ ζύμωση της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχει ευρεία εφαρμογή στην παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ζύμωση της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ για τρόφιμα ή άλλες βιομηχανικές εφαρμογές (συμπεριλαμβανομένου του πολυγαλακτικού οξέος, ενός βιοαποικοδομήσιμου πλαστικού παραγόμενο από γαλακτικό οξύ) είναι τεχνικά εφικτή αλλά δεν είναι οικονομικά ανταγωνιστική προς την παραγωγή του με ζύμωση άλλων σακχάρων ή με χημική σύνθεση.

Το γαλακτικό οξύ μπορεί να μετατραπεί από τα είδη του γένους *Propionibacterium* σε προπιονικό οξύ (με παραγωγή οξικού οξέος, CO₂ και H₂O ως παραπροϊόντα), το οποίο χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά όπως και τα υπόλοιπα προϊόντα ζύμωσης που περιγράφονται παραπάνω, αυτή η μετατροπή μπορεί να μην είναι οικονομικά βιώσιμη (Fox, 2011).

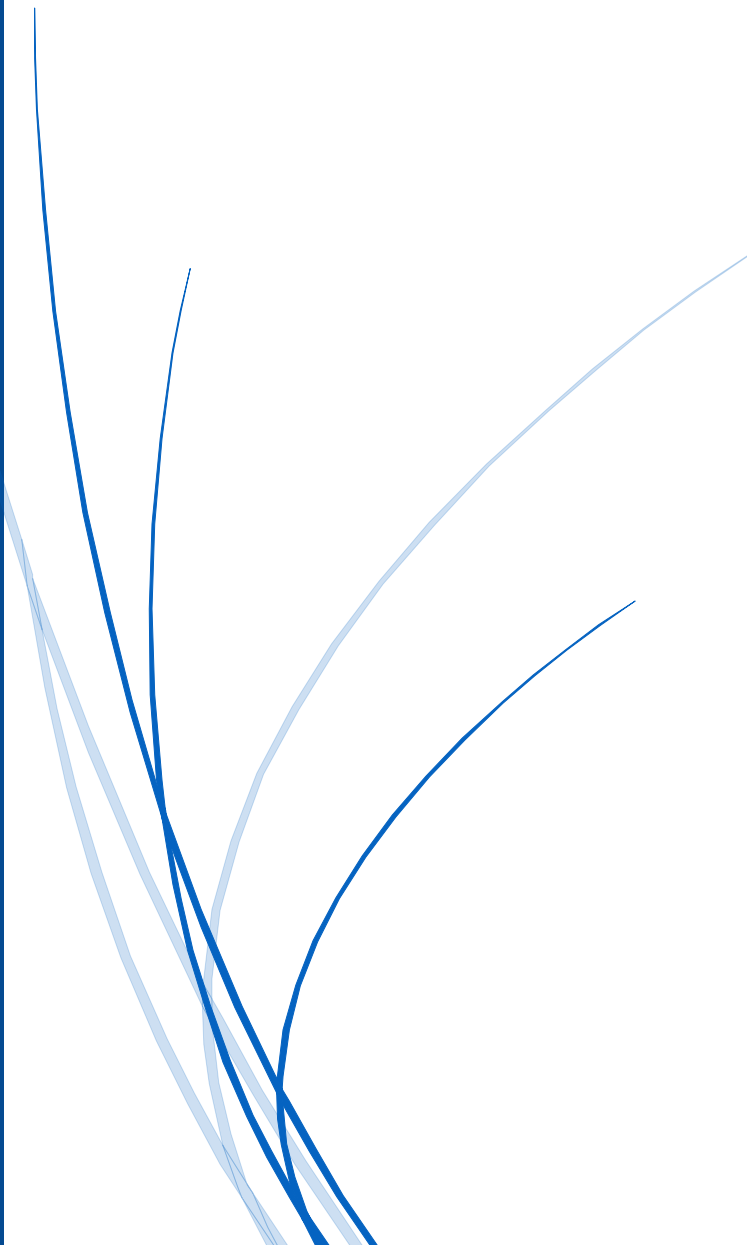


Εικόνα 2.6. Προϊόντα ζύμωσης από λακτόζη.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

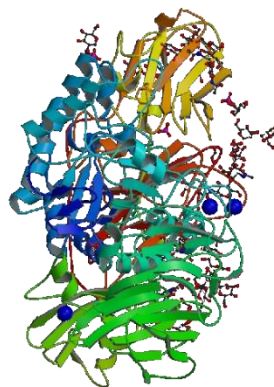
Οι β-γαλακτοζιδάσες και ο ρόλος τους
στη βιομηχανία τροφίμων



3. Οι β-γαλακτοζιδάσες και ο ρόλος τους στη βιομηχανία τροφίμων

3.1. Εισαγωγή

Η β-γαλακτοζιδάση είναι μια υδρολάση η οποία προσβάλλει την ο-γλυκοζυλομάδα της λακτόζης (Torres et al., 2010). Η σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός τέτοιου ενζύμου από μικροοργανισμούς του γένους *Penicillium* παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.1. Η β-γαλακτοζιδάση, η οποία αναφέρεται και ως λακτάση, είναι ένα εμπορικό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη (Guerrero et al. 2015). Αν και είναι υδρολάση, παράλληλα δρα και ως καταλύτης στην αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης και τη σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών (galacto-oligosaccharides, GOS (Albayrak & Yang 2002, Kim et al. 2006, Vera et al. 2012)).



Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της β-γαλακτοζιδάσης από μικροοργανισμούς του γένους *Penicillium*.

Η υδρολυτική δράση της β-γαλακτοζιδάσης αξιοποιείται από τη βιομηχανία των τροφίμων με στόχο τη μείωση της περιεχόμενης λακτόζης στα προϊόντα που απαιτείται, την πρόληψη των προβλημάτων κρυστάλλωσης της λακτόζης αλλά και την αύξηση της γλυκύτητας, της γεύσης και της διαλυτότητάς της στο τελικό προϊόν (Gänzle et al. 2008). Επιπλέον, η υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη, που είναι κατάλληλα για ανθρώπους με δυσανεξία στη λακτόζη, από την οποία πάσχει περίπου το 65 % του συνολικού πληθυσμού, φτάνοντας

ακόμη και στο ποσοστό μεγαλύτερο από 90 % σε κάποιες περιοχές, όπως της ανατολικής Ασίας. Η δυσανεξία στη λακτόζη, οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μη απορρόφηση της λακτόζης από το πεπτικό σύστημα, η οποία μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα όπως κοιλιακές κράμπες, φούσκωμα, διάρροια ή φλεγμονή (Bhatnagar & Aggarwal 2007).

3.2. Πηγές ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης

Η ταχεία αύξηση των διαθέσιμων αλληλουχιών αμινοξέων των γλυκοζυλο-υδρολασών από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 και η διαθεσιμότητα νέων μεθόδων σύγκρισης επιτρέπει την ταξινόμηση αυτών των ενζύμων με βάση τις ομοιότητες της αλληλουχίας αμινοξέων. Ένζυμα με ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης, ταξινομημένα ως EC 3.2.1.23/108, σύμφωνα με την εξειδίκευση υποστρώματος, κατατάσσονται στις οικογένειες GH1, GH2, GH35 και GH42. Η λακτόζη είναι το φυσικό υπόστρωμα μόνο σε μερικά ένζυμα που ανήκουν στις οικογένειες GH1 και GH2, ενώ οι οικογένειες GH35 και GH42 περιλαμβάνουν ένζυμα τα οποία δρουν σε διαφορετικούς γλυκοζίτες που περιλαμβάνουν μόριο γαλακτόζης. Ορισμένες β-γαλακτοζιδάσες από την οικογένεια GH1, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση στο τελικό, μη αναγωγικό άκρο β-D-γλυκόζης, καθώς και β-μαννοζιδάσες από τις οικογένειες GH1 και GH2, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση στο τελικό, μη αναγωγικό άκρο β-D-μαννόζης, επίσης προσβάλλουν το μόριο της γλυκόζης στη λακτόζη, γεγονός το οποίο τις καθιστά κατάλληλες για σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Γλυκοζυλο-υδρολάσες με ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης βρίσκονται σε πληθώρα μικροοργανισμών από τα υποβασίλεια των αρχαίων, των βακτηρίων και των ευκαριωτών. Μερικά από αυτά τα ένζυμα έχουν εκφρασθεί σε μικροοργανισμούς-ξενιστές ή/και καθαριστεί με συνδυασμό αρκετών συμβατικών τεχνικών, όπως η κλασμάτωση εξαλάτωσης (salting-out fractionation), η ιονεναλλαγή (ion exchange), η διήθηση γέλης (gel filtration), και οι χρωματογραφικές τεχνικές υδροφοβικής αλληλεπίδρασης (hydrophobic interaction chromatographies). Μια πληθώρα εμπορικών γλυκοζυλο-υδρολασών με ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης είναι εμπορικά διαθέσιμη για χρήση στην επεξεργασία τροφίμων και ορισμένες από αυτές χρησιμοποιούνται ήδη για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Ωστόσο, υπάρχει διαρκές ενδιαφέρον στην ανεύρεση μικροοργανισμών με ξεχωριστές ιδιότητες που συνάδουν με βιομηχανικές εφαρμογές και είναι ικανές να παράγουν εξειδικευμένα

μείγματα γαλακτοολιγοσακχαριτών με υψηλότερους βαθμούς απόδοσης (Torres et al., 2010).

3.2.1. Βακτηριακές β-γαλακτοζιδάσες

Η β-γαλακτοζιδάση που εξάγεται από βακτηριακές πηγές χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της λακτόζης λόγω του πλεονεκτήματος της υψηλής δραστηριότητας, της ευκολίας στη ζύμωση και της σταθερότητας του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η β-γαλακτοζιδάση που λαμβάνεται από μικροοργανισμούς του γένους *Bifidobacterium* χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα και συστήματα τροφίμων. Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τα βακτηριακά στελέχη των *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 και *Bifidobacterium longum* CCRC15708 έχουν εμφανίσει τη μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα (Hsu et al. 2007). Ακόμη, πιθανές πηγές β-γαλακτοζιδάσης αποτελούν και τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Lactobacillus* (Jain et al. 2007).

3.2.2. Μυκητιακές β-γαλακτοζιδάσες

Η απομόνωση της β-γαλακτοζιδάσης από ζυμομύκητες παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της χρήσης της στην παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, με τη βέλτιστη τιμή pH δράσης τους κυμαίνεται από 6,0 έως 7,0 (Pivarnik et al. 1995). Ο ζυμομύκητας *Kluyveromyces lactis* είναι από τις πιο σημαντικές εμπορικά πηγές παραγωγής της β-γαλακτοζιδάσης.

Από τους ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης, αξίζει να αναφερθεί ο *Kluyveromyces marxianus*, ο οποίος παράγει ομόλογα ένζυμα β-γαλακτοζιδάσης και άλλες ετερόλογες πρωτεΐνες που αναπτύσσονται σε μια σειρά υποστρωμάτων που έχουν τη λακτόζη ως μοναδική πηγή ενέργειας. Επιπλέον, η β-γαλακτοσιδάση που απομονώνεται από το ψυχρόφιλο στέλεχος της ζύμης *Guehomyce spullulans* χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων για την υδρόλυση της λακτόζης που περιέχεται στο γάλα και τον ορό γάλακτος.

Οι ενζυμικές ενεργότητες των διαφορετικής προέλευσης β-γαλακτοζιδασών επηρεάζονται από την παρουσία διαφόρων ιόντων. Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τους ζυμομύκητες *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis* απαιτούν ιόντα όπως το μαγγάνιο (Mn^{2+}), το νάτριο (Na^{+}) και το μαγνήσιο (Mg^{2+}), ενώ η παρουσία βαρέων μετάλλων και ασβεστίου (Ca^{2+}) αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα (Saqib et al., 2017).

Η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από ευρωτομύκητες διαθέτει βέλτιστη περιοχή τιμών pH από 2,5 έως 5,4, καθιστώντας την ως την πιο αποτελεσματική για την υδρόλυση της λακτόζης που περιέχεται στον όξινο ορό γιαουρτιού. Γενικά, οι ευρωτομύκητες παράγουν εξαιρετικά σταθερά ένζυμα, με συνηθέστερες πηγές ευρωτομυκήτων για την παραγωγή β-γαλακτοζιδασών ορισμένα είδη του γένους *Aspergillus*, όπως ο *Aspergillus oryzae* που παράγει εξωκυτταρική β-γαλακτοζιδάση (Saqib et al., 2017). Η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από τον *Aspergillus oryzae* χαρακτηρίστηκε με βέλτιστη τιμή pH 5,0 και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50°C και ξεχωρίζει για την πιθανή εφαρμογή της στην αξιοποίηση του όξινου ορού γιαουρτιού, λόγω των ιδιοτήτων του κατά την υδρόλυση της λακτόζης. Η β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από τον *Aspergillus niger* συνήθως εμπλέκεται στην απομάκρυνση των υπολειμμάτων γαλακτόζης από ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες προερχόμενους από τα φυτά, και όχι από την υδρόλυση της λακτόζης (Kazemi et al., 2016).

3.2.3. Φυτικές β-γαλακτοζιδάσες

Η β-γαλακτοζιδάση μπορεί επίσης να προέλθει από φυτά και είναι επιβεβαιωμένο ότι το ένζυμο εμπλέκεται στην ωρίμανση πολλών καρπών, όπως του λωτού, μειώνοντας τις γαλακτοζυλομάδες του κυτταρικού τοιχώματος. Οι β-γαλακτοζιδάσες από τον καρπό της παπάγιας προκαλούν υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος και κατά συνέπεια γρηγορότερη ωρίμανση του καρπού. Επίσης, έντονη είναι η δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης στο κυτταρικό τοίχωμα της φράουλας, μαλακώνοντας τον καρπό, λόγω της απελευθέρωσης των ελεύθερων σακχάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης του φρούτου. Επιπλέον, οι Smith και Gross (2000) αναγνώρισαν μια οικογένεια επτά β-γαλακτοζιδασών από τον καρπό της τομάτας, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής της. Ταυτόχρονα, έχουν βρεθεί επίσης ίχνη β-γαλακτοζιδάσης στον καρπό του μήλου, του πεπονιού, του αβοκάντο, του ακτινιδίου, του μάνγκο και των ιαπωνικών αχλαδιών (Seddigh & Darabi, 2014).

3.3. Μηχανισμός δράσης της β-γαλακτοζιδάσης

Η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη γαλακτοβιομηχανία το 1950 (Dam et al. 1950), παρόλο που το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράχθηκαν με υδρόλυση της λακτόζης άρχισαν την εμφάνισή τους στην παγκόσμια αγορά τη δεκαετία του 1970, όταν έγιναν εμπορικά διαθέσιμες και οι πρώτες β-

γαλακτοζιδάσες. Σήμερα η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία των τροφίμων (Panesar et al. 2006).

Η διαδικασία της υδρόλυσης της λακτόζης είναι απλή και δεν απαιτείται κάποιος ειδικός εξοπλισμός (Zadow 1992). Όταν χρησιμοποιείται ένα ένζυμο μίας χρήσης για την υδρόλυση της λακτόζης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όλοι οι πιθανοί παράγοντες που την επηρεάζουν, όπως η συγκέντρωση του υποστρώματος, η τιμή του pH του μέσου της αντίδρασης, η θερμοκρασία, ο χρόνος αντίδρασης, η ενζυμική ενεργότητα και το κόστος του ενζύμου που χρησιμοποιείται (Haider & Husain 2009).

Γενικά, η β-γαλακτοζιδάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο, μια γλυκοζυλο-υδρολάση, καθώς υδρολύει τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη, έχοντας δύο διαφορετικούς τρόπους εφαρμογής. Μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε διαλυτή μορφή, για διεργασίες διαλείποντος έργου, είτε σε ακινητοποιημένη μορφή, για παραγωγή προϊόντων με διεργασίες συνεχούς έργου (Bodalo et al. 2001). Παρά το υψηλό κόστος στην προσκόλληση ενζύμων, τα συστήματα ακινητοποιημένης γαλακτοζιδάσης είναι πιο οικονομικά από εκείνα των ελεύθερων ενζύμων, καθώς αυτές οι διαδικασίες είναι συνεχείς, και επιτρέπουν την επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου (Szczo drak 2000).

Ο γενικός μηχανισμός της ενζυμικής υδρόλυσης της λακτόζης περιλαμβάνει ένα πλήθος αλυσιδωτών αντιδράσεων με την παραγωγή άλλων δισακχαριτών, πλην της λακτόζης, και ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο του 2, οι οποίοι ονομάζονται συλλογικά γαλακτοολιγοσακχαρίτες (galactooligosaccharides, GOS), ως ενδιάμεσα προϊόντα (Wallenfels and Malhotra 1960). Σε διεργασίες στις οποίες επιθυμείται η υδρόλυση της λακτόζης, όπως για την παραγωγή προϊόντων με χαμηλή περιεκτικότητα ή χωρίς λακτόζη, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες εμφανίζονται ως ανεπιθύμητα παραπροϊόντα, καθώς δύνανται να έχουν πιθανές παρενέργειες. Ωστόσο, η ικανότητα αυτών των ολιγοσακχαριτών, όταν προστίθενται σε βρεφικές τροφές για την υποκατάσταση των ευεργετικών ιδιοτήτων του μητρικού γάλακτος, ενισχύοντας την εντερική μικροχλωρίδα, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναφορικά με την παραγωγή τους και τις εφαρμογές αυτών σε πλήθος τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων.

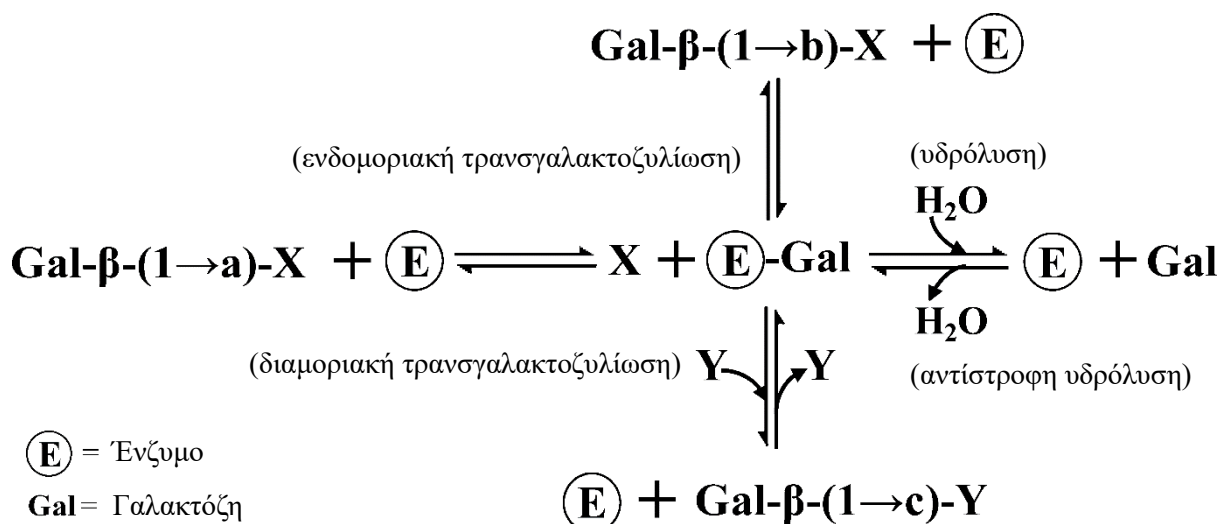
Η ενζυμική υδρόλυση του γλυκοζιδικού δεσμού πραγματοποιείται από δύο καταλυτικές ομάδες (catalytic residues) του ενζύμου που δρουν σαν οξύ και βάση, αντίστοιχα. Με βάση τη θέση αυτών των καταλυτικών ομάδων (catalytic residues) στον χώρο, η υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ένα ή δύο πιθανά στερεοχημικά αποτελέσματα: αναστροφή του ανωμερικού προσανατολισμού (inversion of anomeric configuration), αν η μέση απόσταση μεταξύ των δύο καταλυτικών ομάδων (catalytic residues) είναι περίπου 10 Å, ή διατήρηση του ανωμερικού προσανατολισμού (retention

of anomeric configuration), αν η μέση απόσταση μεταξύ των δύο καταλυτικών ομάδων (catalytic residues) είναι περίπου 5,5 Å.

Μερικές γλυκοζυλο-υδρολάσες που διατηρούν τον ανωμερικό προσανατολισμό (retaining glycosyl hydrolases) δύνανται να καταλύσουν τη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών. Μηχανιστικά, αυτά τα ένζυμα πιστεύεται ότι λειτουργούν μέσω ενός μηχανισμού δύο σταδίων. Το πρώτο, μη αντιστρεπτό στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου-γαλακτόζης με ανεστραμένο προσανατολισμό, ακολουθούμενο από την απελευθέρωση της «αποχωρώσας ομάδας». Ακολούθως, το ομοιοπολικό ενδιάμεσο υδρολύεται με εκ νέου αναστροφή, ολοκληρώνοντας την αντίδραση με διατήρηση του αρχικού προσανατολισμού μέσω ενός γενικού καταλυτικού μηχανισμού οξέος-βάσεως. Σε μία ευρέως γνωστή παραλλαγή του δευτέρου σταδίου, το σύμπλοκο ενζύμου γαλακτόζης δύναται να συνδεθεί με κάποιο πυρηνόφιλο (nucleophiles) μόριο εκτός του νερού, πιθανώς οποιοδήποτε σάκχαρο στο αντιδρών διάλυμα, προς σχηματισμό ενός προϊόντος τρανσγαλακτοζυλίωσης (γαλακτοολιγοσακχαρίτης) (Εικόνα 3.2).

Επομένως, η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτη μέσω της δράσης μιας β-γαλακτοζιδάσης είναι μία κινητικά ελεγχόμενη αντίδραση, μέσω των ανταγωνιστικών αντιδράσεων της υδρόλυσης και της τρανσγαλακτοζυλίωσης. Συγκεκριμένα, κατά τη μετατροπή αυτή, η θερμοδυναμικά ευνοούμενη υδρόλυση της λακτόζης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή D-γαλακτόζη και D-γλυκόζη, ανταγωνίζεται τη δράση τρανσφεράσης (transferase activity) που παράγει ένα σύνθετο μείγμα ποικίλων δι- και ολιγοσακχαριτών με βάση τη γαλακτόζη, με διάφορες δομές. Έτσι, η γνώση της χρονικής εξέλιξης της αντίδρασης (ή της μετατροπής της λακτόζης) απαιτείται για τον προσδιορισμό του σημείου μεγιστοποίησης του επιθυμητού προϊόντος.

Η τρανσγαλακτοζυλίωση περιλαμβάνει τόσο διαμοριακές όσο και ενδομοριακές αντιδράσεις. Η ενδομοριακή ή απευθείας μεταφορά του γλυκοζυλίου στο μόριο της D-γλυκόζης παράγει ισομερή θέσης (regio-isomers) της λακτόζης. Η διαμοριακή ή έμμεση τρανσγαλακτοζυλίωση είναι η πορεία κατά την οποία σχηματίζονται δισακχαρίτες, τρισακχαρίτες, τετρασακχαρίτες και τελικά μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Torres et al., 2010).



Εικόνα 3.2. Γενικό μοντέλο των αντιδράσεων υδρόλυσης της λακτόζης και σύνθεσης των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Τα σύμβολα a, b, c = 2, 3, 4, 6, με a ≠ b, υποδεικνύουν την θέση του γλυκοζιδικού δεσμού. X είναι ο δότης της γαλακτοζυλομάδας. Y είναι ο δέκτης της γαλακτοζυλομάδας και μπορεί να έχει μια από τις ακόλουθες δομές: Γλυκόζη, Γαλακτόζη, Γαλακτόζη-Γαλακτόζη ή [Γαλακτόζη]_n-Γλυκόζη, όπου 1 ≤ n ≤ 6 (Torres et al., 2010).

Μια βασική εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης είναι η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, κατά την οποία το υπόστρωμα λακτόζης ή μονοσακχαριτών (γλυκόζη και γαλακτόζη) χρησιμεύει ως δέκτης γαλακτοζυλομάδας, σχηματίζοντας μια σειρά δισακχαριτών, τρισακχαριτών αλλά και υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού ολιγοσακχαριτών (Park & Oh 2010, Torres et al. 2010).

Παρουσία λακτόζης, η β-γαλακτοζιδάση καταλύει τόσο την υδρόλυσή της όσο και τον ολιγομερισμό της για τη σύνθεση GOS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2. Έτσι, η μέγιστη απόδοση σε GOS εξαρτάται από τη συγκέντρωση της λακτόζης και τις εγγενείς ιδιότητες του ενζύμου, δηλαδή την ικανότητά του να απομακρύνει τα μόρια H₂O από τη θέση πρόσδεσης του δέκτη, επιτρέποντας τη σύνδεση ενός πυρηνόφιλου σακχάρου (στο οποίο μεταφέρεται το τμήμα του γαλακτοζυλομάδας). Έτσι, η μέγιστη απόδοση σε GOS για οποιοδήποτε ένζυμο εξαρτάται από τις σχετικές ταχύτητες των αντιδράσεων της τρανσγαλακτοζυλίωσης και της υδρόλυσης (Plou et al. 2007).

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της τρανσγαλακτοζυλίωσης, καθώς η λακτόζη καταναλώνεται, η συγκέντρωση των GOS αυξάνεται έως ότου φτάσει σε ένα μέγιστο. Στο σημείο αυτό, ο ρυθμός σύνθεσης των GOS ισούται με τον ρυθμό υδρόλυσης αυτών. Στη συνέχεια, η υδρόλυση του προϊόντος γίνεται η κύρια διαδικασία μέχρι την επίτευξη θερμοδυναμικής ισορροπίας. Η ύπαρξη αυτού του κινητικού μέγιστου εξηγεί το ότι η τρανσγαλακτοζυλίωση έχει υψηλότερες αποδόσεις προϊόντων συμπύκνωσης σε

σύγκριση με τις διεργασίες που ελέγχονται με ισορροπία. Ακόμη ισχύει ότι, υπό συνθήκες κινητικού ελέγχου, η συγκέντρωση ενζύμου δεν έχει καμία επίδραση στη μέγιστη απόδοση των GOS, εφόσον δεν λαμβάνει χώρα απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ επηρεάζεται μόνο ο χρόνος στον οποίο επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών (Buchholz et al. 2005, Chockchaisawasdee et al. 2005).

Το εύρος των προϊόντων που λαμβάνονται κατά την μετατροπή της λακτόζης, οι δεσμοί μεταξύ των μονάδων γαλακτόζης και η αποδοτικότητα της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης εξαρτώνται από την πηγή του ενζύμου και τις φυσικοχημικές συνθήκες στο καταλυτικό περιβάλλον. Αντιδράσεις μεταξύ του δέκτη γαλακτοζυλίου και του ενεργού κέντρου του ενζύμου πιστεύεται ότι παίζουν κυρίαρχο ρόλο στον σχηματισμό προϊόντων διαμοριακής μεταφοράς. Με άλλα λόγια, η ικανότητα του ενζύμου να φιλοξενήσει τον δέκτη του γαλακτοζυλίου στην περιοχή του ενεργού κέντρου κατά την καταλυτική στιγμή και ο προσανατολισμός στον χώρο του δέκτη γαλακτοζυλίου αποτελούν παράγοντες-κλειδιά στην αποδοτικότητα των αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης και στη θέση των νεοσχηματιζόμενων γλυκοζιδικών δεσμών.

Η αναλογία γλυκόζης-γαλακτόζης στον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες καθορίστηκε για την ποσοτικοποίηση της ικανότητας διαφορετικών ενζύμων να καταλύσουν την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης (σε δότες λακτόζης ή γαλακτόζης) συγκριτικά με την ολοκληρωτική υδρόλυση. Αυτή η αναλογία θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της μονάδας, επειδή μερική από την παραγόμενη γαλακτόζη που παράγεται από την υδρόλυση της λακτόζης μεταφέρεται στους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, ενώ όλη η γλυκόζη απελευθερώνεται. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η αναλογία δεν λαμβάνει υπόψη τη μεταφορά του μορίου γαλακτόζης σε ελεύθερα μόρια γλυκόζης μέσω είτε διαμοριακών είτε ενδομοριακών αντιδράσεων (Torres et al., 2010).

Στον

Πίνακας 3.1 συνοψίζονται οι κύριες παράμετροι της αντίδρασης και οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS που λαμβάνονται, με δεδομένη επιλογή β-γαλακτοζιδασών. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες αφορούν στην εφαρμογή λακτασών με βιομηχανική χρήση, όπως οι β-γαλακτοζιδάσες από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae*, σε υποστρώματα καθαρής λακτόζης (Füreder et al., 2020; Guerrero et al., 2015; Huang et al., 2020; Warmerdam et al., 2014; Yadav & Kayastha, 2020; Yañez-Ñeco et al., 2021) ή διαλύματα σκόνης τυρογάλακτος (Mano et al., 2019; Simonić et al., 2019) για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Συνεπώς, αναδεικνύεται το κενό που υπάρχει στην βιβλιογραφία αναφορικά με τη μελέτη της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών απευθείας από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού, αλλά και την εφαρμογή καινοτόμων, θερμόφιλων λακτασών για την βιομετατροπή της λακτόζης σε πρεβιοτικούς ολιγοσακχαρίτες, χρησιμοποιώντας υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης, λόγω της μεγαλύτερης διαλυτότητάς της σε υψηλές θερμοκρασίες, είτε την πραγματοποίηση του ολιγομερισμού της λακτόζης ταυτόχρονα με τη συμπύκνωση.

Πίνακας 3.1. Σύγκριση των συνθηκών παραγωγής και των μέγιστων αποδόσεων σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες που επιτυγχάνονται με εφαρμογή ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης από διαφορετικές πηγές σε διάφορα υποστρώματα λακτόζης.

Όνομασία ενζύμου	Προέλευση ενζύμου	pH	Θερμοκρασία (°C)	Υπόστρωμα	Ενζυμικό φορτίο	Βαθμός απόδοσης σε GOS (%)	Reference
βgAO (ENZECO)	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	36,8 °C	-	-	26,73	Cinar et al., 2020
-	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	50 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 40 % w/w	0.2 mg/mL	15,5	Simović et al., 2019
β- gal2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	40 °C	Λακτόζη 480 g/L	2.5 U/g	45,5	Huang et al., 2020
Saphera (Novozymes A/S)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	1.5 U/mL	27	Füreder et al., 2020
B-gal42	<i>Pantoea anthophila</i>	7	50 °C	Λακτόζη 400 g/L	15 U/mL	40	Yañez-Ñeco et al., 2021
Enzeco® fungal lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	29	Guerrero et al., 2015
Fungal lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	28	Guerrero et al., 2015
Tolerase (DSM)	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	28	Guerrero et al., 2015
Klerzyme 150 (DSM)	<i>Aspergillus niger</i>	3,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	19	Guerrero et al., 2015
Rapidase	<i>Aspergillus niger</i>	3,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	20	Guerrero et al., 2015
Pectinex Ultra (Novozymes)	<i>Apergillus aculeatus</i>	3,5	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	17	Guerrero et al., 2015
Biocon NTL 3000	<i>Bacillus circulans</i>	6	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	39	Guerrero et al., 2015
Biolactasa-NL (Biocon)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	7	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	29	Guerrero et al., 2015
Enzeco Lactase NL	<i>Kluyveromyces lactis</i>	7	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	29	Guerrero et al., 2015
Maxilact L200	<i>Kluyveromyces lactis</i>	7	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	29	Guerrero et al., 2015
Lactozym Pure 2600L	<i>Kluyveromyces lactis</i>	7	40 °C	Λακτόζη 400 g/L	10 U/g	28	Guerrero et al., 2015
Biolacta N5	<i>Bacillus circulans</i>	6	50 °C	Λακτόζη 340 g/L	0,016 mg/mL	35	Warmerdam et al., 2014
Lactozyme™ 2600 L (Novozymes)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	4,5	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U/g	2,4	Mano et al., 2019

Lactozyme™ 2600 L (Novozymes)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	7	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U/g	25	Mano et al., 2019
β-galactosidase (Worthington)	<i>Escherichia coli strain K12</i>	4,5	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U/g	0,9	Mano et al., 2019
β-galactosidase (Worthington)	<i>Escherichia coli strain K12</i>	7	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U g ⁻¹	4	Mano et al., 2019
β-galactosidase (Merck)	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U g ⁻¹	13	Mano et al., 2019
β-galactosidase (Merck)	<i>Aspergillus oryzae</i>	7	35 °C	Διάλυμα σκόνης τυρογάλακτος 30 % w/w (Arla Foods Ingredients)	50 U g ⁻¹	15	Mano et al., 2019
<i>Lsbgal</i>	<i>Lens culinaris</i>	4,5	55 °C	Λακτόζη 200 g/L	12 U/ml	68 g/L	Yadav & Kayastha, 2020
<i>TtbGal1</i>	<i>Thermothielavioides terrestris</i>	4,5	50 °C	Λακτόζη 200 g/L	1 U mL ⁻¹ (5 U g ⁻¹)	19,4	Zerva et al., 2021

3.4. Βιομηχανικές εφαρμογές της β-γαλακτοζιδάσης

Σε βιομηχανική κλίμακα, η β-γαλακτοζιδάση, τόσο βακτηριακής όσο και μυκητιακής προέλευσης, εμφανίζει πολλές χρήσεις στην επεξεργασία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ακόμα, η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται και κατά την παραγωγή φαρμάκων, τα οποία απαιτείται να λαμβάνονται πριν την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (Francesconi et al. 2016). Σε αυτή την περίπτωση, προτιμάται η χρήση β-γαλακτοζιδάσης μυκητιακής προέλευσης, και κυρίως από το γένος *Aspergillus*, που εμφανίζουν χαμηλή βέλτιστη τιμή pH δράσης, που επιτρέπει τη διατήρηση της τιμής του pH του στομαχιού (Panesar et al. 2007).

Στις βιομηχανίες τροφίμων, η χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης δεν προτιμάται μόνο κατά την υδρόλυση της λακτόζης στην παραγωγή προϊόντων χωρίς λακτόζη, αλλά χρησιμοποιείται επίσης και για να μειώσει την κρυστάλλωση της λακτόζης σε παγωτά και συμπυκνωμένο γάλα, που συμβαίνει λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αυτών των προϊόντων σε λακτόζη. Με τη χρήση β-γαλακτοζιδάσης, επιτυγχάνεται η βελτίωση της υφής των προϊόντων και τα προϊόντα αυτά καθίσταται πιο εύπεπτα, καθώς τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης της λακτόζης (γλυκόζη και γαλακτόζη) ζυμώνονται πιο εύκολα, μειώνοντας το συνολικό χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η προτιμώμενη τιμή pH των προϊόντων, όπως το γιαούρτι και το τυρί cottage.

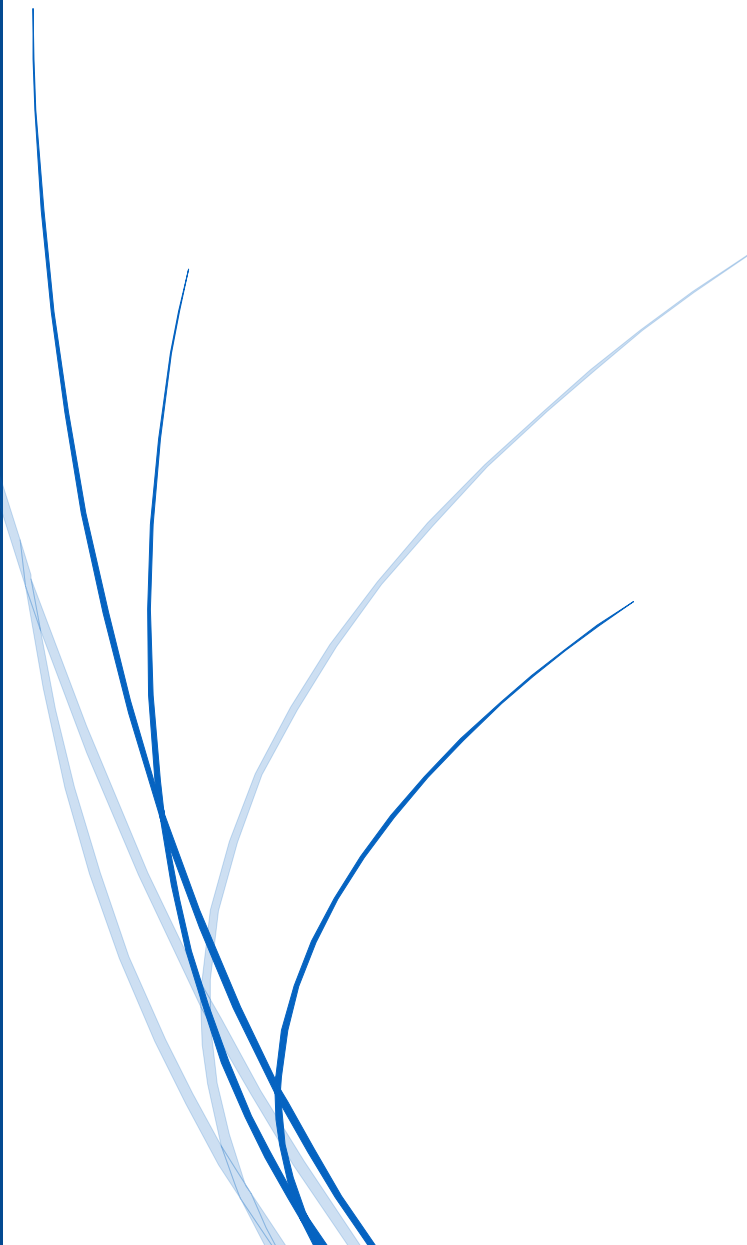
Επιπλέον, με τη χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης μειώνεται η ανάγκη για προσθήκη επιπλέον γλυκαντικών, μειώνοντας έτσι την ποσότητα θερμίδων στο τελικό προϊόν (Domingues et al. 2005).

Τέλος, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται επίσης και στην παραγωγή άλλων προϊόντων βιομηχανικής σημασίας, όπως η αιθανόλη και οι βιοαισθητήρες. Συγκεκριμένα, οι Rodríguez et al. (2014) ανέφεραν την παραγωγή αιθανόλης και του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης εξωκυτταρικά με χρήση ανασυνδυασμένων κυττάρων από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, με παραγωγικότητα αιθανόλης 9 g/h και με ταυτόχρονη παραγωγή του ενζύμου. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από την έρευνα των Grosová et al. (2009), με σκοπό να γίνει κινητική μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης με χρήση του *S. cerevisiae*, στην οποία παρατηρήθηκε ότι αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης βελτίωσε γραμμικά την παραγωγή αιθανόλης (Saqib et al., 2017).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες



4. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες

4.1. Εισαγωγή

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες προσδιορίζονται ως «ένα μείγμα ενώσεων που παράγονται από τη λακτόζη, αποτελούμενοι από 2 έως 8 δομικές μονάδες, μία εκ των οποίων είναι ένα μόριο γλυκόζης στο άκρο της αλυσίδας και οι υπόλοιπες μόρια γαλακτόζης, ή δισακχαρίτες αποτελούμενοι από 2 μόρια γαλακτόζης» (Tzortzis and Vulevic 2009). Το μέγεθος της παγκόσμιας αγοράς γαλακτοολιγοσακχαριτών εκτιμάται ότι ανέρχεται σε 20.000 tn, με Σύνθετο Ρυθμό Ετήσιας Ανάπτυξης (GDPR) 10-20 % (Torres et al., 2010).

4.2. Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών

4.2.1. Οι μέθοδοι παραγωγής

Είναι γνωστό ότι οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν γενικά να σχηματιστούν από μονοσακχαρίτες με τη δράση ανόργανων οξέων (χημική σύνθεση). Αυτή η διεργασία, γνωστή ως «αντιστροφή», εξηγεί την παραγωγή ολιγοσακχαριτών κατά την όξινη υδρόλυση της λακτόζης, η οποία παρατηρήθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950. Οι συνθήκες οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ολιγοσακχαριτών κατά την όξινη υδρόλυση της λακτόζης και οι δομές των ολιγοσακχαριτών που σχηματίζονται με αυτή τη μέθοδο έχουν μελετηθεί εκτενώς. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι ως αποτέλεσμα αυτής της χημικής διεργασίας σχηματίζεται ένα περίπλοκο μείγμα δισακχαριτών και τρισακχαριτών, με ποικίλους δεσμούς με α- ή β- ανωμερικές διαμορφώσεις. Πιθανώς, λόγω της έλλειψης εξειδίκευσης στα προϊόντα της χημικής σύνθεσης ολιγοσακχαριτών, καθώς και εξαιτίας των ακραίων συνθηκών που εφαρμόζονται κατά την όξινη υδρόλυση της λακτόζης, αυτή η μέθοδος παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών δεν χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα.

Η προτιμώμενη μέθοδος σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών είναι μέσω ενζυμικής κατάλυσης με υπόστρωμα τη λακτόζη, χρησιμοποιώντας είτε γλυκοζυλο-τρανφεράσες (EC 2.4), είτε γλυκοζυλο-υδρολάσες ή β-γαλακτοζιδάσες (EC 3.2.1). Οι γλυκοζυλο-τρανφεράσες και οι γλυκοζυλο-υδρολάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν την μεταφορά μιας γλυκοζυλομάδας από ένα σάκχαρο-δότη σε έναν δέκτη. Οι γλυκοζυλο-τρανφεράσες χρησιμοποιούν ως δότες σάκχαρα που περιέχουν φωσφο-νουκλεοζίτες ή φωσφο-λιπίδια ως πλευρικές ομάδες (remaining group). Παρόλη την

επιλεκτικότητα στη δομή των ολιγοσακχαριτών που σχηματίζονται και την αποδοτικότητα αυτών των ενζύμων, οι γλυκοζυλο-τρανσφεράσες δε χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, λόγω της μη διαθεσιμότητάς τους σε μεγάλες ποσότητες, του υψηλού κόστους παραγωγής τους και της ανάγκης χρήσης συγκεκριμένων ενώσεων νουκλεοτιδίου-σακχάρου ως υποστρώματα.

Επί του παρόντος, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες παράγονται χρησιμοποιώντας την καταλυτική δράση των β-γαλακτοζιδασών. Αυτά τα ένζυμα είναι διαθέσιμα σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις γλυκοζυλο-τρανσφεράσες, αλλά είναι γενικά λιγότερο επιλεκτικά όσον αφορά στη δομή των σχηματιζόμενων ολιγοσακχαριτών. Ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενζύμων που οδηγεί στην παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την λακτόζη αναλύθηκε στην ενότητα 3.3.

Εναλλακτικά της τρανσγαλακτοζυλίωσης από έναν δισακχαρίτη που περιγράφεται παραπάνω, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν και με αντίστροφη υδρόλυση (σύνθεση ισορροπίας) από μονοσακχαρίτες. Οι βαθμοί απόδοσης των συνθέσεων ισορροπίας είναι πολύ χαμηλότεροι, καθώς σχηματίζονται κυρίως δισακχαρίτες (10-25 % w/w) και χαμηλά ποσοστά τρισακχαριτών ή ολιγοσακχαριτών με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού. Ωστόσο, από την αντίδραση δεν παράγονται προϊόντα υδρόλυσης, και όταν συνδυάζεται με μία αποδοτική διεργασία διαχωρισμού, είναι εφικτός ένας υποθετικός βαθμός απόδοσης ίσος με 100 % (Torres et al., 2010).

4.2.2. Μέθοδοι βελτίωσης της διεργασίας παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών

Γενικά, ο βαθμός απόδοσης της σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών από λακτόζη χρησιμοποιώντας γλυκοζυλο-υδρολάσες δύναται ν' αυξηθεί χρησιμοποιώντας διάλυμα με υψηλή αρχική συγκέντρωση λακτόζης, μειώνοντας την θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού (π.χ. χρησιμοποιώντας ένα μικρο-υδατικό περιβάλλον (micro-aqueous environment)), αφαιρώντας το τελικό προϊόν ή/και τους παρεμποδιστές από το αντιδρών μείγμα, ή τροποποιώντας το ένζυμο.

4.2.2.1. Χρήση διαλυμάτων με υψηλή αρχική συγκέντρωση λακτόζης

Σταχυολογώντας δεδομένα της βιβλιογραφίας, φαίνεται ότι ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες επηρεάζεται σημαντικά κυρίως από την αρχική συγκέντρωση λακτόζης, μέχρι ένα εύρος συγκεντρώσεως μεταξύ 30 % w/v και 40 %

w/v. Για συγκεντρώσεις λακτόζης άνω του 30 % w/v, η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης μειώνεται σημαντικά.

Καθώς η διαλυτότητα της λακτόζης είναι σχετικά χαμηλή σε θερμοκρασία δωματίου αλλά αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας (Roos, 2009), είναι γενικά επιθυμητές υψηλές θερμοκρασίες. Ορισμένες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανεύρεση θερμοσταθερών γλυκοζυλο-υδρολασών. Γλυκοζυλο-υδρολάσες από τους μικροοργανισμούς *S. solfataricus*, *P. furiosus*, *Thermus* sp., *T. caldophilus*, *C. saccharolyticus* και *T. maritima* είναι παραδείγματα ενζύμων από υπερθερμόφιλους μικροοργανισμούς που δρουν σε θερμοκρασίες 80 °C ή και υψηλότερες.

Οι υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται να ευνοούν, επίσης, τις αντιδράσεις τρανσγαλακτοζυλίωσης έναντι της υδρόλυσης. Η αύξηση της θερμοκρασίας αντίδρασης αύξησε σημαντικά τον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες όταν χρησιμοποιήθηκαν γλυκοζυλο-υδρολάσες από τους μικροοργανισμούς *A. aculeatus*, *S. solfataricus* και *P. furiosus*. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές βρήκαν μόνο μια μικρή έως ανύπαρκτη σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, χρησιμοποιώντας λακτάσες από τους μικροοργανισμούς *P. furiosus*, *S. solfataricus*, *B. circulans*, *A. oryzae*, *K. lactis* και *K. marxianus*.

Η χρήση μικροκυμάτων ως μια μη συμβατική πηγή ενέργειας κατά την ενζυμική σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών επιχειρήθηκε επίσης με επιτυχία, χρησιμοποιώντας ένα ακινητοποιημένο ακατέργαστο ενζυμικό παρασκεύασμα από τον μικροοργανισμό *K. lactis*. Ο μέγιστος βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες αυξήθηκε από 24 σε 28 %, όταν η αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ήταν 16 % w/v.

4.2.2.2. Μείωση της θερμοδυναμικής ενεργότητας του νερού

Ένα παράδειγμα χρήσης ενός μικρο-υδατικού περιβάλλοντος για την μείωση της θερμοδυναμικής ενεργότητας του νερού κατά την σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών αποτελεί η χρήση αντίστροφων μικκυλίων. Μια παρόμοια απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες αποκτήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις λακτόζης, όταν χρησιμοποιώθηκαν αντίστροφα μικκύλια, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που αναφέρονται σε υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης στο υδατικό αντιδρών σύστημα.

Διφασικά υδατικά συστήματα φαίνεται να αυξάνουν την απόδοσης τρανσγαλακτοζυλίωσης σε σύγκριση με συνήθη υδατικά συστήματα, πιθανώς λόγω της διαμέρισης των επιθυμητών προϊόντων, των παρεμποδιστών και του ενζύμου μεταξύ των δύο φάσεων του συστήματος. Η αναλογία γλυκόζης/γαλακτόζης στον μέγιστο

βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες χρησιμοποιώντας ένα ακατέργαστο ενζυμικό κλάσμα από τον μικροοργανισμό *A. Aculeatus* αυξήθηκε από 2,2 σε 12,7 %, όταν χρησιμοποιήθηκε ένα διφασικό υδατικό σύστημα, αντικατοπτρίζοντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για αντιδράσεις μεταφοράς γαλακτοζυλίου.

4.2.2.3. Τροποποίηση του ενζύμου

Η αριστοποίηση της ενζυμικής δομής δύναται να συμβάλει στην αύξηση του μέγιστου βαθμό απόδοσης παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από λακτόζη. Μια προσέγγιση πρωτεϊνικής μηχανικής εφαρμόστηκε στην β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *P. furiosus*. Παρατηρήθηκε μια άυξηση του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες αντικαθιστώντας το αμινοξύ 426 από φαινυλαλανίνη σε τυροσίνη. Αντικαθιστώντας ένα ακόμα αμινοξύ στην θέση 424 από μεθειονίνη σε λυσίνη, οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα τρανσγαλακτοζυλίωσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις λακτόζης. Πιο πρόσφατα, μια παρόμοια προσέγγιση πραγματοποιήθηκε στην β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *G. stearothermophilus*. Όταν η αργινίνη 109 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αντικαταστάθηκε με λυσίνη, βαλίνη ή τρυπτοφάνη, ο βαθμός απόδοσης σε τρισακχαρίτες αυξήθηκε από 2 % σε 12 %, 21 % και 23 %, αντίστοιχα.

Η μεταλλαγμένη αποκοπής του C-τελικού μέρους μετέτρεψε την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *B. bifidum* σε ένα υψηλής απόδοσης ένζυμο τρανσγαλακτοζυλίωσης, το οποίο δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση λακτόζης (Jorgensen and others 2001). Στον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, η αναλογία γλυκόζης/γαλακτόζης στα αντιδρώντα μείγματα είναι πολύ υψηλότερα χρησιμοποιώντας αυτήν την κολοβή β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *B. bifidum* απ' ότι αυτή που αποκτήθηκε με άλλες β-γαλακτοζιδάσες του γένους *Bifidobacterium*.

Η ενεργότητα τρανσγαλακτοζυλίωσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *B. circulans* αυξήθηκε με τροποποίηση του ενζύμου με γλουταραλδεΐδη, πιθανώς λόγω των αλλαγών διαμόρφωσης κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Mozaffar and others 1987). Αυτό είναι ένα παράδειγμα μιας δομικής αλλαγής που προκαλείται χημικά, έχοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η γλουταραλδεΐδη χρησιμοποιείται ευρέως σαν ένας παράγοντας διασύνδεσης για ακινητοποίηση ομοιοπολικού ενζύμου (Torres et al., 2010).

4.2.3.Βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και μετατροπή της λακτόζης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αποδοτικότητα της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης είναι κινητικά ελεγχόμενη, καθώς οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν πιθανό υπόστρωμα για την δράση υδρόλυσης των γλυκοζυλο-υδρολασών. Ο σχηματισμό των ολιγοσακχαριτών φθάνει σε ένα μέγιστο κατά την διάρκεια μιας αντίδρασης διαλείποντος έργου. Μετά το μέγιστο σημείο, η συγκέντρωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών μειώνεται, μέχρι περίπου το μηδέν, όταν η μετατροπή της λακτόζης φθάσει περίπου το 100 %. Η αύξηση της μέγιστης ποσότητας των ολιγοσακχαριτών μπορεί να οφείλεται είτε στην ικανότητα του ενζύμου να ευνοεί τις αντιδράσεις τρανσγαλακτοζυλίωσης έναντι της υδρόλυσης, όπως προαναφέρθηκε, ή/και στον χαμηλό ρυθμό διάσπασης των σχηματιζόμενων ολιγοσακχαριτών έναντι της λακτόζης, πιθανώς λόγω των πολύ υψηλότερων τιμών κινητικής σταθεράς k_m (συγγένειας) για τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες ως προς την λακτόζη.

Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες μεταξύ 15 % και 77 % επιτυγχάνονται όταν η μετατροπή της λακτόζης είναι μεταξύ 45 % και 95 %, αναλόγως της προέλευσης του ενζύμου και της διεργασίας παραγωγής. Αν, για δεδομένο ένζυμο, ένας μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες επιτυγχάνεται με υψηλές τιμές μετατροπής της λακτόζης (π.χ. για γλυκοζυλο-υδρολάσες από τους μικροοργανισμούς *T. caldophilus*, *S. thermophilus*, ή *K. marxianus*), αυτό πιθανώς οφείλεται στις υψηλές τιμές k_m για τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες έναντι της λακτόζης (Torres et al., 2010).

4.2.4.Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών υψηλής καθαρότητας

Μείγματα GOS παραγόμενα διά τρανσγαλακτοζυλίωσης περιέχουν πάντα σημαντικές ποσότητες μη υδρολυμένης λακτόζης και μονοσακχαρίτες. Η αποδοτική απομάκρυνση αυτών των συστατικών επιτρέπει την εμπορευματοποίηση προϊόντων GOS υψηλής προστιθέμενης αξίας (Crittenden and Playne 2002). Ο διαχωρισμός των μονοσακχαριτών σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιείται, συνήθως, μέσω μιας χρωματογραφικής διεργασίας ανιονεναλλαγής με χρήση ρητινών ή ενεργού άνθρακα (Hernandez and others 2009; Nobre and others 2009). Αναφορικά με την χρωματογραφία ιονεναλλαγής, χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον οι ρητίνες κατιονεναλλαγής, καθώς έχουν την υψηλότερη συγγένεια με τους μονοσακχαρίτες, επομένως οι ολιγοσακχαρίτες εκλούνται πρώτοι από την στήλη. Ο ενεργός άνθρακας

έχει αναφερθεί ότι διαθέτει υψηλότερη συγγένεια με τους ολιγοσακχαρίτες, σε σύγκριση με τους μονοσακχαρίτες και τους δισακχαρίτες, καθιστώντας την χρήση του σε βιομηχανικό επίπεδο πλεονεκτική, καθώς η αναγέννησή του μπορεί να λάβει χώρα εκτός της γραμμής παραγωγής, δίχως μεγάλες απώλειες υποστρώματος.

Προσφάτως, μια συγκριτική μελέτη των τεχνικών κλασμάτωσης για την παραγωγή μειγμάτων GOS υψηλής καθαρότητας, σε προπαρασκευαστική κλίμακα, κατέδειξε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών ήταν η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την παραγωγή κλασμάτων υψηλής καθαρότητας, καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό GOS με διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού (Hernandez and others 2009). Παρόλο που δεν βρίσκονται ακόμα σε ώριμο στάδιο, οι τεχνικές μεμβρανών, ιδιαίτερως η νανοδιήθηση, αποτελούν επίσης δυνητικές τεχνικές κλασμάτωσης ολιγοσακχαριτών από περίπλοκα συστήματα σε μεγάλη κλίμακα (Goulas and others 2002, 2003; Feng and others 2009). Η τεχνολογία εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά έχει επιδείξει, επίσης, ικανοποιητικές αποδόσεις στην απομόνωση μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού ολιγοσακχαριτών από σύνθετα μείγματα (Montanes and others 2009).

Επιπλέον, άλλες προσεγγίσεις βασισμένες στα χαρακτηριστικά επιλεκτικής ζύμωσης ορισμένων μικροοργανισμών έχουν προταθεί. Κατά την διάρκεια αυτών των διεργασιών ζύμωσης, αναλόγως τον μικροοργανισμό, δύναται να παραχθεί αιθανόλη και, αν αυξηθεί σε τοξικά επίπεδα, η δραστηκότητά του μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο. Η ζύμη *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της καθαρότητας ενός εμπορικού μείγματος GOS που έχει παραχθεί με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *B. circulans*, με ολοκληρωτική απομάκρυνση των μονοσακχαριτών (Hernandez and others 2009). Όμοια προσέγγιση εφαρμόσθηκε και σε μείγμα GOS που έχει παραχθεί με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από βιομάζα του μικροοργανισμού *B. bifidum* (Goulas and others 2007a). Η ζύμη *K. marxianus* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της καθαρότητας ενός μείγματος GOS που έχει παραχθεί με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *B. circulans* από 38 % σε 97 %, μέσω επιλεκτικής ζύμωσης των μονο- και δισακχαριτών, συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης (Cheng and others 2006a). Επίσης, ένας συνδυασμός των ζυμών *S. cerevisiae* και *K. lactis* έχει χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της καθαρότητας ενός μείγματος GOS που έχει παραχθεί με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *P. expansum* από 29 % σε 98 %, μέσω επιλεκτικής ζύμωσης των μονοσακχαριτών και της λακτόζης (Li and others 2008).

Ο διαχωρισμός της λακτόζης από τους υπόλοιπους δισακχαρίτες, οι οποίοι συγκαταλέγονται στους GOS σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, έχει αποδειχθεί δύσκολος με όλες τις προαναφερθείσες διεργασίες και συνήθως επέρχονται μεγάλες απώλειες σε GOS, κυρίως όσον αφορά στους δισακχαρίτες πέραν της λακτόζης. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, οι Splechtna and others (2001) πρότειναν μια διεργασία με την οποία η λακτόζη διαχωρίζεται αποδοτικά από τα υπόλοιπα σάκχαρα αποτελεί η χρωματογραφία ανιονεναλλαγής μετά την επιλεκτική οξειδωσή της προς λακτοβιονικό οξύ, χρησιμοποιώντας μια μυκητιακή αφυδρογονάση της κελλοβιόζης. Ωστόσο, με αυτήν την διεργασία επέρχεται απώλεια GOS περί το 17 %, καθώς οι μυκητιακές αφυδρογονάσεις της κελλοβιόζης που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν εξειδικευμένες ως προς την λακτόζη (Splechtna and others 2001; Maischberger and others 2008) (Torres et al., 2010).

4.2.5.Εμπορικά διαθέσιμοι γαλακτοολιγοσακχαρίτες

Οι GOS παράγονται και κυκλοφορούν στην αγορά από τις εταιρείες Yakult Honsha και Nissin Sugar Manufacturing στην Ιαπωνία, από την εταιρεία Corn Products Intl. στις ΗΠΑ και από τις εταιρείες Borculo Domo Ingredients και Clasado στην Ευρώπη. Επίσης, ορισμένες βιομηχανίες αναφέρουν ότι παράγουν GOS για ενσωμάτωση σε ίδια προϊόντα, παρά για εμπορία αυτών των συστατικών (Playne and Crittenden 2009). Οι βρώσιμοι GOS είναι, συνήθως, διαυγή σιρόπια ή λευκές σκόνες. Και στις δύο περιπτώσεις, είναι μείγματα αποτελούμενα από ολιγοσακχαρίτες με διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού, μη υδρολυμένη λακτόζη και μονοσακχαρίτες (γλυκόζη και γαλακτόζη) (Playne and Crittenden 2009; Tzortzis and Vulevic 2009). Προϊόντα υψηλής καθαρότητας με περιεκτικότητα άνω του 90 % w/w σε GOS είναι διαθέσιμα από ορισμένες βιομηχανίες (Πίνακας XX).

Εκτός από τις διαφορές στην καθαρότητα μεταξύ των εμπορικών προϊόντων GOS, υπάρχουν επίσης διαφορές και στους δεσμούς στην αλυσίδα των ολιγοσακχαριτών, λόγω του διαφορετικού ενζύμου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους. Η σειρά προϊόντων «Oligomate» περιέχει GOS με β -1 \rightarrow 6 γλυκοζιδικούς δεσμούς, το προϊόν «Bimuno» περιέχει GOS με β -1 \rightarrow 3 γλυκοζιδικούς δεσμούς, ενώ τα προϊόντα «Cup-Oligo», «Vivinal GOS» και «Purimune» περιέχουν GOS κυρίως με β -1 \rightarrow 4 γλυκοζιδικούς δεσμούς (Torres et al., 2010).

Πίνακας 4.1. Σύσταση των εμπορικών σκευασμάτων GOS (% w/w επί ξηρού) (Torres et al., 2010).

Εμπορική ονομασία	Μορφή	Εταιρεία παραγωγής	Γλυκόζη	Γαλακτόζη	Λακτόζη	GOS				Σύνολο	Προέλευση ενζύμου	Πηγή
						ΒΠ = 2	ΒΠ = 3	ΒΠ = 4	ΒΠ > 4			
CUP-oligo	σιρόπι με 75 % στερεά ή σκόνη	Nissin Sugar Manufacturing Co. (Τόκυο, Ιαπωνία)		25-30 ⁱ		-	-	-	-	70	<i>Cryptococcus laurentii</i>	A
Oligomate 55	σιρόπι με 75 % στερεά ή σκόνη	Yakult Honsha (Τόκυο, Ιαπωνία)	18-39 ⁱⁱ		10-22	15-17	18-24	10-16	2,0-5,4	50-60	<i>Aspergillus oryzae</i> & <i>Streptococcus thermophilus</i>	B
TOS-100		Yakult Honsha (Τόκυο, Ιαπωνία)	0	0	0-1	0	55	33-35	12-14	99-100	<i>Aspergillus oryzae</i> & <i>Streptococcus thermophilus</i>	Γ
Vivinal GOS	Σιρόπι με 73 % στερεά ή σκόνη	H Friesland Foods Domo (Zwolle, Ολλανδία)	19-22	0,8-1,3		19-27	22-23	11	6,0-7,6	57-59	<i>Bacillus circulans</i>	Δ
Bimuno	Σιρόπι ή σκόνη	Clasado Ltd. (Milton Keynes, Ηνωμένο Βασίλειο)	18	12		25-29	12-14	6,7-7,7	3,8-4,4	48-55	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	E
Purimune	σκόνη	Corn Products Intl., Inc. (Ill., ΗΠΑ)	0,0-1,0	0,0-0,5		16-21	38-51	25-29 ⁱⁱⁱ		90-92	<i>Bacillus circulans</i>	Z

ΒΠ: βαθμός πολυμερισμού

ⁱγλυκόζη, γαλακτόζη και λακτόζη αθροιστικά; ⁱⁱγλυκόζη και γαλακτόζη αθροιστικά ⁱⁱⁱμη διαθέσιμα δεδομένα για ΒΠ ≥ 4.

A. Hartemink and others (1997), Playne and Crittenden (2009). B. Ito and others (1990), Katta and others (2000), Sar and others (2004), Splechna and others (2006); Γ. Ito and others (1990), Rowland and Tanaka (1993); Δ. Goulas and others (2007a), Coulier and others (2009), Sinclair and others (2009). E. Vulevic and others (2008), Silk and others (2009), Tzortzis (2009). Z. GTC Nutrition (2009).

4.3. Ιδιότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών

4.3.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Καθώς οι εμπορικά διαθέσιμοι βρώσιμοι GOS είναι μείγματα, αναμένεται ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητές τους και οι βιολογικές τους δράσεις, σε έναν βαθμό, θα εξαρτώνται από την σύσταση του μείγματος, η οποία με την σειρά της θα καθορίζει τις κατάλληλες εφαρμογές αυτών των μειγμάτων. Η γλυκύτητα, η διαλυτότητα, η ωσμωτικότητα, η ικανότητα κρυστάλλωσης και οι αντιδράσεις Maillard μειώνονται όσο το μοριακό βάρος αυξάνεται, σε αντίθεση με το ιξώδες, το οποίο αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους (Playne and Crittenden 2009). Ο Πίνακας 4.2 συνοψίζει τις συνήθεις ιδιότητες των GOS (Torres et al., 2010).

Πίνακας 4.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Διαλυτότητα	Υδατοδιαλυτοί (περίπου 80 % w/w)
Εμφάνιση	Διαυγείς / άχρωμοι
Ιξώδες	Παρόμοιο με αυτό του σιροπιού αραβοσίτου υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη
Θερμοσταθερότητα	Σταθεροί στους 160 °C για 10 min σε pH = 7. Σταθεροί στους 100 °C για 10 min σε pH = 2. Σταθεροί στους 37 °C για αρκετούς μήνες σε pH = 2.
Σημείο κατάψυξης	Μειώνουν το σημείο κατάψυξης των τροφίμων.
Συγκράτηση υγρασίας	Υψηλή ικανότητα συγκράτησης υγρασίας, αποτρέποντας την υπερβολική ξήρανση
Γλυκύτητα	Συνήθως 0,3-0,6 φορές αυτή της σακχαρόζης

Πηγή: Macfarlane and others (2008), Playne and Crittenden (2009), and Tzortzis and Vulevic (2009)

4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες

4.3.2.1. Αδυναμία πέψης

Αρκετές in vitro και in vivo μελέτες έχουν καταδείξει την σταθερότητα των GOS έναντι της υδρόλυσης από τα ένζυμα που συμμετέχουν στην διαδικασία της πέψης. Έχει αναφερθεί ομόφωνα ότι περισσότερο από το 90 % των GOS περνούν στο παχύ έντερο (van Loo and others 1999). Τα τρι- και τετραμερή των GOS δεν υδρολύονται in vitro από την ανθρώπινη σιελογόνο α-αμυλάση, τα τεχνητά γαστρικά υγρά, την α-αμυλάση του χοιρινού παγκρέατος και την ακετονική σκόνη εντέρου αρουραίου (rat intestinal acetone powder). Αντιθέτως, τα διμερή των GOS υδρολύονται, μερικώς, από τα εντερικά ένζυμα (Chonan and others 2004). Σε άλλη μελέτη, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της 4-

γαλακτοζυλο-λακτόζης υδρολύθηκε από το ομογενοποίημα του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου του αρουραίου (Ohtsuka and others 1990b).

Τα περισσότερα αποτελέσματα από in vivo μελέτες σε ανθρώπους αναφορικά με την αδυναμία πέψης των GOS προέρχονται από εξετάσεις εκπνοής υδρογόνου (hydrogen breath test). Η απέκκριση υδρογόνου διά της αναπνοής είναι πιθανό να εξαρτάται από την δόση των GOS που λαμβάνονται. Χρησιμοποιώντας αυτή την μη επεμβατική τεχνική, μια αύξηση στην εκπνοή υδρογόνου αναφέρεται σε αρκετές μελέτες, όταν η δόση των μη μεταβολιζόμενων GOS ήταν από 15 έως 35 g/d, υποδεικνύοντας ότι οι GOS διαφεύγουν της πέψης και ζυμώνονται από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Tanaka and others 1983; Alles and others 1999; Chohan and others 2004). Ωστόσο, οι Bouhnik and others (1997) έδειξαν μειωμένο εκπνεόμενο υδρογόνο μετά την χορήγηση μιας δόσης GOS των 10 g/d, αλλά, ταυτόχρονα, οι αριθμοί των bifidobacteria ήταν αυξημένοι, υποδεικνύοντας ότι οι GOS ζυμώνονταν από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Bouhnik and others 1997). Έχει επίσης δειχθεί ότι οι GOS ανιχνεύονται στα περιττώματα νεογνών που είχαν τραφεί με βρεφικές τροφές που περιείχαν GOS (Moro and others 2005).

Η ευρωπαϊκή νομοθεσία αναφορικά με τις αναγραφόμενες πληροφορίες στις ετικέτες των τροφίμων υποχρεώνει τους κατασκευαστές προϊόντων τροφίμων που περιέχουν GOS να προσδιορίζουν σαφώς αυτά τα συστατικά ως εδώδιμες ίνες. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη νομοθεσία, ως «εδώδιμες ίνες» ορίζονται «τα υδατανθρακικά πολυμερή με τρία ή περισσότερα μονομερή, που δεν πέπτονται ούτε απορροφώνται από το λεπτό έντερο του ανθρώπινου οργανισμού και εμπίπτουν στις ακόλουθες κατηγορίες: α) εδώδιμα υδατανθρακικά πολυμερή που απαντώνται σε φυσική μορφή στα τρόφιμα όπως καταναλώνονται, β) εδώδιμα υδατανθρακικά πολυμερή που έχουν ληφθεί από πρώτες ύλες τροφίμων με φυσικά, ενζυμικά ή χημικά μέσα και έχουν ωφέλιμη επίδραση στη φυσιολογία του οργανισμού, η οποία έχει καταδειχθεί με επιστημονικά στοιχεία γενικής αποδοχής, γ) εδώδιμα συνθετικά υδατανθρακικά πολυμερή που έχουν ωφέλιμη επίδραση στη φυσιολογία του οργανισμού, η οποία έχει καταδειχθεί με επιστημονικά στοιχεία γενικής αποδοχής (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) Αριθ. 1169/2011 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ Της 25ης Οκτωβρίου 2011, 2011). Συνήθως, η ποσότητα εδωδιμων ινων που εμφανίζεται στις ετικέτες τροφίμων προσδιορίζεται σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται στις Επίσημες Μεθόδους Αναλύσεων της Ένωσης Επίσημων Αναλυτικών Χημικών (Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1995) (DeVries 2004). Ωστόσο, αυτή η μεθοδολογία δεν είναι κατάλληλη για την μέτρηση

άπεπτων ολιγοσακχαριτών, απαιτώντας την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των GOS έχει υιοθετηθεί μια μέθοδος βασισμένη στην ενζυμική επεξεργασία με β-γαλακτοζιδάση ακολουθούμενη από Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρική Ανιχνευτή (High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD) (De Slegte 2002; AOAC 2005).

Επειδή οι GOS είναι άπεπτοι, αλλά ζυμώσιμοι, το θερμιδικό φορτίο των GOS, όπως και των υπολοίπων άπεπτων ολιγοσακχαριτών, εκτιμάται σε 1-2 kcal/g (Roberfroid and others 1993; Cummings and others 1997). Όσον αφορά στις ετικέτες των τροφίμων στην Ευρώπη, για το θερμιδικό φορτίο των GOS δίδεται η τιμή 2 kcal/g (European Directive 2008) (Torres et al., 2010).

4.3.2.2. *Πρεβιοτικές ιδιότητες*

Οι κύριες βιολογικές ιδιότητες των GOS σχετίζονται με την επίδραση που έχουν στην σύσταση και στην δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας. Το ανθρώπινο εντερικό σύστημα φιλοξενεί μια πολύπλοκη κοινότητα βακτηρίων, ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, αρχαίων, ιών και βακτηριοφάγων, συλλογικά αναφερόμενη ως εντερική μικροχλωρίδα. Τα βακτήρια αποτελούν την πλειοψηφία αυτών των μικροοργανισμών: ο συνολικός αριθμός τους στο ανθρώπινο έντερο εκτιμάται σε 10¹⁴ κύτταρα και εντοπίζονται κυρίως στο παχύ έντερο (Backhed and others 2005; Lupp and Finlay 2005). Ο αποικισμός της γαστρεντερικής οδού με εντερική μικροχλωρίδα εμφανίζεται αμέσως μετά την γέννηση και διαρκεί μέχρι τον θάνατο του ανθρώπου. Στους ενήλικες, η εντερική μικροχλωρίδα εκτιμάται ότι αποτελείται από περισσότερα από 500 μόνιμα και παροδικά είδη βακτηρίων (σε παγκόσμιο επίπεδο, όχι ανά άτομο), ωστόσο εκτιμάται ότι μόλις 30-40 από αυτά τα είδη επικρατούν (McCartney and Gibson 2006). Η πλειοψηφία των εντερικών μικροοργανισμών είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι και περιλαμβάνονται σε αυτούς είδη από τα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* και *Ruminococcus* (McCartney and Gibson 2006).

Σημαντική πρόοδος όσον αφορά στον προσδιορισμό της ποιότητας, της ποσότητας και των βιολογικών δράσεων της εντερικής μικροχλωρίδας έχει καταστεί δυνατή ως αποτέλεσμα της εξέλιξης της μεταγονιδιωμικής επιστήμης (metagenomics), δηλαδή της ανάλυσης συλλογικών γονιδιωμάτων των μικροοργανισμών, ένα ανερχόμενο επιστημονικό πεδίο στο οποίο η δύναμη της

γονιδιωματικής ανάλυσης εφαρμόζεται ολόκληρες μικροβιακές κοινότητες (Gill and others 2006). Συλλογικά, η ανθρώπινη μικροχλωρίδα περιέχει τουλάχιστον 100 φορές περισσότερα γονίδια από το ανθρώπινο γονιδίωμα που αντιστοιχεί σε ένα βαθμό μεταβολικής δραστηριότητας που αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο (Gill and others 2006; Wikoff and others 2009). Αυτή η μεταβολική δραστηριότητα περιλαμβάνει την ικανότητα μεταβολισμού άπεπτων σακχάρων της διατροφής διά ζύμωσης προς διάφορα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (short-chain fatty acids, SCFA), τον επηρεασμό των γονιδίων του ξενιστή που ρυθμίζουν την δαπάνη και την αποθήκευση ενέργειας, την συμβολή σε διάφορες βιοσυνθετικές οδούς (συμπεριλαμβανομένων βιταμινών και πρόδρομων ουσιών ισοπρενοειδών), την παραγωγή συζευγμένων ισομερών λινολεϊκού οξέος (conjugated linoleic acid, CLA) και βιοδραστικών πεπτιδίων, με αναγνωρισμένα οφέλη στην υγεία, την ενίσχυση της ομοιόστασης του ξενιστή και την απομάκρυνση επιβλαβών ουσιών από το έντερο, ελαχιστοποιώντας έτσι την έκθεση σε τοξικές ουσίες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κακοήθειες (Sekirov and Finlay 2006; Ross and others 2010).

Η παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου είναι μια από τις σημαντικότερες βιολογικές δράσεις που πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση της μικροχλωρίδας. Αυτά απορροφώνται, οδηγώντας στην πρόσληψη ενέργειας από άπεπτες τροφές. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου επηρεάζουν την μεταφορά επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου, την μεταγωγή ενέργειας σε αυτά, την ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση. Αυτές οι τροφικές ιδιότητες έχουν σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις, επιπλέον της διατήρησης του αμυντικού φραγμού του βλεννογόνου έναντι των οργανισμών-εισβολέων. Όταν απορροφώνται στην κυκλοφορία του αίματος, επηρεάζουν τον ηπατικό έλεγχο του μεταβολισμού των λιπιδίων και των υδατανθράκων και παρέχουν ενέργεια στους μύες, στα νεφρά και στον εγκέφαλο (Cummins 1995).

Το μικροβιακό οικοσύστημα του παχέος εντέρου είναι αρκετά σταθερό αλλά μπορεί να επηρεαστεί από τον γενότυπο, την ηλικία, την διατροφή και την υγεία του ανθρώπου (Lupp and Finlay 2005). Τρεις προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για την ωφέλιμη ρύθμιση της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας: α) η μεση συμπλήρωση της εντερικής μικροχλωρίδας καταναλώνοντας ζωντανά βακτήρια (προβιοτικά), β) η κατανάλωση εξειδικευμένων διατροφικών συστατικών που χρησιμοποιούνται επιλεκτικά από την εντερική μικροχλωρίδα (πρεβιοτικά) και γ) ο συνδυασμός των δύο παραπάνω στρατηγικών (συμβιωτικά). Ως «πρεβιοτικό» ορίζεται ένα επιλεκτικά μεταβολιζόμενο συστατικό το οποίο επιφέρει εξειδικευμένες αλλαγές τόσο στην σύσταση, όσο και στην δραστηριότητα της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, προς όφελος της ευημερίας και της

υγείας του ξενιστή (Gibson and Roberfroid 1995; Gibson and others 2004a). Οι επιλεκτικές ιδιότητες των πρεβιοτικών θεωρείται ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη των βακτηρίων των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* εις βάρος άλλων ομάδων βακτηρίων στο λεπτό έντερο (Macfarlane and others 2006). Μαζί με την ινουλίνη, τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες (fructooligosaccharides, FOS) και την λακτουλόζη, οι GOS είναι επίσης συστατικά που έχουν καθιερωθεί ως πρεβιοτικά από διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί *in vitro* και *in vivo*, τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους (Gibson and others 2004a; Rastall 2006; Roberfroid 2007; Tzortzis and Vulevic 2009).

Οι διαφορές στους βαθμούς πολυμερισμού και στην δομή των ολιγοσακχαριτών που περιέχονται στα μείγματα GOS θεωρείται ότι είναι σημαντικές όσον αφορά στην αφομοίωση των GOS από τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας (Tzortzis and Vulevic 2009). Σε μια πρόσφατη έρευνα, η χορήγηση ενός μείγματος GOS (3,6 g/d) που περιείχε ενώσεις με, κυρίως, β -(1→3), αλλά και β -(1→4) και β -(1→6) δεσμούς, αποδείχθηκε να έχει μεγαλύτερη επίδραση στα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας απ' ό τι είχε ένα μείγμα GOS (4,9 g/d) που περιείχε ενώσεις με, κυρίως, β -(1→4), αλλά και β -(1→6) δεσμούς, έπειτα από 1 εβδομάδα πρόσληψης από υγιείς ανθρώπους (Depeint and others 2008). Και τα δύο μείγματα είχαν GOS με μικρούς βαθμούς πολυμερισμού, αποτελούμενα, κυρίως, από δι- και τρισακχαρίτες, με τους ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσο του 4 να αποτελούν λιγότερο από το 12 και 19 % των συνολικών σακχάρων, αντίστοιχα.

Οι περισσότερες ευεργετικές ιδιότητες των GOS για την υγεία προκύπτουν από την επιλεκτική κατανάλωση αυτών από τα βακτήρια των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* και έχουν αξιολογηθεί από πλήθος ερευνητών (Gibson and others 2004b; Macfarlane and others 2008; Playne and Crittenden 2009; Tzortzis and Vulevic 2009). Σε αυτές περιλαμβάνονται η προστασία έναντι εντερικών μολύνσεων, η αυξημένη απορρόφηση μετάλλων, η ανοσορύθμιση για την πρόληψη αλλεργιών και φλεγμονών του εντέρου, η θετική επίδραση των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, η σύσφιξη των κοπράνων και ο μειωμένος τοξικογόνος μικροβιακός μεταβολισμός που μπορεί να μειώσει τους παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου (Torres et al., 2010).

4.3.2.3. *Ιδιότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών στις βρεφικές τροφές*

Η σημαντικότητα μιας μικροχλωρίδας με αυξημένο πληθυσμό βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* σε ένα υγιές θηλαζόμενο νεογνό είναι ευρέως αποδεκτή (Fanaro

and others 2003). Σε αυτό το στάδιο της ζωής, η μικροχλωρίδα πιστεύεται ότι είναι πολύ σημαντική για την ορθή λειτουργία του εντέρου και την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και, σε μικρότερο βαθμό, του γένους *Lactobacillus* αποτελούν περί το 90 % της συνολικής μικροχλωρίδας ενός θηλαζόμενου βρέφους, ενώ νεογνά που τρέφονται με βρεφικές τροφές έχουν μια πιο ποικιλόμορφη εντερική μικροχλωρίδα με υψηλότερο πληθυσμό δυνητικά περισσότερα παθογόνων μικροοργανισμών, όπως αυτοί των γενών *Clostridium* και *Enterococcus* (Harmsen and others 2000). Οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος μπορούν να φθάσουν σε συγκεντρώσεις έως 8-12 g/L, που είναι 100 φορές υψηλότερες από αυτές στο αγελαδινό γάλα (Kunz and others 2000), αποτελούμενοι, κυρίως, από σιαλικό οξύ, N-ακετυλογλυκοζαμίνη, L-φουκόζη, D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη (Boehm and others 2005). Ένα χαρακτηριστικό των ολιγοσακχαριτών του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος είναι οι μεγάλες ποσότητες γαλακτόζης που περιέχουν. Η δομή ραχοκοκκαλιάς που παρουσιάζουν βασίζεται στην λακτόζη (γαλακτόζη-γλυκόζη) συν ένα ακόμα μονομερές γαλακτόζης που σχηματίζει 3 διαφορετικούς GOS: την 3'-γαλακτοζυλο-λακτόζη, την 4'-γαλακτόζυλο-λακτόζη και την 6'-γαλακτόζυλο-λακτόζη (Boehm and others 2005). Η υπεροχή των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* στην μικροχλωρίδα των θηλαζόμενων βρεφών πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητα αυτών των βακτηρίων να χρησιμοποιούν τους ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος, περιλαμβανομένων των GOS (Newburg 2000; Fanaro and others 2003).

Η αναγνωρισμένη επίδραση του μητρικού γάλακτος στα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* μπορεί να αναπαραχθεί χρησιμοποιώντας GOS, χωριστά ή μαζί με FOS, για την ενίσχυση των βρεφικών τροφών με βάση το αγελαδινό γάλα (Bakker-Zierikzee and others 2005; Fanaro and others 2005, 2009; Knol and others 2005a, 2005b; Boehm and Moro 2008). Επιπροσθέτως, η ικανότητα των GOS ομοιάζουν γλυκοσυζυγείς δομές στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης που χρησιμοποιούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς για προσκόλληση στο έντερο, δύναται να προστατέψει τον αποικισμό και την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών κατά την διάρκεια αυτής της ευάλωτης περιόδου της ζωής (Kunz and others 2000; Newburg 2000; Boehm and Moro 2008; Macfarlane and others 2008) (Torres et al., 2010).

4.4. Εφαρμογές σε τρόφιμα

Οι GOS χρησιμοποιούνται, κυρίως, σε βρεφικά γάλατα και βρεφικές τροφές (Playne and Crittenden 2009) και περιέχουν συνήθως 6,0-7,2 g/L GOS (Rastall 2006; Playne and Crittenden 2009). Λόγω της σταθερότητάς τους, επιπλέον των βρεφικών τροφών, οι GOS μπορούν να ενσωματωθούν και σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Προσφάτως, έχουν προστεθεί σε χυμούς φρούτων και άλλα όξινα αφεψήματα, σε ανάλογα κρέατος, σε ζυμωμένα γάλατα, σε αρωματικά γάλατα και σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής (Affertsholt-Allen 2007). Το ψωμί, όπως και τα περισσότερα ψημένα προϊόντα, είναι ένα κατάλληλο υποψήφιο προϊόν για ενσωμάτωση GOS, καθώς κατά την διεργασία της ζύμωσης και της έψησης, τα μόρια των GOS δεν διασπώνται ούτε καταναλώνονται. Επιπλέον, λόγω της αυξημένης ικανότητας των GOS να συγκρατούν υγρασία, αποφεύγεται η υπερβολική ξήρανση του προϊόντος, προσδίδοντας στο ψωμί με GOS καλύτερη γεύση και υφή. Τρόφιμα εξειδικευμένα για την ηλικιωμένους και ασθενείς αποτελούν, επίσης, πολλά υποσχόμενες εφαρμογές για τους GOS (Sako and others 1999).

Όπως και άλλοι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες, οι GOS έχουν μια ευχάριστη γεύση και μπορούν να βελτιώσουν την υφή των τροφίμων στο χέρι και στο στόμα, παρέχοντας πληρωτικές ιδιότητες παρόμοιες με την σακχαρόζη. Οι GOS δεν υφίστανται αποδόμηση από το σάλιο και δεν χρησιμοποιούνται από την στοματική μικροχλωρίδα, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα ζάχαρης που μειώνουν την τερηδόνα. Επίσης, καθώς είναι άπεπτα, έχουν αμελητέα επίδραση στην γλυκόζη του αίματος (Prapulla and others 2000).

Εκτός από τις βιομηχανίες τροφίμων, άλλες βιομηχανίες, όπως αυτές των καλλυντικών και των φαρμάκων, δύνανται να αξιοποιήσουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες των GOS. Οι πρεβιοτικοί ολιγοσακχαρίτες μπορούν να ενισχύσουν επιλεκτικά τον πληθυσμό «ωφέλιμων» βακτηρίων του δέρματος και ορισμένες εφαρμογές προς αυτή την κατεύθυνση έχουν ήδη αναπτυχθεί (Bockmühl and others 2007; Krutmann 2009). Επίσης, η χρήση άπεπτων ολιγοσακχαριτών στα σιτηρέσια των ζώων και των κατοικιδίων παρουσιάζει αύξηση. Οι GOS τυγχάνουν αυξανόμενων εφαρμογών στα ορνιθοτροφεία (Biggs and others 2007; Jung and others 2008; Yang and others 2009), στα χοιροτροφεία (Houdijk and others 1997, 1998; Tzortzis and others 2005a; Modesto and others 2009) και στις ιχθυοκαλλιέργειες, για την βελτίωση της υγείας και της ανάπτυξης των ζώων, την μείωση της χρήσης αντιβιοτικών, την αποτροπή πρόωρων θανάτων και την μείωση των οσμών των περιττωμάτων. Οι GOS

εφαρμόζονται, επίσης, για την για την καταστολή της παραγωγής μεθανίου από τα μηρυκαστικά (Mwenya and others 2004a, 2004b; Santoso and others 2004; Sar and others 2004; Iqbal and others 2008) (Torres et al., 2010).

4.5. Το νομοθετικό πλαίσιο σχετικά με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες

Οι GOS αναγνωρίζονται γενικώς ως ασφαλείς (Generally Recognized As Safe, GRAS) στις ΗΠΑ, έχουν ένα status μη καινοτόμου τροφίμου στην ΕΕ και θεωρούνται ως τρόφιμα για εξειδικευμένες χρήσεις σχετικά με την υγεία (Foods For Specific Health Use, FOSHU) στην Ιαπωνία (Tzortzis and Vulevic 2009), λόγω του γεγονότος ότι είναι συστατικά του μητρικού γάλακτος και του παραδοσιακού γιαουρτιού και μπορούν να παραχθούν με κατανάλωση λακτόζης από την εντερική μικροχλωρίδα. Η μόνη αρνητική επίπτωση των GOS που είναι γνωστή μέχρι σήμερα είναι η παροδική ωσμωτική διάρροια που προκαλείται από την υπερβολική κατανάλωση GOS, παρόμοια με τις μη απορροφώμενες αλκοόλες σακχάρων και την λακτόζη σε άτομα με δυσανεξία. Η ποσότητα των GOS που δεν προκαλεί ωσμωτική διάρροια έχει εκτιμηθεί σε περίπου 0,3-0,4 g/kg σωματικού βάρους, ή περίπου 20 g για έναν μέσο άνθρωπο (Sako and others 1999).

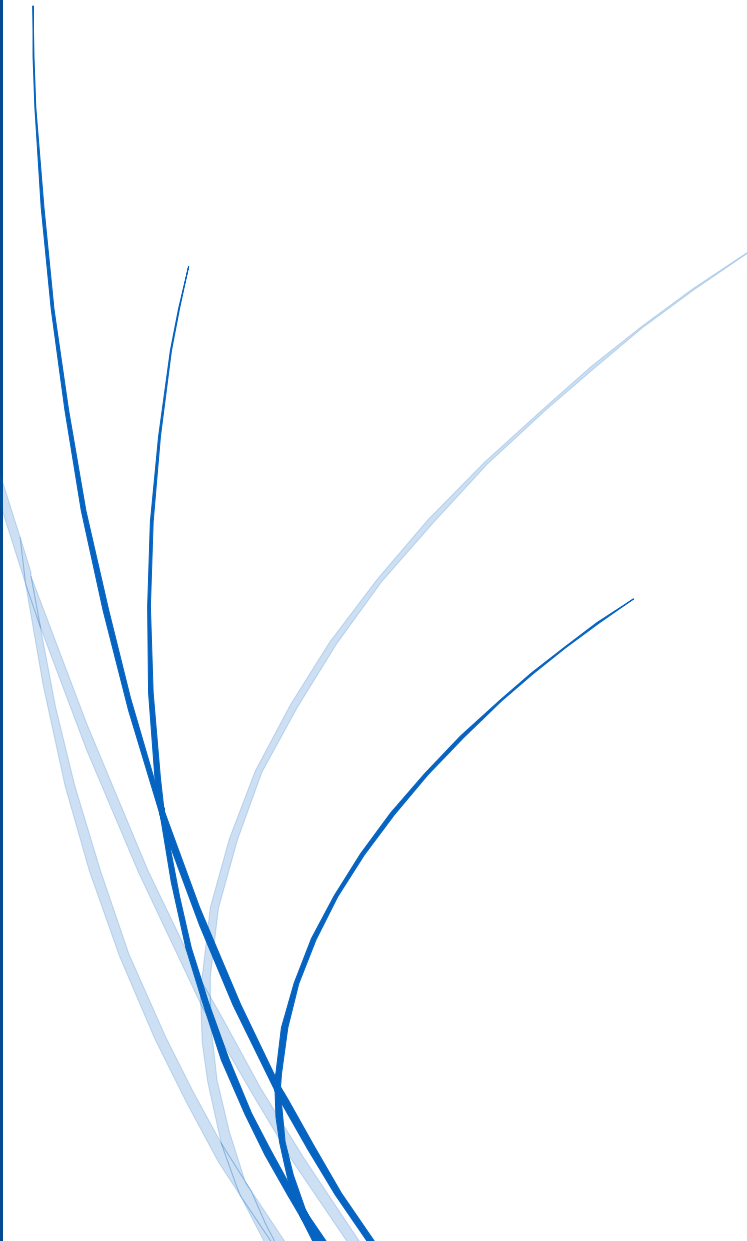
Στην Ευρώπη, ισχυρισμοί σχετικά με την υγεία στα τρόφιμα, κυρίως ισχυρισμοί «γενικής λειτουργικότητας» καθορίζονται από το Άρθρο 13.1 στον Κανονισμό 1924/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20ης Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με τους ισχυρισμούς διατροφής και υγείας που διατυπώνονται στα τρόφιμα. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) αξιολογεί την θεμελιώδη επιστήμη πέρα από τους ισχυρισμούς που παρέχονται από όλα τα κράτη-μέλη. Αν και δεν έχουν ακόμη εγκριθεί, εν τω μεταξύ, τρεις αξιώσεις για τους GOS έχουν ήδη περάσει τον προκαταρκτικό έλεγχο της EFSA, συγκεκριμένα ότι «διατηρεί ένα υγιές φυσιολογικό πεπτικό σύστημα», σχετικά με την «πρεβιοτική δράση και την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*» και την «απορρόφηση ασβεστίου» (EFSA 2010a, 2010b). Ωστόσο, οι ακόλουθοι ισχυρισμοί για τους GOS ότι «συνεισφέρουν στην υποστήριξη ενός υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος σε έναν γηρασόμενο πληθυσμό», ότι «βοηθούν στην διαχείριση των συμπτωμάτων τους συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου» και ότι «ενεργοποιούν τα βακτήρια που ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα» ή «βοηθούν στην ενίσχυση της

αυτοάμυνας του σώματος» δεν πέρασαν από τον προκαταρκτικό έλεγχο της EFSA (Torres et al., 2010).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υλικά και μέθοδοι



5. Υλικά και μέθοδοι

5.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Σκοπό της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της αξιοποίησης των κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας, του όξινου και του γλυκού ορού, για την παραγωγή συστατικών με υψηλή διατροφική και προστιθέμενη αξία, τους πρεβιοτικούς γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), με εφαρμογή καινοτόμων διεργασιών και βιοκαταλυτών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση κύκλου ζωής της προτεινόμενης διεργασίας παραγωγής GOS από όξινο ορό. Παράλληλα, μελετήθηκε η δυνατότητα μεταφοράς της προτεινόμενης διεργασίας παραγωγής GOS από όξινο ορό σε πιλοτική κλίμακα και η τροποποίηση υφιστάμενου γαλακτοκομικού προϊόντος με ενσωμάτωση των παραγόμενων πρεβιοτικών, μελετώντας τη μεταβολή στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Τέλος, μελετήθηκε το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης και η επίδραση που έχουν σε αυτό τα διάφορα συστατικά των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης των δύο κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας, του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού και του τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης, για τον προσδιορισμό των συγκεκτρώσεων των κύριων συστατικών αυτών. Η γνώση της σύστασης των δύο παραπροϊόντων είναι απαραίτητη σε διεργασίες που περιλαμβάνουν ενζυμικές αντιδράσεις, όπως η παραγωγή GOS, καθώς η συγκέντρωση τόσο του υποστρώματος (λακτόζη), όσο και των άλλων συστατικών των ορών επηρεάζουν σημαντικά τη δράση των βιοκαταλυτών που χρησιμοποιούνται (λακτάσες), άρα και την απόδοση των αντιδράσεων και την παραγωγικότητα των προϊόντων (GOS).

Σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε βιοτεχνολογικός χαρακτηρισμός και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης δύο εμπορικών σκευασμάτων λακτασών με βιομηχανική εφαρμογή, της β-γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *Kluyveromyces lactis* και αυτής από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας έρευνας, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Ε.Μ.Π., παραγωγή και απομόνωση δύο καινοτόμων, θερμόφιλων λακτασών, της β-γαλακτοζιδάσης από τον θερμόφιλο μύκητα *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένη σε ζύμη *Pichia pastoris* και της β-γλυκοζιδάσης από το υπερθερμόφιλο βακτήριο *Thermotoga neapolitana*, ετερόλογα εκφρασμένη σε βακτήριο *Escherichia coli*. Οι δύο καινοτόμες λακτάσες

χαρακτηρίστηκαν, επίσης, ως προς τα βιοτεχνολογικά τους χαρακτηριστικά και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης αυτών.

Σε τρίτη φάση πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των τεσσάρων λακτασών σε υπόστρωμα όξινο ορού γιαουρτιού και μελετήθηκε η παραγωγή GOS από αυτόν. Η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης παραγωγής GOS από όξινο ορό γιαουρτιού μελετήθηκε σε συνάρτηση της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη, του ενζυμικού φορτίου και του χρόνου αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης κάθε βιοκαταλύτη, όπως αυτές προσδιορίστηκαν. Υπολογίσθηκαν οι βαθμοί απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS και υδρόλυσης της λακτόζης και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που οδηγούν στη μεγιστοποίηση της απόδοσης σε GOS. Τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων αναλύθηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές και προσδιορίστηκε το προφίλ των παραγόμενων GOS.

Σε τέταρτη φάση πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση κύκλου ζωής και μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων της προτεινόμενης διεργασίας παραγωγής GOS από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των καινοτόμων μεθόδων αξιοποίησης του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού και της συμβατικής τεχνικής διαχείρισής του για την παραγωγή βιοαερίου.

Σε πέμπτη φάση πραγματοποιήθηκε μελέτη της κλιμάκωσης της διαδικασίας παραγωγής GOS από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού σε πιλοτική κλίμακα, στις βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που προσδιορίστηκαν από τη μελέτη σε εργαστηριακή κλίμακα. Οι GOS που παράχθηκαν ενσωματώθηκαν σε γαλακτοκομικό προϊόν, μελετήθηκε η ποιότητα και πραγματοποιήθηκαν πειράματα διατηρησιμότητας του εν λόγω προϊόντος. Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων, η ποιότητα του προϊόντος με ενσωμάτωση GOS προσδιοριζόταν με ενόργανες τεχνικές και οργανοληπτική αξιολόγηση και αυτή συγκρινόταν με δείγμα αναφοράς χωρίς την προσθήκη GOS.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των δύο λακτασών με βιομηχανική εφαρμογή από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae* σε υπόστρωμα τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης και μελετήθηκε η παραγωγή GOS από αυτό. Η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης παραγωγής GOS από τυρόγαλα μελετήθηκε σε συνάρτηση της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη, του ενζυμικού φορτίου και του χρόνου αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης κάθε βιοκαταλύτη. Οι υπολογισμοί και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό για τον όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού που προαναφέρθηκε.

Τέλος, στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε και η μελέτη των θερμοφυσικών ιδιοτήτων της λακτόζης και η μελέτη του φαινομένου κρυστάλλωσης αυτής, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε διεργασίες που περιλαμβάνουν την ενζυμική μετατροπή της σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, ιδιαίτερα όταν απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης και θερμοκρασίες στο αντιδρών διάλυμα για την επίτευξη υψηλών βαθμών απόδοσης της βιοδιεργασίας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των κυριότερων συστατικών του όξινου και γλυκού ορού (γαλακτικό οξύ, πρωτεΐνες, γαλακτόζη) στο φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης, μέσω της κατασκευής δυναμικών καμπυλών ισόθερμης ρόφησης νερού. Επιπλέον, μελετήθηκε και η επίδραση των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών από την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης στην κρυστάλλωση της λακτόζης.

5.2. Χαρακτηρισμός όξινου ορού γιαουτιού και τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αξιοποίηση των δύο κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας: του όξινου και του γλυκού ορού. Ο όξινος ορός που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από την παραγωγική διαδικασία στράγγισης γιαουριού από αγελαδινό γάλα με περιεκτικότητα 0 % w/w σε λιπαρά. Ο όξινος ορός γιαουριού παραλήφθηκε από την ελληνική γαλακτοβιομηχανία Ελληνικά Γαλακτοκομεία Α.Ε. (Τρίκαλα, Ελλάδα) παστεριωμένος σε φιάλες PET 1 L και φυλασσόταν υπό κατάψυξη (-25 °C) μέχρις ότου να χρησιμοποιηθεί. Αντίστοιχα, ο γλυκός ορός (τυρόγαλα) προερχόταν από την παραγωγική διαδικασία σκληρών τυριών από γάλα αιγοπρόβειας προέλευσης. Το τυρόγαλα παραλήφθηκε από την ελληνική εταιρεία Ηπειρωτικές Πρωτεΐνες Α.Ε. (Ιωάννινα, Ελλάδα) παστεριωμένος σε φιάλες PET 1 L και φυλασσόταν υπό κατάψυξη (-25 °C) μέχρις ότου να χρησιμοποιηθεί.

Για τον πλήρη φυσικοχημικό χαρακτηρισμό και των δύο παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μια σειρά αναλύσεων που περιγράφονται στις επόμενες ενότητες.

5.2.1. Σάκχαρα

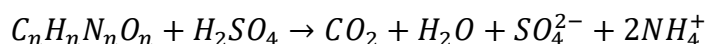
Η περιεκτικότητα των δύο τύπων ορού σε σάκχαρα (γαλακτόζη, γλυκόζη, λακτόζη) προσδιορίστηκε μέσω Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector, HPAEC-PAD). Η μέθοδος που

χρησιμοποιήθηκε ήταν όμοια με αυτήν για την ανάλυση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω, στην ενότητα 5.7.

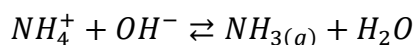
5.2.2. Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα των ορών σε πρωτεΐνες προσδιορίστηκε έμμεσα με τη μέθοδο Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου αζώτου σε οργανικές και ανόργανες ουσίες. Η μέθοδος Kjeldahl διακρίνεται σε τρία στάδια:

α) Χώνευση. Πραγματοποιείται αποδόμηση του αζώτου σε οργανικά δείγματα με χρήση πυκνού οξέος. Αυτό επιτυγχάνεται με βρασμό ενός ομογενοποιημένου δείγματος σε πυκνό θειικό οξύ, οπότε προκύπτει ένα διάλυμα θειικού αμμωνίου, σύμφωνα με τη χημική αντίδραση:



β) Απόσταξη. Πραγματοποιείται προσθήκη περίσσειας βάσεως NaOH στο όξινο μείγμα της χώνευσης για τη μετατροπή του NH_4^+ σε NH_3 , σύμφωνα με τη χημική αντίδραση:



Ακολουθεί βρασμός και υγροποίηση της αέριας NH_3 εντός ενός διαλύματος παραλαβής.

γ) Τιτλοδότηση. Πραγματοποιείται προσδιορισμός της περιεχόμενης αμμωνίας στο διάλυμα παραλαβής.

Η ποσότητα του αζώτου στο δείγμα μπορεί να υπολογισθεί από την ποσότητα της αμμωνίας που προσδιορίζεται στο διάλυμα παραλαβής.

Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Kjeldahl πραγματοποιείται σε ξηρά δείγματα. Για τον σκοπό αυτόν, δείγματα όξινου ορού γιαουρτιού και τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης αφυδατώθηκαν σε ξηραντήρα με κατάψυξη Christ Alpha 1-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Γερμανία). Στους 3 από τους 4 σωλήνες των 300 mL της συσκευής Kjeldahl μεταφέρονται 1-2 g δείγματος ζυγισμένα σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στον 4^ο σωλήνα δεν προστίθεται δείγμα αλλά διατηρείται ως τυφλό. Σε κάθε σωλήνα της συσκευής Kjeldahl προστίθενται 1,0000 g ένυδρου $CuSO_4$, 10,00 g K_2SO_4 , 25 mL πυκνού H_2SO_4 (98 % w/v) και μερικοί πυρήνες βρασμού.

Στη συνέχεια, οι σωλήνες της συσκευής Kjeldahl τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις του μανδύα θέρμανσης του συστήματος Kjeldahl και το σύστημα σφραγίζεται και τίθεται σε εφαρμογή το σύστημα κενού (Venturi). Αρχικά το σύστημα θερμαίνεται ήπια, για περίπου 20 min, έως ότου το μελανόχρωμο νεφέλωμα που θα αναπτυχθεί να «σκάσει» και να αρχίσει να υποχωρεί. Ακολουθεί ήπιος βρασμός για τουλάχιστον 15 min, έως ότου διαυγάσει το περιεχόμενο των σωλήνων, ακολουθούμενος από έντονο βρασμό για 30 min. Στο τέλος του βρασμού το περιεχόμενο των σωλήνων πρέπει να έχει λάβει σμαραγδένιο χρώμα. Οι σωλήνες της συσκευής Kjeldahl αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ακολούθως, κάθε σωλήνας προσαρμόζεται στη συσκευή απόσταξης του συστήματος Kjeldahl. Πληρώνονται τα δοχεία του συστήματος απόσταξης με απιονισμένο νερό και διάλυμα $NaOH$ 32 % w/w . Για κάθε δείγμα απαιτούνται 75 mL H_2O και 125 mL $NaOH$. Για κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένου του τυφλού, προετοιμάζεται μια κωνική φιάλη των 250 mL, εντός της οποίας προστίθενται 50 mL διαλύματος H_2SO_4 0,5 N. Κατόπιν, ενεργοποιείται το σύστημα απόσταξης και το απόσταγμα συλλέγεται εντός της κωνικής φιάλης με το διάλυμα H_2SO_4 0,5 N για 5 min, οπότε συλλέγονται περίπου 200 mL αποστάγματος. Ακολούθως, τιτλοδοτείται το εναπομείναν θειικό οξύ εντός της κωνικής φιάλης με χρήση διαλύματος $NaOH$ 0,5 N και δείκτη ερυθρού μεθυλίου – κυανού μεθυλενίου.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε οργανικό άζωτο (% N) υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 1.

$$\% N = 1,40007 \cdot \frac{(V_S - V_B) \cdot N}{w} \quad 1$$

όπου: V_S ο καταναλωθείς όγκος προτύπου διαλύματος $NaOH$ για την τιτλοδότηση του δείγματος [mL], V_B ο καταναλωθείς όγκος προτύπου διαλύματος $NaOH$ για την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος [mL], N η κανονικότητα του προτύπου διαλύματος $NaOH$ που χρησιμοποιήθηκε κατά την τιτλοδότηση και w το βάρος του δείγματος που αναλύθηκε [g]. Για τον υπολογισμό του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές 6,28 για τον όξινο ορό και 6,41 για τον γλυκό ορό, σύμφωνα με τους van Boekel & Ribadeau Dumas (1987).

5.2.3. Λιπαρά

Το περιεχόμενο του όξινου και του γλυκού ορού σε λιπαρά προσδιορίστηκε σταθμικά, με τη μέθοδο Röse-Gottlieb, όπως αυτή περιγράφεται από τους O'Connor & O'Brien (2002). Εντός διαχωριστικής χοάνης μεταφέρονται 30,00 g ορού και

προστίθενται 4,5 mL αμμωνίας, προκειμένου για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος. Έπειτα, προστίθενται 30 mL αιθανόλης 96 % v/v για τη διάσπαση του γαλακτώματος του λίπους και τη διευκόλυνση της εκχύλισης των λιπιδίων. Η διαχωριστική χοάνη πωματίζεται και ανακινείται ελαφρώς. Εντός της χοάνης προστίθενται 75 mL διαιθυλαιθέρα, για την εκχύλιση του μη γαλακτωματοποιημένου λίπους, και 75 mL πετρελαϊκού αιθέρα, για τη βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης, μειώνοντας τη διαλυτότητα του νερού, της λακτόζης και της αιθανόλης στον διαιθυλαιθέρα. Η χοάνη πωματίζεται και ανακινείται αρκετές φορές, ούτως ώστε να εκχυλιστούν τα λιπαρά στην οργανική φάση. Σε περίπτωση σχηματισμού γαλακτώματος, προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης εντός της εκχυλιστικής χοάνης και η χοάνη ανακινείται ελαφρώς, προκειμένου για τη διάσπαση του γαλακτώματος. Κατόπιν, η χοάνη αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 30 min, έως ότου σχηματισθεί μία διαυγής υπερκείμενη οργανική φάση, ευκρινώς διακριτή από την υποκείμενη υδατική φάση. Η υποκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και η υπερκείμενη οργανική φάση σε σφαιρική φιάλη των 500 mL. Η υδατική φάση μεταφέρεται εκ νέου εντός της διαχωριστικής χοάνης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της εκχύλισης με διαιθυλαιθέρα – πετρελαϊκό αιθέρα άλλες δύο φορές. Στο τέλος, η υδατική φάση απορρίπτεται. Οι οργανικοί διαλύτες του μείγματος εντός της σφαιρικής φιάλης των 500 mL εξατμίζονται πλήρως, με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό. Έπειτα, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης αναδιαλύεται σε 50 mL διαιθυλαιθέρα και το μείγμα μεταφέρεται εντός σφαιρικής φιάλης των 100 mL και ο διαιθυλαιθέρας εξατμίζεται πλήρως, με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό. Κατόπιν η σφαιρική φιάλη ξηραίνεται σε πυριατήριο που λειτουργεί στους 102°C. Η σφαιρική φιάλη με το ξηρό λίπος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων του γραμμαρίου και καταγράφεται το μεικτό βάρος της φιάλης και του λίπους. Έπειτα, η σφαιρική φιάλη πλένεται σχολαστικά με μείγμα διαιθυλαιθέρα – πετρελαϊκού αιθέρα ίσων όγκων, έως ότου αφαιρεθεί πλήρως το λίπος από τη φιάλη. Στη συνέχεια, η σφαιρική φιάλη ξηραίνεται σε πυριατήριο που λειτουργεί στους 102 °C. Η σφαιρική φιάλη χωρίς το λίπος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων του γραμμαρίου και καταγράφεται το καθαρό βάρος της φιάλης. Από τη διαφορά μεικτού και καθαρού βάρους υπολογίζεται σταθμικά η περιεκτικότητα του δείγματος σε λιπαρά.

5.2.4.Γαλακτικό οξύ

Η περιεκτικότητα των δύο τύπων ορού σε γαλακτικό οξύ προσδιορίσθηκε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τους Borshchevskaya et al. (2016). Αρχικά, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς για το γαλακτικό οξύ. Εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 mL μεταφέρονται 1,1765 g DL-γαλακτικού οξέος 85 % w/w και η φιάλη πληροίται με απιονισμένο νερό. Η φιάλη ανακινείται καλά. Το διάλυμα αυτό αποτελεί μητρικό διάλυμα περιεκτικότητας 1 % w/v σε γαλακτικό οξύ. Χρησιμοποιώντας το παραπάνω μητρικό διάλυμα γαλακτικού οξέος παρασκευάζονται διαλύματα με περιεκτικότητες σε γαλακτικό οξύ από 0,1 έως 0,5 % w/v. Για καθένα από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα γαλακτικού οξέος μεταφέρονται εις τριπλούν εντός δοκιμαστικού σωλήνα 2 mL διαλύματος FeCl_3 0,2 % w/v και προστίθενται 50 μL προτύπου διαλύματος γαλακτικού οξέος. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται έντονα. Καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 390 nm εντός 15 min από την ανάμειξη και καταστρώνεται το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος και χαράσσεται η βέλτιστη ευθεία που διέρχεται από τα πειραματικά σημεία. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ των δύο τύπων ορού, τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα ούτως ώστε η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος να ευρίσκεται εντός του εύρους των τιμών για τις οποίες η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική (0-0,5 % w/v). Εντός δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρονται 2 mL διαλύματος FeCl_3 0,2 % w/v και προστίθενται 50 μL δείγματος. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται έντονα. Καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 390 nm εντός 15 min από την ανάμειξη. Με βάση την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε γαλακτικό οξύ. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

5.2.5.Στερεό Υπόλειμμα και Τέφρα

Το στερεό υπόλειμμα και η τέφρα του όξινου και του γλυκού ορού προσδιορίσθηκαν σταθμικά. Τρεις κάψες πορσελάνης ξηραίνονται για 24 h σε πυριατήριο που λειτουργεί στους 105 ± 3 °C και μετρείται το καθαρό βάρος των ξηρών καψών (m_{net}) σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων του γραμμαρίου. Κατόπιν, μεταφέρονται σε κάθε κάψα πορσελάνης περίπου 50 g ορού και καταγράφεται η μεικτή μάζα του ορού και της κάψας ($m_{\text{tot}(i)}$). Οι κάψες με το περιεχόμενο δείγμα μεταφέρονται εντός πυριατηρίου που λειτουργεί στους 105 ± 3 °C και αφήνονται να ξηραθούν για 24 h. Μετά το πέρας της ξήρανσης, οι κάψες με το ξηρό δείγμα μεταφέρονται εντός

ξηραντήρα, έως ότου λάβουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετρείται το μεικτό βάρος κάψας και ξηρού δείγματος ($m_{tot(d)}$) και προσδιορίζεται το στερεό υπόλειμμα του δείγματος σύμφωνα με την εξίσωση 2.

$$\text{στερεό υπόλειμμα} = \frac{m_{tot(d)} - m_{net}}{m_{tot(i)} - m_{net}} \cdot 100 \% \quad 2$$

Στη συνέχεια, οι κάψες με τα ξηρά δείγματα μεταφέρονται εντός καμίνου, η οποία ρυθμίζεται στους 550 °C και τίθεται σε λειτουργία. Τα δείγματα αφήνονται να αποτεφρωθούν για 16 h. Μετά το πέρας της αποτέφρωσης, οι κάψες με την τέφρα μεταφέρονται εντός ξηραντήρα, έως ότου λάβουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετρείται το μεικτό βάρος κάψας και τέφρας ($m_{tot(a)}$) και προσδιορίζεται το περιεχόμενο του δείγματος σε τέφρα, σύμφωνα με την εξίσωση 3.

$$\text{τέφρα} = \frac{m_{tot(a)} - m_{net}}{m_{tot(i)} - m_{net}} \cdot 100 \% \quad 3$$

5.2.6. Ιόντα μετάλλων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων μετάλλων που περιέχονται τόσο στον όξινο όσο και στον γλυκό ορό χρησιμοποιήθηκαν δύο ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων κατιόντων καλίου (K^+) και νατρίου (Na^+) πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry, AAS). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), μαγνησίου (Mg^{2+}), μαγγανίου (Mn^{2+}), ψευδαργύρου (Zn^{2+}) και χαλκού (Cu^{2+}) πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES).

5.2.7. Θειικά Ιόντα

Η συγκέντρωση θειικών ανιόντων στον όξινο και τον γλυκό ορό προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη Θολωσιμετρική Μέθοδο 9038 του 1986 της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α. (Sulphate Turbidimetric Method 9038 (1986) of the United States Environmental Protection Agency (EPA)). Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα εξισορρόπησης, διαλύοντας σε 60 mL υπερκαθαρού νερού 6 mL πυκνού υδροχλωρίου (HCl), 20 mL αιθανόλης 96 % v/v, 15 g χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 10 mL γλυκερόλης. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, εντός ογκομετρικής φιάλης των 1000 mL μεταφέρονται 0,1479 g Na_2SO_4 και η φιάλη πληροίται με υπερκαθαρό νερό, μέχρι τη χαραγή. Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύεται μέχρι πλήρους διαλύσης

του άλατος και το διάλυμα αυτό αποτελεί μητρικό διάλυμα θειικών ανιόντων (SO_4^{2-}) συγκεντρώσεως 100 mg/L. Χρησιμοποιώντας το παραπάνω μητρικό διάλυμα θειικών ανιόντων παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα όγκου 100 mL εις τριπλούν, με συγκεντρώσεις θειικών ανιόντων 20-100 mg/L, αραιώνοντας κατάλληλα το μητρικό διάλυμα. Καθένα από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα θειικών ανιόντων (100 mL) μεταφέρονται εντός κωνικής φιάλης των 250 mL, προστίθενται 5 mL αντιδραστηρίου εξισορρόπησης και το μείγμα αναδεύεται μαγνητικά. Υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται 1 κουταλάκι μετρήσεως (5 mL) κρύσταλλοι $BaCl_2$ (περίπου 7 g) και μετά το πέρας ακριβώς 1 min μετράται η απορρόφηση του αιωρήματος ανά 30 s για 5 min στα 420 nm και καταγράφεται η μέγιστη απορρόφηση. Καταστρώνεται η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στα 420 nm συναρτήσεως της συγκέντρωσης θειικών ανιόντων.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης θειικών ανιόντων στον όξινο και τον γλυκό ορό, τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα, με χρήση υπερκαθαρού νερού, ούτως ώστε η συγκέντρωση θειικών ανιόντων να βρίσκεται εντός του εύρους των τιμών για τις οποίες η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική (0-100 mg/L). Εντός κωνικής φιάλης των 250 mL μεταφέρονται 100 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και προστίθενται 5 mL αντιδραστηρίου εξισορρόπησης και το μείγμα αναδεύεται μαγνητικά. Υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται 1 κουταλάκι μετρήσεως (5 mL) κρύσταλλοι $BaCl_2$ (περίπου 7 g) και μετά το πέρας ακριβώς 1 min μετράται η απορρόφηση του αιωρήματος ανά 30 s για 5 min στα 420 nm και καταγράφεται η μέγιστη απορρόφηση. Με βάση την καμπύλη αναφοράς, η απορρόφηση μετατρέπεται σε συγκέντρωση θειικών ανιόντων.

5.3. Προεπεξεργασία όξινου ορού και τυρογάλακτος

Ο όξινος ορός προερχόταν από τη στράγγιση γιαουρτιού με περιεκτικότητα 0 % σε λιπαρά και παραλαμβάνονταν παστεριωμένος. Από προκαταρκτική μελέτη παρατηρήθηκε ότι η τιμή του pH του όξινου ορού παρέμενε σταθερή κατά την επώασή του για έως 10 h στο θερμοκρασιακό εύρος 35-50 °C, είτε στην φυσιολογική τιμή του pH του, είτε μετά από ρύθμιση αυτής στην τιμή 7,2 με χρήση διαλύματος NaOH.

Αντιθέτως, το τυρόγαλα προερχόταν από την τυροκόμηση σκληρών τυριών ωρίμανσης από γάλα αιγοπρόβειας προέλευσης και δεν είχε υποστεί παστερίωση πριν την παραλαβή του. Από την προκαταρκτική μελέτη που προηγήθηκε πριν την αξιοποίησή του προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, παρατηρήθηκε ότι η τιμή του pH του τυρογάλακτος δεν παρέμενε σταθερή κατά τη διάρκεια επώασης αυτού στο θερμοκρασιακό εύρος 35-45 °C, αλλά παρουσίαζε σημαντική μείωση. Αυτή η μεταβολή

της τιμής του pH οφειλόταν στην ανάπτυξη μικροβιακού φορτίου προερχόμενο από την οξυγαλακτική καλλιέργεια που χρησιμοποιούνταν για την πήξη του γάλακτος κατά την τυροκόμηση, όπως προέκυψε από μικροβιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον ανεπεξέργαστο γλυκό ορό.

Η παστερίωση του τυρογάλακτος στο εργαστήριο με εξοπλισμό διαλείποντος έργου, σε θερμοκρασίες 75-95 °C για χρόνους 5-30 min, ήταν μεν επιτυχημένη όσον αφορά στη μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου και τη διατήρηση της τιμής του pH του τυρογάλακτος σταθερού κατά τη διάρκεια της επώασης για την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων, υποβάθμισε, όμως, σημαντικά την ποιότητα του υποστρώματος, λόγω μετουσίωσης των περιεχόμενων πρωτεϊνών, δημιουργώντας προβλήματα στην περαιτέρω διαχείρισή του (συμπύκνωση, ενζυμική αντίδραση και ανάλυση των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών). Έτσι, επιλέχθηκε η μέθοδος της υπερδιήθησης από μεμβράνη πορώδους 0,22 μm, προκειμένου για τον διαχωρισμό του μικροβιακού φορτίου από το τυρόγαλα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτή η τεχνική ήταν επιτυχημένη, μειώνοντας το μικροβιακό φορτίο κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ η τιμή pH του τυρογάλακτος παρέμενε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια επώασης που απαιτούνταν για τη διεξαγωγή των ενζυμικών αντιδράσεων, είτε με είτε χωρίς ρύθμιση της τιμής του pH του στο 7,2, με χρήση διαλύματος NaOH.

Για τη μελέτη της επίδρασης της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη στην απόδοση της ενζυμικής παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών, με εφαρμογή των μελετηθεισών λακτασών, τόσο ο όξινος, όσο και ο γλυκός ορός συμπυκνώθηκαν με χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό Büchi RE-111 Rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Ελβετία), με χρήση υάλινης φιάλης συμπύκνωσης χωρητικότητας 2000 mL η οποία πληρωνόταν αρχικά στο ήμισυ του ωφέλιμου όγκου, μέχρι την επίτευξη των επιθυμητών τιμών συγκέντρωσης λακτόζης στον όξινο (10, 15 και 20 % w/v) και τον γλυκό ορό (10 και 15 % w/v). Το κενό (80 mbar) επιτεύχθηκε με τη χρήση αντλίας Büchi Vacuum Pump V-100 (Büchi Labortechnik AG, Ελβετία) και ο ψυκτήρας ήταν συνδεδεμένος με υδατόλουτρο Lauda ecoline RE 312 (Γερμανία), με το ψυκτικό να είναι ρυθμισμένο στους 5 °C.

5.4. Παραγωγή καινοτόμων θερμόφιλων λακτασών

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε σύνθεση, παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός δύο καινοτόμων, μη εμπορικών λακτασών, προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη παραγωγής

γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας ως υπόστρωμα. Οι δύο αυτές λακτάσες ήταν η β-γαλακτοζιδάση από τον θερμοφιλο μύκητα *Thermothielavioides terrestris* και η β-γλυκοζιδάση από το υπερθερμοφιλο βακτήριο *Thermotoga neapolitana*. Η παραγωγή, η απομόνωση και ο καθαρισμός των δύο αυτών ενζύμων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, σε συνεργασία με τη Δρ. Αναστασία Ζέρβα και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Ρωμανό Σιάπερα, υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΜΠ κ. Ευάγγελου Τόπακα.

5.4.1. Παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*

Ο μύκητας *Thermothielavioides terrestris* είναι ένας νηματοειδής ασκομύκητας με βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης στους 40– 45 °C και pH 4,5. Λόγω της θερμοφιλης και οξεόφιλης φύσης του, ο *T. terrestris* επιλέχθηκε για την ανακάλυψη μιας νέας, θερμοσταθερής και σταθερής σε όξινο pH β-γαλακτοσιδάσης από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, με στόχο την εφαρμογή του στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναφορικά με την αξιοποίηση των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας ως υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, με ελάχιστη προετοιμασία της πρώτης ύλης. Το γονίδιο *bgal1* επιλέχθηκε από το γονιδίωμα του μύκητα *T. terrestris* NRRL 8126, κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε ζύμη *Pichia pastoris*.

Το γονίδιο της *TtbGal1* συντέθηκε από την εταιρία GenScript. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης του *pPICZaC* με τα ένζυμα περιορισμού *ClaI* και *XbaI*, περιλαμβάνοντας στο πλαίσιο ανάαγνωσης και τον παράγοντα α-έκκρισης του *Saccharomyces cerevisiae* και τις αλληλουχίες επισήμανσης C-term-His6. Ο ανασυνδυασμένος φορέας *pPICZaC/bgal1* γραμμικοποιήθηκε με *PmeI* και μετασχηματίστηκε σε *P. pastoris* X-33 μέσω ηλεκτροδιάτρησης.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων *Pichia pastoris* που ήταν ανθεκτικά στη ζεοσίνη και η διαλογή τους για έκφραση β-γαλακτοζιδάσης σε στερεό μέσο διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας X-GAL ως υπόστρωμα.

Ο ανασυνδυασμένος κλώνος *P. pastoris* που επιλέχθηκε αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες και το ανασυνδυασμένο ένζυμο καθαρίστηκε από το διήθημα της καλλιέργειας με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου-ιόντος (IMAC) (Talon, Clontech, Mountain View, CA, USA, 1,0 cm εσωτερικά, 15 cm μήκος). Η ηλεκτροφόρηση

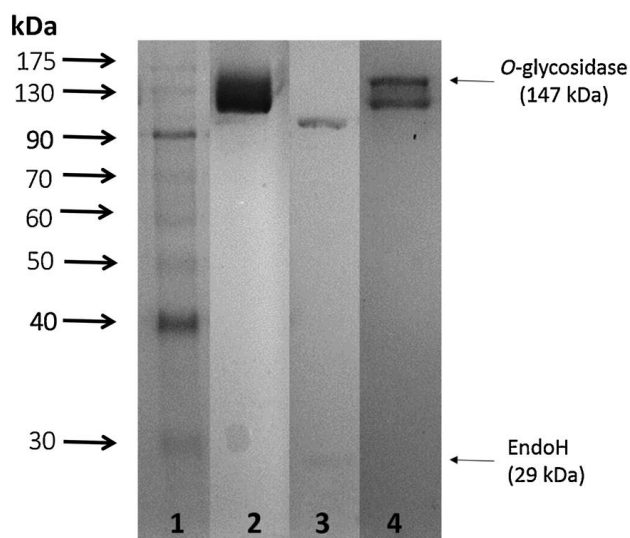
γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε με πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 12,5 % για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Το γονίδιο *TtbGal1* κλωνοποιήθηκε στη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης του *pPICZαC* με ένζυμα περιορισμού *ClaI* και *XbaI*, με τον παράγοντα α-έκκρισης *Saccharomyces cerevisiae* και τις αλληλουχίες επισήμανσης C-term-His6. Το γραμικοποιημένο πλασμίδιο ηλεκτροδιατρήθηκε σε κύτταρα *P. pastoris* και έγινε διαλογή των ανθεκτικών στη ζεοσίνη κλώνων για ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης σε στερεό και υγρό μέσο. Οι περισσότεροι κλώνοι έδειξαν ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης 18-31 U mL⁻¹ μετά από 6 μέρες καλλιέργειας ενώ στο υπερκείμενο δύο εξ αυτών η ενεργότητα ήταν σχεδόν διπλάσια, δηλ. 57-68 U mL⁻¹. Αυτοί οι δύο κλώνοι πιθανώς φέρουν περισσότερα από ένα αντίγραφα του εισαγόμενου γονιδίου *bgal1* και έτσι παρήγαγαν τη διπλάσια ποσότητα της ετερόλογης πρωτεΐνης. Ο κλώνος με την υψηλότερη ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης επιλέχθηκε για περαιτέρω πειράματα.

Η β-γαλακτοζιδάση *TtbGal1* από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* είναι μια πρωτεΐνη 993 αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένου του πεπτιδίου σήματος έκκρισης 19 αμινοξέων (MRPSAVAVALLSASRGCSA), όπως υπολογίσθηκε με το εργαλείο SignalP v5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019). Σύμφωνα με το εργαλείο ExPASy ProtParam, το προβλεπόμενο μοριακό βάρος (MW) της ανασυνδυασμένης β-γαλακτοζιδάσης *TtbGal1* είναι 106 kDa και το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI) είναι 5,78 (Walker et al., 2005).

Η ανασυνδυασμένη β-γαλακτοζιδάση *TtbGal1* καθαρίστηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας και εμφανίστηκε ως μια θολή ζώνη σε πηκτώματα SDS-PAGE στα 120 kDa, περίπου (Εικόνα 5.1, θέση 2). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, όπως συνήθως συμβαίνει για τις περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από μύκητες, και ειδικά για τις ετερόλογες πρωτεΐνες που εκφράζονται από τη ζύμη *P. pastoris* (Zerva et al., 2015). Συγκεκριμένα, η αλληλουχία αμινοξέων της β-γαλακτοζιδάσης *TtbGal1* από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* περιλαμβάνει 17 θέσεις Ο-γλυκοζυλίωσης και 5 θέσεις Ν-γλυκοζυλίωσης, όπως υπολογίζονται από τους αλγόριθμους NetOGlyc 4.0 (Steentoft et al., 2013) και NetNGlyc 1.0 (Blom et al., 2004), αντίστοιχα. Η επεξεργασία με Ο-γλυκοζιδάση οδήγησε στην εμφάνιση μιας πιο οξείας ζώνης στο ίδιο μοριακό βάρος των 120 kDa περίπου (Εικόνα 5.1, θέση 4), ενώ η επεξεργασία με EndoH οδήγησε στην αφαίρεση της Ν-συνδεδεμένης γλυκοζυλίωσης και στην εμφάνιση μιας οξείας ζώνης στα 110 kDa περίπου (Εικόνα 5.1, θέση 3). Αυτή η τιμή συμφωνεί με το θεωρητικό μοριακό βάρος της β-γαλακτοζιδάσης *TtbGal1* από

τον μικροοργανισμό *T. terrestris*, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου c-myc και του His-tag (108,5 kDa) (Zerva et al., 2021).



Εικόνα 5.1. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) της καθαρισμένης β-γαλακτοζιδάσης *Tbgal1* από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris* (θέση 2) και της καθαρισμένης β-γαλακτοζιδάσης *Tbgal1* μετά από επεξεργασία με EndoH (θέση 3) και O-γλυκοζιδάση (θέση 4). Θέση 1: Πρότυπο δείγμα με πρωτεϊνικά μόρια γνωστού μοριακού βάρους.

5.4.2. Παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*

Η χρήση υπερθερμόφιλων ενζύμων για τη μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες είναι ελκυστική επειδή σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης, λόγω της έντονης εξάρτησης της διαλυτότητας αυτού του δισακχαρίτη από τη θερμοκρασία, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, με αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλών αποδόσεων σύνθεσης ολιγοσακχαριτών.

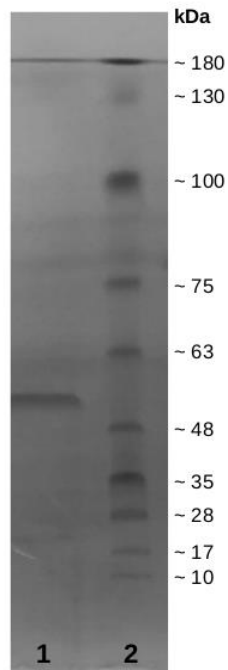
Το γένος *Thermotoga* είναι μια πλούσια πηγή υπερθερμόφιλων γλυκοζυλο-υδρολασών, παρά το σχετικά μικρό μέγεθος του γονιδιώματός τους. Το γονίδιο *bglA* που κωδικοποιεί τη β-γλυκοζιδάση του θαλάσσιου υπερθερμόφιλου βακτηρίου *Thermotoga neapolitana* επιλέχθηκε να παραχθεί λόγω της δυνατότητας του ενζύμου να παράγει GOS χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη λακτόζη και της σταθερότητας που εμφανίζει στο θερμοκρασιακό εύρος 70-100 °C (Park et al., 2005).

Το γονίδιο της *TnbGal1* συντέθηκε από την εταιρία GenScript. Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδίου pET22b(+) με

τα ένζυμα περιορισμού *NdeI* και *XhoI*. Ο ανασυνδυσασμένος φορέας μετασχηματίστηκε χημικά σε *E. coli* Arctic Express Competent Cells. Στα μετασχηματισμένα, ανθεκτικά στην αμπικιλίνη βακτήρια *E. coli* πραγματοποιήθηκε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με ισοπρωπυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG).

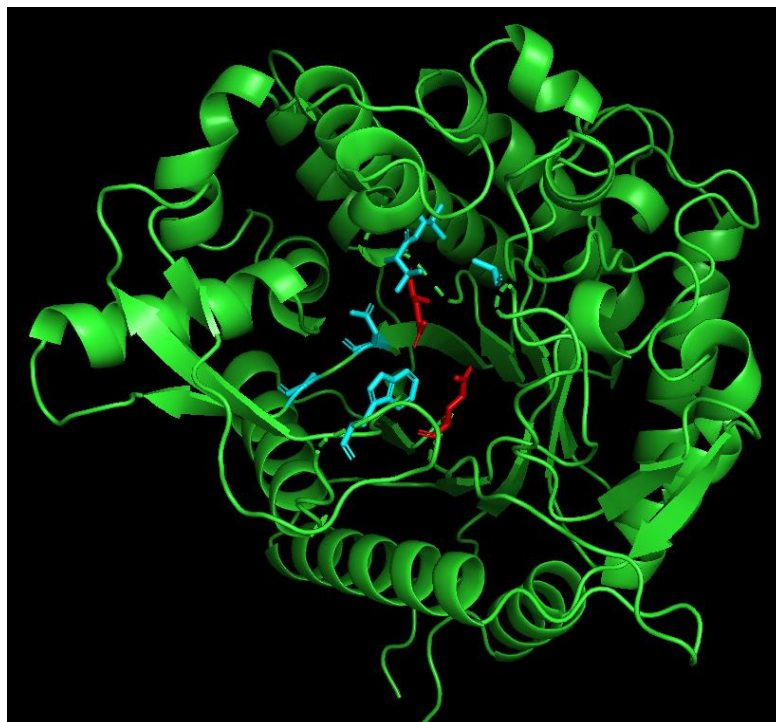
Ο ανασυνδυσασμένος κλώνος *E. coli* που επιλέχθηκε καλλιεργήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Catalog #230191 ArcticExpress Competent Cells, Agilent Technologies). Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπερήχων. Μία ανθεκτική στην αμπικιλίνη αποικία επιλέχτηκε και εμβολιάστηκε σε προκαλλιέργειες όγκου 5 mL με θρεπτικό μέσο LB και γενταμυκίνη και αμπικιλίνη. Όγκος 1 % v/v της προκαλλιέργειας εμβολιάστηκε σε καλλιέργεια που δεν περιείχε αντιβιοτικά στους 30 °C. Μετά από 3 h, ο επαγωγέας IPTG προστέθηκε σε τελικό διάλυμα 1 mM στους 10 °C, για 24 h. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε 5000 rpm για 10 min και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 3 M - Tris-HCl 0,5 M. Πραγματοποιήθηκαν 3 κύκλοι παλμικής επεξεργασίας με υπερήχους διάρκειας 1 min, με παλμό επεξεργασίας για 8 s ακολουθούμενη από παύση για 8 s. Τα διαρρηγμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και το επαναιώρημα χρησιμοποιήθηκε για το πρωτόκολλο καθαρισμού. Η ανασυνδυσασμένη β-γλυκοζιδάση *TnbGal1* καθαρίστηκε από το διήθημα της καλλιέργειας με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου-ιόντος (IMAC) (Talon, Clontec, Mountain View, CA, USA, εσωτερική διάμετρος 1,0 cm, μήκος 15 cm). Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 12,5 %, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και του μοριακού βάρους του ενζύμου.

Η β-γλυκοζιδάση *TnbGal1* από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* είναι μία πρωτεΐνη 444 αμινοξέων. Σύμφωνα με το εργαλείο ExpASY ProtParam, το προβλεπόμενο μοριακό βάρος του ανασυνδυσασμένου ενζύμου είναι 52 kDa και το ισοηλεκτρικό σημείο είναι 5,66. Η ανασυνδυσασμένη β-γλυκοζιδάση *TnbGal1* καθαρίστηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας και εμφανίστηκε σε πηκτώματα SDS-PAGE στα ~52 kDa (Εικόνα 5.2, θέση 1).



Εικόνα 5.2. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) της καθαρής β-γαλακτοζιδάσης *TnbGal1* από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana* (θέση 2). Θέση 1: Πρότυπο δείγμα με πρωτεϊνικά μόρια γνωστού μοριακού βάρους.

Η αντίδραση τρανσγλυκοζυλίωσης από τις β-γλυκοζιδάσες είναι ανταγωνιστική της αντίδρασης υδρόλυσης του υποστρώματος με την πρώτη να ευνοείται με την αύξηση της συγγένειας ενζύμου υποστρώματος στην περιοχή αγλυκόνης του ενεργού κέντρου της γλυκοζιδάσης. Στην Εικόνα 5.3 φαίνεται η περιοχή αγλυκόνης της *TnbGal1*.



Εικόνα 5.3. Η δομή της *TnbGal1* μοντελοποιήθηκε με το AlphaFold και απεικονίστηκε στο PyMol v2.5.2. Τα καταλυτικά αμινοξέα E164 και E349 είναι κόκκινα. Οι τρεις θέσεις που σχετίζονται με τη δέσμευση του υποστρώματος είναι κυανές.

5.5. Χαρακτηρισμός εμπορικών και καινοτόμων λακτασών

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η μετατροπή της λακτόζης του όξινου και του γλυκού ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες με εφαρμογή διαφόρων λακτασών μικροβιακής προέλευσης. Συγκεκριμένα, στον μεν όξινο ορό εφαρμόστηκαν δύο βιομηχανικά χρησιμοποιούμενες β-γαλακτοζιδάσες από τη ζύμη *Kluyveromyces lactis* και τον μύκητα *Aspergillus oryzae* και οι δύο καινοτόμες λακτάσες από τον μύκητα *T. terrestris* και το βακτήριο *T. neapolitana*. Η ενζυμική ενεργότητα των προαναφερθέντων λακτασών μελετήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας και της τιμής pH του ενζυμικού διαλύματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ο-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζης (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranose, o-NPG). Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα ορθο-νιτροφαινόλης (oNP), συγκεντρώσεων 0,05 – 0,6 mM. Εντός υάλινων δοκιμαστικών σωλήνων μεταφέρονται 2,7 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα ο-NP και 500 μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου 30 % w/v, προκειμένου για την αλκαλοποίηση του διαλύματος που οδηγεί στη μεταβολή του χρώματος της ο-νιτροφαινόλης (o-nitrophenol, o-NP) σε κίτρινο. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναδεύονται καλά και μετρείται η απορρόφησή τους στα 410 nm. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση της ορθο-νιτροφαινόλης (oNP) στο φωτομετρούμενο διάλυμα και καταστρώνεται το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης oNP. Προσαρμόζεται στα πειραματικά σημεία ευθεία γραμμή τάσης, η εξίσωση της οποίας αποτελεί την καμπύλη αναφοράς.

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας, μεταφέρονται εντός υάλινων δοκιμαστικών σωλήνων 2,5 mL διαλύματος ο-NPG συγκέντρωσης 0,3 mM σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με την επιθυμητή τιμή pH και 200 μL κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος, προκειμένου το υπόστρωμα (ο-NPG) να είναι σε περίσσεια καθ' όλη τη διάρκεια της δεκάλεπτης επώασης. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό αντί του ενζυμικού διαλύματος. Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων αναδεύεται έντονα και επωάζεται για ακριβώς 10 min εντός υδατόλουτρου στην επιθυμητή θερμοκρασία που μελετάται η ενεργότητα του ενζύμου. Αμέσως μετά την πάροδο 10 min, προστίθενται εντός κάθε δοκιμαστικού σωλήνα 500 μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου 30 % w/v, προκειμένου για την αλκαλοποίηση του διαλύματος που οδηγεί στον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης διάσπασης της ο-

νιτροφαίνυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζης και στη μεταβολή του χρώματος της παραγόμενης ο-νιτροφαινόλης (o-nitrophenol, o-NP) σε κίτρινο. Κατόπιν μετράται η απορρόφηση του διαλύματος στα 410 nm και μετατρέπεται σε συγκέντρωση ο-NP, μέσω της παραπάνω καμπύλης αναφοράς.

Η ενζυμική ενεργότητα (ΑΕ) της β-γαλακτοζιδάσης εκφράζεται σε Units, όπου 1 Unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1 μmol ο-NP ανά min ενζυμικής αντίδρασης σε συνθήκες περίσσειας υποστρώματος (ο-NPG), σε δεδομένη τιμή θερμοκρασίας και pH. Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης καθενός από τα μελετηθέντα ένζυμα, οι ενζυμικές ενεργότητες των προαναφερθέντων λακτασών μετρήθηκαν στα εύρη τιμών θερμοκρασίας και pH που παρατίθενται στον Πίνακα 5.1, χρησιμοποιώντας τα αναφερόμενα ρυθμιστικά διαλύματα.

Πίνακας 5.1. Ρυθμιστικά διαλύματα και εύρη pH και θερμοκρασίας στα οποία προσδιορίστηκαν η ενζυμική ενεργότητα και η θερμοσταθερότητα των λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, *Thermothielavioides terrestris* και *Thermotoga neapolitana*.

Προέλευση β-γαλακτοζιδάσης	Ρυθμιστικό διάλυμα	Εύρος pH	Εύρος θερμοκρασίας (°C)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄	6,0 - 8,0	20 - 50
<i>Aspergillus oryzae</i>	Κιτρικό οξύ - NaOH	3,0 - 6,5	30 - 60
<i>Thermothielavioides terrestris</i>	κιτρικό, φωσφορικό, Tris - HCl	3,0 - 9,0	30 - 70
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Κιτρικό οξύ - NaOH	4,0 - 8,0	70 - 100

Η θερμοσταθερότητα κάθε βιοκαταλύτη μελετήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος που αναγράφεται στον Πίνακα 5.1, στην τιμή pH που κάθε ένζυμο παρουσίασε βέλτιστη δράση, μέσω επώασης του ενζυμικού διαλύματος εντός υδατόλουτρου για έως 10 h. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, αφαιρούνταν 200 μL από το επωαζόμενο ενζυμικό διάλυμα και προσδιοριζόταν η απομένουσα ενεργότητα με τη μέθοδο της ο-NPG. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η επίδραση των ιόντων μετάλλων που περιέχονται τόσο στον όξινο όσο και στον γλυκό ορό στην ενζυμική ενεργότητα των λακτασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, στις βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και pH καθενός βιοκαταλύτη, όπως αυτές προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη. Τα ιόντα μετάλλων που μελετήθηκαν ήταν του καλίου (K⁺), του νατρίου (Na⁺), του ασβεστίου (Ca²⁺), του μαγνησίου (Mg²⁺), του μαγγανίου (Mn²⁺), του ψευδαργύρου (Zn²⁺) και του χαλκού (Cu²⁺). Τα μέταλλα αυτά προστέθηκαν ως χλωριούχα άλατα στα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας

κάθε βιοκαταλύτη σε συγκεντρώσεις από 1 έως 100 mM και προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα παρουσία των ιόντων μετάλλων, όπως προαναφέρθηκε. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

5.6. Ενζυμικές αντιδράσεις για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών

Οι ενζυμικές αντιδράσεις για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον όξινο ορό γιαουρτιού και το τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης, στη συμπυκνωμένη ή μη μορφή τους, πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με εφαρμογή των λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis*, *A. oryzae*, *T. terrestris* και *T. neapolitana*, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης κάθε βιοκαταλύτη, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.4. Εντός κωνικών φιαλών Erlenmeyer χωρητικότητας 100 mL με εσφυρισμένο χείλος και πώμα μεταφέρονται 90 mL ορού, συμπυκνωμένου ή μη, και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ενζύμου, για την επίτευξη του επιθυμητού ενζυμικού φορτίου στο αντιδρών σύστημα. Οι φιάλες πωματίζονται και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο παλινδρομικής ανακίνησης (160 rpm) Grant GLS400 (Grant Instruments Ltd., Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο). Το εύρος των ενζυμικών φορτίων που μελετήθηκαν ήταν στην περίπτωση του όξινου ορού γιαουρτιού 0,06 - 0,26 U/mL για την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, 0,5 - 8,0 U/mL για αυτήν από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, 1,0 - 16 U/mL για την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* και 0,5 - 1,0 U/mL για την β-γλυκοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana*.

Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν 3 mL δείγματος από το αντιδρών μείγμα και μεταφέρονταν εντός υάλινων σωλήνων με πώμα. Στην περίπτωση εφαρμογής των λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis*, *A. oryzae* και *T. terrestris*, οι σωλήνες με τα δείγματα των ενζυμικών αντιδράσεων επωάζονταν για 10 min στους 100 °C εντός υδατόλουτρου Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Γερμανία) για την απενεργοποίηση του ενζύμου και τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης. Στην περίπτωση εφαρμογής του ενζύμου από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana*, λόγω της υψηλής θερμοσταθερότητάς του, δεν ήταν δυνατή η θερμική απενεργοποίησή του, οπότε αυτή πραγματοποιούνταν με προσθήκη 150 μL πυκνού διαλύματος HCl 37 % v/v, οπότε η ενζυμική αντίδραση τερματιζόταν λόγω μείωσης της τιμής του pH που καθιστούσε το ένζυμο ανενεργό. Μετά την

απενεργοποίηση του ενζύμου τα δείγματα των ενζυμικών αντιδράσεων διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη, μέχρι την ανάλυσή τους.

Η επιλογή των ενζυμικών φορτίων για κάθε βιοκαταλύτη βασίστηκε σε προκαταρκτικά πειράματα και δεν ήταν όμοια για όλες τις λακτάσες. Η ενζυμική ενεργότητα των τεσσάρων β-γαλακτοζιδασών προσδιορίστηκε σε πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα ο-NPG, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5.4. Ωστόσο, για την παραγωγή των GOS τα ένζυμα εφαρμόστηκαν σε ορό που περιείχε και άλλα συστατικά πλην της λακτόζης, τα οποία είναι πιθανόν να επηρεάζουν την ενεργότητα των ενζύμων, όπως τα διάφορα μέταλλα. Για τον λόγο αυτόν, ο όρος «ενζυμικό φορτίο» χρησιμοποιήθηκε αντί του όρου «ενζυμική ενεργότητα» για να περιγράψει την ποσότητα του ενζύμου που εφαρμοζόταν κάθε φορά στον όξινο ή τον γλυκό ορό για τη βιομετατροπή της περιεχόμενης λακτόζης των ορών σε GOS, χρησιμοποιώντας ως τιμή αναφοράς την ενεργότητα που είχε προσδιορισθεί στο πρότυπο υπόστρωμα ο-NPG.

5.7. Ανάλυση των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης

Τα δείγματα των αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης του όξινου και του γλυκού ορού με εφαρμογή των βιομηχανικών και των καινοτόμων λακτασών αναλύθηκαν ως προς τη σύσταση σε μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και άλλους ολιγοσακχαρίτες με χρήση δύο τεχνικών υγρής χρωματογραφίας. Για την ανάλυση των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από τη μελέτη ολιγομερισμού της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού χρησιμοποιήθηκε η Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector, HPAEC-PAD), ενώ για την ανάλυση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης του γλυκού ορού χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (High-Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector, HPLC-RID).

Η μέθοδος HPAEC-PAD που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην πρότυπη μέθοδο AOAC 2001.02 της Ένωσης Επίσημων Αναλυτικών Χημικών (Association of Official Analytical Chemists, AOAC), με μικρές τροποποιήσεις (DIONEX Application Note 155, 2016). Η ανάλυση των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή ICS 6000 (Thermo Scientific, Μασαχουσέτη, Η.Π.Α.), εξοπλισμένο με μια στήλη Dionex CarboPac PA1 (4 × 250 mm) και μια

προστήλη Dionex CarboPac PA1 (4 × 50 mm) (Thermo Scientific, Μασαχουσέτη, Η.Π.Α.). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα υδατικό διάλυμα 12,5 mM NaOH (A), ένα υδατικό διάλυμα 125 mM NaOH (B) και ένα υδατικό διάλυμα 125 mM NaOH και 500 mM CH₃COONa (C). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: 0-20 min 95 % A και 5 % B, 20-35 min βαθμίδωση έως 100 % B, 35-55 min 100 % B, 55-65 min 100 % C, 65-80 min 95 % A και 5 % B. Η ροή του εκλούτη ήταν ίση με 1,0 mL/min. Ο έλεγχος του συστήματος HPAEC-PAD και η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Chromeleon 7 (Thermo Scientific, Waltham, Μασαχουσέτη, Η.Π.Α.). Για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν 5 πρότυπα σάκχαρα (γαλακτόζη, γλυκόζη, 6-γαλακτοβιόζη, λακτόζη, ραφινόζη), με τα οποία κατασκευάστηκαν αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσο του 2, εκτός από τη λακτόζη και την 6-γαλακτοβιόζη, ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς της ραφινόζης. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Η μέθοδος HPLC-RID που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο που ακολούθησαν οι Fischer & Kleinschmidt (2015), με μικρές τροποποιήσεις, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Καλιφόρνια, Η.Π.Α.) εξοπλισμένο με μια στήλη Microsorb-MV 100 NH₂ (250 mm x 4.6 mm) και προστήλη Polaris 5 NH₂ MetaGuard (10 mm x 4.6 mm) (Agilent Technologies Inc., Καλιφόρνια, Η.Π.Α.). Η έκλουση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας ως εκλούτη ένα διάλυμα 70 % v/v ακετονιτρίλιο σε νερό. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν 1,3 mL/min. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων των αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης πραγματοποιήθηκε μέσω δημιουργίας καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιώντας ως πρότυπα σάκχαρα τη γαλακτόζη για τους μονοσακχαρίτες, τη λακτόζη για τους δισακχαρίτες και τη ραφινόζη για τους ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσο του 3. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Ο βαθμός απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων σε GOS (y_{GOS}), ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) και ο βαθμός απόδοσης σε 6-γαλακτοβιόζη ($y_{gal-gal}$) υπολογίσθηκαν μέσω των εξισώσεων 4, 5 και 6, αντίστοιχα.

$$y_{GOS} = \frac{c_{GOS}}{c_{lac(0)}} \cdot 100 \% \quad 4$$

$$h_{lac} = \frac{c_{lac} - c_{lac(0)}}{c_{lac(0)}} \cdot 100 \% \quad 5$$

$$y_{gal-gal} = \frac{c_{gal-gal}}{c_{lac(0)}} \cdot 100 \% \quad 6$$

όπου c_{lac} η περιεκτικότητα σε λακτόζη κάθε χρονική στιγμή [% w/v], $c_{lac(0)}$ η αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη [% w/v], c_{GOS} η περιεκτικότητα σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες κάθε χρονική στιγμή [% w/v] και $c_{gal-gal}$ η περιεκτικότητα σε 6-γαλακτοβιόζη κάθε χρονική στιγμή [% w/v].

5.8. Κλιμάκωση της διεργασίας συμπύκνωσης του όξινου ορού και παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών

Για την μελέτη κλιμάκωσης της διεργασίας συμπύκνωσης του όξινου ορού και παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από αυτόν πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού σε περιστροφικό εξαμιστήρα υπό κενό πιλοτικής κλίμακας, με χωρητικότητα της φιάλης συμπύκνωσης 50 L, και χρήση προπυλενογλυκόλης ως ψυκτικό μέσο (-10 °C). Η επίτευξη του κενού (100 mbar) γινόταν με χρήση αεροσυμπιεστή και αντλίας Venturi. Η διαδικασία της συμπύκνωσης ήταν ημιδιαλείπωντος έργου, με το 1/10 του ωφέλιμου όγκου της φιάλης συμπύκνωσης να είναι πληρωμένο κάθε φορά. Η τελική περιεκτικότητα του ορού σε λακτόζη ήταν 20 % w/v.

Η αντίδραση ολιγομερισμού της λακτόζης του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού πραγματοποιήθηκε σε πιλοτική κλίμακα εντός δοχείου χωρητικότητας 3 L με περιστροφικό αναδευτήρα, στους 45 °C για 7 h. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με χρήση του συμπυκνωμένου όξινου ορού που παραλήφθηκε από την συμπύκνωση σε πιλοτική κλίμακα, με εφαρμογή της βιομηχανικής λακτάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, χρησιμοποιώντας ενζυμικό φορτίο ίσο με 4 U/mL.

5.9. Ενσωμάτωση των παραγόμενων από όξινο ορό γαλακτοολιγοσακχαριτών σε κρέμες βανίλιας – Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας

5.9.1. Παραγωγή σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών και ενσωμάτωσή του σε κρέμες βανίλιας

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.

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%.

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, 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 πήζει 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. Το πήγμα αφήνεται εντός των περιεκτών για 30 min και στη συνέχεια σφραγίζεται με αλουμινοφύλλο. 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%

5.9.2. Μελέτη ποιότητας και διατηρησιμότητας των κρεμών

5.9.2.1. 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.

5.9.2.2. Μέτρηση Χρώματος

Η μέτρηση του χρώματος πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματόμετρου Minolta CR200 (Minolta Co., Chuo-Ku, Ιαπωνία) στη χρωματική κλίμακα CIELab, 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 L₀, a₀, b₀ αντιστοιχούν στις τιμές που μετρήθηκαν την 1η ημέρα αποθήκευσης.

5.9.2.3. 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 φαινολοφθαλεΐνης και πραγματοποιείται τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0,1 N.

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

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

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).

5.9.2.4. 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 διεξόδου 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: πηκτικότητα, συνεκτικότητα, προσκολλησιμότητα, δείκτης ελαστικότητας και το κομμιώδες.

5.9.2.5. 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. Το έντυπο αξιολόγησης είχε την ακόλουθη μορφή.

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

Παρατηρήσεις - Σχόλια:

5.10.Μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού

Στα πλαίσια της έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής αναφορικά με την αξιοποίηση του όξινου ορού γιαουρτιού για την μετατροπή της

περιεχόμενης λακτόζης σε συστατικά υψηλής προστιθέμενης και διατροφικής αξίας, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS). Η μελέτη αυτή διεξήχθη στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, σε συνεργασία με τη Δρ. Μαρίνα Στραμάρκου και υπό την καθοδήγηση της Καθηγήτριας ΕΜΠ Μαγδαληνής Κροκίδα. Τα απαραίτητα διαγράμματα ροής της διαδικασίας παραγωγής GOS από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού και τα απαραίτητα ποσοτικά δεδομένα αυτής της διεργασίας προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή και παρασχέθηκαν στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αξιολόγηση κύκλου ζωής και να εκτιμηθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της προτεινόμενης διεργασίας συγκριτικά με άλλα προτεινόμενα και εφαρμοζόμενα σχέδια αξιοποίησης του όξινου ορού.

Η Αξιολόγηση Κύκλου Ζωής (Life Cycle Assessment, LCA) έχει αναγνωριστεί ως το ισχυρότερο εργαλείο για την αξιολόγηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων πολλών προϊόντων, διαδικασιών και υπηρεσιών και μπορεί να προσδιορίσει τα στάδια του κύκλου ζωής ενός προϊόντος ή μιας γραμμής παραγωγής που προκαλούν τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στο περιβάλλον και τον τύπο αυτού του αντίκτυπου. Τα αποτελέσματά της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας μιας διεργασίας, την εφαρμογή πιο αποτελεσματικών μέτρων και την ιεράρχηση αυτών των μέτρων.

5.10.1. Μεθοδολογία της αξιολόγησης κύκλου ζωής

Η Αξιολόγηση Κύκλου Ζωής (ΑΚΖ) υλοποιείται σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 14040 και 14044 (14040:2006, 2006, 14044:2006, 2006) και πραγματοποιείται σε τέσσερα βήματα:

- Καθορισμός του σκοπού και του πλαισίου της μελέτης: περιλαμβάνει τον καθορισμό των ορίων του συστήματος της μελέτης και τη συλλογή των διαγραμμάτων ροής που εμπλέκονται σε κάθε διεργασία.
- Απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής (LCI – Life Cycle Inventory): περιλαμβάνει τη συλλογή και την ποσοτικοποίηση των εισροών και των εκροών για ένα δεδομένο σύστημα προϊόντων για κάθε μονάδα διεργασίας που περιλαμβάνεται στο όριο του συστήματος. Η απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής περιλαμβάνει τη συλλογή δεδομένων και τις διαδικασίες υπολογισμού δεδομένων.

- Εκτίμηση επιπτώσεων κύκλου ζωής: περιλαμβάνει τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση της ποσότητας και της σημασίας των πιθανών περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τα αποτελέσματα της απογραφής των δεδομένων του κύκλου ζωής, όπως η υπερθέρμανση του πλανήτη, το δυναμικό οξίνισης κ.λπ.
- Εκτίμηση βελτιώσεων και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τα τέσσερα βήματα συχνά αλληλοεξαρτώνται και τα αποτελέσματα ενός βήματος χρησιμοποιούνται ως απαραίτητα δεδομένα για τα άλλα βήματα (Farjana, et al., 2021).

5.10.1.1. Καθορισμός του σκοπού και του πλαισίου της μελέτης

Κατά το πρώτο στάδιο, προσδιορίζονται ο σκοπός και το πλαίσιο μελέτης της ΑΚΖ. Από αυτό το στάδιο εξαρτάται και ορίζεται η κατεύθυνση της μελέτης, το βάθος της, και οι απαιτήσεις της τελικής αναφοράς και της επανεξέτασής της (Baumann & Tillman, 2004a). Ο σκοπός της ΑΚΖ αναφέρει την προβλεπόμενη εφαρμογή, τους λόγους διεξαγωγής της μελέτης, το κοινό για το οποίο προορίζεται και εάν τα αποτελέσματα προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε συγκριτικούς ισχυρισμούς που θα γνωστοποιηθούν στο κοινό.

Όσον αφορά το πλαίσιο μελέτης, θα πρέπει να είναι επαρκώς καθορισμένο ώστε να διασφαλίζεται ότι το εύρος, το βάθος και η λεπτομέρεια της μελέτης είναι συμβατά και επαρκή για την επίτευξη του δηλωμένου σκοπού. Το πλαίσιο μελέτης περιλαμβάνει το προς μελέτη σύστημα προϊόντος, τις λειτουργίες του συστήματος προϊόντων (ροές αναφοράς), τη λειτουργική μονάδα, τα όρια του συστήματος, τις διαδικασίες κατανομής, τις επιλεγμένες κατηγορίες επιπτώσεων, τη μεθοδολογία εκτίμησης επιπτώσεων και την επακόλουθη ερμηνεία που θα χρησιμοποιηθούν, τις απαιτήσεις δεδομένων, τις υποθέσεις και τους περιορισμούς και το είδος και τη μορφή της έκθεσης που απαιτείται για τη μελέτη (ISO, 2006).

5.10.1.2. Απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής

Το επόμενο βήμα είναι να πραγματοποιηθεί μια ανάλυση απογραφής, συλλέγοντας όλα τα ποσοτικά δεδομένα. Η χρησιμότητα και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μιας μελέτης ΑΚΖ εξαρτάται από την ποιότητα των δεδομένων που χρησιμοποιούνται ως βάση, δηλαδή τα δεδομένα που περιγράφουν τις συμπεριλαμβανόμενες διεργασίες στα διάφορα μέρη του συστήματος. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να καθοριστούν οι απαιτήσεις ποιότητας των δεδομένων, δηλαδή το επίπεδο ποιότητας δεδομένων που απαιτείται για την επίτευξη του στόχου της μελέτης.

Πρέπει να καθοριστεί ποια δεδομένα πρέπει να συλλέγονται, καθώς και πώς και πού πρέπει να συλλέγονται. Όλα τα υλικά και οι εισροές ενέργειας, καθώς και όλες οι εκπομπές στον αέρα, το νερό και το έδαφος καταγράφονται.

5.10.1.3. *Εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων*

Το επόμενο βήμα της αξιολόγησης κύκλου ζωής είναι η μετάφραση των δεδομένων απογραφής σε πραγματικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Το στάδιο της εκτίμησης των περιβαλλοντικών επιπτώσεων περιλαμβάνει τη συσχέτιση των δεδομένων απογραφής με συγκεκριμένες κατηγορίες περιβαλλοντικών επιπτώσεων και δείκτες κατηγοριών, επιχειρώντας την κατανόηση της σχέσης των δεδομένων εισόδου και εξόδου του συστήματος με το περιβάλλον. Αναγνωρίζοντας την επίδραση που μπορεί να έχουν αυτά στο περιβάλλον μπορεί να προκύψουν λύσεις για την εκτίμηση του εξεταζόμενου συστήματος (ISO, 2006).

5.10.1.4. *Εκτίμηση βελτιώσεων*

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, κατ' επέκταση η εκτίμηση των βελτιώσεων του συστήματος προς μελέτη, είναι το στάδιο κατά το οποίο τα ευρήματα από την ανάλυση απογραφής και την εκτίμηση επιπτώσεων εξετάζονται και αξιολογούνται από άποψη πληρότητας, ευρωστίας και συνάγονται τα τελικά συμπεράσματα.

Το πρότυπο ISO 14043 προσδιορίζει τρεις κύριες κατηγορίες δραστηριοτήτων: την αξιολόγηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων, την εξαγωγή των τελικών συμπερασμάτων και τη διατύπωση των προτάσεων. Οι δραστηριότητες αυτές επιτυγχάνονται ύστερα από διασφάλιση της κοινής επεξεργασίας των θεμάτων που τα ενδιαφερόμενα μέρη θέλουν να συζητήσουν κατά τη φάση ερμηνείας (Baumann & Tillman, 2004a).

5.10.2. *Εργαλεία λογισμικού και μέθοδοι αξιολόγησης περιβαλλοντικών επιπτώσεων*

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το λογισμικό Gabi (v8.7.0.18). Το GaBi προσφέρει μια πλήρη σουίτα λογισμικού, η οποία διευκολύνει τη διαδικασία επιλογής του καλύτερου συνόλου δεδομένων απογραφής μέσω βάσεων δεδομένων και βοηθάει στην διαδικασία σχεδιασμού των διαγραμμάτων ροής μιας διεργασίας (Senusi et al., 2022). Χρησιμοποιώντας τη λειτουργία αναφοράς που προσφέρει το λογισμικό συλλέγονται δεδομένα σε κάθε σημείο της διαδικασίας

σχεδιασμού και προσδιορίζεται στοχευμένα το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα. Το GaBi είναι συμβατό με τα πρότυπα ISO 14040:2006 και 14044:2006 και είναι εξαιρετικά ευέλικτο. Η ενσωματωμένη βάση δεδομένων έχει 4.500 σύνολα δεδομένων και το λογισμικό λειτουργεί επίσης με την Ecoinvent (Herrmann & Moltesen, 2015).

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εκτίμησης επιπτώσεων για τον προσδιορισμό των κατάλληλων περιβαλλοντικών δεικτών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η μέθοδος ReCiPe 2016 (H, hierarchist)(H). Ο στόχος της ReCiPe είναι ο μετασχηματισμός των αποτελεσμάτων της απογραφής του κύκλου ζωής σε περιορισμένο αριθμό βαθμολογιών περιβαλλοντικών επιπτώσεων μέσω δεικτών χαρακτηρισμού. Ο προσδιορισμός των δεικτών χαρακτηρισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί:

- σε επίπεδο μέσου σημείου με 18 κατηγορίες επιπτώσεων που εστιάζουν σε μεμονωμένα περιβαλλοντικά προβλήματα και
- σε επίπεδο τελικού σημείου με 3 συγκεντρωτικές κατηγορίες επιπτώσεων, οι οποίες δείχνουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, στη βιοποικιλότητα και στην έλλειψη των πόρων (Huijbregts et al., 2016, 2017). Το παρακάτω σχήμα παρέχει μια επισκόπηση της δομής του ReCiPe.

Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα ενδιάμεσα και στον Πίνακα 5.3 τα τελικά σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe, αντίστοιχα.

Πίνακας 5.2. Ενδιάμεσα σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe.

Ενδιάμεσα σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe	Μονάδα αναφοράς
Κλιματική αλλαγή, προεπιλογή, εκτός βιογενούς άνθρακα (CC-ex)	[kg ισοδ. CO ₂]
Κλιματική αλλαγή, συμπεριλαμβανομένου του βιογενούς άνθρακα (CC-in)	[kg ισοδ. CO ₂]
Σχηματισμός αιωρούμενων σωματιδίων (FPMF)	[kg PM _{2,5} eq.]
Εξάντληση ορυκτών πόρων (FD)	[kg πετρελαίου εξ.]
Κατανάλωση γλυκού νερού (FC)	[m ³]
Οικοτοξικότητα του γλυκού νερού (FEC)	[kg 1,4 DB eq.]
Ευτροφισμός γλυκού νερού (FEu)	[kg P eq.]
Τοξικότητα στον άνθρωπο, καρκινογενής (HT)	[kg 1,4-DB eq.]
Ανθρώπινη τοξικότητα, μη καρκινογενής (HT-non)	[kg 1,4-DB eq.]
Ιονίζουσα Ακτινοβολία (IR)	[Bq C-60 eq. στον αέρα]
Χρήση γης (LU)	[Ετήσια ισοδύναμη καλλιέργειας]
Θαλάσσια οικοτοξικότητα (ME)	[kg 1,4-DB eq.]
Θαλάσσιος ευτροφισμός (MEu)	[kg N eq.]
Εξάντληση μετάλλων (MD)	[kg ισοδύναμο Cu]

Φωτοχημικός Σχηματισμός Όζοντος, Οικοσυστήματα (POF-ec)	[kg NOx eq.]
Φωτοχημικός Σχηματισμός Όζοντος, Ανθρώπινη Υγεία (POF-hu)	[kg NOx eq.]
Καταστροφή του στρατοσφαιρικού όζοντος (SOD)	[kg CFC-11 eq.]
Επίγεια Οξίνιση (TA)	[kg SO2 eq.]
Επίγεια οικοτοξικότητα (TE)	[kg 1,4-DB eq.]

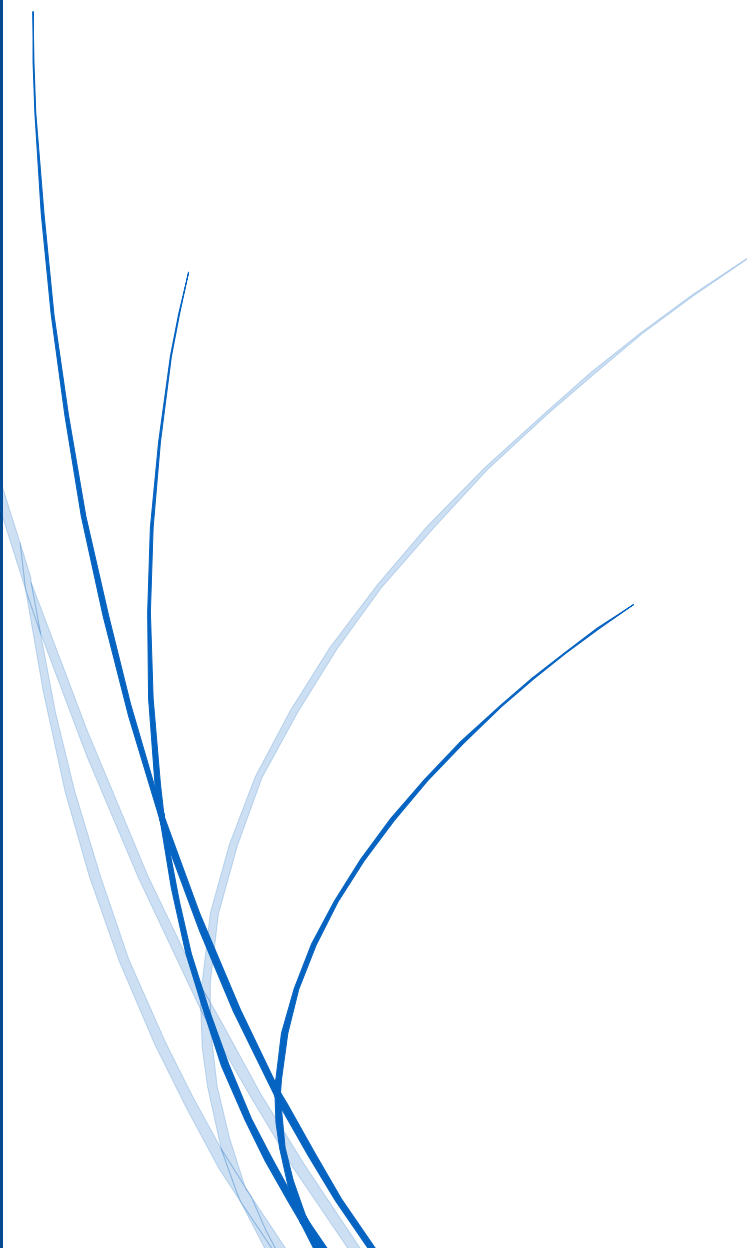
Πίνακας 5.3. Τελικά σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe.

Τελικά σημεία της μεθοδολογίας ReCiPe	Μονάδα αναφοράς
Βλάβη στην ανθρώπινη υγεία	[DALY]
Βλάβες στα οικοσυστήματα	[species.yr]
Ζημιά στη διαθεσιμότητα πόρων	[\$]



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Αποτελέσματα και σχολιασμός



6. Αποτελέσματα και Σχολιασμός

6.1. Προσδιορισμός σύστασης όξινου και γλυκού ορού

Από την ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των δύο κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ήτοι του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού και του τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης, προέκυψε η σύσταση καθενός παραπροϊόντος που συνοψίζεται στον Πίνακας 6.1. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση ολικών σακχάρων ήταν υψηλότερη στον γλυκό από ότι στον όξινο ορό. Η συγκέντρωση σακχάρων στον όξινο ορό και στο τυρόγαλα ήταν, κατά μέσο όρο, $38,72 \pm 2,81$ g/L και $56,33 \pm 0,82$ g/L, αντίστοιχα, εκ των οποίων για τον όξινο ορό τα $31,18 \pm 2,34$ g/L ήταν λακτόζη, τα $7,42 \pm 1,56$ g/L γαλακτόζη και τα $0,12 \pm 0,01$ g/L, ενώ για την περίπτωση του τυρογάλακτος τα $50,76 \pm 0,80$ g/L ήταν λακτόζη και τα $0,88 \pm 0,16$ g/L γαλακτόζη, με τη συγκέντρωση γλυκόζης να βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης ($0,01$ g/L). Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη στον όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl. Συγκεκριμένα, το τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης είχε συγκέντρωση πρωτεϊνών ίση $14,06 \pm 0,42$ g/L, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τον όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού ανερχόταν σε μόλις $2,752 \pm 0,421$ g/L. Η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, από την άλλη, ήταν σημαντικά υψηλότερη στον όξινο ορό, σε σύγκριση με το τυρόγαλα. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος προσδιορίστηκε σε $1,37 \pm 0,05$ g/L στον όξινο ορό και σε $0,578 \pm 0,003$ g/L στο τυρόγαλα, με την τιμή του pH να ανέρχεται σε $4,4 \pm 0,2$ και $6,2 \pm 0,1$ στα δύο παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας, αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα και οι διαφορές στις συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος μεταξύ όξινου και γλυκού ορού οφείλονται στις διαφορετικές παραγωγικές διαδικασίες που ακολουθούνται για την παραγωγή του στραγγιστού γιαουρτιού, από το οποίο προκύπτει ο όξινος ορός, και των σκληρών και ημισκληρών τυριών αιγοπρόβειας προέλευσης, από τα οποία προκύπτει το τυρόγαλα (Jelen, 2011). Επιπροσθέτως, ο όξινος και ο γλυκός ορός περιέχουν διάφορα μέταλλα, με κυριότερα αυτών το K^+ (1131 ± 38 και 1363 ± 92 mg/L, αντίστοιχα), το Na^+ ($343,2 \pm 50,4$ και $384,4 \pm 25,5$ mg/L, αντίστοιχα), το Ca^{2+} (1175 ± 28 και $344,5 \pm 73,0$ mg/L, αντίστοιχα), και το Mg^{2+} ($29,26 \pm 6,20$ και $14,92 \pm 1,87$ mg/L, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα και βρίσκονται εντός του εύρους των συγκεντρώσεων κατιόντων μετάλλων που αναφέρονται στην βιβλιογραφία από πληθώρα ερευνητών (Božanić et al., 2014; Fischer

& Kleinschmidt, 2015; Menchik et al., 2019; Nishanthi et al., 2017). Η γνώση της ακριβούς σύστασης των δύο κύριων παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας είναι σημαντική κατά τη μελέτη των ενζυμικών διεργασιών μετατροπής της λακτόζης του όξινου και του γλυκού ορό σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, καθώς η ενεργότητα ορισμένων ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης επηρεάζεται ισχυρά από την παρουσία άλλων συστατικών του ορού, πλην της λακτόζης, όπως είναι τα κατιόντα ορισμένων μετάλλων (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

Πίνακας 6.1. Σύσταση όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού και τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης.

Συστατικό	Όξινος ορός	Τυρόγαλα
	Συγκέντρωση (g/L)	
Ολικά σάκχαρα	38,72 ± 2,81	56,33 ± 0,82
Λακτόζη	31,18 ± 2,34	50,76 ± 0,80
Γαλακτόζη	7,42 ± 1,56	0,88 ± 0,16
Γλυκόζη	0,12 ± 0,09	ΔΑ
Ολικές πρωτεΐνες	2,752 ± 0,421	14,06 ± 0,42
Λιπαρά	0,719 ± 0,120	0,037 ± 0,009
Γαλακτικό οξύ	1,37 ± 0,05	0,578 ± 0,003
Στερεό υπόλειμμα	53,75 ± 2,50	73,49 ± 1,40
Τέφρα	8,964 ± 0,198	4,489 ± 0,960
	Συγκέντρωση (mg/L)	
K ⁺	1131 ± 38	1363 ± 92
Na ⁺	343,2 ± 50,4	384,4 ± 25,5
Ca ²⁺	1175 ± 28	344,5 ± 73,0
Mg ²⁺	29,26 ± 6,20	14,92 ± 1,87
Mn ²⁺	0,019 ± 0,003	ΔΠ
Zn ²⁺	1,746 ± 0,121	ΔΠ
Cu ²⁺	ΔΑ	ΔΠ
SO ₄ ²⁻	65,4 ± 0,6	ΔΠ

ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε, ΔΠ: δεν προσδιορίστηκε

6.2. Βιοτεχνολογικός χαρακτηρισμός βιομηχανικά διαθέσιμων και καινοτόμων λακτασών

6.2.1. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*

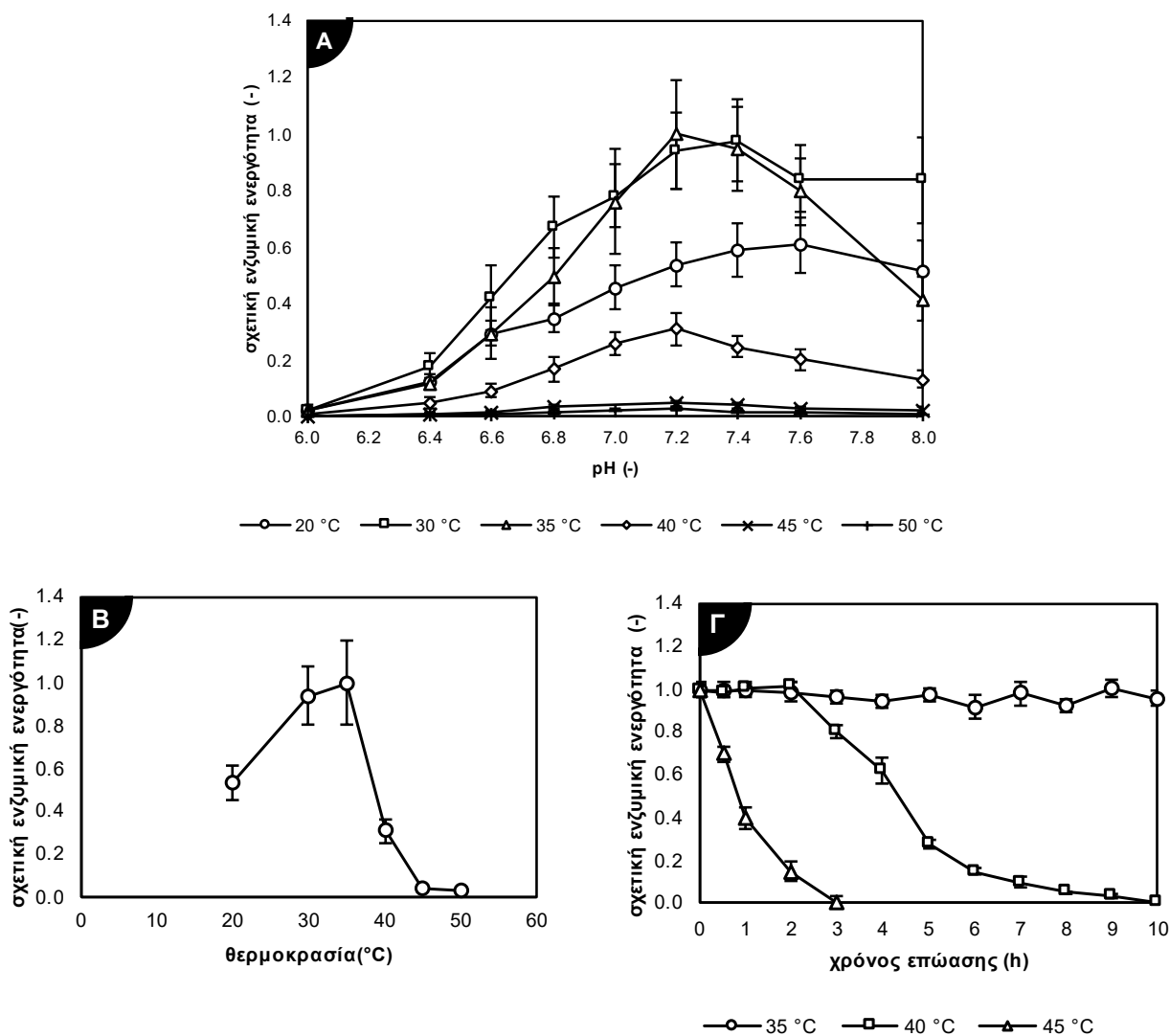
Η μελέτη της ενεργότητας της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* μελετήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 50 °C και στο εύρος τιμών pH από 6,0 έως 8,0, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 5.5. Στο Σχήμα 6.1 παρουσιάζεται

η σχετική ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* συναρτῆσει της θερμοκρασίας και της τιμῆς του pH. Ως σχετική ενζυμική ενεργότητα ορίζεται το κλάσμα της μετρούμενης ενζυμικής ενεργότητας σε κάθε τιμή θερμοκρασίας και pH προς την ενζυμική ενεργότητα που μετρήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Όπως παρατηρείται, η συγκεκριμένη λακτάση παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε τιμές pH στην ουδέτερη περιοχή. Συγκεκριμένα, η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis* παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα σε τιμή pH ίση με 7,2, όπως παρατηρείται από το Σχήμα 6.1.A. Ωστόσο, η σχετική ενζυμική ενεργότητα δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική στο εύρος τιμών pH μεταξύ 7,0 και 7,6 ($0,76 \pm 0,19$, $1,0 \pm 0,2$, $0,95 \pm 0,15$ και $0,80 \pm 0,12$ για τιμές pH ίσες με 7,0, 7,2, 7,4 και 7,6, αντίστοιχα). Η ενζυμική ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης μειώνεται σημαντικά σε τιμές μικρότερες από 7,0 και μεγαλύτερες από 7,6 και απενεργοποιείται πλήρως σε τιμές pH μικρότερες από 6,0.

Όσον αφορά στην βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, όπως παρατηρείται και από το Σχήμα 6.1.B, μέγιστη σχετική ενζυμική ενεργότητα ίση με $1,0 \pm 0,2$ μετρήθηκε στους 35 °C, η οποία, όμως, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική από αυτήν που μετρήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C ($0,94 \pm 0,14$). Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 30 °C και υψηλότερες των 35 °C, η ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης μειώνεται σημαντικά και παρατηρείται πλήρης απενεργοποίηση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40 °C. Στη θερμοκρασία των 35 °C, παρατηρήθηκε ικανοποιητική σταθερότητα του ενζύμου συναρτῆσει του χρόνου επώασης, καθώς περισσότερο από το 96 % της αρχικής ενζυμικής ενεργότητας διατηρήθηκε έπειτα από 10 h επώασης, όπως παρατηρείται από το διάγραμμα XX. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (40 και 45 °C), η ενζυμική ενεργότητα όχι μόνο ήταν μικρότερη στην αρχή της επώασης αλλά μειωνόταν ταχέως με τον χρόνο επώασης, με τον ρυθμό απενεργοποίησης να είναι αναμενόμενα υψηλότερος με αύξηση της θερμοκρασίας, όπως φαίνεται ποιοτικά στο Σχήμα 6.1.Γ, καθώς η κλίση της καμπύλης είναι κατ' απόλυτη τιμή μεγαλύτερη για την υψηλότερη θερμοκρασία.

Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης κάθε ενζύμου είναι σημαντικός και πρέπει να προηγείται πάντα της μελέτης κάθε βιοδιεργασίας, όπως η ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της β-γαλακτοζιδάσης έχουν προσδιοριστεί από πλήθος ερευνητών, με πολυάριθμες αναφορές στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, οι (Fujimura et al., 2003) και (Dickson et al., 1979) αναφέρουν ότι η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis* παρουσιάζει βέλτιστη ενζυμική ενεργότητα σε θερμοκρασία

ιση με 35 °C και τιμή pH ίση με 7,0, αποτελέσματα που είναι σε συμφωνία με αυτά της παρούσας διατριβής. Οι συγκεκριμένες βέλτιστες συνθήκες δράσης της εν λόγω β-γαλακτοζιδάσης κρίνονται αναμενόμενες, καθώς αυτή προέρχεται από τη ζύμη *K. lactis* και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως βέλτιστες συνθήκες δράσης του εν λόγω ενζύμου το θερμοκρασιακό εύρος 30-35 °C και το εύρος τιμών pH στην περιοχή 6,0-7,0 (Saqib et al., 2017).



Σχήμα 6.1. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (7,2) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*.

Η επίδραση των κυριότερων ιόντων μετάλλων που περιέχονται στα δύο παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τον όξινο και τον γλυκό ορό, στην ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2. Η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *K. lactis* φάνηκε να ενισχύεται από την

παρουσία ιόντων K^+ , Na^+ και Ca^{2+} , τα οποία είναι αυτά που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον όξινο και τον γλυκό ορό, όπως παρουσιάστηκε στην ενότητα 6.1. Συγκεκριμένα, η παρουσία των ιόντων K^+ και Na^+ σε συγκέντρωση 100 mM (3,910 και 2,299 mg/L, αντίστοιχα) αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου κατά 551 ± 9 και 289 ± 7 %, αντίστοιχα, ενώ η παρουσία ιόντων Ca^{2+} σε συγκέντρωση 10 mM (400,8 mg/L) αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα της λακτάσης αυτής κατά 156 ± 12 %. Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία ιόντων Mg^{2+} , Mn^{2+} και Zn^{2+} έδρασε παρεμποδιστικά για τη λακτάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, η παρουσία ιόντων Mg^{2+} , Mn^{2+} και Zn^{2+} σε συγκέντρωση μόλις 1 mM (24,31, 54,94 και 65,38 mg/L, αντίστοιχα) οδήγησε σε απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* κατά 71 ± 3 , 75 ± 2 και $98,6 \pm 0,3$ %, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που παρουσιάζονται από τους (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

Πίνακας 6.2. Επίδραση διαφόρων κατιόντων μετάλλων στην ενζυμική ενεργότητα (\pm τυπική απόκλιση) της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces fragilis*.

συγκέντρωση (mM)	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
0				100 ± 9			
1	231 ± 4	118 ± 3	183 ± 16	29 ± 3	25 ± 2	$1,4 \pm 0,3$	ΔΠ
10	393 ± 6	195 ± 9	256 ± 12	38 ± 5	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
100	651 ± 9	389 ± 7	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ

ΔΠ: δεν προσδιορίστηκε

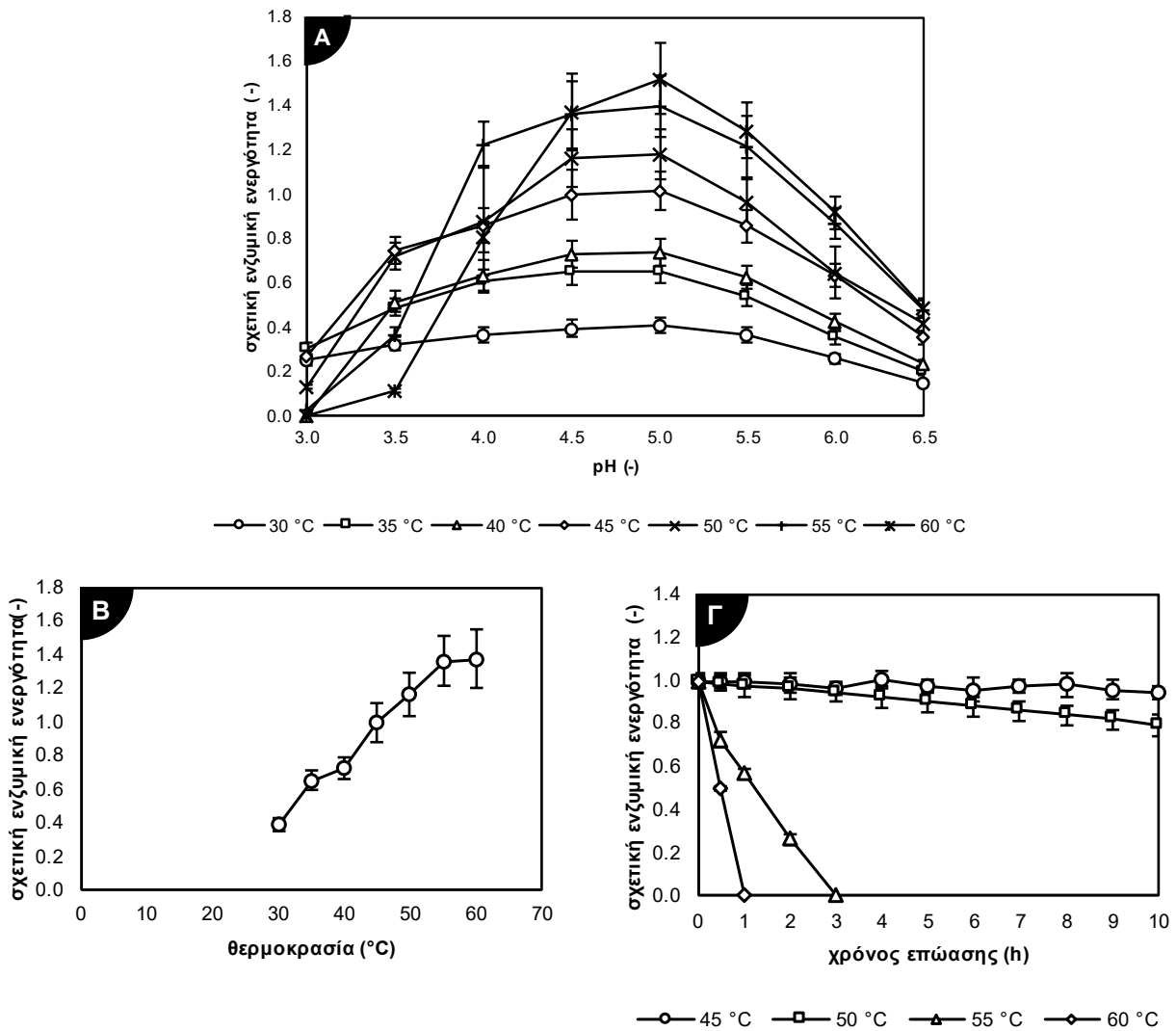
6.2.2. Η β -γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*

Όσον αφορά στη β -γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*, η ενζυμική ενεργότητά της μελετήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος από 30 έως 60 °C και στο εύρος τιμών pH από 3,0 έως 6,5, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 5.5. Στο Σχήμα 6.2 απεικονίζεται η σχετική ενζυμική ενεργότητα της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* συναρτήσει της θερμοκρασίας και της τιμής του pH. Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 6.2.A, η λακτάση από τον *A. oryzae* παρουσιάζει βέλτιστη ενζυμική ενεργότητα (τιμή σχετικής ενζυμικής ενεργότητας $1,00 \pm 0,12$) σε τιμή pH ίση με 4,5. Στην τιμή pH ίση με 5,0 η εν λόγω λακτάση παρουσιάζει στατιστικά όμοια ($p > 0.05$) ενζυμική ενεργότητα (τιμή σχετικής ενζυμικής ενεργότητας $1,02 \pm 0,09$). Ωστόσο, η τιμή pH ίση με 4,5 επιλέχθηκε ως βέλτιστη στην παρούσα διατριβή, καθώς συμπίπτει με την τιμή pH του όξινου ορού γιαουρτιού και δεν χρειάζεται ρύθμισή της για την

περαιτέρω πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η ενζυμική ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης μειώνεται σημαντικά σε τιμές μικρότερες από 3,5 και μεγαλύτερες από 6,0.

Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, η ενεργότητα παρουσιάζει συνεχή αύξηση με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30 στους 55 °C, όπως προκύπτει από το Σχήμα 6.2.Β. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2.Γ, η επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες άνω των 45 °C για έως 10 h οδηγεί σε σταδιακή απενεργοποίηση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, στη θερμοκρασία των 45 °C, η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* διατηρεί πλήρως (94.4 ± 2.9 %) την αρχική ενζυμική ενεργότητά της, έπειτα από 10 h επώασης. Στη θερμοκρασία των 50 °C το ένζυμο χάνει το 20,3 % της αρχικής ενεργότητάς του έπειτα από 10 h επώασης και σε θερμοκρασία ίση με 55 και 60 °C απενεργοποιείται πλήρως έπειτα από 3 και 1 h, αντίστοιχα. Επομένως, ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* θεωρήθηκε αυτή των 45 °C.

Οι παραπάνω συνθήκες βέλτιστης δράσης για την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* (45 °C, pH = 4,5) ήταν αναμενόμενες, καθώς η εν λόγω λακτάση είναι μηκυτιακής προέλευσης και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι οι β-γαλακτοζιδάσες από τον μύκητα *A. oryzae* παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε τιμές pH στο εύρος 4,5-5,0 (Saqib et al., 2017). Οι συνθήκες αυτές επιβεβαιώνονται από αναφορές της βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, οι Tanaka et al. (1975) αναφέρουν ότι η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία ίση με 46 °C και σε τιμή pH ίση με 4,5. Αυτές οι τιμές συμπίπτουν με αυτές που αναφέρονται και από τους Tanriseven & Dogan (2002). Από την άλλη μεριά, οι Fischer & Kleinschmidt (2015) και Vera et al. (2011) αναφέρουν υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας (55-60 °C) ως βέλτιστες για την β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae*, πιθανώς λόγω διαφορετικής προέλευσης του ενζυμικού παρασκευάσματος (π.χ. διαφορετικό στέλεχος του *A. oryzae*) ή λόγω χρήσης διαφορετικού ρυθμιστικού διαλύματος (π.χ. διάλυμα οξικού νατρίου έναντι κιτρικού νατρίου στην παρούσα έρευνα) για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας που πιθανώς παρουσιάζει διαφορετική μεταβολή στην τιμή pH του με την μεταβολή της θερμοκρασίας.



Σχήμα 6.2. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (4,5) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*.

Όσον αφορά στην επίδραση των κυριότερων ιόντων μετάλλων που περιέχονται στα δύο παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τον όξινο και τον γλυκό ορό, στην ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, κανένα από τα μελετηθέντα ιόντα μετάλλων δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.3. Σε όλες τις περιπτώσεις, η εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα ήταν μεγαλύτερη του 90 % της αρχικής. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που παρουσιάζονται από τους Fischer & Kleinschmidt (2015).

Πίνακας 6.3. Επίδραση διαφόρων κατιόντων μετάλλων στην ενζυμική ενεργότητα (\pm τυπική απόκλιση) της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*.

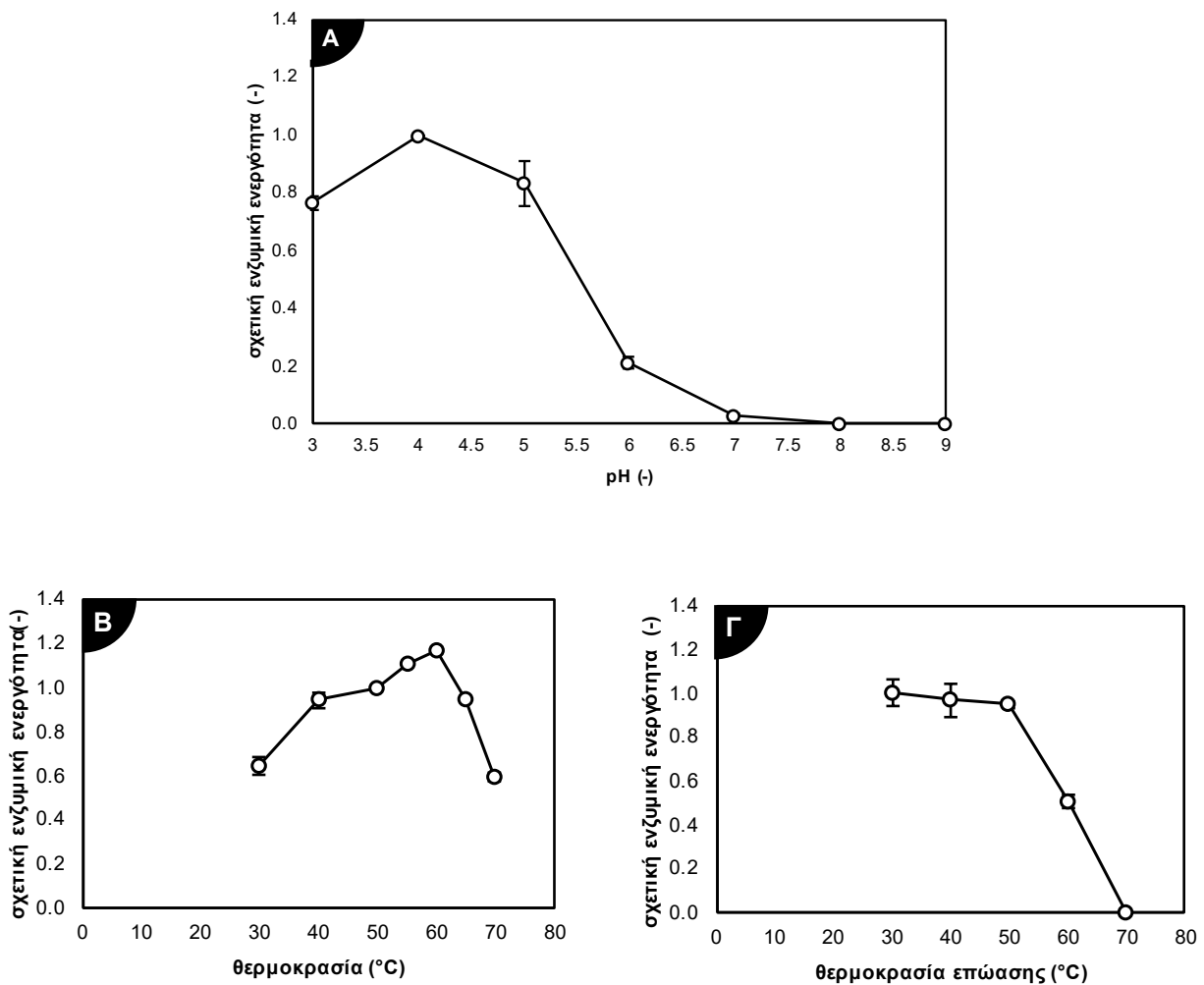
συγκέντρωση (mM)	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺
0				100 ± 2			
1	92 ± 2	99 ± 2	97 ± 3	97 ± 4	97 ± 3	104 ± 3	108 ± 2
10	98 ± 3	98 ± 3	104 ± 7	100 ± 3	90 ± 6	103 ± 2	104 ± 3
100	99 ± 2	101 ± 2	ΔΠ	101 ± 3	98 ± 10	ΔΠ	ΔΠ

ΔΠ: δεν προσδιορίστηκε

6.2.3. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*

Η ενζυμική ενεργότητα της καινοτόμου μηκυτιακής β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*, η οποία παρήχθη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.4.1, μελετήθηκε σε θερμοκρασιακό εύρος από 30 έως 70 °C και σε εύρος τιμών pH από 3,0 έως 9,0, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.5. Στο Σχήμα 6.3 απεικονίζεται η σχετική ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* συναρτήσει της θερμοκρασίας και της τιμής του pH.

Όσον αφορά στη βέλτιστη τιμή pH δράσης του εν λόγω ενζύμου, αυτή βρέθηκε ίση με 4,0 και το ένζυμο παρουσίασε σημαντικά μειωμένη ενζυμική ενεργότητα σε τιμές pH μεγαλύτερες από 6,0. Η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* μετρήθηκε στους 60 °C, ενώ πάνω από το 80 % της αρχικής ενζυμικής ενεργότητας διατηρήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 40 και 65 °C, όπως προκύπτει από το Σχήμα 6.3.B. Επιπλέον, η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* διατηρεί σχεδόν πλήρως την ενζυμική ενεργότητά της έπειτα από 24 h επώασης στους 50 °C και σε τιμή pH ίση με 4,5. Ωστόσο, η ενζυμική ενεργότητα παρουσίασε σημαντική μείωση έπειτα από 24 h επώασης σε θερμοκρασία 60 °C και άνω (Zerva et al., 2021). Επομένως, ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* θεωρήθηκαν οι 50 °C, κατατάσσοντάς την στην οικογένεια των θερμοφίλων λακτασών (Atalah et al., 2019).



Σχήμα 6.3. Επίδραση (Α) της τιμής του pH στη βέλτιστη θερμοκρασία (50 °C), (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (4,0) και (Γ) της θερμοκρασίας επώασης για 24 h στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*.

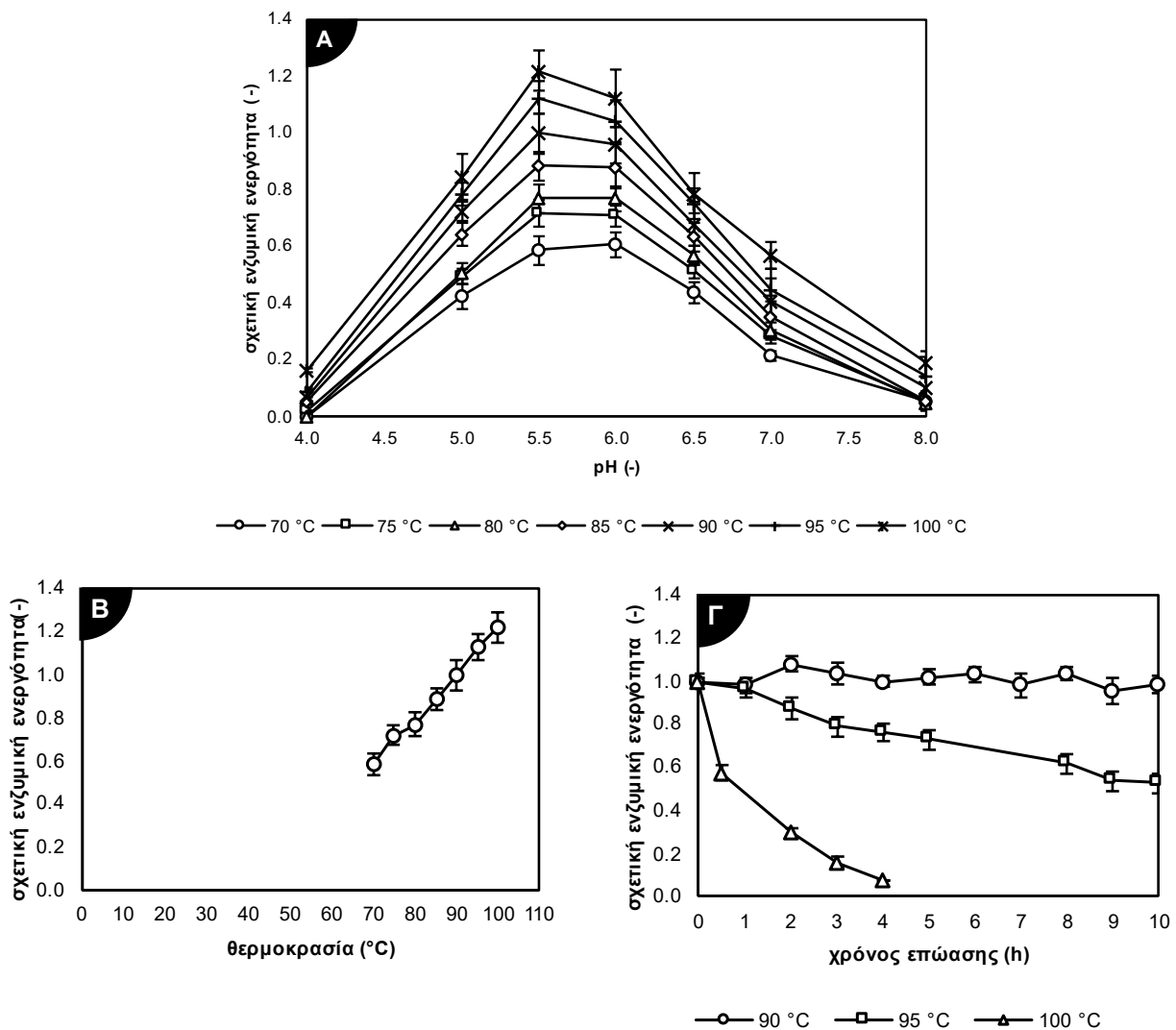
6.2.4.Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*

Η ενζυμική ενεργότητα της βακτηριακής υπερθερμόφιλης λακτάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*, η οποία επίσης παρήχθη σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.4.2, μελετήθηκε σε εύρος τιμών pH από 4,0 έως 8,0 και σε θερμοκρασιακό εύρος από 70 έως 100 °C, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.5. Στο Σχήμα 6.4 απεικονίζεται η σχετική ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* συναρτήσει της τιμής του pH και της θερμοκρασίας.

Όπως παρατηρείται, η συγκεκριμένη λακτάση παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε τιμή pH ίση με 5,5, όπου παρουσιάζει μέγιστη ενζυμική ενεργότητα (τιμή σχετικής ενζυμικής ενεργότητας $1,00 \pm 0,07$), όπως παρατηρείται από το Σχήμα 6.4.A. Ωστόσο, η ενζυμική ενεργότητα δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p > 0,05$) μεταξύ των τιμών pH 5,5 και 6,0 (τιμή σχετικής ενζυμικής ενεργότητας $0,96 \pm 0,06$ σε τιμή pH ίση με 6,0). Η ενζυμική ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης μειώνεται σημαντικά σε τιμές pH μικρότερες ή ίσες του 5,0 και μεγαλύτερες ή ίσες του 6,5 και απενεργοποιείται πλήρως σε τιμές pH μικρότερες από 4,0 και μεγαλύτερες από 8,0.

Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana*, η ενζυμική της ενεργότητα παρουσιάζει συνεχή αύξηση με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 70 στους 100 °C, όπως προκύπτει από το Σχήμα 6.4.B. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.4.Γ, η επώαση του ενζύμου σε θερμοκρασίες άνω των 90 °C για έως 10 h οδηγεί σε σταδιακή απενεργοποίησή του. Συγκεκριμένα, στη θερμοκρασία των 90 °C η λακτάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* διατηρεί πλήρως ($98,6 \pm 4,5$ %) την αρχική ενζυμική ενεργότητά της, έπειτα από 10 h επώασης. Στη θερμοκρασία των 95 °C το ένζυμο χάνει το 47,5 % της αρχικής ενεργότητάς του έπειτα από 10 h επώασης και σε θερμοκρασία ίση με 100 °C απενεργοποιείται πλήρως έπειτα από 4 h. Επομένως, ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της λακτάσης από το υπερθερμόφιλο βακτήριο *T. neapolitana* θεωρήθηκε αυτή των 90 °C.

Οι παραπάνω βέλτιστες τιμές pH και θερμοκρασίας επιβεβαιώνουν τις αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για την λακτάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana*. Οι Park et al. (2005) αναφέρουν ότι η β-γλυκοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* είχε βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα στο εύρος τιμών pH μεταξύ 5,0 και 7,0 και ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης αναφέρουν τους 95 °C. Στη θερμοκρασία των 100 °C, η λακτάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* έχασε το 50 % της αρχικής ενεργότητάς της έπειτα από 3,6 h και στη θερμοκρασία των 105 °C, η ενζυμική ενεργότητα της εν λόγω λακτάσης μειώθηκε κατά 50 % έπειτα από 12 min.



Σχήμα 6.4. Επίδραση (Α) της τιμής του pH και της θερμοκρασίας, (Β) της θερμοκρασίας στη βέλτιστη τιμή pH (5,5) και (Γ) του χρόνου επώασης σε κάθε θερμοκρασία στη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*.

6.3. Αξιοποίηση του όξινο ορού στραγγιστού γιαουρτιού για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών

6.3.1. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*

Η λακτάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* ήταν η πρώτη που μελετήθηκε σε συμπυκνωμένο ή μη όξινο ορό γιαουρτιού, για διάφορα ενζυμικά φορτία. Τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων όσον αφορά στον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και τον βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης παρουσιάζονται παρακάτω.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι ο βαθμός απόδοσης σε GOS αρχικά παρουσιάζει απότομη αύξηση, ενώ όσο περνά ο χρόνος αντίδρασης ο ρυθμός αύξησης μειώνεται, μέχρι την επίτευξη ενός μέγιστου σημείου. Στην συνέχεια ο βαθμός απόδοσης σε GOS μειώνεται, υποδηλώνοντας υδρόλυση των σχηματιζόμενων ολιγοσακχαριτών. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τον μηχανισμό της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης που περιγράφηκε στην ενότητα 3.3. Η τρανσγαλακτοζυλίωση είναι μια κινητικά ελεγχόμενη ενζυμική αντίδραση, ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται όχι μόνο από το ενζυμικό φορτίο στο αντιδρών σύστημα, το οποίο παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, αλλά και από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, η οποία μεταβάλλεται με τον χρόνο αντίδρασης, καθώς το υπόστρωμα καταναλώνεται. Στην αρχή της αντίδρασης, το μόνο διαθέσιμο υπόστρωμα για τη δράση του ενζύμου είναι η λακτόζη, η οποία είτε υδρολύεται προς γλυκόζη και γαλακτόζη, είτε ολιγομερίζεται, οπότε παράγονται γαλακτοολιγοσακχαρίτες με υψηλό ρυθμό. Ωστόσο, οι παραγόμενοι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τη β-γαλακτοζιδάση, είτε για περαιτέρω αύξηση του βαθμού πολυμερισμού τους, είτε για την υδρόλυσή τους. Όταν η συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών σύστημα μειώνεται, ο ρυθμός τρανσγαλακτοζυλίωσης μειώνεται, ενώ αυξάνεται ο ρυθμός υδρόλυσης των παραγόμενων GOS, καθώς η συγκέντρωσή τους στο αντιδρών σύστημα έχει αυξηθεί. Στο σημείο που η συγκέντρωση των GOS μεγιστοποιείται, οι ρυθμοί παραγωγής και υδρόλυσης των GOS εξισώνονται. Κατόπιν, καθώς η λακτόζη εξαντλείται, η υδρόλυση των GOS επικρατεί της σύνθεσης αυτών, οπότε η συγκέντρωσή τους στο αντιδρών σύστημα μειώνεται (Vera et al., 2016).

Στο Σχήμα 6.5 παρουσιάζεται ο βαθμός απόδοσης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης με εφαρμογή της εμπορικής β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε μη συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v. Η εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 0,06 U/mL οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS $21,2 \pm 1,8$ έπειτα από 3 h ενζυμικής αντίδρασης. Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,13 U/mL οδήγησε σε αυξημένο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με $23,7 \pm 1,4$ % επιτεύχθηκε με εφαρμογή 0,13 U/mL ενζύμου, έπειτα από 1,5 h ενζυμικής αντίδρασης. Αυτός ο βαθμός απόδοσης σε GOS ήταν ο μέγιστος που επιτεύχθηκε με εφαρμογή της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στον όξινο ορό γιαουρτιού, ενώ ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης στο χρονικό σημείο μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν 76,0 %. Περαιτέρω διπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου σε 0,26 U/mL οδήγησε στη μεγιστοποίηση της

συγκέντρωσης σε υποδιπλάσιο χρόνο (45 min), ωστόσο ο βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος ($15,6 \pm 1,2$).

Η αύξηση της αρχικής περιεκτικότητας του όξινου ορού σε 10 % w/v λακτόζη δεν οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS. Με χρήση ενζυμικών φορτίων από 0,06 έως 0,26 U/mL, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS κυμάνθηκε μεταξύ $12,4 \pm 1,0$ και $14,9 \pm 1,8$ και ήταν στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικός και στις τρεις περιπτώσεις. Επιπλέον, περαιτέρω αύξηση της αρχικής περιεκτικότητας του όξινου ορού σε 14 και 18 % w/v λακτόζη δεν οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερους βαθμούς απόδοσης σε GOS, με τους μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS να κυμαίνονται μεταξύ $8,33 \pm 1,24$ και $21,3 \pm 1,1$. Αυτή η παρατήρηση δεν ήταν αναμενόμενη, καθώς η αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος σε μία ενζυμική αντίδραση αναμένεται να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις σε προϊόντα. Ωστόσο μπορεί να ερμηνευθεί από την παρουσία άλλων συστατικών στον όξινο ορό γιαουρτιού, όπως τα ιόντα μετάλλων, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα του εν λόγω ενζύμου, όπως αναλύθηκε στην ενότητα 6.2.1. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η παρουσία ιόντων K^+ , Na^+ και Ca^{2+} ενισχύει σημαντικά την δραστικότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, ενώ άλλα ιόντα, όπως το Mg^{2+} , το Mn^{2+} και ο Zn^{2+} , δρουν παρεμποδιστικά για το ένζυμο, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όσο ο όξινος ορός συμπυκνώνεται, εκτός από τη συγκέντρωση της λακτόζης αυξάνεται η συγκέντρωση και των υπόλοιπων διαλυτών στερεών, άρα και των ιόντων. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.1, ο μη συμπυκνωμένος όξινος ορός περιέχει συγκεντρώσεις K^+ , Na^+ και Ca^{2+} ίσες με 1131 ± 38 , $343,4 \pm 50,4$ και 1175 ± 28 mg/L, ήτοι $29,00 \pm 1,00$, $14,92 \pm 2,19$ και $29,38 \pm 0,70$ mM, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις για τα Mg^{2+} και Zn^{2+} ισούνται με $29,26 \pm 6,20$ και $1,746 \pm 0,121$ mg/L, ήτοι $1,204 \pm 0,255$ και $0,0267 \pm 0,0019$ mM, αντίστοιχα. Στους συμπυκνωμένους όξινους ορούς με αρχικές περιεκτικότητες σε λακτόζη ίσες με 10, 14 και 18 % w/v, οι παραπάνω τιμές συγκεντρώσεων ιόντων πολλαπλασιάζονται κατά 3,23, 4,52 και 5,81 φορές. Επομένως, οι μικρότερες αποδόσεις σε GOS από την εφαρμογή αυτής της λακτάσης στον συμπυκνωμένο όξινο ορό οφείλονται στην αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} , Mn^{2+} και Zn^{2+} που παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου, η οποία πιθανώς δεν μπορεί να υπερκαλυφθεί από την ενισχυτική δράση των ιόντων K^+ , Na^+ και Ca^{2+} , η συγκέντρωση των οποίων είναι επίσης αυξημένη στον συμπυκνωμένο όξινο ορό.

Από την ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στον όξινο ορό γιαουρτιού με την τεχνική της Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με

Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD), ταυτοποιήθηκαν 14-18 μόρια υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης, της γαλακτόζης και της λακτόζης, σε όλες τις περιπτώσεις. Ο πλέον άφθονος ολιγοσακχαρίτης που παράχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις εκλύεται στα 35,6 min κατά μέσο όρο και θεωρείται ότι πρόκειται για τον τρισακχαρίτη 6'-Ο-β-γαλακτοζυλ-λακτόζη, με βάση αναφορές της βιβλιογραφίας που αφορούν σε μελέτες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από λακτόζη (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017). Ο δεύτερος κατά σειρά απόδοσης ολιγοσακχαρίτης που παράχθηκε ήταν ο δισακχαρίτης 6-γαλακτοβιόζη, ο οποίος ταυτοποιήθηκε με χρήση προτύπου. Αυτό το προϊόν τρανσγαλακτοζυλίωσης δε συμπεριλήφθηκε στον υπολογισμό του βαθμού απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων σε GOS, αλλά επιλέχθηκε να παρουσιαστεί ανεξάρτητα, καθώς η παραγωγή αυτού του δισακχαρίτη ακολουθεί διαφορετική πορεία παραγωγής και υδρόλυσης από όλους τους άλλους ολιγοσακχαρίτες που παράγονται. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της 6-γαλακτοβιόζης παρουσίασε επίσης απότομη αύξηση στα πρώτα στάδια της ενζυμικής αντίδρασης, αλλά έφθασε σε μέγιστο σημείο σε μετέπειτα χρονικό σημείο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης, όταν οι άλλοι ολιγοσακχαρίτες είχαν ήδη αρχίσει να υδρολύονται, πριν αρχίσει να υδρολύεται και αυτή. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι αυτός ο δισακχαρίτης δεν αποτελεί προτιμητέο υπόστρωμα για τη δράση της β-γαλακτοζιδάσης, συγκριτικά με τη λακτόζη και τα υπόλοιπα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί βιοβιογραφικά (Torres et al., 2010). Θεωρήθηκε ότι αν η 6-γαλακτοβιόζη λαμβανόταν υπόψη στον υπολογισμό του βαθμού απόδοσης σε GOS, θα προέκυπτε εσφαλμένο συμπέρασμα αναφορικά με την παραγωγικότητα της λακτάσης σε GOS, καθώς στο σημείο μεγιστοποίησης αυτού η αυξημένη παραγωγικότητα σε 6-γαλακτοβιόζη σε μακρότερους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης θα επικάλυπτε την υδρόλυση των άλλων προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης και θα προέκυπτε ένα μείγμα ολιγοσακχαριτών με μικρότερη ποικιλομορφία και συντριπτική επικράτηση του δισακχαρίτη 6-γαλακτοβιόζη.

Υπό τις συνθήκες μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS (23,7 %) που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,1 % w/v, ενζυμικό φορτίο 0,13 U/mL, 1,5 h ενζυμικής αντίδρασης, θερμοκρασία 45 °C και τιμή pH = 7,2), οι οποίες αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες δράσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στον όξινο ορό, η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης ήταν ίση με 0,110 % w/v, αποτελώντας τον 3,72 % της αρχικής περιεκτικότητας του όξινου ορού σε λακτόζη. Αν αυτό το ποσοστό συνυπολογιστεί στον προαναφερθέντα μέγιστο βαθμό

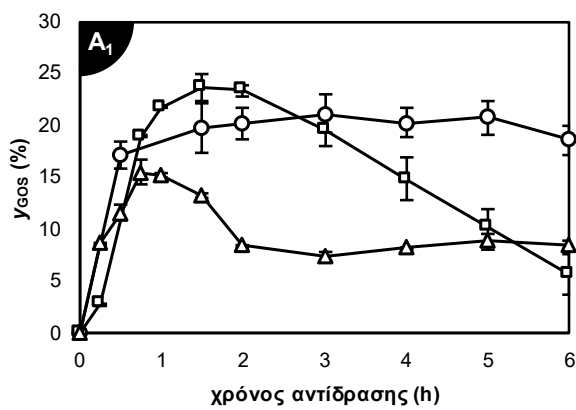
απόδοσης σε GOS, αυτός αυξάνεται στο $27,4 \pm 1,5$ %, με την 6-γαλακτοβιόζη να αποτελεί το 13,6 % των συνολικών παραγόμενων ολιγοσακχαριτών. Σε αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση 6'-Ο-β-γαλακτοζυλ-λακτόζης ανήλθε σε 0,253 % w/v, και η συγκέντρωση αλλολακτόζης ήταν ίση με 0,057 % w/v, με τα αντίστοιχα ποσοστά στο μείγμα των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών να ανέχρονται σε 31,5 και 7,13 %.

Μία έρευνα των González-Delgado et al. (2016), οι οποίοι μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε υπόστρωμα καθαρής λακτόζης για παραγωγή GOS, αναφέρει την επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσο με 12,18 %, με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσου με 5 U/mL σε υπόστρωμα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 25 % w/v, σε θερμοκρασία 40 °C και τιμή pH ίση με 7, έπειτα από 3 h ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας έρευνας δεν συνάδουν με αυτά της παρούσας διατριβής, καθώς στην παρούσα μελέτη η εφαρμογή πολύ μικρότερων ενζυμικών φορτίων (0,13 U/mL) σε υπόστρωμα μη συμπυκνωμένου όξινο ορού γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v οδήγησε στην επίτευξη πολύ υψηλότερου βαθμού απόδοσης σε GOS. Αυτή η διαφοροποίηση δύναται να αποδοθεί στην επίδραση των διαφόρων ιόντων μετάλλων που περιέχονται στον όξινο ορό και απουσιάζουν από τα πρότυπα διαλύματα καθαρής λακτόζης, τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή επίδραση στην ενεργότητα της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, όπως προαναφέρθηκε και επιβεβαιώνεται και από άλλες αναφορές της βιβλιογραφίας (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

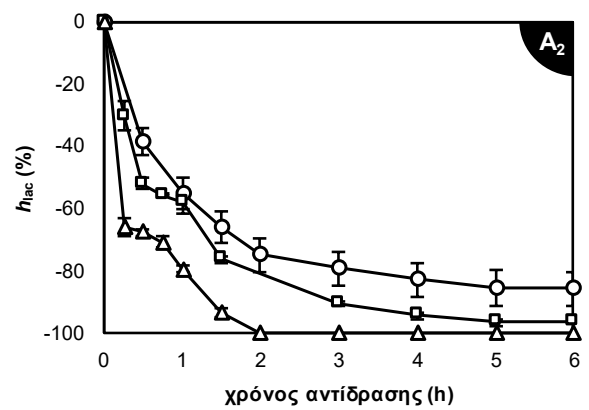
Επιπλέον, οι Yin et al. (2017) μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε υπόστρωμα καθαρής λακτόζης με περιεκτικότητα 30 % w/w προς παραγωγή GOS και αναφέρουν ότι η εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 3,75 U/g λακτόζης (1,125 U/mL αντιδρώντος μείγματος) οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS $34,9 \pm 1,8$ %, έπειτα από 6 h ενζυμικής αντίδρασης σε θερμοκρασία 40 °C και τιμή pH ίση με 7,0, με ταυτόχρονη υδρόλυση της αρχικής περιεχόμενης λακτόζης σε βαθμό $91,8 \pm 0,8$ %. Ο χαμηλότερος βαθμός απόδοσης σε GOS στην παρούσα μελέτη θεωρείται ότι οφείλεται στην παρουσία ιόντων μετάλλων στον όξινο ορό που δρουν παρεμποδιστικά για το ένζυμο, όπως προαναφέρθηκε.

Τέλος, οι Mano et al. (2019) μελέτησαν την εφαρμογή β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε ορό γάλακτος συγκριτικά με άλλες εμπορικά διαθέσιμες λακτάσες και αναφέρουν την επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσο με 25 %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 50 U/g λακτόζης (15 U/mL ορού) σε συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 30 % w/v, έπειτα από 2 h ενζυμικής

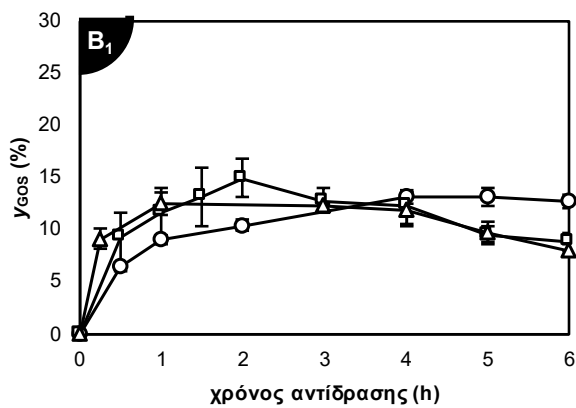
αντίδρασης στους 35 °C και σε τιμή pH ίση με 7. Αυτά τα αποτελέσματα αντιτίθενται με αυτά της παρούσας διατριβής, υπό την έννοια ότι παρόμοιοι βαθμοί απόδοσης σε GOS επιτεύχθηκαν στην παρούσα έρευνα, αλλά σε μη συμπυκνωμένο ορό (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,1 % w/v), ενώ στον συμπυκνωμένο ορό επιτεύχθηκαν χαμηλότεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS (ενδεικτικά 11.9 ± 1.2 % για αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 18 % w/v και ενζυμικό φορτίο 0.26 U/mL), υπό τις ίδιες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης (35 °C, pH = 7.2).



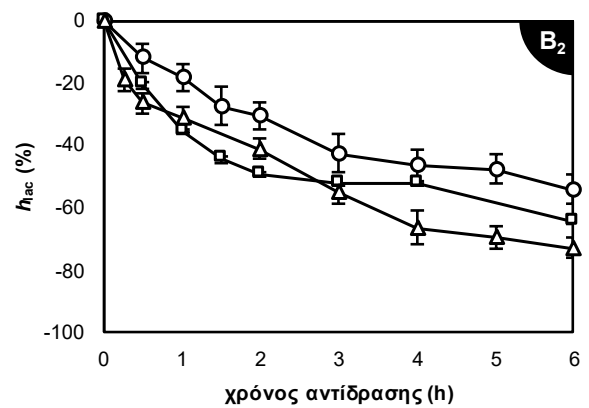
○ 0.06 U/mL □ 0.13 U/mL ▲ 0.26 U/mL



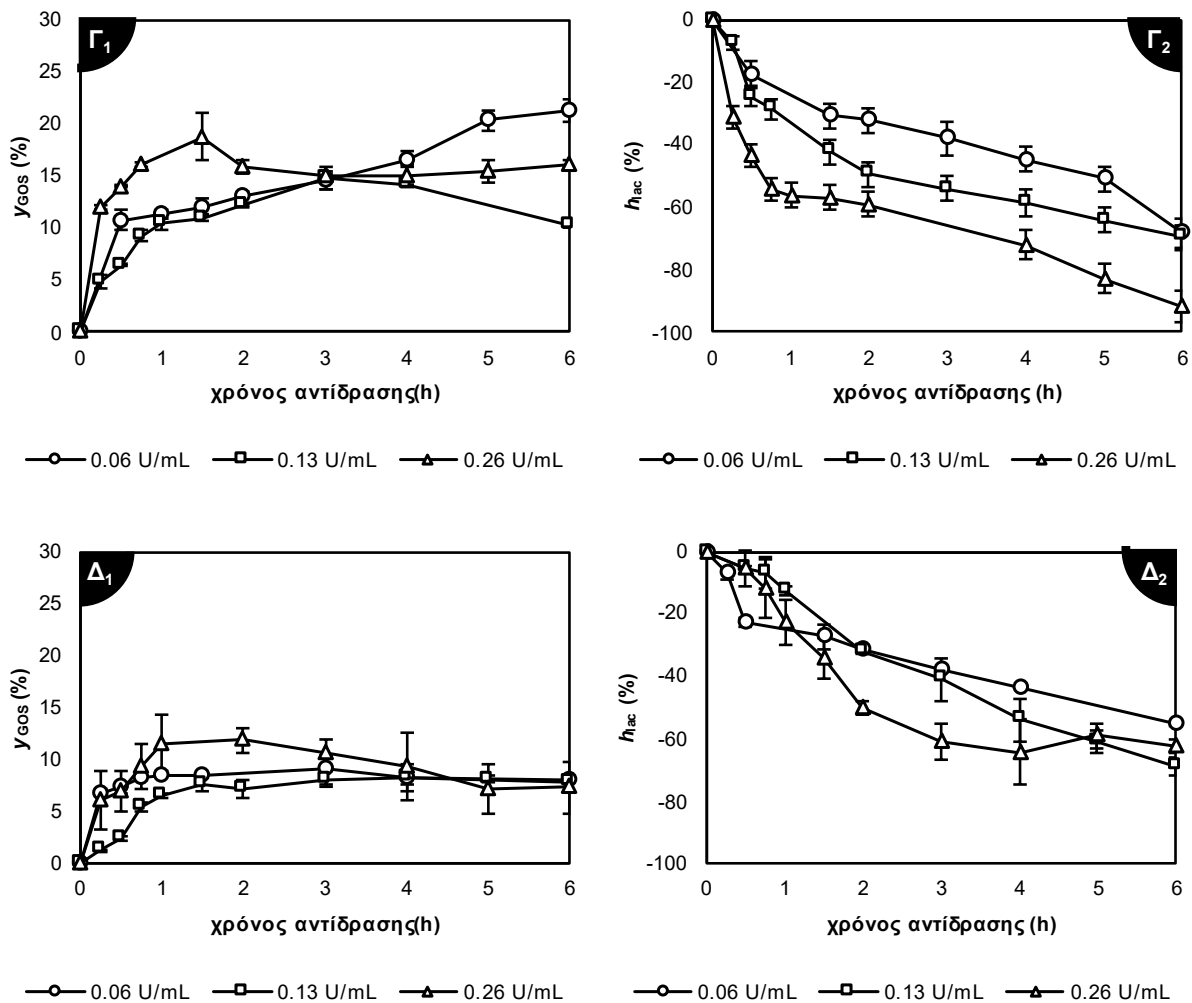
○ 0.06 U/mL □ 0.13 U/mL ▲ 0.26 U/mL



○ 0.06 U/mL □ 0.13 U/mL ▲ 0.26 U/mL



○ 0.06 U/mL □ 0.13 U/mL ▲ 0.26 U/mL



Σχήμα 6.5. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % w/v , (Β) 10 % w/v , (Γ) 14 % w/v και (Δ) 18 % w/v .

6.3.2. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*

Στη συνέχεια μελετήθηκε η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών με εφαρμογή της βιομηχανικής β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* σε συμπυκνωμένο ή μη όξινο ορό γιαουρτιού, για διάφορα ενζυμικά φορτία. Τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων όσον αφορά στον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και τον βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.6.

Όπως και στην περίπτωση εφαρμογής της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ότι ο βαθμός απόδοσης σε GOS αρχικά αυξήθηκε, μέχρι την επίτευξη μίας

μέγιστης τιμής, και κατόπιν παρουσίασε μείωση. Η υδρόλυση των παραγόμενων GOS ήταν περισσότερο έντονη όταν εφαρμόστηκαν υψηλά ενζυμικά φορτία σε όξινο ορό γιαουρτιού με χαμηλή αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη, κυρίως στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό (Σχήμα 6.6.A), καθώς η αναλογία ενζύμου προς υπόστρωμα είναι μεγαλύτερη. Με χρήση συμπυκνωμένου ορού επιτεύχθηκαν υψηλότεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS και παρατηρήθηκε ότι, η υδρόλυση των σχηματιζόμενων προϊόντων ήταν μικρότερη ή λάμβανε χώρα σε μεγάλους χρόνους αντίδρασης. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η λακτόζη παραμένει σε περίσσεια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας στο ένζυμο να συνθέσει περισσότερους GOS, πριν επικρατήσει η αντίδραση υδρόλυσης. Επίσης, όπως παρουσιάστηκε στην ενότητα 6.2.2, η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* δεν επηρεάζεται από τα ιόντα μετάλλων που περιέχονται στον όξινο ορό, επομένως δεν εμφανίζονται φαινόμενα παρεμπόδισης της δράσης του ενζύμου στην περίπτωση του συμπυκνωμένου όξινου ορού, όπως συμβαίνει στην περίπτωση εφαρμογής της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*.

Στην περίπτωση χρήσης μη συμπυκνωμένου όξινου ορού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v, η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *A. oryzae* οδήγησε στην επίτευξη σχετικά χαμηλών τιμών μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS, έως $9,59 \pm 0,56$ %, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των τιμών που επιτεύχθηκαν με χρήση διαφορετικών ενζυμικών φορτίων στο εύρος 0,5-4 U/mL. Μετά από τη συμπύκνωση του όξινου ορού, επιτεύχθηκαν υψηλότεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση χρήσης συμπυκνωμένου όξινου ορού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10 % w/v, επιτεύχθηκαν στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικοί ($p > 0,05$) μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS, έως $18,5 \pm 0,4$ %, με εφαρμογή ενζυμικών φορτίων στο εύρος 1-4 U/mL. Η χρήση υψηλότερου ενζυμικού φορτίου (8 U/mL) οδήγησε στην επίτευξη σημαντικά ($p < 0,05$) χαμηλότερου μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ($13,9 \pm 0,7$ %). Αυτό υποδεικνύει ότι για αυξημένες αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης, αν το ενζυμικό φορτίο ξεπεράσει μία κρίσιμη τιμή, η αντίδραση υδρόλυσης πιθανώς υπερσχύει της αντίδρασης τρανσγαλατοζυλίωσης. Επομένως, είτε η λακτόζη εξαντλείται ταχύτερα και δεν παραμένει για αρκετό διάστημα σε περίσσεια προκειμένου να σχηματιστούν περισσότεροι GOS, είτε η αντίδραση της υδρόλυσης των σχηματιζόμενων GOS πραγματοποιείται ταχύτερα, λόγω της υψηλότερης ενεργότητας του ενζύμου.

Μία περαιτέρω αύξηση της αρχικής περιεκτικότητας του όξινου ορού σε λακτόζη σε 15 % w/v οδήγησε στην επίτευξη ακόμα υψηλότερων μέγιστων βαθμών απόδοσης

σε GOS. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS έφθασε έως και $19,8 \pm 0,9$ % με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 4 U/mL, έπειτα από 4 h ενζυμικής αντίδρασης. Ωστόσο, για τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των GOS στο αντιδρών σύστημα απαιτήθηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι αντίδρασης, καθώς η αυξημένη συγκέντρωση υποστρώματος οδηγεί σε μειωμένους ρυθμούς αντίδρασης, σύμφωνα με τη θεωρία των ενζυμικών αντιδράσεων (Shuler & Kargi, 2002).

Μέγιστη παραγωγικότητα σε GOS στην περίπτωση εφαρμογής της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* επιτεύχθηκε με χρήση του πλέον συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού με περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ανήλθε σε $23,4 \pm 0,9$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 4 U/mL, έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, σε θερμοκρασία 45 °C και τιμή pH του αντιδρώντος συστήματος ίση με 4,5. Ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης τη στιγμή της μεγιστοποίησης της συγκέντρωσης GOS στο αντιδρών σύστημα ήταν ίση με 51,9 %. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *A. oryzae* στον συμπυκνωμένο όξινο ορό ($23,4 \pm 0,9$ %) ήταν στατιστικά μη σημαντικά διαφορετική ($p > 0,05$) από αυτόν που επιτεύχθηκε με εφαρμογή της λακτάσης από την ζύμη *K. lactis* στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό ($23,7 \pm 1,4$ %). Όμως, στην περίπτωση χρήσης της λακτάσης από τον *K. lactis*, ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης κατά τη μεγιστοποίηση του βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο στην περίπτωση χρήσης του ενζύμου από τον *A. oryzae* (76,0 % έναντι 51,9 %). Επίσης, στην περίπτωση της εφαρμογής της λακτάσης από τον *K. lactis* στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό απαιτήθηκαν μόλις 90 min για τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης GOS στο αντιδρών σύστημα, ενώ στην περίπτωση της λακτάσης από τον *A. oryzae* ο αντίστοιχος απαιτούμενος χρόνος ήταν 7 h. Παρόλα αυτά, η παραγωγή GOS από συμπυκνωμένο ορό μπορεί να θεωρηθεί πλεονεκτική σε μία βιομηχανική διεργασία, αρκεί η συμπύκνωση του ορού που προηγείται της ενζυμικής αντίδρασης να πραγματοποιείται με τρόπο που να ελαχιστοποιεί τις απώλειες σε λακτόζη λόγω κρυστάλλωσης.

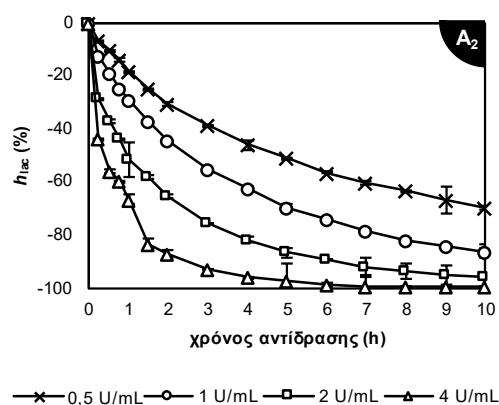
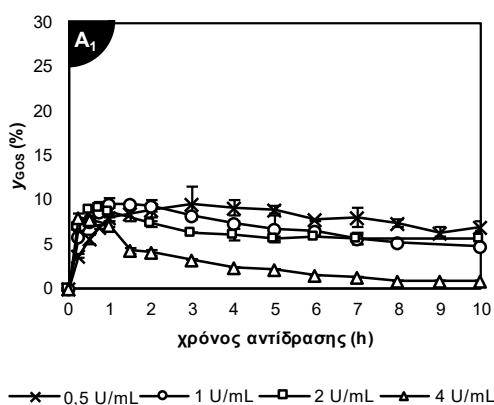
Από την ανάλυση των προϊόντων της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *A. oryzae* στο σύστημα HPAEC-PAD ανιχνεύθηκαν 18-21 σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένων της γαλακτόζης, της γλυκόζης και της λακτόζης. Ο ολιγοσακχαρίτης που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερα ποσοστά στο μείγμα των παραγόμενων εκλούεται, κατά μέσο όρο, στα 34,9 min ανάλυσης. Όπως και στην περίπτωση εφαρμογής της λακτάσης από τον *K. lactis* στον όξινο ορό, θεωρήθηκε ότι πρόκειται για τον τρισακχαρίτη δ'-Ο-β-γαλακτοζυλο-

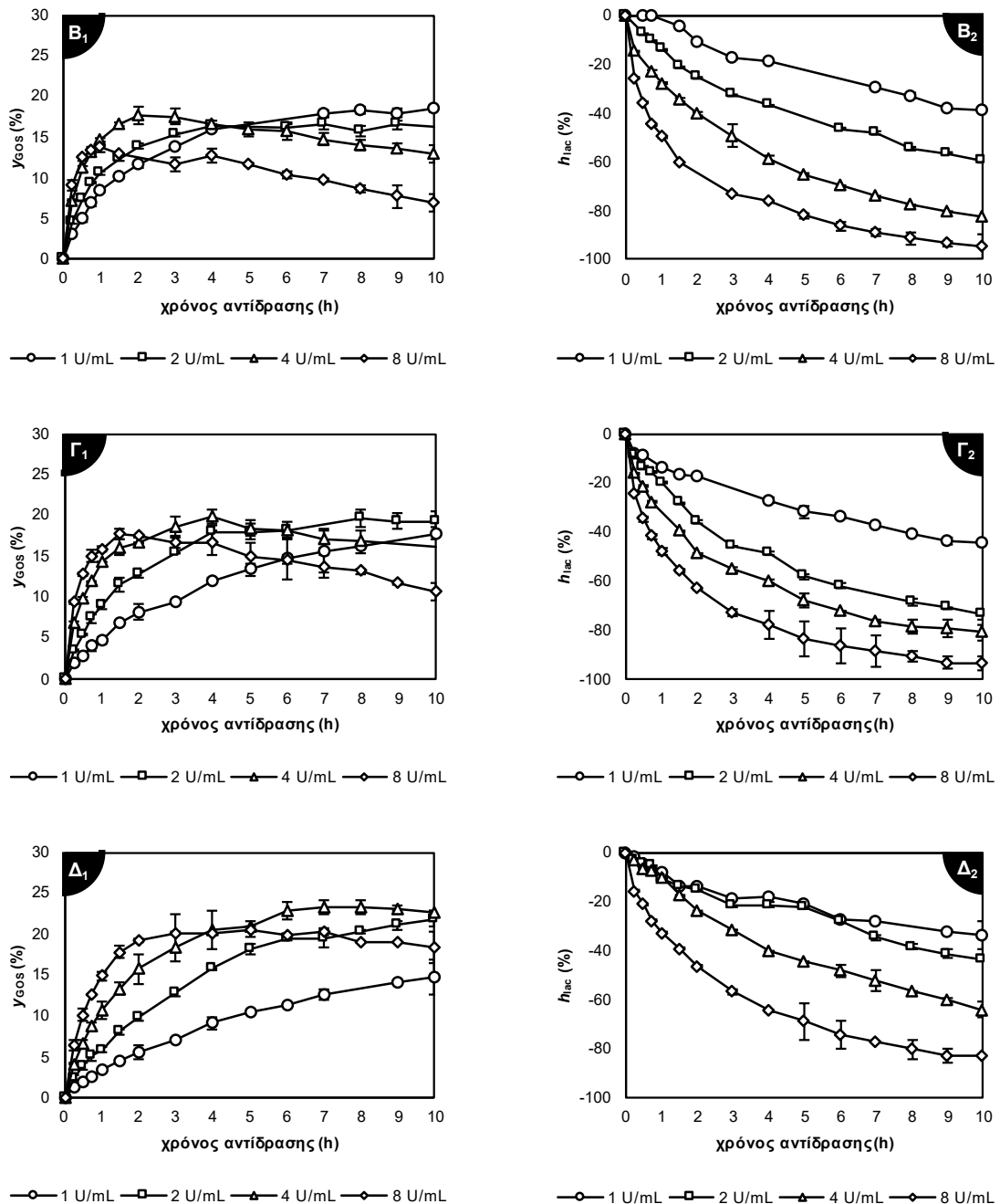
λακτόζη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αντίστοιχων ερευνών της βιβλιογραφίας (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017). Ο δεύτερος σε σειρά αφθονίας ολιγοσακχαρίτης εκλύεται στα 23,5 min, ο οποίος ταυτοποιήθηκε ως 6-γαλακτοβιόζη χρησιμοποιώντας πρότυπη ουσία. Τέλος, ανάμεσα στους υπόλοιπους GOS που ανιχνεύθηκαν ξεχωρίζει η αλλολακτόζη, η οποία εκλύεται κατά μέσον όρο στα 28,5 min της ανάλυσης, ενώ οι υπόλοιποι GOS ανιχνεύθηκαν σε μικρότερες ποσότητες. Κατά τη μεγιστοποίηση του βαθμού απόδοσης σε GOS με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* στον όξινο ορό γιαουρτιού, δηλαδή στην περίπτωση χρήσης συμπυκνωμένου ορού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v και ενζυμικού φορτίου ίσου με 4 U/mL, έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης προσδιορίστηκε σε 0,966 % w/v, με βαθμό απόδοσης επί της αρχικής λακτόζης ίσο με 4,78 %. Αν αυτή η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης αθροιστεί με την συγκέντρωση των υπόλοιπων GOS, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS αυξάνεται σε $28,2 \pm 1,1$ %, με την 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη και την 6-γαλακτοβιόζη να αποτελούν το 41,9 και 17,0 % των συνολικών ολιγοσακχαριτών που παράγονται, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση αλλολακτόζης στο σημείο αυτό μετρήθηκε ίση με 0,325 % w/v, αποτελώντας το 5,72 % των συνολικών ολιγοσακχαριτών.

Οι Urrutia et al. (2013) χρησιμοποίησαν την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* για την παραγωγή GOS από διαλύματα καθαρής λακτόζης με περιεκτικότητα ίση με 40 % w/v, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 15 U/mL, με την αντίδραση να πραγματοποιείται στους 40 °C και με τιμή pH υποστρώματος ίση με 4,5. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν ίσος με 26,8 % w/w, με τον αντίστοιχο βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης να ανέρχεται σε περίπου 70 %. Ο βαθμός απόδοσης που επιτεύχθηκε στην αναφερόμενη έρευνα είναι αντίστοιχος με αυτόν που επιτεύχθηκε στην παρούσα διδακτορική έρευνα ($28,2 \pm 1,1$ %) με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε συμπυκνωμένο όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η δράση της λακτάσης από τον μύκητα *A. oryzae* δεν επηρεάζεται από την παρουσία πρόσθετων συστατικών στο υπόστρωμα λακτόζης, όπως τα διάφορα ιόντα μετάλλων που περιέχονται στον όξινο ορό της παρούσας έρευνας και απουσιάζουν από το υπόστρωμα της έρευνας των Urrutia et al. (2013). Επιπλέον, παρόμοια με την παρούσα έρευνα, οι Urrutia et al. (2013) ταυτοποίησαν περισσότερα από 17 διαφορετικά σάκχαρα στο σύστημα της ενζυμικής αντίδρασης, με το επικρατές προϊόν της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης να είναι η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, αποτελώντας περίπου το 1/3 των συνολικών ολιγοσακχαριτών που παρήχθησαν.

Οι Jenab et al. (2018) μελέτησαν επίσης την εφαρμογή της λακτάσης από τον μύκητα *A. oryzae* σε διαλύματα καθαρής λακτόζης και μέτρησαν μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 23 %, με πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης στους 50 °C, με αρχική περιεκτικότητα του ρυθμιστικού διαλύματος (pH = 4,5) σε λακτόζη ίση με 40 % w/v. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής και επιβεβαιώνουν την επιτυχία της εφαρμογής μίας εμπορικής λακτάσης απευθείας στον όξινο ορό γιαουρτιού για την παραγωγή GOS με υψηλή απόδοση, αντίστοιχη με αυτήν που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του ενζύμου σε καθαρή λακτόζη, πρακτική που ακολουθείται επί του παρόντος από τη βιομηχανία.

Επιπλέον, οι Fischer & Kleinschmidt (2015) μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* συγκριτικά στον όξινο και τον γλυκό ορό. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν ίσος με $11,32 \pm 0,59$ % στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,8 % w/v, ενζυμικό φορτίο 1,9 U/mL) και $24,45 \pm 0,33$ % στον συμπυκνωμένο όξινο ορό (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 20 % w/v, ενζυμικό φορτίο 10 U/mL). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα προς τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, καθώς παρόμοιοι βαθμοί απόδοσης σε GOS επιτεύχθηκαν τόσο στον μη συμπυκνωμένο όσο και στον συμπυκνωμένο ορό. Ωστόσο, οι Fischer & Kleinschmidt (2015) χρησιμοποίησαν υψηλότερες τιμές ενζυμικού φορτίου για την επίτευξη αυτών των αποδόσεων σε GOS.





Σχήμα 6.6. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (y_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % w/v , (Β) 10 % w/v , (Γ) 15 % w/v και (Δ) 20 % w/v .

6.3.3.Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*

Σε συνέχεια της μελέτης εφαρμογής των δύο βιομηχανικών λακτασών για την παραγωγή GOS από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού, μελετήθηκε η εφαρμογή της μια καινοτόμου, θερμοάντοχης και οξεόφιλης β-γαλακτοζιδάση από τον θερμόφιλο

μύκητα *Thermothielavioides terrestris* που παράχθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής. Όπως και οι δύο βιομηχανικές λακτάσες, έτσι και αυτή η β-γαλακτοζιδάση εφαρμόσθηκε σε συμπυκνωμένο ή μη όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού σε διάφορα ενζυμικά φορτία. Τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων όσον αφορά στον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (y_{GOS}) και τον βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.7.

Όπως και στην περίπτωση της εφαρμογής των δύο βιομηχανικών λακτασών στον όξινο ορό γιαουρτιού, η εφαρμογή υψηλών ενζυμικών φορτίων της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* σε όξινο ορό με χαμηλή αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη οδήγησε στη μεγιστοποίηση της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS κατά τα πρώτα στάδια της ενζυμικής αντίδρασης, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης παρατηρήθηκε ταχεία υδρόλυση των σχηματιζόμενων GOS. Στην περίπτωση χρήσης συμπυκνωμένου όξινου ορού, οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης που επιτεύχθηκαν ήταν υψηλότεροι, ενώ μετρήθηκαν σε μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση χρήσης μη συμπυκνωμένου όξινου ορού γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v, μετρήθηκαν στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικοί ($p > 0,05$) μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS με τιμές έως και $12,9 \pm 0,6$ %, για όλα τα ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν (1-4 U/mL). Όσο μεγαλύτερο ήταν το ενζυμικό φορτίο που εφαρμόσθηκε στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό, τόσο πιο γρήγορα μεγιστοποιήτο ο βαθμός απόδοσης σε GOS, όπως αναμενόταν με βάση την θεωρία των ενζυμικών αντιδράσεων (Shuler & Kargi, 2002). Στην συνέχεια, όταν η συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών σύστημα μειωνόταν, τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης υδρολύονταν ταχύτερα από ότι παράγονταν, οπότε η συγκέντρωση των GOS, άρα και ο βαθμός απόδοσης, παρουσίαζε μείωση.

Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* σε συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10 % w/v οδήγησε στην επίτευξη υψηλότερων βαθμών απόδοσης σε GOS. Συγκεκριμένα, σε αυτήν την περίπτωση, μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $20,2 \pm 2,4$ % επιτεύχθηκε έπειτα από 3 h ενζυμικής αντίδρασης, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 8 U/mL. Ο αντίστοιχος βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης στον χρόνο μεγιστοποίησης της απόδοσης σε GOS ήταν ίσος με 49,2 %. Περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 16 U/mL ευνόησε τις αντιδράσεις υδρόλυσης έναντι του ολιγομερισμού, με αποτέλεσμα την επίτευξη μικρότερου μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ($15,6 \pm 0,8$ %), με

ταυτόχρονο υποδιπλασιασμό του χρόνου επίτευξης αυτού (1,5 h). Η χρήση περαιτέρω συμπυκνωμένου όξινου ορού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v οδήγησε σε ακόμα υψηλότερες αποδόσεις. Συγκεκριμένα, η αύξηση του ενζυμικού φορτίου από 2 σε 8 U/mL οδήγησε στην αύξηση του βαθμού απόδοσης σε GOS από $16,7 \pm 0,8$ σε $23,7 \pm 0,4$ % και το αντίστοιχο ποσοστό υδρόλυσης της λακτόζης του όξινου ορού αυξήθηκε από 39,9 σε 65,6 %, με την επίτευξη αυτού να λαμβάνει χώρα έπειτα από 9-10 h ενζυμικής αντίδρασης. Και πάλι, περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 16 U/mL οδήγησε στην επίτευξη μειωμένου μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS, ίσο με $19,6 \pm 1,5$ %, ο οποίος επιτεύχθηκε έπειτα από 5 h αντίδρασης.

Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που μετρήθηκε με εφαρμογή της θερμοφιλης β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* επιτεύχθηκε στον πλέον συμπυκνωμένο όξινο ορό, με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v. Αυτός ήταν ίσος με $25,7 \pm 0,3$ % και επιτεύχθηκε έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσου με 8 U/mL. Ο αντίστοιχος βαθμός απόδοσης της λακτόζης ήταν ίσος με 48,8 %. Η μέγιστη απόδοση της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης με εφαρμογή της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ($p < 0,05$) από τις αντίστοιχες αποδόσεις που επιτεύχθηκαν με την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae*, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης κάθε ενζύμου, σε όρους θερμοκρασίας, τιμής pH, αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη και ενζυμικού φορτίου, όπως παρουσιάζονται με έντονο χρώμα στον Πίνακα 6.4.

Από την ανάλυση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων στο σύστημα HPAEC-PAD ανιχνεύθηκαν 17-22 σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένης της γαλακτόζης, της γλυκόζης και της λακτόζης. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, ο ολιγοσακχαρίτης που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης ήταν η 6'-O-γαλακτοζυλο-λακτόζη, με δεύτερη σε σειρά αφθονίας την 6-γαλακτοβιόζη. Στο σημείο μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS με εφαρμογή της εν λόγω λακτάσης, ήτοι για αρχική περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λακτόζη ίση με 20 % w/v, με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσο με 8 U/mL, έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης ήταν ίση με 1,13 % w/v, ή 6,07 % της αρχικής περιεχόμενης λακτόζης, η οποία δεν συμπεριλήφθηκε στον υπολογισμό της απόδοσης τρανσγαλακτοζυλίωσης, όπως εξηγήθηκε στην ενότητα XX. Αν αυτό το ποσοστό συμπεριληφθεί στον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS, τότε αυτός αυξάνεται σε $31,8 \pm 0,4$ %, με την 6-γαλακτοβιόζη να αποτελεί το 19,1 % των συνολικών

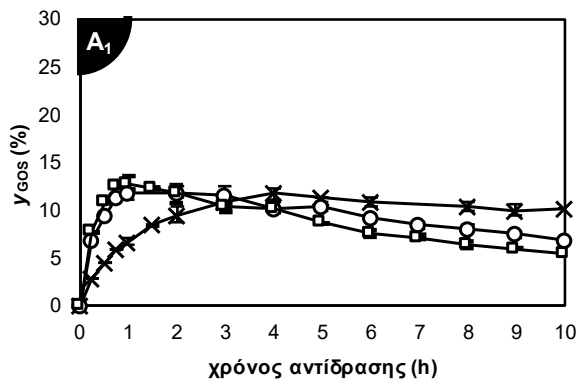
ολιγοσακχαριτών που παρήχθησαν. Το ποσοστό της 6'-Ο-γαλακτοζυλο-λακτόζης στο μείγμα των παραγόμενων GOS ήταν σε αυτό το σημείο ίσο με 45,6 %.

Οι Zeuner et al. (2016) μελέτησαν την εφαρμογή τριών θερμοφίλων λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Bacillus circulans*, *Thermus thermophilus*, και *Pyrococcus furiosus* σε πρότυπα διαλύματα που περιείχαν λακτόζη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη και λακτο-N-τριόζη II για την παραγωγή N-ακυτυλολακτοζαμίνης και λακτο-N-νεοτετραόζη, δύο αμινοσακχάρων με πρεβιοτικές ιδιότητες που αποτελούν κύρια συστατικά του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος. Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *B. circulans* είχε βέλτιστη δράση και θερμοσταθερότητα σε θερμοκρασία 50 °C, όμοια με τη λακτάση από τον μύκητα *T. terrestris* που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, αλλά υψηλότερη βέλτιστη τιμή pH (6,0). Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *B. circulans* σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών ανιόντων με τιμή pH ίση με 6,0 που περιείχε λακτόζη σε μοριακή συγκέντρωση 50 mM και N-ακετυλογλυκοζαμίνη σε μοριακή συγκέντρωση 500 mM οδήγησε στην παραγωγή N-ακετυλολακτοζαμίνης με μέγιστο βαθμό απόδοσης ίσο με 32 %, έπειτα από 30 min ενζυμικής αντίδρασης. Η απόδοση αυτή είναι παρόμοια με την απόδοση σε GOS που επιτεύχθηκε στην παρούσα διατριβή με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* στον όξινο ορό γιαουρτιού (31,8 ± 0,4 %, συμπεριλαμβανομένης της 6-γαλακτοβιόζης). Οι πιο θερμοσταθερές β-γαλακτοζιδάσες από τους μικροοργανισμούς *T. thermophilus* και *P. furiosus*, με βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης τους 65 και 90 °C, αντίστοιχα, οδήγησαν στην παραγωγή N-ακετυλολακτοζαμίνης με σημαντικά μικρότερες αποδόσεις, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε μόλις 16 και 5,4 %, αντίστοιχα. Όσον αφορά στην παραγωγή λακτο-N-νεοτετραόζη από λακτόζη και λακτο-N-τριόζη II, ο βαθμός απόδοσης σε λακτο-N-νεοτετραόζη με εφαρμογή των προαναφερθέντων ενζύμων από τους μικροοργανισμούς *B. circulans*, *T. thermophilus* και *P. furiosus*, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης καθεμιάς β-γαλακτοζιδάσης, υπολογίστηκαν μέχρι και 7,1, 5,2 και 1,0 %, αντίστοιχα.

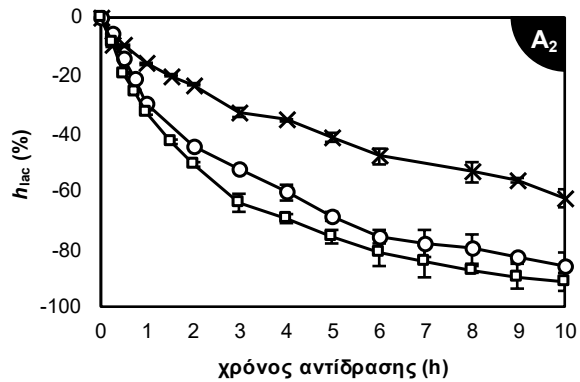
Επιπλέον, οι Yadav & Kayastha (2020) μελέτησαν την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης της φυτικής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσης από φακή (*Lens culinaris*) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα πρότυπο διάλυμα λακτόζης με συγκέντρωση 200 g/L για την παραγωγή GOS. Η συγκέντρωση των παραγόμενων GOS που αναφέρουν ανήλθε μέχρι 68 g/L, έπειτα από 16 h ενζυμικής αντίδρασης σε θερμοκρασία 55 °C και τιμή pH ίση με 4,5, χρησιμοποιώντας ενζυμικό φορτίο ίσο με 12 U/mL. Αυτή η συγκέντρωση αντιστοιχεί σε βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 34 %, ο οποίος είναι ελαφρώς υψηλότερος από αυτόν που επιτεύχθηκε στην παρούσα διατριβή,

με εφαρμογή της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* στον όξινο ορό γιαουρτιού ($31,8 \pm 0,4$ %, συμπεριλαμβανομένης της 6-γαλακτοβιόζης), σε σχεδόν πανομοιότυπες συνθήκες αντίδρασης. Ωστόσο, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από *L. culinaris* επιτεύχθηκε σε μακρότερους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης, ήτοι 16 h έναντι 7 h που απαιτήθηκαν για τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των GOS με τη β-γαλακτοζιδάση από τον μύκητα *T. terrestris*, χρησιμοποιώντας, επίσης, μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο (16 U/mL έναντι 8 U/mL με την β-γαλακτοζιδάση από τον *T. terrestris*).

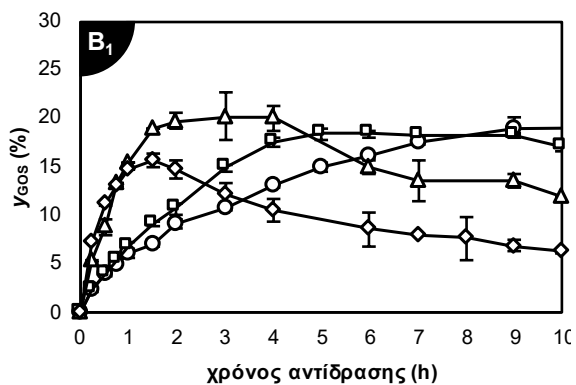
Τέλος, οι Yañez-Ñeco et al. (2021) μελέτησαν την εφαρμογή της ανασυνδυασμένης θερμοφιλης λακτάσης από το βακτήριο *Pantoea anthophila*, το οποίο δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 50 °C και τιμή pH ίση με 7,0, σε συστήματα καθαρής λακτόζης και γλυκού ορού για την παραγωγή GOS. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι στην περίπτωση της χρήσης καθαρής λακτόζης με αρχική περιεκτικότητα ίση με 40 % w/v ως υπόστρωμα, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν ίσος με 39,9 %, έπειτα από 6 h ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσου με 15 U/mL. Τα κύρια προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης σε αυτό το χρονικό σημείο ήταν η αλλολακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η 3'-γαλακτοζυλο-λακτόζη, με τα αντίστοιχα ποσοστά στο μείγμα των παραγόμενων GOS να ανέρχονται σε 50,5, 14,1 και 11,1 %. Στην περίπτωση χρήσης γλυκού ορού ως υπόστρωμα, αναφέρεται ότι οι βαθμοί απόδοσης που επιτεύχθηκαν ήταν αντίστοιχοι με την περίπτωση της χρήσης καθαρής λακτόζης, επομένως η παρουσία ιόντων μετάλλων δεν επηρεάζει τη δράση του ενζύμου. Οι βαθμοί απόδοσης σε GOS που αναφέρονται από τους Yañez-Ñeco et al. (2021) ήταν μεγαλύτεροι από αυτούς που επιτεύχθηκαν στην παρούσα έρευνα με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* και οφείλονται πιθανώς στην χρήση πολύ υψηλότερης αρχικής περιεκτικότητας του συστήματος σε λακτόζη αλλά και υψηλότερων ενζυμικών φορτίων.



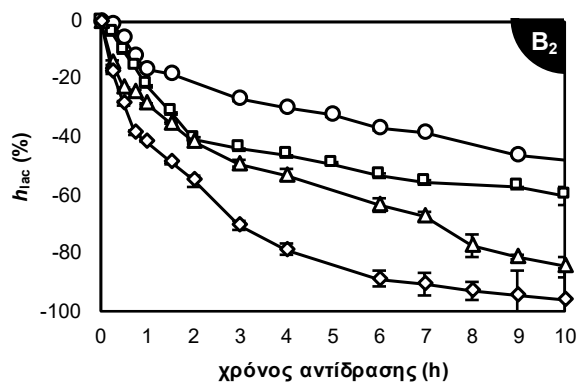
—x— 1 U/mL —o— 2 U/mL —□— 4 U/mL



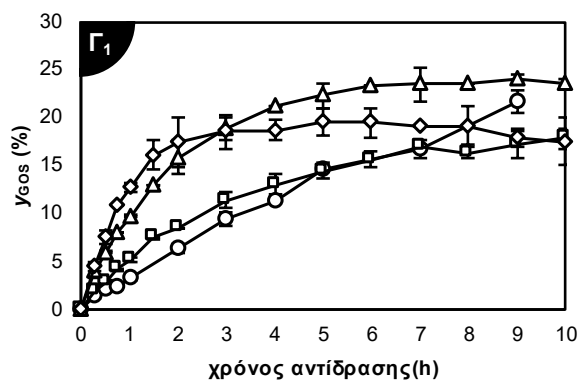
—x— 1 U/mL —o— 2 U/mL —□— 4 U/mL



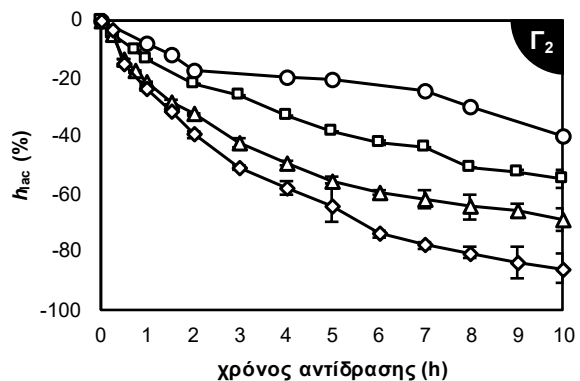
—o— 2 U/mL —□— 4 U/mL —▲— 8 U/mL —◇— 16 U/mL



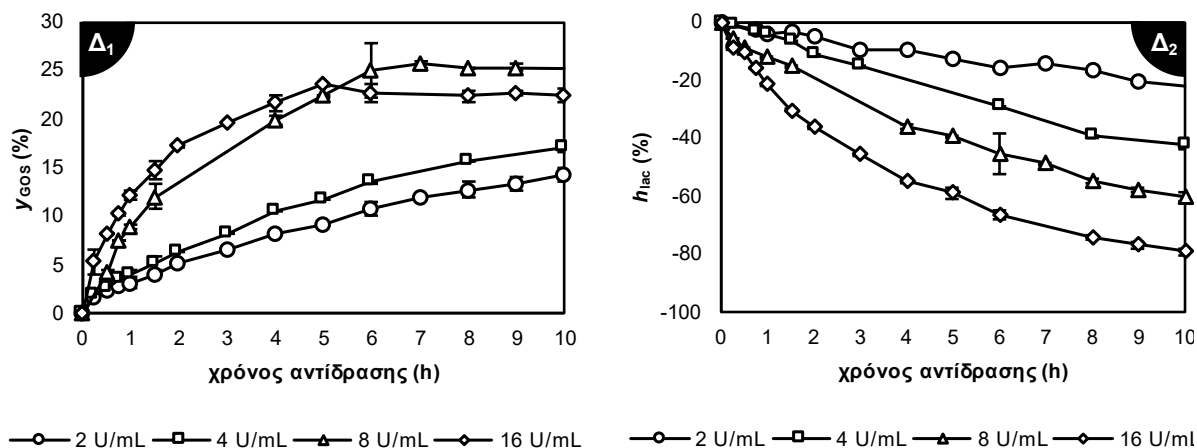
—o— 2 U/mL —□— 4 U/mL —▲— 8 U/mL —◇— 16 U/mL



—o— 2 U/mL —□— 4 U/mL —▲— 8 U/mL —◇— 16 U/mL



—o— 2 U/mL —□— 4 U/mL —▲— 8 U/mL —◇— 16 U/mL



Σχήμα 6.7. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 3,1 % w/v, (Β) 10 % w/v, (Γ) 15 % w/v και (Δ) 20 % w/v.

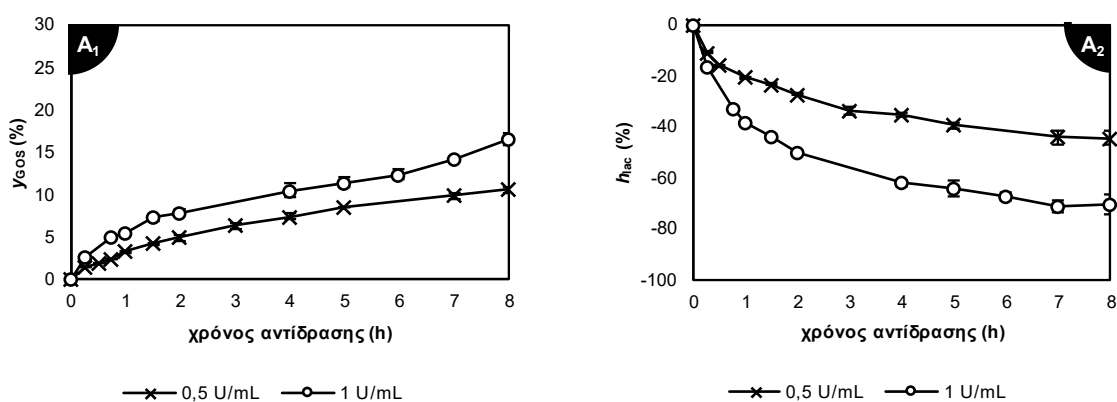
6.3.4. Εφαρμογή της β-γλυκοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana*

Τέλος, μελετήθηκε η εφαρμογή της υπερθερμόφιλης βακτηριακής β-γλυκοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana* σε όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού για την παραγωγή GOS. Στο Σχήμα 6.8 παρουσιάζεται η μεταβολή του βαθμού απόδοσης σε GOS και του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης με τον χρόνο αντίδρασης στην περίπτωση του μη συμπυκνωμένου όξινου ορού. Η εφαρμογή αυτής της λακτάσης σε συμπυκνωμένο όξινο ορό δεν οδήγησε στην παραγωγή GOS, στο εύρος των ενζυμικών φορτίων που μελετήθηκαν. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην παρουσία των μετάλλων ιόντων, η συγκέντρωση των οποίων στην περίπτωση του συμπυκνωμένου ορού αυξάνεται στα επίπεδα που εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση στην λακτάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana*, όπως παρουσιάστηκε στην ενότητα 6.2.4. Γι' αυτό χρειάζεται περαιτέρω μελέτη αναφορικά με την εφαρμογή αυτής της λακτάσης σε συμπυκνωμένο όξινο ορό, με χρήση υψηλότερων ενζυμικών φορτίων ή ακόμα και χαμηλότερων θερμοκρασιών, ο συνδυασμός των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή GOS σε ικανοποιητικές αποδόσεις.

Στην προκειμένη περίπτωση, η εφαρμογή της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* σε μη συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσου με $16,6 \pm 0,7$ % έπειτα από 8 h ενζυμικής αντίδρασης, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 1 U/mL. Ο αντίστοιχος βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης στον χρόνο μεγιστοποίησης της

απόδοσης σε GOS ήταν ίσος με 70,2 %. Από την ανάλυση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων στο σύστημα HPAEC-PAD ανιχνεύθηκαν 15 σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένης της γαλακτόζης, της γλυκόζης και της λακτόζης. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, ο ολιγοσακχαρίτης που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης ήταν η 6'-Ο-γαλακτοζυλο-λακτόζη, με δεύτερη σε σειρά αφθονίας την 6-γαλακτοβιόζη, ακολουθούμενη από την αλλολακτόζη. Στο σημείο μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS με εφαρμογή της εν λόγω λακτάσης στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό, η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης ήταν ίση με 0,047 % w/v, ή 1,63 % της αρχικής περιεχόμενης λακτόζης, η οποία δεν συμπεριλήφθηκε στον υπολογισμό της απόδοσης τρανσγαλακτοζυλίωσης, όπως εξηγήθηκε στην ενότητα **Error! Reference source not found.** Αν αυτό το ποσοστό συμπεριληφθεί στον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS, τότε αυτός αυξάνεται σε $18,2 \pm 0,7$ %, με την 6-γαλακτοβιόζη να αποτελεί το 8,86 % των συνολικών ολιγοσακχαριτών που παρήχθησαν. Το ποσοστό της 6'-Ο-γαλακτοζυλο-λακτόζης στο μείγμα των παραγόμενων GOS ήταν σε αυτό το σημείο ίσο με 34,4 % και της αλλολακτόζης ίσο με 5,43 %.

Οι Park et al. (2005) μελέτησαν την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης καταλυόμενη από την β-γλυκοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* σε υπόστρωμα-δότη καθαρής λακτόζης και βρήκαν το εν λόγω ένζυμο παρουσιάζει απόδοση ολιγομερισμού της τάξης του 50-70 % χρησιμοποιώντας ως δέκτη λακτόζη προς σχηματισμό δύο τρισακχαριτών, της 6'-β-Ο-γαλακτοζυλο-λακτόζης και της 3'-β-Ο-γαλακτοζυλο-λακτόζης, και απόδοση ολιγομερισμού της τάξης κάτω του 50 % χρησιμοποιώντας ως δέκτη γαλακτόζη προς σχηματισμό 6-γαλακτοβιόζης.



Σχήμα 6.8. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (y_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσεως του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-

γλυκοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Thermotoga neapolitana* σε όξινο ορό γιαουρτιού με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % W/v .

6.3.5. Σύνοψη αποτελεσμάτων – Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού

Στον Πίνακα 6.4 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού, με εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Kluyveromyces lactis* και *Aspergillus oryzae* και των δύο καινοτόμων, θερμοφίλων λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Thermothielavioides terrestris* και *Thermotoga neapolitana*. Συνολικά, βέλτιστη παραγωγικότητα σε ολιγοσακχαρίτες παρουσίασε η θερμοφιλή β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. terrestris*, με τον βαθμό απόδοσης σε GOS να ανέρχεται σε $25,7 \pm 0,3$ %, ή $31,8 \pm 0,3$ % συνυπολογισμένης της 6-γαλακτοβιόζης στο μείγμα των GOS, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 8 U/mL, έπειτα από 7 h, με τον αντίστοιχο βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης να ανέρχεται σε 48,8 %. Αυτή η τιμή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μεγαλύτερη από αυτή που επιτεύχθηκε με την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* ($23,7 \pm 1,4$ %) και *A. oryzae* ($23,4 \pm 0,9$ %) και της υπερθερμοφίλης λακτάσης από τον μικροοργανισμό *T. neapolitana* ($16,6 \pm 0,7$ %), στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης καθενός βιοκαταλύτη. Το αποτέλεσμα αυτό κρίνεται ιδιαίτερος πλεονεκτικό, καθώς η αυξημένη παραγωγή GOS από τη θερμοφιλή β-γαλακτοσιδάση από τον *T. terrestris* μπορεί να παίξει κεντρικό ρόλο σε μια ενοποιημένη βιομηχανική διεργασία που συνδυάζει την συμπύκνωση του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού ταυτόχρονα με τον ολιγομερισμό της λακτόζης, όπου απαιτούνται βιοκαταλύτες με αυξημένη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες μιας βιομηχανικής διεργασίας. Αυτή η ολοκληρωμένη διεργασία θα μπορούσε να επιτρέψει την παραγωγή GOS με αυξημένες αποδόσεις, διευκολύνοντας την αποτελεσματική και οικονομική παραγωγή πρεβιοτικών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού που μπορούν να ενσωματωθούν περαιτέρω σε συμβατικά προϊόντα για να αυξήσουν τη θρεπτική τους αξία και τη βιολειτουργικότητά τους, ως βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη διαχείριση του όξινου ορού από τις γαλακτοβιομηχανίες.

Πίνακας 6.4. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες ($y_{GOS(max)}$), χρόνος ενζυμικής αντίδρασης για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ($t_{GOS(max)}$), βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης κατά τον χρόνο επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS (h_{lac}) και βαθμός απόδοσης σε 6-γαλακτοβιόζη ($y_{gal-gal}$) για όλα τα συστήματα παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού που μελετήθηκαν.

Προέλευση λακτάσης	T (°C)	pH	c _{lac(0)} (% w/v)	A _E (U/mL)	y _{GOS(max)} (%)	t _{GOS(max)} (h)	h _{lac} (%)	y _{gal-gal} (%)			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	35	7,2	3,1	0,06	21,2 ± 1,8 ^e	3	-78,9	3,70 ± 0,01			
				0,13	23,7 ± 1,4^g	1,5	-76,0	3,72 ± 0,29			
				0,26	15,6 ± 1,2 ^b	0,75	-70,6	3,62 ± 0,17			
			10	0,06	13,0 ± 0,6 ^{abc}	4	-46,3	6,56 ± 0,11			
				0,13	14,9 ± 1,8 ^{ab}	2	-49,3	5,72 ± 0,09			
				0,26	12,4 ± 1,0 ^{abc}	1	-31,2	6,25 ± 0,17			
			14	0,06	21,3 ± 1,1 ^e	6	-68,3	6,40 ± 0,29			
				0,13	14,8 ± 1,1 ^{ab}	3	-54,0	4,61 ± 0,11			
				0,26	18,8 ± 2,3 ^f	1,5	-57,0	4,34 ± 0,01			
			18	0,06	9,11 ± 1,39 ^d	3	-37,4	7,19 ± 0,01			
				0,13	8,33 ± 1,24 ^d	4	-53,9	7,44 ± 0,34			
				0,26	11,9 ± 1,2 ^c	2	-49,8	6,63 ± 0,21			
<i>Aspergillus oryzae</i>	45	4,5	3,1	0,5	9,57 ± 1,81 ^a	3	-38,8	1,84 ± 0,01			
				1	9,59 ± 0,56 ^a	1	-29,6	1,66 ± 0,02			
				2	9,14 ± 0,53 ^a	0,75	-44,1	1,95 ± 0,02			
			10	4	7,99 ± 0,45 ^a	0,25	-43,8	1,21 ± 0,01			
				1	18,5 ± 0,4 ^{cd}	10	-38,5	5,32 ± 0,01			
				2	16,7 ± 0,7 ^c	7	-48,2	8,97 ± 0,09			
			15	4	17,7 ± 1,0 ^c	2	-40,0	6,38 ± 0,10			
				8	13,9 ± 0,7 ^b	1	-49,6	7,86 ± 0,02			
				1	17,8 ± 0,7 ^c	10	-44,7	8,25 ± 0,18			
			20	2	19,7 ± 1,1 ^{de}	8	-68,6	4,71 ± 0,10			
				4	19,8 ± 0,9 ^{de}	4	-59,9	5,97 ± 0,08			
				8	17,7 ± 0,6 ^c	1,5	-55,6	6,89 ± 0,09			
			<i>Thermothielavioides terrestris</i>	50	4,0	3,1	1	14,8 ± 2,1 ^b	10	-33,7	4,19 ± 0,06
							2	22,0 ± 0,9 ^{fg}	10	-43,4	5,60 ± 0,38
							4	20,7 ± 1,0 ^{ef}	5	-68,7	4,93 ± 0,54
						10	1	11,8 ± 0,6 ^a	4	-35,2	2,99 ± 0,06
							2	12,0 ± 0,6 ^a	2	-44,5	3,39 ± 0,05
							4	12,9 ± 0,6 ^{ab}	1	-32,4	3,03 ± 0,05
15	2	19,0 ± 1,0 ^{fgh}				9	-45,9	5,71 ± 0,29			
	4	18,4 ± 0,6 ^{efg}				5	-49,3	4,65 ± 0,04			
	8	20,2 ± 2,4 ^h				3	-49,2	5,34 ± 0,15			
20	16	15,6 ± 0,8 ^{cd}				1,5	-49,0	3,95 ± 0,06			
	2	16,7 ± 0,8 ^{de}				9	-39,9	3,86 ± 0,01			
	4	17,8 ± 1,0 ^{ef}				10	-55,1	4,16 ± 0,23			
<i>Thermotoga neapolitana</i>	90	5,5	3,1	8	23,7 ± 0,4 ⁱ	9	-65,6	6,88 ± 0,26			
				16	19,6 ± 1,5 ^{gh}	5	-63,8	5,83 ± 0,55			
				2	14,3 ± 0,7 ^{bc}	10	-20,4	2,94 ± 0,01			
				4	17,2 ± 0,6 ^{de}	10	-42,3	4,09 ± 0,16			
				8	25,7 ± 0,3^j	7	-48,8	6,07 ± 0,07			
				16	23,6 ± 0,2 ⁱ	5	-59,1	5,91 ± 0,18			
<i>Thermotoga neapolitana</i>	90	5,5	3,1	0,5	10,6 ± 0,4	8	-44,1 ± 2,9	1,01 ± 0,07			
				1	16,6 ± 0,7	8	-70,2 ± 4,2	1,62 ± 0,10			

c_{lac(0)}: αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη, A_E: ενζυμικό φορτίο

Τα διαφορετικά γράμματα στους εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (± τυπική απόκλιση) των μέγιστων βαθμών απόδοσης (y_{GOS(max)}), σύμφωνα με την δοκιμασία σύγκρισης μέσων τιμών Duncan's post hoc για επίπεδο σημαντικότητας ίσο με α = 0.05.

6.3.6. Ανάλυση της σύστασης των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού στις βέλτιστες συνθήκες

Στο Σχήμα 6.9 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα HPAEC-PAD των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae* και των δύο καινοτόμων, θερμόφιλων λακτασών από τους μικροοργανισμούς *T. terrestris* και *T. neapolitana* στον όξινο ορό γιαουρτιού, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης σε όρους θερμοκρασίας, τιμής pH, αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη, ενζυμικού φορτίου και χρόνου αντίδρασης που οδήγησαν στη μεγιστοποίηση των βαθμών απόδοσης σε GOS, όπως παρουσιάζονται με έντονους χαρακτήρες στον Πίνακα 6.4. Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στον όξινο ορό γιαουρτιού οδήγησε στην παραγωγή ενός μείγματος GOS με διαφορετική σύσταση σε σύγκριση με εκείνο που προέκυψε από την εφαρμογή των δύο οξεόφιλων λακτασών από τους μικροοργανισμούς *A. oryzae* και *T. terrestris*.

Ο κύριος ολιγοσακχαρίτης που συνετέθη και από τα δύο ένζυμα ανιχνεύθηκε, κατά μέσον όρο, στα 35,6 min έκλουσης και θεωρείται ότι πρόκειται για τον τρισακχαρίτη 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, με βάση τα ευρήματα άλλων ερευνών στο ίδιο θέμα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017). Το δεύτερο σε παραγωγικότητα προϊόν τρανσγαλακτοζυλίωσης που ανιχνεύθηκε ήταν ο δισακχαρίτης 6-γαλακτοβιόζη, ο οποίος ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπο σάκχαρο. Τέλος, ο τρίτος κύριος ολιγοσακχαρίτης στο μείγμα των GOS που προέκυψε ήταν η αλλολακτόζη, ένας δισακχαρίτης με δομικές μονάδες γαλακτόζη και γλυκόζη, ενωμένες με β-1→6 γλυκοζιδικό δεσμό. Η αλλολακτόζη φάνηκε να εκλύεται στα XX min της ανάλυσης με το σύστημα HPAEC-PAD και ταυτοποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματα από τους Urrutia et al. (2013) και Yin et al. (2017), όπως στην περίπτωση της 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης. Τα υπόλοιπα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, έως και ίχνη, επομένως δεν κρίθηκε σκόπιμο να ταυτοποιηθούν, αλλά συνυπολογίσθηκαν στον υπολογισμό της συνολικής συγκέντρωσης GOS, άρα και στον βαθμό απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων.

Το ένζυμο από τη ζύμη *K. lactis* φάνηκε ότι υδρολύει τη λακτόζη ταχύτερα και οδηγεί στην παραγωγή υψηλότερων ποσοστών αλλολακτόζης και χαμηλότερων ποσοστών 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης. Αντιθέτως, οι β-γαλακτοζιδάσες από τους μύκητες *A. oryzae* και *T. terrestris* καταλύουν την παραγωγή ενός μείγματος GOS

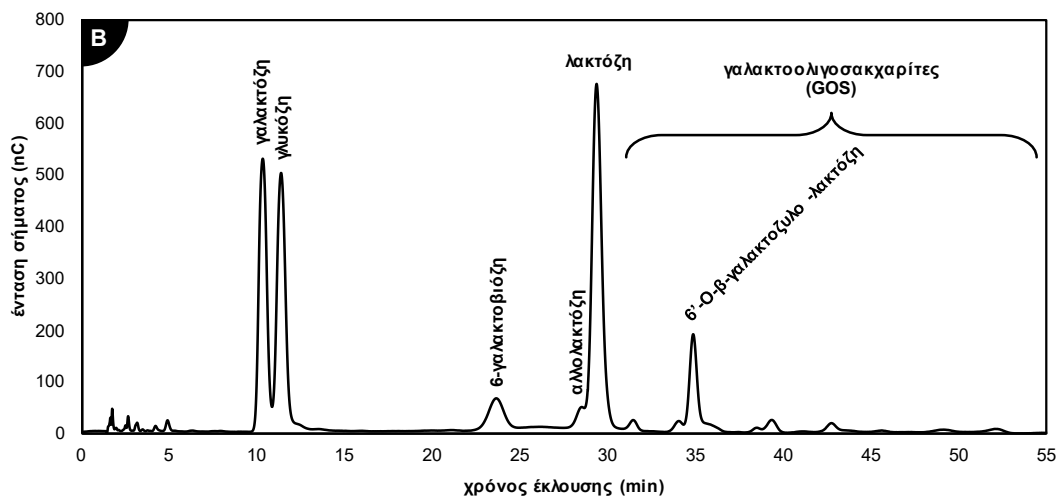
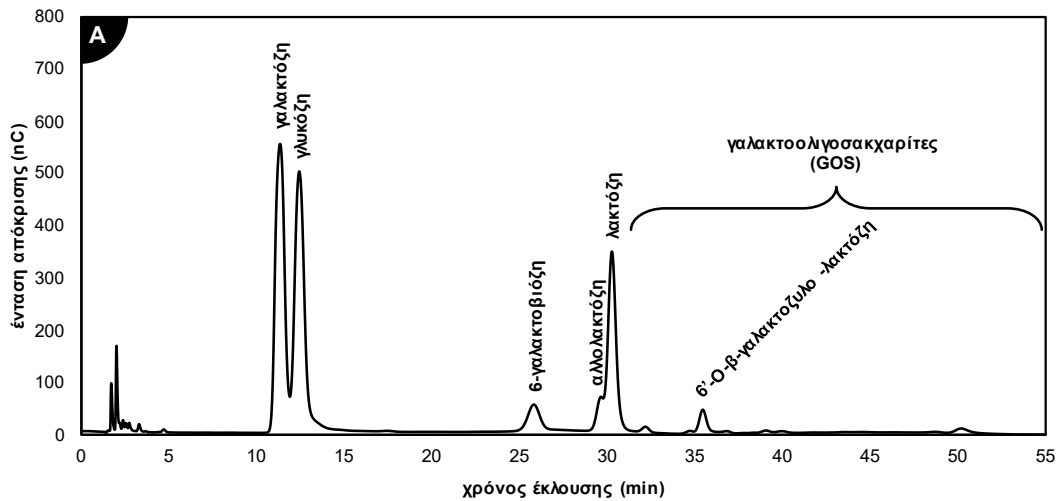
περισσότερο πλούσιο σε 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη και πιο φτωχό σε αλλολακτόζη. Συγκρίνοντας τις δύο μυκητιακές λακτάσες από τους μικροοργανισμούς *A. oryzae* και *T. terrestris*, η δεύτερη οδηγεί στην παραγωγή υψηλότερων ποσοστών 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης και χαμηλότερων ποσοστών αλλολακτόζης, σε σύγκριση με την πρώτη.

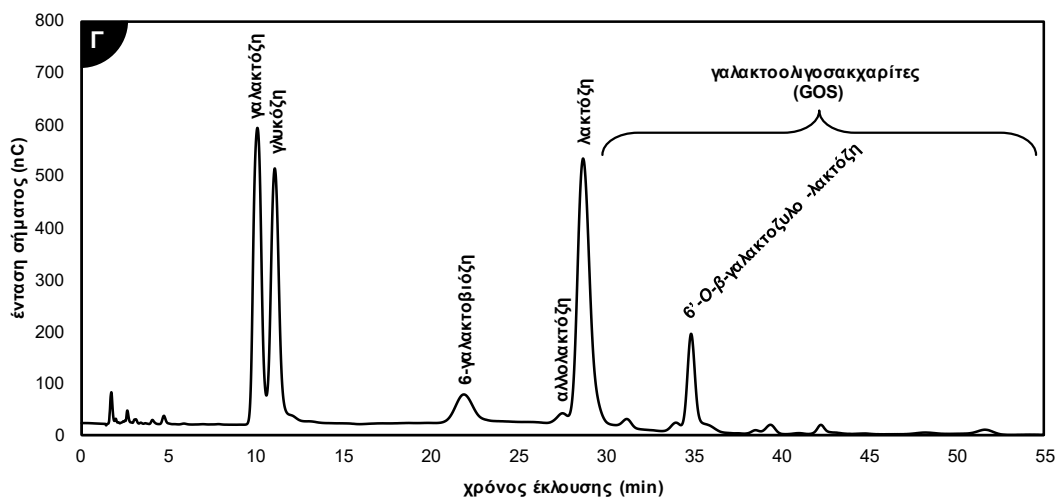
Συγκεκριμένα, η ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού σε GOS με εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στις συνθήκες που μεγιστοποίησαν τον βαθμό απόδοσης σε GOS (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 3,1 % w/v, ενζυμικό φορτίο 0,13 U/mL, χρόνος αντίδρασης 1,5 h, 35 °C, pH = 7,2) οδήγησε στην παραγωγή ενός μείγματος GOS αποτελούμενο από 7,13 % αλλολακτόζη και 31,5 % 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, στη βάση των συνολικών παραγόμενων ολιγοσακχαριτών. Τα αντίστοιχα κλάσματα στα μείγματα GOS που παρήχθησαν στις βέλτιστες συνθήκες με τον βιοκαταλύτη από τον μύκητα *A. oryzae* (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 20 % w/v, ενζυμικό φορτίο 4 U/mL, χρόνος αντίδρασης 7 h, 45 °C, pH = 4,5) ήταν 5,72 % για την αλλολακτόζη και 41,9 % για την 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, ενώ με την θερμοφιλή λακτάση από τον μύκητα *T. terrestris* (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 20 % w/v, ενζυμικό φορτίο 8 U/mL, χρόνος αντίδρασης 7 h, 50 °C, pH = 4,0) ήταν 3,97 % για την αλλολακτόζη και 45,6 % για την 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη.

Όσον αφορά στην 6-γαλακτοβιόζη, μέγιστο ποσοστό στο παραγόμενο μείγμα GOS ίσο με 19,1 % στη βάση των συνολικών ολιγοσακχαριτών μετρήθηκε στην περίπτωση εφαρμογής του ενζύμου από τον θερμοφιλό μικροοργανισμό *T. terrestris*. Τα ποσοστά 6-γαλακτοβιόζης που επιτεύχθηκαν με την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *A. oryzae* και *K. lactis* ήταν 17,0 και 13,3 %, αντίστοιχα, στις προαναφερθείσες βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης καθενός βιοκαταλύτη που οδηγούν στη μεγιστοποίηση της απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων σε GOS.

Οι Rico-Rodríguez et al. (2021) μελέτησαν την εφαρμογή των δύο β-γαλακτοσιδασών από *A. oryzae* και *K. lactis* χωριστά και ταυτόχρονα σε διαλύματα καθαρής λακτόζης και σε γλυκό ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 40 % w/w και διαπίστωσαν ότι στις αντιδράσεις με καθαρή λακτόζη οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS ίσοι με 32,7 και 41,7 % των συνολικών υδατανθράκων επιτεύχθηκαν μέσω της εφαρμογής β-γαλακτοσιδασών από *A. oryzae* και *K. lactis*, αντίστοιχα. Όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκός ορός, οι αντίστοιχοι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS ήταν 35,6 και 29,6 % των συνολικών υδατανθράκων. Επιπλέον, ανέφεραν ότι παρόλο που ο

συνδυασμός των δύο ενζύμων είχε ως αποτέλεσμα παρόμοιες αποδόσεις σε GOS με αυτές που ελήφθησαν όταν οι δύο β-γαλακτοσιδάσες μελετήθηκαν χωριστά, υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ των παραγόμενων μειγμάτων GOS, κυρίως όσον αφορά στον βαθμό πολυμερισμού τους.



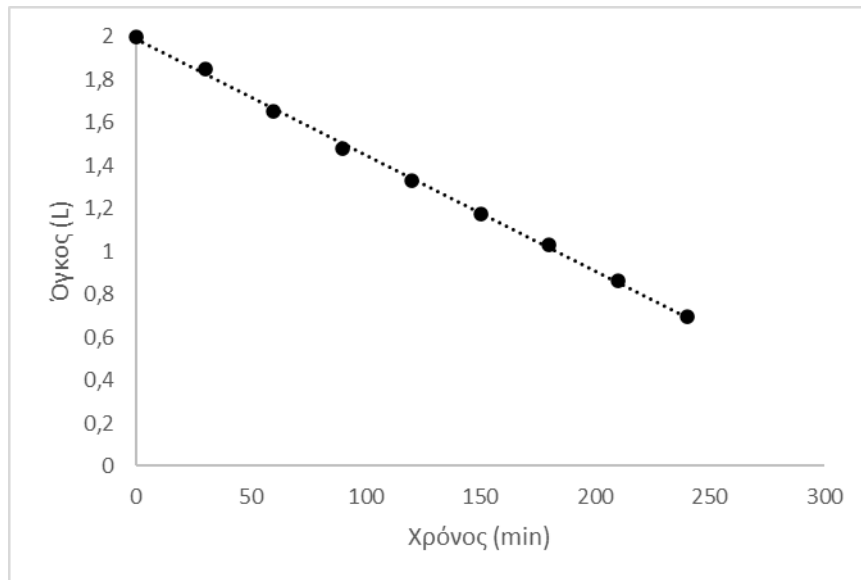


Σχήμα 6.9. Χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα HPAEC-PAD των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των β-γαλακτοζιδασών από τους μικροοργανισμούς (Α) *Kluyveromyces lactis* (αραίωση δείγματος 1:200) και (Β) *Aspergillus oryzae* (αραίωση δείγματος 1:1000) και (Γ) *Thermothielavioides terrestris* (αραίωση δείγματος 1:1000) στον όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι κορυφές της αλλολακτόζης και της 6'-Ο-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης ταυτοποιήθηκαν με βάση την μελέτη από τους Urrutia et al. (2013) που ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία για τον διαχωρισμό των γαλακτοολιγοσακχαριτών.

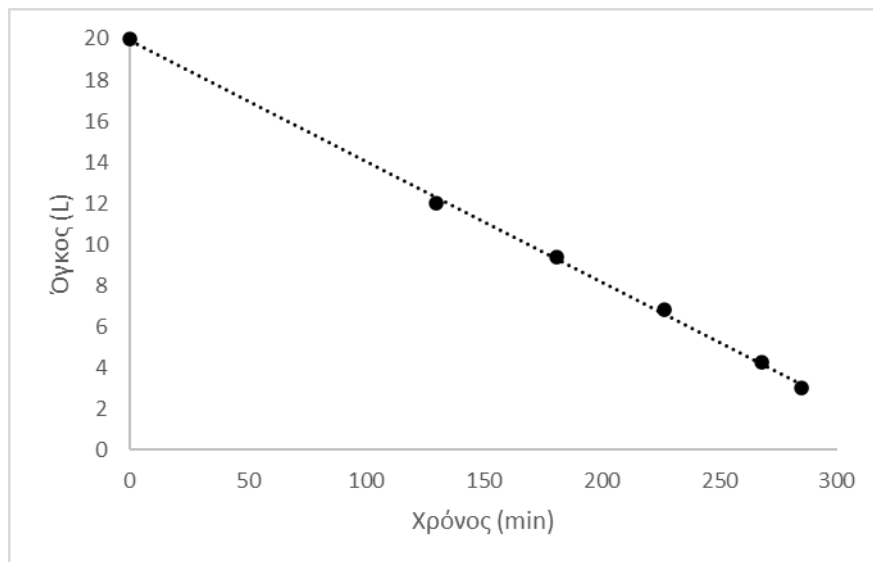
6.3.7. Κλιμάκωση της διεργασίας ενζυμικής παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό στραγγιστού γιαουρτιού

6.3.7.1. 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 h. 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 συναρτήσε του χρόνου συμπύκνωσης για τις δύο περιπτώσεις παρουσιάζεται στα Σχήμα 6.10 και Σχήμα 6.11.



Σχήμα 6.10. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα εργαστηριακής κλίμακας.

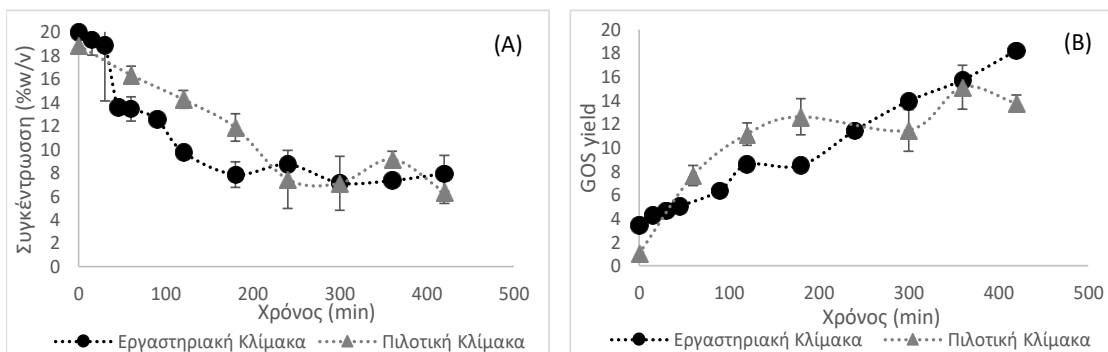


Σχήμα 6.11. Μεταβολή του όγκου του υπό συμπύκνωση όξινου ορού γιαουρτιού με τον χρόνο για συμπυκνωτήρα πιλοτικής κλίμακας.

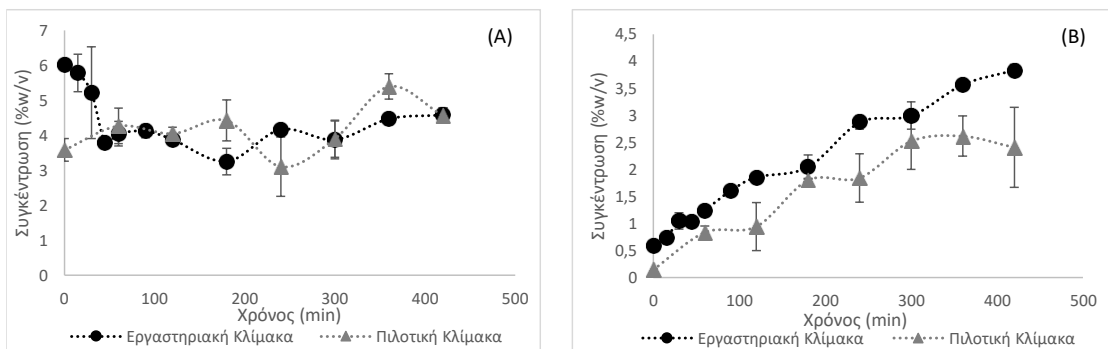
Με βάση το Σχήμα 6.11 υπολογίστηκε ότι ο ρυθμός συμπύκνωσης του όξινου ορού γιαουρτιού στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας είναι 2,94 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού. Η τιμή του μέσου ρυθμού συμπύκνωσης στην πιλοτική κλίμακα είναι 46 % χαμηλότερη συγκριτικά με την εργαστηριακή κλίμακα, όπου ο μέσος ρυθμός συμπύκνωσης ήταν 5,41 mL/min ανά L μη συμπυκνωμένου ορού.

6.3.7.2. 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 Σχήμα 6.12 και Σχήμα 6.13.



Σχήμα 6.12. Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης (A) και της απόδοσης μετατροπής σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (B) με τον χρόνο υπό την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε αρχικό όγκο διαλύματος 40 mL και 3 L.



Σχήμα 6.13. 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.

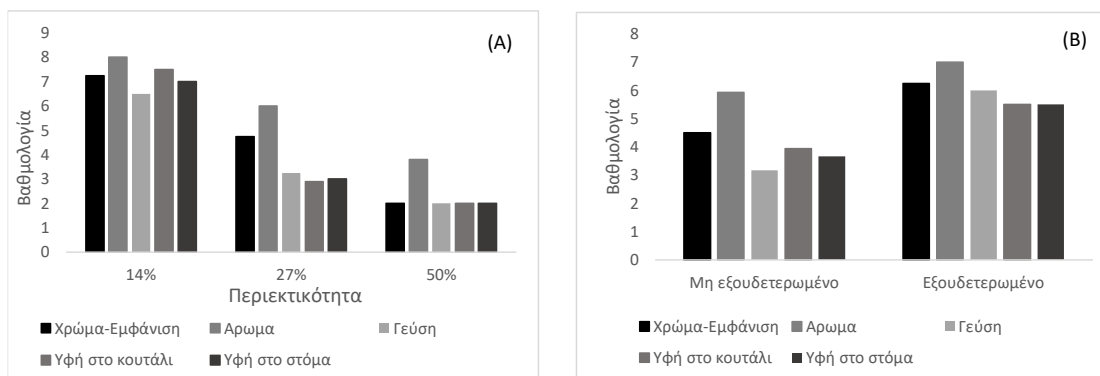
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η απόδοση μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζει μείωση κατά 25 %. Συγκεκριμένα, η απόδοση μετατροπής στην περίπτωση της πιλοτικής κλίμακας είναι 13,7 %, ενώ στην εργαστηριακή κλίμακα 18,2 % μετά από 6 ώρες αντίδρασης. Σε σχέση με τη κατανάλωση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

6.3.8. 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 γεύσης 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

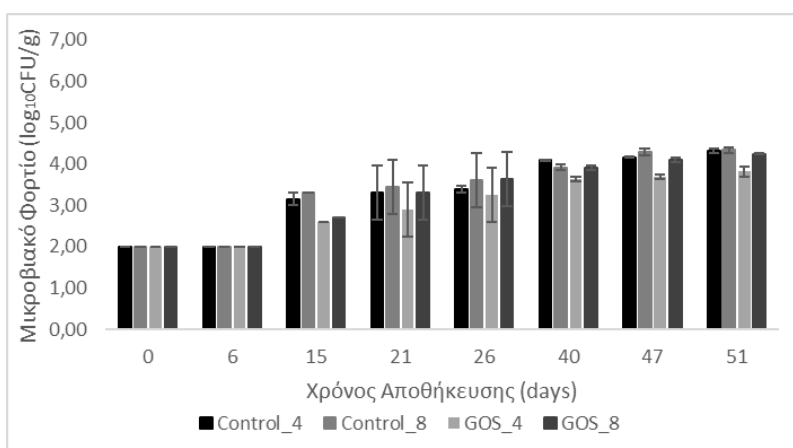
χαρακτηριστικά του προϊόντος και κυρίως στη γεύση των δειγμάτων διότι περιορίζει την όξινη γεύση το διαλύματος.



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

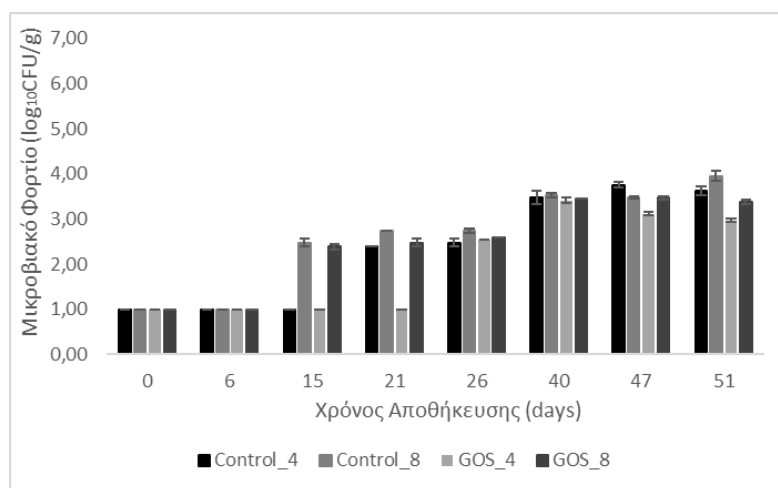
6.3.8.1. Αποτελέσματα Μικροβιολογικής Ανάλυσης

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 ($2 \log_{10}CFU/g$). Η τιμή του φορτίου στην περίπτωση των κρεμών αναφοράς ήταν 3,15 και 3,30 $\log_{10}CFU/g$ στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 και 8 °C αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων με GOS, 2,60 και 2,70 αντίστοιχα.



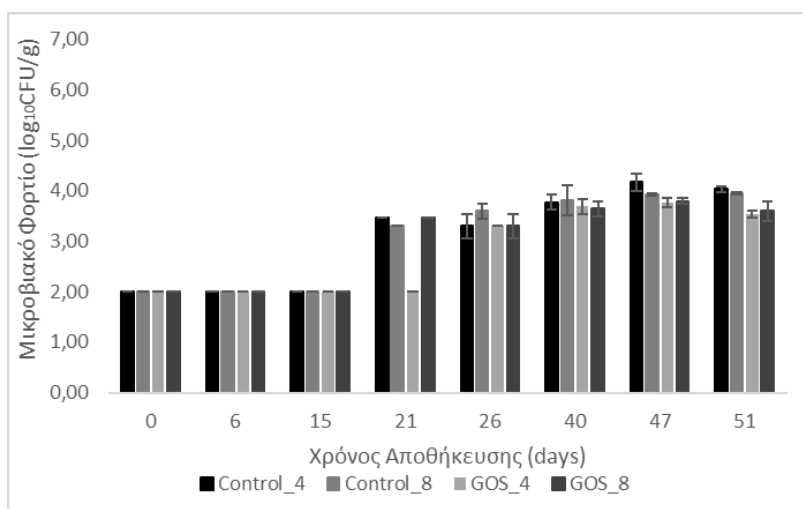
Διάγραμμα 5.24. Μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας εκφρασμένης ως $\log_{10}CFU/g$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

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 log₁₀CFU/g στις κρέμες αναφοράς και την 26^η ημέρα αποθήκευσης με μικροβιακό φορτίο 2,54 log₁₀CFU/g στις κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες.



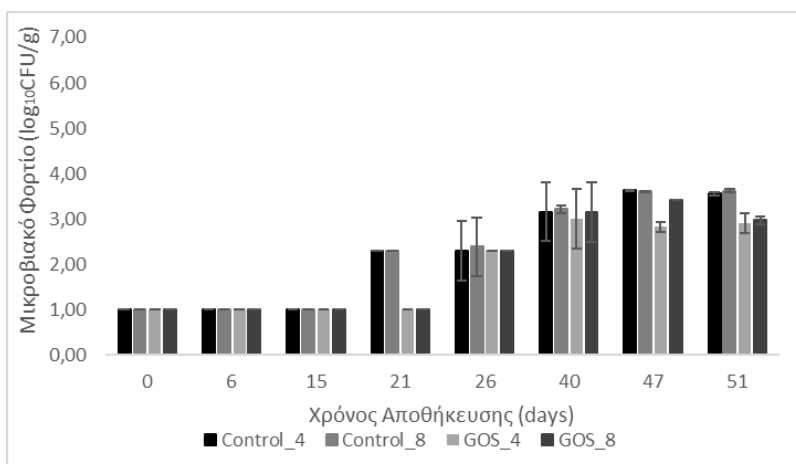
Διάγραμμα 5.25. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων εκφρασμένων ως log₁₀CFU/g με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

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 log₁₀CFU/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 ανάπτυξης 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 $\log_{10}CFU/g$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

Σε σχέση με τα εντεροβακτήρια, το μικροβιακό τους φορτίο παραμένει χαμηλότερο από το όριο ανίχνευσης ($1 \log_{10}CFU/g$) 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.

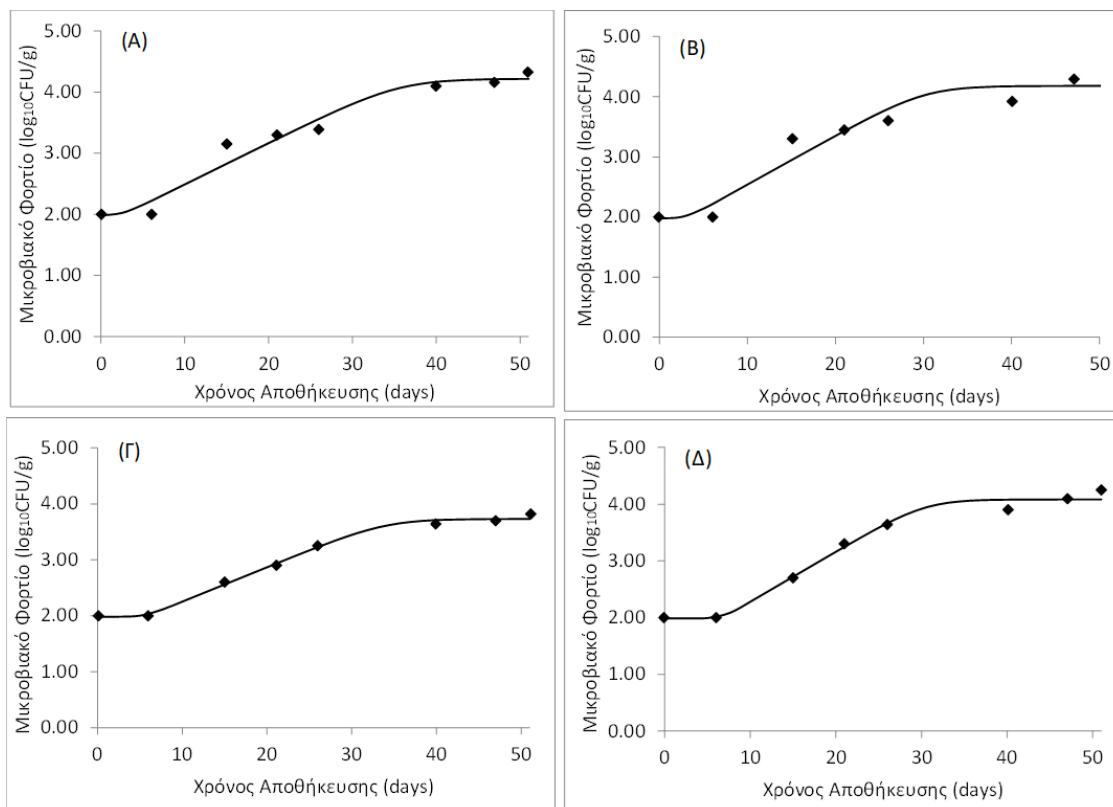


Διάγραμμα 5.27. Μεταβολή του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων εκφρασμένων ως $\log_{10}\text{CFU/g}$ με τον χρόνο αποθήκευσης για όλα τα δείγματα

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 $7 \log_{10}\text{CFU/g}$. 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ξεπερνούν το όριο αλλοίωσης έως και 15 ημέρες νωρίτερα.

Πίνακας 5.3. Τιμές των υπολογισμένων μεγεθών μικροβιακής ανάπτυξης από το μοντέλο Bayanyi & 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

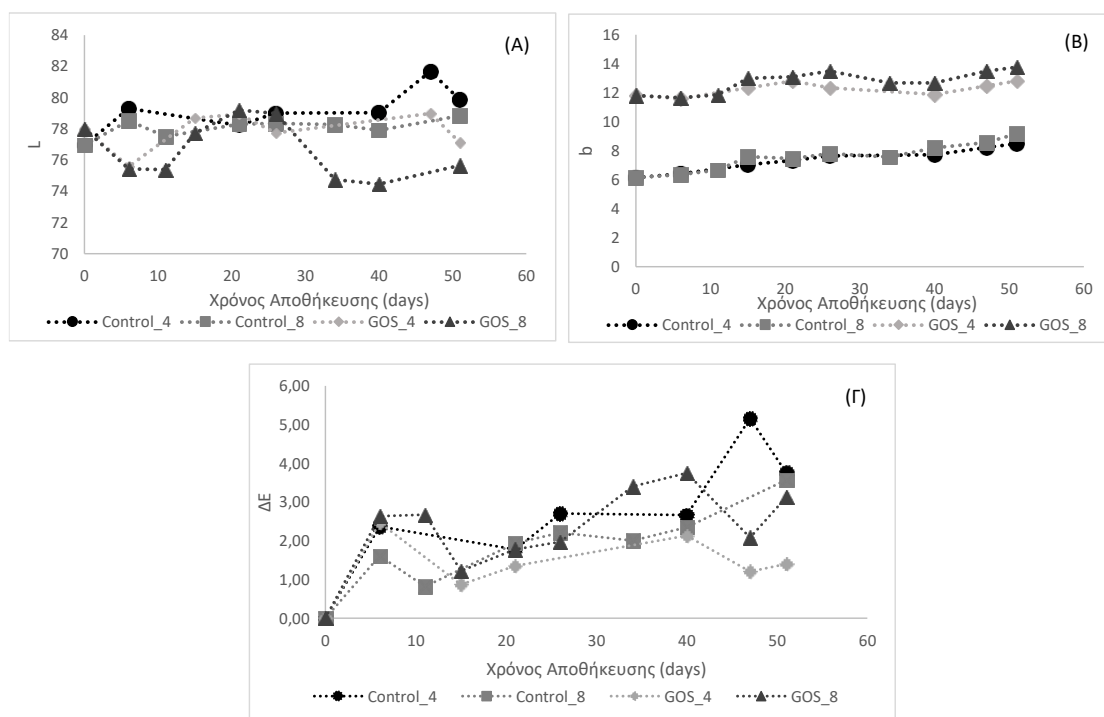


Διάγραμμα 5.28. Μεταβολή του μικροβιακού φορτίου με το χρόνο αποθήκευσης σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα και το μοντέλο Baranyi & Roberts για το Control 4 (A), Control 8 (B), GOS 4 (Γ), GOS 8 (Δ)

6.3.8.2. 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 CIELab. Η μεταβολή του μέτρου ΔE 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 ΔE 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 ΔE 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 αποθηκευτήκαν 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 ($p>0,05$).

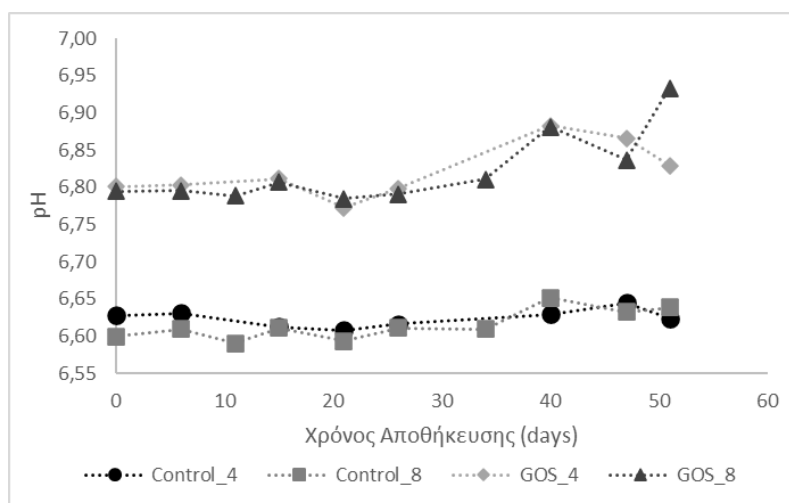


Διάγραμμα 5.29. Μεταβολή των παραμέτρων L (Α), b (Β) και του μέτρου ΔΕ (Γ) με τον χρόνο για όλα τα δείγματα.

6.3.8.3. Μεταβολή μετρούμενης (pH) και τιτλοδοτούμενης οξύτητας

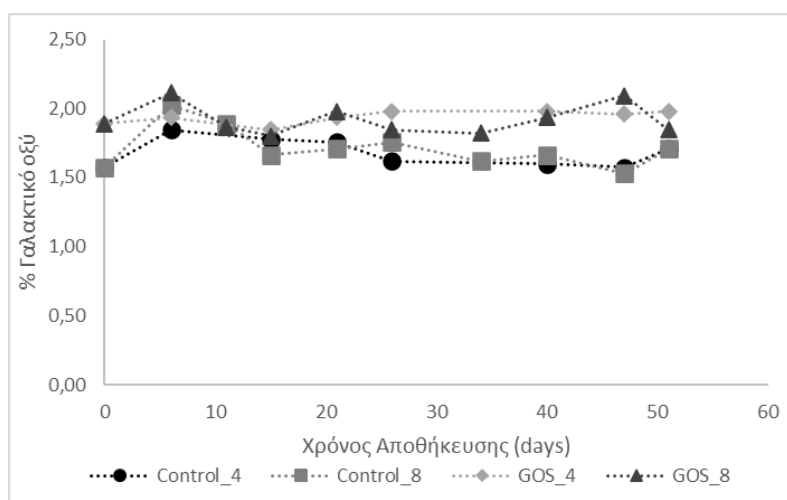
Η μεταβολή του pH των δειγμάτων παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.30. Η αρχική τιμή των δειγμάτων αναφοράς είναι κατά 0,2 μονάδες χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη των δειγμάτων με σιρόπι GOS. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στη διεργασία της εξουδετέρωσης που πραγματοποιήθηκε στο σιρόπι GOS και την παρουσία της διπτανθρακικής 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).

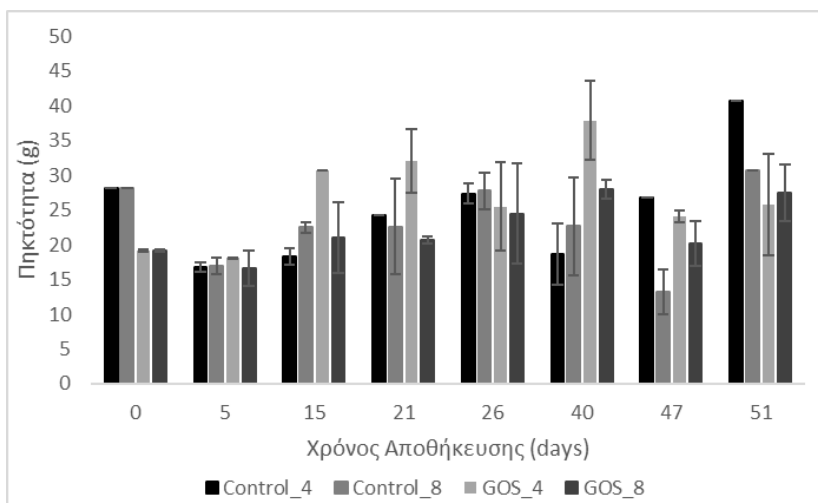
6.3.8.4. Ανάλυση Υφής

Οι κρέμες που παράχθηκαν αξιολογήθηκαν ως προς την αντικειμενική τους υφή και υπολογίστηκαν τα μεγέθη πηκτότητα, προσκολλησιμότητα, κομμιώδες 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.

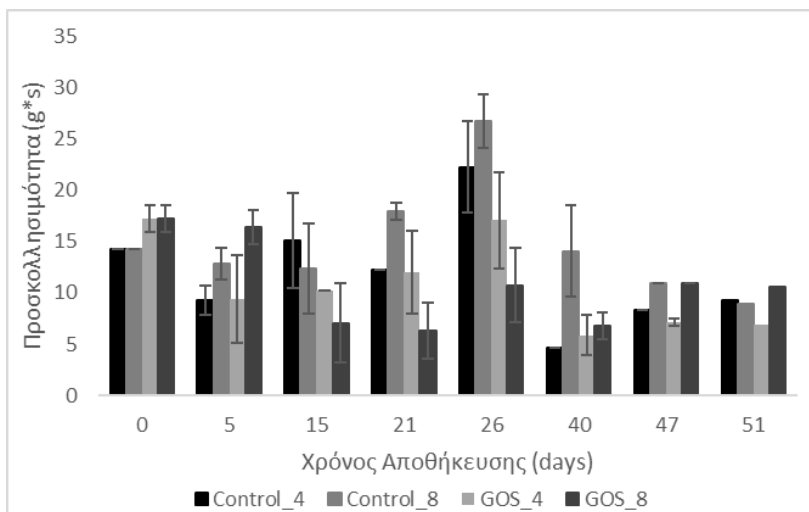
Η πηκτότητα των δειγμάτων αναφοράς ήταν μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή σε σχέση με την πηκτότητα των δειγμάτων με GOS (μέσες τιμές: 39,34 και 19,18 g για τα δείγματα χωρίς GOS και με GOS αντίστοιχα). Η παρουσία του σιροπιού επηρεάζει την πηκτικότητα των δειγμάτων, καθώς η δύναμη του εμβόλου που μετράται είναι μικρότερη και επομένως τα δείγματα λιγότερο σκληρά. Με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, η τιμή της πηκτότητας 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 πηκτότητας σε όλο το διάστημα αποθήκευσης. Η θερμοκρασία αποθήκευσης δεν επηρεάζει την πηκτότητα των δειγμάτων, αφού οι μεταβολές που υφίστανται τα δείγματα είναι παρόμοιες ανεξαρτήτου θερμοκρασίας αποθήκευσης.



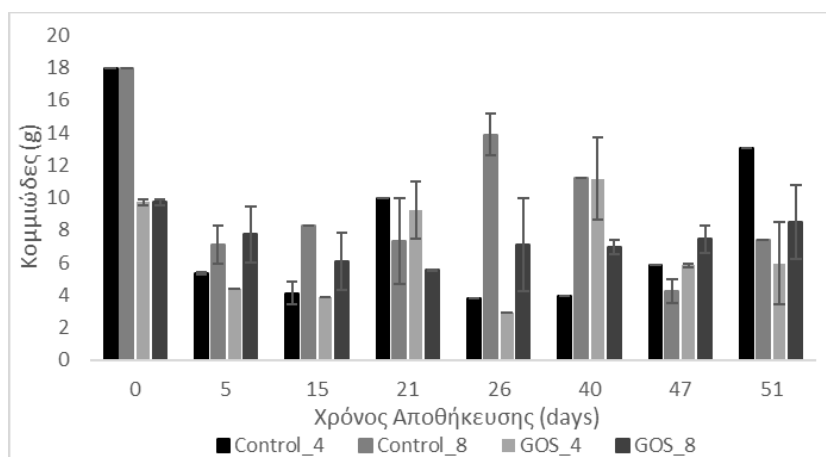
Διάγραμμα 5.34. Μεταβολή της πηκτότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης.

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 ($p>0,05$).



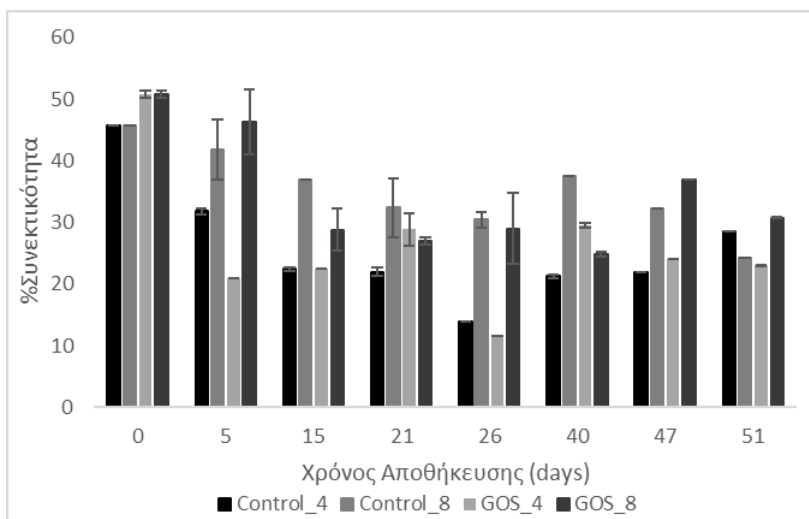
Διάγραμμα 5.35. Μεταβολή της προσκολλησιμότητας των δειγμάτων με τον χρόνο αποθήκευσης

Το κομμιώδες 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 κομμιώδες 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 τιμής του κομμιώδους. 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 γαλακτοολιγοσαχαρίτες παρουσίασαν σταθερότητα στη τιμή του κομμιώδους 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 κομμιώδες των δειγμάτων, καθώς η συμπεριφορά σε όλα τα δείγματα ήταν αντίστοιχη ανεξαρτήτως θερμοκρασίας αποθήκευσης ($p>0,05$).



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

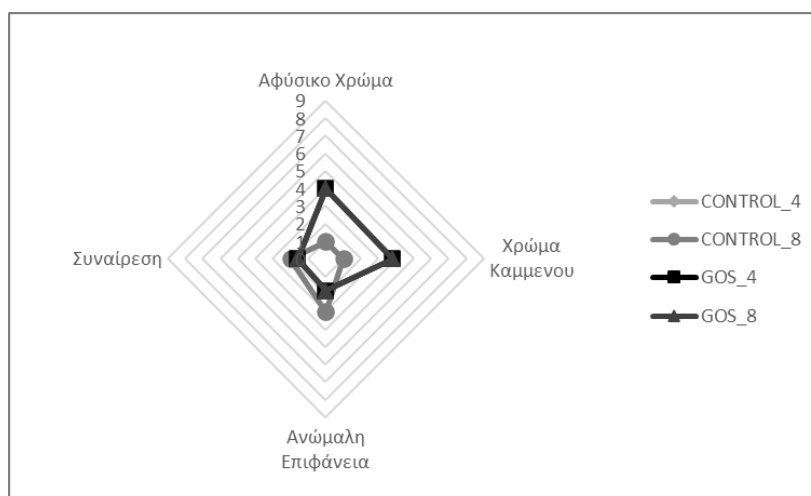
Αναφορικά με την παράμετρο της συνεκτικότητας των δειγμάτων, παρατηρήθηκε ότι η τιμή όλων των δειγμάτων παρουσιάζει μείωση με τον χρόνο αποθήκευσης. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν στατιστικά μη σημαντική. Η τιμή αυτή την 47^η ημέρα αποθήκευσης ήταν μειωμένη κατά 32 % σε σχέση 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

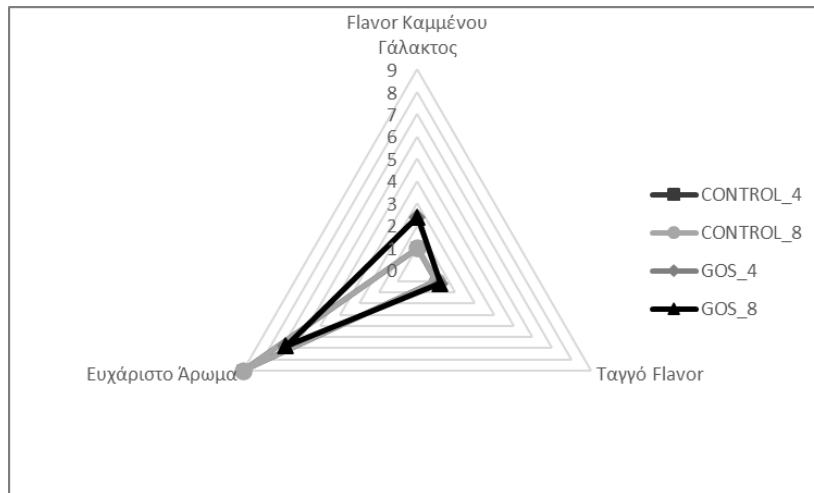
6.3.8.5. Αποτελέσματα Οργανοληπτικής Αξιολόγησης

Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών αξιολογήσεων των κρεμών παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.38-5.47. Τα χαρακτηριστικά που τέθηκαν προς αξιολόγηση κατατάχθηκαν σε 5 γενικές κατηγορίες. Χρώμα-Εμφάνιση, Άρωμα, Γεύση, Υφή στο κουτάλι, Υφή στο στόμα.



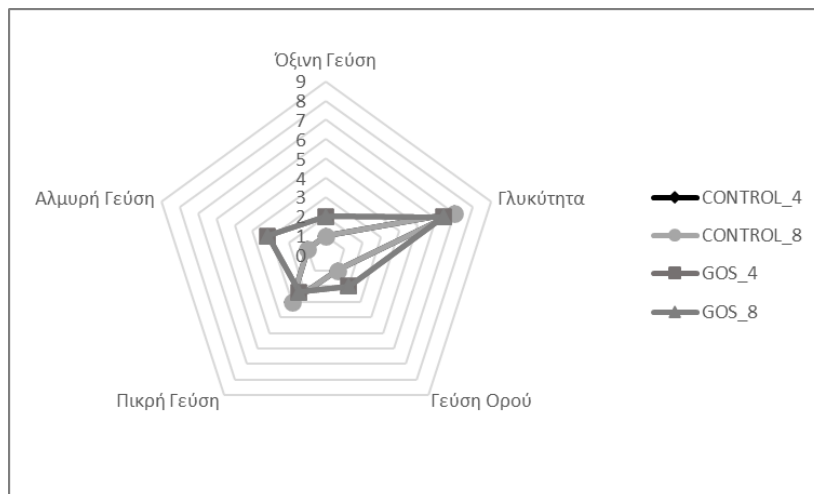
Διάγραμμα 5.38. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 24 h μετά την παραγωγή τους

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 κλασσικές κρέμες βανίλιας. Η κίτρινη απόχρωση παράλληλα οδήγησε στην υψηλότερη βαθμολογία των δειγμάτων με GOS αναφορικά με την όψη καμένου.



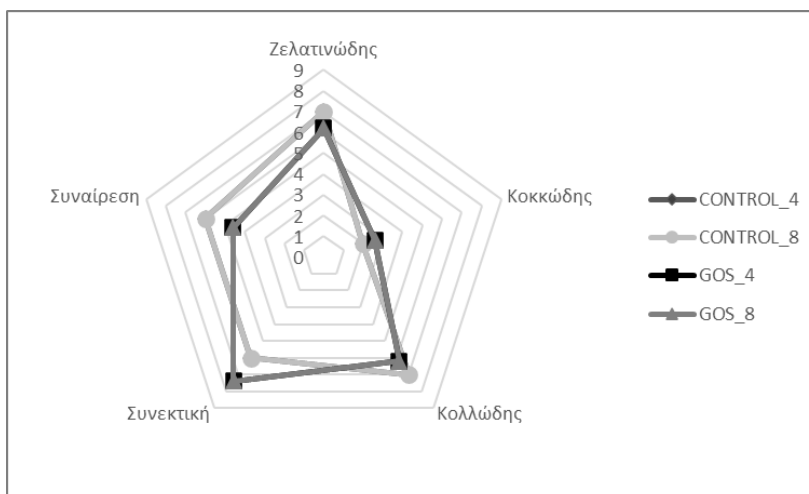
Διάγραμμα 5.39. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Άρωμα 24 h μετά την παραγωγή τους

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 καμμένου γάλακτος και ταγγό, ενώ το ευχάριστο άρωμα ήταν περίπου δύο μονάδες χαμηλότερο.



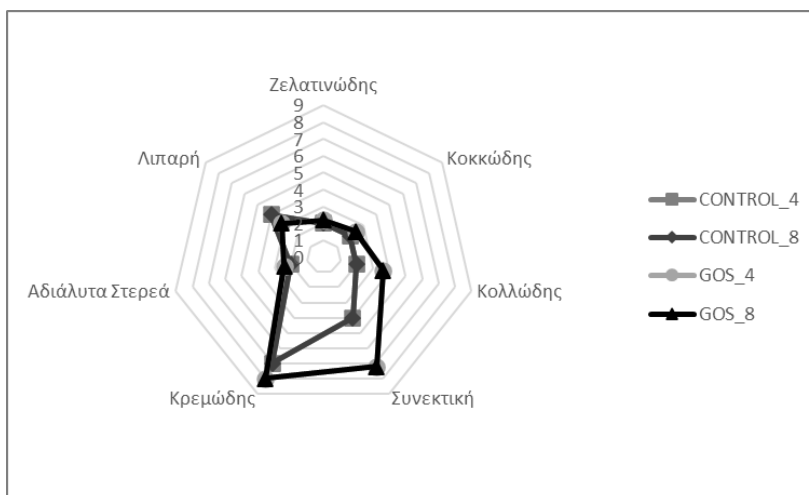
Διάγραμμα 5.40. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Γεύση 24 h μετά την παραγωγή τους

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.

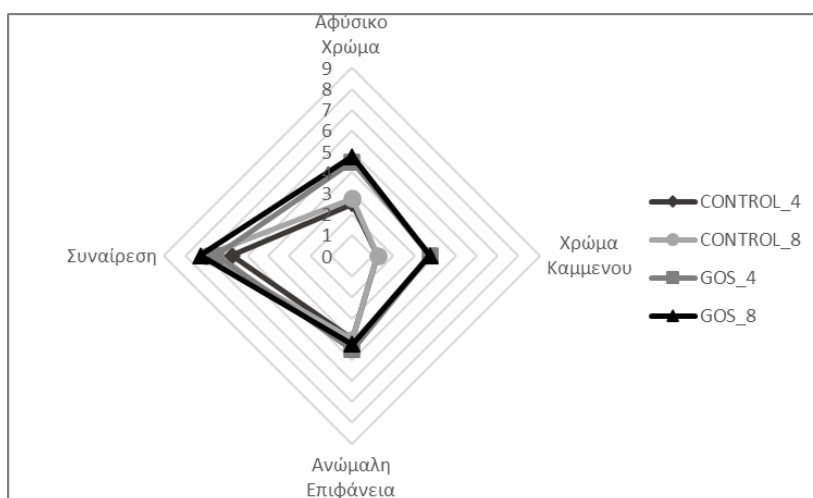


Διάγραμμα 5.42. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Υφή στο στόμα 24 h μετά την παραγωγή τους

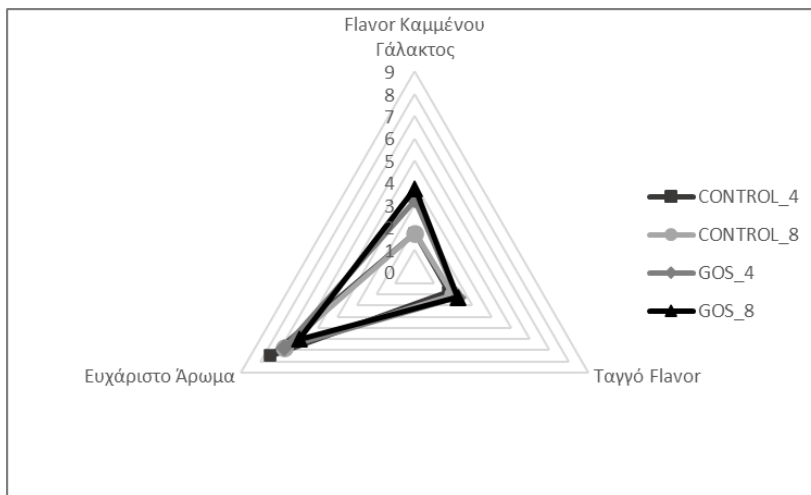
Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν σχετικά με την υφή τους στο στόμα και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική υπεροχή των δειγμάτων με GOS στα χαρακτηριστικά συνεκτικότητα, κολλώδης και κρεμώδης υφή. Συγχρόνως, η κρέμα αναφοράς συγκριτικά με τα δείγματα με GOS ήταν πιο λιπαρή, ενώ η ζελατινώδης και η κοκκώδης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

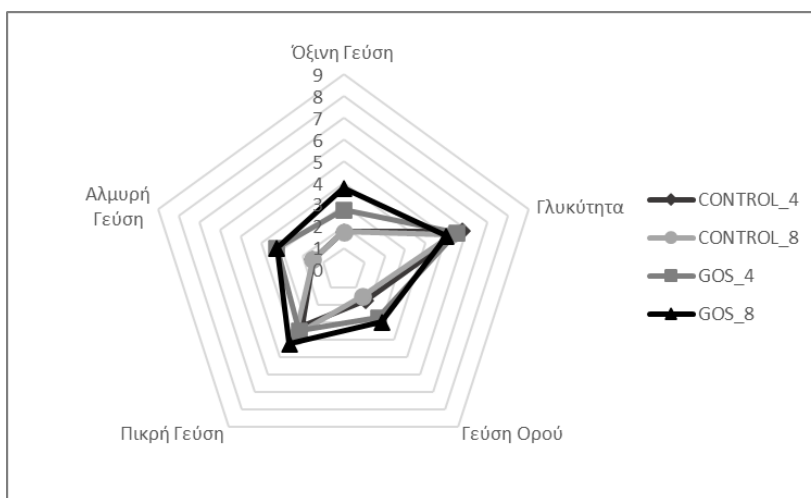
Τα δείγματα που περιείχαν γαλακτοολιγοσακχαρίτες δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια των 40 ημερών αποθήκευσης. Εξαιρέση αποτελούν τα χαρακτηριστικά της ζελατινώδους και κοκκώδους υφής στο κουτάλι των δοκιμαστών, όπου παρατηρήθηκε μείωση και αύξηση αντίστοιχα. 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.



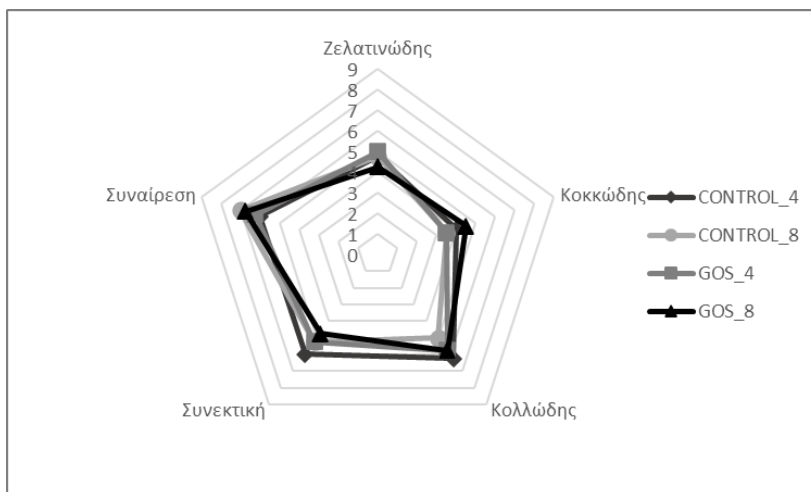
Διάγραμμα 5.43. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Χρώμα-Εμφάνιση 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



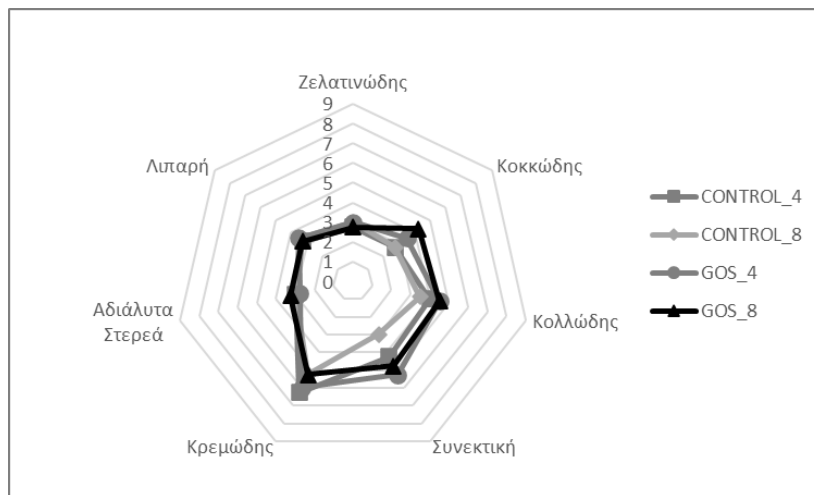
Διάγραμμα 5.44. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής δοκιμής των δειγμάτων για την κατηγορία Αρωμα 40 ημέρες μετά την παραγωγή τους



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

6.3.8.6. Σχέση αντικειμενικών μετρήσεων και οργανοληπτικής αξιολόγησης

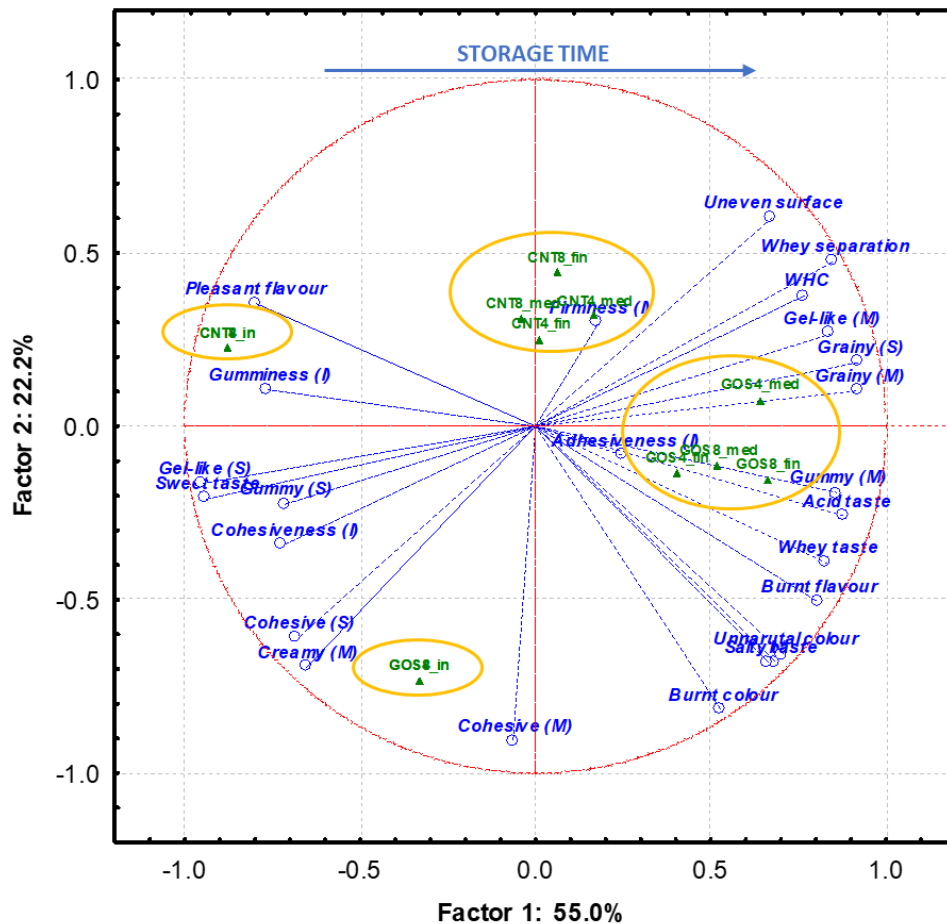
Προκειμένου να αναγνωρισθούν οι συσχετίσεις μεταξύ των αντικειμενικών μετρήσεων των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων προϊόντων με τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, τα δεδομένα από τις αντικειμενικές μετρήσεις και τα αντίστοιχα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κύριων 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 flavonο, 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 κομμιώδες, τη συνεκτικότητα, τη ζελατινώδη, κολλώδη και συνεκτική υφή στο κουτάλι. Από την άλλη πλευρά, η δεύτερη κύρια 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 κομμιώδες σχετίζονται αρνητικά με την κολλώδη υφή στο στόμα, την προσκολλησιμότητα, το φλανουρ 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 κομμιώδες. 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

6.3.9. Μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση κύκλου ζωής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού

Η μελέτη LCA πραγματοποιείται σύμφωνα με τις συστάσεις της σειράς ISO 14040 (14040:2006 και 14044: 2006). Η εκτίμηση επιπτώσεων πραγματοποιείται με τη χρήση του ReCiPe 2016 (H) και των κατηγοριών επιπτώσεων μέσου σημείου με επίκεντρο τα περιβαλλοντικά προβλήματα. Το λογισμικό που χρησιμοποιείται σε αυτή τη μελέτη είναι το GABI ts (v8.7.0.18).

6.3.9.1. Προσδιορισμός σκοπού και αντικειμένου μελέτης

Ο στόχος αυτής της μελέτης ΑΚΖ είναι ο προσδιορισμός των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκύπτουν από την αξιοποίηση του ΟΟΓ που παράγεται ως παραπροϊόν της βιομηχανίας στραγγιστού γιαουρτιού προς παραγωγή συστατικών υψηλής διατροφικής αξίας, και συγκεκριμένα συμπυκνώματος και σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS), και η σύγκρισή τους με τη συμβατική γραμμή διαχείρισης του ΟΟΓ.

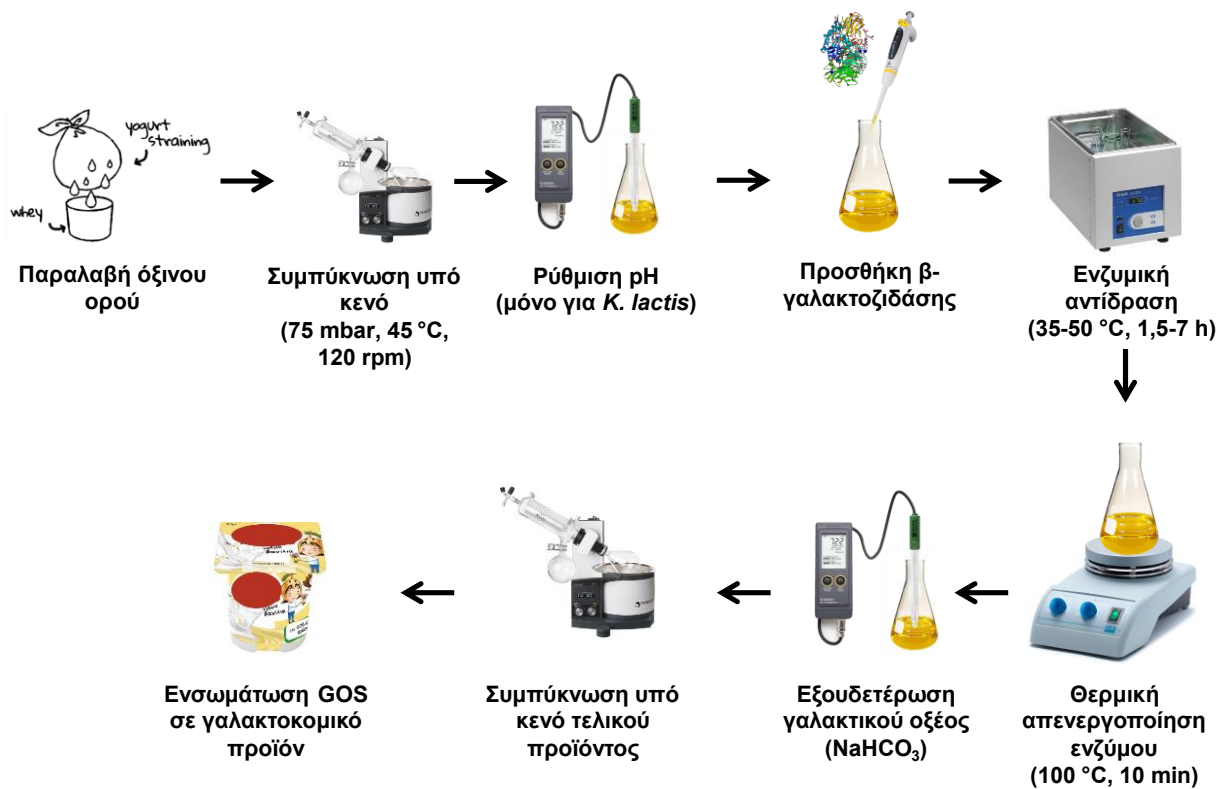
6.3.9.1.1. Σύστημα προϊόντων

Τα καινοτόμα προϊόντα που αναπτύχθηκαν αξιοποιώντας τα ρεύματα ΟΟΓ είναι το συμπύκνωμα (σιρόπι) γαλακτοολιγοσακχαριτών και η σκόνη γαλακτοολιγοσακχαριτών. Τα συστήματα παραγωγής των δύο αυτών προϊόντων περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

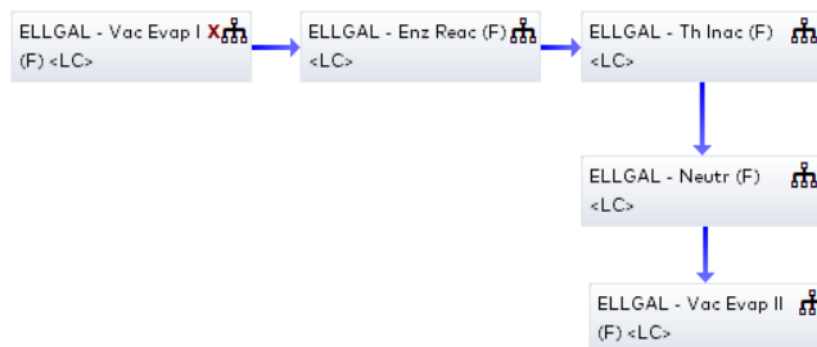
Το σύστημα προϊόντων για την παραγωγή συμπυκνώματος (σιροπιού) ολιγοσακχαριτών από τον ΟΟΓ που λαμβάνει χώρα στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου περιλαμβάνει:

- τη συμπύκνωση υπό κενό του ΟΟΓ για την απομάκρυνση ποσοτήτων νερού που περιλαμβάνονται
- τη ρύθμιση του pH με καυστικό νάτριο μόνο σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί στο επόμενο βήμα εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*, ενώ σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae* ή καινοτόμος β-γαλακτοζιδάση από *Thermothielavioides terrestris*, η ρύθμιση pH δεν απαιτείται
- την προσθήκη του βιοκαταλύτη (β-γαλακτοζιδάση)
- την ενζυμική αντίδραση σε λουτρό με θερμοκρασία 35-50 °C
- τη θέρμανση στους 100 °C για τη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου
- την εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος με προσθήκη διττανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) και
- την περαιτέρω συμπύκνωση για την παραγωγή του σιροπιού.

Το διάγραμμα ροής της διεργασίας και οι ροές GABI της παραγωγής του συμπυκνώματος από ΟΟΓ φαίνονται στο Σχήμα 6.14 και στο Σχήμα 6.15, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.14. Διάγραμμα ροής της διεργασίας παραγωγής σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.



Σχήμα 6.15. Ροές GABI της διεργασίας παραγωγής σιροπιού γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.

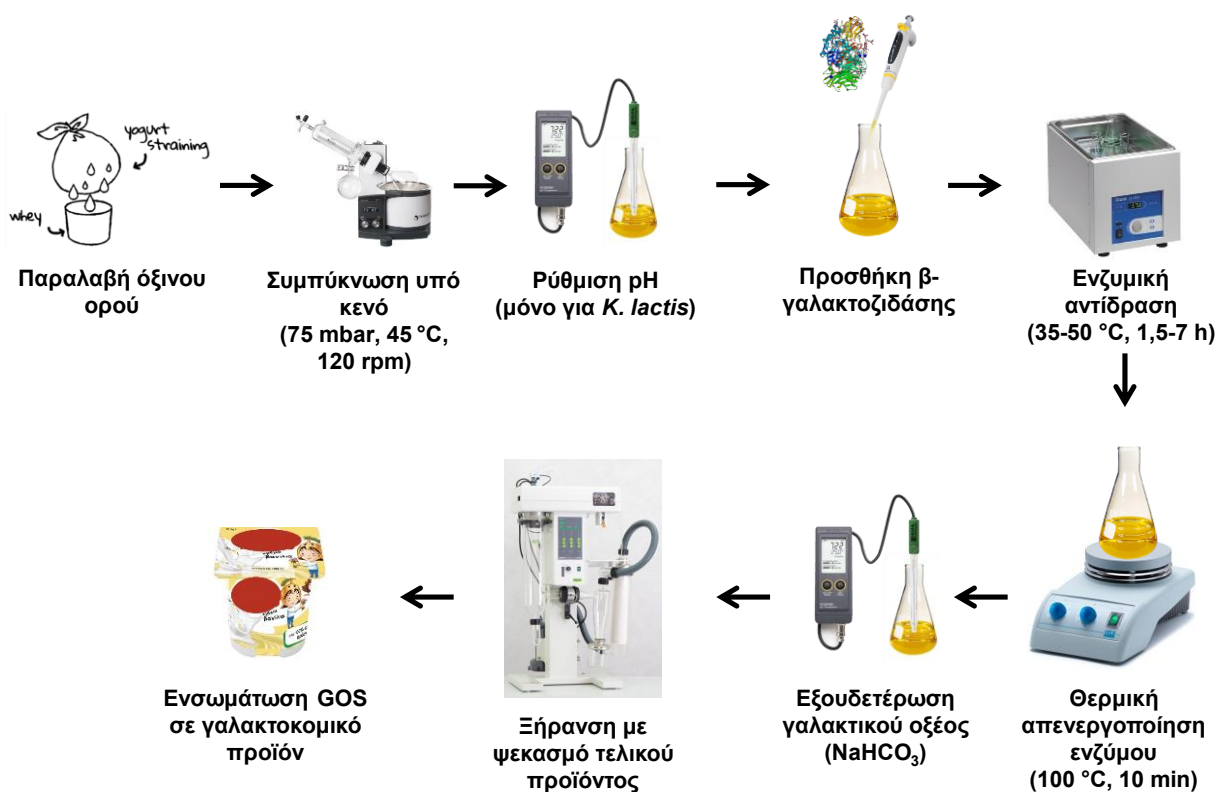
Το σύστημα προϊόντων για την παραγωγή σκόνης ολιγοσακχαριτών από τον ΟΟΓ που λαμβάνει χώρα στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου περιλαμβάνει:

- τη συμπύκνωση υπό κενό του ΟΟΓ για την απομάκρυνση ποσοτήτων νερού που περιλαμβάνονται,
- τη ρύθμιση του pH με καυστικό νάτριο μόνο σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί στο επόμενο βήμα εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*, ενώ σε

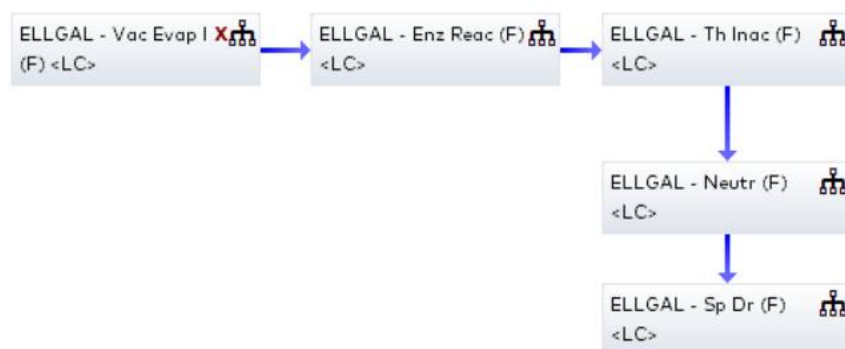
περίπτωση που χρησιμοποιηθεί εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae* ή καινοτόμος β-γαλακτοζιδάση από *Thermothielavioides terrestris*, η ρύθμιση pH δεν απαιτείται

- την προσθήκη του βιοκαταλύτη (β-γαλακτοζιδάση)
- την ενζυμική αντίδραση σε λουτρό με θερμοκρασία 35-50 °C
- τη θέρμανση στους 100 °C για τη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου
- την εξουδετέρωση του γαλακτικού οξέος με προσθήκη διττανθρακικού νατρίου
- την ξήρανση με ψεκασμό για την ανάπτυξη της σκόνης

Το διάγραμμα ροής της διεργασίας και οι ροές GABI της παραγωγής της σκόνης από ΟΟΓ, η οποία θα ενσωματωθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα, φαίνονται στο Σχήμα 6.16 και Σχήμα 6.17, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.16. Διάγραμμα ροής της διεργασίας παραγωγής σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών από οξίνο ορό γιαουρτιού.



Σχήμα 6.17. Ροές GABI της διεργασίας παραγωγής σκόνης γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού.

Η συμβατική μέθοδος αξιοποίησης του παραγόμενου ΟΟΓ στις εγκαταστάσεις μιας γαλακτοβιομηχανίας είναι η παρακάτω. Τα απόνερα από το πλύσιμο του μηχανολογικού εξοπλισμού καθώς και τα αστικά λύματα του προσωπικού, συλλέγονται στο υφιστάμενο αντλιοστάσιο και οδηγούνται στο σύστημα εσχάρωσης, το οποίο αποτελείται από μηχανική εσχάρα και χρησιμοποιείται για την αφαίρεση μεγάλων στερεών σωματιδίων - υπολειμμάτων. Τα διαχωρισμένα στερεά – συνήθως χαρτιά και ξύλα- αποθηκεύονται σε ένα μεταφερόμενο κάδο προς απόρριψη με τα ανακυκλώσιμα υλικά της μονάδας. Το μη επεξεργασμένο υγρό ρεύμα οδηγείται στη δεξαμενή εξισορρόπησης-οξεοποίησης.

Η δεξαμενή είναι μεταλλική, κλειστού τύπου και εξασφαλίζει την αρχική εξισορρόπηση της ροής και την ομογενοποίηση του προς επεξεργασία ρεύματος. Ουσιαστικά, η δεξαμενή εξισορρόπησης λειτουργεί ως απόσβεση των διακυμάνσεων της ροής που βοηθά στην επίτευξη μιας σταθερής ροής.

Στη συνέχεια, το υγρό ρεύμα οδηγείται στη μονάδα επίπλευσης διαλυμένου αέρα (DAF). Η επίπλευση είναι μια λειτουργία που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό στερεών ή υγρών σωματιδίων (ιδιαίτερα των ελαφρών κλασμάτων όπως λίπη και έλαια) από την υγρή φάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την εισαγωγή μικρών αέριων φυσαλίδων (αέρας), στην υγρή φάση. Η επιπλέουσα ύλη απομακρύνεται προς τη δεξαμενή αποθήκευσης ιλύος και μεταφέρεται κατόπιν στη δεξαμενή προετοιμασίας προς αναερόβια χώνευση.

Τα λύματα από τη δεξαμενή DAF υπερχειλίζουν σε δεύτερη δεξαμενή εξισορρόπησης όπου λαμβάνει χώρα η ανάμειξη με το διηθημένο τυρόγαλο (λακτόζη) και συνεχίζεται η διεργασία της οξεοποίησης. Πριν την είσοδο του ρεύματος στον αντιδραστήρα, το λύμα οδηγείται μέσω εναλλάκτη θερμότητας σε δεξαμενή όπου

προετοιμάζεται με δοσολογία χημικών και αύξηση θερμοκρασίας. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό για τον έλεγχο της ανακυκλοφορίας του αντιδραστήρα ECSB. Στη δεξαμενή έχει εγκατασταθεί σύστημα δοσομέτρησης NaOH (προς διόρθωση του pH), FeCl₃ (προς βελτίωση της κοκκοποίησης) καθώς και σύστημα δοσομέτρησης αντιαφριστικού.

Μετά την προετοιμασία, τα λύματα εισέρχονται στον αντιδραστήρα ECSB από τον πυθμένα του με τη βοήθεια ενός δικτύου διανομής (IDS), διαπερνούν ένα πυκνό αναερόβιο κοκκώδες στρώμα βιομάζας όπου και πραγματοποιείται η διαδικασία της βιομετατροπής και εξέρχονται από την επιφάνειά του. Τα αναερόβια επεξεργασμένα απόβλητα και το ρεύμα ανακυκλοφορίας επιστρέφουν στη δεξαμενή εξουδετέρωσης.

Η έξοδος του ECSB διασταυρώνεται με την είσοδο στον εναλλάκτη θερμότητας προς ανάκτηση τμήματος της υψηλής θερμοκρασίας (άνω των 30 °C) του ρεύματος. Το εκρέον υγρό ρεύμα από τον αντιδραστήρα ECSB εισάγεται στο αερόβιο σύστημα.

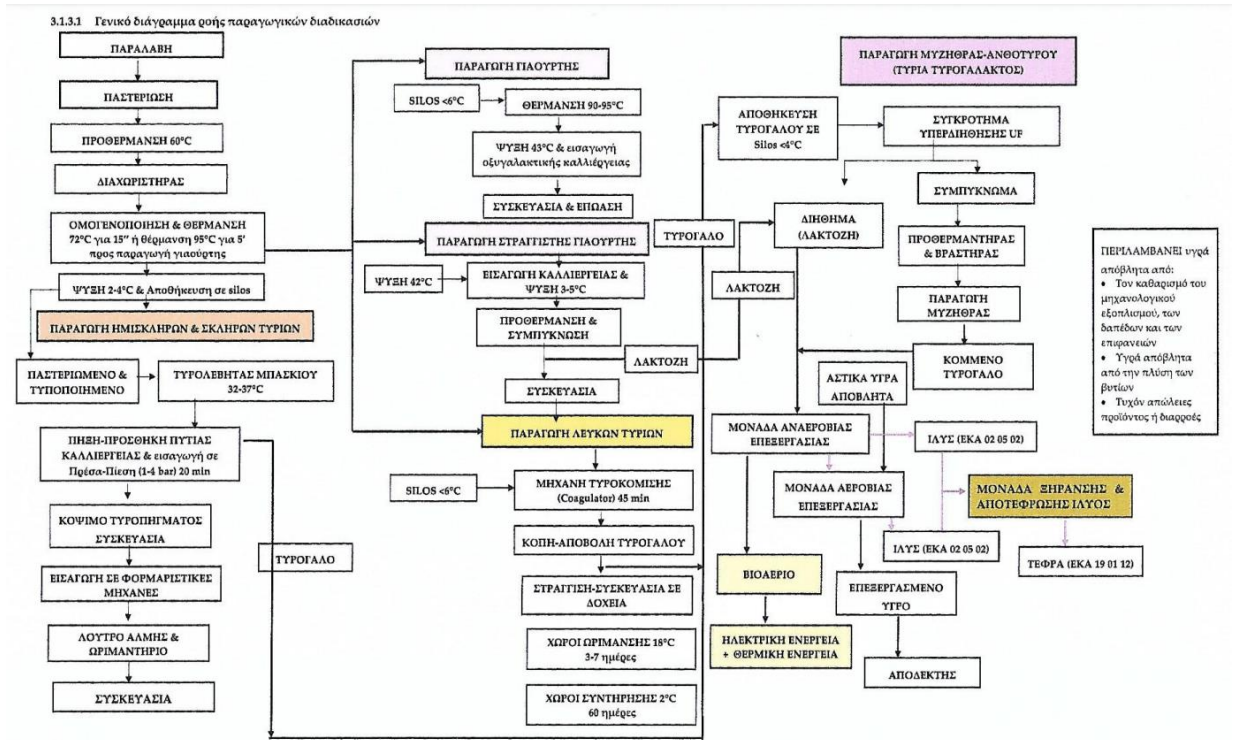
Τα απόβλητα τα οποία θεωρούνται παχύρρευστα όπως :

- η ιλύς του DAF
- τα επιστρεφόμενα/ληγμένα προϊόντα
- το τυρόγαλο

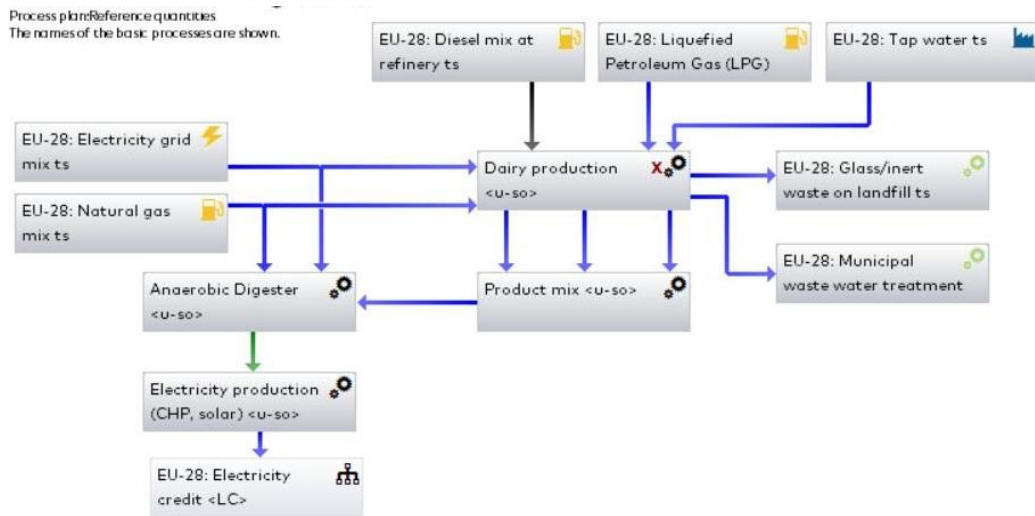
συλλέγονται σε δεξαμενή προετοιμασίας και οδηγούνται προς χώνευση σε σύστημα τεσσάρων αντιδραστήρων τύπου CSTR. Τα συστήματα χώνευσης CSTR μετατρέπουν το οργανικό φορτίο σε βιοαέριο με επίτευξη σωστών συνθηκών ανάμειξης και παραμονή άνω των 20 ημερών εντός των αντιδραστήρων. Το εξερχόμενο ρεύμα αποθηκεύεται σε δεξαμενή ενδιάμεσης αποθήκευσης και στη συνέχεια αφυδατώνεται σε φυγοκεντρικό διαχωριστή, από τον οποίο το υγρό ρεύμα επιστρέφει στη πρώτη δεξαμενή εξουδετέρωσης προς ανάκτηση θρεπτικών και περαιτέρω επεξεργασία.

Συνολικά, όλη η ποσότητα ΟΟΓ μαζί με τα υπόλοιπα υγρά απόβλητα αξιοποιείται για την παραγωγή βιοαερίου και μετέπειτα ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας που χρησιμοποιούνται για την κάλυψη ενεργειακών απαιτήσεων στις εγκαταστάσεις της εταιρείας. Παραπάνω στοιχεία βρίσκονται στη διάθεση της εταιρείας.

Το συνολικό διάγραμμα ρευμάτων της γαλακτοβιομηχανίας, καθώς και οι ροές GABI εμφανίζονται στο Σχήμα 6.18 και Σχήμα 6.19, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.18. Γενικό διάγραμμα ροής των παραγωγικών διεργασιών μιας γαλακτοβιομηχανίας.



Σχήμα 6.19. Ροές GABI της παραγωγής ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας.

6.3.9.1.2. Λειτουργική μονάδα

Στο πλαίσιο του έργου και λόγω του διαφορετικού τύπου των παραγόμενων προϊόντων (ηλεκτρική και θερμική ενέργεια στην παρούσα κατάσταση και συμπύκνωμα και σκόνη ολιγοσακχαριτών στη μελλοντική κατάσταση που προτείνονται) ως λειτουργική μονάδα θεωρείται το 1 ευρώ (EUR) των εσόδων της επιχείρησης όπως προκύπτουν από τον συνολικό κύκλο εργασιών της επιχείρησης από τον τελευταίο

διαθέσιμο ισολογισμό για την παρούσα κατάσταση και από τις τιμές πώλησης των καινοτόμων προϊόντων για την προτεινόμενη κατάσταση. Να σημειωθεί ότι οι αρχικοί υπολογισμοί και η απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής γίνονται με βάση τις ποσότητες του ΟΟΓ που παράγονται σε ετήσια βάση από μια γαλακτοβιομηχανία και στη συνέχεια τα αποτελέσματα της εκτίμησης του περιβαλλοντικού αποτυπώματος ανάγονται σε 1 ευρώ (EUR) εσόδων της επιχείρησης για να υπάρχει ομοιογένεια στις αναλύσεις περιβαλλοντικών επιπτώσεων.

6.3.9.1.3. Όρια συστήματος

Τα όρια του συστήματος της μελέτης που αξιολογεί το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της παραγωγής συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών από ΟΟΓ και της παραγωγής σκόνης ολιγοσακχαριτών από ΟΟΓ και τα συγκρίνει με τη συμβατική πρακτική παραγωγής βιοαερίου ορίζονται από τη βάση μέχρι την πύλη. Πιο συγκεκριμένα, τα όρια του συστήματος περιλαμβάνουν:

- την παραγωγή του γάλακτος που χρησιμοποιείται για τα γαλακτοκομικά προϊόντα, την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων κατά την οποία λαμβάνεται ο ΟΟΓ, την αναερόβια επεξεργασία του ΟΟΓ και τη συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας (combined heat and power, CHP)
- την παραγωγή συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών από ΟΟΓ
- την παραγωγή σκόνης ολιγοσακχαριτών από ΟΟΓ

6.3.9.1.4. Απαιτήσεις δεδομένων

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από την τρέχουσα βιομηχανική παραγωγή, την εργαστηριακή παραγωγή των καινοτόμων προϊόντων από το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο και προήλθαν από άμεσα μετρούμενα δεδομένα από την εταιρεία και το εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων μέσω συμπλήρωσης ερωτηματολογίων φύλλων δεδομένων. Άλλες πηγές δεδομένων περιλαμβάνουν δημοσιεύσεις σε επιστημονικές εργασίες και από τις βάσεις δεδομένων AKZ GaBi και Ecoinvent. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την ακρίβεια των προσομοιώσεων, των δεδομένων της βιβλιογραφίας, των δεδομένων παραγωγής και των εκτιμήσεών μας.

6.3.9.2. Απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής

Η απογραφή δεδομένων κύκλου ζωής συνδέει τις δραστηριότητες με ποσοτικά δεδομένα. Τα αποτελέσματα της απογραφικής ανάλυσης συλλέγονται σε πίνακες, στους οποίους παρουσιάζονται οι στοιχειώδεις ροές εισόδου και εξόδου. Οι μονάδες κατά την απογραφή ακολουθούν ένα τυποποιημένο πρότυπο SI, ώστε να εξομαλύνονται οι διαφορές στα δεδομένα. Τα δεδομένα εισόδου και εξόδου για την υφιστάμενη κατάσταση μπορούν να είναι διαθέσιμα έπειτα από αίτημα και έγκριση της γαλακτοβιομηχανίας. Τα δεδομένα εισόδου και εξόδου για την παραγωγή του συμπυκνώματος και σκόνης ολιγοσακχαριτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5 και τον Πίνακα 6.6 και αναφέρονται σε ένα κιλό αρχικού ΟΟΓ.

Πίνακας 6.5. Απογραφή κύκλου ζωής με δεδομένα εισόδου και εξόδου για τις διεργασίες παραγωγής συμπυκνώματος από 1 kg αρχικού ΟΟΓ.

ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	ΕΙΣΡΟΕΣ/ ΕΚΡΟΕΣ	ΡΟΕΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ	ΜΟΝΑΔΕΣ
<u>ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΥΠΟ ΚΕΝΟ</u>	Εισροές	ΟΟΓ	1	kg
		Ηλεκτρική ενέργεια	0,116	KWh
		Φυσικό αέριο	0,686	KWh
	Εκροές	Συμπυκνωμένος ΟΟΓ	0,227	kg
		Ατμοί	0,773	kg
<u>ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</u>	Εισροές	Συμπυκνωμένος ΟΟΓ	0,227	kg
		ένζυμο	0,001	kg
		Ηλεκτρική ενέργεια	0,010	KWh
	Εκροές	Προϊόν 1	0,228	kg
	<u>ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ</u>	Εισροές	Προϊόν 1	0,228
Ηλεκτρική ενέργεια			0,025	KWh
Εκροές		Προϊόν 2	0,228	kg
		Προϊόν 2	0,228	kg
<u>ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ</u>	Εισροές	NaHCO ₃	0,002	kg
		Προϊόν 3	0,228	kg
	<u>ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΥΠΟ ΚΕΝΟ II</u>	Εισροές	Προϊόν 3	0,228
Φυσικό αέριο			0,101	KWh
Ηλεκτρική ενέργεια			0,017	KWh

Εκροές	Ατμοί	0,114	kg
	Τελικό Συμπύκνωμα	0,114	kg

Πίνακας 6.6. Απογραφή κύκλου ζωής με δεδομένα εισόδου και εξόδου για τις διεργασίες παραγωγής σκόνης ολιγοσακχαριτών από 1 kg αρχικού ΟΟΓ.

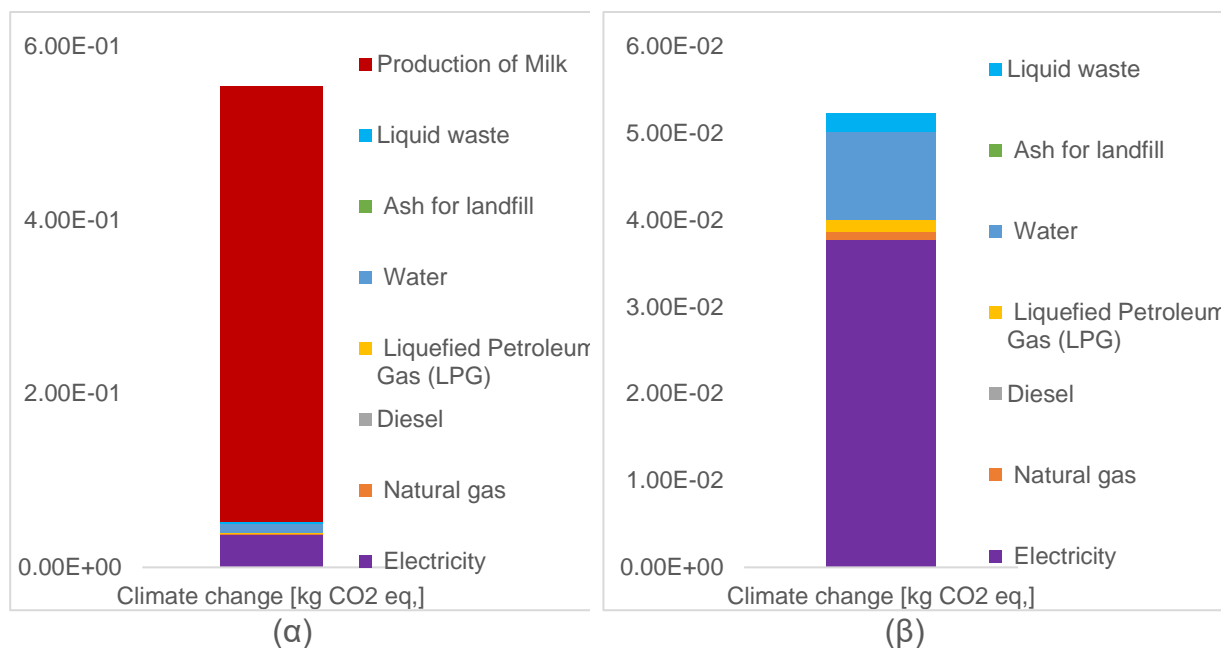
ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	ΕΙΣΡΟΕΣ/ ΕΚΡΟΕΣ	ΡΟΕΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ	ΜΟΝΑΔΕΣ
<u>ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΥΠΟ ΚΕΝΟ</u>	Εισροές	ΟΟΓ	1	kg
		Ηλεκτρική ενέργεια	0,116	KWh
	Εκροές	Φυσικό αέριο	0,686	KWh
		Συμπυκνωμένος ΟΟΓ	0,227	kg
		Ατμοί	0,773	kg
<u>ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</u>	Εισροές	Συμπυκνωμένος ΟΟΓ	0,227	kg
		ένζυμο	0,001	kg
		Ηλεκτρική ενέργεια	0,010	KWh
	Εκροές	Προϊόν 1	0,228	kg
	<u>ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ</u>	Εισροές	Προϊόν 1	0,228
Ηλεκτρική ενέργεια			0,025	KWh
Εκροές		Προϊόν 2	0,228	kg
<u>ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ</u>	Εισροές	Προϊόν 2	0,228	kg
		NaHCO ₃	0,002	kg
	Εκροές	Προϊόν 3	0,228	kg
<u>ΞΗΡΑΝΣΗ ΜΕ ΨΕΚΑΣΜΟ</u>	Εισροές	Προϊόν 3	0,228	kg
		Ηλεκτρική ενέργεια	1,467	KWh
	Εκροές	Νερό	0,174	kg
		Τελική Σκόνη	0,054	kg

6.3.9.3. Εκτίμηση περιβαλλοντικού αποτυπώματος

Το επόμενο βήμα της αξιολόγησης κύκλου ζωής είναι η μετάφραση των δεδομένων απογραφής σε πραγματικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pennington et al., 2006; Udo de Haes & Jolliet, 1999). Το συνολικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα της παραγωγής και αξιοποίησης του ΟΟΓ αναλύεται στη συνέχεια για όλες τις κατηγορίες επιπτώσεων της ReCiPe για την υφιστάμενη και τη μελλοντική κατάσταση.

6.3.9.3.1. Εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος υφιστάμενης κατάστασης

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης των επιπτώσεων κύκλου ζωής για την υφιστάμενη κατάσταση, κατά την οποία ο ΟΟΓ αξιοποιείται για την παράγωγή βιοαερίου και στη συνέχεια για συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.20 για τη σημαντικότερη κατηγορία επιπτώσεων, την κατηγορία της κλιματικής αλλαγής, συμπεριλαμβανομένων των σημαντικότερων διεργασιών και ρευμάτων. Τα αποτελέσματα ανάγονται ανά ευρώ εσόδων.



Σχήμα 6.20. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την παραγωγή και αξιοποίηση για τη συνολική ποσότητα ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) στην κατηγορία των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής (εκφρασμένες σε kg ισοδύναμου διοξειδίου του άνθρακα — kg ισοδύναμου CO₂) (α) συμπεριλαμβανομένης και (β) χωρίς την παραγωγή γάλακτος.

Όπως φαίνεται το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της παραγωγής και αξιοποίησης του ΟΟΓ, όπως εφαρμόζεται στο παρόν, είναι ίσο με με 5,54 10⁻¹ kg ισοδύναμου CO₂ με την παραγωγή γάλακτος να έχει τη μεγαλύτερη περιβαλλοντική επιβάρυνση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά (Finnegan et al., 2017). Τα δεδομένα για την παραγωγή γάλακτος αντλούνται από τη βάση δεδομένων του GABI για παραγωγή στις χώρες της Ευρώπης (EU-28). Το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της υφιστάμενης κατάστασης για το σύνολο των κατηγοριών επιπτώσεων έχει υπολογιστεί και παρουσιάζεται στον επόμενο Πίνακα.

Πίνακας 6.7. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την παραγωγή και αξιοποίηση για τη συνολική ποσότητα ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) στην υφιστάμενη κατάσταση στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Συνολικό Αποτύπωμα
Climate change [kg CO2 eq,]	5,54E-01
Fine Particulate Matter Formation [kg PM2,5 eq,]	3,64E-03
Fossil depletion [kg oil eq,]	4,33E-02
Freshwater Consumption [m3]	1,36E-02
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4 DB eq,]	3,95E-04
Freshwater Eutrophication [kg P eq,]	9,29E-05
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq,]	1,74E-04
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq,]	-1,06E-01
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq, to air]	2,07E-03
Land use [Annual crop eq, ·γ]	5,78E-01
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq,]	5,10E-04
Marine Eutrophication [kg N eq,]	8,36E-04
Metal depletion [kg Cu eq,]	2,23E-03
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NOx eq,]	1,19E-01
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NOx eq,]	7,41E-02
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq,]	4,19E-06
Terrestrial Acidification [kg SO2 eq,]	7,10E-03
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq,]	3,17E-02

6.3.9.3.2. Εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος μελλοντικής κατάστασης

6.3.9.3.2.1. Σιρόπι γαλακτοολιγοσακχαριτών

Στον Επόμενο Πίνακα φαίνεται το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της αξιοποίησης της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών.

Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την αξιοποίηση της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Συμπύκνωση υπό κενό	Ενζυμική αντίδραση	Θερμική απενεργ. ενζύμου	Εξουδετ. γαλακτικού οξέος	Συμπύκνωση υπό κενό II	Συνολικό Αποτύπωμα
Climate change [kg CO2 eq,]	4,70E-03	3,78E-04	6,95E-04	1,38E-04	6,82E-04	6,60E-03
Fine Particulate Matter Formation [kg PM2,5 eq,]	2,81E-06	2,18E-07	4,48E-07	1,52E-07	4,10E-07	4,04E-06
Fossil depletion [kg oil eq,]	4,89E-03	1,47E-04	2,86E-04	4,00E-05	7,02E-04	6,07E-03

Freshwater Consumption [m3]	2,99E-05	3,30E-06	6,39E-06	6,13E-07	4,38E-06	4,46E-05
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4 DB eq.]	3,98E-07	8,79E-08	5,40E-08	5,71E-08	5,78E-08	6,55E-07
Freshwater Eutrophication [kg P eq.]	8,99E-09	9,45E-09	1,90E-09	2,60E-10	1,32E-09	2,19E-08
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq.]	6,23E-07	1,12E-07	1,21E-07	1,43E-08	9,12E-08	9,61E-07
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq.]	1,92E-05	1,84E-04	9,32E-07	3,38E-06	2,76E-06	2,10E-04
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq, to air]	2,30E-04	2,01E-05	4,95E-05	2,51E-07	3,37E-05	3,33E-04
Land use [Annual crop eq. · y]	1,93E-04	1,16E-04	4,11E-05	1,43E-06	2,83E-05	3,80E-04
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	1,21E-06	1,59E-07	1,78E-07	8,86E-08	1,76E-07	1,82E-06
Marine Eutrophication [kg N eq.]	7,48E-08	8,14E-08	1,58E-08	1,50E-08	1,09E-08	1,98E-07
Metal depletion [kg Cu eq.]	5,89E-06	9,32E-07	8,86E-07	3,02E-06	8,59E-07	1,16E-05
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NOx eq.]	1,11E-02	8,99E-04	2,08E-03	4,30E-05	1,62E-03	1,57E-02
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NOx eq.]	6,89E-03	5,58E-04	1,29E-03	2,68E-05	1,01E-03	9,78E-03
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq.]	1,18E-09	4,47E-10	2,21E-10	4,44E-11	1,73E-10	2,07E-09
Terrestrial Acidification [kg SO2 eq.]	8,79E-06	7,35E-07	1,43E-06	5,72E-07	1,29E-06	1,28E-05
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	1,00E-03	9,12E-05	2,09E-04	4,68E-06	1,47E-04	1,46E-03

Ουσιαστικά στην προτεινόμενη κατάσταση, εκτιμάται ότι όλη η παραγόμενη ποσότητα ΟΟΓ κατευθύνεται προς την παραγωγή συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών, ενώ η συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας βασίζεται στα υπόλοιπα υγρά ρεύματα της εταιρείας (επιστρεφόμενα προϊόντα και κομμένο τυρόγαλο). Με βάση τελευταία δεδομένα τιμής συμπυκνώματος GOS , αυτή κυμαίνεται από 3-8.5 EUR/kg. Δεδομένου ότι η ετήσια ποσότητα συμπυκνώματος είναι 3315804 kg και θεωρώντας μια μέση τιμή πώλησης στα 5 EUR/kg, τα επιπλέον έσοδα που θα υπάρχουν είναι 16579020

EUR, τα οποία προστίθενται στον συνολικό κύκλο εργασιών της εταιρείας. Η εκτίμηση κόστους που προκύπτει από την απόσβεση του νέου εξοπλισμού δεν έχει ληφθεί υπόψη.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της συνολικής διεργασίας αξιοποίησης του ΟΟΓ, συμπεριλαμβάνοντας και τα στάδια παραγωγής του, αλλά και της συμπαραγωγής ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας στην γαλακτοβιομηχανία.

Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για τη συνολική αξιοποίηση του ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Παραγωγή και επεξεργασία ΟΟΓ (ΕΛΛΓΑ)	Παραγωγή συμπκνώματος GOS (ΕΜΠ)	Συνολικό Αποτύπωμα
Climate change [kg CO ₂ eq.]	5,37E-01	6,60E-03	5,43E-01
Fine Particulate Matter Formation [kg PM _{2,5} eq.]	3,50E-03	4,04E-06	3,51E-03
Fossil depletion [kg oil eq.]	5,21E-02	6,07E-03	5,82E-02
Freshwater Consumption [m ³]	1,40E-02	4,46E-05	1,40E-02
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4 DB eq.]	3,72E-04	6,55E-07	3,73E-04
Freshwater Eutrophication [kg P eq.]	8,83E-05	2,19E-08	8,83E-05
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq.]	1,25E-04	9,61E-07	1,26E-04
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq.]	-1,02E-01	2,10E-04	-1,02E-01
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq, to air]	2,23E-03	3,33E-04	2,56E-03
Land use [Annual crop eq., γ]	5,57E-01	3,80E-04	5,57E-01
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	4,81E-04	1,82E-06	4,83E-04
Marine Eutrophication [kg N eq.]	8,04E-04	1,98E-07	8,04E-04
Metal depletion [kg Cu eq.]	2,31E-03	1,16E-05	2,32E-03
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NO _x eq.]	1,23E-01	1,57E-02	1,39E-01
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NO _x eq.]	7,67E-02	9,78E-03	8,64E-02
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq.]	4,04E-06	2,07E-09	4,04E-06

Terrestrial Acidification [kg SO ₂ eq.]	6,84E-03	1,28E-05	6,85E-03
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	3,10E-02	1,46E-03	3,25E-02

Παρατηρείται ότι το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της προτεινόμενης κατάστασης είναι χαμηλότερο στις 11 από τις 18 κατηγορίες επιπτώσεων σε σχέση με την υφιστάμενη κατάσταση, ενώ η επιβάρυνση που προκύπτει από την επεξεργασία του ΟΟΓ στο ΕΜΠ για την παραγωγή του καινοτόμου προϊόντος συμπυκνώματος GOS είναι πολύ μικρή. Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές περιβαλλοντικών επιπτώσεων για την παραγωγή συμπυκνώματος GOS είναι υπερεκτιμημένες καθώς βασίζονται σε μετρήσεις από πειράματα εργαστηριακής κλίμακας και ένα λαμβάνονταν υπόψη τιμές ηλεκτρικής ενέργειας και φυσικού αερίου για εξοπλισμό βιομηχανικής κλίμακας με μεγαλύτερες αποδόσεις, οι τιμές περιβαλλοντικών επιπτώσεων της παραγωγής συμπυκνώματος GOS θα ήταν χαμηλότερες, αυξάνοντας έτσι ακόμα περισσότερο την περιβαλλοντική ανωτερότητα των προτεινόμενων διεργασιών στα πλαίσια του Έργου. Επιπλέον να σημειωθεί πως οι αρνητικές τιμές που εμφανίζονται στις κατηγορίες της τοξικότητας στον άνθρωπο είναι συνώνυμες με τα καθαρά περιβαλλοντικά οφέλη (credits) και αποδίδονται στις αποφευχθείσες εκπομπές.

6.3.9.3.2.2. Σκόνη γαλακτοολιγοσακχαριτών

Αντίστοιχα, στον επόμενο Πίνακα φαίνεται το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της αξιοποίησης της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ (ανά 1 EUR εσόδων) για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα σκόνης ολιγοσακχαριτών. Για τον υπολογισμό των παρακάτω αποτελεσμάτων λαμβάνονται υπόψη τελευταία δεδομένα τιμής σκόνης GOS που κυμαίνεται από 12-17 EUR/kg. Δεδομένου ότι η ετήσια ποσότητα σκόνης είναι 1570644 kg και θεωρώντας μια μέση τιμή πώλησης στα 15 EUR/kg, τα επιπλέον έσοδα που θα υπάρχουν είναι 23559660 EUR, τα οποία προστίθενται στον συνολικό κύκλο εργασιών της εταιρείας.

Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για την αξιοποίηση της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα σκόνης ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Συμπύκνω-ση υπό κενό	Ενζυμική αντίδραση	Θερμική απενεργ. ενζύμου	Εξουδετ. γαλακτικού οξέος	Ξήρανση με ψεκάσμο	Συνολικό Αποτύπωμ α
----------------------	----------------------	--------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------	---------------------

Climate change [kg CO2 eq.]	4,63E-03	3,72E-04	6,85E-04	1,36E-04	4,01E-02	4,59E-02
Fine Particulate Matter Formation [kg PM2,5 eq.]	2,77E-06	2,14E-07	4,41E-07	1,50E-07	2,58E-05	2,93E-05
Fossil depletion [kg oil eq.]	4,82E-03	1,45E-04	2,82E-04	3,94E-05	1,65E-02	2,18E-02
Freshwater Consumption [m3]	2,95E-05	3,25E-06	6,29E-06	6,04E-07	3,68E-04	4,07E-04
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4 DB eq.]	3,92E-07	8,66E-08	5,32E-08	5,63E-08	3,11E-06	3,69E-06
Freshwater Eutrophication [kg P eq.]	8,85E-09	9,30E-09	1,87E-09	2,56E-10	1,10E-07	1,30E-07
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq.]	6,13E-07	1,10E-07	1,19E-07	1,41E-08	6,98E-06	7,83E-06
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq.]	1,89E-05	1,81E-04	9,17E-07	3,33E-06	5,37E-05	2,58E-04
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq. to air]	2,26E-04	1,98E-05	4,88E-05	2,47E-07	2,85E-03	3,14E-03
Land use [Annual crop eq.·y]	1,90E-04	1,14E-04	4,05E-05	1,41E-06	2,36E-03	2,71E-03
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	1,19E-06	1,56E-07	1,75E-07	8,72E-08	1,02E-05	1,18E-05
Marine Eutrophication [kg N eq.]	7,36E-08	8,01E-08	1,56E-08	1,47E-08	9,11E-07	1,09E-06
Metal depletion [kg Cu eq.]	5,80E-06	9,17E-07	8,72E-07	2,98E-06	5,09E-05	6,15E-05
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NOx eq.]	1,09E-02	8,85E-04	2,05E-03	4,23E-05	1,19E-01	1,33E-01
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NOx eq.]	6,78E-03	5,50E-04	1,27E-03	2,64E-05	7,43E-02	8,29E-02
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq.]	1,16E-09	4,40E-10	2,18E-10	4,37E-11	1,27E-08	1,46E-08
Terrestrial Acidification [kg SO2 eq.]	8,66E-06	7,23E-07	1,41E-06	5,63E-07	8,27E-05	9,40E-05
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	9,88E-04	8,98E-05	2,06E-04	4,61E-06	1,20E-02	1,33E-02

Όπως παρατηρείται, το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της ανάπτυξης σκόνης GOS είναι αυξημένο σε σχέση με το συμπύκνωμα (Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα εκτίμησης

επιπτώσεων κύκλου ζωής για την αξιοποίηση της συνολικής ποσότητας ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.) και αυτό οφείλεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό (περίπου 90% του συνόλου του αντικτύπου) στην ξήρανση με ψεκασμό, η οποία έχει τεράστιες καταναλώσεις ενέργειας εφόσον χρησιμοποιείται σε εργαστηριακή και όχι βιομηχανική κλίμακα, όπου θα μπορούσαν οι ατμοί και το νερό από προηγούμενες διεργασίες (συμπύκνωση υπό κενό) να ανακυκλώνονται και να επαναχρησιμοποιούνται.

Στη συνέχεια περιλαμβάνονται και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις κατά τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας του ΟΟΓ στην γαλακτοβιομηχανία.

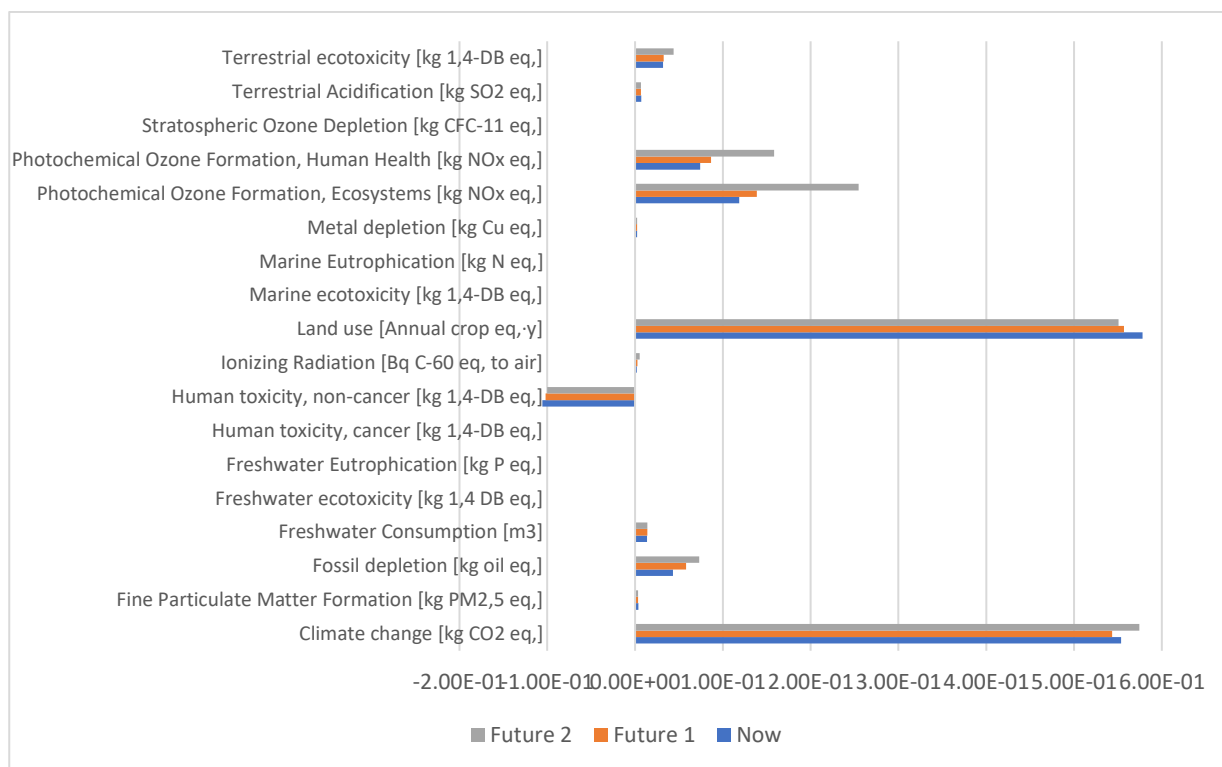
Πίνακας 6.11. Αποτελέσματα εκτίμησης επιπτώσεων κύκλου ζωής για τη συνολική αξιοποίηση του ετήσια παραγόμενου ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (ανά 1 EUR εσόδων) στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Παραγωγή και επεξεργασία ΟΟΓ (ΕΛΛΓΑ)	Παραγωγή Σκόνης GOS (ΕΜΠ)	Συνολικό Αποτύπωμα
Climate change [kg CO ₂ eq.]	5,29E-01	4,59E-02	5,74E-01
Fine Particulate Matter Formation [kg PM _{2,5} eq.]	3,45E-03	2,93E-05	3,48E-03
Fossil depletion [kg oil eq.]	5,13E-02	2,18E-02	7,31E-02
Freshwater Consumption [m ³]	1,38E-02	4,07E-04	1,42E-02
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	3,67E-04	3,69E-06	3,70E-04
Freshwater Eutrophication [kg P eq.]	8,70E-05	1,30E-07	8,71E-05
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq.]	1,23E-04	7,83E-06	1,31E-04
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq.]	-1,01E-01	2,58E-04	-1,00E-01
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq. to air]	2,19E-03	3,14E-03	5,34E-03
Land use [Annual crop eq.,y]	5,48E-01	2,71E-03	5,51E-01
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	4,74E-04	1,18E-05	4,86E-04
Marine Eutrophication [kg N eq.]	7,91E-04	1,09E-06	7,92E-04
Metal depletion [kg Cu eq.]	2,27E-03	6,15E-05	2,33E-03
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NO _x eq.]	1,21E-01	1,33E-01	2,54E-01
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NO _x eq.]	7,55E-02	8,29E-02	1,58E-01
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq.]	3,98E-06	1,46E-08	3,99E-06
Terrestrial Acidification [kg SO ₂ eq.]	6,73E-03	9,40E-05	6,83E-03
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq.]	3,06E-02	1,33E-02	4,39E-02

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.11, ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος της δεύτερης προτεινόμενης κατάστασης (σκόνη GOS) είναι αυξημένος σε σχέση με αυτόν της πρώτης (συμπύκνωμα GOS) λόγω των μεγαλύτερων ενεργειακών απαιτήσεων της ξήρανσης με ψεκασμό και της μικρότερης παραγωγικότητας. Παρόλα αυτά, σε σχέση με την υφιστάμενη κατάσταση, η δεύτερη προτεινόμενη κατάσταση είναι ανώτερη περιβαλλοντικά της πρώτης σε 10 από 18 κατηγορίες επιπτώσεων. Μια καλύτερη σύγκριση μεταξύ των αποτυπώματων των συμβατικών και των καινοτόμων λύσεων αξιοποίησης του ΟΟΓ μπορεί να επιτευχθεί στην επόμενη Ενότητα, όπου παρουσιάζονται και οι τρεις καταστάσεις.

6.3.9.4. Ερμηνεία και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Η εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των καινοτόμων μεθόδων αξιοποίησης του ΟΟΓ και της συμβατικής τεχνικής πραγματοποιήθηκε μέσω των δεκαοκτώ κατηγοριών επιπτώσεων, όπως αυτές προτείνονται στη μεθοδολογία ReCiPe. Οι αναλυτικές κατηγορίες για τις τρεις μεθόδους εμφανίζονται στο Σχήμα 7, ενώ στον Πίνακα 6.12 εμφανίζονται τα ποσοστά αύξησης ή μείωσης αύξησης του περιβαλλοντικού αποτυπώματος (ΠΑ) των καινοτόμων μεθόδων σε σύγκριση με αυτό της συμβατικής που υπολογίζονται ως $[(\text{ΠΑ καινοτ} - \text{ΠΑ συμβ}) / \text{ΠΑ συμβ}]$.



Πίνακας 6.12. Ποσοστά αλλαγών των περιβαλλοντικών αποτυπωμάτων των μεθόδων αξιοποίησης ΟΟΓ για την παραγωγή σε εργαστηριακή κλίμακα συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (Future 1) και σκόνης ολιγοσακχαριτών (Future 2) σε σχέση με τη συμβατική [(ΠΑ καινοτ- ΠΑ συμβ)/ ΠΑ συμβ] στις κατηγορίες επιπτώσεων ReCiPe.

Κατηγορία Επιπτώσεων	Future 1	Future 2
Climate change [kg CO2 eq,]	-2%	4%
Fine Particulate Matter Formation [kg PM2,5 eq,]	-4%	-4%
Fossil depletion [kg oil eq,]	34%	69%
Freshwater Consumption [m3]	3%	4%
Freshwater ecotoxicity [kg 1,4 DB eq,]	-6%	-6%
Freshwater Eutrophication [kg P eq,]	-5%	-6%
Human toxicity, cancer [kg 1,4-DB eq,]	-27%	-25%
Human toxicity, non-cancer [kg 1,4-DB eq,]	-4%	-5%
Ionizing Radiation [Bq C-60 eq, to air]	24%	158%
Land use [Annual crop eq, ·y]	-4%	-5%
Marine ecotoxicity [kg 1,4-DB eq,]	-5%	-5%
Marine Eutrophication [kg N eq,]	-4%	-5%
Metal depletion [kg Cu eq,]	4%	5%
Photochemical Ozone Formation, Ecosystems [kg NOx eq,]	17%	114%
Photochemical Ozone Formation, Human Health [kg NOx eq,]	17%	114%
Stratospheric Ozone Depletion [kg CFC-11 eq,]	-4%	-5%
Terrestrial Acidification [kg SO2 eq,]	-3%	-4%
Terrestrial ecotoxicity [kg 1,4-DB eq,]	2%	38%

Στον Πίνακα 6.12, τα αρνητικά ποσοστά υποδηλώνουν ανωτερότητα των προτεινόμενων μεθόδων σε σύγκριση με τη συμβατική, ενώ οι θετικές τιμές των ποσοστών δείχνουν κατωτερότητα. Ξεκινώντας με την παραγωγή συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών (Future 1) σε εργαστηριακή κλίμακα, η μέθοδος αυτή εμφανίζει αρνητικά ποσοστά σε 11 από τις 18 κατηγορίες επιπτώσεων, επιβεβαιώνοντας τα περιβαλλοντικά του πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής. Σε 3 κατηγορίες, εμφανίζει περίπου τις ίδιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (εύρος ποσοστών: 0–5%) και υψηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις στις 4 κατηγορίες μείωσης ορυκτών πόρων (fossil depletion), ιονίζουσας ακτινοβολίας (ionizing radiation) και δημιουργίας φωτοχημικού όζοντος (photochemical ozone formation) στα οικοσυστήματα και στην ανθρώπινη υγεία. Γενικά, η ιονίζουσα ακτινοβολία σχετίζεται με τις ανθρωπογενείς εκπομπές ραδιονουκλεϊδίων στο περιβάλλον που παράγονται κατά τη διάρκεια του κύκλου των πυρηνικών καυσίμων (nuclear fuel cycle) (εξόρυξη, επεξεργασία και διάθεση

απορριμμάτων), καθώς και κατά τη διάρκεια άλλων ανθρωπίνων δραστηριοτήτων, όπως η καύση άνθρακα και η εξόρυξη φωσφορικών πετρώματων (Huijbregts et al., 2016). Οι αυξήσεις σε αυτές τις κατηγορίες οφείλονται στο γεγονός ότι η συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας, οι οποίες χρησιμοποιούνταν για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των εγκαταστάσεων της εταιρείας, πλέον θα βασίζεται σε δύο ρεύματα (κομμένο τυρόγαλο και επιστρεφόμενα προϊόντα) και όχι και στο ρεύμα του ΟΟΓ, το οποίο θα χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παραγωγή των καινοτόμων προϊόντων, για την οποία γίνεται χρήση ηλεκτρικής ενέργειας.

Όσον αφορά την παραγωγή σκόνης ολιγοσακχαριτών (Future 2) σε εργαστηριακή κλίμακα, εμφανίζει αρνητικά ποσοστά σε 10 από τις 18 κατηγορίες επιπτώσεων, περίπου τις ίδιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (εύρος ποσοστών: 0–5%) σε 3 κατηγορίες και υψηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε 5 κατηγορίες, οι 4 εκ των οποίων συζητήθηκαν προηγουμένως και η πέμπτη είναι η χερσαία οικοτοξικότητα.

Συνολικά, οι καινοτόμες μέθοδοι υπερέχουν από τη συμβατική όταν λαμβάνεται υπόψη το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα σε πολλές κατηγορίες επιπτώσεων και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν σκεφτεί κάποιος ότι οι ενεργειακές καταναλώσεις υπολογίζονται σε εξοπλισμό ενεργειακής κλίμακας με συγκεκριμένες αποδόσεις και περιορισμένες δυνατότητες ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης νερού και ατμών. Εάν ληφθεί υπόψη η κλιμάκωση σε βιομηχανικό εξοπλισμό, τα περιβαλλοντικά προτερήματα των προτεινόμενων μεθόδων θα γίνουν ακόμα πιο εμφανή. Ανάμεσα στις δύο προτεινόμενες μεθόδους για την παραγωγή των καινοτόμων προϊόντων, η πρώτη μέθοδος παραγωγής συμπυκνώματος GOS είναι περιβαλλοντικά ανώτερη και αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό στην κατηγορία της κλιματικής αλλαγής, η περιβαλλοντική σημασία της οποίας αξιολογείται από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος ως «πολύ υψηλή» (Kartonverpackungen et al., 2007).

6.4. Αξιοποίηση του γλυκού ορού αιγοπρόβειας προέλευσης για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών

6.4.1. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*

Αναφορικά με την αξιοποίηση του τυρογάλακτος που αποβάλλεται κατά την παραγωγική διαδικασία σκληρών τυριών ωρίμανσης από αιγοπρόβειο γάλα για την παραγωγή πρεβιοτικών GOS, αρχικά μελετήθηκε η εφαρμογή της βιομηχανικής β-

γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συμπυκνωμένο ή μη τυρόγαλα, με εφαρμογή διάφορων ενζυμικών φορτίων. Τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων όσον αφορά στον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (y_{GOS}) και τον βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.21. Όπως και στην περίπτωση του όξινου ορού γιαουρτιού, έτσι και στην εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *K. lactis* στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης, ο βαθμός απόδοσης σε GOS παρουσίασε αύξηση κατά τα πρώτα στάδια της ενζυμικής αντίδρασης, όταν η λακτόζη αφθονεί στο αντιδρών σύστημα, ενώ στη συνέχεια αυτός λαμβάνει μία μέγιστη τιμή και στη συνέχεια μειώνεται, λόγω της υδρόλυσης των σχηματιζόμενων GOS, όπως αναλύθηκε στις προηγούμενες ενότητες.

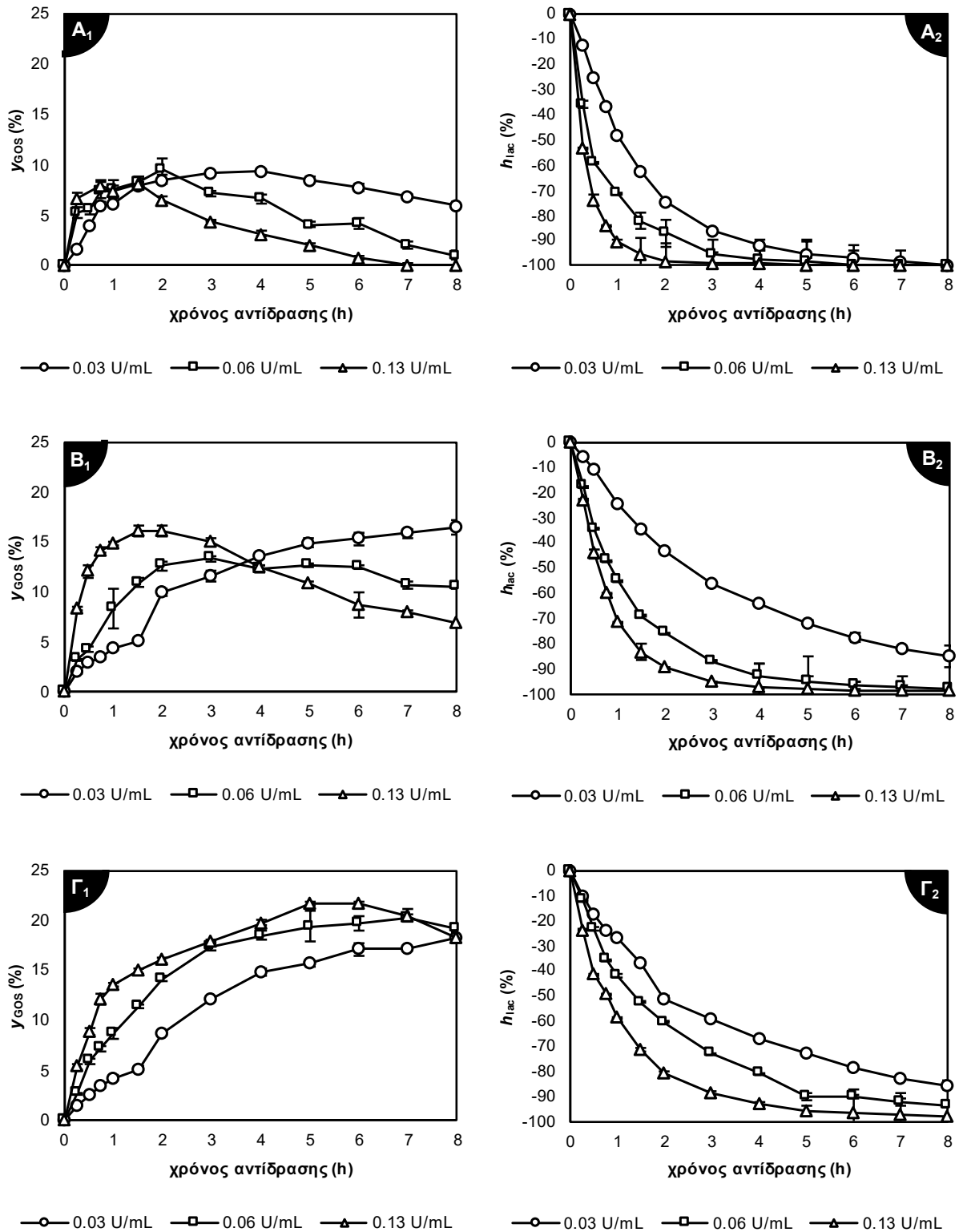
Συγκεκριμένα, η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε μη συμπυκνωμένο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 5,1 % w/v οδήγησε στην παραγωγή GOS με χαμηλές αποδόσεις. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $9,64 \pm 1,09$ % επιτεύχθηκε με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσου με 0,06 U/mL, έπειτα από 2 h ενζυμικής αντίδρασης. Στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικός ($p > 0,05$) μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS επιτεύχθηκε στο μη συμπυκνωμένο τυρόγαλα χρησιμοποιώντας το μισό ενζυμικό φορτίο (0,03 U/mL), ωστόσο ο χρόνος που απαιτήθηκε για τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των GOS ήταν διπλάσιος (4 h).

Η συμπύκνωση του τυρογάλακτος αιγοπρόβειας προέλευσης υπό κενό σε περιεκτικότητα σε λακτόζη 10 % w/v πριν την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων, οδήγησε στην επίτευξη μεγαλύτερων αποδόσεων σε GOS. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 0,03 U/mL οδήγησε στην παραγωγή GOS με μέγιστο βαθμό απόδοσης ίσο με $16,5 \pm 0,7$ %, έπειτα από 8 h ενζυμικής αντίδρασης. Η εφαρμογή υψηλότερου ενζυμικού φορτίου ίσου με 0,13 U/mL στο ίδιο υπόστρωμα οδήγησε στην επίτευξη στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικού ($p > 0,05$) βαθμού απόδοσης σε GOS, ωστόσο ο χρόνος για την επίτευξη αυτού υποτετραπλασιάσθηκε (2 h).

Η υψηλότερη απόδοση σε GOS επιτεύχθηκε στην περίπτωση εφαρμογής της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στο πλέον συμπυκνωμένο τυρόγαλα που μελετήθηκε, με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης προσδιορίστηκε σε $21,7 \pm 0,2$ % με εφαρμογή του μέγιστου ενζυμικού φορτίου που μελετήθηκε (0,13 U/mL), έπειτα από 5 h ενζυμικής αντίδρασης. Ο αντίστοιχος βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης ήταν ίσος με $95,6 \pm 1,5$ %.

βαθμός απόδοσης ήταν στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικός ($p > 0,05$) με αυτόν που επιτεύχθηκε με χρήση ενζυμικού φορτίου ίσου με 0.06 U/mL έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης. Ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης σε αυτήν την περίπτωση ήταν ίσος με $92,3 \pm 1,2$ %.

Η εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* σε διαλύματα καθαρής λακτόζης για παραγωγή GOS έχει μελετηθεί από τους González-Delgado et al. (2016), αναφέροντας μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 12,18 %, όταν χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό φορτίο 5 U/mL σε διάλυμα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 25 % w/v, μετά από 3 h ενζυμικής αντίδρασης. Αυτά τα ευρήματα είναι διαφορετικά από αυτά που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς η χρήση πολύ χαμηλότερου ενζυμικού φορτίου σε συμπυκνωμένο γλυκό ορό με αρχική περιεκτικότητα λακτόζης 15 % w/v είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλότερου βαθμού απόδοσης σε GOS (21,7 %). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση πολλών κατιόντων μετάλλων που υπάρχουν στον γλυκό ορό που ενισχύουν την ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης από τον *K. lactis*, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 6.2.1. Οι Mano et al. (2019) μελέτησαν την παραγωγή GOS από διήθημα ορού γάλακτος με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 30 % w/v, εφαρμόζοντας 50 U β-γαλακτοσιδάσης από *K. lactis* ανά g λακτόζης (ενζυμικό φορτίο 15 U/mL) και ανέφεραν μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 25 %, μετά από 2 h ενζυμικής αντίδρασης. Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα ευρήματα αυτής της μελέτης, αν και στην παρούσα διατριβή απαιτούνταν πολύ χαμηλότερο ενζυμικό φορτίο ενζύμου για να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις σε GOS ένα υπόστρωμα γλυκού ορού με την μισή περιεκτικότητα σε λακτόζη. Επιπλέον, οι Fischer & Kleinschmidt (2015) μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* τόσο σε γλυκό όσο και σε όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,8 και 20 % w/v και ανέφεραν σχετικά χαμηλούς μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS ίσους με 4,30 και 10,56 % για μη συμπυκνωμένο γλυκό και όξινο ορός, αντίστοιχα, και υψηλότερους μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS ίσους με 32,56 και 33,45 % για συμπυκνωμένο γλυκό και όξινο ορό, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.21. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 5,1 % w/v , (Β) 10 % w/v και (Γ) 15 % w/v .

6.4.2. Εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*

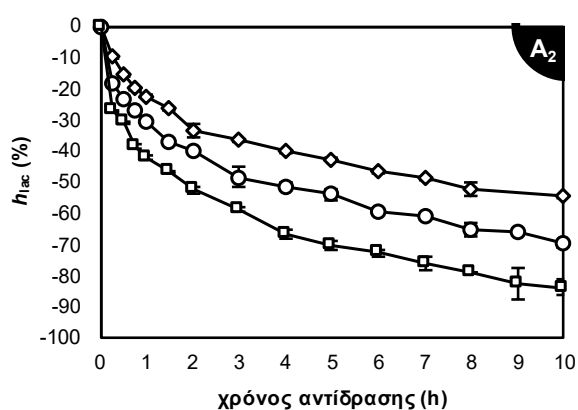
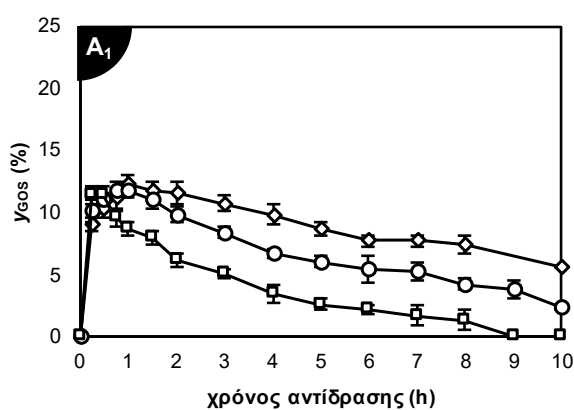
Στη συνέχεια μελετήθηκε η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Και αυτή η λακτάση εφαρμόστηκε σε συμπυκνωμένο ή μη τυρόγαλα σε διάφορες τιμές ενζυμικού φορτίου. Τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων όσον αφορά στον βαθμό απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (y_{GOS}) και τον βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης παρουσιάζονται στο σχήμα XX.

Στην περίπτωση του μη συμπυκνωμένου τυρογάλακτος επιτεύχθηκαν σχετικά χαμηλές και στατιστικά μη σημαντικές διαφορικές ($p > 0.05$) μέγιστες αποδόσεις σε GOS για όλα τα ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν. Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS έφθασε μέχρι και $12,4 \pm 0,7$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με $0,5$ U/mL, έπειτα από 1 h ενζυμικής αντίδρασης. Ωστόσο, οι αποδόσεις σε GOS στην περίπτωση του μη συμπυκνωμένου τυρογάλακτος ήταν υψηλότεροι στην περίπτωση εφαρμογής της λακτάσης από τον μύκητα *A. oryzae* σε σύγκριση με την εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *K. lactis*.

Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* σε συμπυκνωμένο τυρόγαλα οδήγησε στην επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων σε GOS. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του συμπυκνωμένου τυρογάλακτος με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10 % w/v, επιτεύχθηκε μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $17,3$ %, με την εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με είτε 2 , είτε 4 U/mL, έπειτα από 2 h ή 45 min ενζυμικής αντίδρασης, αντίστοιχα. Ο βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης ανήλθε σε $40,5 \pm 2,1$ και $46,0 \pm 0,9$ %, στην κάθε περίπτωση.

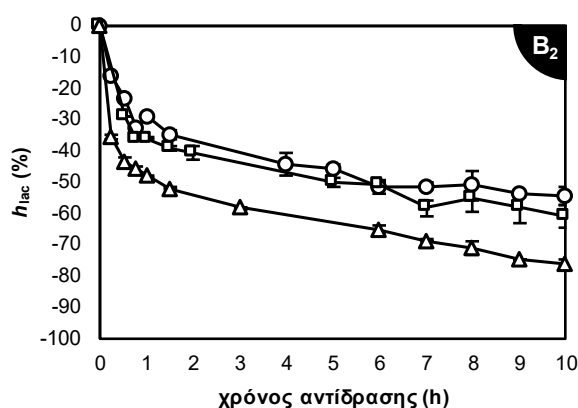
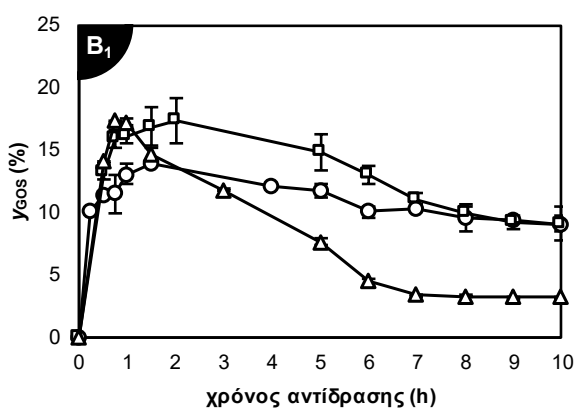
Στην περίπτωση χρήσης του περισσότερο συμπυκνωμένου τυρογάλακτος με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v, οι βαθμοί απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκαν ήταν ακόμα υψηλότεροι. Ωστόσο, για μεγιστοποίηση των συγκεντρώσεων σε GOS στα αντιδρώντα συστήματα απαιτήθηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι αντίδρασης σε αυτήν την περίπτωση, γεγονός αναμενόμενο καθώς η ταχύτητα της αντίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Shuler & Kargi, 2002). Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε σε αυτήν την περίπτωση ήταν ίσος με $17,9 \pm 1,6$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 2 U/mL, έπειτα από 1 h, με τον αντίστοιχο βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης να ανέρχεται σε $35,5 \pm 2,0$ %.

Οι Urrutia et al. (2013) και Jenab et al. (2018) μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης από τον μύκητα *A. oryzae* σε καθαρά διαλύματα λακτόζης με αρχική περιεκτικότητα ίση με 40 % w/v και ανέφεραν μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS ίσους με 26,8 και 23,0 %, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, αλλά η λακτάση από τον *A. oryzae* εφαρμόστηκε σε διαλύματα με πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις λακτόζης. Από την άλλη, οι Simonić et al. (2019) μελέτησαν την εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης από τον *A. oryzae* σε συμπυκνωμένο γλυκό ορό (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 40 % w/v) για παραγωγή GOS, αλλά ανέφεραν χαμηλότερους μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS από αυτές της παρούσας μελέτης, έως και 15,5 % (υψηλότερη αναφερόμενη συγκέντρωση GOS 62 g/L).



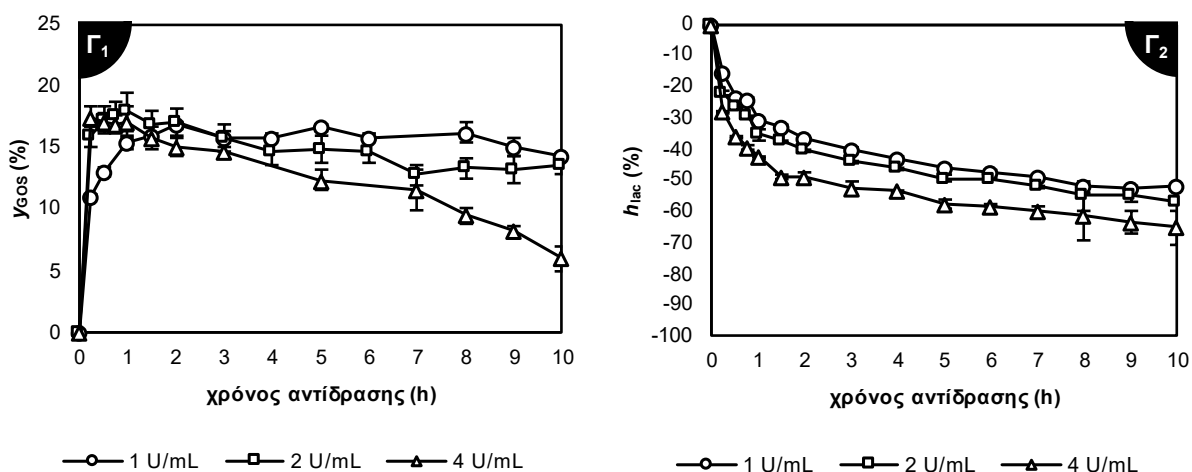
—◇— 0,5 U/mL —○— 1 U/mL —□— 2 U/mL

—◇— 0,5 U/mL —○— 1 U/mL —□— 2 U/mL



—○— 1 U/mL —□— 2 U/mL —▲— 4 U/mL

—○— 1 U/mL —□— 2 U/mL —▲— 4 U/mL



Σχήμα 6.22. Μεταβολή (1) του βαθμού απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (γ_{GOS}) και (2) του βαθμού υδρόλυσης της λακτόζης (h_{lac}) συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης με χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με (Α) 5,1 % W/v , (Β) 10 % W/v και (Γ) 15 % W/v .

6.4.3. Σύνοψη αποτελεσμάτων – Βέλτιστες συνθήκες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από γλυκό ορό αιγοπρόβειας προέλευσης

Στον Πίνακα 6.13 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης, με εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *Kluyveromyces lactis* και *Aspergillus oryzae*. Συνολικά, βέλτιστη παραγωγικότητα σε ολιγοσακχαρίτες παρουσίασε η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, με τον βαθμό απόδοσης σε GOS να ανέρχεται σε $17,9 \pm 1,6$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου ίσου με 2 U/mL, έπειτα από 1 h, με τον αντίστοιχο βαθμό υδρόλυσης της λακτόζης να ανέρχεται σε $35,5 \pm 2,0$ %. Αυτή η τιμή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερη από αυτήν που επιτεύχθηκε με την εφαρμογή της λακτάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στο ίδιο υπόστρωμα ($21,7 \pm 0,2$ %). Ως εκ τούτου, από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, το τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή αποτελεί πιο ευνοϊκό υπόστρωμα για τη δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *K. lactis*, σε σύγκριση με αυτήν από τον μύκητα *A. oryzae*, οδηγώντας σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε GOS.

Πίνακας 6.13. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες ($\gamma_{GOS(max)}$), χρόνος ενζυμικής αντίδρασης για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ($t_{GOS(max)}$) και βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης κατά τον χρόνο επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS (h_{lac}) για όλα τα

συστήματα παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαρίτων από τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης που μελετήθηκαν.

Προέλευση β-γαλακτοζιδάσης	T (°C)	pH	c _{lac(0)} (% w/v)	A _E (U/mL)	y _{GOS(max)} (%)	t _{GOS(max)} (h)	h _{lac} (%)	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	35	7,2	5,1	0,03	9,41 ± 0,22 ^b	4	91,8 ± 2,4	
				0,06	9,64 ± 1,09 ^b	2	86,9 ± 5,4	
				0,13	7,99 ± 0,55 ^a	0.75	83,8 ± 0,1	
			10	0,03	16,5 ± 0,7 ^{fg}	8	85,3 ± 4,3	
				0,06	13,4 ± 0,3 ^{de}	3	87,1 ± 0,3	
				0,13	16,1 ± 0,5 ^f	2	89,5 ± 0,1	
				0,03	18,3 ± 0,5 ^h	8	85,5 ± 1,9	
				15	0,06	20,3 ± 0,3 ⁱ	7	92,3 ± 1,2
					0,13	21,7 ± 0,2^j	5	95,6 ± 1,5
					0,5	12,4 ± 0,7 ^{cd}	1	22,3 ± 0,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	45	4,5	5,1	1	11,8 ± 0,6 ^c	1	30,1 ± 0,4	
				2	11,4 ± 0,8 ^c	0.25	26,7 ± 0,3	
				1	14,0 ± 0,1 ^e	1.5	34,8 ± 1,3	
			10	2	17,3 ± 1,8 ^{fgh}	2	40,5 ± 2,1	
				4	17,3 ± 0,1 ^{fgh}	0.75	46,0 ± 0,9	
				1	16,8 ± 0,3 ^{fg}	2	36,5 ± 0,1	
				2	17,9 ± 1,6^{gh}	1	35,5 ± 2,0	
			15	4	17,5 ± 0,8 ^{fgh}	0.25	27,7 ± 0,1	

c_{lac(0)}: αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη, A_E: ενζυμικό φορτίο

Τα διαφορετικά γράμματα στους εκθέτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (± τυπική απόκλιση) των μέγιστων βαθμών απόδοσης (y_{GOS(max)}), σύμφωνα με την δοκιμασία σύγκρισης μέσων τιμών Duncan's post hoc για επίπεδο σημαντικότητας ίσο με α = 0.05.

6.4.4. Ανάλυση της σύστασης των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαρίτων από γλυκό ορό αιγοπρόβειας προέλευσης στις βέλτιστες συνθήκες

Όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του όξινου ορού γιαουρτιού, η εφαρμογή διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσης στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης οδήγησε στην παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαρίτων όχι μόνο με διαφορετικές αποδόσεις, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, αλλά και στην παραγωγή ενός μείγματος ολιγοσακχαρίτων με διαφορετική σύσταση σε σάκχαρα. Στο Σχήμα 6.23 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα HPAEC-PAD των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των δύο βιομηχανικών λακτασών από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae* στο τυρόγαλα, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης που οδήγησαν στη μεγιστοποίηση των βαθμών απόδοσης σε GOS, όπως παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες.

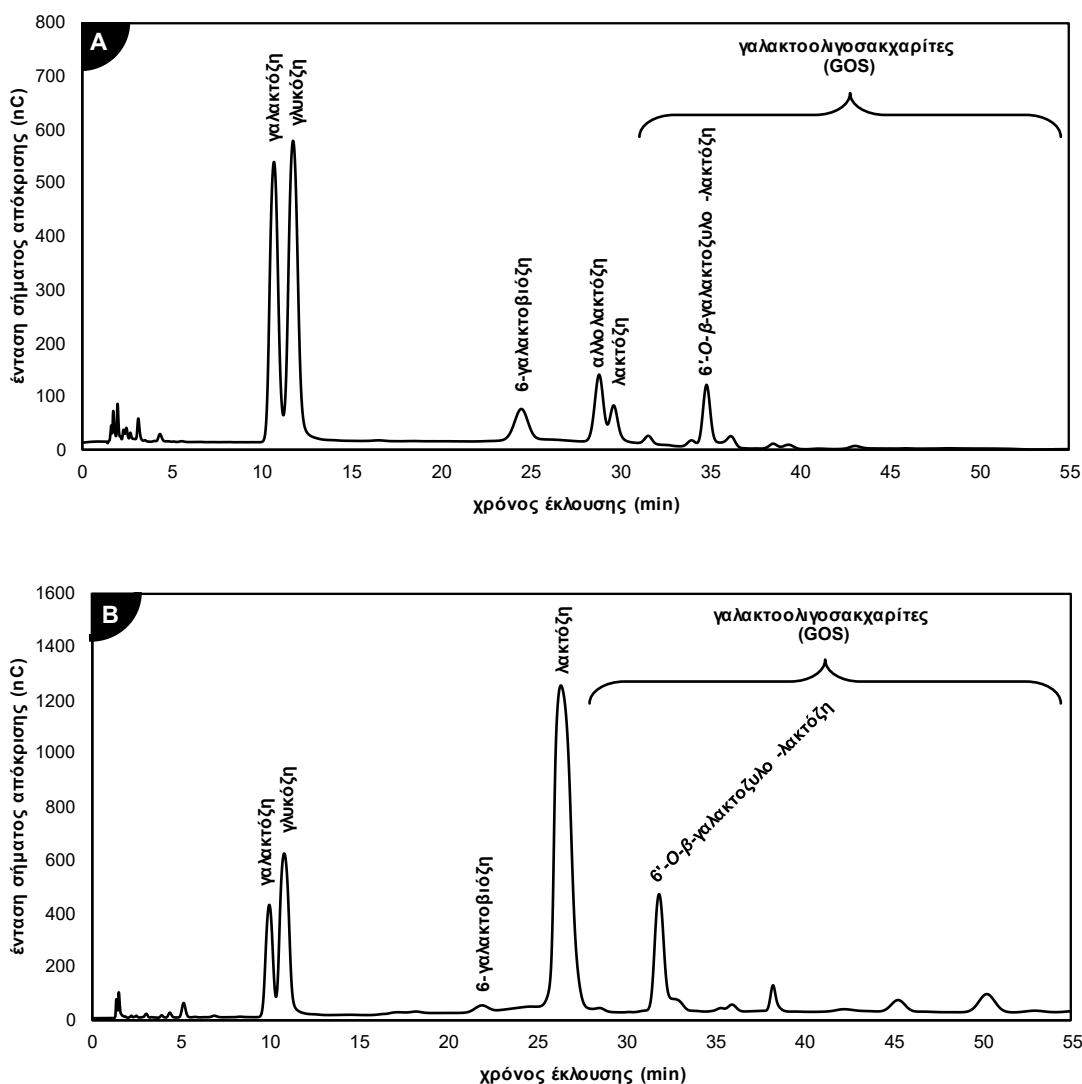
Ο κύριος ολιγοσακχαρίτης που συνετέθη και από τα δύο ένζυμα ανιχνεύθηκε, κατά μέσο όρο, στα 35,6 min έκλουσης και θεωρείται ότι πρόκειται για τον τρισακχαρίτη 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, με βάση τα ευρήματα άλλων ερευνών στο ίδιο θέμα που

παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία (Urrutia et al., 2013; Yin et al., 2017). Το δεύτερο σε παραγωγικότητα προϊόν τρανσγαλακτοζυλίωσης που ανιχνεύθηκε ήταν ο δισακχαρίτης 6-γαλακτοβιόζη, ο οποίος ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπο σάκχαρο. Τέλος, ο τρίτος κύριος ολιγοσακχαρίτης στο μείγμα των GOS που προέκυψε ήταν η αλλολακτόζη, ένας δισακχαρίτης με δομικές μονάδες γαλακτόζη και γλυκόζη, ενωμένες με β -1 \rightarrow 6 γλυκοζιδικό δεσμό. Η εφαρμογή, λοιπόν, της β -γαλακτοζιδάσης από τη ζύμη *K. lactis* στο τυρόγαλα οδήγησε στην παραγωγή ενός μείγματος GOS με διαφορετικές αναλογίες στους τρεις κύριους ολιγοσακχαρίτες που ταυτοποιήθηκαν, όπως και στα υπόλοιπα XX προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης που ανιχνεύθηκαν, σε σύγκριση με το μείγμα GOS που προέκυψε από την εφαρμογή της β -γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *A. oryzae*.

Η λακτάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis* παρατηρήθηκε ότι διασπά ταχύτερα τη λακτόζη και οδηγεί στην παραγωγή υψηλότερων ποσοστών 6-γαλακτοβιόζης και αλλολακτόζης και χαμηλότερων ποσοστών 6'-O- β -γαλακτοζυλο-λακτόζης. Αντιθέτως, η β -γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* συνθέτει περισσότερη 6'-O- β -γαλακτοζυλο-λακτόζη και λιγότερη 6-γαλακτοβιόζη και αλλολακτόζη. Συγκεκριμένα, στις βέλτιστες συνθήκες παραγωγικότητας GOS χρησιμοποιώντας τη β -γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *K. lactis* στο τυρόγαλα (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 15 % w/v, ενζυμικό φορτίο 0,13 U/mL, 5 h αντίδρασης, 35 °C, pH = 7,2), από την ενζυμική αντίδραση προέκυψε ένα μείγμα GOS αποτελούμενο από 31,6 % 6'-O- β -γαλακτοζυλο-λακτόζη, 21,6 % αλλολακτόζη και 14,8 % 6-γαλακτοβιόζη, στη βάση των συνολικών GOS που παράχθηκαν. Ο αντίστοιχος βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης ανήλθε σε 95,6 %. Από την άλλη μεριά, η εφαρμογή της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* στο τυρόγαλα, στις βέλτιστες συνθήκες παραγωγικότητας GOS για αυτό το ένζυμο (αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη 15 % w/v, ενζυμικό φορτίο 2 U/mL, 1 h αντίδρασης, 45 °C, pH = 4,5), οδήγησε στην παραγωγή ενός μείγματος GOS αποτελούμενο από 68,0 % 6'-O- β -γαλακτοζυλο-λακτόζη, μόλις 2,05 % 6-γαλακτοβιόζη, ενώ δεν ανιχνεύθηκε αλλολακτόζη. Επίσης, ο αντίστοιχος βαθμός υδρόλυσης της λακτόζης ήταν χαμηλότερος στην περίπτωση αυτή, σε σύγκριση με την περίπτωση της β -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, προσδιορισμένος σε μόλις 35,5 %.

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Rico-Rodríguez et al. (2021) ερευνήθηκε η χρήση λακτάσης που προέρχεται από τους μικροοργανισμούς *A. oryzae* και *K. lactis*, τόσο μεμονωμένα όσο και ταυτόχρονα, σε ενζυμικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν καθαρή λακτόζη και γλυκό ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 40 % w/w.

Τα ευρήματά τους αποκάλυψαν ότι κατά τη χρήση καθαρής λακτόζης, μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS ανήλθαν σε 32,7 και 41,7 % της συνολικής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, όταν χρησιμοποιήθηκαν οι β-γαλακτοσιδάσες από τον *A. oryzae* και τον *K. lactis*, αντίστοιχα. Όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκός ορός, οι αντίστοιχοι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS ήταν 35,6 και 29,6 % του συνόλου των υδατανθράκων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη χρήση των ενζύμων οδήγησε στην παραγωγή συγκρίσιμων ποσοτήτων GOS με αυτές που παράχθηκαν όταν τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν χωριστά, ωστόσο υπήρχαν αξιοσημείωτες διακρίσεις στα προφίλ των παραγόμενων GOS, κυρίως όσον αφορά στον βαθμό πολυμερισμού τους.



Σχήμα 6.23. Χρωματογραφήματα από την ανάλυση στο σύστημα HPAEC-PAD των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης που προέκυψαν από την εφαρμογή των β-γαλακτοζιδασών από τους μικροοργανισμούς (A) *Kluyveromyces lactis* (αραίωση δείγματος 1:800) και (B) *Aspergillus oryzae* (αραίωση δείγματος 1:200) στο τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι κορυφές της αλλολακτόζης και της 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζης ταυτοποιήθηκαν με βάση την μελέτη από τους Urrutia et al. (2013) που ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία για τον διαχωρισμό των γαλακτοολιγοσακχαριτών.

6.5. Επίδραση των συστατικών του όξινου και γλυκού ορού και των γαλακτοολιγοσακχαριτών στο φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης

6.5.1. Επίδραση της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ

6.5.1.1. Δυναμικές καμπύλες ρόφησης νερού

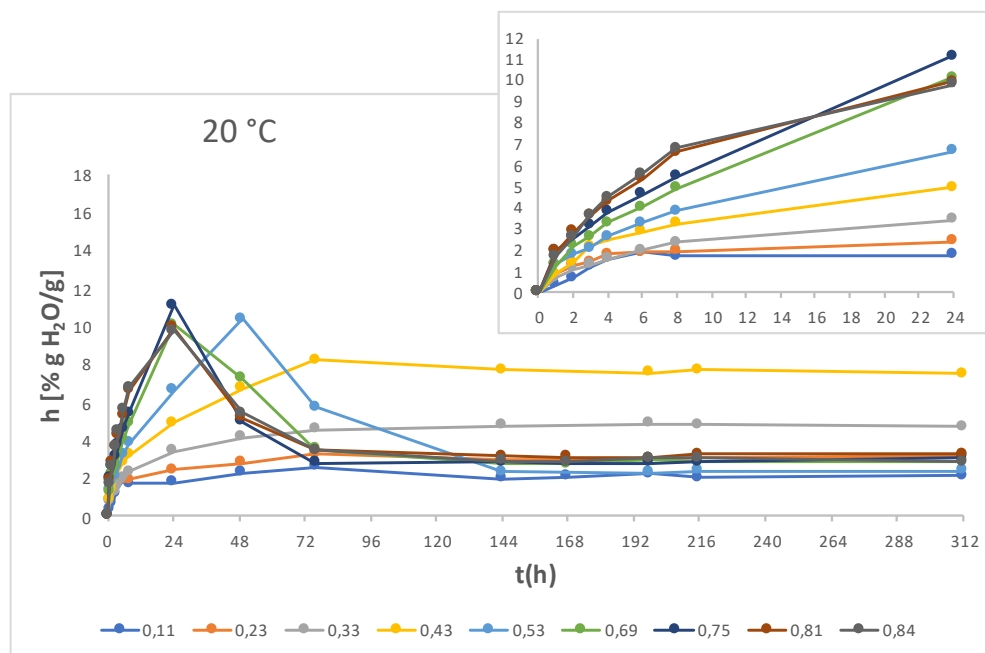
Από την καταγραφή της μεταβολής του βάρους των πρότυπων μιγμάτων λακτόζης-γαλακτικού οξέος σε περιβάλλοντα ενεργότητας νερού από 0,11 έως και 0,97 και θερμοκρασίας από 20 έως 50°C, για χρονικό διάστημα έως 15 ημερών, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 4.6.1, προέκυψαν τα συγκεντρωτικά διαγράμματα περιεχόμενου νερού συναρτήσει του χρόνου που παρουσιάζονται παρακάτω. Στα διαγράμματα που ακολουθούν δεν απεικονίζεται η ενεργότητα 0,97, καθώς σε αυτή την τιμή παρατηρήθηκε υγροποίηση του νερού και διάλυση της λακτόζης σε αυτό, με αποτέλεσμα η περιεχόμενη υγρασία να αυξάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των μετρήσεων.

Το κάθε ένα από τα διαγράμματα που ακολουθούν αναφέρεται σε περιεκτικότητες 0, 5, 10, 15 και 20% w/w σε γαλακτικό οξύ αντίστοιχα. Δίπλα από κάθε συγκεντρωτικό διάγραμμα ρόφησης νερού για το συνολικό χρονικό διάστημα καταγραφής, παρατίθεται και ένα διάγραμμα που εστιάζει στις πρώτες 24 h του φαινομένου, διάστημα στο οποίο λαμβάνουν χώρα πιο έντονα τα φαινόμενα ρόφησης ή/και κρυστάλλωσης της λακτόζης, για την καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας.

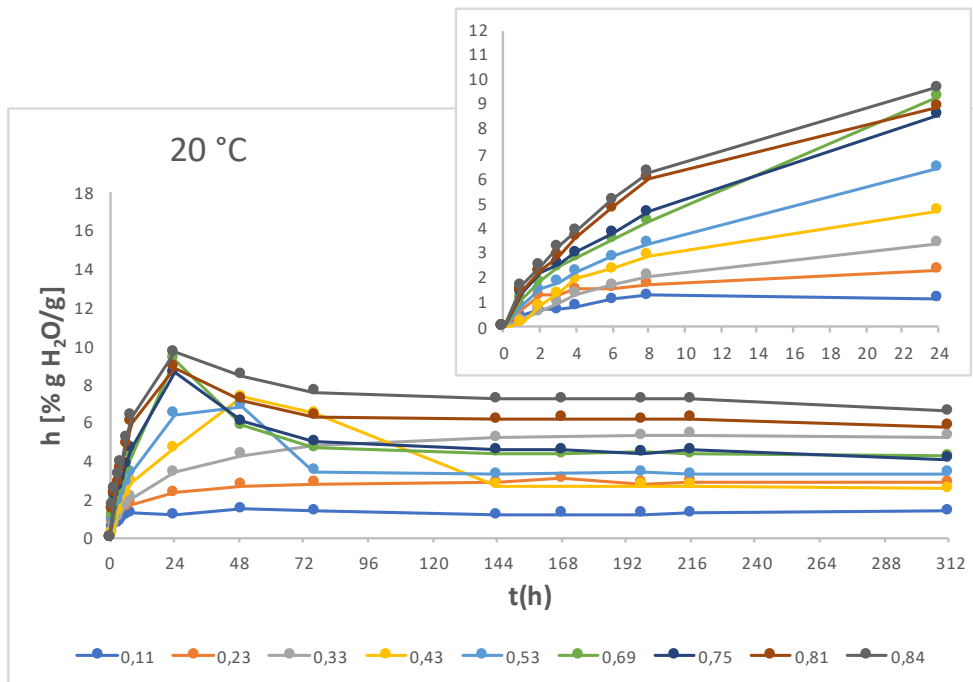
Για τη θερμοκρασία των 20 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 3-7. Από τα διαγράμματα 4-7, αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας παρατηρείται κυρίως τις πρώτες 24 h. Για μικρή περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος (0-5% w/w), για ενεργότητες 0,11-0,43 δεν παρατηρείται απώλεια της προσροφημένης υγρασίας σε καμία χρονική στιγμή, έως τις 15 ημέρες αποθήκευσης. Επομένως, σε αυτές τις συνθήκες δεν πραγματοποιείται κρυστάλλωση της λακτόζης. Η κρυστάλλωση λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας νερού.

Πιο συγκεκριμένα, για μηδενική περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος (καθαρή λακτόζη) παρατηρείται απώλεια της προσροφημένης υγρασίας, για $a_w = 0,53$ μετά τις 48 h, ενώ για $a_w \geq 0,69$ το φαινόμενο της κρυστάλλωσης ξεκινάει μετά τις 24 h αποθήκευσης. Σε περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος ίση με 5% w/w ως προς την περιεχόμενη λακτόζη, η κρυστάλλωση αρχίζει για τιμές ενεργότητας νερού (a_w) ίσες με 0,43, 0,53 και 0,69 μετά τις 48 h, ενώ για μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας νερού το

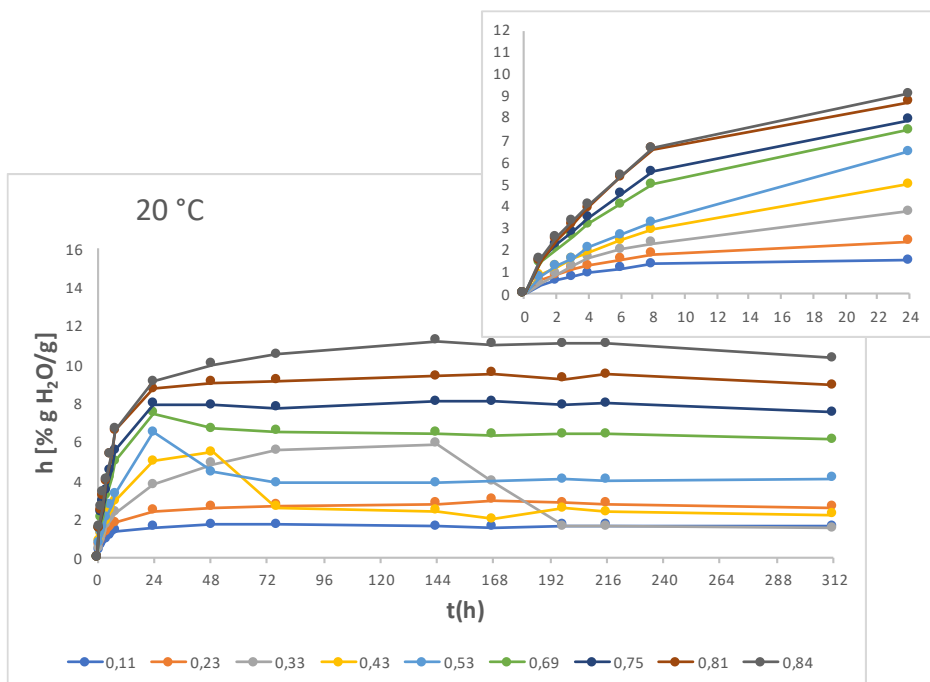
φαινόμενο παρατηρείται μετά τις 24 h. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του γαλακτικού οξέος σε 10, 15 και 20% w/w, η προσροφημένη υγρασία αρχίζει να χάνεται για τιμές ενεργότητας νερού (a_w) ίσες ή μεγαλύτερες από 0,33. Για τιμές ενεργότητας νερού (a_w) ίσες ή μεγαλύτερες από 0,69 δεν παρατηρείται απώλεια υγρασίας σε καμία χρονική στιγμή καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης των προτύπων συστημάτων λακτόζης-γαλακτικού οξέος. Σε αυτά τα συστήματα, η υψηλή περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητας αυτού, οδηγεί σε ολοένα μεγαλύτερη απορρόφηση νερού, η οποία είναι τόσο ραγδαία, ώστε να υπερκαλύπτει την απώλεια υγρασίας λόγω κρυστάλλωσης της λακτόζης, κατά τις πρώτες ώρες αποθήκευσης. Γι' αυτό και στις δυναμικές καμπύλες ρόφησης νερού δεν παρατηρείται το χαρακτηριστικό "σπάσιμο" που υποδηλώνει απώλεια υγρασίας, συνεπώς κρυστάλλωση της λακτόζης. Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται ότι τις τελευταίες ώρες αποθήκευσης, σε όλες τις ενεργότητες σταθεροποιείται η περιεχόμενη υγρασία.



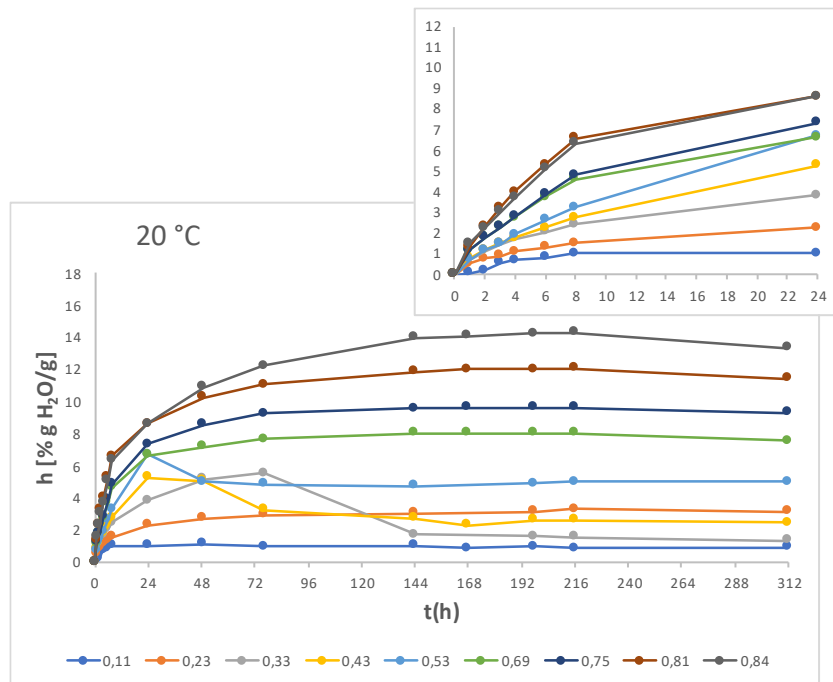
Σχήμα 6.24. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπύλων ρόφησης, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.



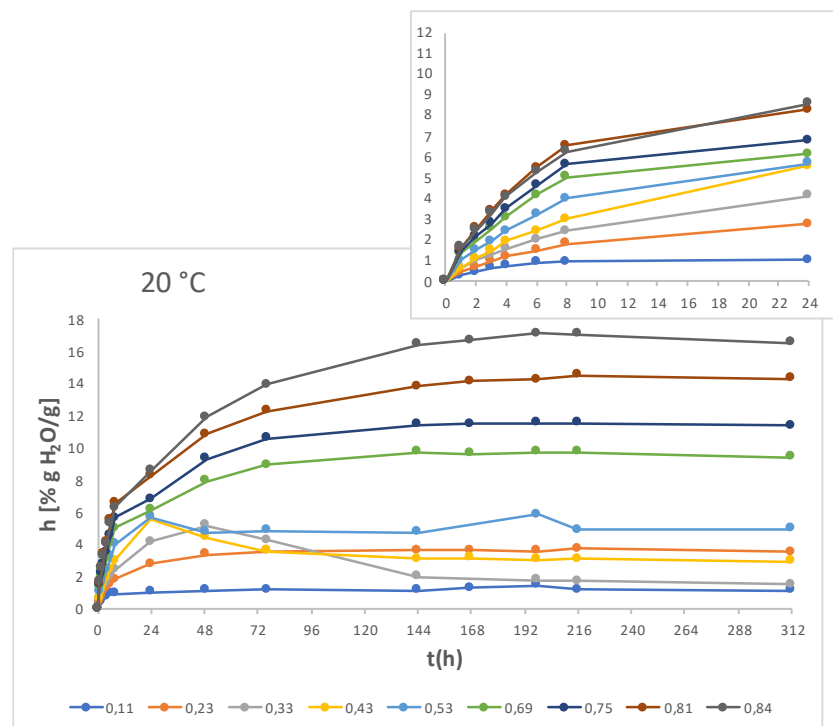
Σχήμα 6.25. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.



Σχήμα 6.26. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.



Σχήμα 6.27. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.

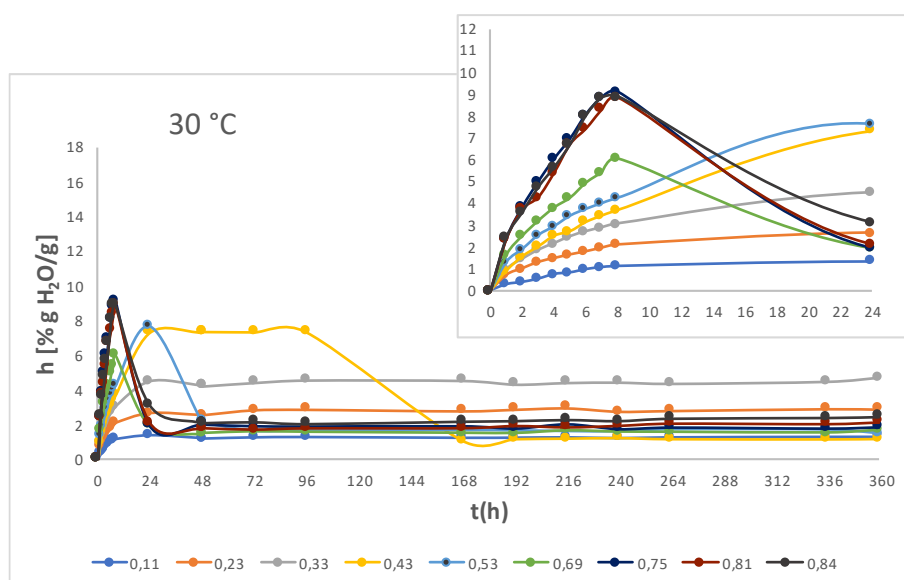


Σχήμα 6.28. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 20 °C.

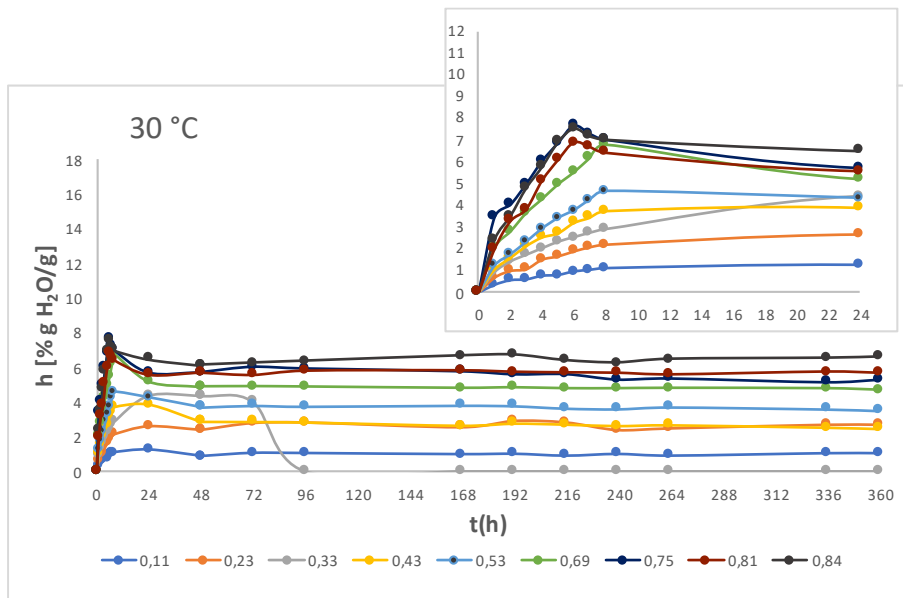
Για τη θερμοκρασία των 30 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 8-12. Από τα διαγράμματα 8-12, αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας παρατηρείται κυρίως τις πρώτες 24 h. Για μικρή περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος (0-5% w/w), για ενεργότητες 0,11-0,33

δεν παρατηρείται απώλεια της προσροφημένης υγρασίας σε καμία χρονική στιγμή, έως τις 15 ημέρες αποθήκευσης. Επομένως, σε αυτές τις συνθήκες δεν πραγματοποιείται κρυστάλλωση της λακτόζης. Η κρυστάλλωση λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας νερού.

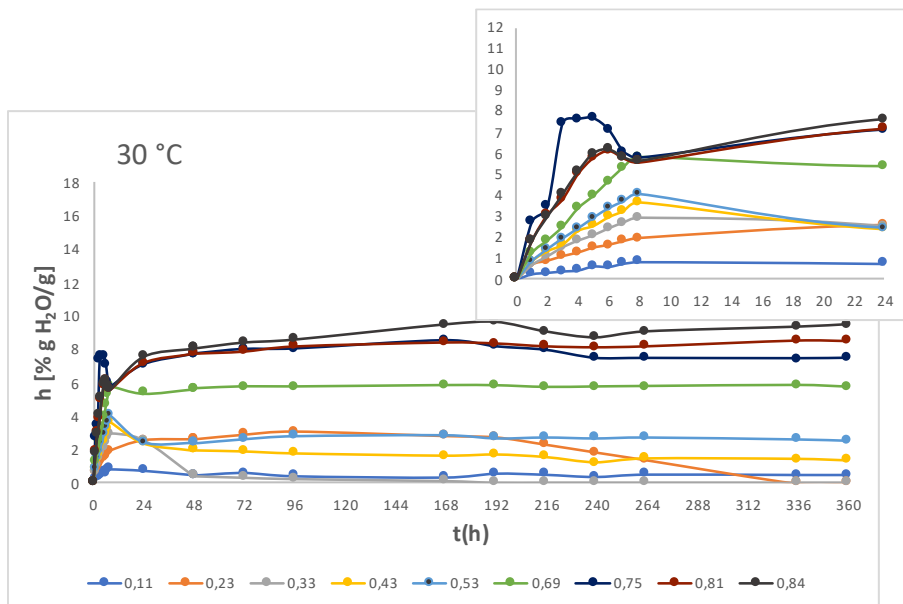
Πιο συγκεκριμένα, για μηδενική περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος (καθαρή λακτόζη) παρατηρείται απώλεια της προσροφημένης υγρασίας, για $a_w = 0,43$ μετά τις 96 h, για $a_w = 0,53$ μετά τις 24 h, ενώ για $a_w \geq 0,69$ το φαινόμενο της κρυστάλλωσης ξεκινάει μετά τις 8 h αποθήκευσης. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του γαλακτικού οξέος σε 5% και 10%, η προσροφημένη υγρασία χάνεται ταχύτερα και μέχρι τις πρώτες 24 h έχει πραγματοποιηθεί. Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται ότι τις τελευταίες ώρες αποθήκευσης, σε όλες τις ενεργότητες σταθεροποιείται η περιεχόμενη υγρασία.



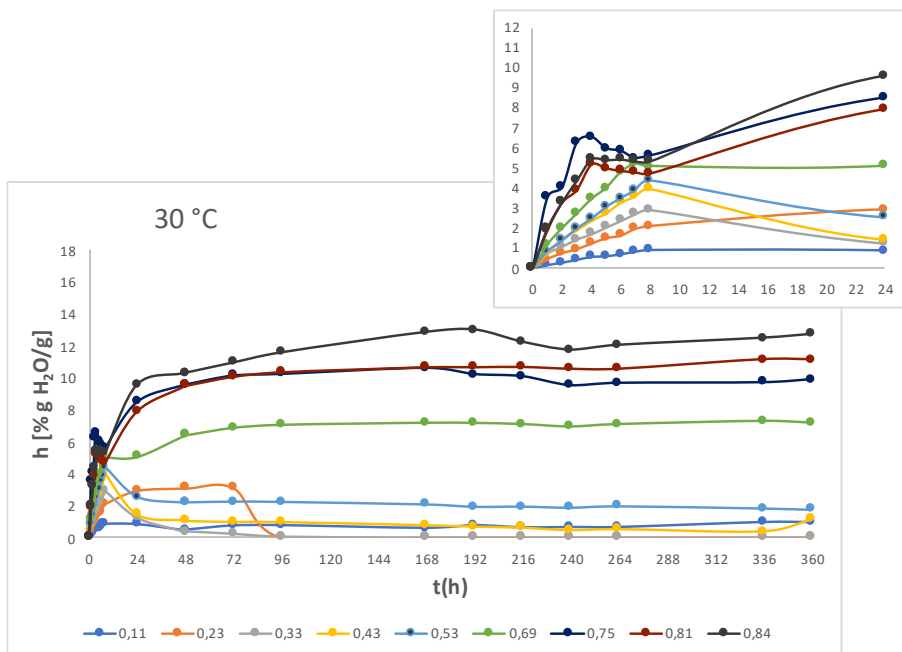
Σχήμα 6.29. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.



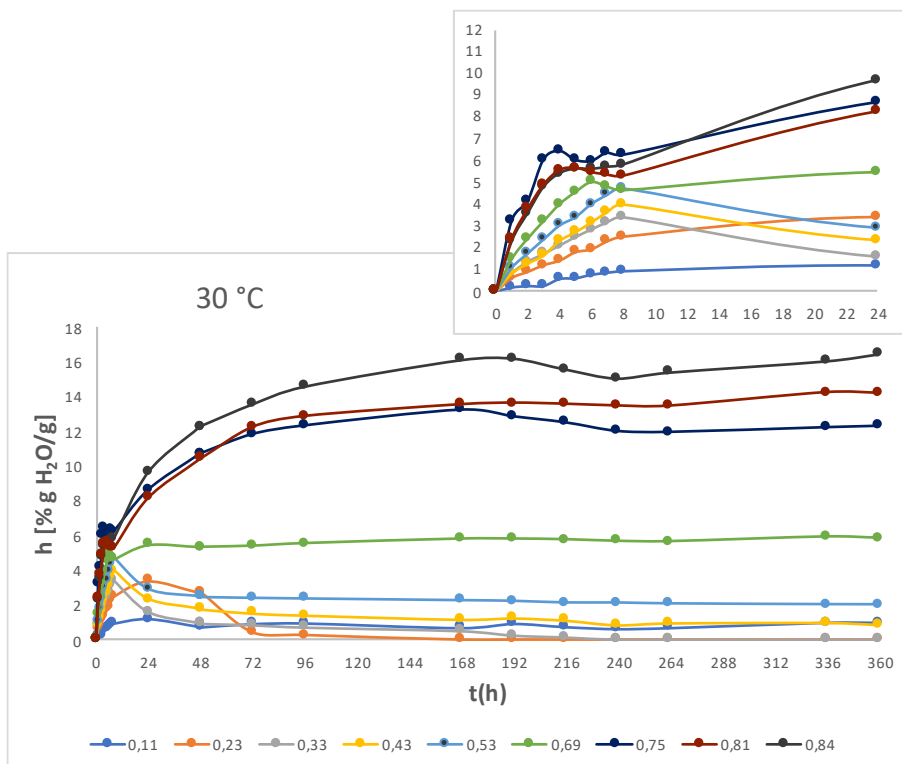
Σχήμα 6.30. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.



Σχήμα 6.31. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.



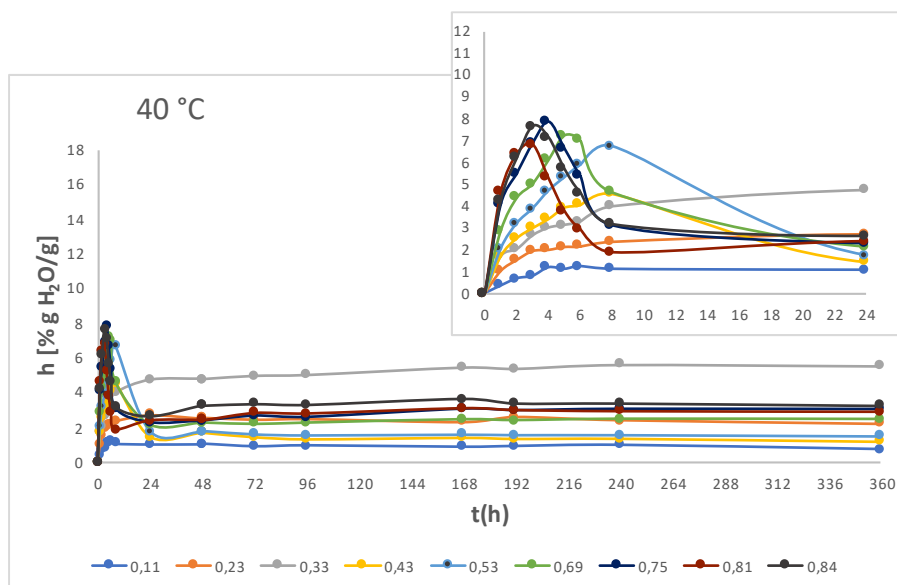
Σχήμα 6.32. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.



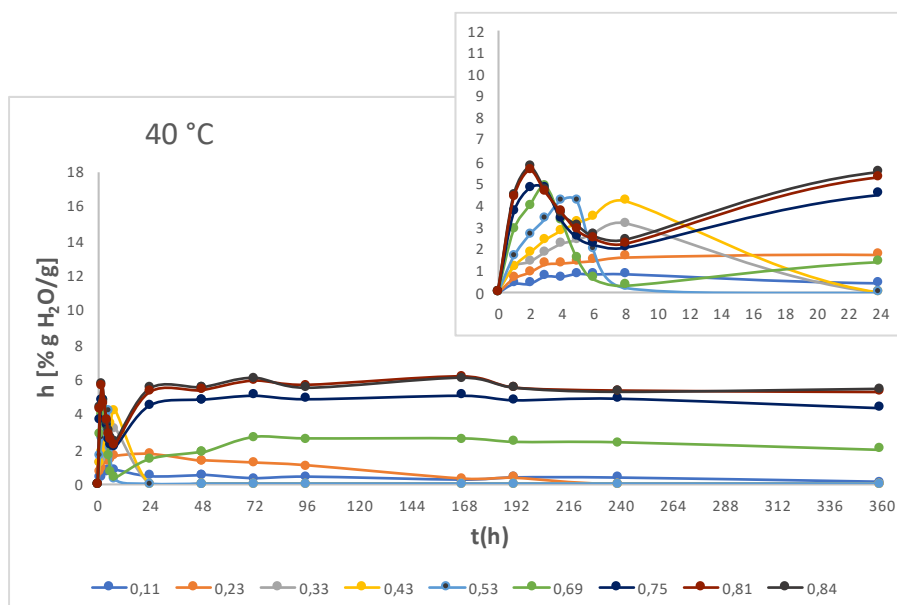
Σχήμα 6.33. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 30 °C.

Για τη θερμοκρασία των 40 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 13-17. Από τα διαγράμματα 13-17, αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας παρατηρείται κυρίως τις πρώτες 8 h.

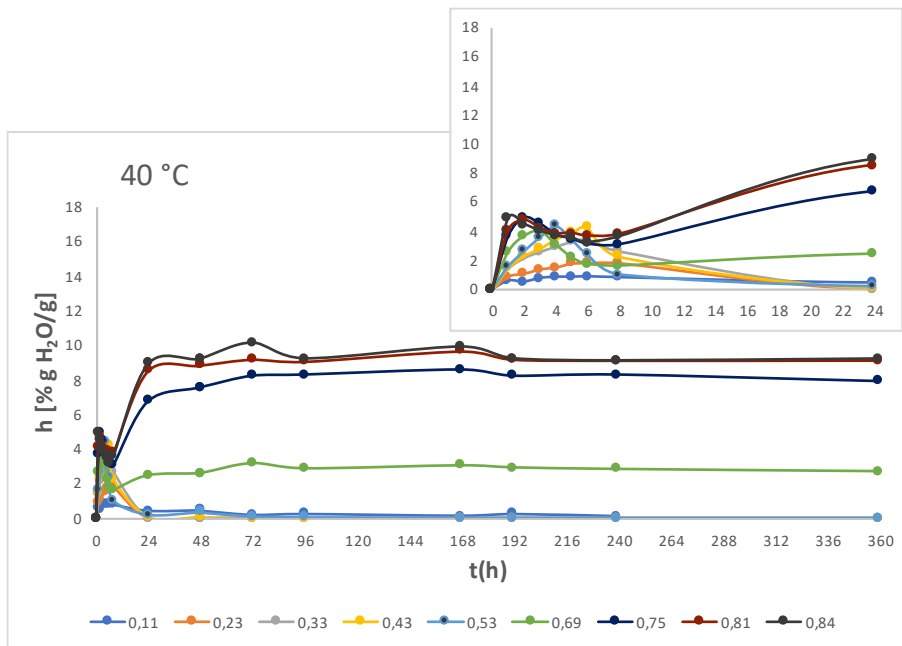
Ειδικότερα, όταν δεν υπάρχει καθόλου γαλακτικό οξύ η κρυστάλλωση λαμβάνει χώρα σε τιμή ενεργότητας 0,43 μετά τις 8 h και για μεγαλύτερες τιμές ενεργοτήτων το φαινόμενο πραγματοποιείται ακόμη νωρίτερα, μετά τις 4-6 h. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του γαλακτικού οξέος σε 15-20% w/w, η κρυστάλλωση της λακτόζης έχει πραγματοποιηθεί έως τις πρώτες 8 h. Σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται ότι τις τελευταίες ώρες αποθήκευσης, σε όλες τις ενεργότητες σταθεροποιείται η περιεχόμενη υγρασία.



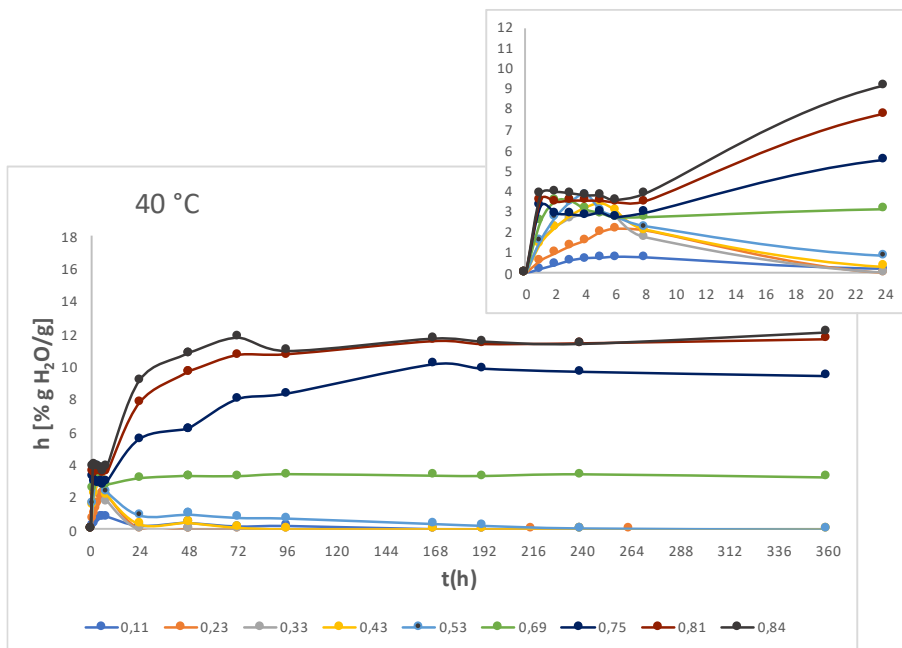
Σχήμα 6.34. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.



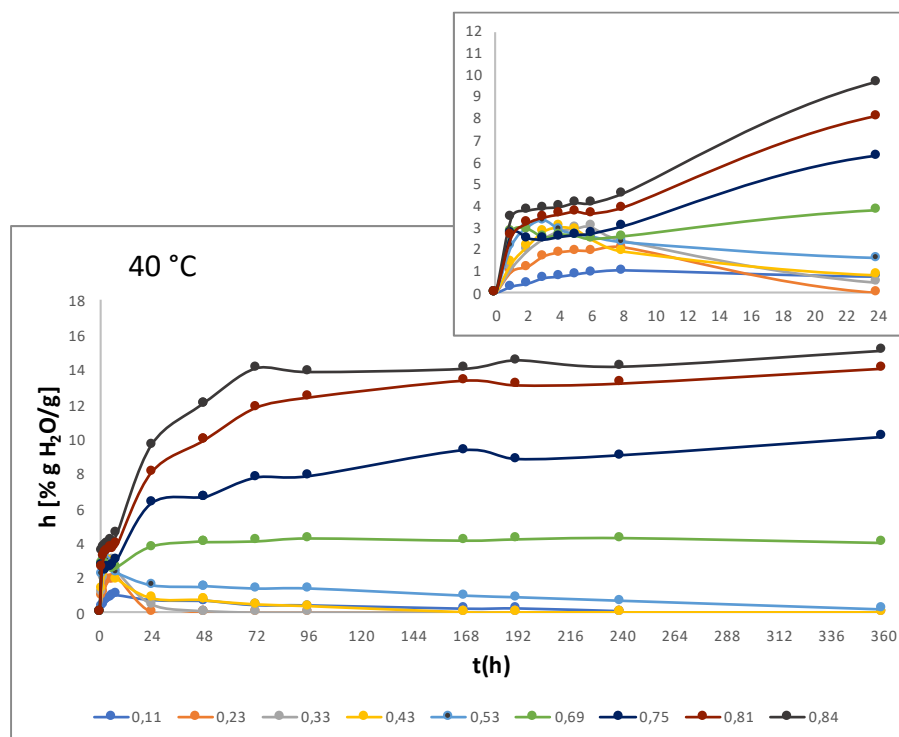
Σχήμα 6.35. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.



Σχήμα 6.36. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.



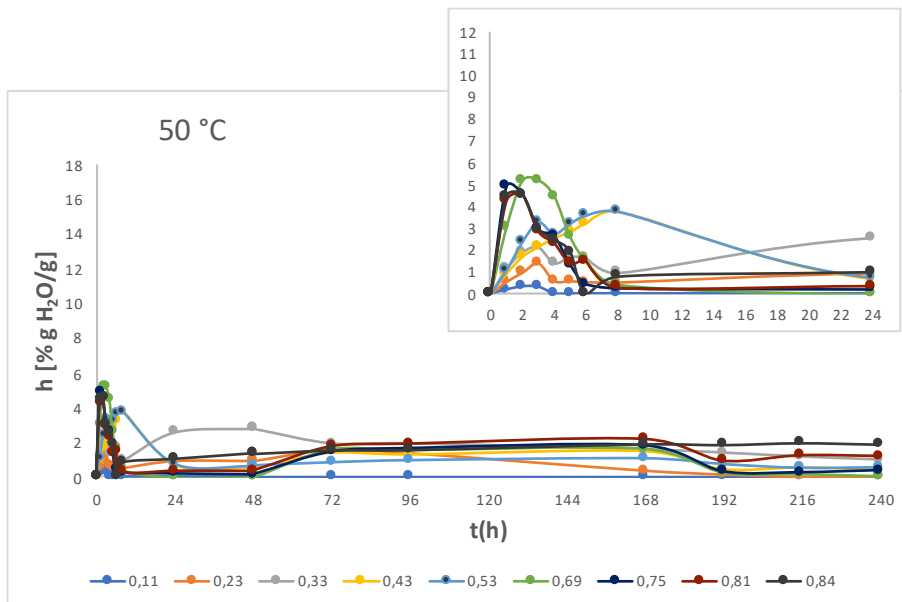
Σχήμα 6.37. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.



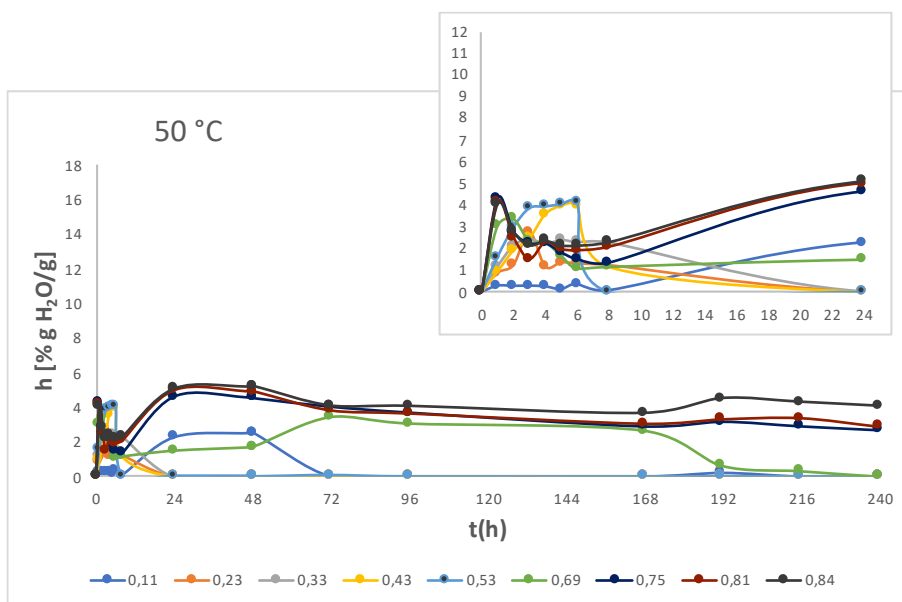
Σχήμα 6.38. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% γαλακτικό οξύ στους 40 °C.

Για τη θερμοκρασία των 50 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 18-21. Από τα διαγράμματα 14-21, υπάρχει μικρότερη αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας κυρίως τις πρώτες 8 ώρες, συγκριτικά με τα διαγραμμάτων των θερμοκρασιών 20-40 °C.

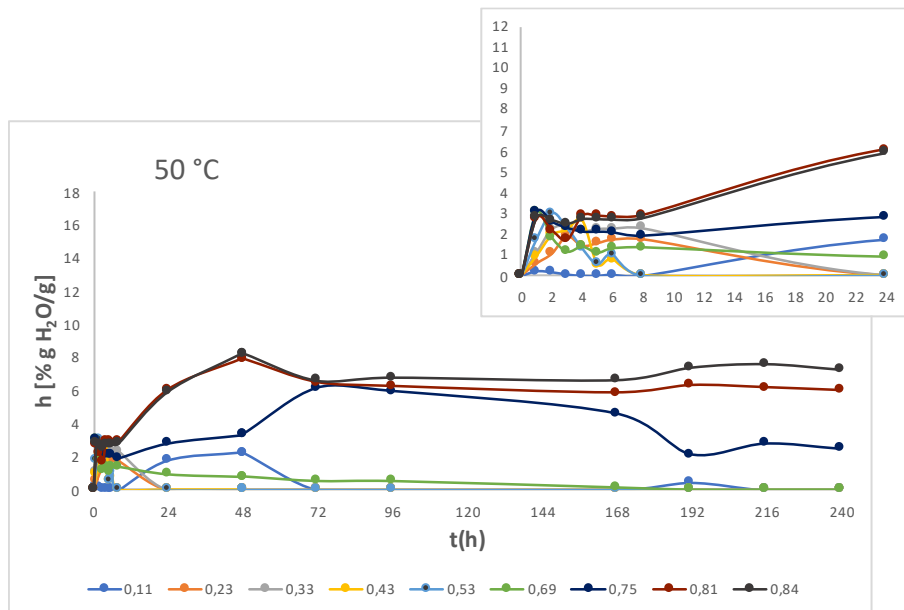
Συγκεκριμένα, όταν δεν υπάρχει καθόλου γαλακτικό οξύ η κρυστάλλωση διακρίνεται σε τιμή ενεργότητας 0,43 και 0,53 μετά τις 8 h και για μεγαλύτερες τιμές ενεργοτήτων το φαινόμενο πραγματοποιείται ακόμη νωρίτερα, μετά τις 2-4 h. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, το φαινόμενο παρατηρείται και για τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες ή ίσες από 0,11. Πιο συγκεκριμένα, για περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ 5 % w/w, σε τιμή ενεργότητας 0,11 η απώλεια της προσροφημένης υγρασίας πραγματοποιείται μετά τις 48 h, σε τιμή 0,23 και 0,33 μετά τις 5 h, ενώ για τις υπόλοιπες ενεργότητες το φαινόμενο επιταχύνεται. Για μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ στην τιμή ενεργότητας 0,11 η κρυστάλλωση λαμβάνει χώρα ταχύτερα, μετά τις 24 h και σε ενεργότητα 0,23 μετά τις 3 h.



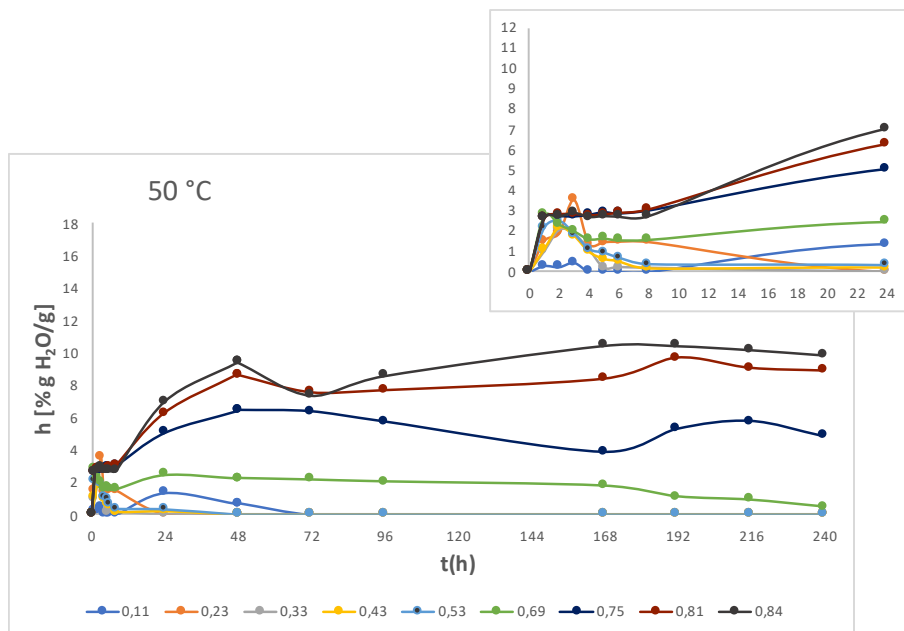
Σχήμα 6.39. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.



Σχήμα 6.40. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.



Σχήμα 6.41. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.



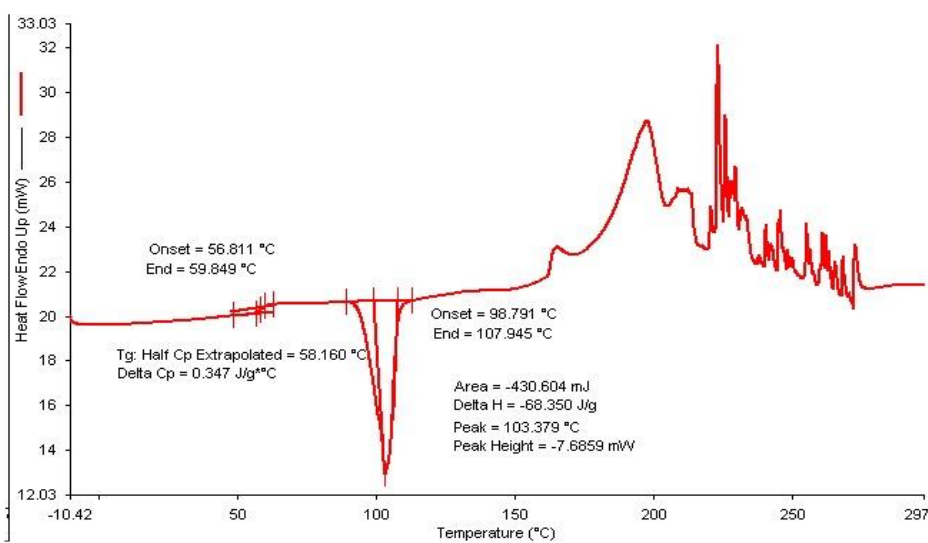
Σχήμα 6.42. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% γαλακτικό οξύ στους 50 °C.

Συνολικά, στα διαγράμματα 3-21 το φαινόμενο της κρυστάλλωσης παρατηρείται για τιμές ενεργότητας 0,43 και μεγαλύτερες από αυτή. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του γαλακτικού οξέος, κυρίως σε 10-20% w/w, η κρυστάλλωση επιταχύνεται. Σε τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες από 0,69, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος και ενώ η κρυστάλλωση συμβαίνει νωρίτερα, η απώλεια της προσροφημένης υγρασίας δεν είναι εμφανής στα διαγράμματα. Αυτό οφείλεται στην υπερκάλυψη της

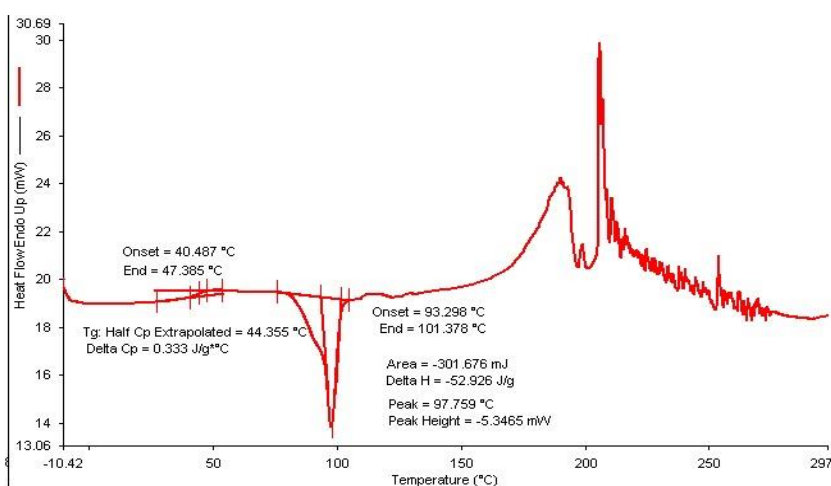
απώλειας υγρασίας λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητας του συστήματος που οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση νερού. Με την αύξηση της θερμοκρασίας η έναρξη της κρυστάλλωσης επίσης επιταχύνεται.

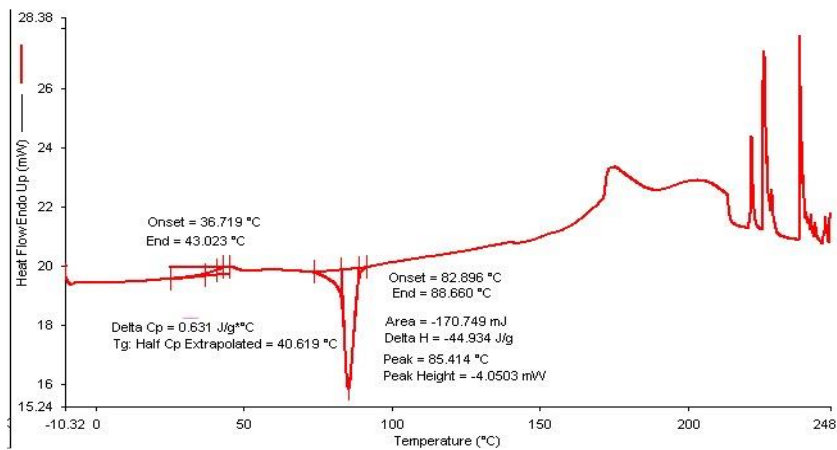
6.5.1.2. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα θερμογραφήματα που προέκυψαν από τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης για δείγματα λακτόζης- γαλακτικού οξέος για θερμοκρασίες 20 και 30 °C. Τα θερμογραφήματα των ενδιάμεσων μετρήσεων παρατίθενται στο Παράρτημα.



Σχήμα 6.43: Θερμογράφημα για λακτόζη- 5% w/w γαλακτικό οξύ (0 d αποθήκευσης).

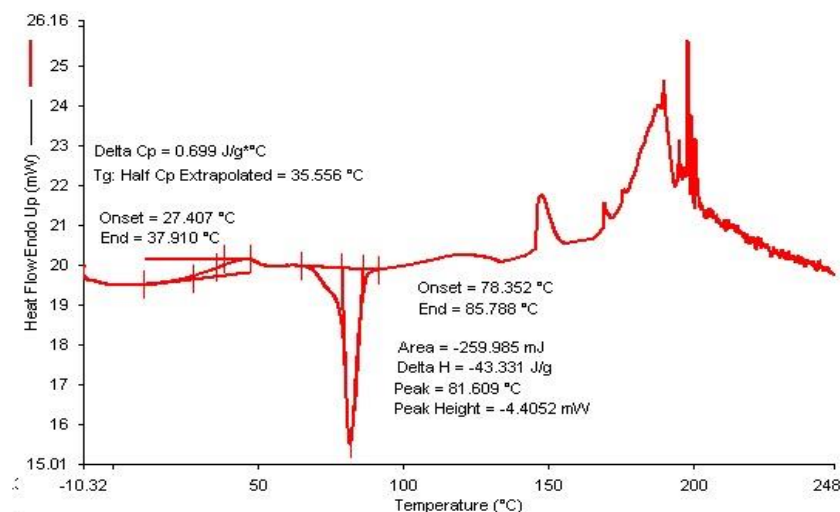


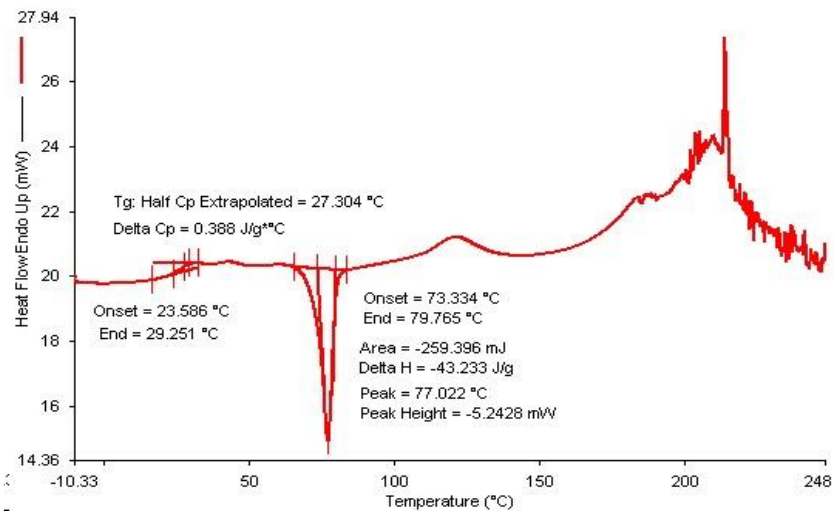


Σχήμα 6.44: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ (0 d αποθήκευσης).

Από τα Διαγράμματα 65, 67 και 68 παρατηρείται ότι με την αύξηση της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ από 0 σε 10% w/w επί τη βάση της λακτόζης, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θερμοκρασία κρυστάλλωσης μειώνονται. Η ενθαλπία κρυστάλλωσης μειώνεται κατά απόλυτη τιμή και επομένως το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης επιταχύνεται.

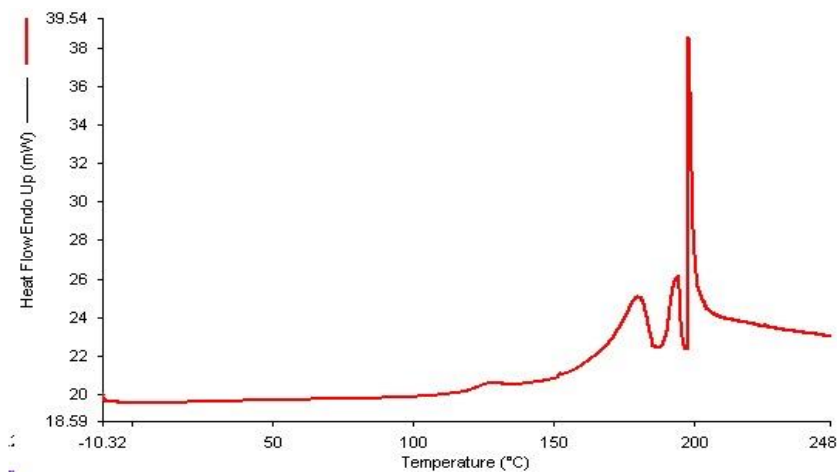
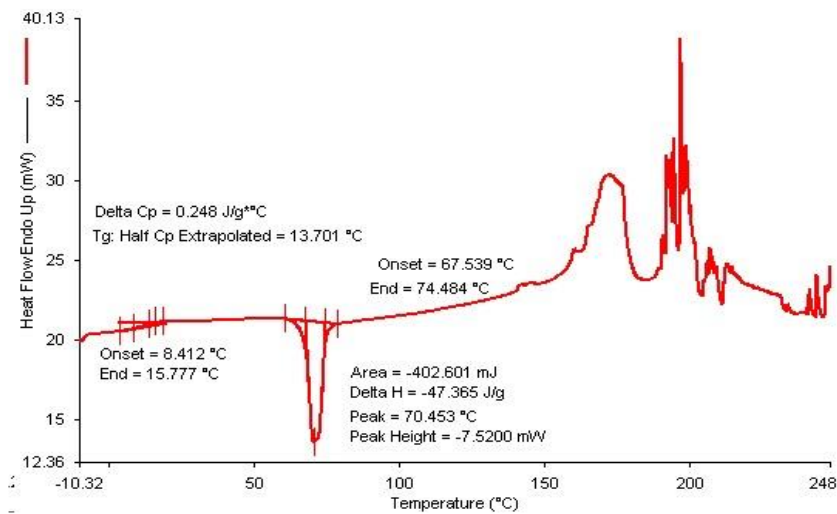
Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,23 σε θερμοκρασία 20 °C είναι τα ακόλουθα:





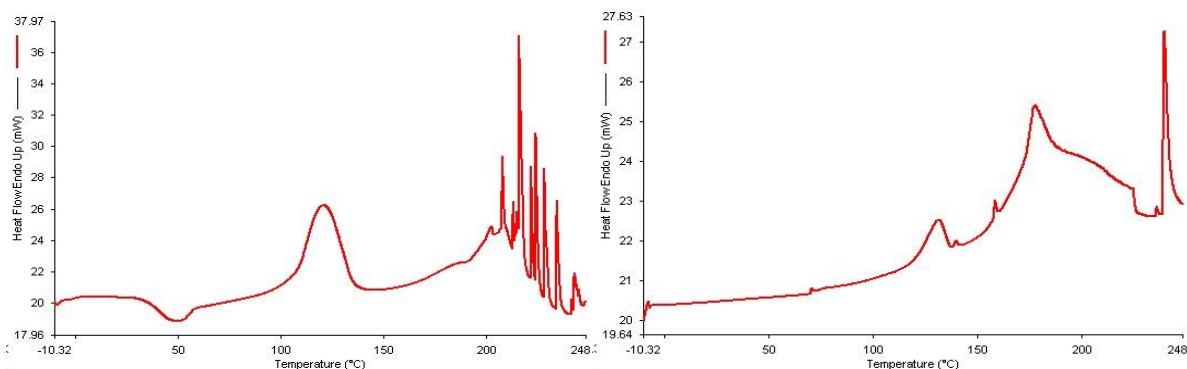
Σχήμα 6.45: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,43 σε θερμοκρασία 20 °C είναι τα ακόλουθα:



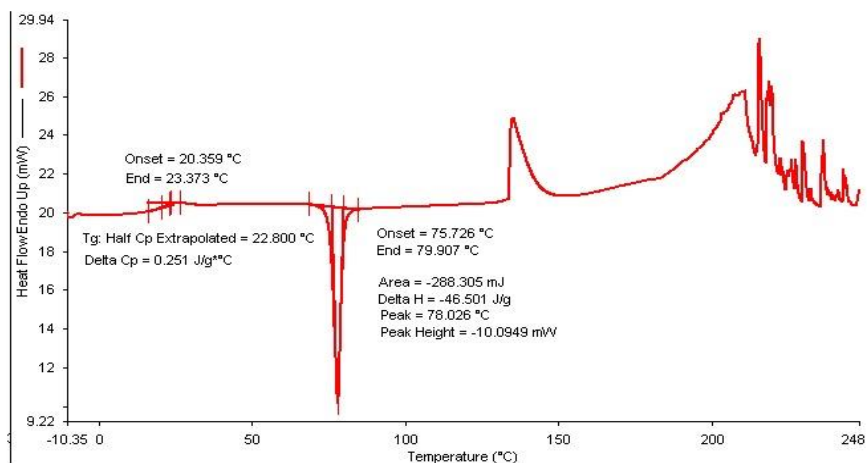
Σχήμα 6.46: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).

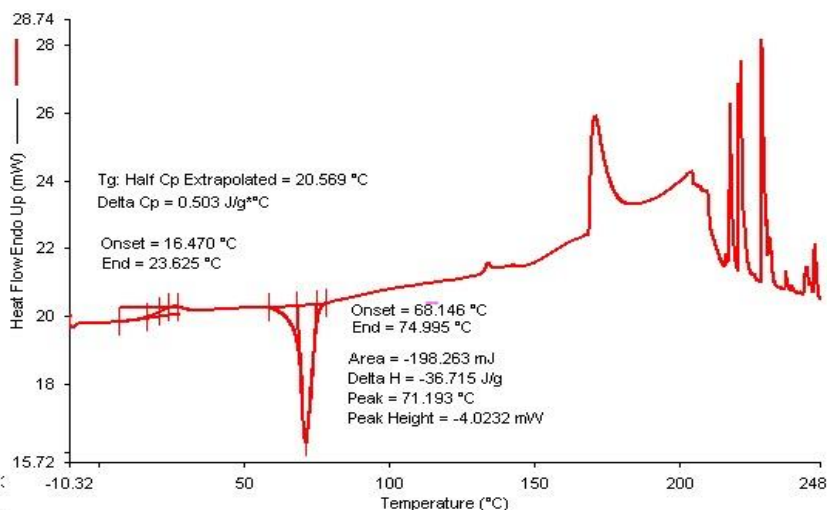
Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,54 σε θερμοκρασία 20 °C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.47: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 20°C).

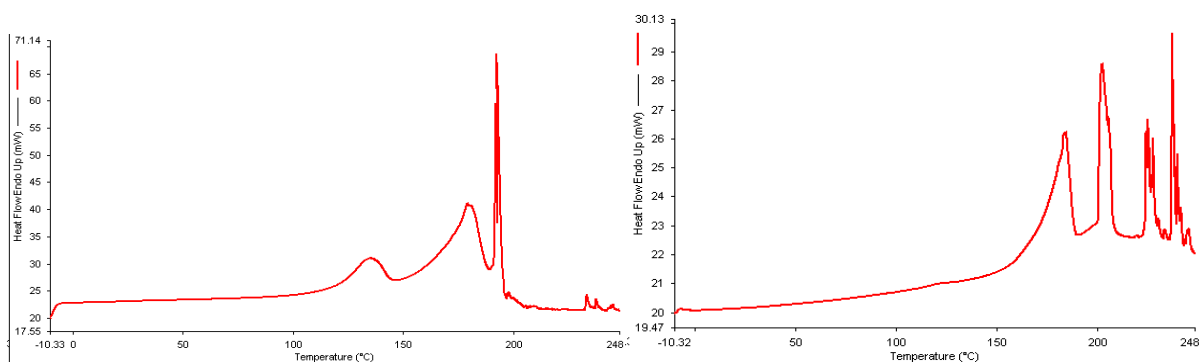
Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,23 σε θερμοκρασία 30 °C είναι τα ακόλουθα:





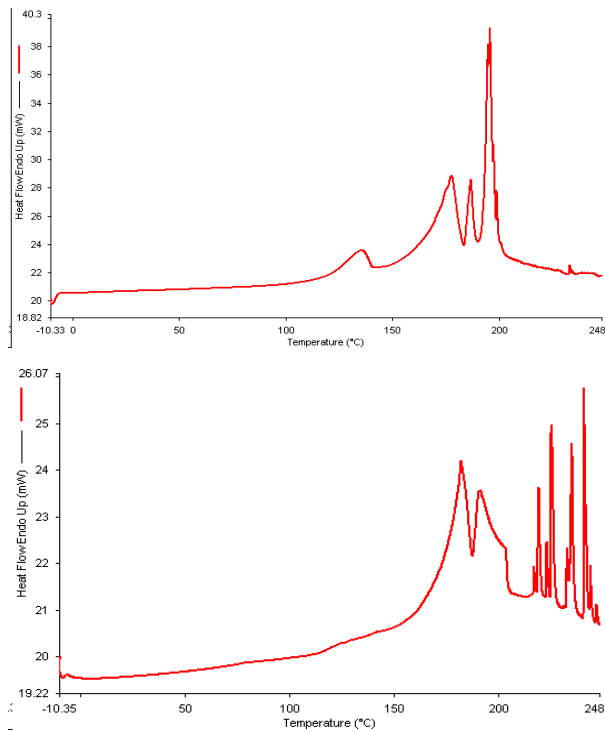
Σχήμα 6.48: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,43 σε θερμοκρασία 30 °C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.49: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).

Τα διαγράμματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,54 σε θερμοκρασία 30 °C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.50: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w γαλακτικό οξύ σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, Ταποθήκευσης = 30°C).

Από τα Διαγράμματα 69-74 παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών αποθήκευσης, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θερμοκρασία κρυστάλλωσης της λακτόζης μειώνονται. Επίσης, αυξανόμενης της τιμής της ενεργότητας, η μείωση που παρατηρείται είναι μεγαλύτερη. Στη θερμοκρασία των 30 °C, αρνητικές κορυφές παρατηρούνται ταχύτερα, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης.

Στα Διαγράμματα 70, 71, 73 και 74, όπου δεν παρατηρούνται αρνητικές κορυφές που να υποδηλώνουν την κρυστάλλωση της λακτόζης, το φαινόμενο έχει ήδη πραγματοποιηθεί πριν τη διεξαγωγή της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Αυτό παρατηρείται στις υψηλότερες τιμές ενεργότητας 0,43 και 0,54 κατά τις οποίες η κρυστάλλωση επιταχύνεται περισσότερο.

Στους Πίνακες 10-15 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης T_g , καθώς και της θερμοκρασίας και ενθαλπίας κρυστάλλωσης (T_{cr} , ΔH_{cr}) που προέκυψαν από τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Τα δείγματα που δεν παρουσίασαν κορυφή που να υποδηλώνει το φαινόμενο της κρυστάλλωσης, κατά τη θερμοκρασιακή σάρωση από -10 έως 250 °C θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν T_g , $T_{cr} = -10$ και $\Delta H_{cr} = 0$, καθώς το φαινόμενο έχει ήδη ολοκληρωθεί πριν τη μέτρηση.

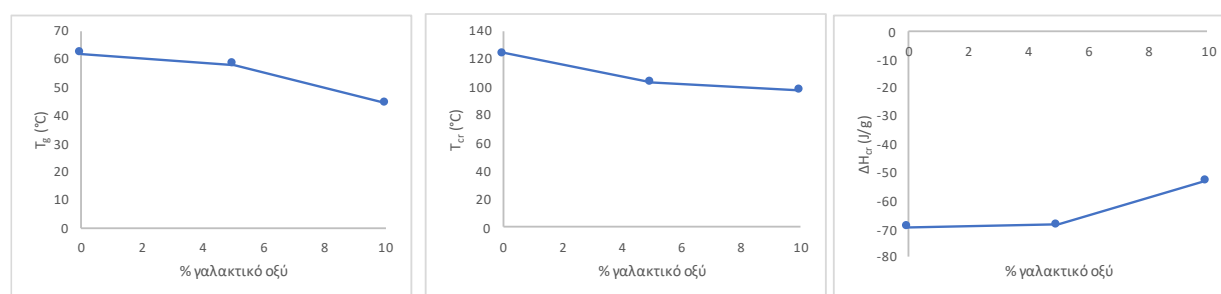
Πίνακας 6.14: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για λακτόζη-5% w/w γαλακτικό οξύ.

Λακτόζη-5% w/w γαλακτικό οξύ				
t [d]	a _w [-]	T _g [°C]	T _{cr} [°C]	ΔH _{cr} [J/g]
0	0	58,160	103,379	-68,350

Πίνακας 6.15: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για για λακτόζη-10% w/w γαλακτικό οξύ (Ταποθήκευση = 20°C και 30°C).

t [d]	20 °C				30 °C		
	a _w [-]	T _g [°C]	T _{cr} [°C]	ΔH _{cr} [J/g]	T _g [°C]	T _{cr} [°C]	ΔH _{cr} [J/g]
0	0	40,619	85,414	-44,934	40,619	85,414	-44,934
1	0,23	35,556	81,609	-43,331	22,8	78,026	-46,501
	0,43	13,701	70,453	-47,365	-9,5	-9,5	-0,5
	0,54	-10	-10	0	-10	-10	0
2	0,23	40,894	81,034	-30,756	19,675	69,969	-30,756
	0,43	-10	-10	0	-9,5	-9,5	-0,5
	0,54	-10	-10	0	-10	-10	0
3	0,23	27,304	77,022	-36,715	20,569	71,193	-36,715
	0,43	-10	-10	0	-9,5	-9,5	-0,5
	0,54	-10	-10	0	-10	-10	0
4	0,23	28,605	78,486	-37,323	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε
	0,43	-10	-10	0	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε
	0,54	-10	-10	0	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε

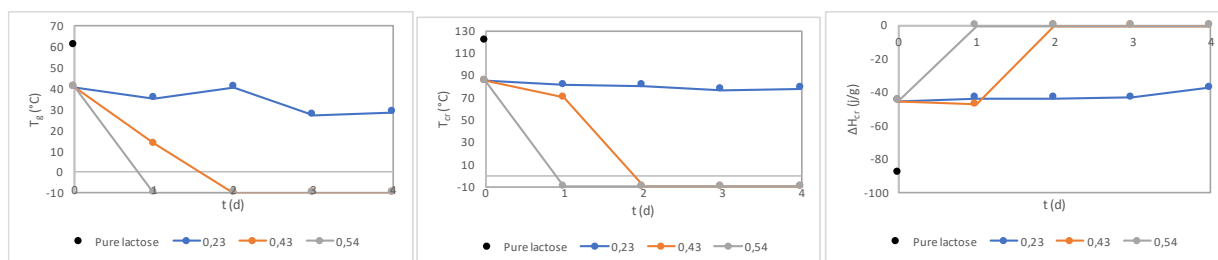
Με βάση τα αποτελέσματα των Πινάκων 10-12 κατασκευάζονται τα ακόλουθα διαγράμματα που απεικονίζουν την εξάρτηση της θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, της θερμοκρασίας και ενθαλπίας κρυστάλλωσης από τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος.



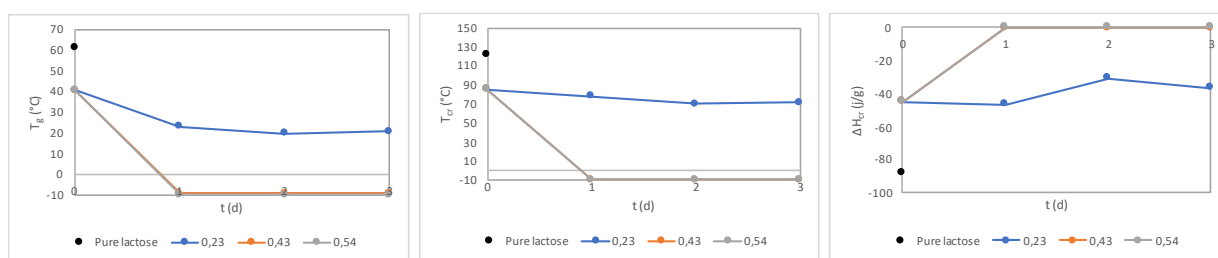
Σχήμα 6.51: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, τη θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης συναρτήσει του

χρόνου διεξαγωγής των μετρήσεων σε θερμοκρασίες 20 και 30 °C, τόσο για το γαλακτικό οξύ, όσο και για τις πρωτεΐνες ορού.



Σχήμα 6.52: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου (Ταποθήκευσης = 20°C).



Σχήμα 6.53: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου (Ταποθήκευσης = 30°C).

Από το Διάγραμμα 83 παρατηρείται ότι αύξηση της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ συνεπάγεται μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (T_g) και κρυστάλλωσης (T_{cr}). Επίσης, κατά απόλυτη τιμή η ενθαλπία κρυστάλλωσης (ΔH) μειώνεται. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι τα φαινόμενα της υαλώδους μετάπτωσης και της κρυστάλλωσης ενισχύονται αυξανόμενου του γαλακτικού οξέος. Ειδικότερα, από τα Διαγράμματα 84 και 86 για το γαλακτικό οξύ, παρατηρείται ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και κρυστάλλωσης της λακτόζης αποθηκευμένης σε περιβάλλον σταθερής ενεργότητας 0,23, 0,43 και 0,54, μειώνεται όσο αυξάνεται η τιμή της ενεργότητας αλλά και με το πέρασμα των ημερών αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της μελέτης μέσω δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού.

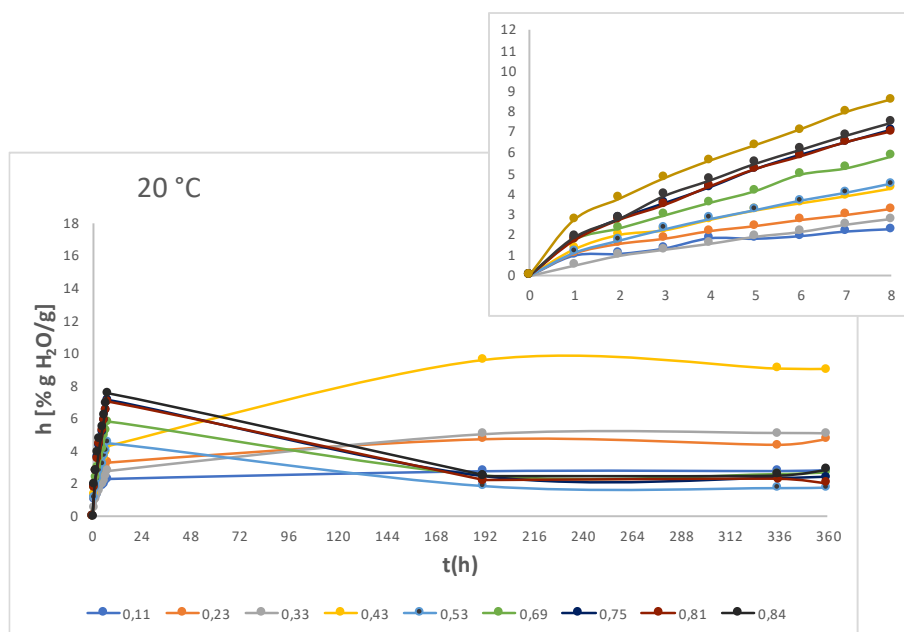
6.5.2. Επίδραση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ορού

6.5.2.1. Δυναμικές καμπύλες ρόφησης νερού

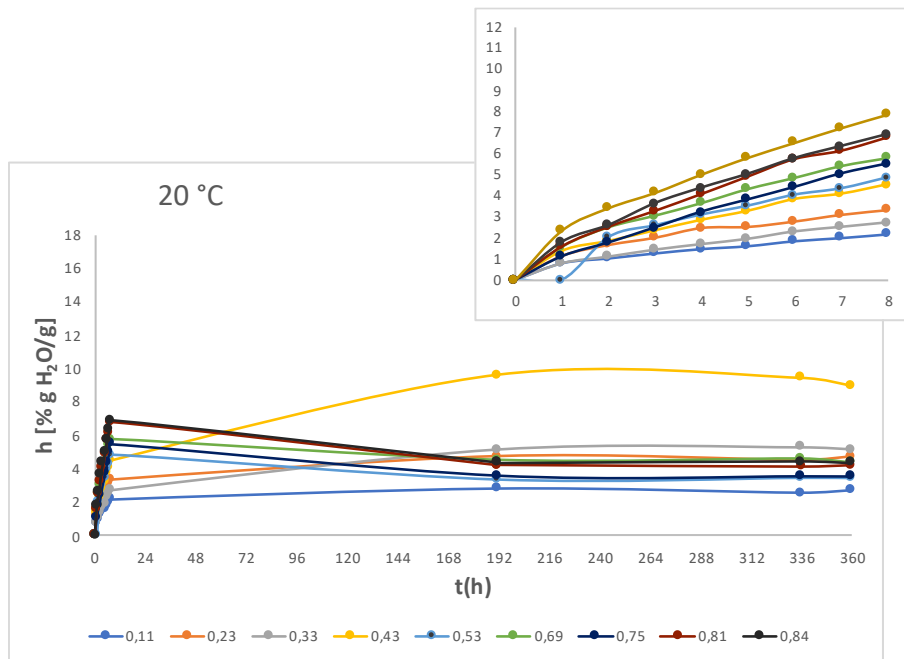
Η διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 5.2.1 επαναλήφθηκε και για πρότυπα μίγματα λακτόζης-πρωτεΐνης. Το κάθε ένα από τα διαγράμματα που ακολουθούν αναφέρεται σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 15 και 20% πρωτεΐνες επί τη βάση της λακτόζης αντίστοιχα. Στα διαγράμματα που ακολουθούν δεν απεικονίζεται η ενεργότητα 0,97, καθώς σε αυτή την τιμή παρατηρήθηκε υγροποίηση του νερού και διάλυση της λακτόζης σε αυτό, με αποτέλεσμα η περιεχόμενη υγρασία να αυξάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των μετρήσεων.

Για τη θερμοκρασία των 20 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 22-26. Από τα Διαγράμματα 22-26 παρατηρείται ότι η περιεχόμενη υγρασία αυξάνεται τις πρώτες 8 h.

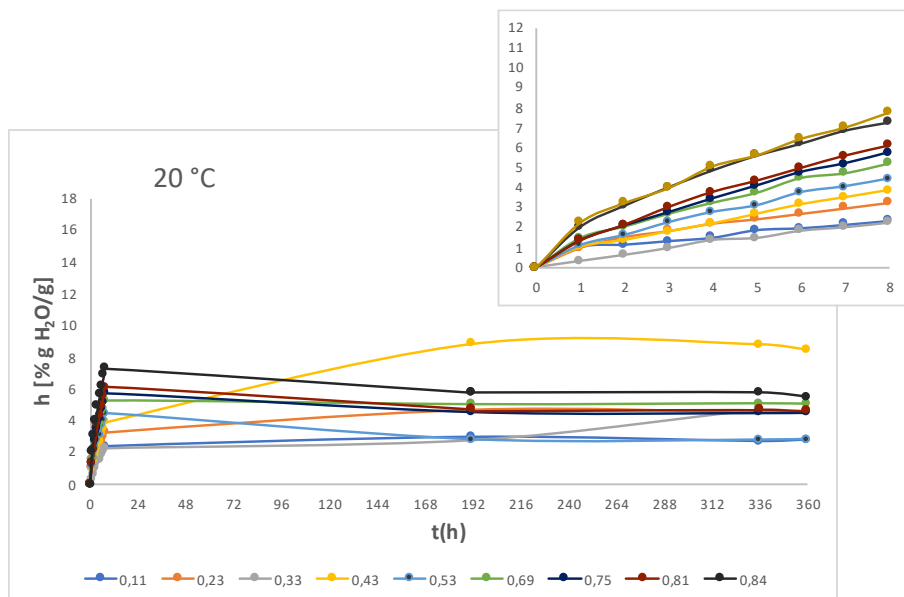
Πιο συγκεκριμένα, σε περιεκτικότητα πρωτεϊνών 0% (καθαρή λακτόζη) η κρυστάλλωση πραγματοποιείται για τιμές ενεργότητας νερού (aw) μεγαλύτερες από 0,53 μετά τις πρώτες 8 h. Όταν η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών είναι 5% w/w ως προς τη λακτόζη η κρυστάλλωση πραγματοποιείται και πάλι για $aw \geq 0,53$ αλλά ταχύτερα πριν τις 8 h. Σε ακόμη μεγαλύτερες περιεκτικότητες πρωτεϊνών (10-20%) απώλεια της προσροφημένης υγρασίας παρατηρείται και για τις τιμές ενεργότητας 0,23 και 0,33.



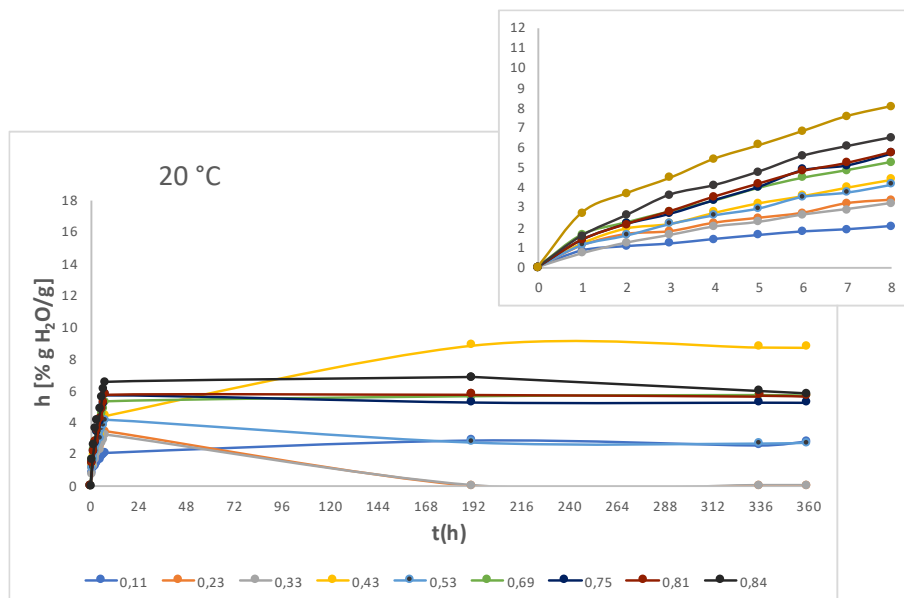
Σχήμα 6.54. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνης ορού στους 20 °C.



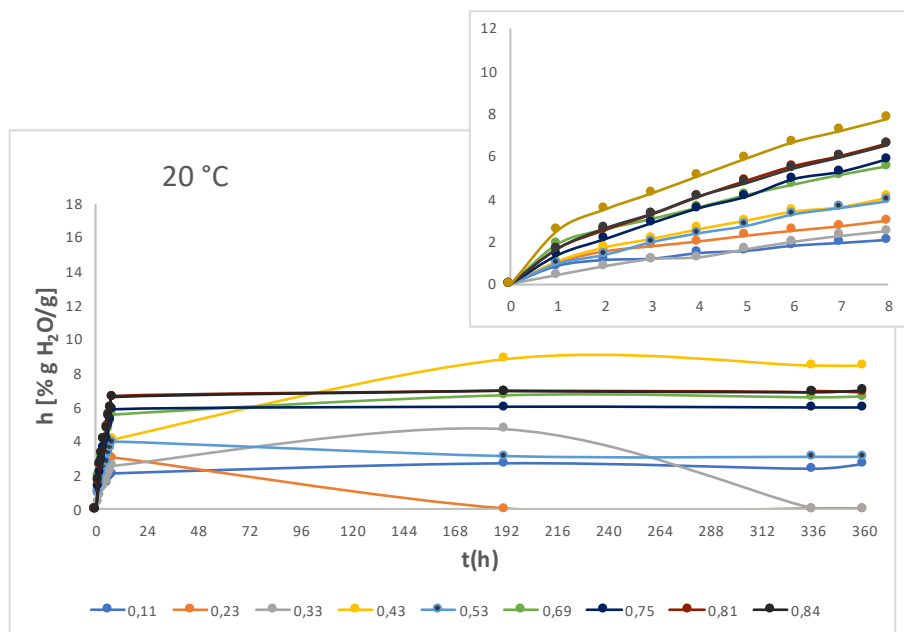
Σχήμα 6.55. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.



Σχήμα 6.56. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.



Σχήμα 6.57. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.

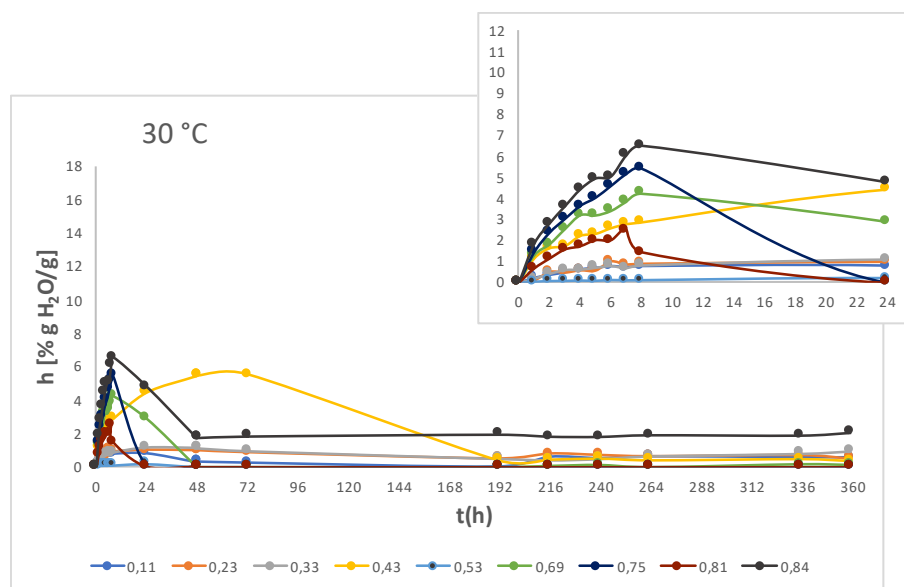


Σχήμα 6.58. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 20 °C.

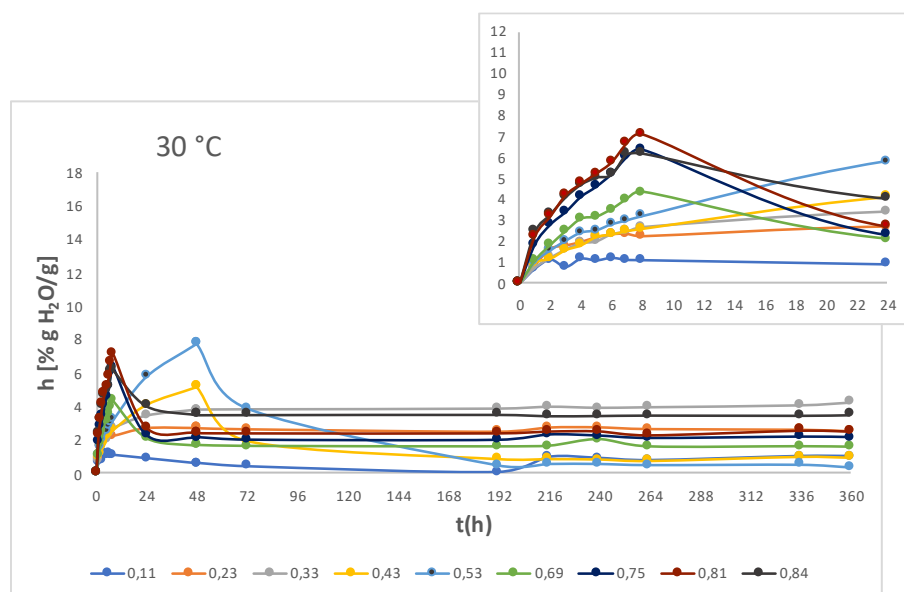
Για τη θερμοκρασία των 30 °C προέκυψαν τα Διαγράμματα 27-31. Από τα Διαγράμματα 27-31 παρατηρείται έντονη αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας τις πρώτες 8-24 h.

Ειδικότερα, σε περιεκτικότητα πρωτεΐνης 0% (καθαρή λακτόζη), η κρυστάλλωση πραγματοποιείται για τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες από 0,43. Σε ενεργότητα 0,43 η κρυστάλλωση πραγματοποιείται μετά τις 72 h και σε όλες τις υπόλοιπες τιμές έχει γίνει

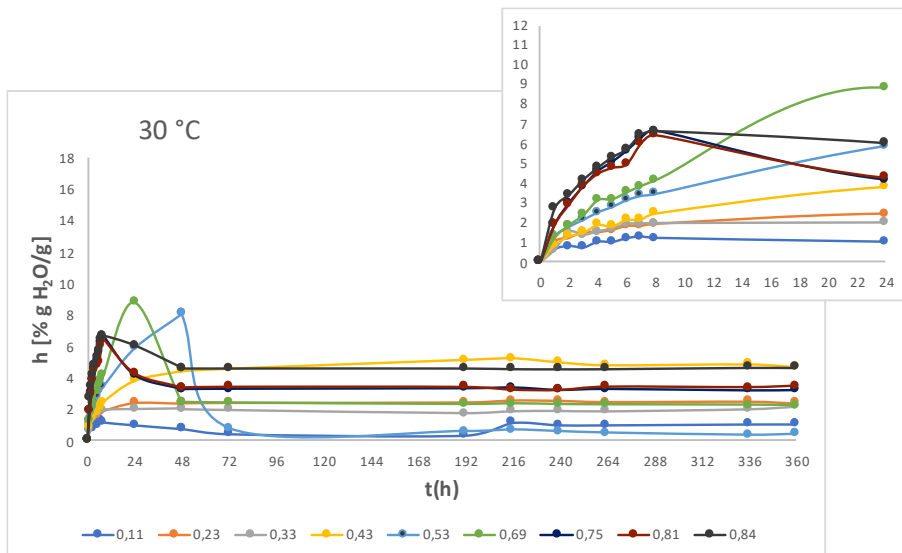
έως τις 24 h. Σε περιεκτικότητα πρωτεΐνης 5% w/w επί τη βάσει της λακτόζης, η κρυστάλλωση πραγματοποιείται για τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες ή ίσες από 0,54, αλλά νωρίτερα, μετά τις 48 h. Όσο αυξάνεται η πρωτεΐνη σε 10-20% w/w, η κρυστάλλωση πραγματοποιείται για $a_w \geq 0,53$. Αντίθετα, για τιμές ενεργότητας από 0,75 και πάνω, ενώ απουσία πρωτεϊνών η κρυστάλλωση γίνεται μετά τις 8 h, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, το φαινόμενο επιβραδύνεται και γίνεται μετά τις 24 h.



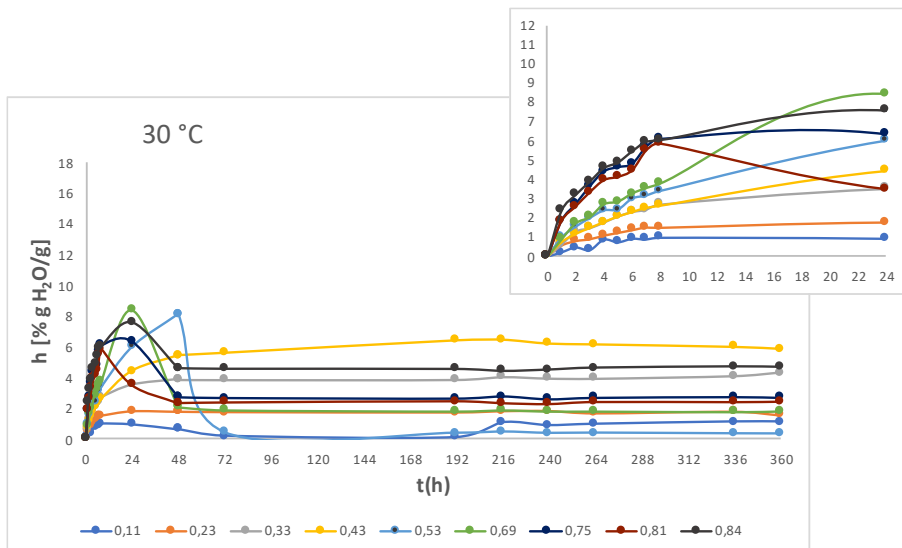
Σχήμα 6.59. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνης ορού στους 30 °C.



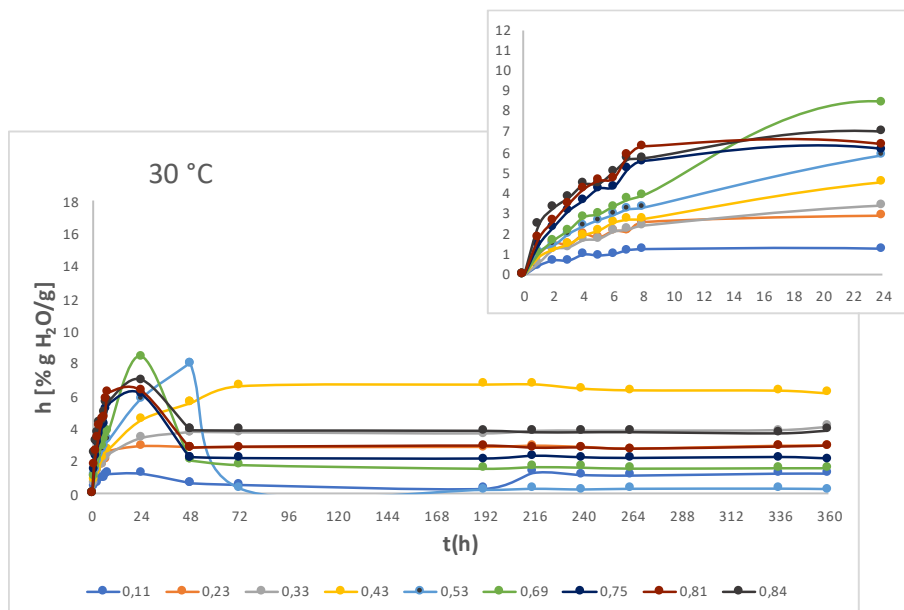
Σχήμα 6.60. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνης ορού στους 30 °C.



Σχήμα 6.61. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.

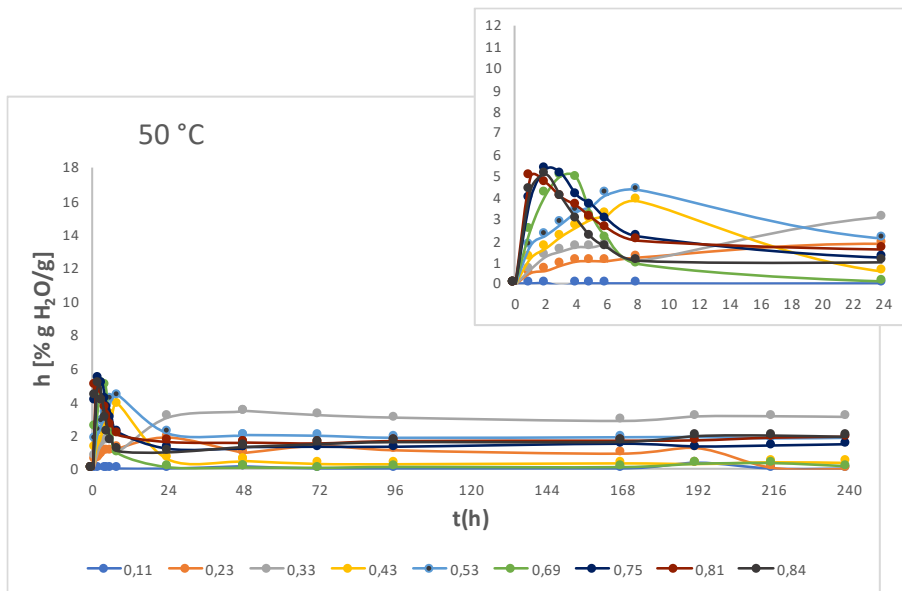


Σχήμα 6.62. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.

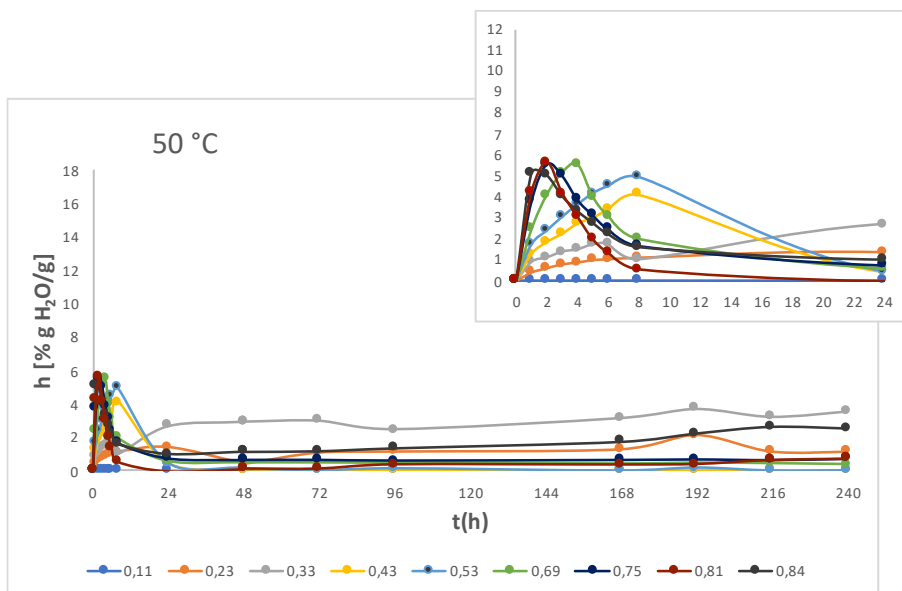


Σχήμα 6.63. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 30 °C.

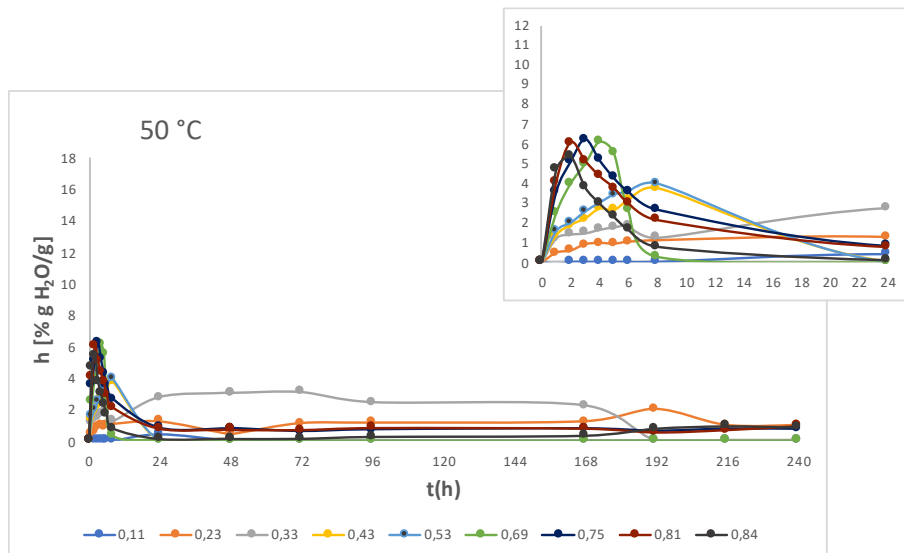
Για τη θερμοκρασία των 50 °C προέκυψαν προέκυψαν τα Διαγράμματα 32-36. Από τα Διαγράμματα 32-36 παρατηρείται ότι, σε όλα τις περιεκτικότητες πρωτεϊνών, η κρυστάλλωση γίνεται για τιμές ενεργότητας μεγαλύτερες από 0,43. Ειδικότερα, απουσία πρωτεϊνών, για τιμή ενεργότητας 0,43 και 0,53, η απώλεια της προσροφημένης υγρασίας φαίνεται να γίνεται τις 8 h, ενώ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η κρυστάλλωση πραγματοποιείται νωρίτερα από τις 8 h. Αντίθετα, για τιμές ενεργότητας από 0,75 και πάνω, ενώ απουσία πρωτεϊνών η κρυστάλλωση γίνεται μετά τις 2 h, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, το φαινόμενο επιβραδύνεται και γίνεται μετά τις 3-4 h.



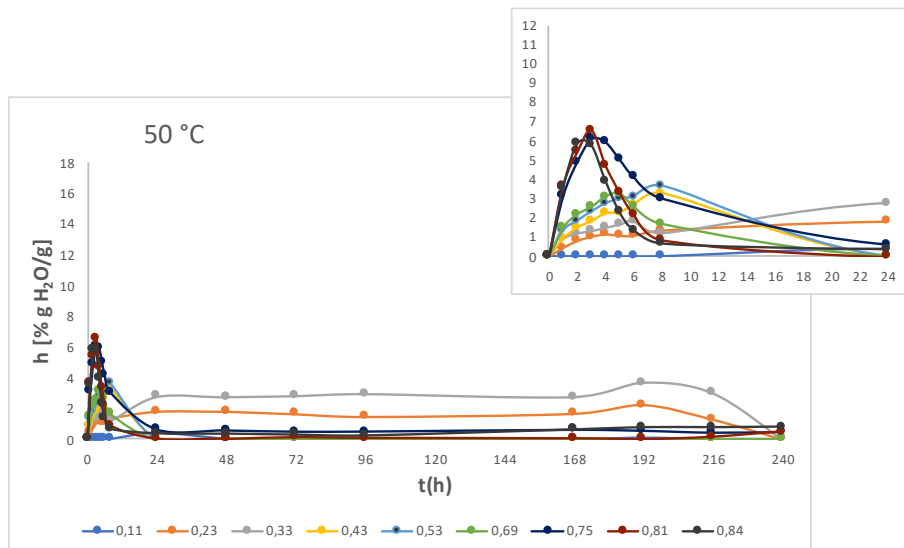
Σχήμα 6.64. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-0% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.



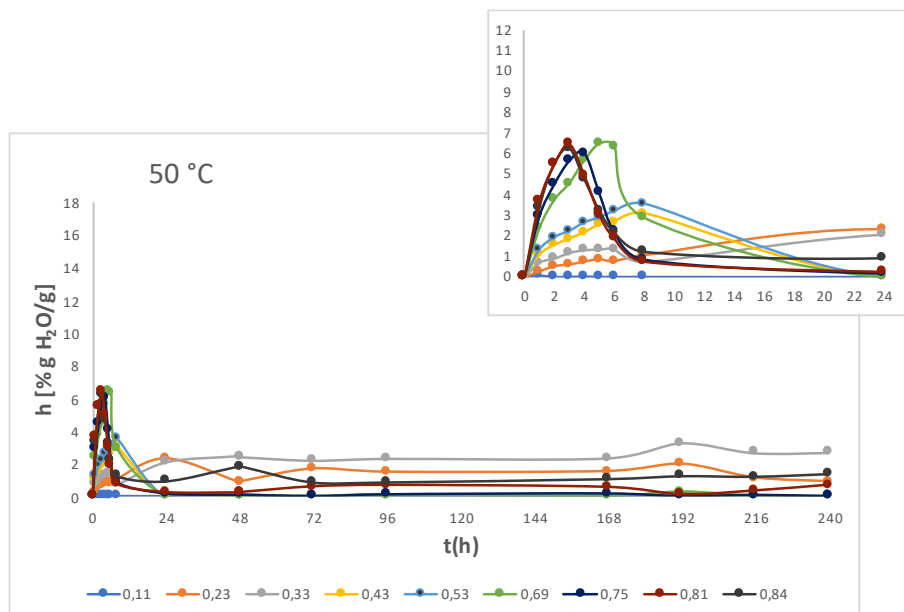
Σχήμα 6.65. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-5% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.



Σχήμα 6.66. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-10% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.



Σχήμα 6.67. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-15% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.

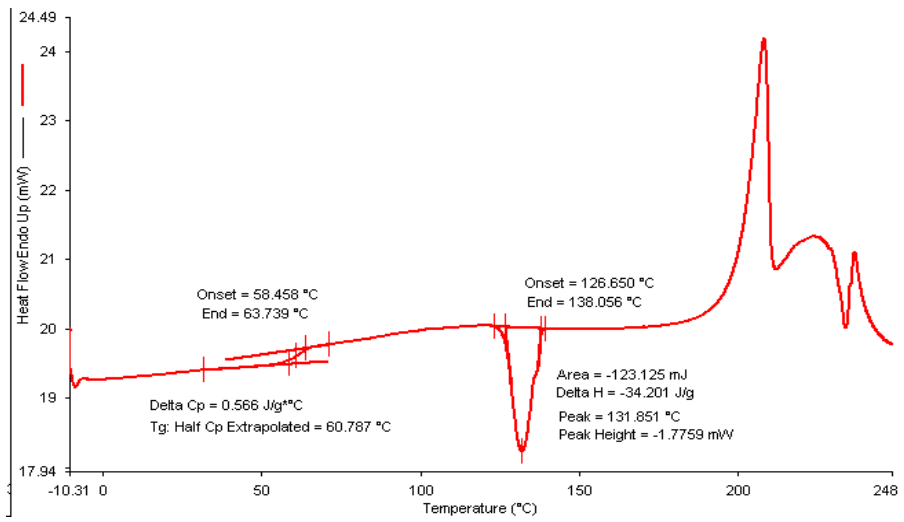


Σχήμα 6.68. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού, για κάθε ενεργότητα, για τα δείγματα 100% λακτόζη-20% πρωτεΐνες ορού στους 50 °C.

Συνολικά, στα διαγράμματα 22-36 το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης παρατηρείται για τιμές ενεργότητας 0,43 και μεγαλύτερες από αυτή. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης, κυρίως σε 10-20% w/w ως προς τη λακτόζη, η κρυστάλλωση επιταχύνεται, εκτός από τις υψηλές τιμές ενεργότητας (μεγαλύτερες από 0,75) που παρατηρείται επιβράδυνση της κρυστάλλωσης της λακτόζης. Επιπρόσθετα, με την αύξηση της τιμής της ενεργότητας, για $a_w \geq 0,75$ η τελική προσροφημένη υγρασία εμφανίζει υψηλότερες τιμές.

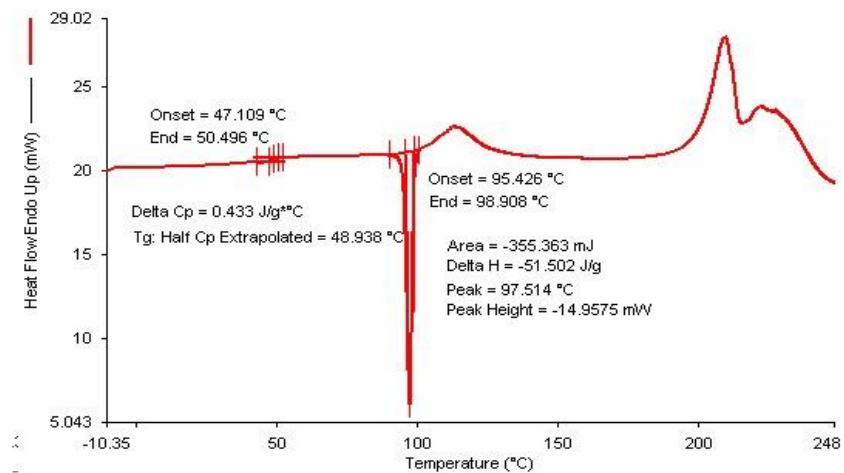
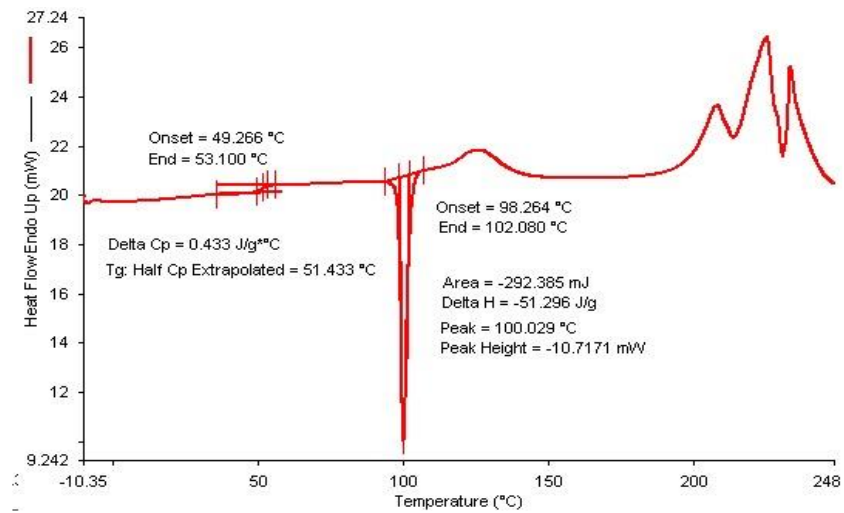
6.5.2.2. Διαφορική θερμοδομετρία σάρωσης

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα θερμογραφήματα που προέκυψαν από τη διαφορική θερμοδομετρία σάρωσης για τα μίγματα λακτόζης-πρωτεϊνών ορού στις θερμοκρασίες 20 και 30 °C. Τα θερμογραφήματα των ενδιάμεσων μετρήσεων παρατίθενται στο Παράρτημα.



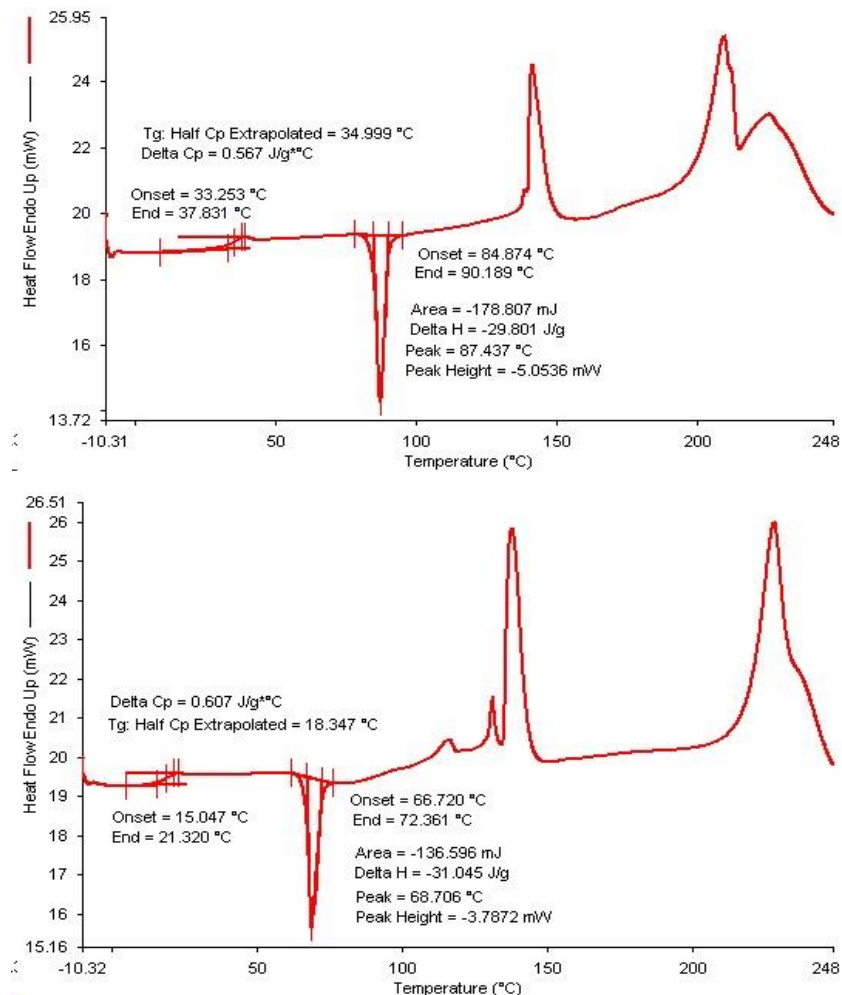
Σχήμα 6.69: Θερμογράφημα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού (0 d αποθήκευσης).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,23 σε θερμοκρασία 20 °C είναι τα ακόλουθα:



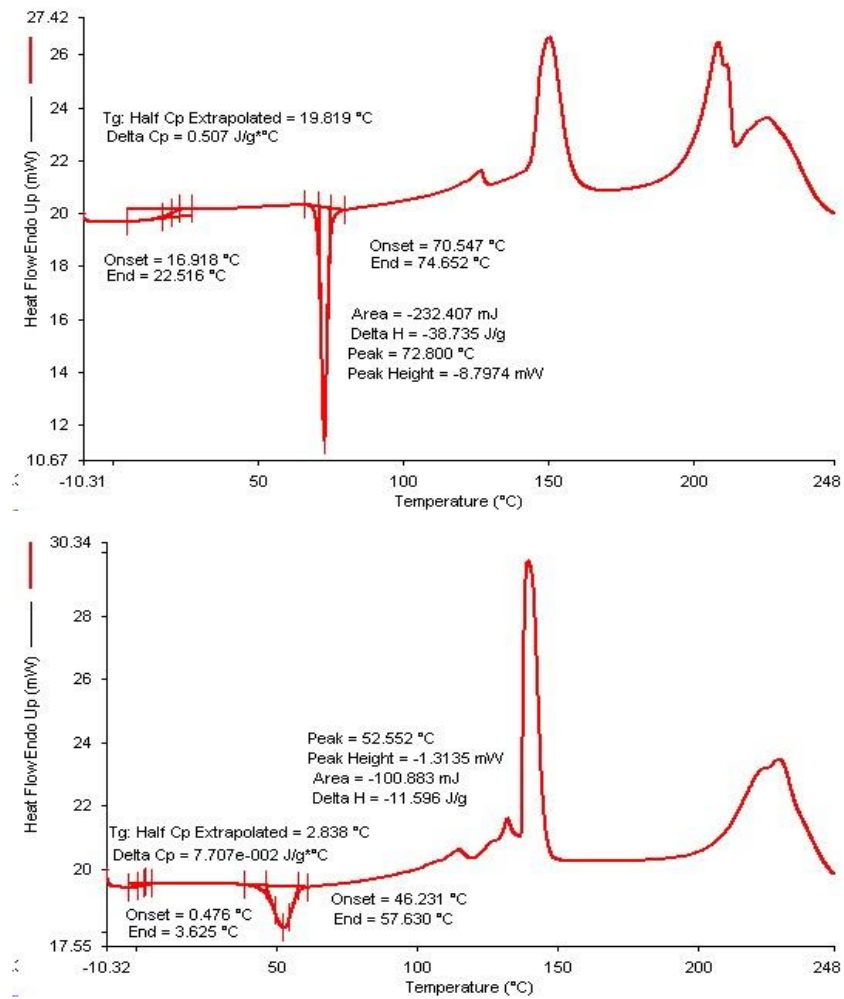
Σχήμα 6.70: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,23 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 20^{\circ}\text{C}$).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,43 σε θερμοκρασία 20°C είναι τα ακόλουθα:



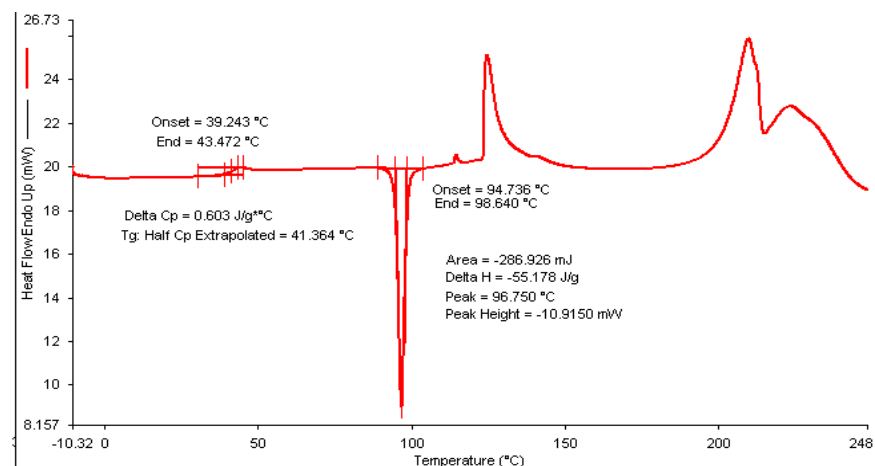
Σχήμα 6.71: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 20^{\circ}\text{C}$).

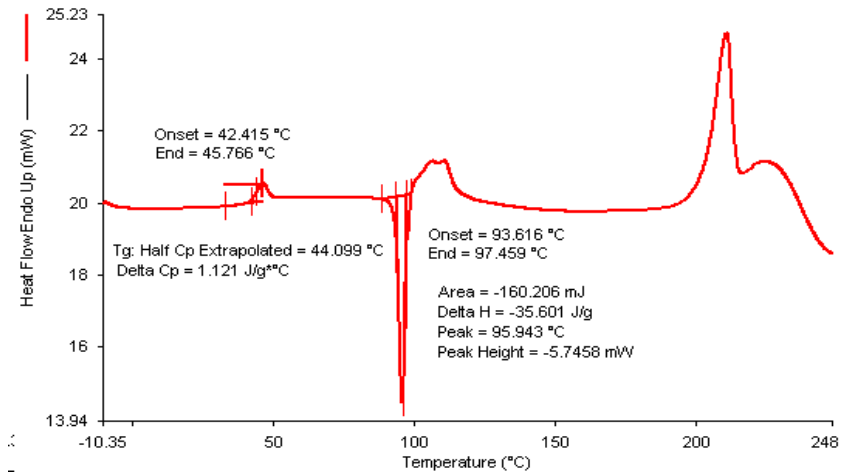
Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,54 σε θερμοκρασία 20°C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.72: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,54 (1, 2 d αποθήκευσης, T_{αποθήκευσης} = 20°C).

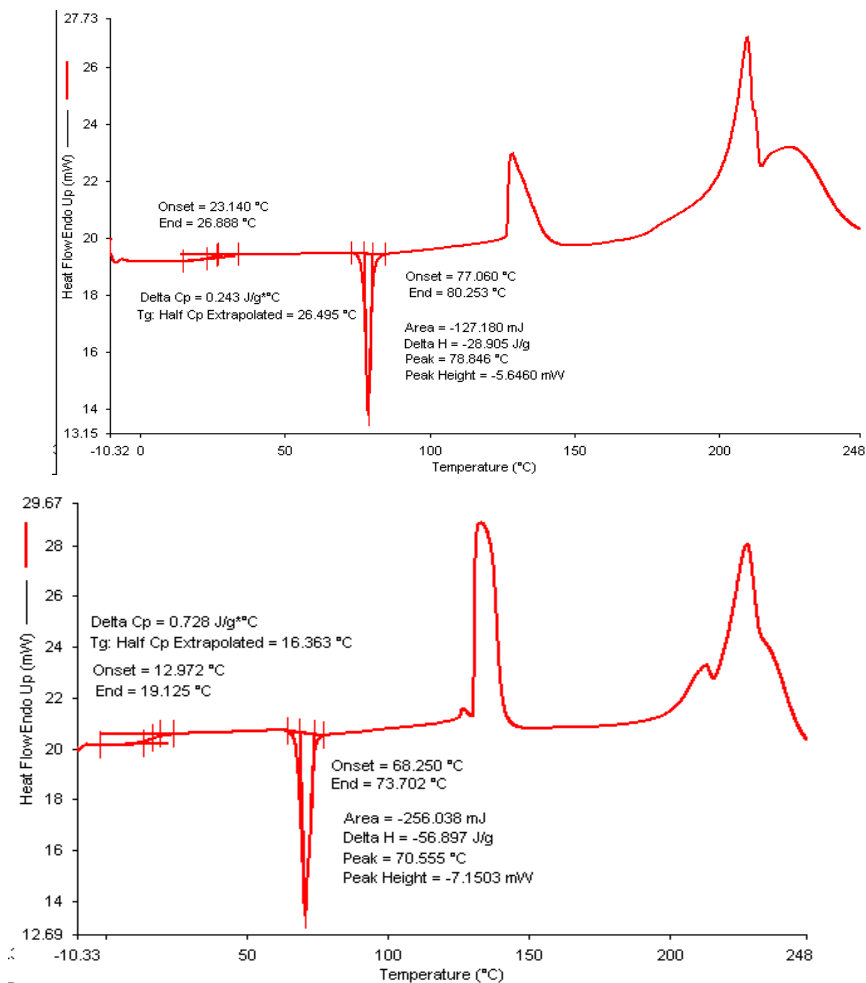
Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,23 σε θερμοκρασία 30 °C είναι τα ακόλουθα:





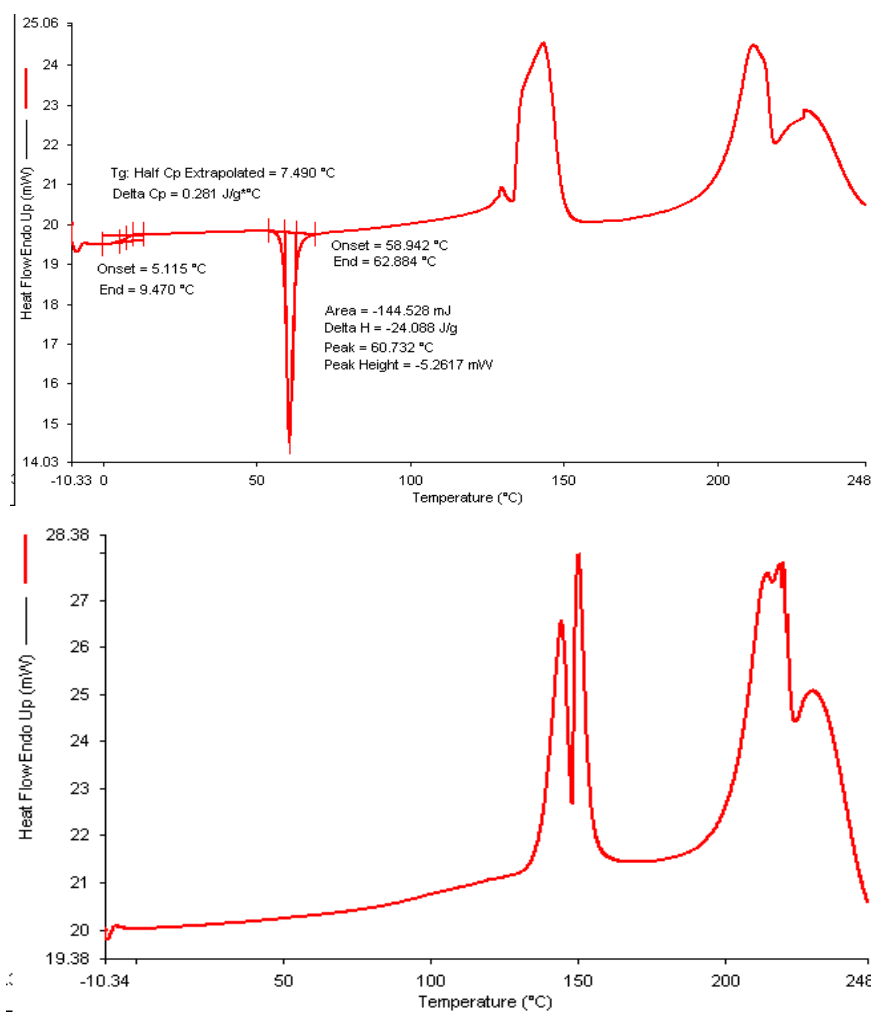
Σχήμα 6.73: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,23 (1, 3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,43 για διάστημα 3 ημερών σε θερμοκρασία 30 °C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.74: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,43 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).

Τα θερμογραφήματα που προέκυψαν για συνθήκες αποθήκευσης σε ενεργότητα 0,54 για διάστημα 3 ημερών σε θερμοκρασία 30°C είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 6.75: Θερμογραφήματα για λακτόζη- 10% w/w πρωτεΐνες ορού σε ενεργότητα 0,54 (1,3 d αποθήκευσης, $T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^{\circ}\text{C}$).

Από τα Διαγράμματα 75-81 παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών αποθήκευσης, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και η θερμοκρασία κρυστάλλωσης της λακτόζης μειώνονται. Επίσης, αυξανόμενης της τιμής της ενεργότητας, η μείωση που παρατηρείται είναι μεγαλύτερη. Στη θερμοκρασία των 30°C , αρνητικές κορυφές παρατηρούνται ταχύτερα, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης.

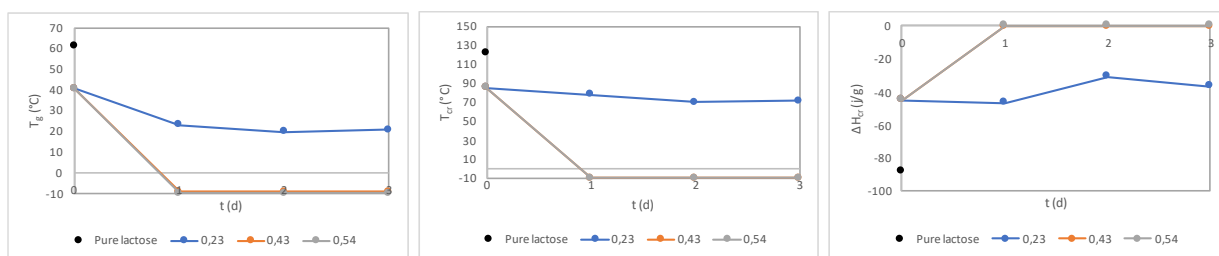
Στο Διάγραμμα 81 όπου δεν παρατηρείται αρνητική κορυφή που να υποδηλώνει την κρυστάλλωση της λακτόζης, το φαινόμενο έχει ήδη πραγματοποιηθεί πριν τη διεξαγωγή της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.

Στους Πίνακες 10-15 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης T_g , καθώς και της θερμοκρασίας και ενθαλπίας κρυστάλλωσης (T_{cr} , ΔH_{cr}) που προέκυψαν από τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Τα δείγματα που δεν παρουσίασαν κορυφή που να υποδηλώνει το φαινόμενο της κρυστάλλωσης, κατά τη θερμοκρασιακή σάρωση από -10 έως 250 °C θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν T_g , $T_{cr} = -10$ και $\Delta H_{cr} = 0$, καθώς το φαινόμενο έχει ήδη ολοκληρωθεί πριν τη μέτρηση.

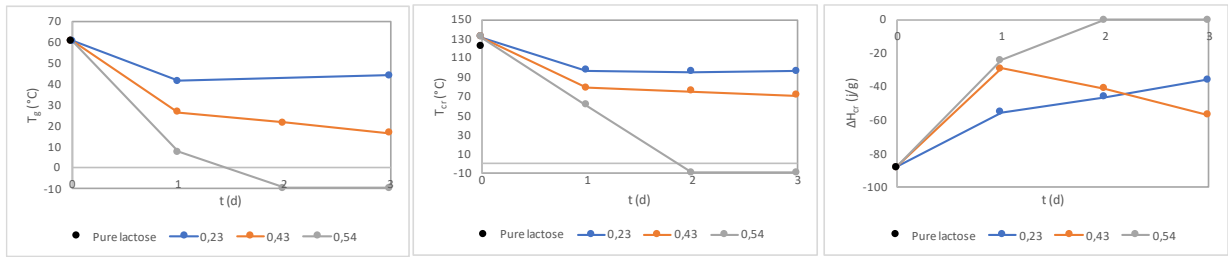
Πίνακας 6.16: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης για λακτόζη-10% w/w πρωτεΐνες ορού ($T_{αποθήκευσης} = 20^\circ\text{C}$ και 30°C).

20 °C		Λακτόζη-10% w/w πρωτεΐνες ορού			30 °C		
t [d]	a_w [-]	T_g [°C]	T_{cr} [°C]	ΔH_{cr} [J/g]	T_g [°C]	T_{cr} [°C]	ΔH_{cr} [J/g]
0	0	60,787	131,851	-88,148	60,787	131,851	-88,148
1	0,23	-	-	-	41,364	96,75	-55,178
	0,43	34,999	87,437	-29,801	26,495	78,846	-28,905
	0,54	19,819	72,8	-38,735	7,49	60,732	-24,088
2	0,23	51,433	100,029	-51,296	Δεν ήταν διακριτή	95,124	-46,314
	0,43	19,803	68,622	-35,387	21,348	75,235	-41,297
	0,54	2,838	52,552	-11,596	-10	-10	0
3	0,23	48,938	97,514	-51,502	44,099	95,943	-35,601
	0,43	18,347	68,706	-31,045	16,363	70,555	-56,897
	0,54	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	-10	-10	0
4	0,23	49,066	104,355	-46,488	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε
	0,43	27,765	77,595	-30,944	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε
	0,54	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε	Δε μετρήθηκε

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, τη θερμοκρασία και ενθαλπία κρυστάλλωσης συναρτήσει του χρόνου διεξαγωγής των μετρήσεων σε θερμοκρασίες 20 και 30 °C, τόσο για το γαλακτικό οξύ, όσο και για τις πρωτεΐνες ορού.



Σχήμα 6.76: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης-γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου ($T_{αποθήκευσης} = 30^\circ\text{C}$).



Σχήμα 6.77: Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, θερμοκρασία και θερμότητα κρυστάλλωσης για τα μίγματα λακτόζης- πρωτεΐνες ορού συναρτήσει του χρόνου ($T_{\text{αποθήκευσης}} = 30^\circ\text{C}$).

Από τα Διαγράμματα 85 και 87 παρατηρείται ότι η κρυστάλλωση της λακτόζης αποθηκευμένης σε περιβάλλον σταθερής ενεργότητας 0,23, 0,43 και 0,54, πραγματοποιείται ταχύτερα όσο αυξάνεται η τιμή της ενεργότητας. Το ίδιο συμβαίνει και όσο αυξάνεται το διάστημα αποθήκευσης των δειγμάτων. Ωστόσο, μικρές αυξομειώσεις στις υπολογισμένες τιμές κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των μετρήσεων είναι αναμενόμενες και δηλώνουν σταθεροποίηση των τιμών γύρω από μια μέση τιμή. Η αυξημένη τιμή στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης που παρατηρείται στις 4 ημέρες αποθήκευσης μπορεί να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα και για το λόγο αυτό χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την επιβεβαίωση των διεξαχθέντων πειραμάτων. Επομένως, για δείγματα λακτόζης-10% w/w πρωτεΐνες ορού, αποθηκευμένα για 3 ημέρες σε θερμοκρασία 30°C , το φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης επιταχύνεται. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που βρέθηκαν μέσω δυναμικών καμπυλών ρόφησης νερού για τις θερμοκρασίες και τις ενεργότητες αυτές.

Τα δείγματα που δεν παρουσίασαν κορυφή που να υποδηλώνει ότι λαμβάνει χώρα η κρυστάλλωση της λακτόζης, κατά τη θερμοκρασιακή σάρωση από -10 έως 250°C θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν T_g , $T_{cr} = -10$ και $\Delta H_{cr} = 0$, καθώς το φαινόμενο έχει ήδη ολοκληρωθεί πριν την πραγματοποίηση της μέτρησης. Και στις 2 περιπτώσεις πρόσθετων συστατικών, η αύξηση στη θερμοκρασία από 20 σε 30°C οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης και κρυστάλλωσης, δηλαδή σε ακόμη μεγαλύτερη ενίσχυση του φαινομένου κρυστάλλωσης της λακτόζης.

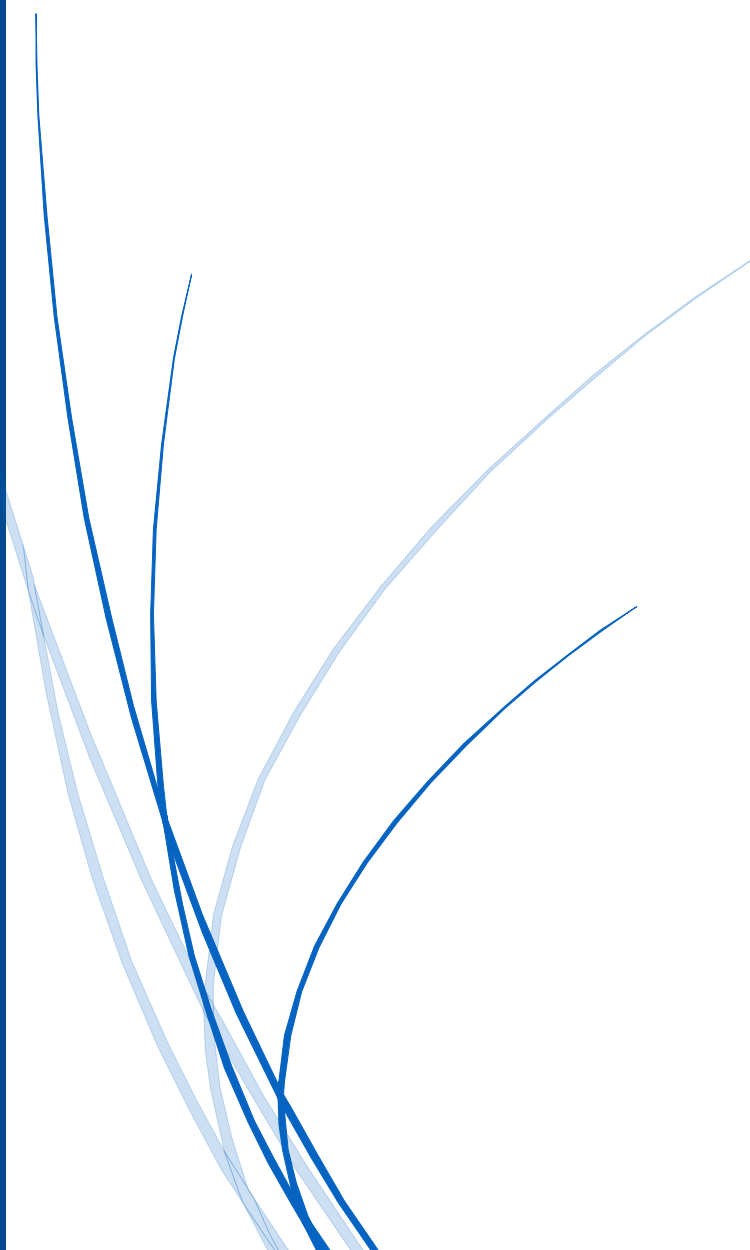
Οι Chandrapala, Wijayasinghe και Vasiljevic (2016) μελέτησαν τη φυσική κατάσταση και τη θερμική συμπεριφορά της λακτόζης κατά την κρυστάλλωση παρουσία γαλακτικού οξέος (LA) και ασβεστίου (Ca), προκειμένου να αναπτυχθούν κατάλληλες στρατηγικές για τη βελτίωση της επεξεργασίας του ορού. Συγκεκριμένα, η παρουσία

υψηλής συγκέντρωσης LA (1% w/w) οδήγησε σε μείωση των κρυστάλλων λακτόζης και επομένως επιβράδυνση του φαινομένου κρυστάλλωσης της λακτόζης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στη διαφορετική προστιθέμενη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, αλλά και στην παρουσία του προστιθέμενου ασβεστίου. Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, ενδεχόμενα σφάλματα που μπορεί να έχουν προκύψει αλλά και κάποιες διαφορές στις συνθήκες εξαγωγής των 2 πειραμάτων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύνοψη αποτελεσμάτων -
Συμπεράσματα



7. Σύνοψη αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

Ο ορός είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος. Είναι ένα υγρό με κιτρινο-πράσινο χρώμα, αποτελούμενο, κυρίως, από λακτόζη, και περιέχει γαλακτόζη, γαλακτικό οξύ, πρωτεΐνες ορού και διάφορα μέταλλα. Ανάλογα με το τελικό προϊόν και την παραγωγική διαδικασία που ακολουθείται, αποβάλλονται διάφορα είδη ορού ως παραπροϊόντα, εκ των οποίων δύο είναι τα κυριότερα: ο όξινος και ο γλυκός ορός. Η κύρια διαφορά τους εντοπίζεται στην περιεκτικότητά τους σε γαλακτικό οξύ. Ο όξινος ορός περιέχει γαλακτικό οξύ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ ο γλυκός ορός περιέχει υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών.

Οι ποσότητες όξινου και γλυκού ορού που παράγονται σε ετήσια βάση είναι τεράστιες, δημιουργώντας σημαντικό πρόβλημα στη διαχείριση αυτού του παραπροϊόντος από τις γαλακτοβιομηχανίες. Κατά το παρελθόν έχουν προταθεί διάφορες εφαρμογές αξιοποίησης, όπως η χρήση του ως εδαφοβελτιωτικό, η ενσωμάτωσή του στα σιτηρέσια των ζώων και η μετατροπή του σε βιοκαύσιμο μέσω αναερόβιας χώνευσης. Ωστόσο, όλες αυτές οι εφαρμογές παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα που τις καθιστούν μη αποδοτικές. Επιπλέον, οι αυξημένες συγκεντρώσεις χημικά και βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου στα δύο είδη ορού δυσχεραίνουν τη διαχείριση αυτού του παραπροϊόντος σε συμβατικά συστήματα βιολογικού καθαρισμού, πριν την απόρριψή του στο περιβάλλον. Συνεπώς, η αναζήτηση περιβαλλοντικά και οικονομικά βιώσιμων εναλλακτικών μεθόδων αξιοποίησης του όξινου και του γλυκού ορού παραμένει αναγκαία για όλες τις γαλακτοβιομηχανίες.

Προς μία εναλλακτική κατεύθυνση αναφορικά με την αξιοποίηση των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας για την παραγωγή συστατικών υψηλής αξίας ξεχωρίζει η εφαρμογή καινοτόμων διεργασιών και βιοκαταλυτών για την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Για αυτήν την εφαρμογή γίνεται χρήση ενός ενζύμου που ονομάζεται β-γαλακτοζιδάση. Κύρια δράση αυτού του ενζύμου αποτελεί η διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού της λακτόζης, με αποτέλεσμα την υδρόλυσή της. Παράλληλα, η β-γαλακτοζιδάση δύναται να καταλύσει την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης που οδηγεί στη σύνθεση ολιγομερών της λακτόζης, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες.

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (galactooligosaccharides, GOS) είναι ολιγομερείς ενώσεις αποτελούμενες από 2 έως 8 μονομερή σάκχαρα και έχει αποδειχθεί ότι έχουν

πρεβιοτικές ιδιότητες, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας. Η απευθείας βιομετατροπή της λακτόζης του όξινου και γλυκού ορού απευθείας σε πρεβιοτικούς γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορεί να αυξήσει την αξία των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας και να συμβάλει στη μερική επίλυση του ζητήματος διαχείρισης που έχει προκύψει λόγω της συσσώρευσης ορού, με σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από αυτήν τη διαδικασία μπορούν να ενσωματωθούν σε διάφορα προϊόντα που παράγονται στην ίδια βιομηχανία προκειμένου να αυξηθεί η θρεπτική τους αξία, ή για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων προϊόντων τροφίμων.

Πρώτο στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη των θερμοφυσικών ιδιοτήτων της λακτόζης και η μελέτη του φαινομένου κρυστάλλωσης αυτής. Η κρυστάλλωση και καταβύθιση της λακτόζης μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε διεργασίες που περιλαμβάνουν την ενζυμική μετατροπή της σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, ιδιαίτερα όταν απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης και θερμοκρασίες στο αντιδρών διάλυμα για την επίτευξη υψηλών βαθμών απόδοσης της βιοδιεργασίας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των κυριότερων συστατικών του όξινου και γλυκού ορού (γαλακτικό οξύ, πρωτεΐνες, γαλακτόζη) στο φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης, σε εύρος ενεργότητας νερού από 0,11 έως 0,84 και θερμοκρασίας από 20 έως 50 °C, μέσω της κατασκευής δυναμικών καμπυλών ισόθερμης ρόφησης νερού. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών από την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης στην κρυστάλλωση της λακτόζης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι σε συστήματα καθαρής λακτόζης δεν παρατηρήθηκε κρυστάλλωση σε τιμές ενεργότητας νερού μικρότερες από 0,43. Αντίθετα, σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας νερού έλαβε χώρα κρυστάλλωση της λακτόζης, η οποία γινόταν ταχύτερα όσο υψηλότερες ήταν οι τιμές της ενεργότητας νερού και της θερμοκρασίας. Η προσθήκη γαλακτικού οξέος στα συστήματα καθαρής λακτόζης ενίσχυσε την κρυστάλλωση της λακτόζης, λόγω της υψηλής υγροσκοπικότητάς του. Υψηλότερα ποσοστά γαλακτικού οξέος οδήγησαν στην κρυστάλλωση της λακτόζης ταχύτερα και σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού. Από την άλλη, η προσθήκη πρωτεϊνών και γαλακτοολιγοσακχαριτών στα συστήματα λακτόζης απέτρεψε την κρυστάλλωση της λακτόζης σε τιμές ενεργότητας νερού έως 0,43, ενώ δεν φάνηκε να έχει επίδραση στο φαινόμενο αυτό σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας νερού. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από αναλύσεις των συστημάτων λακτόζης με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, καθώς η προσθήκη γαλακτικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα την

ταχεία μείωση των θερμοκρασιών υαλώδους μετάπτωσης και κρυστάλλωσης της λακτόζης, ενώ η προσθήκη πρωτεϊνών είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της μείωσης των δύο μεγεθών.

Δεύτερο στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη των βιοτεχνολογικών ιδιοτήτων τεσσάρων ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης, προκειμένου να προσδιορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης καθενός, για να εφαρμοσθούν στη συνέχεια στα παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας προς παραγωγή πρεβιοτικών γαλακτοολιγοσακχαριτών. Πρόκειται για δύο εμπορικές, βιομηχανικά εφαρμοζόμενες β-γαλακτοζιδάσες από τη ζύμη *Kluyveromyces lactis* και τον μύκητα *Aspergillus oryzae*, μία θερμόφιλη, καινοτόμος β-γαλακτοζιδάση από τον μύκητα *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένη στη ζύμη *Pichia pastoris*, και μια υπερθερμόφιλη β-γλυκοζιδάση με ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης από το βακτήριο *Thermotoga neapolitana*, ετερόλογα εκφρασμένη στο βακτήριο *Escherichia coli*. Η παραγωγή των δύο τελευταίων λακτασών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του ΕΜΠ.

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* παρουσίασε βέλτιστη ενεργότητα σε τιμή pH ίση με 7,2 και θερμοκρασία 35 °C, διατηρώντας περισσότερο από το 96 % της ενεργότητάς της έπειτα από 10 h επώασης. Η ενεργότητά της φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία ιόντων μετάλλων, με την παρουσία των ιόντων K⁺, Na⁺ και Ca²⁺ να ενισχύει τη δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ η παρουσία ιόντων Mg²⁺, Mn²⁺ και Zn²⁺ φάνηκε να δρα παρεμποδιστικά προς αυτό. Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* είχε βέλτιστη ενεργότητα σε τιμή pH ίση με 4,5 και θερμοκρασία 45 °C, παραμένοντας σταθερή για περισσότερες από 10 h επώασης, ενώ η ενεργότητά της δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων μετάλλων. Η καινοτόμος β-γαλακτοζιδάση από τον *T. terrestris* εμφάνισε βέλτιστη δράση σε συνθήκες τιμής pH ίση με 5,0 και θερμοκρασία 50 °C. Και αυτή η λακτάση δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων μετάλλων. Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες δράσης της υπερθερμόφιλης β-γλυκοζιδάσης από τον *T. neapolitana* προσδιορίστηκαν ως τιμή pH ίση με 5,5 και θερμοκρασία 90 °C.

Τρίτο στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η εφαρμογή των μελετηθέντων ενζύμων στα κύρια παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας για την παραγωγή συστατικών υψηλής αξίας. Συγκεκριμένα, οι παραπάνω λακτάσες εφαρμόσθηκαν σε υπόστρωμα όξινου ορού γιαουρτιού και μελετήθηκε η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Πριν την ενζυμική αντίδραση, ο ορός συμπυκνώθηκε υπό κενό και μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο βαθμό απόδοσης των GOS σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων. Τα προϊόντα των ενζυμικών

αντιδράσεων αναλύθηκαν μέσω Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή. Ως βαθμός απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS ορίζεται το ποσοστό της συγκέντρωσης των παραγόμενων GOS προς την αρχική συγκέντρωση της λακτόζης στο αντιδρών σύστημα. Για τον υπολογισμό του βαθμού απόδοσης σε GOS ελήφθησαν υπόψη όλα τα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης πλην του δισακχαρίτη 6-γαλακτοβιόζη, η παραγωγή του οποίου φάνηκε να ακολουθεί διαφορετική χρονική μεταβολή από όλους τους υπόλοιπους ολιγοσακχαρίτες. Η συγκέντρωση της 6-γαλακτοβιόζης μετρήθηκε στο σημείο μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS και κατόπιν προσμετρήθηκε σε αυτόν.

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* εφαρμόστηκε σε μη συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v και σε συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10, 14 και 18 % w/v, και τα ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν ήταν στο εύρος 0,06-0,26 U/mL. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $23,7 \pm 1,4$ % επιτεύχθηκε με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 0,13 U/mL στον μη συμπυκνωμένο όξινο ορό, έπειτα από 1,5 h ενζυμικής αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης για αυτήν τη λακτάση (35 °C και pH = 7,2). Η συγκέντρωση της 6-γαλακτοβιόζης στο σημείο αυτό ήταν ίση με 3,72 % της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη, ανεβάζοντας τον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS στο $27,4 \pm 1,5$ %. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παράχθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες με αυτό το ένζυμο ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλ-λακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η αλλολακτόζη και περιείχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά 31,5, 13,6 και 7,13 %, αντίστοιχα.

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* εφαρμόστηκε σε μη συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v και σε συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10, 15 και 20 % w/v, και τα ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν ήταν στο εύρος 0,5-8,0 U/mL. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $23,4 \pm 0,9$ % επιτεύχθηκε με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 4,0 U/mL στον συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v, έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης για αυτήν τη λακτάση (45 °C και pH = 4,5). Η συγκέντρωση 6-γαλακτοβιόζης στο σημείο αυτό ήταν ίση με 4,78 % της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη, ανεβάζοντας τον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS στο $28,2 \pm 1,1$ %. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παράχθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες με αυτό το ένζυμο ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η 6-γαλακτοβιόζη και η αλλολακτόζη σε ποσοστά 41,9, 17,0, και 5,72 %, αντίστοιχα.

Η β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* εφαρμόστηκε σε μη συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,1 % w/v και σε συμπυκνωμένο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10, 15 και 20 % w/v, και τα ενζυμικά φορτία που μελετήθηκαν ήταν στο εύρος 1,0-16 U/mL. Μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με $25,7 \pm 0,3$ % επιτεύχθηκε με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου 8,0 U/mL στον συμπυκνωμένο όξινο ορό με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 20 % w/v, έπειτα από 7 h ενζυμικής αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης για αυτήν τη λακτάση (50 °C και pH = 4,0). Η συγκέντρωση της 6-γαλακτοβιόζης στο σημείο αυτό ήταν ίση με 6,07 % της αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη, αυξάνοντας τον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS στο $31,8 \pm 0,4$ %. Οι τρεις κυριότεροι GOS που παράχθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες με αυτό το ένζυμο ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη και η 6-γαλακτοβιόζη σε ποσοστά 45,6 και 19,1 %, αντίστοιχα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων και αξιολόγηση του κύκλου ζωής της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών με αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών του ΕΜΠ. Η καινοτόμος αξιοποίηση του όξινου ορού περιελάμβανε την προσυμπύκνωση του ορού για την επίτευξη της επιθυμητής αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη, την ενζυμική αντίδραση ολιγομερισμού της λακτόζης και κατόπιν την παραγωγή δύο διαφορετικών προϊόντων GOS, ένα σε μορφή σιροπιού με περαιτέρω συμπύκνωση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης και ένα σε μορφή σκόνης με ξήρανση των προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης με ψεκασμό. Προσδιορίστηκε η περιβαλλοντική επίδοση των διαδικασιών/προϊόντων που προκύπτουν κατά τον κύκλο επεξεργασίας και διαχείρισης του όξινου ορού της βιομηχανίας στραγγιστού γιαουρτιού ελέγχοντας τα χαρακτηριστικά του, την απαιτούμενη κατανάλωση ενέργειας και νερού εκτιμώντας το συνολικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα μέσω αξιολόγησης κύκλου ζωής και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τη συμβατική γραμμή διαχείρισης του όξινου ορού.

Η εκτίμηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των καινοτόμων μεθόδων αξιοποίησης του όξινου ορού γιαουρτιού και της συμβατικής τεχνικής πραγματοποιήθηκε μέσω των δεκαοκτώ κατηγοριών επιπτώσεων, όπως αυτές προτείνονται στη μεθοδολογία ReCiPe. Ξεκινώντας με την παραγωγή συμπυκνώματος ολιγοσακχαριτών σε εργαστηριακή κλίμακα, η μέθοδος αυτή εμφανίζει αρνητικά ποσοστά σε 11 από τις 18 κατηγορίες επιπτώσεων, επιβεβαιώνοντας τα περιβαλλοντικά του πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής. Σε 3 κατηγορίες, εμφανίζει περίπου τις ίδιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (εύρος ποσοστών: 0-5 %) και υψηλότερες περιβαλλοντικές

επιπτώσεις στις 4 κατηγορίες της μείωσης ορυκτών πόρων, της ιονίζουσας ακτινοβολίας και της δημιουργίας φωτοχημικού όζοντος στα οικοσυστήματα και στην ανθρώπινη υγεία. Οι αυξήσεις σε αυτές τις κατηγορίες οφείλονται στο γεγονός ότι η συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας, οι οποίες χρησιμοποιούνταν για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των εγκαταστάσεων της εταιρείας, πλέον θα βασίζεται σε δύο ρεύματα (κομμένο τυρόγαλο και επιστρεφόμενα προϊόντα) και όχι και στο ρεύμα του όξινου ορού γιαουρτιού, το οποίο θα χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παραγωγή των καινοτόμων προϊόντων, για την οποία γίνεται χρήση ηλεκτρικής ενέργειας. Όσον αφορά την παραγωγή σκόνης ολιγοσακχαριτών σε εργαστηριακή κλίμακα, εμφανίζει αρνητικά ποσοστά σε 10 από τις 18 κατηγορίες επιπτώσεων, περίπου τις ίδιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (εύρος ποσοστών: 0–5%) σε 3 κατηγορίες και υψηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε 5 κατηγορίες, οι 4 εκ των οποίων συζητήθηκαν προηγουμένως και η πέμπτη είναι η χερσαία οικοτοξικότητα.

Συνολικά, οι καινοτόμες μέθοδοι υπερέρχουν από τη συμβατική όταν λαμβάνεται υπόψη το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα σε πολλές κατηγορίες επιπτώσεων και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν σκεφτεί κάποιος ότι οι ενεργειακές καταναλώσεις υπολογίζονται σε εξοπλισμό ενεργειακής κλίμακας με συγκεκριμένες αποδόσεις και περιορισμένες δυνατότητες ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης νερού και ατμών. Εάν ληφθεί υπόψη η κλιμάκωση σε βιομηχανικό εξοπλισμό, τα περιβαλλοντικά προτερήματα των προτεινόμενων μεθόδων θα γίνουν ακόμα πιο εμφανή. Ανάμεσα στις δύο προτεινόμενες μεθόδους για την παραγωγή των καινοτόμων προϊόντων, η πρώτη μέθοδος παραγωγής συμπυκνώματος GOS είναι περιβαλλοντικά ανώτερη και αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό στην κατηγορία της κλιματικής αλλαγής, η περιβαλλοντική σημασία της οποίας αξιολογείται από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος ως «πολύ υψηλή».

Στη συνέχεια, οι δύο βιομηχανικές λακτάσες από τους μικροοργανισμούς *K. lactis* και *A. oryzae* εφαρμόστηκαν σε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης και μελετήθηκε η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Πριν την ενζυμική αντίδραση, ο ορός συμπυκνώθηκε υπό κενό και μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο βαθμό απόδοσης των GOS σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, το μη συμπυκνωμένο τυρόγαλα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 5,1 % w/v και δύο συμπυκνώματα με περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 10 και 15 % w/v. Τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων αναλύθηκαν μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης. Ο βαθμός απόδοσης σε GOS ορίσθηκε όπως και στην περίπτωση της μελέτης του όξινου ορού γιαουρτιού. Για τον υπολογισμό του βαθμού

απόδοσης ελήφθησαν υπόψη τα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης που ανιχνεύθηκαν με αυτή την μέθοδο, ήτοι οι ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσο του 3. Κατόπιν, στις συνθήκες μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης, αναλύθηκαν οι παραγόμενοι GOS με Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των κυριότερων προϊόντων τρανσγαλακτοζυλίωσης.

Η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσου με $21,7 \pm 0,2$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου $0,13$ U/mL στο συμπυκνωμένο τυρόγαλα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v, έπειτα από 5 h ενζυμικής αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης για αυτήν τη λακτάση (35 °C και $pH = 7,2$). Τα κυριότερα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης στις συνθήκες μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη, η αλλολακτόζη και η 6-γαλακτοβιόζη και περιέχονταν στο μείγμα των GOS σε ποσοστά $31,6$, $21,6$ και $14,8$ %, αντίστοιχα.

Από την άλλη, η εφαρμογή της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* οδήγησε στην επίτευξη μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ίσου με $17,9 \pm 1,6$ %, με εφαρμογή ενζυμικού φορτίου $2,0$ U/mL στο συμπυκνωμένο τυρόγαλα με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 15 % w/v, έπειτα από 1 h ενζυμικής αντίδρασης, στις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης για αυτήν τη λακτάση (45 °C και $pH = 4,5$). Τα κυριότερα προϊόντα τρανσγαλακτοζυλίωσης στις συνθήκες μεγιστοποίησης του βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν η 6'-O-β-γαλακτοζυλο-λακτόζη και η 6-γαλακτοβιόζη σε ποσοστά $68,0$ και $2,05$ %.

Στην συνέχεια, οι GOS που παράχθηκαν με αξιοποίηση των παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας, συγκεκριμένα του όξινου ορού γιαουρτιού, ενσωματώθηκαν σε γαλακτοκομικό προϊόν και μελετήθηκε η ποιότητά του, με ταυτόχρονη πραγματοποίηση πειραμάτων διατηρησιμότητας. Το προϊόν αφορούσε σε μία κρέμα με άρωμα βανίλιας. Για την προσθήκη του διαλύματος GOS που παράχθηκε στην κλασική κρέμα βανίλιας πραγματοποιήθηκαν μία 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 %w/w. 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 οδήγησε στην καθυστέρηση της

ανάπτυξης των μικροοργανισμών. 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. 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 ΔΕ 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. Επιπλέον, μέσω της μέτρησης της αντικειμενικής υφής των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι οι κρέμες με γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν σταθερές τιμές των χαρακτηριστικών μεγεθών της υφής (συνεκτικότητα, πηκτότητα, προσκολλησιμότητα, δείκτη ελαστικότητας, κομμιώδες). Αντίθετα, τα δείγματα αναφοράς παρουσίασαν αρχικά μείωση και έπειτα αύξηση της τιμής της πηκτότητας και του κομμιώδους 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.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καταδεικνύουν την εφικτότητα και την υψηλή αποδοτικότητα της μετατροπής του όξινου και του γλυκού ορού από δύο χαμηλής αξίας παραπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας σε συστατικά με υψηλή θρεπτική και προστιθέμενη αξία, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, μέσω εφαρμογής καινοτόμων διεργασιών και βιοκαταλυτών. Η προτεινόμενη στην παρούσα διατριβή διεργασία μπορεί να εφαρμοσθεί άμεσα από κάθε γαλακτοβιομηχανία, για την παραγωγή νέων ή τον επανασχεδιασμό υπαρχόντων γαλακτοκομικών προϊόντων, μέσω μιας διαδικασίας πρακτικά μηδενικών εκροών που ευθυγραμμίζεται με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, *37*(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Altuntas, S., & Hapoglu, H. (2019). Kefir-type drinks from whey. In *Non-alcoholic Beverages: Volume 6. The Science of Beverages* (pp. 185–226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00007-4>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. In *Bioresource Technology* (Vol. 280, pp. 478–488). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Benaissa, M., Zadi-Karam, H., & Karam, N.-E. (2017). Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*, *16*(30), 1630–1637. <https://doi.org/10.5897/ajb2017.16088>
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, *4*(6), 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, *71*(8), 755–758. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>
- Božanić, R., Barukčić, I., Lisak, K., Tratnik, J., & Tratnik, L. (2014). Possibilities of Whey Utilisation. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, *2*(7), 1–7.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. Tetrapak Processing Systems.
- Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., & Vasiljevic, T. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, *98*(7), 4352–4363. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9435>
- Cinar, K., Gunes, G., & Gulec, H. A. (2020). Enzymatic synthesis of prebiotic carbohydrates from lactose: Kinetics and optimization of transgalactosylation activity of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Process Engineering*, *43*(8). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13435>
- Das, B., Sarkar, S., Maiti, S., & Bhattacharjee, S. (2016). Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. In *Materials Today:*

www.sciencedirect.comwww.materialstoday.com/proceedings

- de Wit, J. N. (2001). *Lecturer's Handbook on whey and whey products* (1st ed.). European Whey Products Association.
- Dickson, R. C., Dickson, L. R., & Markin, J. S. (1979). Purification and Properties of an Inducible β -Galactosidase Isolated from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 51–61.
- Diniz, R. H. S., Rodrigues, M. Q. R. B., Fietto, L. G., Passos, F. M. L., & Silveira, W. B. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.002>
- DIONEX Application Note 155. (2016). *Determination of Trans-Galactooligosaccharides in Foods by AOAC Method 2001.02*. Thermo Scientific.
- Elena Mondragón-Parada, M., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., & Cristiani-Urbina, E. (2006). Lactic Acid Bacteria Production From Whey 223 Lactic Acid Bacteria Production From Whey. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 134).
- Erickson, B. E. (2017). Acid whey: Is the waste product an untapped goldmine? Companies, food scientists develop innovative solutions to handle tons of Greek yogurt byproduct. *Chemical & Engineering News*, 95(6). <https://cen.acs.org/articles/95/i6/Acid-whey-waste-product-untapped.html>
- Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
- Fox, P. F. (2011). Lactose: Chemistry, Properties. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 173–181). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00274-0>
- Fujimura, Y., Rokushika, S., & Ohnishi, M. (2003). Purification and molecular characterization of β -galactosidase from yeast *Kluyveromyces lactis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3(3), 97–103.
- Füreder, V., Rodriguez-Colinas, B., Cervantes, F. V., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2020). Selective Synthesis of Galactooligosaccharides Containing $\beta(1\rightarrow3)$ Linkages with β -Galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* (Saphera). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(17), 4930–4938. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00997>

- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>
- González Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, *57*(1), 1–11.
- González-Delgado, I., López-Muñoz, M. J., Morales, G., & Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*, *61*, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>
- Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, *70*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. In *Biotechnology Advances* (Vol. 28, Issue 3, pp. 375–384). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>
- Huang, J., Zhu, S., Zhao, L., Chen, L., Du, M., Zhang, C., & Yang, S. T. (2020). A novel β -galactosidase from *Klebsiella oxytoca* ZJUH1705 for efficient production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(14), 6161–6172. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10679-9>
- Jelen, P. (2011). WHEY PROCESSING | Utilization and Products. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 731–737). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00495-7>
- Jenab, E., Omidghane, M., Mussone, P., Armada, D. H., Cartmell, J., & Montemagno, C. (2018). Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization. *Journal of Food Engineering*, *222*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.015>
- Johnson, J. M., & Conforti, F. D. (2003). Lactose. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed., pp. 3472–3476). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00674-X>
- Kazemi, S., Khayati, G., & Faezi-Ghasemi, M. (2016). β -galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state

- fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. *Iranian Biomedical Journal*, 20(5), 287–294. <https://doi.org/10.22045/ibj.2016.06>
- Ketterings, Q., Czymmek, K., Gami, S., Godwin, G., & Ganoe, K. (2017). Guidelines for Land Application of Acid Whey. *Cornell University Department of Animal Science Publication Series*, 247.
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2017). Whey proteins. In *Proteins in Food Processing, Second Edition* (pp. 93–126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
- Kirmaci, H. A., Özer, B. H., Akçelik, M., & Akçelik, N. (2016). Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 301–307. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12260>
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 22, 366–382. <https://doi.org/10.1007/BF01338151>
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
- Mano, M. C. R., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2019). Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*, 124, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>
- Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A., & Moraru, C. I. (2019). Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3978–3984. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15951>
- Nishanthi, M., Vasiljevic, T., & Chandrapala, J. (2017). Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, 66, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.009>
- O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2002). LIPIDS | Analytical Methods. In H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1583–1587). Academic Press.
- OECD-FAO *Agricultural Outlook 2023-2032*. (2023). OECD. <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>
- Park, T. H., Choi, K. W., Park, C. S., Lee, S. B., Kang, H. Y., Shon, K. J., Park, J. S., & Cha, J. (2005). Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a

thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), 411–422. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0055-1>

Paterson, A. H. J. (2011). Lactose: Production, Applications. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 196–201). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00274-0>

Rico-Rodríguez, F., Noriega, M. A., Lancheros, R., & Serrato-Bermúdez, J. C. (2021). Kinetics of galactooligosaccharide (GOS) production with two β -galactosidases combined: Mathematical model and raw material effects. *International Dairy Journal*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105015>

Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., Mayta-Apaza, A., Giusti, M., Jiménez-Flores, R., & García-Cano, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 104, Issue 2, pp. 1262–1275). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>

Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 479–498). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>

Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. In *3 Biotech* (Vol. 7, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>

Seddigh, S., & Darabi, M. (2014). Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on *Arabidopsis thaliana*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 140–150. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-14>

Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering (Basic Concepts)* (2nd ed.). Prentice Hall PTR.

Simović, M., Milivojević, A., Čorović, M., Banjanac, K., & Bezbradica, D. (2019). Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized β -galactosidase. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3074–3082. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14222>

- Skryplonek, K., Dmytrów, I., & Mituniewicz-Małek, A. (2019). Probiotic fermented beverages based on acid whey. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 7773–7780. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16385>
- Skryplonek, K., & Jasińska, M. (2015). Fermented probiotic beverages based on acid whey. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, *14*(4), 397–405. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.4.39>
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *International Dairy Journal*, *18*(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. In *International Dairy Journal* (Vol. 48, pp. 2–14). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Steenftoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T. B. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Levery, S. B., & Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO Journal*, *32*(10), 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2000). *YOGHURT Science and Technology* (2nd.). Woodhead Publishing Limited.
- Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., & Horiuchi, T. (1975). Purification and Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem*, *77*, 241–247.
- Tanriseven, A., & Dogan, S. (2002). A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Process Biochemistry*, *38*, 27–30. www.elsevier.com/locate/procbio
- Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>
- Urrutia, P., Rodriguez-Colinas, B., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Wilson, L., Illanes, A., & Plou, F. J. (2013). Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(5), 1081–1087. <https://doi.org/10.1021/jf304354u>
- van Boekel, M. A. J. S., & Ribadeau Dumas, B. (1987). Addendum to the evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, *41*, 281–284.

- Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 32, Issue 12). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2159-4>
- Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research*, 346(6), 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>
- Villarreal, M. (2017). *Value added products utilizing acid whey: Development of a fruit yogurt beverage and a sports drink*. Cornell University.
- Walker, J. M., Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks (pp. 571–607). Humana Press Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Warmerdam, A., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2014). Kinetic characterization of galacto-oligosaccharide (GOS) synthesis by three commercially important β -galactosidases. *Biotechnology Progress*, 30(1), 38–47. <https://doi.org/10.1002/btpr.1828>
- Weisberg, S. M. (1954). Recent Progress in the Manufacture and Use of Lactose: A Review. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 37, Issue 9, pp. 1106–1115). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(54\)91374-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(54)91374-0)
- Yadav, A., & Kayastha, A. M. (2020). *Lens culinaris* β -galactosidase (Lsbgal): Insights into its purification, biochemical characterization and trisaccharides synthesis. *Bioorganic Chemistry*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103543>
- Yañez-Ñeco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., & Arrizon, J. (2021). Synthesis of $\beta(1 \rightarrow 3)$ and $\beta(1 \rightarrow 6)$ galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β -galactosidase from *Pantoea anthophila*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>
- Yin, H., Bultema, J. B., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 225, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>

- Zall, R. R. (1992). *Chapter 1 SOURCES AND COMPOSITION OF WHEY AND PERMEATE*.
- Zerva, A., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2015). Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. *Enzyme and Microbial Technology*, 75–76, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.012>
- Zerva, A., Limnaios, A., Kritikou, A. S., Thomaidis, N. S., Taoukis, P., & Topakas, E. (2021). A novel thermophile β -galactosidase from *Thermothielavioides terrestris* producing galactooligosaccharides from acid whey. *New Biotechnology*, 63, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.002>
- Zeuner, B., Nyffenegger, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2016). Thermostable β -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 33(3), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.003>
- Ανδρικόπουλος, Ν. Κ. (2015). *Τροφογνωσία. Περιγραφική Χημεία & Τεχνολογία Τροφίμων*. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. www.kallipos.gr

