

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ**Α. Λημναίος^{1,*}, Α. Ζέρβα², Ε. Τόπακας², Π. Ταούκης¹**¹Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Χημικών Μηχανικών,
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, Ελλάδα²Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, Ελλάδα
(*alimnaios@chemeng.ntua.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Οι β-γαλακτοζιδάσες είναι ένζυμα-κλειδιά για τη βιομηχανία τροφίμων. Εκτός από την υδρόλυση του γλυκοζιδικού δεσμού της λακτόζης, δύνανται να καταλύσουν, επίσης, αντιδράσεις τρανσγαλακτοζυλίωσης, προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (Galactooligosaccharides, GOS), σάκχαρα τα οποία παρουσιάζουν πρεβιοτική δράση. Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η ετερόλογη παραγωγή μιας καινοτόμου β-γαλακτοζιδάσης από τον μύκητα *Thielavia terrestris* στη ζύμη *Pichia pastoris*. Το ετερόλογο ένζυμο (*TtbGal1*), αφού απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, χαρακτηρίστηκε, παρουσιάζοντας άριστη δράση στους 50°C και σε pH=4. Το *TtbGal1* εφαρμόσθηκε, αρχικά, σε πρότυπα διαλύματα λακτόζης, για την παραγωγή GOS. Μετά την αριστοποίηση διαφόρων παραμέτρων, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS ανήλθε σε 22,3%. Κατόπιν, το ένζυμο εφαρμόσθηκε παρομοίως σε όξινο ορό, το κυριότερο παραπροϊόν της παραγωγικής διαδικασίας στραγγιστού γιαουρτιού, με τον μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS να ανέρχεται σε 19,3%. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας καταδεικνύουν ότι η εφαρμογή της καινοτόμου β-γαλακτοζιδάσης σε όξινο ορό γιαουρτιού δύνανται να αποδώσει ικανοποιητική παραγωγή GOS.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η β-γαλακτοζιδάση είναι μια υδρολάση του γλυκοζιδικού δεσμού, η οποία καταλύει την υδρόλυση του δισακχαρίτη της λακτόζης στα μονομερή της, τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη^[1]. Οι β-γαλακτοζιδάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στη γαλακτοβιομηχανία, για την υδρόλυση της λακτόζης σε γαλακτοκομικά προϊόντα, προς παραγωγή προϊόντων ελεύθερων λακτόζης (lactose-free), για καταναλωτές που παρουσιάζουν δυσανεξία στη λακτόζη^[2].

Εκτός από την υδρόλυση της λακτόζης, οι β-γαλακτοζιδάσες δύνανται να καταλύσουν και την αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης^[3,4], προς σχηματισμό ολιγομερών, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharides, GOS). Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου συνίσταται σε δύο στάδια^[1]. Στο πρώτο στάδιο, η β-γαλακτοζιδάση προσβάλλει το ανωμερικό κέντρο του μονομερούς της γαλακτόζης στο μόριο της λακτόζης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο γαλακτόζης-ενζύμου, με παράλληλη απελευθέρωση ενός μορίου γλυκόζης. Το δεύτερο στάδιο εξαρτάται από το υπόστρωμα-δέκτη. Αν ο δέκτης είναι το νερό, τότε το σύμπλοκο γαλακτόζης-ενζύμου απελευθερώνει το μονομερές της γαλακτόζης, οδηγώντας σε αντίδραση υδρόλυσης. Αν ο δέκτης είναι η λακτόζη, ένας μονοσακχαρίτης ή ένας ολιγοσακχαρίτης, τότε σχηματίζεται ένας GOS, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης. Ακολούθως, ο σχηματιζόμενος GOS δύναται ν' αποτελέσει είτε υπόστρωμα-δέκτη, αντιδρώντας με άλλο σύμπλοκο γαλακτόζης-ενζύμου, προς παραγωγή GOS υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού, είτε δότη, με αποτέλεσμα την αποσύνθεσή του^[5]. Συνεπώς, η παραγωγή GOS είναι μια κινητικά ελεγχόμενη ενζυμική αντίδραση, η οποία συνίσταται στις ανταγωνιστικές αντιδράσεις της υδρόλυσης και της τρανσγαλακτοζυλίωσης. Τα είδη των δεσμών μεταξύ των μονομερών και ο βαθμός πολυμερισμού των GOS που συντίθενται εξαρτώνται από την προέλευση του ενζύμου και τις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης^[1,4].

Οι GOS είναι σημαντικά πρεβιοτικά, τα οποία συμβάλλουν στην υγεία του εντέρου, προάγοντας την ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας^[5]. Κατά τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για την αριστοποίηση της μετατροπής της λακτόζης σε GOS, με τη χρήση

εμπορικών ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης από διάφορους μικροοργανισμούς^[6], οδηγώντας σε υψηλούς βαθμούς απόδοσης σε GOS^[5]. Ωστόσο, η οικονομικά αποδοτικότερη παραγωγή GOS συνίσταται στη χρήση χαμηλού κόστους πρώτων υλών ως υπόστρωμα, όπως είναι ο ορός, το κυριότερο παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας. Υπάρχουν δύο κύρια είδη ορού: ο γλυκός ορός, ο οποίος αποβάλλεται κατά την τυροκόμηση, και ο όξινος ορός, ο οποίος αποβάλλεται κατά την παραγωγική διαδικασία στραγγιστού γιαουρτιού και ορισμένων λευκών τυριών^[7,8].

Κατά τα τελευταία χρόνια, ο ορός έχει θεωρηθεί ως απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας. Στις μεθόδους διαχείρισης αυτού του «αποβλήτου» περιλαμβάνονται ο ψεκαμός του ορού σε χωράφια, η απόρριψή του σε υδάτινους αποδέκτες ή σε συστήματα διαχείρισης αστικών αποβλήτων, αλλά και η χρήση του ως ζωοτροφή. Ωστόσο, η οσμή, τα άλατα, η τιμή του pH και το μεγάλο βιολογικό φορτίο του ορού καθιστούν αυτές τις μεθόδους απαγορευτικές^[9]. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να βρεθούν νέες προσεγγίσεις αναφορικά με την αξιοποίησή του, προκειμένου για τη διαχείριση των τεράστιων ποσοτήτων ορού που παράγονται σε ετήσια βάση.

Ωστόσο, λίγες ερευνητικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα αναφορικά με την αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού προς παραγωγή GOS. Τα πρώτα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι βιομηχανικά διαθέσιμες β-γαλακτοζιδάσες από *Aspergillus oryzae* και *Kluyveromyces lactis* δύνανται να καταλύσουν τον ολιγομερισμό της λακτόζης προς παραγωγή GOS, χρησιμοποιώντας όξινο και γλυκό ορό ως υπόστρωμα, επιτυγχάνοντας μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 32,6% επί τη βάσει των ολικών σακχάρων^[10]. Ωστόσο, οι β-γαλακτοζιδάσες από ζύμες ή βακτήρια παρουσιάζουν βέλτιστο pH δράσης στην ουδέτερη περιοχή (6-7)^[11], με αποτέλεσμα ν' απαιτείται η ρύθμιση του pH του όξινου ορού, προκειμένου για την αξιοποίησή του. Αυτό μπορεί ν' αποφευχθεί με τη χρήση β-γαλακτοζιδασών μυκητιακής προέλευσης, όπως ο *A. oryzae*, οι οποίες δρουν βέλτιστα σε pH=4,5^[12]. Επιπλέον, για βιομηχανικές διεργασίες μεγάλης κλίμακας προτιμώνται, συνήθως, θερμοφιλά ένζυμα, τα οποία είναι ανθεκτικά στις έντονες βιομηχανικές συνθήκες. Συνεπώς, η βέλτιστη και οικονομικά βιώσιμη αξιοποίηση του όξινου ορού προκρίνει την εύρεση β-γαλακτοζιδασών με υψηλή θερμοσταθερότητα και βέλτιστη δράση σε όξινες τιμές pH.

Ο *Thielavia terrestris* είναι ένας νηματοειδής ασκομύκητας, με άριστες συνθήκες ανάπτυξης σε θερμοκρασία 40-45 °C και pH=4,5. Η θερμοφιλή φύση και η δράση του μικροοργανισμού σε όξινο περιβάλλον, σε συνδυασμό με τη γνωστή γονιδιακή ακολουθία του^[13], καθιστούν τον *T. terrestris* έναν εξαιρετικό υποψήφιο μικροοργανισμό για την εύρεση καινοτόμων θερμοφίλων και σταθερών σε όξινες συνθήκες βιοκαταλυτών.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ο *Thielavia terrestris* ως πηγή για την ανακάλυψη μιας καινοτόμου, σταθερής σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινες τιμές pH β-γαλακτοζιδάσης, στοχεύοντας στην παραγωγή GOS από όξινο ορό, με ελάχιστη προεπεξεργασία του υλικού. Επελέγη το γονίδιο *Ttbgal1* από το γονιδίωμα του *T. terrestris*, κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε ετερόλογα στον μικροοργανισμό *Pichia pastoris*. Το ένζυμο απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε και εφαρμόστηκε για την παραγωγή GOS από πρότυπα διαλύματα λακτόζης και όξινο ορό. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συντείνουν στην αποδοτική παραγωγή GOS από όξινο ορό, μέσω του *Ttbgal1*.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην ενεργότητα και σταθερότητα του ενζύμου μετρήθηκε χρησιμοποιώντας 0,5 mM oNPG (*Sigma-Aldrich, H.P.A.*) ως υπόστρωμα. Η βέλτιστη τιμή pH υπολογίστηκε στους 40°C μετά από 10 min επώασης ενζύμου και υποστρώματος σε εύρος pH 3,0-9,0, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου υπολογίστηκε στο εύρος 20-70°C, με επώαση ενζύμου και υποστρώματος για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=4,0. Η θερμοσταθερότητα του *Ttbgal1* υπολογίστηκε

στο εύρος 20-70°C μετά από επώαση ενζύμου και υποστρώματος για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=8,0.

Ο όξινος ορός στραγγιστού γιαουρτιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρελήφθη παστεριωμένος από ελληνική γαλακτοβιομηχανία, με αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη ίση με 3,29% w/v και τιμή pH=4,5. Ακολούθησε συμπύκνωση του ορού με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτήρα υπό κενό (*Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Γερμανία*) σε θερμοκρασία 45°C και περιστροφική συχνότητα 110 rpm, μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής περιεκτικότητας σε λακτόζη (10,1% w/v).

Οι ενζυμικές αντιδράσεις με πρότυπα διαλύματα λακτόζης (*Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.*) ή όξινο ορό ως υπόστρωμα πραγματοποιήθηκαν εντός δοκιμαστικών σωλήνων εμβαπτισμένων σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας (*Memmert GmbH & CO. KG, Γερμανία*), εντός των οποίων μεταφέρονταν για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας 1,8 mL διαλύματος λακτόζης επιθυμητής συγκέντρωσης ή ορού επιθυμητής περιεκτικότητας σε λακτόζη και 0,2 mL διαλύματος ενζύμου, κατάλληλης αραίωσης για την επίτευξη της επιθυμητής ενεργότητας στο διάλυμα της αντίδρασης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν δειγματοληψία και το ένζυμο απενεργοποιείτο με επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C για 10 min. Μετά την ψύξη των δειγμάτων, αυτά φιλτράρονταν με χρήση φίλτρου 0,22 μm, πριν την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Για την ανάλυση των περιεχόμενων σακχάρων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με στήλη Zorbax Microsorb-MV 100-5 NH₂, στην οποία ήταν προσαρτημένη προστήλη Zorbax Polaris 5 NH₂ MetaGuard (*Agilent Technologies, Η.Π.Α.*), ενώ ο διαλύτης έκλουσης ήταν διάλυμα ακετονιτριλίου σε νερό με αναλογία 70% v/v ακετονιτρίλιο σε νερό. Η ανίχνευση των σακχάρων έγινε με χρήση ανιχνευτή δείκτη διάθλασης HP 1047A (*Hewlett-Packard Company, Η.Π.Α.*). Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μονο-, δι- και ολιγοσακχαριτών έγινε με χρήση προτύπων σακχάρων (γαλακτόζη, λακτόζη και ραφινόζη, *Sigma-Aldrich, Η.Π.Α.*). Ο βαθμός απόδοσης σε GOS εκφράσθηκε ως $Y_{GOS} = \frac{\% \text{ w/v περιεκτικότητα σε GOS}}{\% \text{ w/v αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη}} \cdot 100\%$. Ο βαθμός υδρόλυσης των GOS εκφράσθηκε ως $h_{GOS} = \frac{\text{εναπομένουσα \% w/v περιεκτικότητα σε GOS}}{\text{μέγιστη \% w/v περιεκτικότητα σε GOS}} \cdot 100\%$.

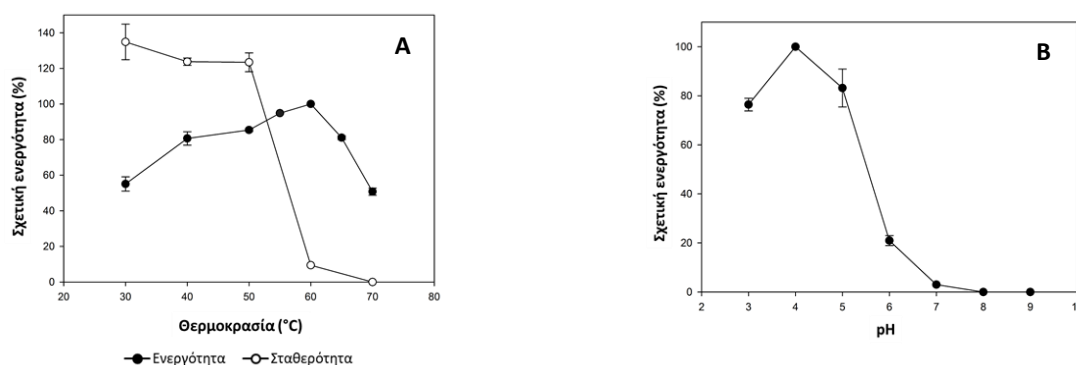
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα, επελέγη το γονίδιο *bgal1* (XP_003652726) του μικροοργανισμού *T. terrestris* ως ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την καινοτόμο β-γαλακτοζιδάση. Η μετάφραση του εξωνίου αυτού του γονιδίου είναι παρόμοια με πολλές γνωστές μυκητιακές β-γαλακτοζιδάσες με δραστικότητα τρανσγαλακτοζυλίωσης. Αυτό το γονίδιο κλωνοποιήθηκε και εκφράσθηκε στον μικροοργανισμό *P. pastoris*, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα βιοτεχνολογικά εργαλεία και η παραγόμενη πρωτεΐνη (*Ttbgal1*) απομονώθηκε και χαρακτηρίσθηκε.

Η άριστη δράση του ενζύμου *Ttbgal1* παρατηρήθηκε στους 60°C, ενώ άνω του 80% της αρχικής ενεργότητας διατηρήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος των 40-65°C (Σχήμα 1A). Το αποτέλεσμα αυτό ευρίσκεται σε συμφωνία με τα θερμοκρασιακά βέλτιστα τα οποία καταγράφονται στη βιβλιογραφία για μυκητιακής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσες^[14]. Επιπλέον, η β-γαλακτοζιδάση διατηρεί σε ποσοστά άνω του 100% τη δραστικότητά της σε θερμοκρασίες έως 50°C, έπειτα από 24 h επώασης. Αυτή η ενίσχυση της ενεργότητας δύναται να οφείλεται στην προφανή θερμόφιλη φύση του ενζύμου, παρουσιάζοντας αυξημένη ενεργότητα κατά τις πρώτες ώρες της επώασης. Ωστόσο, η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά έπειτα από 24 h επώασης σε θερμοκρασίες 60°C ή μεγαλύτερες.

Η βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου βρέθηκε ίση με 4, ενώ η ενεργότητα μειώνεται δραστικά σε τιμές pH μεγαλύτερες από 5 (Σχήμα 1B). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αντίστοιχα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας^[14], αναφέροντας άριστες τιμές pH δράσης

μυκητιακών β-γαλακτοζιδασών στην όξινη περιοχή (3,0-5,5). Αυτό το χαρακτηριστικό του ενζύμου δίνει πλεονέκτημα σε εφαρμογές αξιοποίησης του όξινου ορού.



Σχήμα 1. Επίδραση θερμοκρασίας (A) και pH (B) στην ενεργότητα και σταθερότητα του ενζύμου Ttbgal1.

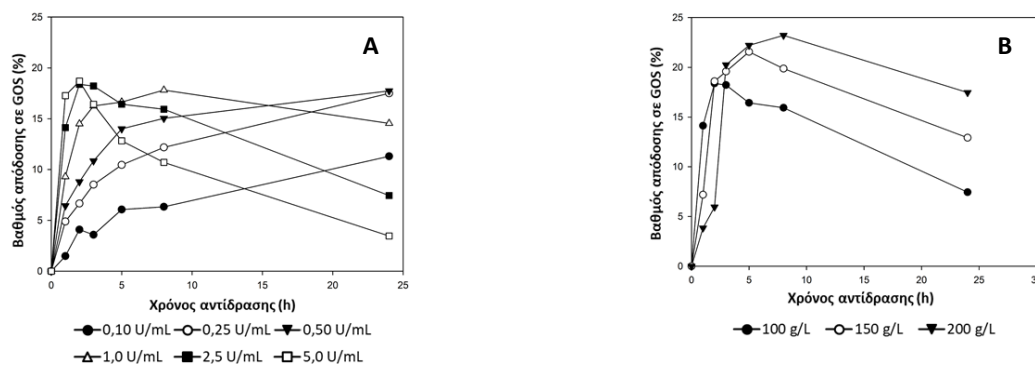
Η ικανότητα τρανσγαλακτοζυλίωσης του ενζύμου Ttbgal1 μελετήθηκε, αρχικά, σε συστήματα με καθαρή λακτόζη ως υπόστρωμα. Η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην ικανότητα τρανσγαλακτοζυλίωσης του ενζύμου μελετήθηκε με αντιδράσεις διάρκειας 2 h, χρησιμοποιώντας 100 g/L λακτόζη και 2,5 U/mL ενζύμου. Η άριστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου βρέθηκε ίση με 50°C, καθώς σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS και, ταυτόχρονα, χαμηλός βαθμός υδρόλυσης (17,3% και 15,9% αντίστοιχα). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ο βαθμός απόδοσης σε GOS ήταν ελάχιστα υψηλότερος, αλλά αυξανόταν και ο βαθμός υδρόλυσης. Το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου ήταν 4, με βαθμό απόδοσης σε GOS ίσο με 18,3% και βαθμό υδρόλυσης ίσο με 16,4%. Γι' αυτό, όλες οι ακόλουθες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 50°C και σε pH=4.

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη του προφίλ των παραγόμενων GOS, για μεγαλύτερους χρόνους επώασης, αλλά και η αριστοποίηση των παραμέτρων της αντίδρασης. Για τον σκοπό αυτόν, μελετήθηκαν το ενζυμικό φορτίο και η συγκέντρωση του υποστρώματος και τα αποτελέσματα παρατίθενται στο Σχήμα 2.

Το ενζυμικό φορτίο μελετήθηκε στο εύρος 0,1-5,0 U/mL σε αντιδράσεις διάρκειας 24 h, ενώ δείγματα ελήφθησαν σε επιλεγμένους ενδιάμεσους χρόνους. Όπως αναμενόταν, η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας οδήγησε σε υψηλότερους βαθμούς απόδοσης σε GOS, αλλά και σε υψηλότερους βαθμούς υδρόλυσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2A. Επίσης, η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας οδήγησε στην επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ταχύτερα. Ωστόσο, κατά την διάρκεια των 24 h της αντίδρασης και για ενζυμικές ενεργότητες μεγαλύτερες από 1 U/mL, ο βαθμός απόδοσης σε GOS έφθανε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια έφθινε σημαντικά. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει ότι οι παραγόμενοι GOS υδρολύονταν ταυτόχρονα από το ένζυμο, πιθανώς όταν η συγκέντρωσή τους υπερέβαινε μια ορισμένη τιμή^[12]. Γι' αυτό, όσον αφορά στο Ttbgal1, οι παραγόμενοι GOS φαίνεται ν' αποτελούν ανταγωνιστικό υπόστρωμα της λακτόζης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η ενεργότητα 2,5 U/mL επελέγη για τα επόμενα πειράματα, επειδή γι' αυτή την ενεργότητα ενζύμου επετεύχθη ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS (18,3%), με ταυτόχρονα χαμηλότερο βαθμό υδρόλυσης (18,0%), σε αντίθεση με υψηλότερες ενζυμικές ενεργότητες (π.χ. για ενεργότητα 5 U/mL επετεύχθη βαθμός απόδοσης σε GOS 18,7%, αλλά ο βαθμός υδρόλυσης ανήλθε σε 28,8%).

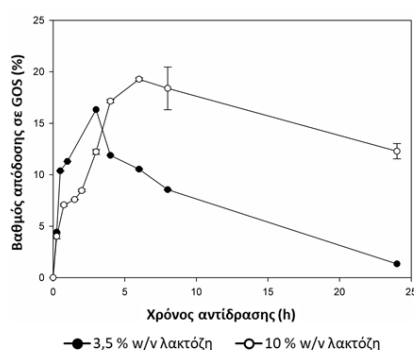
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης του υποστρώματος, στο εύρος 100-200 g/L, έως το όριο διαλυτότητας της λακτόζης στο νερό. Σε αυτή την περίπτωση, η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης οδήγησε σε υψηλότερους βαθμούς απόδοσης σε GOS, έως 23,2%, μετά από 8 h επώασης, για συγκέντρωση λακτόζης 200 g/L, με ταυτόχρονο βαθμό υδρόλυσης ίσο με 21,7%, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2B. Το Ttbgal1 οδήγησε σε ελαφρώς υψηλότερο βαθμό απόδοσης σε GOS, συγκριτικά με μυκητιακής προέλευσης β-γαλακτοζιδάσες

που έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία^[14], στις οποίες η απόδοση σε GOS δεν υπερβαίνει το 20%. Ωστόσο, ο βαθμός απόδοσης σε GOS μειώθηκε για μεγάλους χρόνους επώασης, λόγω υδρόλυσης των GOS.



Σχήμα 2. Επίδραση της ενεργότητας του ενζύμου *Ttbga1* (A) και της συγκέντρωσης λακτόζης (B) στον βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS.

Τέλος, τα παραπάνω αποτελέσματα αναφορικά με την παραγωγή GOS από πρότυπα διαλύματα λακτόζης με χρήση του ενζύμου *Ttbga1* οδήγησαν στη διερεύνηση της παραγωγής GOS με χρήση όξινου ορού ως υπόστρωμα. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας (50°C) και ενζυμικής ενεργότητας (2,5 U/mL), με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα. Μελετήθηκε η ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε δύο διαφορετικές τιμές περιεκτικότητας σε λακτόζη: 3,29% w/v (μη συμπυκνωμένος ορός) και 10,1% w/v (συμπυκνωμένος ορός). Για την περίπτωση του μη συμπυκνωμένου ορού επετεύχθη μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με 16,3%, έπειτα από 3 h επώασης, ενώ στην περίπτωση του συμπυκνωμένου ορού επετεύχθη μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με 19,3%, έπειτα από 6 h επώασης. Συνεπώς, υψηλότερη περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λακτόζη οδήγησε σε υψηλότερους βαθμούς απόδοσης σε GOS, όπως αναμενόταν. Ταυτόχρονα, και στις δύο περιπτώσεις, οι παραγόμενοι GOS υδρολύονταν, μετά την επίτευξη μιας μέγιστης συγκέντρωσης, και μετά από 24 h μόνο το 8,19% και 63,7% της μέγιστης συγκέντρωσης GOS είχε απομείνει, για την περίπτωση του μη συμπυκνωμένου και του συμπυκνωμένου ορού, αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχες έρευνες της βιβλιογραφίας, για παραγωγή GOS από ορό με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae*, επιτυγχάνοντας μέγιστους βαθμούς απόδοσης σε GOS αντίστοιχους με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Παράλληλα, οι ίδιες βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν και το φαινόμενο της υδρόλυσης των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών, για μεγάλους χρόνους αντίδρασης, η οποία αποδίδεται στο γεγονός ότι οι GOS προτιμώνται ως υπόστρωμα από το ένζυμο, έναντι της λακτόζης, καθώς και στο γεγονός ότι η κατάλυση αντιδράσεων τρανσαλακτοζυλίωσης από το ένζυμο παρεμποδίζεται από διάφορα συστατικά του ορού, όπως διάφορα κατιόντα^[10,15].



Σχήμα 3. Βαθμός απόδοσης σε GOS της ενζυμικής αντίδρασης με *Ttbga1* ενεργότητας 2,5 U/mL, σε θερμοκρασία 45 °C και pH=4,5 με όξινο ορό περιεκτικότητας 3,29 % w/v και 10,1 % w/v σε λακτόζη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα, το ένζυμο *TtbGal1* από τον μικροοργανισμό *T. terrestris* εκφράσθηκε ετερόλογα στον μικροοργανισμό *P. pastoris*, απομονώθηκε και χαρακτηρίσθηκε. Το συγκεκριμένο ένζυμο βρέθηκε θερμοφίλο και θερμοσταθερό έως τους 50°C, ενώ δρα βέλτιστα σε όξινο pH. Το ένζυμο διαπιστώθηκε ότι καταλύει αντιδράσεις τρανσγαλακτοζυλίωσης σε πρότυπα διαλύματα λακτόζης, παράγοντας GOS με ικανοποιητικούς βαθμούς απόδοσης, συγκρίσιμων με αυτούς της βιβλιογραφίας. Κατόπιν, το ένζυμο εφαρμόσθηκε σε υπόστρωμα όξινου ορού και βρέθηκε να παράγει GOS σε βαθμούς απόδοσης παρόμοιους με αυτούς από πρότυπα διαλύματα λακτόζης. Γενικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συντείνουν στο εφικτό της εφαρμογής του *TtbGal1* για την παραγωγή GOS από όξινο ορό, συμβάλλοντας στην αξιοποίηση του συγκεκριμένου παραπροϊόντος, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται, αναφορικά με την αριστοποίηση των παραμέτρων της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση του όξινου ορού ως υπόστρωμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Torres D. P. M., Gonçalves M. d. P. F., Teixeira J. A., and Rodrigues L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 438-454.
- [2] Erich S., Kuschel B., Schwarz T., Ewert J., Böhmer N., Niehaus F., Eck J., Lutz-Wahl S., Stressler T., Fischer L. (2015). Novel high-performance metagenome -galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry. *Journal of Biotechnology* 210: 27-37.
- [3] Fischer C. and Kleinschmidt T. (2018). Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 678-697.
- [4] Gosling A., Stevens G. W., Barber A. R., Kentish S. E., Gras S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry* 121: 307-318.
- [5] Yin H., Bultema J. B., Dijkhuizen L., van Leeuwen S. S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the bgalactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry* 225: 230-238.
- [6] Warmerdam A., Zisopoulos F. K., Boom R. M., and E. M. Janssen A. E. M. (2013). Kinetic Characterization of Galacto-Oligosaccharide (GOS) Synthesis by Three Commercially Important b-Galactosidases. *Biotechnol. Prog.* 30(1): 38-47.
- [7] Jelen P., WHEY PROCESSING | Utilization and Products. In Fuquay J. W., Fox P. F. and Mc Sweeney P. L. H.. *Encyclopaedia of Dairy Sciences*; 2011, pp. 731-737.
- [8] Nishanthi M., Vasiljevic T., Chandrapala J. (2017). Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal* 66: 76-83.
- [9] Smithers G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal* 18: 695-704.
- [10] Fischer C., Kleinschmidt T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal* 48: 15-22.
- [11] Kim C. S., Ji E. S. and Oh D. K. (2004). Characterization of a thermostable recombinant beta-galactosidase from *Thermotoga maritima*. *J Appl Microbiol* 97(5): 1006-1014.
- [12] Vera C., Guerrero C. and Illanes A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydr Res* 346(6): 745-752.
- [13] Berka R. M., Grigoriev I. V., Otilar R., Salamov A., Grimwood J., Reid I., Ishmael N., John T., Darmond C., Moisan M. C., Henrissat B., Coutinho P. M., Lombard V., Natvig D. O., Lindquist E., Schmutz J., Lucas S., Harris P., Powlowski J., Bellemare A., Taylor D., Butler G., de Vries R. P., Allijn I. E., van den Brink J., Ushinsky S., Storms R., Powell A. J., Paulsen I. T., Elbourne L. D., Baker S. E., Magnuson J., Laboissiere S., Clutterbuck A. J., Martinez D., Wogulis M., de Leon A. L., Rey M. W. and Tsang A. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol* 29(10): 922-927.
- [14] Silverio S. C., Macedo E. A., Teixeira J. A. and Rodrigues L. R. (2018). New beta-galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresour Technol* 250: 131-139.
- [15] Mano M. C. R., Paulino B. N., Pastore G. M. (2018). Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*.