

"ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ:
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ."

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

των

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΠΑΠΑΣΤΕΡΓΙΟΥ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Σεπτέμβριος 2022

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Κοψαχείλης Νικόλαος

Παπαδάκη Αικατερίνη

Καχριμανίδου Βασιλική

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, είναι αμφίφιλα μόρια τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν αποτελέσει πόλο έλξης για τον επιστημονικό κλάδο της Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούν μια «πράσινη» λύση έναντι των προϊόντων του πετρελαίου που βρίσκει εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων, των φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων εξετάσθηκαν ως προς την ικανότητα τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες με χρήση δύο διαφορετικών υποστρωμάτων. Αναλυτικότερα αξιολογήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα M2 (γλυκόζη ως πηγή άνθρακα) και το τυρόγαλο, που αποτελεί έναν χαμηλού κόστους υπόστρωμα γαλακτικών βακτηρίων με στόχο την μείωση των ρυπογόνων επιπτώσεων και την μείωση του κόστους. Κατά την πειραματική διαδικασία, για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, αρχικά πραγματοποιήθηκε η ζύμωση κατά την οποία έγινε εμβολιασμός των θρεπτικών υποστρωμάτων με τις προκαλλιέργειες και ακολούθησε επώαση στους 37°C. Ακολούθησαν μετρήσεις για τον έλεγχο της πορείας της ζύμωσης οι οποίες είναι ο προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων (HPLC), η παραγωγή γαλακτικού οξέος και ο προσδιορισμός ολικού ξηρού βάρους. Εν κατακλείδι, έγιναν αναλύσεις για την ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης. Συμπερασματικά, μετά το πέρας της πειραματικού μέρους διαπιστώθηκε ότι και στα δυο υποστρώματα υπήρχε η δυνατότητα παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών, με το τυρόγαλο να εμφανίζει τις χαμηλότερες τιμές επιφανειακής τάσης.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic molecules which have been a pole of attraction for the sector of Applied Biotechnology. More specifically, they are an eco- friendly solution to petroleum derived counterparts that find applications in the food, pharmaceutical and cosmetic sectors. In this thesis, several *Lactobacillus* strains were tested for their ability to produce biosurfactants implementing two different substrates. The synthetic substrate M2 (glucose as carbon source) and cheese whey, which is a low-cost substrate for *Lactobacilli* strains with the aim of reducing polluting effects and reducing costs, were evaluated in more detail. During the experimental process, for the production of biosurfactants, fermentation was first carried out during which the nutrient substrates were inoculated with the precultures, followed by incubation at 37°C. This was followed by the determination of sugar consumption (HPLC), the production of lactic acid and the determination of total dry weight. In conclusion, biosurfactant production capacity was analyzed through surface tension measurement. In conclusion, it was found that both substrates had the possibility of producing surfactants, with the cheese whey showing the lowest surface tension values.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
Πίνακας περιεχομένων.....	iv
Κατάλογος Γραφημάτων.....	vi
Κατάλογος Εικόνων.....	vii
Κατάλογος Πινάκων.....	viii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 Επιφανειοδραστικές και βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.....	1
1.1.1 Ορισμός των επιφανειακά ενεργών συστατικών.....	1
1.1.2 Δομή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	2
1.2 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών.....	3
1.2.1 Επιφανειακή τάση και κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου.....	3
1.2.2 Γαλάκτωμα.....	7
1.2.3 Σταθερότητα σε διαφορετικές συνθήκες.....	8
1.3 Ταξινόμηση.....	8
1.3.1 Γλυκολιπίδια.....	8
1.3.2 Λιποπεπτίδια και Λιποπρωτεΐνες.....	10
1.4 Ρόλος και ιδιότητες.....	10
1.4.1 Αλληλεπίδραση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με υδρόφοβα τμήματα.....	11
1.4.2 Προσκόλληση και αποκόλληση.....	12
1.4.3 Σχηματισμός και απομάκρυνση βιοφίλμ.....	12
1.4.4 Αντιμικροβιακή δράση.....	13
1.5 Παραγωγή από γαλακτικά βακτήρια.....	13

1.6	Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.....	15
1.6.1	Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα.....	16
1.6.2	Απόβλητα και ρεύματα από την επεξεργασία ελαίων.....	16
1.6.3	Αμυλώδη υποστρώματα.....	17
1.6.4	Απόβλητα από τη βιομηχανία και επεξεργασία γάλακτος.....	17
1.7	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	18
1.8	Εφαρμογές.....	19
1.8.1	Εφαρμογές στα τρόφιμα.....	20
1.8.2	Παγωτό.....	23
1.8.3	Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από προβιοτικά βακτήρια και οι δυνατότητες εφαρμογής τους σε προϊόντα τροφίμων.....	23
1.9	Πιθανή μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών.....	23
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.1	Βιολογικό υλικό.....	26
3.2	Θρεπτικό υπόστρωμα.....	28
3.3	Ασυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	30
3.4	Εκχύλιση κυτταρικά προσδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell bound).....	31
3.5	Αναλυτικές μέθοδοι.....	32
3.5.1	Προσδιορισμός ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW).....	32
3.5.2	Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος.....	32
3.6	Αξιολόγηση παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών.....	32
3.6.1	Μέτρηση επιφανειακής τάσης.....	33
3.6.2	Προσδιορισμός του δείκτη γαλακτωματοποίησης.....	34
3.6.3	Δοκιμή μετατόπισης ελαίου.....	35
3.7	Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων και βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	36

3.7.1	Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος.....	36
3.7.2	Αναλύσεις ξινογάλακτος:.....	37
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1	Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.....	41
4.1.1	Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό ζύμωσης.....	41
4.1.2	Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS).....	45
4.2	Αξιολόγηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	47
4.2.1	Προσδιορισμός κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των 24 και 72 ωρών.....	47
4.2.2	Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	50
4.2.3	Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.....	52
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1:	Μέτρηση της επιφανειακής τάσης, Surface tension, σε mN/m στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	44
Γράφημα 2:	Μέτρηση της επιφανειακής τάσης, Surface tension, σε mN/m στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	45
Γράφημα 3:	Μέτρηση μείωσης επιφανειακής τάσης, Surface tension reduction, σε mN/m από εκχυλίσματα PBS.....	47

Γράφημα 4: Κατανάλωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος.....	50
Γράφημα 5: Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό μέσο.....	52
Γράφημα 6: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	54
Γράφημα 7: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	55
Γράφημα 8: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	57
Γράφημα 9: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	58
Γράφημα 10: Κατανάλωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος και μέτρηση της μείωσης της επιφανειακής τάσης σε 24 ώρες και 72 ώρες ζύμωσης.....	60

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Ενδεικτικά κόστη για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Misailidis and Petrides, 2020).....	2
Εικόνα 2 Υδρόφοβο και υδρόφιλο τμήμα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Sharma 2014)....	3
Εικόνα 3 Ραμνολιπίδια - δομή (Wittgens et al., 2018).....	9
Εικόνα 4 Σοφορολιπίδια - Δομή (Henkel et al., 2019).....	10
Εικόνα 5 Ιδιότητες και εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στον τομέα της ιατρικής/υγείας, στον γεωργικό τομέα, στον περιβαλλοντικό τομέα και στον βιομηχανικό τομέα (Markande et al. 2021).....	11

Εικόνα 6 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	21
Εικόνα 7 Πειραματικός σχεδιασμός.....	30
Εικόνα 8: Μembrάνες διαπίδυσης.....	32
Εικόνα 9a, b: Wilhelmy plate.....	35
Εικόνα 10: Τενσιόμετρο.....	35
Εικόνα 11: Γαλάκτωμα σε υπερκείμενο.....	36
Εικόνα 12: Γαλάκτωμα σε PBS.....	36
Εικόνα 13: Μετατόπιση ελαίου.....	37
Εικόνα 14: Ξινόγαλο έτοιμο μετά την οξίνιση.....	38
Εικόνα 15: Τριβλίο με ανεπτυγμένες αποικίες.....	39
Εικόνα 16: Falcon στο οποίο φαίνεται η συναίρεση του γάλατος.....	40
Εικόνα 17: Ογκομέτρηση.....	41

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Μικροοργανισμοί που θεωρούνται προβιοτικά (Hajfarajollah et al, 2018).....	15
Πίνακας 2 Κωδικός απομονωμένου στελέχους των γαλακτικών βακτηρίων.....	27
Πίνακας 3: Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2).....	31

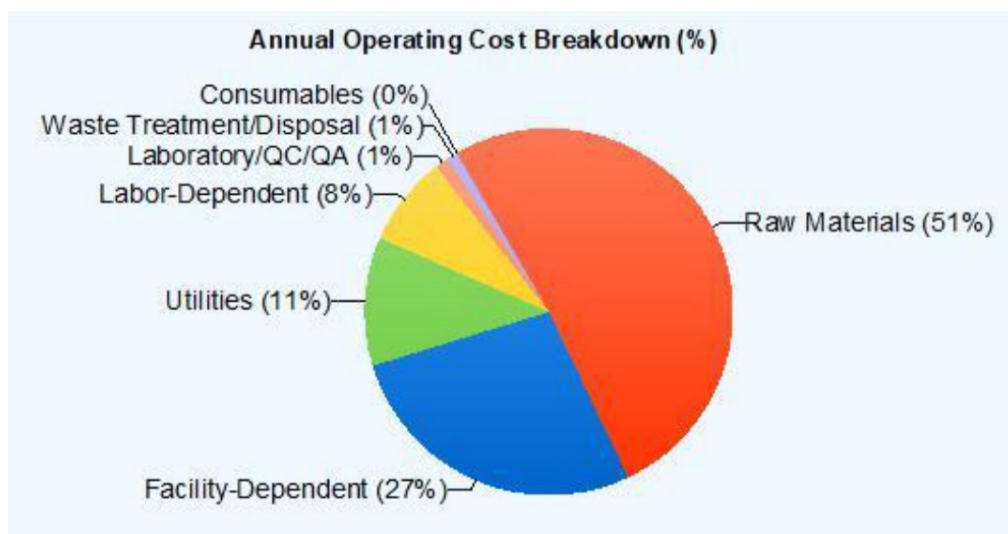
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Επιφανειοδραστικές και βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

1.1.1 Ορισμός των επιφανειακά ενεργών συστατικών

Τα επιφανειακά ενεργά συστατικά αποτελούν μία ομάδα χημικών που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες εφαρμογές στην καθημερινή ζωή. Με τον όρο επιφανειοδραστικές ουσίες αναφερόμαστε σε ενώσεις που έχουν την κύρια ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή ή διεπιφανειακή τάση ενός υγρού ή μεταξύ δύο υγρών, ή ακόμα και μεταξύ υγρού και στερεού. Αποτελούνται από ένα υδρόφοβο άπολο τμήμα (ουρά) και μία υδρόφιλη πολική ομάδα (κεφαλή), και παράγονται μέσω χημικής σύνθεσης (Ahmadi-Ashtiani et al., 2020). Ο διαχωρισμός τους σε κατηγορίες μπορεί να γίνει με διαφορετικούς τρόπους, όπως το φορτίο, το μοριακό βάρος και η χημική δομή. Μέσω της μείωσης της επιφανειακής τάσης, έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν γαλακτώματα και να βοηθούν στην ομογενοποίηση ενός μίγματος και για το λόγο αυτό βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον προς τη βιώσιμη παραγωγή προϊόντων είχε ως αποτέλεσμα τη στροφή προς τις βιολογικές επιφανειοδραστικές ή βιοεπιφανειοδραστικές. Οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορεί να προέρχονται από φυτικές ή ζωικές πρώτες ύλες μέσω μιας διαδικασίας διαχωρισμού ή μπορεί να παράγονται από μικροοργανισμούς. Τα πλεονεκτήματα τους σχετίζονται με την ικανότητα βιοδιάσπασης (ή βιοαποικοδόμησης), με τη χαμηλή τοξικότητα άρα και τον περιβαλλοντικά φιλικό χαρακτήρα σε σύγκριση με τις χημικές επιφανειοδραστικές. Επίσης, έχει αναφερθεί και η ικανότητα να διατηρούν τις ιδιότητες τους σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, τιμής pH και αλατότητας, γεγονός που σχετίζεται με τις μετέπειτα εφαρμογές (Bakhshi et al., 2017; Ribeiro et al., 2020).

Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα σχετίζεται με το υψηλό ολικό κόστος παραγωγής, το οποίο και προέρχεται από το κόστος των συνθετικών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στις διεργασίες ζύμωσης. Για παράδειγμα, μια τεχνοοικονομική μελέτη έδειξε ότι 50% του κόστους παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών προέρχεται από το κόστος του υποστρώματος (π.χ. γλυκόζη) (Misailidis and Petrides, 2020).



Εικόνα 1 Ενδεικτικά κόστη για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Misailidis and Petrides, 2020)

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τη χρησιμοποίηση χαμηλού κόστους αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων. Αυτά συμπεριλαμβάνουν μεταξύ άλλων διάφορα απόβλητα φυτικά έλαια, λάδι μετά από επεξεργασία (τηγανόλαδο), γλυκερόλη (ως απόβλητο της παραγωγής βιοντίζελ), απόβλητα της παραγωγής κρασιού και απόβλητα της βιομηχανίας γάλακτος μεταξύ άλλων (Banat et al., 2014).

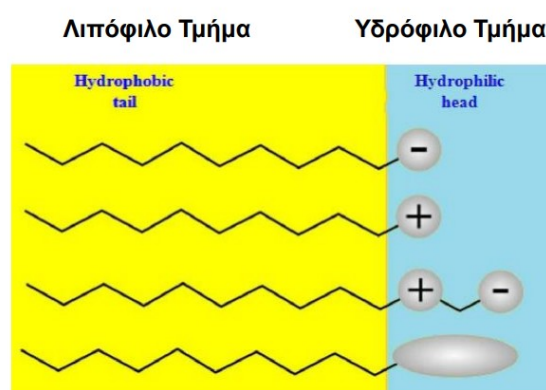
Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορους τομείς και να αντικαταστήσουν πλήρως ή μερικώς τις χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Βρίσκουν εφαρμογή σαν απορρυπαντικά (detergents), σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής και σε καλλυντικά. Στον ιατρικό και φαρμακευτικό τομέα, έχει δείχθει η αντιμικροβιακή δράση, η δράση έναντι σε όγκο (antitumor) και η ανοσοκατασταλτική δράση (anti-inflammatory), ενώ στον αγροτικό τομέα οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να βοηθήσουν στη βελτίωση του εδάφους μέσω της απομάκρυνσης βαρέων μετάλλων (Ribeiro et al., 2020; Markande et al., 2021).

1.1.2 Δομή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Οι επιφανειοδραστικές και βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες όπως προαναφέρθηκε αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα (Εικόνα 2) και παρουσιάζουν ένα

έυρος διαφορετικών δομών, οι οποίες επηρεάζουν τόσο τις ιδιότητες όσο και τις εφαρμογές τους (Sharma 2014).

Το υδρόφοβο τμήμα (ή λιπόφιλο τμήμα) μπορεί να αποτελείται από κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, υδροξυλιπαρά οξέα) ενώ το υδρόφιλο από υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες, μονοσακχαρίτες κ.α.) αμινοξέα, πεπτίδια, καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες και φωσφορικά παραγόμενα τμήματα. Οι ενώσεις αυτές κατανέμονται συνήθως στη διεπιφάνεια μεταξύ ρευστών φάσεων με διαφορετική πολικότητα και διαφορετικούς δεσμούς υδρογόνου, όπως για παράδειγμα οι διεπιφάνειες αέρα/νερού ή ελαίου/νερού. Το αποτέλεσμα είναι οι επιφανειοδραστικές ουσίες να μειώνουν την επιφανειακή τάση καθώς και τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ διαφορετικών φάσεων σε επιφάνειες ή διεπιφάνειες (Sharma, 2016; Ahmadi-Ashtiani et al., 2020). Ανάλογα με τη σύσταση του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματος αλλά και το μοριακό βάρος, οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορεί να χαρακτηρίζονται ως τα γλυκολιπίδια, τα φωσfolιπίδια, λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες (χαμηλού μοριακού βάρους) ενώ υπάρχουν και οι υψηλού μοριακού βάρους βιοεπιφανειοδραστικές σε μορφή πολυμερών (π.χ. emulsan) (Ahmadi-Ashtiani et al., 2020).



Εικόνα 2 Υδρόφοβο και υδρόφιλο τμήμα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Sharma 2014)

1.2 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών

1.2.1 Επιφανειακή τάση και κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου

Η κύρια ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι η μείωση της επιφανειακής τάσης του μέσου, η οποία θεωρείται η πρώτη παράμετρος για την αναγνώριση της παρουσίας μιας επιφανειοδραστικής ουσίας σε ένα σύστημα. Όταν μια βιοεπιφανειοδραστική ουσία

παράγεται ή προστίθεται στο μέσο, σχηματίζονται αμφιπαθή μόρια, τα λεγόμενα μικύλλια, τα οποία συσσωρεύονται στο υδρόφιλο και στο υδρόφοβο τμήμα. Ανάλογα με τον τύπο του συστήματος, το υδρόφιλο τμήμα του βιοεπιφανειοδραστικού μπορεί να είναι στραμμένο προς την εξωτερική ή την εσωτερική περιοχή του συστήματος, έτσι ώστε να σχηματίζεται μια προστατευμένη περιοχή για τα μικκύλια (Araújo et al., 2020). Ένας μεγαλύτερος αριθμός μικκυλίων οδηγεί σε χαμηλότερη επιφανειακή τάση και επηρεάζεται άμεσα από την αύξηση της συγκέντρωσης του βιοεπιφανειοδραστικού. Η ελάχιστη συγκέντρωση του βιοεπιφανειοδραστικού που είναι απαραίτητη για τη μέγιστη μείωση της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC).

Οι διαφορετικές τιμές CMC λαμβάνονται ανάλογα με τη χημική δομή του βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα και η τιμή αυτή επηρεάζεται από την αυτοσυσσώματωση των μορίων (μικυλλιακή, εξαγωνική, κυβική ή ελασματοειδής), η οποία διέπεται από τις διαμοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, την πολικότητα, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκρασία του διαλύτη (Zanotto et al., 2019). Οι τιμές CMC μετρούν την αποτελεσματικότητα ενός βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα, ενώ οι τιμές της επιφανειακής και της διεπιφανειακής τάσης καθορίζουν την αποτελεσματικότητά του.

Όταν ένα βιοεπιφανειοδραστικό παράγεται ή προστίθεται στο μέσο, σχηματίζονται αμφίπαθα μόρια, τα οποία ονομάζονται μικκύλια, και συσσωρεύονται στα υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα. Ανάλογα με τον τύπο του συστήματος, το υδρόφιλο τμήμα του βιοεπιφανειοδραστικού μπορεί να στραφεί προς την εξωτερική ή την εσωτερική περιοχή του συστήματος, έτσι ώστε ένα σχηματίζεται προστατευμένη περιοχή για τα μικκύλια. Ένας μεγαλύτερος αριθμός μικκυλίων οδηγεί σε χαμηλότερη επιφανειακή τάση και επηρεάζεται άμεσα από την αύξηση της συγκέντρωσης του βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα. Η ελάχιστη συγκέντρωση του βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα που είναι απαραίτητη για τη μέγιστη μείωση της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης αποκαλείται Κρίσιμη Μικροκυελίδα συγκέντρωση (CMC).

Η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) είναι η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην οποία σχηματίζονται οργανωμένες μοριακές συστοιχίες, γνωστές ως μικκύλια, και αντιστοιχεί στο σημείο στο οποίο ο τενσιενεργός παράγοντας επιτυγχάνει τη χαμηλότερη σταθερή επιφανειακή τάση (Santos et al., 2016). Λαμβάνονται διαφορετικές τιμές CMC ανάλογα με τη χημική δομή του βιοεπιφανειοδραστικού και η τιμή αυτή επηρεάζεται από την αυτοσυσσώματωση των μορίων

(μικροκυτταρική, εξαγωνική, κυβική ή ελασματοειδής), η οποία διέπεται από τις διαμοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, την πολικότητα, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκρασία του διαλύτη.

Στη βιομηχανία τροφίμων, τα πλεονεκτήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά στα τρόφιμα επεξεργασίας και στην τελική ποιότητα των προϊόντων. Αντοχή στις μεταβολές στη θερμοκρασία, την οξύτητα και την αλατότητα, για παράδειγμα, επιτρέπει σε αυτά τα βιομόρια να διατηρούν τις αρχικές τους ιδιότητες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει θετικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ιδιότητες όπως η αντιοξειδωτική, η αντιπροσκολλητική και η αντιμικροβιακή δράση, είναι επίσης πλεονεκτήματα που ξεπερνούν τις συνήθεις ιδιότητες των συνθετικών επιφανειοδραστικών ουσιών, και τα οποία μπορούν να προσθέσουν ακόμη μεγαλύτερη αξία στα τρόφιμα. Η παρουσία τους στα σκευάσματα έχει περιορισμούς όσον αφορά τη χρήση σε διεργασίες που περιλαμβάνουν μαγείρεμα σε μικροκύματα και ακτινοβολία, καθώς αυτές οι φυσικές ενώσεις μπορεί να χάσουν κάποιες από τις βασικές τους ιδιότητες. Στη βιομηχανία τροφίμων, η οποία χρησιμοποιεί πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και λιπίδια, η πλειονότητα των προσθέτων είναι πηκτικά, σταθεροποιητές και γαλακτωματοποιητές.

Λαμβάνοντας υπόψη τη ζήτηση για νέα φυσικά προϊόντα για τη μείωση των τη χρήση γαλακτωματοποιητών που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά, όπως όπως η σόγια, οι οποίες μπορούν να αλλοιώσουν τη φυσική γεύση και υφή των τροφίμων, οι βιοεπιφανειοδραστικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αντικαταστήσουν αυτές τις ενώσεις και να ενισχύσουν αυτούς τους παράγοντες. Έχουν διεξαχθεί ορισμένες αρχικές μελέτες με στόχο τη χρήση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθέσεις τροφίμων για τον έλεγχο της συνοχής, τη διαλυτοποίηση αρωματικών ελαίων για την ενίσχυση του αρώματος των τροφίμων, καθώς και τη σταθεροποίηση των λιπών και να χρησιμεύουν ως αντιπαρασιτικός παράγοντας κατά το μαγείρεμα των λιπών. Ως γαλακτωματοποιητές, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν επίσης να συμβάλουν στην αύξηση του ιξώδους των τροφίμων. που περιέχουν οξέα, όπως το κιτρικό και το ασκορβικό οξύ. Ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ως γαλακτωματοποιητών σε σκευάσματα παγωτού με στόχο τη βελτίωση της υφής, της κρεμώδους υφής και της ποιότητας του προϊόντος.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό ενός βιο-γαλακτωματοποιητή είναι η ικανότητά του να μειώνει την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Αυτή είναι μια ουσιαστική λειτουργία των

αμφίφιλων μορίων για το σχηματισμό κινητικά σταθεροποιημένων γαλακτωμάτων. Τα μόρια αυτά προσροφώνται σε διεπιφάνειες (αέρας/υγρό, υγρό/υγρό, στερεό/υγρό), αντικαθιστώντας μόρια νερού ή ελαίου κατά μήκος της διεπιφάνειας και μειώνοντας τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του διαλύτη και της επιφανειακής ή διεπιφανειακής τάσης. Σε σύγκριση με τις χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ήταν σε θέση να μειώσουν τη διεπιφανειακή τάση πιο αποτελεσματικά (Bjerk et al., 2021).

Η επιφανειοδραστική ουσία είναι ένα από τα πιο δραστικά επιφανειακά βιοεπιφανειοδραστικά. Η τασιενεργή εμφανίζει εκφραστική επιφανειακή δραστηριότητα από 72 mN/m σε 27 ± 2 mN/m και διεπιφανειακή τάση σε $3,79 \pm 0,27$ mN/m και $0,32 \pm 0,02$ mN/m υπό σκληρές φυσικές και χημικές συνθήκες. Μια λιποπεπτιδική βιοεπιφανειοδραστική ουσία με την ονομασία arthrofactin που παράγεται από το στέλεχος MIS38 του *Arthrobacter* sp. και μια βιοεπιφανειοδραστική ουσία που παράγεται από την *Candida lipolytica* UCP 0988 παρουσίασαν χαμηλή επιφανειακή δραστηριότητα. Αυτές οι μοναδικές επιφανειακές ιδιότητες συνδέονται με την πιο σύνθετη χημική δομή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Σε αντίθεση με τις συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες, δεν έχουν σαφή κατανομή της πολικότητας και περιέχουν επίσης διακλαδισμένες ή δακτυλοειδείς δομές. Η λιποπεπτιδική επιφανειοδραστική ουσία είναι ικανή να σχηματίζει σφαιρικές δομές για να διευκολύνει τη στενή συσκευασία σε διεπιφάνειες και το σχηματισμό δομών με χαμηλό αριθμό συσσωμάτωσης (Bjerk et al., 2021).

Έχουν παρατηρηθεί ασυνήθιστες επιφανειακές ιδιότητες των σαπωνινών. Η συμπεριφορά τους εξηγήθηκε από μια πυκνή μοριακή συσκευασία στη διεπιφάνεια των φάσεων και έναν ισχυρό δεσμό υδρογόνου μεταξύ των ομάδων σακχαριτών στο διεπιφανειακό στρώμα. Τα πολύ συμπαγή επιφανειακά στρώματα που σχηματίζονται είναι πυκνότερα από εκείνα που παρατηρούνται στα περισσότερα κοινά αμφίφιλα. Οι προαναφερθείσες ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθορίζουν τους μηχανισμούς πρόσδεσής τους σε βιομόρια και κυτταρικές μεμβράνες. Μια λεπτομερέστερη σύγκριση των ιδιοτήτων, δηλαδή της επιφανειακής δραστηριότητας και των τιμών της κρίσιμης συγκέντρωσης μικροκυτταροποίησης (CMC), παρουσιάζεται στην ανασκόπηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι χαμηλές τιμές CMC και η επιφανειακή δραστηριότητα μπορεί να σχετίζονται με την παρουσία προσμίξεων στις συνθέσεις επιφανειοδραστικών ουσιών (Bjerk et al., 2021).

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η παγκόσμια αγορά βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών αναμένεται να αναπτυχθεί με CAGR 0,8 τοις εκατό από 1,3754 δισ. δολάρια ΗΠΑ το 2020 σε 1,4427 δισ. δολάρια ΗΠΑ το 2026 (360researchreports). Σύμφωνα με το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (UNEP), περίπου 93,1 εκατομμύρια τόνοι τροφίμων αποβλήτων παρήχθησαν το 2019, με το 61% να προέρχεται από κατοικίες, το 26% από υπηρεσίες εστίασης και το 13% από το λιανικό εμπόριο, που σημαίνει ότι το 17% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων θα μπορούσε να σπαταληθεί. Ένα άλλο ισχυρό προϊόν αποβλήτων που έχει ληφθεί υπόψη για χρήση ως υπόστρωμα είναι η φλούδα μπανάνας, η οποία είναι το κύριο υποπροϊόν της παραγωγής και της παραγωγής επεξεργασίας της μπανάνας.

Το χρησιμοποιημένο λάδι τηγανίσματος έχει υψηλότερη συγκέντρωση πολικών υδρογονανθράκων από το φρέσκο λάδι και τα κύρια συστατικά του είναι κυρίως μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και τριγλυκερίδια μαζί με κάποιο ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων (Ramírez et al., 2015). Η βιοχημική ζήτηση οξυγόνου (BOD) των αποβλήτων που παράγονται από τη γαλακτοβιομηχανία και ιδιαίτερα του ορού γάλακτος είναι σημαντικά υψηλή. Τα ένζυμα όπως η β-γλυκοσιδάση έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην υδρόλυση της βαγάσης και άλλων υποστρωμάτων (Tan & Li, 2018). Ομοίως, η επιλογή του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος είναι επίσης καθοριστική για τον καθορισμό της απόδοσης και της αποδοτικότητας του τελικού προϊόντος που λαμβάνεται. Οι βασικές εκτιμήσεις, ιδίως όσον αφορά τα υποστρώματα, όπως τα αγροτοβιομηχανικά υποστρώματα, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα της πρώτης ύλης, το κόστος της μεταφοράς της πρώτης ύλης, και η προεπεξεργασία που απαιτείται πριν από τη διαδικασία παραγωγής. Η μεταγενέστερη επεξεργασία παίζει σημαντικό ρόλο σε όλες τις δαπάνες κάθε βιοτεχνολογικού προϊόντος (Patel et al., 2019). Ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών τεχνικών έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση, τον καθαρισμό και την ταξινόμηση διαφόρων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

1.2.2 Γαλάκτωμα

Τα γαλακτώματα είναι ετερογενή συστήματα, αποτελούμενα από δύο τουλάχιστον υγρά μη αναμίξιμα μεταξύ τους (συνήθως μια υδατική και μία λιπαρή φάση), όπου η μία διασπείρεται στην άλλη στη μορφή σταγόνας (Gudiña and R. Rodrigues, 2019). Τα γαλακτώματα μπορεί να είναι της μορφής λάδι σε νερό (oil in water) ή νερό σε λάδι (water in

oil). Οι βιοεπιφανειοδραστικές μέσω προσρόφησης μειώνουν την επιφανειακή ή διεπιφανειακή τάση και προκαλούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών φάσεων με αποτέλεσμα την ανάμιξη και τη δημιουργία γαλακτώματος. Η γαλακτωματοποίηση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες εφαρμογές, ειδικότερα στη βιομηχανία τροφίμων (π.χ. συνεκτικότητα και υφή στα τρόφιμα). Παραδείγματα W/O γαλακτωμάτων είναι το βούτυρο, η μαργαρίνη και τα αλείμματα αυτών ενώ αντίστοιχα O/W είναι τα αρτύματα (food dressings) η μαγιονέζα και το παγωτό (Gudiña & Rodrigues, 2019).

1.2.3 Σταθερότητα σε διαφορετικές συνθήκες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν μελετηθεί αναφορικά με την ικανότητα τους να διατηρούν τις ιδιότητες σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι υψηλές θερμοκρασίες (0–120 °C), ένα μεγάλο εύρος από τιμές pH (2–12) και διαφορετικά επίπεδα αλατότητας (π.χ. 2–10% NaCl) (Karnwal 2021). Η διαφορετική συμπεριφορά σχετίζεται με τις μετέπειτα εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι συνήθως είναι πιο σταθερές σε σύγκριση με τις χημικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές (Satpute et al., 2017).

1.3 Ταξινόμηση

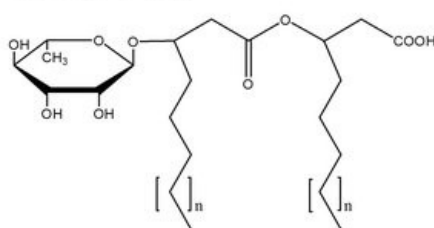
Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση: το μοριακό βάρος (αν είναι υψηλό ή χαμηλό), τη χημική δομή, τη μικροβιακή προέλευση και τον τρόπο παραγωγής από το κύτταρο (εξωκυτταρικό ή προσκολλημένο σε μικροβιακά κύτταρα) καθώς και το ιοντικό φορτίο (Hajfarajollah et al., 2018; Ribeiro et al., 2020). Ανάλογα με την χημική δομή των μόριων, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες: λιποπολυσακχαρίτες, λιποπρωτεΐνες, βιοπολυμερή, φωσφολιπίδια, λιποπεπτίδια ή γλυκολιπίδια. Τα γλυκολιπίδια και τα λιποπεπτίδια αποτελούν τις πιο ευρέως μελετημένες βιοεπιφανειοδραστικές, καθώς εμφανίζουν υψηλότερες παραγόμενες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δομές, ενώ παράλληλα εμφανίζουν σημαντικό εύρος τελικών εφαρμογών (Ribeiro et al., 2020).

1.3.1 Γλυκολιπίδια

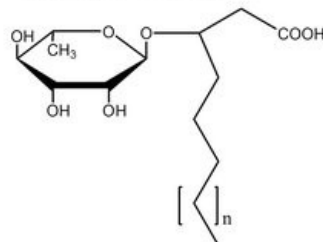
Η δομή του γλυκολιπιδίου αποτελείται από ένα υδρόφιλο τμήμα υδατάνθρακα (π.χ. γλυκόζη, μαννόζη, ραμνόζη, σοφορόζη, γαλακτόζη, τρεχαλόζη) και ένα υδρόφοβο τμήμα τμήμα λιπαρού οξέος, που συνδέονται με γλυκοσιδικό δεσμό. Ανάλογα την φύση του υδατάνθρακα, τα γλυκολιπίδια χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: ραμνολιπίδια, λιπίδια τρεχαλόζης, λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης (MELs), ή σοφορολιπίδια. Τα γλυκολιπίδια μπορούν να παραχθούν από διαφορετικούς οργανισμούς και είναι μία ομάδα από τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την επιφανειακή τάση (Williams, 2017). Για παράδειγμα, τα MELs συνήθως παράγονται από στελέχη ζυμών όπως *Pseudozyma* sp., τα τρεχαλολιπίδια από στελέχη *Rhodococcus* και άλλα στελέχη βακτηρίων, τα ραμνολιπίδια από στελέχη *Pseudomonas* sp και *Saccharomyces*, ενώ στελέχη του γένους *Candida* παράγουν σύμπλοκα υδατάνθρακα-πρωτεΐνης-λιπιδίων (Ribeiro et al., 2020). Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά χαρακτηριστικές δομές διαφορετικών γλυκολιπιδίων που παράγονται από μικροβιακά στελέχη.

Mono-rhamnolipids

Mono-rhamno-di-lipid

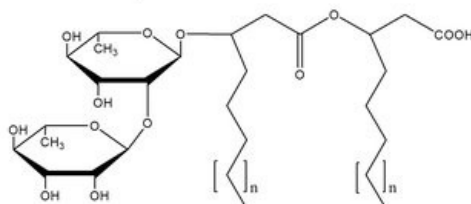


Mono-rhamno-mono-lipid

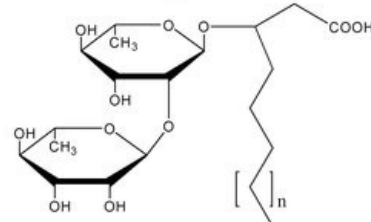


Di-rhamnolipids

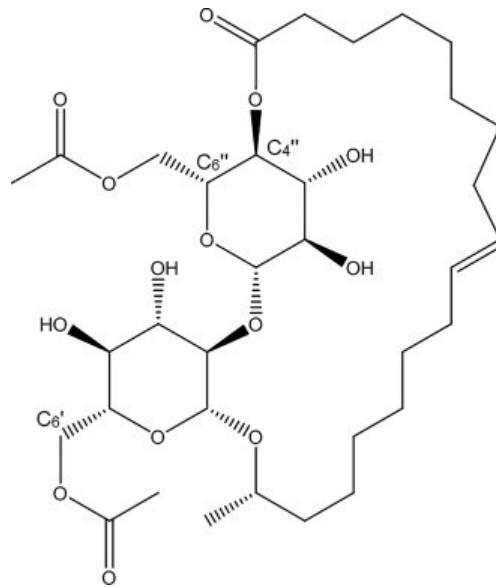
Di-rhamno-di-lipid



Di-rhamno-mono-lipid



Εικόνα 3 Ραμνολιπίδια - δομή (Wittgens et al., 2018)



Εικόνα 4: Σοφορολιπίδια - Δομή (Henkel et al., 2019)

Αναφορικά με τα γαλακτικά βακτήρια, έχουν αναφερθεί ποικίλες δομές, με κυριότερες τα γλυκολιπίδια, τις γλυκολιποπρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες (Mouafo et al., 2022). Ειδικότερα, στη βιβλιογραφική ανασκόπηση των Mouafo et al. (2022), οι συγγραφείς παρουσίασαν πληθώρα μελετών της βιβλιογραφίας που αναφέρεται στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από γαλακτικά βακτήρια, χρησιμοποιώντας συνθετικά υποστρώματα ή υποστρώματα από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα καθώς και τη χημική δομή των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών, όπου αυτή αναφέρεται. Γενικά ωστόσο, δεδομένου ότι η χημική δομή είναι πολύπλοκη αρκετές φορές είναι δύσκολος ο ακριβής χαρακτηρισμός (Kachrimanidou et al., 2022).

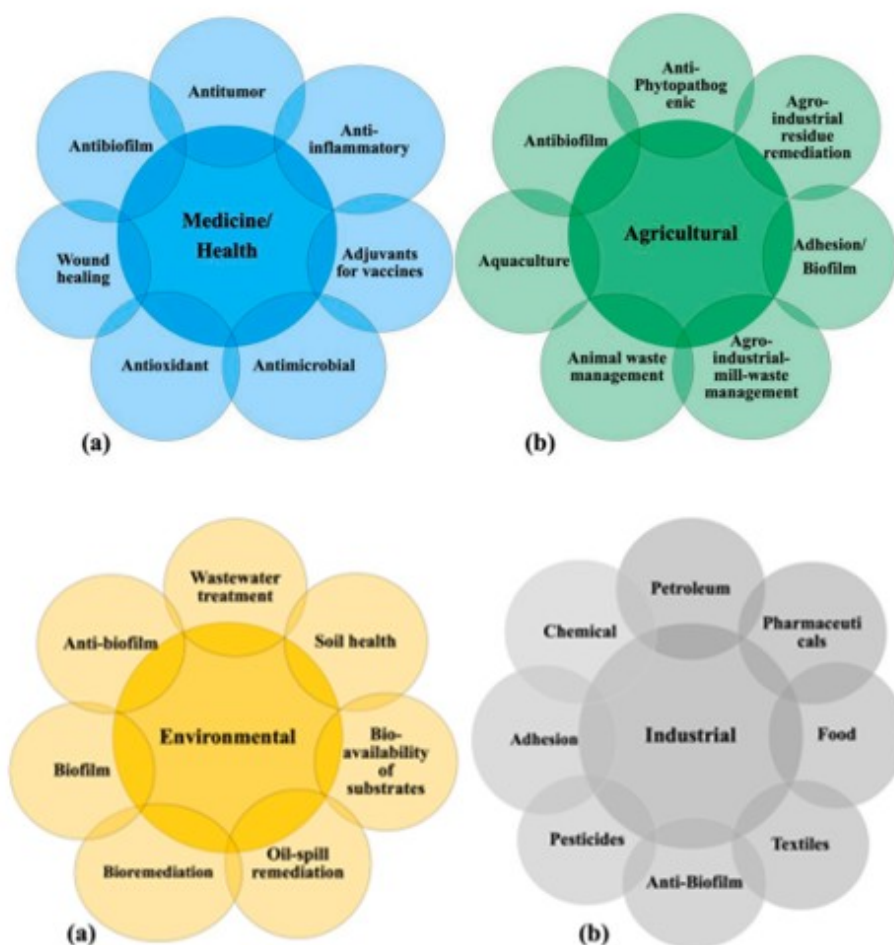
1.3.2 Λιποπεπτίδια και Λιποπρωτεΐνες

Η δομή των λιποπεπτιδίων αποτελείται από μια λιπιδική ουρά που συνδέεται με πεπτιδικά μόρια τα οποία διατάσσονται σε γραμμική ή σε κυκλική διάταξη στο χώρο. Μεταξύ των λιποπεπτιδίων, η σουρφακτίνη (surfactin) αποτελεί την κύρια και μελετημένη ένωση. Παράγεται κυρίως από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, παρουσιάζει ανιονικό φορτίο και δύναται να έχει ποικίλες εφαρμογές καθώς διαθέτει σημαντική ικανότητα να μειώνει την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Ακόμη, η σουρφακτίνη διαθέτει βιολογικές ιδιότητες, συνεπώς μπορεί να εφαρμοστεί σε τομείς της ιατρικής, των τροφίμων και των καλλυντικών. Άλλα είδη του γένους *Bacillus* έχουν αναφερθεί ότι παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές με δομή

παρόμοια με τη σουρφακτίνη, η οποία είναι σταθερή σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Meena et al., 2015; Sharma, 2016).

1.4 Ρόλος και ιδιότητες

Οι ιδιότητες των επιφανειοδραστικών παραγόντων έχουν απαριθμηθεί και αναφέρονται ονομαστικά στην Εικόνα 5. Το πιο σημαντικό από αυτά θεωρείται ότι οι βιοεπιφανειοδραστικοί παράγοντες έχουν μικροβιακή φυσιολογία.



Εικόνα 5 Ιδιότητες και εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στον τομέα της ιατρικής/υγείας, στον γεωργικό τομέα, στον περιβαλλοντικό τομέα και στον βιομηχανικό τομέα (Markande et al. 2021).

1.4.1 Αλληλεπίδραση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με υδρόφοβα τμήματα.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχει αναφερθεί η αλληλεπίδρασή τους με υδρόφοβες χημικές ουσίες. Αυτά τα χαρακτηριστικά έδωσαν στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εφαρμογές στη μικροβιακή ενισχυμένη ανάκτηση πετρελαίου ή MEOR (Satpute et al., 2010). Η ικανότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών να σχηματίζουν σταθερά μικκύλια έχει αυξήσει τις εφαρμογές τους σε σκευάσματα νανογαλακτωμάτων και άλλων συστημάτων φαρμάκων – διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά σημαντικών ασθενειών όπως η θρόμβωση, Αλτσχάιμερ, καρκίνος κ.λπ., (Calabrese et al., 2017). Η παραγωγή τους από μικροοργανισμούς τους βοηθά στην αλληλεπίδραση με υδρόφοβες ενώσεις και τις αξιοποιεί ως πηγή άνθρακα. Αυτή η ικανότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών να επηρεάζει την απορρόφηση, τη μεταφορά και τη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων και των ξενοβιοτικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς τους δίνει εφαρμογές βιοεξυγίανσης (Ren et al., 2018).

1.4.2 Προσκόλληση και αποκόλληση

Η αμφίπαθη φύση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με πολικές και μη πολικές επιφάνειες καθώς και με φορτισμένες επιφάνειες σχηματίζοντας το πρώτο στρώμα και δρώντας ως διαβρεκτικοί παράγοντες. Στη φύση, η πλειονότητα των μικροοργανισμών βρίσκεται κατανεμημένη στις διεπιφάνειες (Markande & Nerurkar, 2019). Έτσι, η ικανότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τους καθιστά ιδανικούς σε βιομόρια για να είναι χρήσιμα στο περιβάλλον των διεπιφανειών. Ο Neu (1996), έχει συζητήσει λεπτομερώς, την ικανότητα των αμφίπαθων επιφανειοδραστικών παραγόντων που βοηθούν στη μικροβιακή προσκόλληση και τη αποκόλληση στις διεπιφάνειες. Οι βιοεκχυλιστές σουρλακτίνης από τον *Lactobacillus acidophilus* RC14 είναι γνωστοί για την αντιπροσκόλληση, ενώ ο Yan et al. (2019) ανέφερε την αντιμικροβιακή και αντι-προσκολλητική ιδιότητα μικροβιακού επιφανειακού ενεργού παράγοντα.

1.4.3 Σχηματισμός και απομάκρυνση βιοφίλμ

Στη φύση, η πλειονότητα των μικροοργανισμών είναι παρόντες σε διεπιφάνειες ως μικροβιακά συσσωματώματα που ονομάζονται – τα "βιοφίλμ". Η βακτηριακή διαβροχή της διεπιφάνειας με τη χρήση επιφανειοδραστικών παραγόντων έχουν αναφερθεί ως πρωταρχικό

κριτήριο προσκόλλησης για μια πολύπλοκη ομάδα ετερογενών βιοφίλμ που παρατηρούνται στη φύση. Αυτά τα βιοϋμένια που ενισχύονται από βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην MEOR (Geetha et al., 2018). Η αμφιπαθητική φύση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τους δίνει επίσης εφαρμογές κατά των βιοϋμενίων. Πολλά ανεπιθύμητα βιοϋμένια σχηματίζονται σε διάφορες επιφάνειες (περιβαλλοντικές, βιομηχανικές και βιοϊατρικές) έχουν αναφερθεί ότι μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά μετά τη χρήση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (μερικές φορές σε συνδυασμό με φυσικές μεθόδους όπως η έκπλυση με υγρά και η μηχανική τριβή ανάλογα με την έκταση του σχηματιζόμενου βιοφίλμ). Οι Yan et al. (2019) και Kiran et al. (2010), ανέφεραν τις αντι-βιοϋμενικές δράσεις για την αναστολή των παθογόνων βακτηρίων από το σχηματισμό δευτερογενούς βιοϋμενίου.

1.4.4 Αντιμικροβιακή δράση

Πολλές βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς, όπως η Surfactin, Iturin, Rhamnolipids και η Fengycin έχουν αναφερθεί με αντιμικροβιακές δραστηριότητες. Παρόλο που έχουν αναφερθεί πολλές βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες για αντιμυκητιασικές, αντιβακτηριακές και αντιελμινθικές δραστηριότητες, πρόσφατες μελέτες σχετικά με αυτές τις δραστηριότητες στην κατάσταση των ευρέως διαδεδομένων αναφορών σχετικά με την αντοχή στα αντιβιοτικά έχουν αυξήσει τις δυνατότητές τους. Οι Bhawsar et al. (2011) ανέλυσαν τις δραστηριότητες των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών κατά των ανθεκτικών στους αντιβιοτικούς κοινούς βακτηριακούς και μυκητιασικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Ενώ η δραστηριότητα των βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να έχει κάποια δραστηριότητα επούλωσης τραυμάτων (Sana et al., 2018), οι αναφορές των χρήσεων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στη χορήγηση φαρμάκων σε σημεία μόλυνσης, φαρμακευτικές χρήσεις ακόμη και ως βοηθητικά για εμβόλια (Sandeep & Sinha, 2017). Επιπλέον, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν επίσης αναφερθεί κατά φυτοπαθογόνων μυκήτων (Sharma et al., 2017).

1.5 Παραγωγή από γαλακτικά βακτήρια

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) θεωρούνται ως μια σημαντική ομάδα προβιοτικών βακτηρίων. Επιπλέον, είναι οι επικρατέστεροι παραγωγοί

βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μεταξύ των προβιοτικών βακτηρίων. Τα LAB περιγράφονται συνήθως ως μια ομάδα Gram – θετικών μη σπορογόνων, αρνητικών σε καταλάση, αυστηρά ζυμωτικά, ανεκτικά στα οξέα βακτήρια, τα οποία έχουν προτίμηση στις αναερόβιες συνθήκες με την ικανότητα να παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης των υδατανθράκων (Soccol et al. 2010). Τα σημαντικότερα γένη είναι τα εξής (Wood & Holzapfel, 1995):

- *Lactobacillus*
- *Streptococcus*
- *Lactococcus*
- *Enterococcus*
- *Pediococcus*
- *Leuconostoc*
- *Oenococcus*
- *Sporolactobacillus*
- *Bifidobacterium*

Τα μέλη των LAB υποδιαιρούνται συνήθως σε δύο ομάδες με βάση τον μεταβολισμό τους σε υδατάνθρακες. Η ομοζυμωτική ομάδα που αποτελείται από τους *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και ορισμένους γαλακτοβάκιλλους χρησιμοποιούν την οδό Embden-Meyerhof-Parnas (γλυκολυτική) για να μετατρέπουν μια πηγή άνθρακα κυρίως σε γαλακτικό οξύ. Σε αντίθεση με με τους ομοζυμωτές, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια παράγουν ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού, CO₂, αιθανόλης ή οξικού από γλυκόζη εκμεταλλευόμενα την οδό της φωσφοκετολάσης. Τα μέλη αυτού του περιλαμβάνουν τα *Leuconostoc*, *Weissella* και ορισμένους γαλακτοβάκιλλους (Vasiljevic & Shah, 2008).

Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό των προβιοτικών βακτηρίων, ένα εντυπωσιακός αριθμός ειδών θεωρούνται προβιοτικά. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα από αυτά. Ωστόσο, μόνο εκείνα τα στελέχη που ταξινομούνται ως LAB και PAB θεωρούνται σημαντικά όσον αφορά τα τρόφιμα και τη διατροφή. Αν και υπάρχει μεγάλος αριθμός προβιοτικών βακτηρίων, έχουν αναφερθεί μόνο εκείνα που υποδεικνύονται με το σύμβολο του αστεριού (*) στον Πίνακα 1 ως παραγωγοί βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που θεωρούνται προβιοτικά (Hajfarajollah et al, 2018)

Είδη <i>Lactobacillus</i>		Είδη <i>Bifidobacterium</i>	Άλλα βακτήρια γαλακτικού οξέος	Βακτήρια μη γαλακτικού οξέος
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. paracasei</i> *	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> *
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. plantarum</i> *	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. bulgaricus</i> 2	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. fermentum</i> *	<i>B. longum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinu</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>B. essencis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> *	<i>Bacillus lactis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i> *	
<i>L. casei</i>		<i>B. lactis</i>		

*Αναφέρεται ως παραγωγός βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Ο Velraeds et al.(1996) απομόνωσε τέσσερα είδη γαλακτοβακίλλων και συγκεκριμένα, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* 36, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *L. fermentum* B54 και *Lactobacillus acidophilus* RC14, και διερεύνησε τη βιοεπιφανειοδραστική ικανότητα παραγωγής. Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών διερευνήθηκε στη μέση εκθετική φάση και στη στατική φάση της ανάπτυξης. Το ST για όλα τα είδη ήταν χαμηλότερο στη στάσιμη φάση. Τα αποτελέσματα της ST και της κρίσιμης συγκέντρωσης μικκυλίων (CMC) επιτεύχθηκαν με τη χρήση του *L. fermentum* B54 με μέγιστη απόδοση 93 mg βιοεπιφανειοδραστικού ανά γραμμάριο CDW.

1.6 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών σε βιομηχανική κλίμακα παρεμποδίζεται από το υψηλό κόστος παραγωγής. Η συγκεκριμένη παράμετρος σχετίζεται με το κόστος του θρεπτικού υποστρώματος (10-30%) ή αλλιώς upstream, καθώς επίσης και από το κόστος ανάκτησης και καθαρισμού (downstream). Ακόμη, επηρεάζεται και από τις χαμηλές αποδόσεις που παρατηρούνται στις διεργασίες ζύμωσης, παράλληλα με την χαμηλή παραγωγικότητα. Για το λόγο αυτό, ειδικότερα στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, πραγματοποιούνται μελέτες που αφορούν στην αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, ως θρεπτικά υποστρώματα με χαμηλό κόστος για τις διεργασίες βιομετατροπής. Ο απώτερος στόχος είναι να αντικαταστήσουν τις εμπορικές και υψηλού κόστους πρώτες ύλες και να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεκριμένα απόβλητα ρεύματα που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από διαφορετικά μικροβιακά στελέχη.

1.6.1 Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η ανάγκη για την αξιοποίηση ανανεώσιμων υλικών που μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, γεγονός που αποτυπώνεται από τον αυξανόμενο αριθμό μελετών. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα αγροτοβιομηχανικά και τροφικά απόβλητα. Πέρα από τη μείωση στο κόστος παραγωγής, η προσέγγιση αυτή συμβάλει και στη διαχείριση αυτών των αποβλήτων. Διάφορα μικροβιακά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Halobacteriaceae archaeon*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, *Candida tropicalis*, *Lactobacillus*, *Pseudozyma* κ.λπ. έχουν μελετηθεί αναφορικά με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα. Σε αυτά περιλαμβάνονται απόβλητα από την επεξεργασία χουρμάδων, πορτοκαλιού, καλαμποκιού, ζαχαροκάλαμου, λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα (Satpute et al., 2017; Mohanty et al., 2021; Mouafo et al., 2022). Για παράδειγμα το στέλεχος *L. pentosus* CECT 4023T έχει μελετηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών χρησιμοποιώντας υποστρώματα που προήλθαν από φλοιό από πίτουρο κριθαριού και φυτικά υπολείμματα από κλάδεμα αμπέλου (Moldes et al., 2007; Vecino et al., 2013). Μάλιστα, η

μελέτη των Moldes et al. (2007) συμπεριέλαβε πληθώρα αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, τα οποία υποβλήθηκαν σε όξινη υδρόλυση προς παραγωγή υποστρωμάτων για το στάδιο της ζύμωσης, ενώ η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών αξιολογήθηκε μέσω της μείωσης της επιφανειακής τάσης.

1.6.2 Απόβλητα και ρεύματα από την επεξεργασία ελαίων

Αρκετά προϊόντα γεωργικής καλλιέργειας επεξεργάζονται προς την παραγωγή ειδών διατροφής, όπως οι ελαιούχοι σπόροι για την παραγωγή λαδιού. Η επεξεργασία αυτή, ειδικά σε μεγάλη κλίμακα, συντελεί στην παραγωγή μεγάλης ποσότητας αποβλήτων που περιέχουν σάπωνες, λαρδί ή/και ελεύθερα λιπαρά οξέα μεταξύ άλλων. Ειδικότερα τα χρησιμοποιημένα έλαια τηγανίσματος μπορεί να περιέχουν υδρογονάνθρακες, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και τριγλυκερίδια μαζί με κάποιο ποσοστό σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (Satpute et al., 2017; Mohanty et al., 2021). Η διαχείριση και απόρριψη αυτών των ρευμάτων αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων, συνεπώς έχουν αξιολογηθεί σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες, ανάμεσα σε αυτές και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Οι ζύμες που ανήκουν στο γένος *Candida* έχουν εφαρμοστεί αρκετά συχνά, κυρίως για την παραγωγή σοφορολιπιδίων, ενώ διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν ερευνηθεί για την παραγωγή ραμνολιπιδίων (Mohanty et al., 2021).

1.6.3 Αμυλώδη υποστρώματα

Η εκχύλιση του αμύλου από το ρύζι, το σιτάρι, την πατάτα, την κασάβα (ή ταπιόκα) και άλλα καλλιέργειες συνεπάγεται την παραγωγή μεγάλου όγκου υδατικών αποβλήτων, τα οποία έχουν υψηλή συγκέντρωση σε άμυλο και φλοιούς. Τα υδατικά αυτά ρεύματα μπορούν να εφαρμοστούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων και βιοεπιφανειοδραστικών (Mohanty et al., 2018). Για παράδειγμα, απόβλητα από την επεξεργασία πατάτας και κασάβα έχουν αξιολογηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *Bacillus subtilis* (Bhange et al., 2016).

1.6.4 Απόβλητα από τη βιομηχανία και επεξεργασία γάλακτος

Το τυρόγαλο είναι το υγρό ρεύμα που προέρχεται από την καθίζηση και την απομάκρυνση της καζεΐνης του γάλακτος κατά τη διάρκεια της παραγωγής τυριού και

αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας και ένα αρκετά ρυπογόνο ρεύμα. Η παγκόσμια παραγωγή τυρογάλακτος εκτιμάται πάνω από 10^8 τόνους ανά έτος, ενώ εντός της Ευρωπαϊκής ένωσης υπολογίζεται περίπου 40×10^6 τόνους/έτος (Zotta et al., 2020). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι παράγονται 9-10 L τυρογάλακτος για κάθε 1 kg τυριού (Carvalho et al., 2013; Lappa et al., 2019). Το τυρόγαλο αποτελείται κυρίως από νερό, ωστόσο περιέχει σημαντική ποσότητα συστατικών, όπως λακτόζη, πρωτεΐνες, αμινοξέα, πεπτίδια και βιταμίνες, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν βιοτεχνολογικά. Ένας από τους τρόπους βιοτεχνολογικής αξιοποίησης του τυρογάλακτος έγκειται και στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών. Αρκετές προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν μελετήσει την αξιοποίηση αυτού του ρεύματος σε μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή μικροβιακών επιφανειοδραστικών με τη χρήση διαφόρων μικροοργανισμών, με έμφαση στα στελέχη ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων (Nascimento et al., 2022; Kachrimanidou et al., 2022). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Nascimento et al. (2022) χρησιμοποιήθηκε το τυρόγαλο για την καλλιέργεια των ζυμών *Moesziomyces aphidis* 5535^T και *Moesziomyces antarcticus* 5048^T προς παραγωγή λιπιδίων μαννόζης-ερυθριτόλης (mannosylerythritol lipids- MELs). Αντίστοιχα, το τυρόγαλο έχει μελετηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών η οποία αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους (Gudina et al., 2012; Alkan et al., 2019). Σε αυτές συνήθως περιλαμβάνεται η μέτρηση της μείωσης της επιφανειακής τάσης, η μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης και η μετατόπιση ελαίου (Rodrigues et al. 2006; Kachrimanidou et al. 2021).

1.7 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Η ποικιλία των χημικών δομών αποτελεί ένα από τα κύρια προτερήματα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών συγκριτικά με τα συνθετικά, αφού η χρήση βιολογικών συστημάτων δίνει ορισμένους δομικούς τύπους επιφανειοδραστικών ουσιών με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά και εφαρμογές που δεν μπορούν να παραχθούν με ευκολία μέσω χημικών διεργασιών (Gerson, 2005). Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές είναι παθογόνοι και αυτό καθιστά δύσκολη την χρήση τους σε εμπορικά σκευάσματα. Έτσι, αναπτύσσοντας και παράγοντας τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από μη παθογόνους μικροοργανισμούς είναι ιδιαίτερα σημαντικό.

Πολλές έρευνες έχουν αναδείξει ως μία εναλλακτική λύση για τις χημικώς συντιθέμενες συμβατικές επιφανειοδραστικές ουσίες τις μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες και τους γαλακτωματοποιητές. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μπορούν να συγκριθούν με τις χημικά συντιθέμενες ενώσεις.

Ένα από τα πλεονεκτήματα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι η ιδιότητα τους να μπορούν να παράγονται από βιομηχανικά απόβλητα ή ανανεώσιμες πηγές που είναι «φιλικές» προς το περιβάλλον εμφανίζοντας χαμηλή τοξικότητα και ότι είναι βιοδιασπώμενες. Επιπλέον, εμφανίζουν διάφορες βιολογικές επιφανειοδραστικές δραστηριότητες. Μερικά τρόφιμα, προϊόντα περιποίησης, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα που καταναλώνονται περισσότερο από το ευρύ κοινό είναι γαλακτώματα. Υπάρχει ένα τεράστιο φάσμα εφαρμογών για τις τασιενεργές ουσίες και τους γαλακτωματοποιητές. Οι νέες και καινοτόμες επιφανειοδραστικές ουσίες, γίνονται όλο και πιο γνωστές, ειδικότερα στη βιομηχανία τροφίμων, αφού αποτελούν νέες και ασφαλείς επιφανειοδραστικές ουσίες και είναι επιθυμητές λόγω του περιορισμένου αριθμού των επιφανειοδραστικών ουσιών και των εγκεκριμένων γαλακτωματοποιητών (Sharma 2016). Ένα ακόμη πλεονέκτημα τους είναι η σταθερότητα που παρουσιάζουν σε διάφορες συνθήκες όπως αυτές της θερμοκρασίας, του pH και των αλάτων (Sharma 2015).

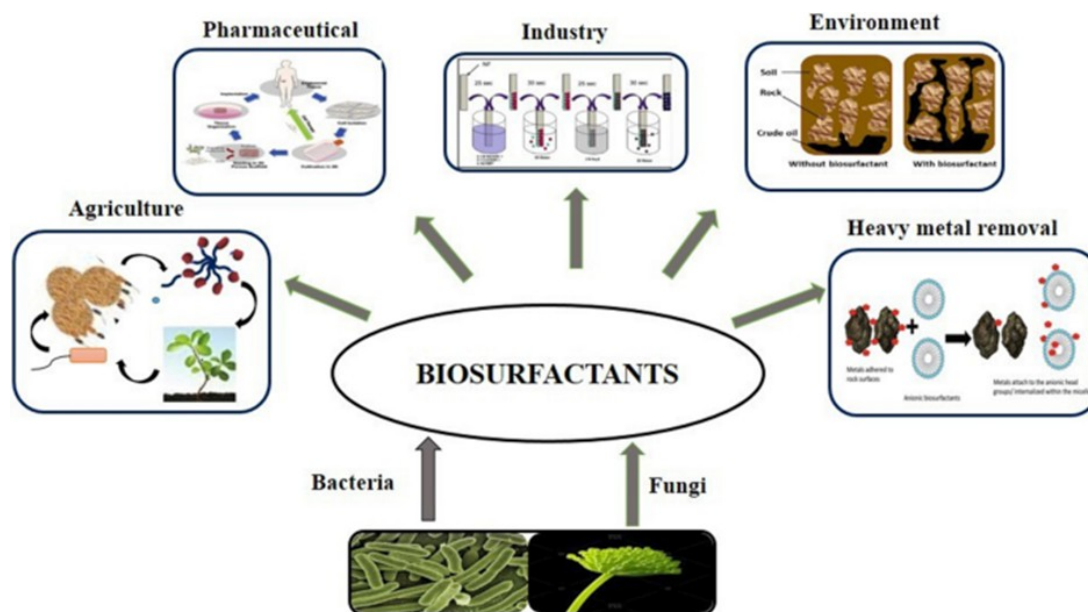
Τα μειονεκτήματα της παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών σε υψηλές ποσότητες είναι το υψηλό κόστος παραγωγής τους σε σχέση με τις χημικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές ουσίες. Αυτό το φαινόμενο έχει αποτελέσει το τροχοπέδη για την εκτεταμένη εφαρμογή τους στον τομέα της βιομηχανίας. Το κόστος παραγωγής για τα περισσότερα βιοεπιφανειοδραστικά δεν μπορεί να ανταγωνιστεί με εκείνα των χημικών επιφανειοδραστικών ουσιών. Ωστόσο, η βιομηχανία τροφίμων επειδή παράγει προϊόντα υψηλής αξίας, αυτό το μειονέκτημα το θεωρεί μειωμένης σημασίας συγκριτικά με άλλους κλάδους. Επιπροσθέτως, υπάρχουν κι άλλες εναλλακτικές λύσεις με στόχο την ελάττωση του κόστους παραγωγής τους, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης χαμηλού κόστους και βιώσιμων υποστρωμάτων (όπως αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα ή απόβλητα), τη βελτίωση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών μικροοργανισμών καθώς και τη βελτιστοποίηση της παραγωγής διεργασιών.

1.8 Εφαρμογές

Ο μεγάλος αριθμός από χημικές δομές που συναντάται στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες δείχνει το πιθανό μεγάλο εύρος εφαρμογών στις βιομηχανίες γαλακτοκομικών, τροφίμων, ποτών, φαρμακευτικών, απορρυπαντικών-καθαριστικών, καλλυντικών κ.λπ. (M. Nitschke & Costa, 2007; Marcia Nitschke & Silva, 2018).

Είναι σημαντικό ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές έχουν ισχυρές αντιμικροβιακές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων τις αντιμυκητιασικές, αντιβακτηριακές και αντι-ικές ιδιότητες (Rodrigues, 2006). Οι εφαρμογές στον ιατρικό τομέα είναι σχετικές με την παρεμπόδιση της προσκόλλησης των παθογόνων, καθιστώντας τις ουσίες αυτές χρήσιμες για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών αλλά ενδεχομένως και ως φορείς προβιοτικών στελεχών (Rodrigues, 2007, Rodrigues 2004). Παρόλα αυτών των τεράστιων ιατρικών δυνατοτήτων των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών η χρήση τους παραμένει περιορισμένη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής τους και λόγω της έλλειψης πληροφοριών για την τοξικότητά τους στο ανθρώπινο σύστημα.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα προϊόντα και να αντικαταστήσουν εν μέρει ή πλήρως τις χημικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές ουσίες σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης (Louhasakul Y, 2020; Oliva A, 2020) όπως απορρυπαντικά για το πλύσιμο ρούχων και οικιακά καθαριστικά (Marchant R, Banat IM, 2012) (Fei D., 2020), προϊόντα καθαρισμού προσωπικής υγιεινής και καλλυντικά (Perfumo 2017; Rebello S, 2020; Fernández-Peña L, 2020). Σχετικά με τη γεωργία, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εντείνουν την βελτίωση της ποιότητας του εδάφους διότι αφαιρούν τα βαρέα μέταλλα και αναστέλλουν την καταστροφική δραστηριότητα πολλών παρασίτων, όπως ζιζάνια, μύκητες και προνύμφες εντόμων, που προκαλούν μειώσεις στα κέρδη (Sachdev DP & Cameotra SS., 2013).



Εικόνα 6 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

1.8.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Η βιομηχανία τροφίμων αποτελείται από αυστηρά μέτρα ελέγχου των μικροοργανισμών με στόχο την παραγωγή προϊόντων που διασφαλίζουν την ασφάλεια των καταναλωτών και δεν είναι βλαβερά την υγεία. Ακόμη, είναι απαραίτητο το τελικό προϊόν να είναι υψηλού επιπέδου η ποιότητά τους και αποδεκτό από τους καταναλωτές, το οποίο λαμβάνει υπόψη το αυξανόμενο ενδιαφέρον των τροφίμων με τις λιγότερες τεχνητές και χημικές συνθετικές ενώσεις και είναι πλούσια σε φυσικά συστατικά. (Hasenhuettl GL, 2019).

Οι μικροοργανισμοί, όταν βρίσκονται σε σκευάσματα περιορίζουν τη χρήση σε διαδικασίες όπως αυτές του μαγειρέματος σε φούρνο μικροκυμάτων και ακτινοβολία, αφού αυτές οι φυσικές ενώσεις μπορούν να χάσουν μερικές από τις αρχικές τους ιδιότητες. Για αυτό το λόγο έχουν οδηγηθεί στην παραγωγή, απομόνωση και ταυτοποίηση νέων πρόσθετων τροφίμων που έχουν πυκνωτικές, σταθεροποιητικές και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες καθώς επίσης και αντιοξειδωτικές, αντιβιοφίλμ και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Ribeiro, 2020).

Οι ενδιαφέρουσες ιδιότητές των βιοεπιφανειοδραστικών, τις κάνει πιο εύχρηστες σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας τροφίμων. Ακόμη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για να σχηματίσουν και να σταθεροποιήσουν γαλακτωμάτα, ως παράγοντες διαβροχής, ή να

βοηθήσουν στην ανάμειξη των συστατικών των τροφίμων, λόγω των επιφανειακών και γαλακτωματοποιητικών τους δραστηριοτήτων.

Εκτός από αυτό, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης τους ως συντηρητικά σε σκευάσματα τροφίμων και ως παράγοντες για την αναστολή του σχηματισμού βιοφίλμ και της προσκόλλησης μικροοργανισμών σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα καθώς διαθέτουν αντιμικροβιακές δράσεις. Επίσης, επειδή δεν έχουν τοξικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται ως καθαριστικά για να αφαιρέσουν και να καταστρέψουν παθογόνους μικροοργανισμούς από εξοπλισμούς και επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων (Nitschke & Costa 2007; Campos et al., 2013).

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να βρουν ακόμα πολλές εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων, εκτός από τη λειτουργία τους που σχηματίζουν και σταθεροποιούν τα γαλακτώματα. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν την υφή και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων που περιέχουν άμυλο, να ελέγχουν τη συσσωμάτωση των σφαιριδίων λίπους σε προϊόντα όπως παγωτό ή σαντιγί και να βελτιώσουν τη συνοχή και την υφή τους με βάση τα λιπαρά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Στα προϊόντα αρτοποιίας, χρησιμοποιούνται για να τροποποιήσουν τις ρεολογικές ιδιότητες, να βελτιώσουν την ικανότητα κατακράτησης νερού και της μεταχείρισης της ζύμης, και να διευκολύνουν την ανάμειξη των υλικών. Επιπλέον, η χρήση τους επεκτείνεται ενάντια της διασποράς της μαργαρίνης ειδικά κατά το μαγείρεμα των λιπών και ελαίων που σκοπεύουν στην παρεμπόδιση της δημιουργίας κρυστάλλων σε αρτύματα για σαλάτες, στην παρεμπόδιση της κολλώδους υφής σε καραμέλες, στην τροποποίηση του ιξώδους της σοκολάτας, στην ενίσχυση της στιλπνής όψης (γυαλάδα-λαμπερότητα) σε επιστρώσεις ζαχαροπλαστικής, για τη βελτίωση της διαδικασίας απόψυξης σε χτυπημένες επιστρώσεις ζαχαροπλαστικής, και σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα για κατοικίδια με υψηλό ποσοστό υγρασίας (Garti 1999, Nitschke & Costa, 2007; Hasenhuettl & Hartel, 2008).

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, γενικά, μπορούν να αξιοποιηθούν άμεσα ως πρόσθετα τροφίμων για να βελτιώσουν την εμφάνιση και τη σταθερότητα των τροφίμων ή έμμεσα ως σκευάσματα απορρυπαντικών για να καθαρίσουν τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και να αποτρέψουν μόλυνση των τροφίμων. Ωστόσο, παρά τις πολλά υποσχόμενες ιδιότητές τους, η εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών ως πρόσθετα σε μεγάλη κλίμακα στη βιομηχανία τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Ο

κυριότερος λόγος είναι το μειωμένο ποσοστό από διαθέσιμες πληροφορίες σχετικές με την τοξικότητά τους, δεδομένου ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές που έχουν παραχθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις, προέρχονται κυρίως από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus* τα οποία χαρακτηρίζονται ως δυνητικά παθογόνα (*opportunistic pathogens*).

Αντιθέτως, η ύπαρξη μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές και χαρακτηρίζονται ως GRAS (*Generally Recognised As Safe*) έχουν βρει χρήση σε πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων (όπως οι ζύμες *Yarrowia lipolytica* ή *Candida utilis*, και τα γαλακτικά βακτήρια), γεγονός που κάνει εύκολο το να αξιοποιηθούν οι μεταβολίτες τους στην παραγωγική διαδικασία τροφίμων, λόγω της απουσίας κινδύνων τοξικότητας ή παθογένειας.

Ακόμα, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες βρίσκουν πιθανές εφαρμογές ως παράγοντες γαλακτωματοποίησης σε προϊόντα τροφίμων, όπως ψωμί, κέικ, μπισκότα, παγωτό και αρτύματα (ντρέσινγκ) σαλάτας. Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις καθώς και η δυνατότητα παρεμπόδισης της προσκόλλησης των παθογόνων στελεχών, αποτελούν χαρακτηριστικά μείζονος σημασίας, καθιστώντας την ανάγκη για περαιτέρω εξέλιξη του συγκεκριμένου ερευνητικού αντικειμένου (Ribeiro, 2020).

Τέλος πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να γίνει χρήση μικροβιακών επιφανειοδραστικών ως γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα όπως π.χ: dressing μαγιονέζας και σαλάτας για βελτίωση της συνοχής και της υφής. Για παράδειγμα, το στέλεχος *C. Utilis* από τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, που χαρακτηρίζεται ως σύμπλοκο υδατάνθρακα-πρωτεΐνης-λιπιδίου έχει χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί καλύτερη σταθερότητα και συνοχή στα αρτύματα σαλάτας όταν γίνεται ανάμιξη με μεταλλική σπάτουλα μετά από ένα μήνα αποθήκευσης. Στην ίδια μελέτη, η βιοεπιφανειοδραστική προστέθηκε σε συγκέντρωση 0,7% (w/v) σε συνδυασμό με κόμμι γκουάρ και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (Campos J M, 2019.)

1.8.2 Παγωτό

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες δεν έχουν αναφερθεί σε κατεψυγμένα επιδόρπια. Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν ότι υπάρχει δυνατότητα να ενσωματωθούν ως γαλακτωματοποιητές στα παγωτά για να βελτιώσουν την υφή και την ποιότητα του προϊόντος. Η βελτίωση ενδεχομένως να οφείλεται στην χαρακτηριστική ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών να βελτιώνουν τη συνοχή και να διατηρούν τις φυσικές ιδιότητες

καθώς και να διαλυτοποιούν τα αρωματικά έλαια που προστίθενται για να ενισχύσουν τη γεύση (Anjum F, 2016; Kieliszek M, 2017).

1.8.3 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από προβιοτικά βακτήρια και οι δυνατότητες εφαρμογής τους σε προϊόντα τροφίμων

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που με την χορήγηση τους σε επαρκείς ποσότητες έχουν πολλά οφέλη για την υγεία στον ξενιστή» (FAO/WHO, 2002). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις όπως βακτηριοσίνη, βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του άνθρακα, διακετύλιο, αντιμικροβιακές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και υπεροξειδίο του υδρογόνου, που εμποδίζουν την ανάπτυξη πιθανών παθογόνων (Sharma, 2016). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες πως τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) μπορούν να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αντιβιοτικής δράσης σε θεραπευτικά και σε σκευάσματα τροφίμων (Sharma & Saharan, 2016; Sharma et al., 2016).

1.9 Πιθανή μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών

Τα συμβατικά αντιμικροβιακά φάρμακα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα εξαιτίας της μικροβιακής προσαρμογής στα αντιβιοτικά. Με αυτόν τον τρόπο, οι μικροβιακές επιφανειακές ουσίες που έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσαν να επιλέγονται για αποτελεσματικές θεραπευτικές εφαρμογές. Η γαλακτωματοποίηση των ελαίων και του λίπους αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στον κλάδο της αρτοποιίας και των σχετικών παρασκευασμάτων. Η προσθήκη υπαρχόντων γαλακτωματοποιητικών λύσεων δεν ικανοποιεί τις απαιτήσεις των καταναλωτών στον μέγιστο βαθμό. Έτσι, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μη συμβατικών διαλυμάτων γαλακτωματοποίησης, όπως μικροβιακά επιφανειοδραστικά.

Στο μέλλον, η χρήση των επιφανειοδραστικών ουσιών θα αφορά την παρασκευή νανογαλακτωμάτων, σταθερών γαλακτωμάτων και πηκτικών παραγόντων που θα βελτιώνουν την υφή των σκευασμάτων της αρτοποιίας. Η διαθεσιμότητα των βιοεπιφανειοδραστικών, η παραγωγή χαμηλού κόστους και η σταθερότητά τους σε διάφορα βιομηχανικά παρασκευάσματα αποτελούν μερικούς από τους παράγοντες που καθορίζουν την μετέπειτα χρήση τους. Για την ύπαρξη φιλικών περιβαλλοντικά λύσεων στον τομέα των τροφίμων και

της ιατρικής, ο κλάδος της έρευνας θα πρέπει να εστιάσει στην παραγωγή πράσινων επιφανειοδραστικών χαμηλού κόστους, στην αξιολόγηση της τοξικότητας και στην ενθάρρυνση της χρήσης αυτών (Sharma D. 2016).

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας εστιάζει στην αξιοποίηση πληθώρας μεθόδων που αξιολογούν την δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από μία ποικιλία γαλακτικών βακτηρίων. Ειδικότερα, στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα ένα συνθετικό με βάση την γλυκόζη και το τυρόγαλο με πηγή άνθρακα τη λακτόζη. Μελετήθηκε η παραγωγή βιομάζας, η κατανάλωση λακτόζης συγκριτικά με την μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης και τη μείωσης αυτής. Οι μετρήσεις αφορούσαν τόσο σε εξωκυττάρια επιφανειοδραστικές (extracellular) όσο και σε αυτές που παράγονται επάνω στα βακτήρια (cell bound).

Επιπρόσθετα, η επιλογή των στελεχών γαλακτικών βακτηρίων της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας έγινε με βάση την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και επιλέχθηκαν στελέχη από συγκεκριμένες συλλογές. Η επιλογή γαλακτικών βακτηρίων έγινε καθώς τα συγκεκριμένα στελέχη χαρακτηρίζονται ως GRAS, συνεπώς μπορούν να διευρύνουν το εύρος των εφαρμογών και στον τομέα των τροφίμων καθώς δεν εμφανίζουν τοξικότητα όπως άλλα στελέχη (*Pseudomonas*).

Το καινοτόμο στοιχείο της συγκεκριμένης μελέτης έγκειται στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με την χρήση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους όπως είναι το τυρόγαλο.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Βιολογικό υλικό

Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων επιλέχθηκαν από τέσσερις διαφορετικές συλλογές (Πίνακας 2): Spanish Type Culture Collection, Universitat de Valencia, Spain (CECT), Culture Collection of the Laboratory of Dairy Research, Agricultural University of Athens, Greece (ACA-DC), Culture Collection of the Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Agricultural University of Athens, Greece (LQC) and Culture Collection of the Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, Agricultural University of Athens, Greece (FMCC).

Η φύλαξη και διατήρηση των βακτηρίων γίνεται σε ειδικού τύπου φιαλίδια (cryovials), όγκου 2 mL στους -80 °C σε θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco™, USA), εμπλουτισμένο με 25% γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121°C, 20 λεπτά). Πριν τη χρήση τους πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας των καλλιιεργειών με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς και στη συνέχεια γινόταν εμβολιασμός των προκαλλιιεργειών υπό ασηπτικές συνθήκες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 mL αποστειρωμένου MRS. Η επώαση των προκαλλιιεργειών έγινε σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C για ~12 ώρες.

Πίνακας 2: Κωδικός απομονωμένου στελέχους των γαλακτικών βακτηρίων

Κωδικός απομονωμένου στελέχους	Είδος
FMCC B-324 (E10)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
FMCC B-329 (E108)	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
CECT 278	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (Hansen 1968) Collins et al. 1989
CECT 903	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Moro 1900) Hansen and Møcquot

	1970
CECT 4023	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> Zannoni et al. 1987
LQC 639	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 752	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
LQC 753	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
LQC 763	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 780	<i>Latilactobacillus sakei</i>
LQC 817	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LQC 820	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LQC 824	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 841	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 842	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LQC 846	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 854	<i>Latilactobacillus sakei</i>
LQC 855	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
LQC 2014	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
LQC 2020	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
LQC 2030	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>

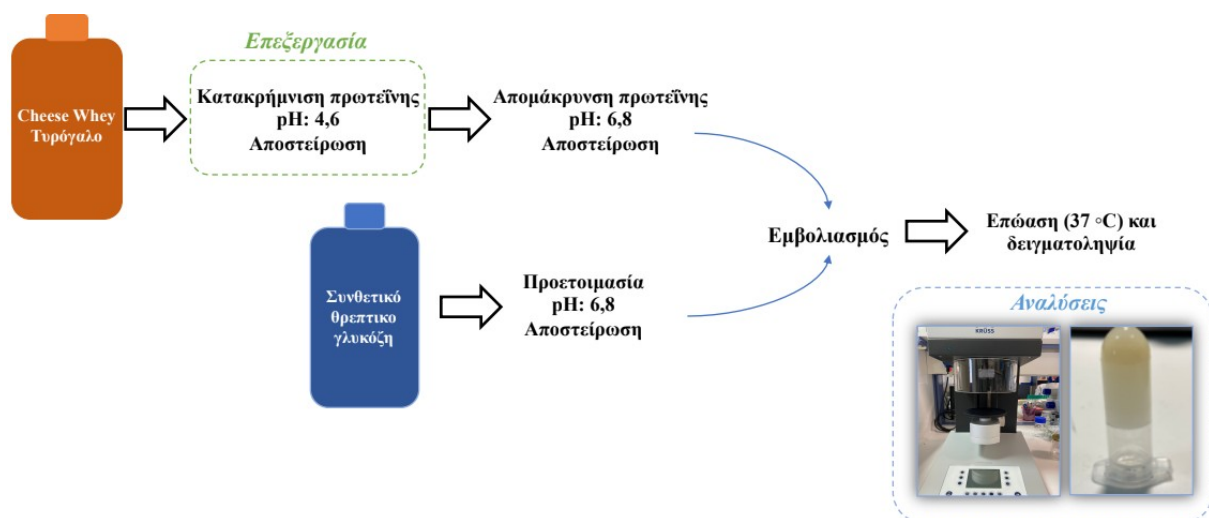
ACA-DC 0081	<i>Lactobacillus delbrueckii delbrueckii</i>
ACA-DC 0124	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
ACA-DC 0125	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
ACA-DC 0127	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
ACA-DC 0179	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
ACA-DC 0182	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
ACA-DC 0183	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
ACA-DC 2474	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
ACA-DC 3430	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
ACA-DC 4039	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
ACA-DC 4052	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

3.2 Θρεπτικό υπόστρωμα

Σε πρώτο στάδιο οι ζυμώσεις έγιναν σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (θρεπτικό M2), η σύσταση του οποίου αναγράφεται στον Πίνακα 3. Στο επόμενο βήμα όλα τα στελέχη αξιολογήθηκαν σε ζυμώσεις με τη χρήση αποπροτεϊνωμένου τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα. Ο σκοπός αυτών των πειραμάτων έγκειται στην αξιοποίηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα.

Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης είναι ευγενική χορηγία του Τυροκομείου Γαλιατσάτος στην Κεφαλονιά. Για την απομάκρυνση των

πρωτεϊνών, πραγματοποιείται θέρμανση του τυρογάλακτος στους 55-60°C και ρυθμίζεται η τιμή pH=10 με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH 5M) για 3 λεπτά. Ακολουθεί ρύθμιση του pH=3,5 για 5 λεπτά με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl 5 M). Με το πέρας των 5 λεπτών, προστίθεται NaOH 5M ώστε η τελική τιμή pH να ρυθμιστεί στο 4,7 τιμή που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Τέλος, διάλυμα ZnSO₄ προστίθεται στο τυρόγαλα στην απαιτούμενη ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωση Zn σε αυτό να είναι να είναι 10 mM. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 121°C, 20 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρωση (4,200 g, 20 λεπτά, 4 °C, Rotina 420R, Hettich Zentrifugen) και διήθηση υπό κενό. Ο στόχος είναι να γίνει η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν καθιζάνει. Το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα αραιώθηκε ώστε η αρχική συγκέντρωση λακτόζης να είναι 20 g/L, το pH ρυθμίστηκε στο 6,8. Σε κάθε περίπτωση θρεπτικού υποστρώματος, τοποθετήθηκαν 95 mL σε κάθε κωνική φιάλη (Erlernmeyer 250 mL) και πραγματοποιήθηκε αποστείρωση (121°C, 20 λεπτά) πριν την έναρξη του πειράματος.



Εικόνα 7 Πειραματικός σχεδιασμός

Πίνακας 3: Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2)

M2	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	20
Εκχύλισμα ζύμης	8
Θεικό αμμώνιο	5
Επταένυδρο φωσφορικό κάλιο	1
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο	0,3
Όξινο ανθρακικό νάτριο	5

3.3 Ασυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Μετά τον απαιτούμενο χρόνο επώασης των προκαλλιιεργειών, έγινε ο εμβολιασμός της κύριας καλλιέργειας στις κωνικές φιάλες. Οι προκαλλιέργειες αποτέλεσαν το 5% του συνολικού όγκου ζύμωσης. Στη συνέχεια, οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε στατικό θάλαμο επώασης στους 37°C, για 72 ώρες. Δείγματα προς ανάλυση λήφθηκαν στις 24 και στις 72 ώρες, ενώ ενδιάμεσα λήφθηκαν δείγματα ώστε να διορθωθεί ασηπτικά η τιμή pH (6,7-6,8) μέσω της προσθήκης αποστειρωμένου διαλύματος βάσης ή οξέος. Στα δείγματα της ζύμωσης μετρήθηκε το ολικό ξηρό βάρος (total dry weight, TDW), η κατανάλωση σακχάρων και αξιολογήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ειδικότερα, το πρώτο βήμα της δειγματοληψίας ήταν ο διαχωρισμός των κύτταρων από το υγρό της ζύμωσης με φυγοκέντρηση (6450 g, 15 min, Rotina 420R, Hettich, Germany).. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιομάζας (TDW) αλλά και για την παραγωγή

βιοεπιφανειοδραστικών (cell bound). Αντίστοιχα, το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση σακχάρων και την παραγωγή εξωκυττάρων βιοεπιφανειοδραστικών. Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών και για τις δύο περιπτώσεις αναλύεται στις επόμενες ενότητες.

3.4 Εκχύλιση κυτταρικά προσδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell bound)

Τα κύτταρα που προήλθαν από το βήμα της φυγοκέντρησης αρχικά εκπλύθηκαν με απιονισμένο H_2O , και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Μετά και το στάδιο της έκπλυσης, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH 7,0. Χρησιμοποιήθηκε αναλογία όγκου δείγματος: όγκου PBS ήταν (6:1 v/v). Η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών έγινε στους $4^{\circ}C$ για 12 ώρες υπό ανάδευση. Μετά από αυτό το στάδιο, έγινε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κυττάρων, ενώ το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με φιλτράρισμα ($0,22\ \mu m$ pore-size filter, Millipore) με μεμβράνες διαπίδυσης (Cellu-Sep® molecular weight cut-off 6-8 kDa). Το διάλυμα που προήλθε χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, του δείκτη γαλακτωματοποίησης και της μετατόπισης ελαίου.



Εικόνα 8: Μεμβράνες διαπίδυσης

3.5 Αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1 Προσδιορισμός ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW)

Ο προσδιορισμός το ολικού ξηρού βάρους (βιομάζα) έγινε για την αξιολόγηση της μικροβιακής ανάπτυξης χρησιμοποιώντας μια βαρυμετρική μέθοδο. Ειδικότερα, λήφθηκαν 2 mL δείγματος από το δείγμα και τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια erpendorf. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγοκέντρωση (Nuve NF 048) για 10 λεπτά στις 5200 στροφές και τα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του θρεπτικού υποστρώματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν πάλι και το νερό πλύσης απορρίφθηκε. Τα δείγματα με τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 65°C μέχρι την απόκτηση σταθερού βάρους. Εν συνεχεία, ζυγίστηκαν τα φιαλίδια, ώστε να υπολογιστεί η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους η οποία υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους και εκφράστηκε σε γραμμάρια ανά λίτρο (g/L). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στο μέσο όρο κάθε μέτρησης.

3.5.2 Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο υγρό της ζύμωσης το οποίο λήφθηκε μετά από φυγοκέντρωση στα αντίστοιχα χρονικά σημεία (δηλαδή 24 και 72 ώρες). Ο προσδιορισμός της κατανάλωσης των σακχάρων και της παραγωγής γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απορρόφησης (HPLC, Agilent). Τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα και στη συνέχεια ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman 0,2 μM. Τα αραιωμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια (vials). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η στήλη ROA-organic acid H⁺ (300 μήκος x 7.8 mm εσωτερική διάμετρο, Phenomenex), η οποία ήταν συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer) και ροή 0,6 mL/min κάτω από συγκεκριμένη πίεση και θερμοκρασία φούρνου στους 65°C ενώ η κινητή φάση της ανάλυσης ήταν διάλυμα H₂SO₄ 10 mM.

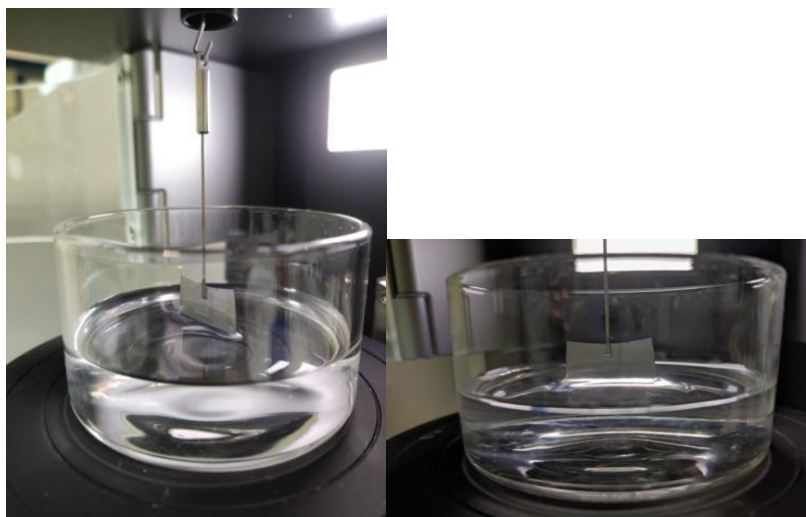
3.6 Αξιολόγηση παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών

Η δυνατότητα των γαλακτικών βακτηρίων να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εξακριβώθηκε μέσω συγκεκριμένων αναλύσεων που περιγράφονται στη συνέχεια. Οι αναλύσεις έλαβαν χώρα τόσο στο υπερκείμενο της ζύμωσης όσο και στα εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS για τα διαφορετικά είδη βιοεπιφανειοδραστικών (εξωκυττάριας και cell bound).

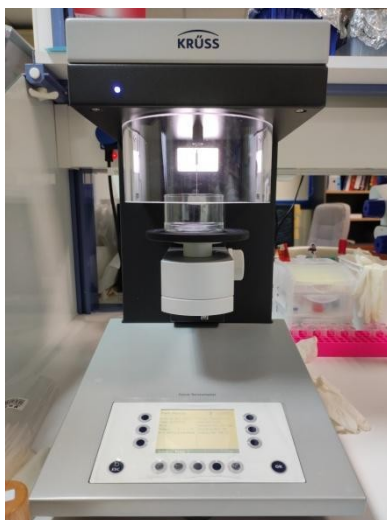
3.6.1 Μέτρηση επιφανειακής τάσης

Οι αλλαγές στην επιφανειακή τάση και ειδικότερα η μείωση της, μετρήθηκε με тенσιόμετρο με τη μέθοδο του πλακιδίου Wilhelmy plate (1.9 cm platinum plate, wetted length: 40.20 mm). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της έντασης (δύναμης) που απαιτείται για την αποκόλληση του πλακιδίου από την επιφάνεια (ή τη διεπιφάνεια). Η ένταση της αποκόλλησης σχετίζεται με την επιφανειακή τάση. Η μείωση της επιφανειακής τάσης ενός υγρού σχετίζεται με την παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε αυτό. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου έγκεινται στην ακρίβεια, στο σύντομο χρόνο που απαιτείται και στην ευκολία της μεθόδου, ενώ μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν πραγματοποιούνται συγχρόνως πολλά δείγματα.

Για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης χρησιμοποιήθηκε тенσιόμετρο (K20 Krüss tensiometer, KRÜSS GmbH, Germany). Χρησιμοποιήθηκαν 20 mL δείγματος σε θερμοκρασίας περιβάλλοντος (25°C). Πριν την κάθε μέτρηση, το πλακίδιο καθαρίστηκε με οργανικούς διαλύτες οι οποίοι καθαρίστηκαν με πέρασμα του πλακιδίου από φλόγα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (n=2) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το μέσο όρο των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 9a, b: Wilhelmy plate



Εικόνα 10: Τενσιόμετρο

3.6.2 Προσδιορισμός του δείκτη γαλακτωματοποίησης

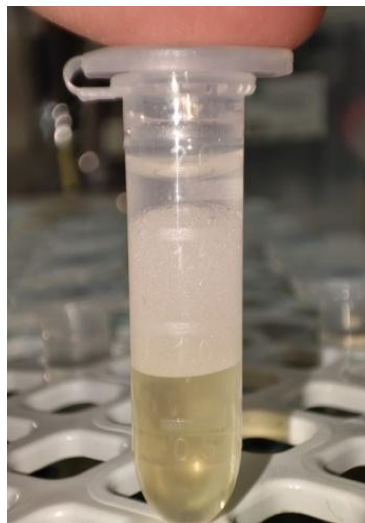
Ο προσδιορισμός του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}) αποτελεί μια γνωστή μέθοδο για την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, καθώς σχετίζονται με ιδιότητες γαλακτωματοποίησης. Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα υπερκείμενα μετά από φυγοκέντρηση καθώς και το εκχύλισμα με τις ακατέργαστες βιοεπιφανειοδραστικές μετά από εκχύλιση με PBS.

Συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε 1 mL από το κάθε δείγμα και 1 mL παραφινέλαιο και ακολούθησε έντονη ανάδευση με vortex για 1 λεπτό. Τα

δείγματα εξετάστηκαν μετά από 24 h και καταγράφηκε το ύψος του γαλακτώματος καθώς και το ολικό ύψος του μίγματος. Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης προσδιορίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

$$E_{24} = \left(\frac{H_{emulsion}}{H_{total\ height\ of\ liquid}} \right) \times 100\%$$

Όπου $H_{emulsion}$: το ύψους του γαλακτώματος και $H_{total\ height\ of\ liquid}$: το συνολικό ύψος του μίγματος.



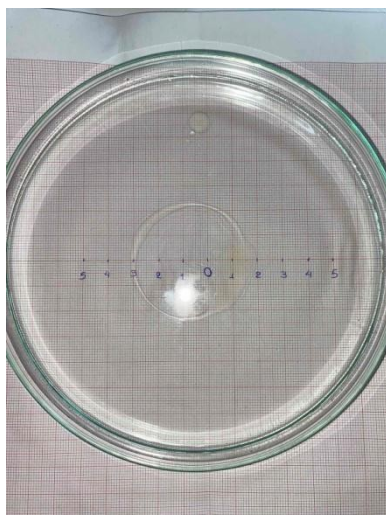
Εικόνα 11: Γαλάκτωμα σε υπερκείμενο



Εικόνα 12: Γαλάκτωμα σε PBS

3.6.3 Δοκιμή μετατόπισης ελαίου

Σε γυάλινα τρίβλια τοποθετήθηκαν 50 mL dH₂O και 50 μ L λάδι τύπου 20W-50. Στη συνέχεια 20 μ L από το εκάστοτε δείγμα τοποθετήθηκε στο κέντρο της κηλίδας που είχε σχηματιστεί από το λάδι με σκοπό τον έλεγχο σχηματισμού δακτυλίου και κατά συνέπεια της μετατόπισης του ελαίου. Ακολούθησε μέτρηση και καταγραφή της διαμέτρου του δακτυλίου που προέκυψε λόγω της παρουσίας βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο δείγμα.



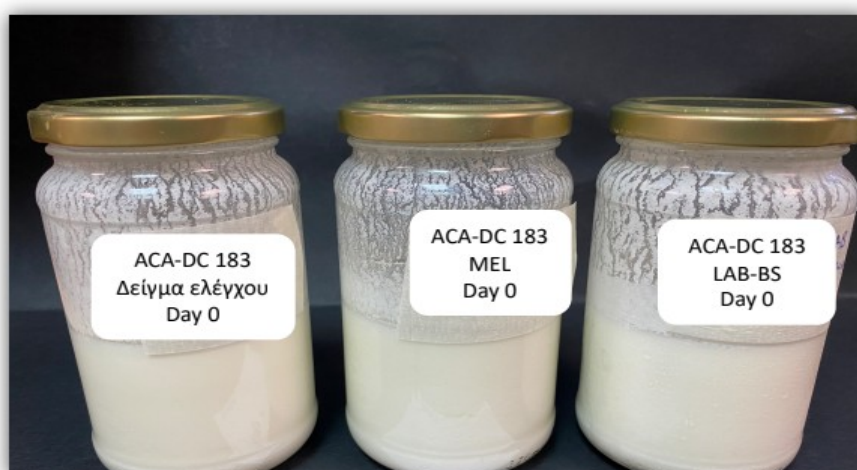
Εικόνα 13: Μετατόπιση ελαίου

3.7 Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων και βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Για την παρασκευή του ξινογάλακτος χρησιμοποιήθηκαν στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία είχε διαπιστωθεί η ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Αρχικά παρασκευάστηκαν προκαλλιέργειες με θρεπτικό υπόστρωμα MRS οι οποίες αποτέλεσαν τις εναρκτήριες καλλιέργειες για τη γαλακτική ζύμωση που ακολούθησε. Η προετοιμασία των προκαλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50 mL με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.1 σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

3.7.1 Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος

Μετά την επώαση των προκαλλιιεργειών, παραλήφθηκαν τα κύτταρα μέσω φυγοκέντρωσης, και εκπλύθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες με παστεριωμένο γάλα. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση, επαναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο γάλακτος προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής αριθμός κυττάρων για την έναρξη της οξίνισης του γάλακτος. Στη συνέχεια 20 mL καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε 180 mL γάλακτος σε γυάλινους περιέκτες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37°C. Το pH του παραγόμενου προϊόντος ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να φτάσει σε τιμή $\text{pH} < 4,5$. Σε αυτό το στάδιο, ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ζύμωσης του ξινογάλακτος και ακολούθησε η αποθήκευσή τους στους 4°C για 15 ημέρες. Εκτός από το ξινόγαλα που παρασκευάστηκε με χρήση στελεχών γαλακτικών βακτηριών, παρασκευάστηκε και ξινόγαλα στο οποίο προστέθηκε επιπλέον ποσότητα ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί στην κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων. Στην πρώτη περίπτωση οι ακατέργαστες βιοεπιφανειοδραστικές, προήλθαν από γαλακτικά βακτήρια σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος (LAB). Στη δεύτερη περίπτωση, οι βιοεπιφανειοδραστικές προήλθαν από τη ζύμωση του στελέχους *Pseudozyma antarctica* και είχαν σύσταση λιπιδίων συνδεδεμένες με μανόζη και ερυθριτόλη (mannosylerythritol lipids, MEL) (Faria et al., 2014).



Εικόνα 14: Ξινόγαλα μετά την οξίνιση

3.7.2 Αναλύσεις ξινογάλακτος:

Η επίδραση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στην παραγωγή του ξινογάλακτος, έγινε μελετώντας το μικροβιακό πληθυσμό, το ποσοστό συναίρεσης και την ογκομετρούμενη οξύτητα. Η λήψη των δειγμάτων γινόταν ανά 5 ημέρες και συνολικά το πείραμα διήρκησε 15 ημέρες.

3.7.2.1 Καταμέτρηση αποικιών

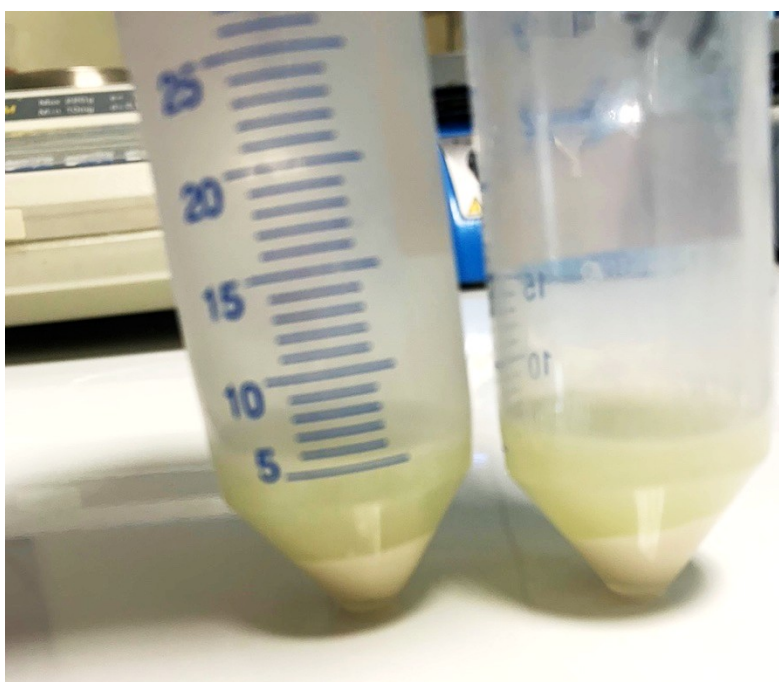
Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και την επίστρωση σε τριβλία. Αρχικά, 100 μL δείγματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Ringer $\frac{1}{4}$ 900 μL και ακολούθησε ανάδευση για να ομογενοποιηθεί το δείγμα. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν οι υπόλοιπες αραιώσεις. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν σε κάθε δείγμα και ακολούθησε η επίστρωση των τριβλίων με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Σε κ'αθε τριβλία, τοποθετήθηκε τριβλίο 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και προστέθηκαν 20 mL θρεπτικού υποστρώματος MRS agarτα τριβλία μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο θάλαμο επώασης στους 37 °C και μετρήθηκαν οι αποικίες μετά από 48 ώρες.



Εικόνα 15: Τριβλίο με ανεπτυγμένες αποικίες

3.7.2.2 Υπολογισμός του ποσοστού συναίρεσης

Το ποσοστό συναίρεσης αποτελεί μία μέτρηση που σχετίζεται γενικά με τη συνοχή του γιαουρτιού ή του ξινογάλακτος και αντιστοιχεί στο διαχωρισμό του ορού γάλακτος από το τελικό προϊόν. Η μέτρηση πραγματοποιείται ζυγίζοντας 5g ξινογάλακτος σε προζυγισμένο περιέκτη (falcon). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C, 2000 rpm για 10 min, μετά το πέρας της οποίας απομακρύνεται ο ορός γάλακτος (υδατική φάση) που έχει διαχωρίσει και τα δείγματα ζυγίζονται εκ νέου, ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό συναίρεσης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δύο μετρήσεων.

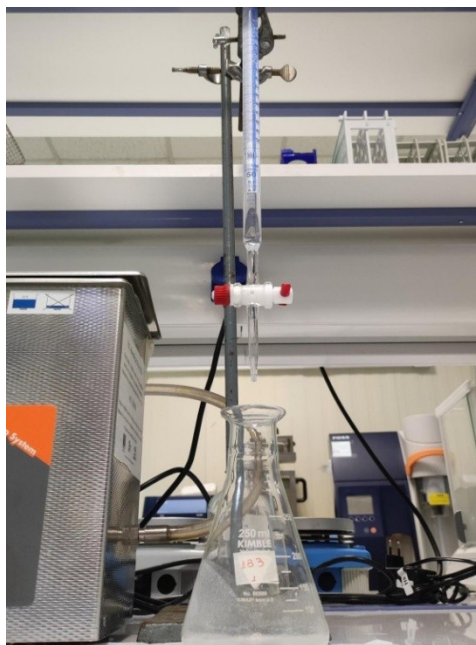


Εικόνα 16: Δείγμα μετά από φυγοκέντρηση: διαχωρισμός ορού γάλακτος (συναίρεση)

3.7.2.3 Ογκομετρούμενη οξύτητα

Η ογκομετρούμενη οξύτητα (ή ολική οξύτητα) εκτιμάται μέσω τιτλοδότησης. Αρχικά, δείγμα 5g γάλακτος τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 250 mL και προστίθενται 10 mL dH₂O και 3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Ακολουθεί ογκομέτρηση με διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 0,1 M μέχρι να αλλάξει το χρώμα του διαλύματος σε ροζ. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στο

μέσο όρο δύο μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως g γαλακτικού οξέος που ήταν και το κυρίαρχο οξύ στο παραγόμενο προϊόν.



Εικόνα 17: Εργαστηριακή διάταξη για τη διαδικασία της ογκομέτρησης

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης

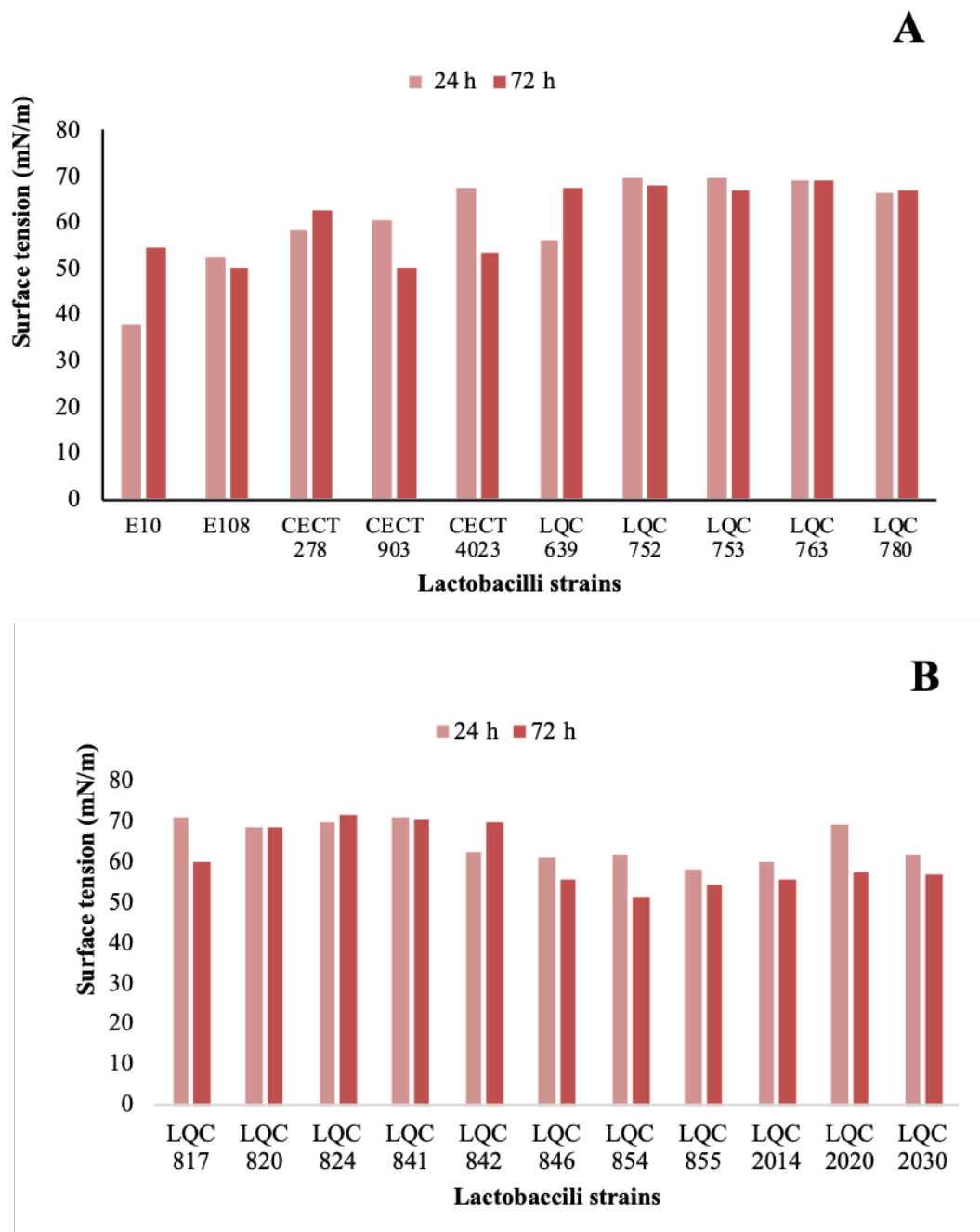
Το αρχικό στάδιο της εργασίας ήταν η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το συνθετικό μέσο M2 σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία. Όπως αναφέρθηκε, οι βιοεπιφανειοδραστικές στα γαλακτικά βακτήρια παράγονται είτε εξωκυτταρικά είτε πάνω στο κύτταρο (cell bound). Συνεπώς για κάθε χρονικό σημείο μετρήθηκε η επιφανειακή τάση στο υπερκείμενο υγρό καθώς επίσης και στο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο εκχυλίστηκαν οι βιοεπιφανειοδραστικές.

4.1.1 Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό ζύμωσης

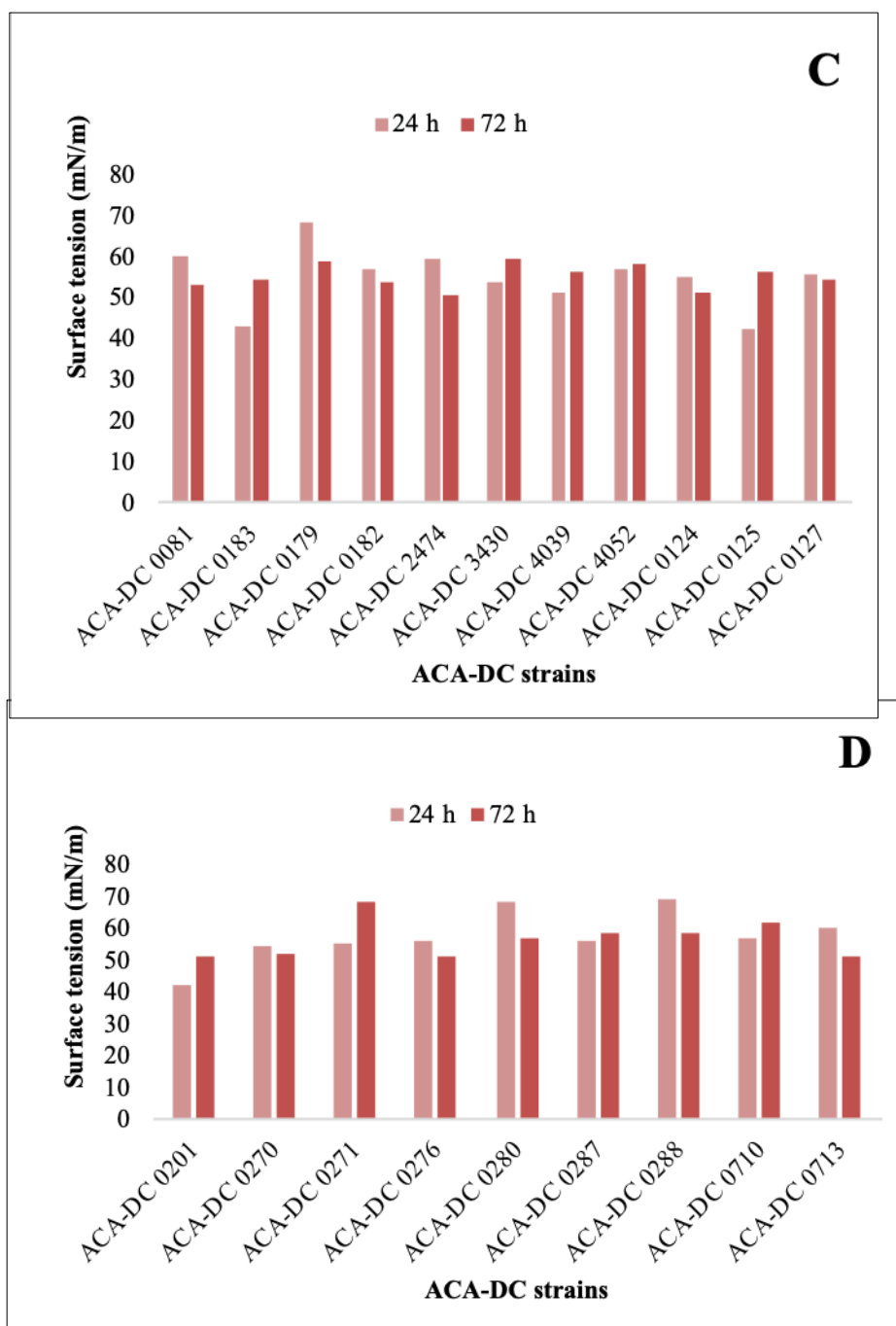
Τα Γραφήματα 1 και 2 παρουσιάζουν τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης, στις 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Τα αποτελέσματα στα Γραφήματα αντιστοιχούν στις μετρήσουν της επιφανειακής τάση όπως προήλθαν από το τενσιόμετρο.

Στο Γράφημα 1 παρατηρείται ότι αναφορικά με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, το 50% των στελεχών (23 από το σύνολο των 41) παρουσιάζουν μεγαλύτερη μέτρηση επιφανειακής τάση στις 24 ώρες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη E10, ACA-DC 0125, ACA-DC 0201 και ACA-DC 0183 είχαν τις μικρότερες τιμές επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες (37,7 42,3, 42,6 και 43,1 mN/m αντιστοίχως). Οι χαμηλές τιμές στην επιφανειακή τάση συνήθως σχετίζονται και με την υψηλότερη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Εκτός αυτού, τα στελέχη E108, CECT 903, ACA-DC 2474, ACA-DC 0124 και ACA-DC 0201 εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές επιφανειακής τάσης μετά από 72 ώρες (50, 50,3, 50,6, 51, 51 mN/m αντιστοίχως).

Συνολικά, τη μικρότερη μέτρηση επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρουσίασε το στέλεχος E10 (37,7 mN/m) ενώ μετά από 72 ώρες το στέλεχος E108 (50 mN/m).



Γράφημα 1: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης, Surface tension, σε mN/m στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

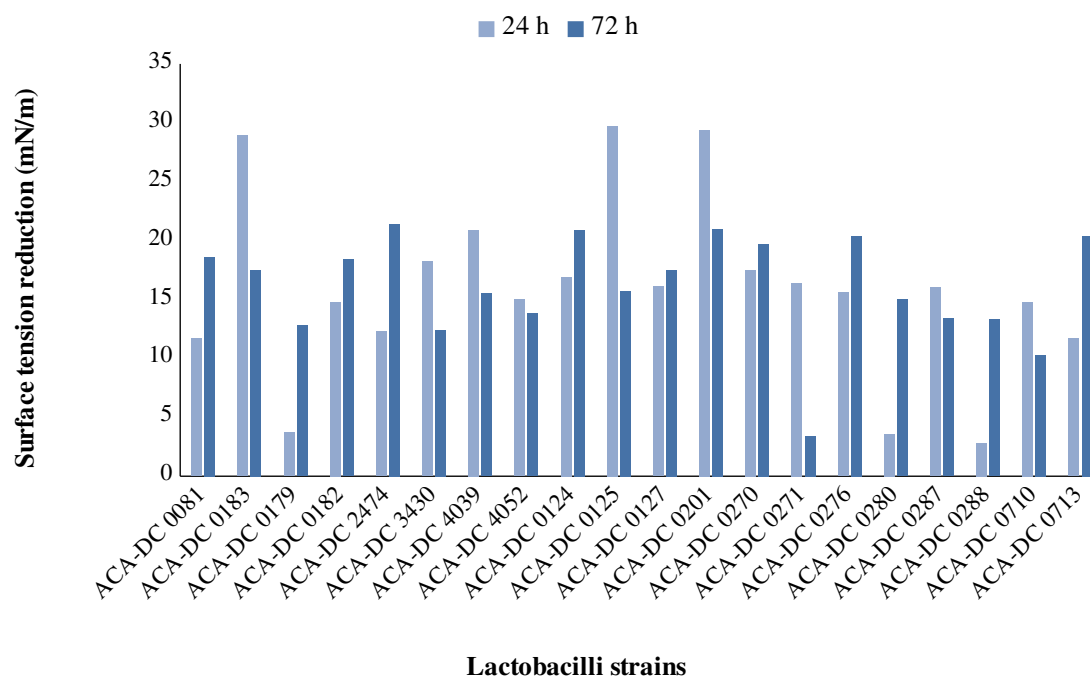
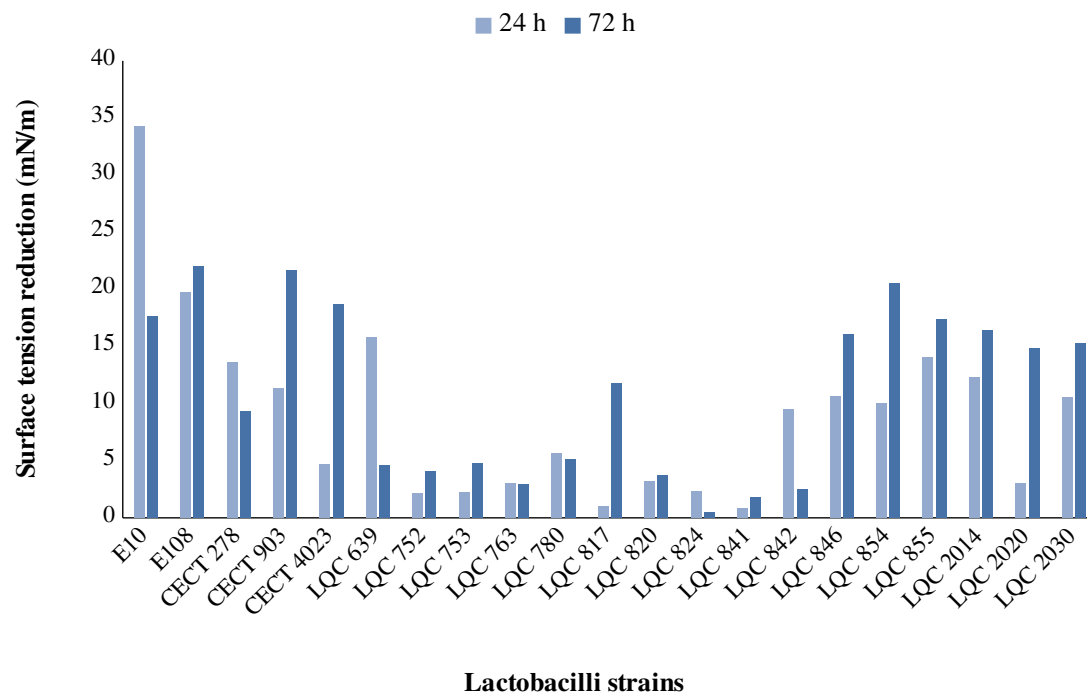


Γράφημα 2: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης, Surface tension, σε mN/m στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

4.1.2 Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

Το Γράφημα 3 παρουσιάζει τη μείωση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τον υπολογισμό της μείωσης της επιφανειακής τάσης έγινε αφαίρεση των τιμών που προέκυψαν από το PBS.

Στις 24 ώρες η υψηλότερη μείωση επιφανειακής τάσης προήλθε από το στέλεχος E10 (34,3 mN/m). Επιπλέον, στελέχη που εμφάνισαν υψηλές τιμές μείωσης επιφανειακής τάσης στις 24 ώρες είναι το ACA-DC 0183 (28,9 mN/m), ACA-DC 0125 (29,7 mN/m), ACA-DC 0201 (29,4 mN/m). Από την άλλη την χαμηλότερη τιμή μείωσης της επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης εμφάνισαν τα στελέχη LQC 752 (2,1 mN/m), LQC 753 (2,2 mN/m), LQC 817 (1,0 mN/m), LQC 841 (0,8 mN/m), ACA-DC 0280 (3,6 mN/m) και ACA-DC 0288 (2,8 mN/m). Εκτός αυτού, τα στελέχη που εμφάνισαν την υψηλότερη τιμή μείωσης επιφανειακής τάσης στις 72 ώρες είναι τα στελέχη E108 (22,0 mN/m), LQC 854 (20,5 mN/m), ACA-DC 0081 (18,6 mN/m), ACA-DC 0124 (20,9 mN/m), ACA-DC 0270 (19,7 mN/m) και ACA-DC 0713 (20,4 mN/m). Τέλος, τα στελέχη που εμφάνισαν την χαμηλότερη τιμή μείωσης της επιφανειακής τάσης στις 72 ώρες είναι το LQC 824 (0,5 mN/m), το LQC 841 (1,8 mN/m), το LQC 842 (2,5 mN/m), το LQC 763 (2,9 mN/m) και το LQC 820 (3,4 mN/m).



Γράφημα 3: Μέτρηση μείωσης επιφανειακής τάσης, Surface tension reduction, σε mN/m από εκχυλίσματα PBS.

4.1.3 Αξιολόγηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης και της μετατόπισης ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται στο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα

Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, μετρήθηκε ο δείκτης γαλακτωματοποίησης και η μετατόπιση ελαίου ως μέθοδοι που σχετίζονται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Αξιολογήθηκε τόσο το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης όσο και το εκχύλισμα PBS για τις εξωκυττάρια και τις βακτηριακά προσδεμένες βιοεπιφανειοδραστικές αντίστοιχα, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους επόμενους Πίνακες.

Από τον Πίνακα 3 και 4 παρατηρείται ότι η μετατόπιση ελαίου ήταν υψηλότερη γενικά στο υπερκείμενο υγρό σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα. Προηγούμενες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει αυτή τη μέθοδο, αντίστοιχα τη συσχετίζουν και με το δείκτη γαλακτωματοποίησης και την επιφανειακή τάση. Στην παρούσα μελέτη, στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε υψηλή μετατόπιση ελαίου, δε σχετιζόταν με υψηλό δείκτη γαλακτωματοποίησης. Για παράδειγμα το στέλεχος E10 παρουσίασε υψηλή μετατόπιση και υψηλή μείωση στην επιφανειακή τάση αλλά χαμηλό E₂₄.

Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα, ο δείκτης γαλακτωματοποίησης στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν υψηλότερος στο υπερκείμενο σε αντίθεση με το εκχύλισμα, ωστόσο αυτό ενδέχεται να οφείλεται και σε υπολειπόμενα οργανικά συστατικά το οποίο παρουσιάζει ιδιότητες γαλακτωματοποίησης. Ωστόσο, 14 στελέχη παρουσίασαν υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης στο εκχύλισμα PBS στο δείγμα των 72 ωρών. Η μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών, ωστόσο θα πρέπει να συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους όπως η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Kachrimanidou et al., 2021).

Πίνακας 4: Αξιολόγηση της μετατόπισης ελαίου και του Δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}) στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης και στο εκχύλισμα PBS μετά από ζύμωση σε συνθετικό θρεπτικό με γλυκόζη

	Μετατόπιση ελαίου (OD)				Δείκτης γαλακτωματοποίησης (E_{24} %)			
	Εξωκυττάρια		Εκχύλισμα PBS		Εξωκυττάρια		Εκχύλισμα PBS	
Στέλεχος	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
E10	0,7	4,8	1,7	1,5	3,92	3,00	17,90	16,00
E108	0,9	1,3	0,1	0,5	4,69	5,00	4,30	4,30
CECT 278	1,4	1	0,8	0,1	27,80	9,00	3,85	3,80
CECT 903	1,1	2,8	1,6	1,7	11,20	1,00	7,69	5,70
CECT 4023	0,8	1,7	1	0,3	52,70	51,00	0,00	0,00
LQC 639	1,95	0,9	0,35	0,65	45,63	34,48	0,00	51,67
LQC 752	0,95	0,35	0,05	0,17	32,76	55,98	0,00	4,73
LQC 753	1,2	1,1	0,75	0,55	35,71	61,67	5,00	55,22
LQC 763	0,6	1,7	0,65	0,3	37,98	17,86	0,00	1,61
LQC 780	0,85	0,6	0,55	0,65	36,04	35,00	1,85	55,73
LQC 817	0,9	1,3	1,45	1,35	6,84	65,00	3,70	3,35
LQC 820	0,95	0,75	0,4	0,1	27,59	23,94	3,57	0,00
LQC 824	1,15	0	0,05	0,25	27,89	17,37	0,00	0,00
LQC 841	1,85	1,25	0,3	0,35	18,12	13,79	60,00	0,00
LQC 842	0,65	1,85	0,05	0,2	25,00	17,14	59,31	64,50
LQC 846	1,2	0,45	0,15	0,25	5,17	40,39	0,00	6,57
LQC 854	1,35	0,6	0,9	0,25	18,62	22,41	13,13	1,96

LQC 855	1,1	1,05	0,5	0,15	29,31	31,03	0,00	50,00
LQC 2014	0,9	1,05	0,65	0,1	14,30	19,40	1,79	53,70
LQC 2020	1	1,4	0,45	0,95	36,67	21,00	1,72	33,93
LQC 2030	1,65	0,8	0,45	0,2	37,93	40,33	10,86	34,52

Πίνακας 5: Αξιολόγηση της μετατόπισης ελαίου και του Δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}) στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης και στο εκχύλισμα PBS μετά από ζύμωση σε συνθετικό θρεπτικό με γλυκόζη

	Μετατόπιση ελαίου (OD)				Δείκτης γαλακτωματοποίησης (E_{24} %)			
	Εξωκυττάρια		Εκχύλισμα PBS		Εξωκυττάρια		Εκχύλισμα PBS	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Στέλεχος								
ACA-DC 0081	1,6	1,15	0,65	0,35	36,99	18,97	36,21	5,36
ACA-DC 0124	0,9	0,75	0,45	0,1	31,67	47,17	0,00	60,34
ACA-DC 0125	0,75	0,75	1,1	0	47,35	17,24	0,00	41,38
ACA-DC 0127	0,9	0,15	0,45	0,2	14,29	36,21	3,33	67,24
ACA-DC 0179	1,85	0,85	0,05	0,55	43,10	60,00	0,00	1,67
ACA-DC 0182	0,95	0,65	0,35	0	36,21	61,45	1,79	51,67
ACA-DC 0183	1,25	0,85	0,1	0,25	20,69	55,00	0,00	0,00
ACA-DC 0201	0,6	0,2	0,65	0,1	5,00	37,32	1,67	46,55
ACA-DC 0270	2,6	1	0,05	0,35	33,37	60,00	5,88	62,07
ACA-DC 0271	1,55	0,95	0,25	0,15	39,66	25,00	3,13	0,00

ACA-DC 0276	0,5	0,75	0,6	1,1	41,87	45,44	3,45	51,72
ACA-DC 0280	1,35	0,55	0,05	0,05	40,52	37,93	1,52	13,56
ACA-DC 0287	1,2	1,35	0,55	0,15	18,68	57,88	5,71	22,26
ACA-DC 0288	1,2	1	2,55	1,5	41,67	55,24	0,00	17,24
ACA-DC 0710	1,15	0,3	0,25	0,05	33,33	44,83	11,94	10,23
ACA-DC 0713	1,3	0,15	0,35	0,15	52,64	31,03	10,38	8,33
ACA-DC 0731	1,1	1,75	0,65	0,05	26,35	44,83	0,00	10,65
ACA-DC 0759	0,85	0,45	0,5	0	25,86	41,38	6,90	26,60
ACA-DC 0761	0,95	0,75	0,45	0,05	18,97	41,38	3,45	5,17
ACA-DC 2111	1,3	1,2	1,15	0	21,12	39,29	3,51	3,57
ACA-DC 2174	1,15	0,75	0,6	0,3	47,47	31,43	15,52	37,22
ACA-DC 2221	0,6	0,85	0,65	0	22,41	29,31	1,67	5,49
ACA-DC 2350	1,65	0,95	0,9	0	25,86	34,48	1,72	3,57
ACA-DC 2474	0,6	0,3	0,75	0,4	31,84	43,10	1,92	6,90
ACA-DC 3430	0,25	1	0,05	0	12,07	37,30	0,00	1,79
ACA-DC 4039	1,3	0,9	0,7	0,65	24,60	27,59	0,00	0,00
ACA-DC 4052	0,1	0,1	0,6	0	25,00	56,58	1,72	15,76

4.2 Αξιολόγηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

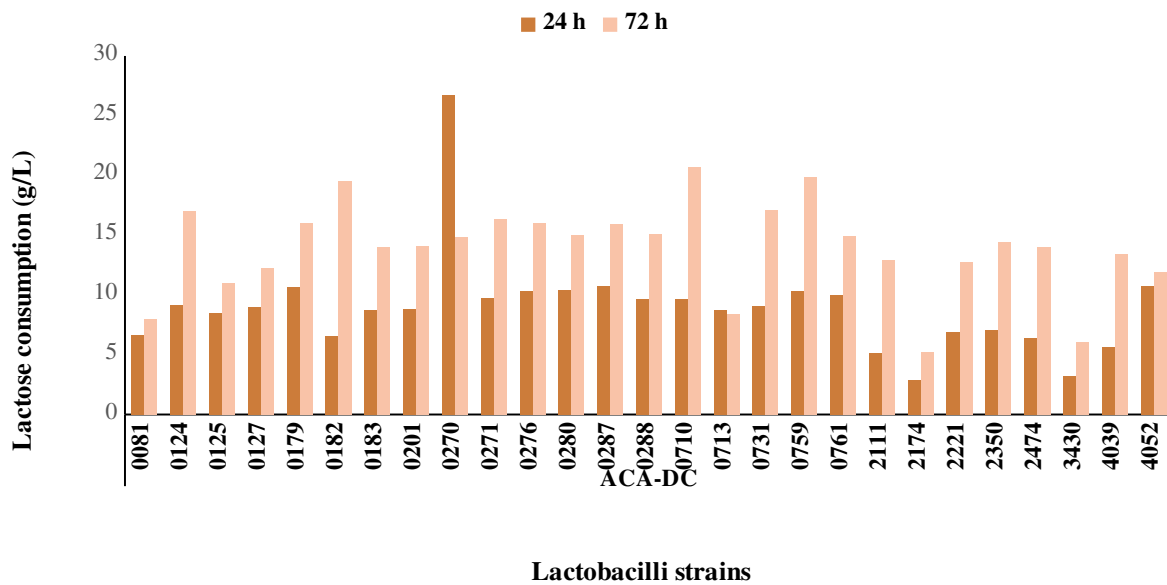
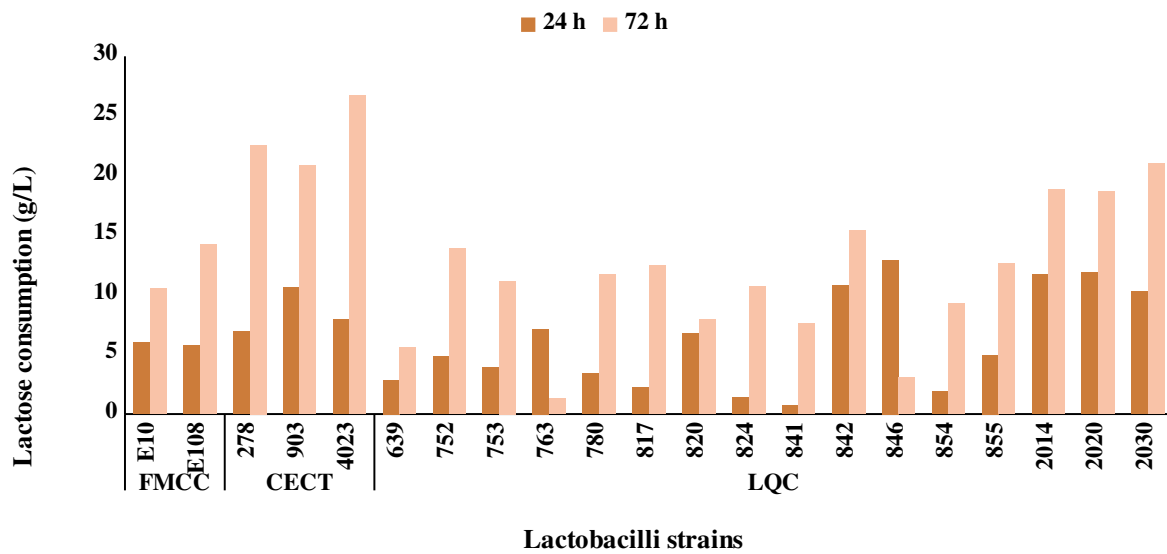
Επόμενο στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση του τυρογάλακτος, ως μια χαμηλού κόστους πρώτη ύλη για τις μικροβιακές ζυμώσεις. Ο στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν διπλός, καθώς από τη μία πλευρά ενδέχεται να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών ενώ παράλληλα αποτελεί και ένα τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων των βιομηχανιών τροφίμων στα πλαίσια της βιοοικονομίας. Επιπρόσθετα, το τυρόγαλα, που περιέχει λακτόζη ως πηγή άνθρακα, αποτελεί ένα φυσικό υπόστρωμα για τα γαλακτικά βακτήρια. Στο στάδιο αυτό συμπεριλήφθηκαν όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα, δεδομένου ότι η πηγή άνθρακα σχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Gudiña et al., 2011; Kachrimanidou et al., 2021).

Κατά την πειραματική διαδικασία προσδιορίστηκε η κατανάλωση λακτόζης και η παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της επιφανειακής τάσης και της μετατόπισης ελαίου για τον έλεγχο ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών. Αντίστοιχα μελετήθηκαν τα υπερκείμενα της ζύμωσης για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών καθώς και τα εκχυλίσματα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα.

4.2.1 Προσδιορισμός κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των 24 και 72 ωρών

Αρχικά ερευνήθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη με το τυρόγαλα ως θρεπτικό υπόστρωμα, στο οποίο η αρχική συγκέντρωση λακτόζης ήταν ~27 g/L. Το Γράφημα 4 περιγράφει, την κατανάλωση λακτόζης στο υπερκείμενο μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Ειδικότερα, το στέλεχος CECT 4023 στις 24 ώρες έχει σχετικά χαμηλή κατανάλωση λακτόζης, ενώ στις 72 ώρες εμφανίζει την υψηλότερη κατανάλωση σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Πολλά στελέχη που εμφάνισαν χαμηλή κατανάλωση λακτόζης στις 24 ώρες με κυριότερα τα LQC 841, LQC 824, LQC 817, LQC 854, LQC 639, ACA-DC 2174, ACA-DC 3430. Από αυτά, τα

στελέχη που συνέχισαν να καταναλώνουν λακτόζη μέχρι και 72 ώρες είναι τα LQC 639, ACA-DC 2174 και το ACA-DC 3430. Ακόμη κάποια στελέχη, εμφάνισαν κατανάλωση λακτόζης μόνο στις 24 ώρες, η οποία δε συνεχίστηκε, γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει την έλλειψη κάποια θρεπτικού συστατικού από το υπόστρωμα και τη διακοπή της ζύμωσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη LQC 763, LQC 846, LQC 820, ACA-DC 0081, ACA-DC 0270, ACA-DC 0713 και το ACA-DC 4052.



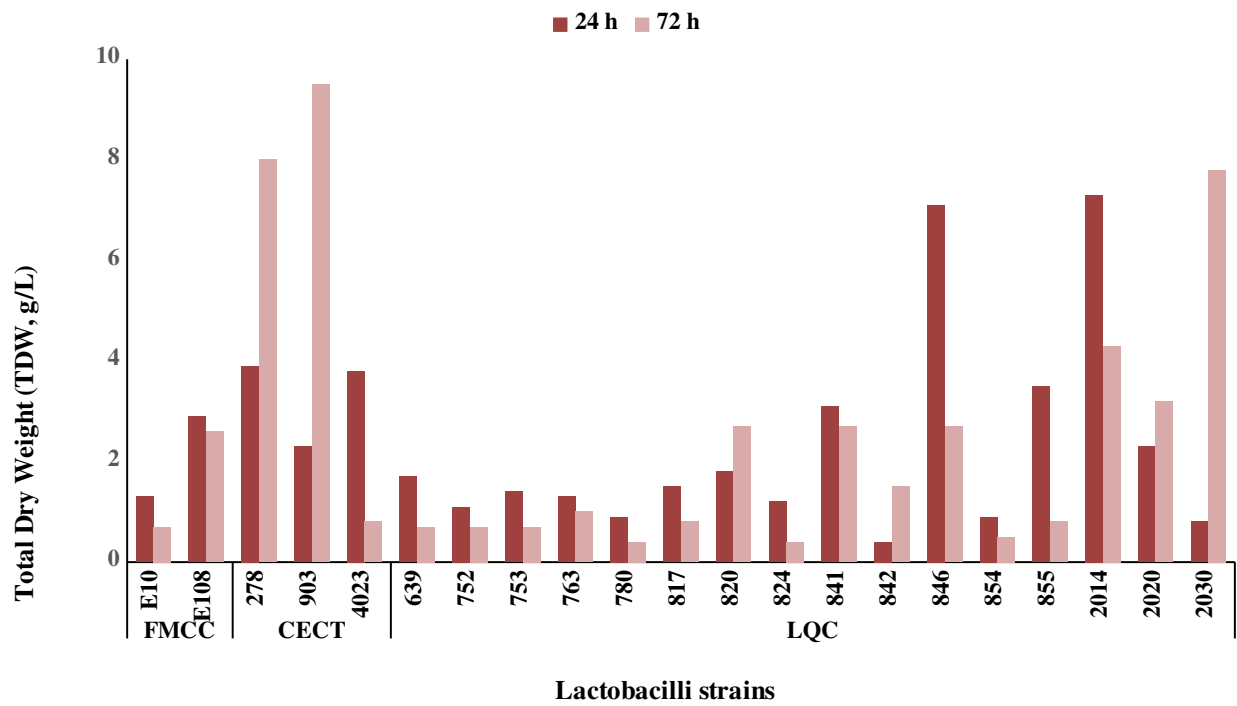
Γράφημα 4: Κατανάλωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος.

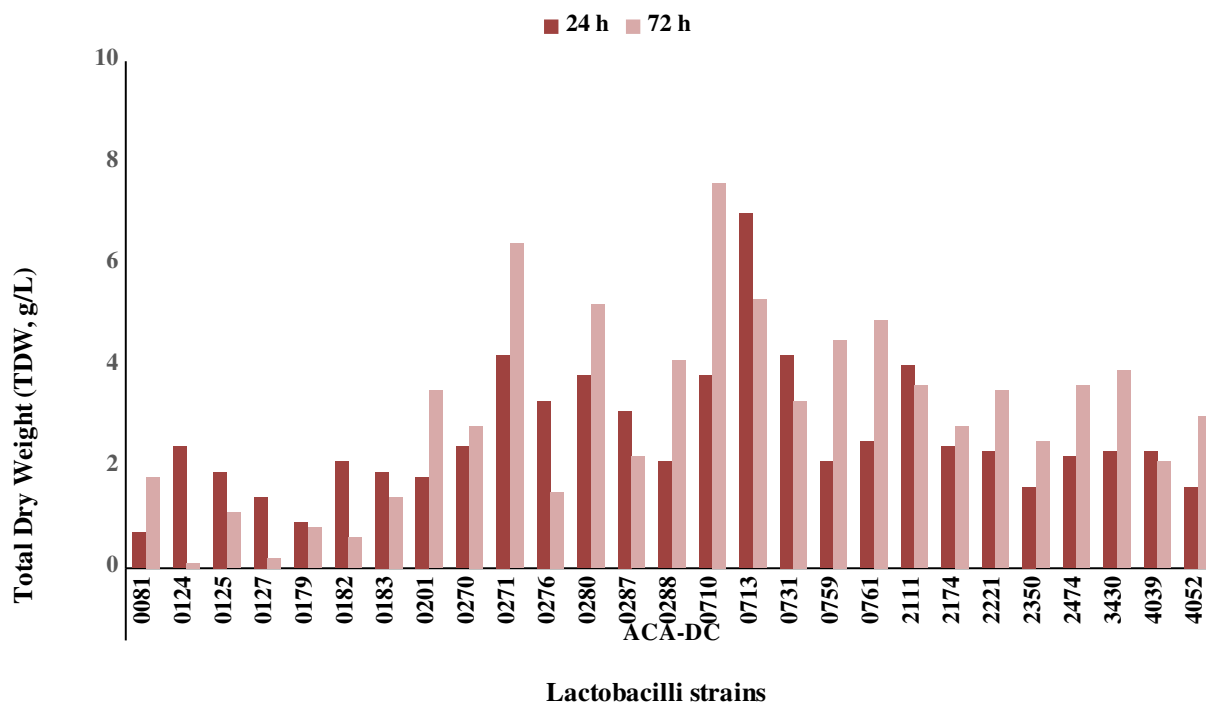
4.2.2 Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Το Γράφημα 5 παρουσιάζει την παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Συγκρίνοντας τα Γραφήματα 4 και 5 παρατηρείται ότι όπου υπάρχει αυξημένη παραγωγή βιομάζας, στην πλειονότητα των περιπτώσεων υπάρχει και αυξημένη κατανάλωση λακτόζης. Συνεπώς, παρατηρείται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας συνδέεται με την κατανάλωση της λακτόζης, για παράδειγμα στα στελέχη CECT 278, CECT 903, LQC 2030 και ACA-DC 0710.

Από το Γράφημα 5 διαπιστώνεται ότι η πλειονηφία των στελεχών είχε μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας ύστερα από 72 ώρες ζύμωσης συγκριτικά μετά από 24 ώρες. Στις 24 ώρες ζύμωσης τα στελέχη με την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είναι το LQC 2014 με βιομάζα 7,3 g/L, το LQC 846 με βιομάζα 7,1 g/L και το ACA-DC 0713 με βιομάζα 7,0 g/L. Από την άλλη, τα στελέχη με την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας στις 72 ώρες ζύμωσης είναι το CECT 903 με βιομάζα 9,5 g/L, το CECT 278 με βιομάζα 8 g/L, το LQC 2030 με βιομάζα 7,8 g/L, το ACA-DC 0710 με βιομάζα 7,6 g/L και το ACA-DC 0271 με βιομάζα 6,4 g/L.

Στελέχη με παρόμοια παραγωγή βιομάζας στις 24 και στις 72 ώρες είναι τα E108, ACA-DC 0270, ACA-DC 2111, ACA-DC 2174 και ACA-DC 4039. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος ACA-DC 0270 παρόλο που στις 24 ώρες εμφάνισε υψηλή κατανάλωση λακτόζης (26,71 g/L) την ίδια ώρα είχε χαμηλή παραγωγή βιομάζας (2,4 g/L). Επιπρόσθετα, το στέλεχος CECT 4023 είχε υψηλή κατανάλωση λακτόζης στις 72 ώρες (26,71 g/L), ωστόσο την ίδια ώρα είχε χαμηλή παραγωγή βιομάζας (0,8 g/L).





Γράφημα 5: Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό μέσο.

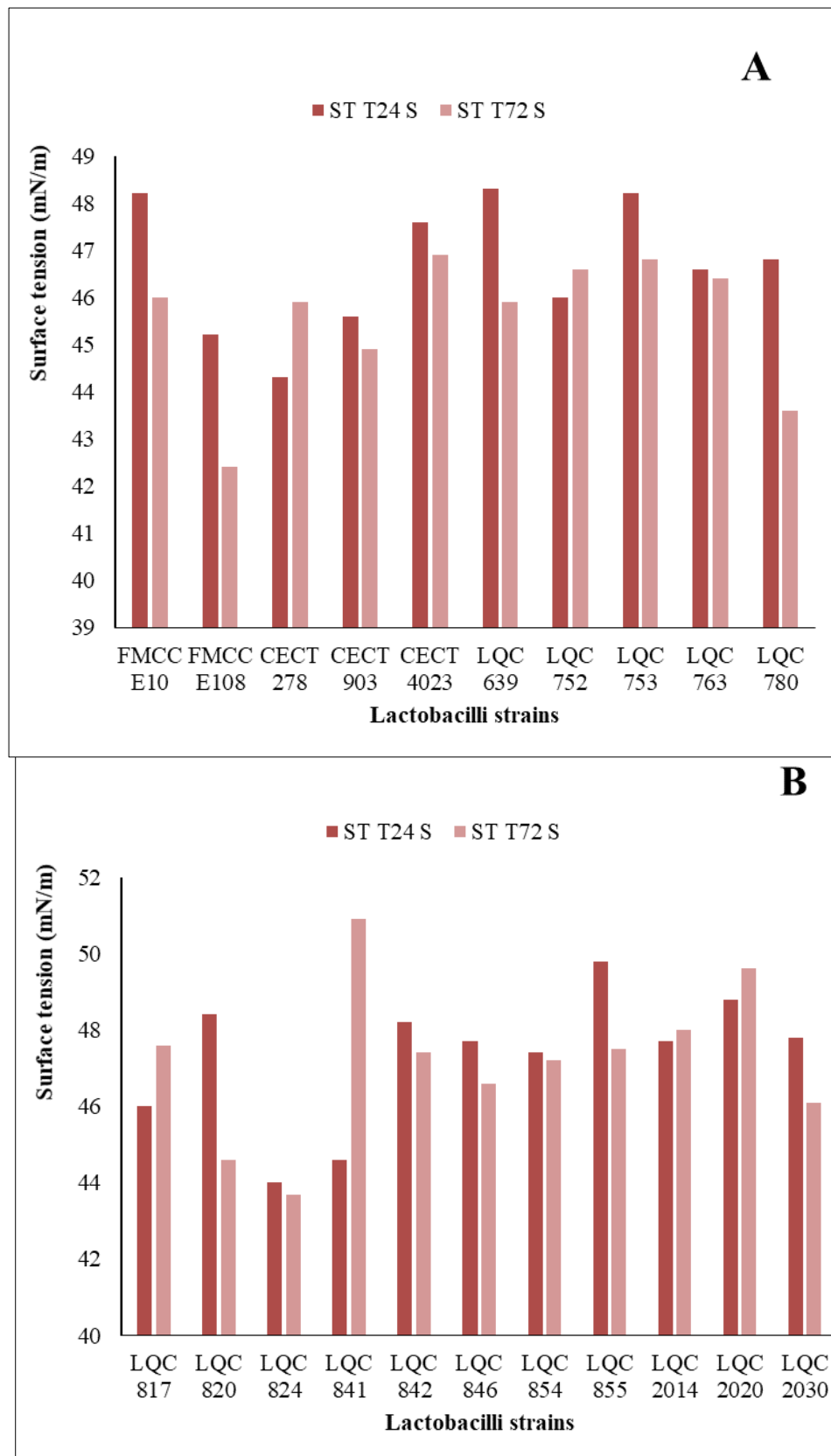
4.2.3 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης

Στην επόμενη ενότητα μελετήθηκε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για τον έλεγχο και την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, με θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλα. Αντίστοιχα και με το προηγούμενο πείραμα, μετρήθηκε τόσο το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρωση, για τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται εξωκυτταρικά αλλά και το εκχύλισμα από PBS για τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται συνδεδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα.

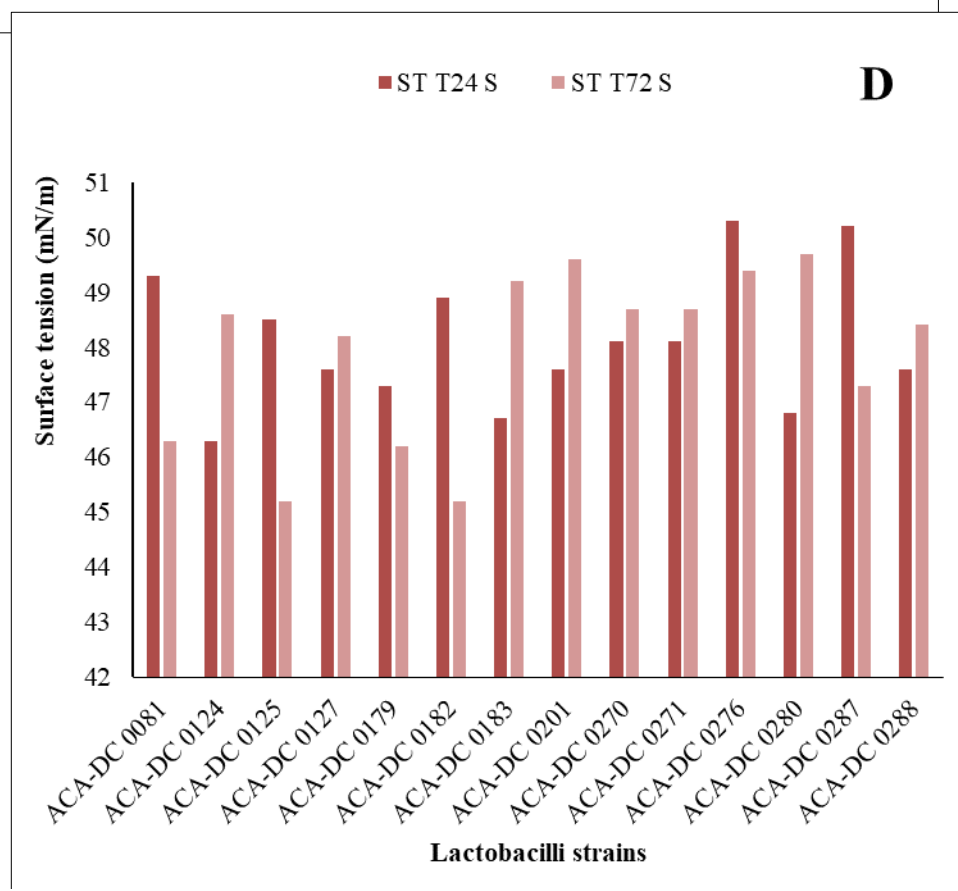
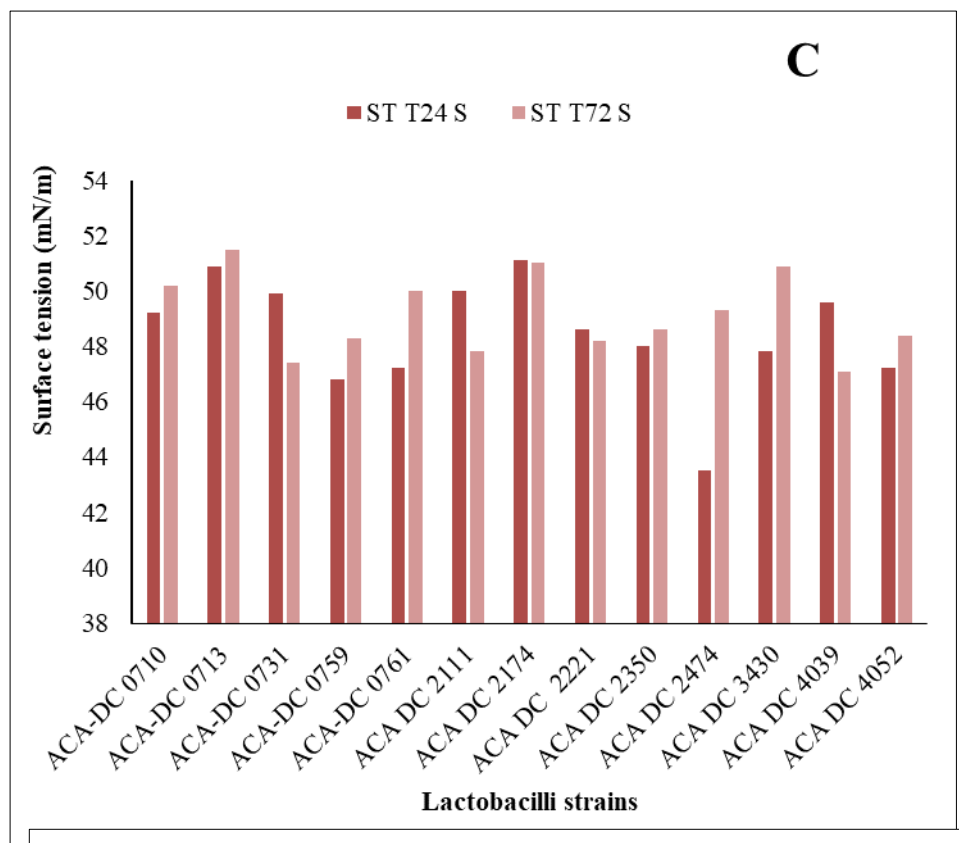
4.2.3.1 Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό ζύμωσης

Τα Γραφήματα 6 και 7 παρουσιάζουν τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρωση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Το στέλεχος με την μικρότερη τιμή επιφανειακής τάσης είναι το LQC 824 με 44 mN/m με μικρή διαφορά από το CECT 278

(44,3 mN/m) το οποίο σύμφωνα με το Γράφημα 5 είχε αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Αντίστοιχα, μετά από 72 ώρες το E108 με 42,2 mN/m το οποίο είχε σχετικά υψηλή κατανάλωση λακτόζης (Γράφημα 4) αλλά χαμηλή παραγωγή βιομάζας (Γράφημα 5). Από την άλλη πλευρά το στέλεχος με τη μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το ACA-DC 2174 με 51,1 mN/m ενώ για τις 72 ώρες το ACA-DC 0713 με 51,5 mN/m.



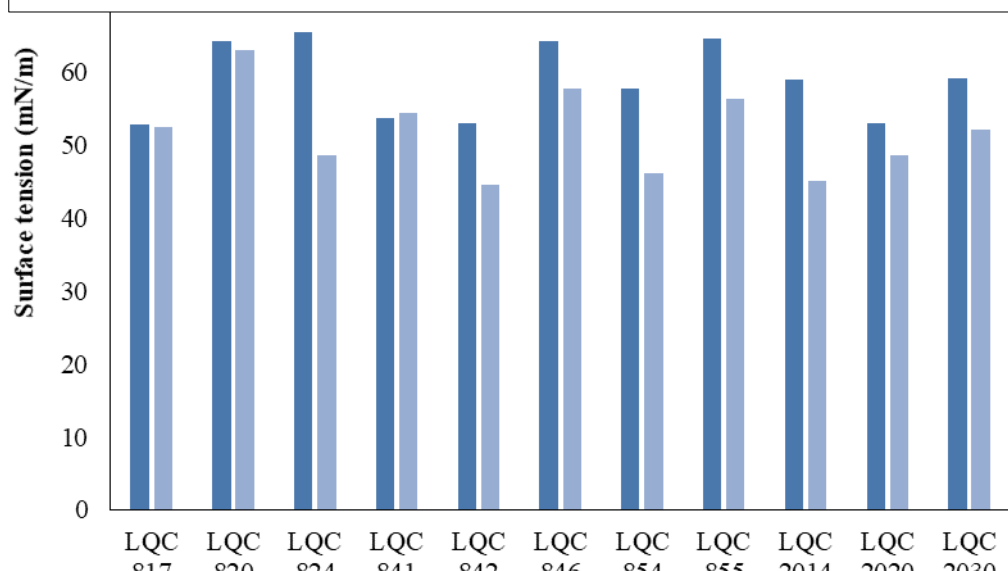
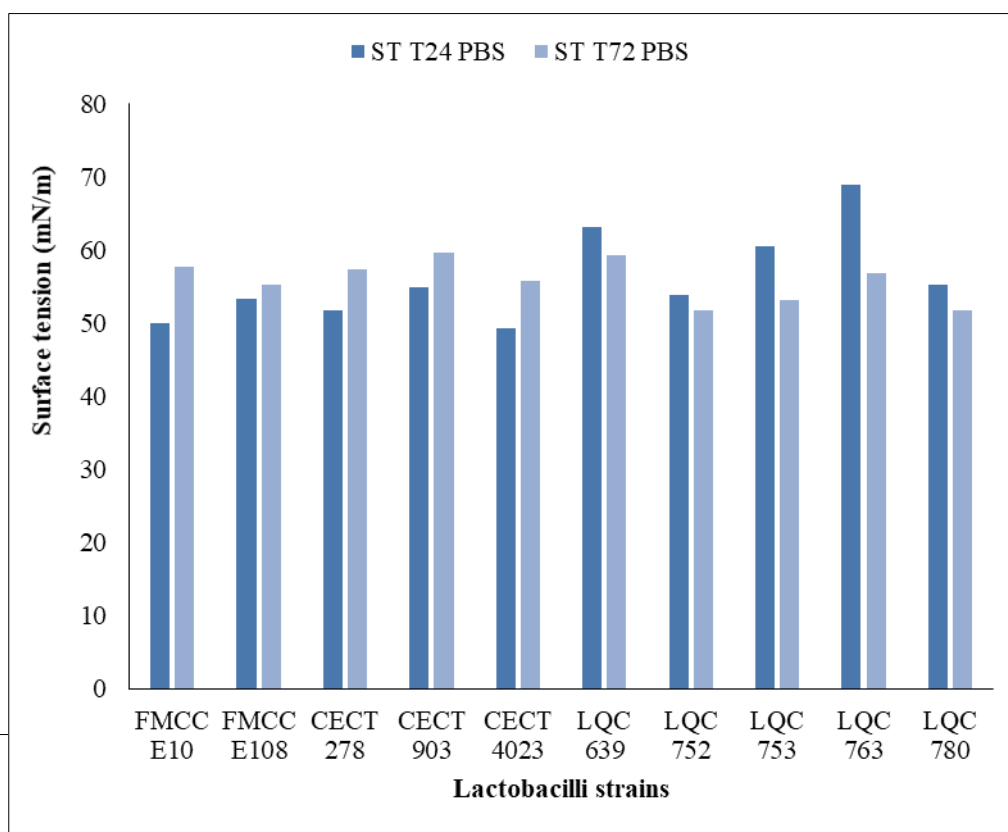
Γράφημα 6: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

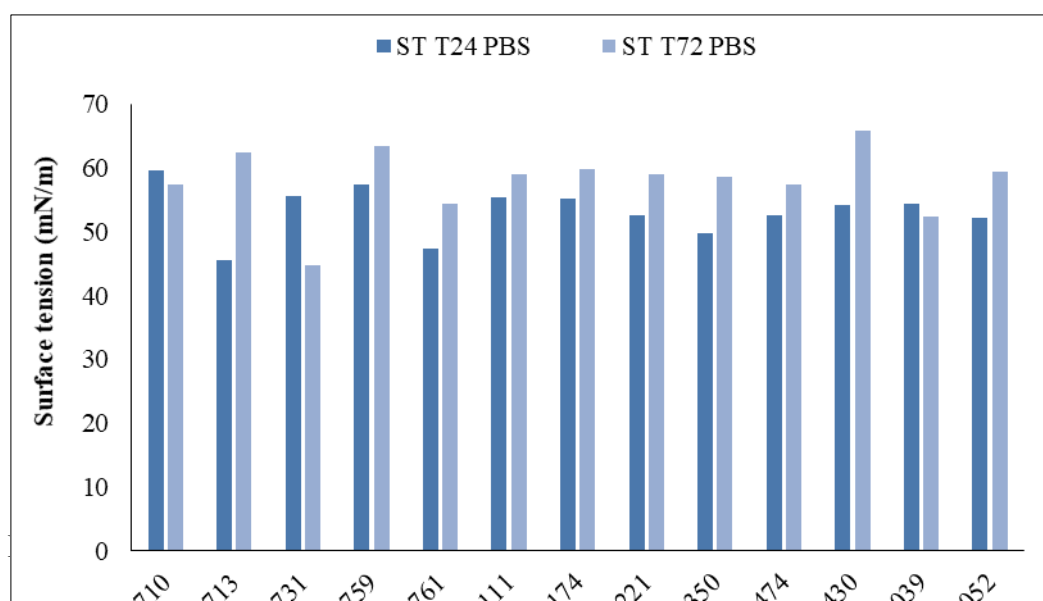
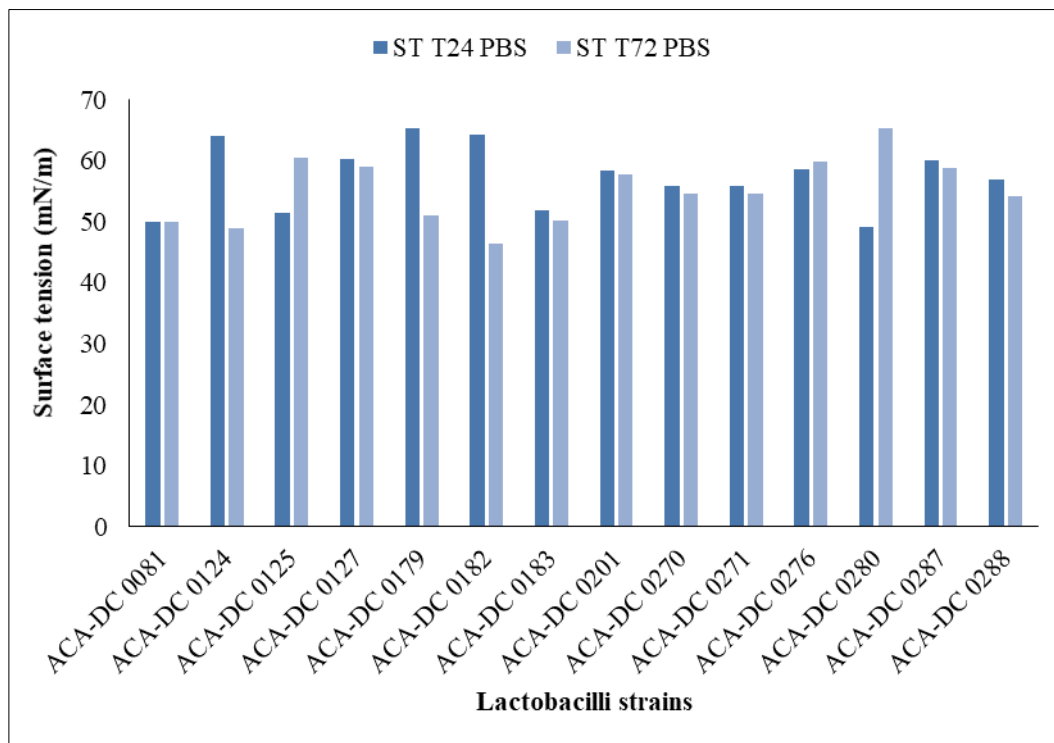


Γράφημα 7: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

4.2.3.2 Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

Τα Γραφήματα 8 και 9 παρουσιάζουν τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Όσον αφορά στα εκχυλίσματα PBS και σύμφωνα με το Γράφημα 7, πάνω από το 50% των στελεχών φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης μετά τις 72 ώρες ζύμωσης, με την επιφανειακή τάση να αυξάνεται μετά τις 24 ώρες στην πλειονότητα των στελεχών. Το στέλεχος με την μικρότερη επιφανειακή τάση για τις 24 ώρες είναι το ACA-DC 0280 με 49,1 mN/m και για τις 72 είναι το LQC 842 με 44,5 mN/m. Το στέλεχος με την μεγαλύτερη επιφανειακή τάση για τις 24 ώρες είναι το LQC 763 με 68,9 mN/m και για τις 72 είναι το ACA-DC 3430 με 65,8 mN/m.

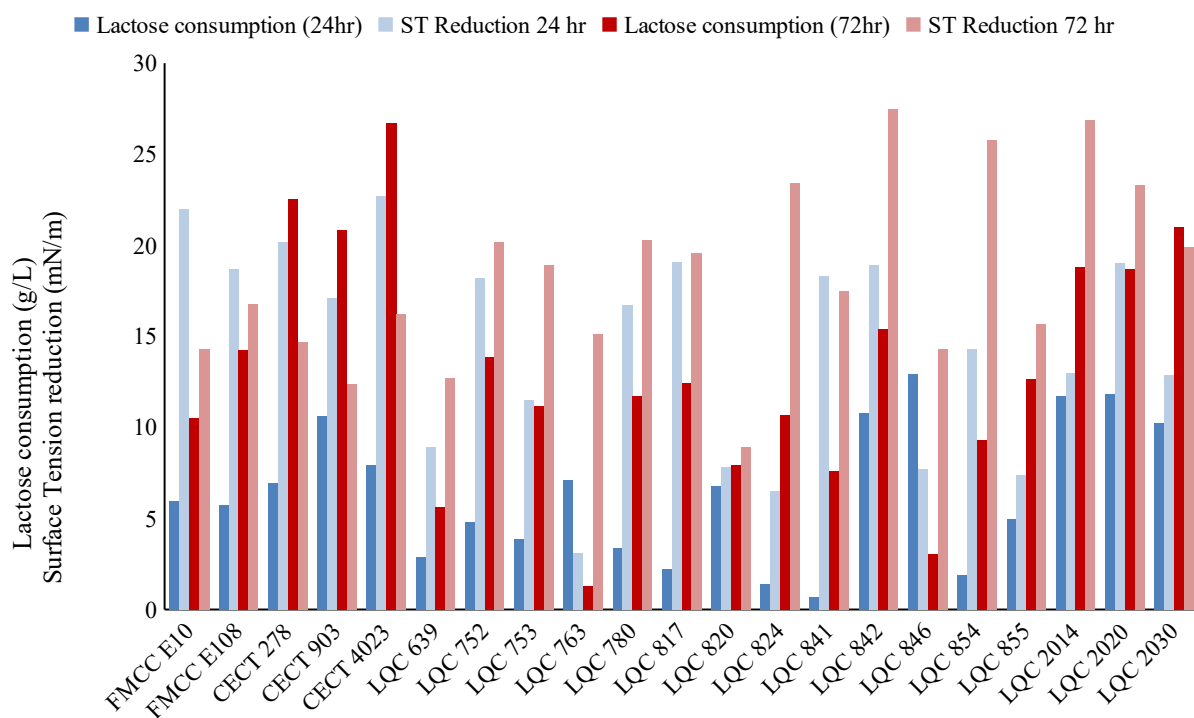


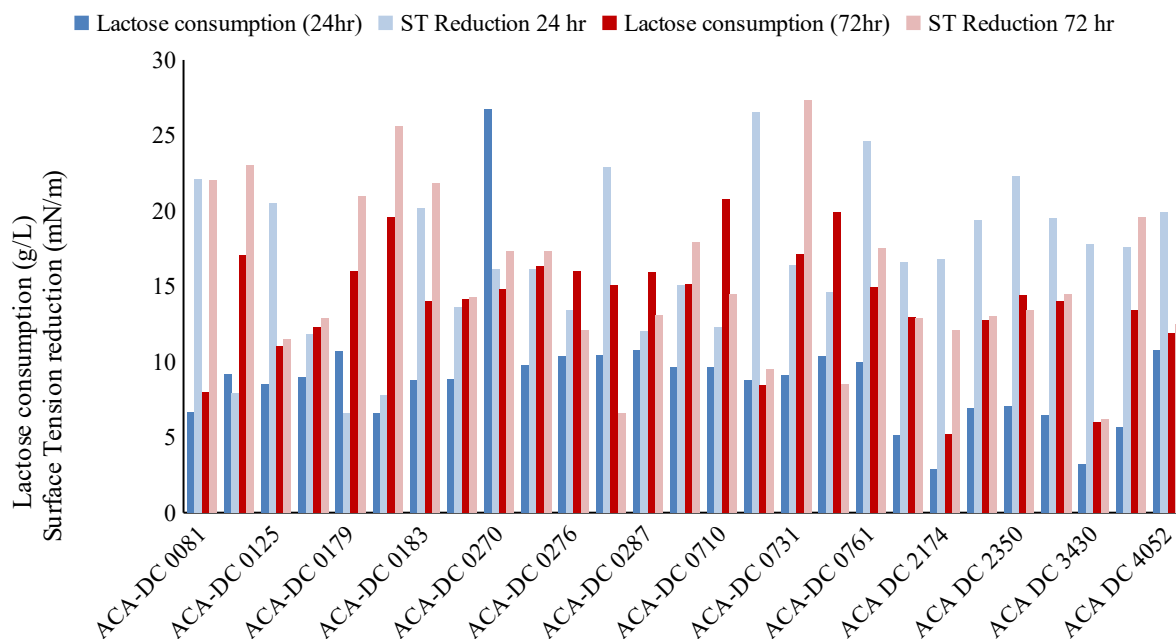


4.2.3.3 Συσχέτιση κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια με την μείωση της επιφανειακής τάσης αυτών

Στο Γράφημα 10 παρουσιάζεται ο συνδυασμός του Γραφήματος 4 με την μέτρηση της μείωσης της επιφανειακής τάσης για τα διάφορα στελέχη. Το στέλεχος ACA-DC 0270 που εμφανίζει την υψηλότερη κατανάλωση λακτόζης στις 24 ώρες ζύμωσης εμφανίζει μια μέση μείωση της επιφανειακής τάσης. Επιπλέον, το στέλεχος CECT 4023 που παρουσιάζει την υψηλότερη κατανάλωση λακτόζης στις 72 ώρες παρουσιάζει μια μέση μείωση της επιφανειακής τάσης. Το στέλεχος LQC 841 έχει την χαμηλότερη κατανάλωση λακτόζης στις 24 ώρες και η μείωση της επιφανειακής του τάσης είναι χαμηλή. Τέλος, το στέλεχος LQC 763 που εμφανίζει τη χαμηλότερη κατανάλωση λακτόζης στις 72 ώρες, παρουσιάζει υψηλή τιμή μείωσης επιφανειακής τάσης στην ίδια ώρα. Με λίγα λόγια, τα στελέχη με υψηλή κατανάλωση λακτόζης εμφανίζουν σχετικά μικρή μείωση επιφανειακής τάσης και το αντίστροφο.

A



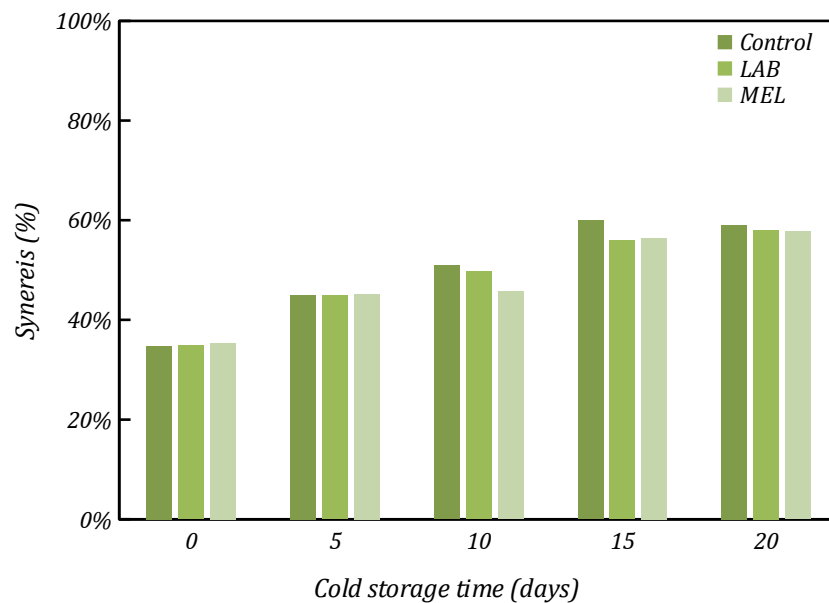


Γράφημα 10: Κατανάλωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος και μέτρηση της μείωσης της επιφανειακής τάσης σε 24 ώρες και 72 ώρες ζύμωσης.

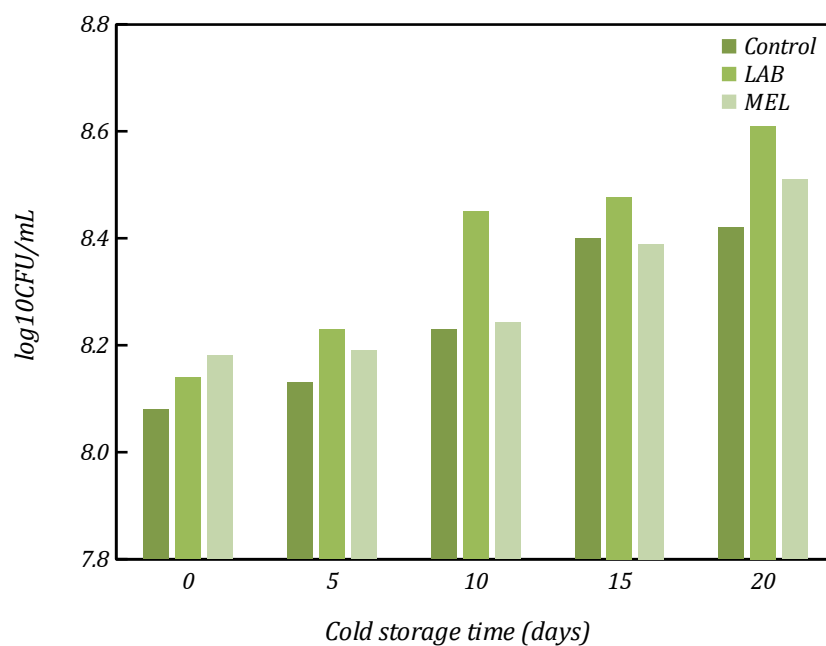
4.3 Αξιολόγηση των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών σε εφαρμογή σε τρόφιμο

Από τη μελέτη επιλογής των γαλακτικών βακτηρίων, το στέλεχος ACA-DC 183 το οποίο παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα όσον αφορά στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Οι βιοεπιφανειοδραστικές εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα και λυοφιλώθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν σε στερεή μορφή για την παραγωγή ξινογάλακτος. Ο στόχος της προσθήκης των βιοεπιφανειοδραστικών ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση στο ποσοστό συναίρεσης και στο μικροβιακό πληθυσμό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι γάλακτος, δηλαδή πλήρες και χαμηλών λιπαρών. Για σύγκριση, χρησιμοποιήθηκε και βιοεπιφανειοδραστική που παράγεται από στέλεχος ζύμης και παρουσιάζει διαφορετική χημική δομή, καθώς επίσης και ζύμωση χωρίς την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικής.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό γάλα, πλήρες και χαμηλών λιπαρών και τα αποτελέσματα αναφορικά με τις φυσικοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα.



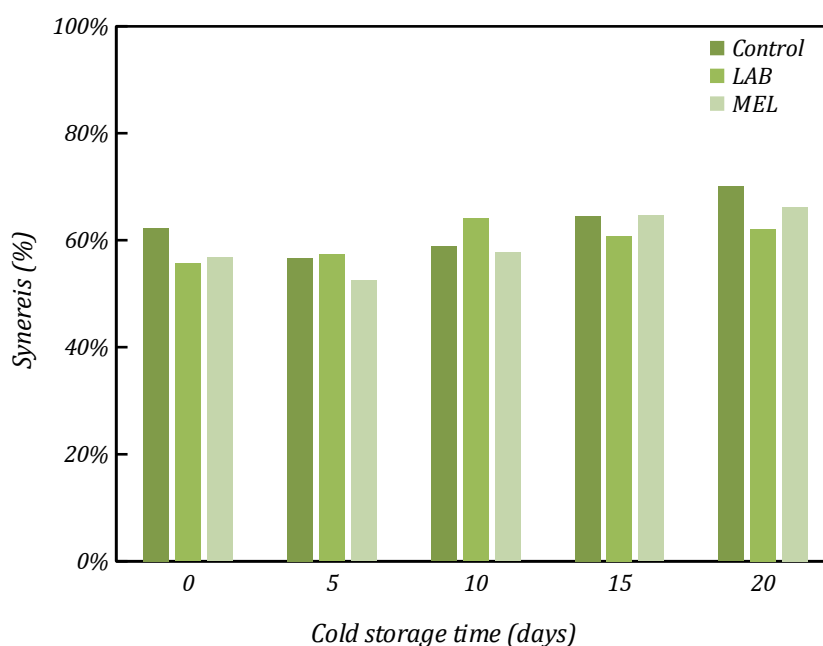
Γράφημα 11: Μεταβολή του ποσοστού συναίρεσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ξινόγαλα από πλήρες αγελαδινό γάλα με το στέλεχος ACA-DC 183 (control: δείγμα ελέγχου, LAB: δείγμα με προσθήκη γαλακτικών BS; MEL: δείγμα με προσθήκη BS από ζύμη)



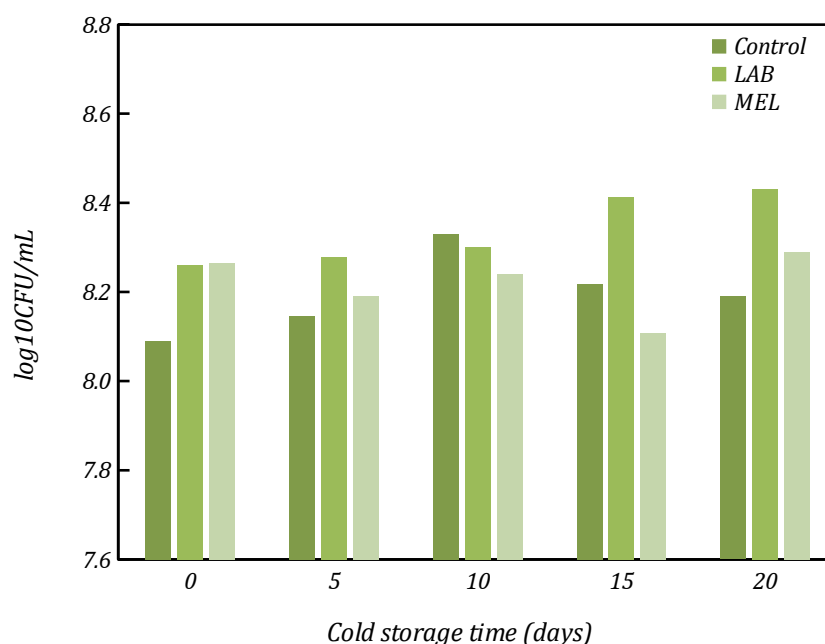
Γράφημα 12: Μεταβολή του ποσοστού συναίρεσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ξινόγαλα από πλήρες αγελαδινό γάλα με το στέλεχος ACA-DC 183 (control: δείγμα ελέγχου, LAB: δείγμα με προσθήκη γαλακτικών BS; MEL: δείγμα με προσθήκη BS από ζύμη)

Όσον αφορά στο ποσοστό της συναίρεσης, από το Γράφημα 10, φαίνεται ότι η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών έδρασε θετικά καθώς κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, το δείγμα ελέγχου χωρίς την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό συναίρεσης που αντιστοιχεί σε μεγαλύτερο διαχωρισμό του ορού γάλακτος. Αντίστοιχα, η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών παρουσίασε θετική επίδραση και στον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η προσθήκη των LAB BS, παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση σε σύγκριση με τα MEL.

Σε επόμενο στάδιο, το γάλα πλήρες λιπαρών αντικαταστάθηκε από γάλα χαμηλών λιπαρών προκειμένου να συγκριθεί κυρίως όσον αφορά στο ποσοστό συναίρεσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 13 ενώ στο Γράφημα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μικροβιακό πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων.



Γράφημα 13: Μεταβολή του ποσοστού συναίρεσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ξινόγαλα από αγελαδινό γάλα χαμηλών λιπαρών με το στέλεχος ACA-DC 183 (control: δείγμα ελέγχου, LAB: δείγμα με προσθήκη γαλακτικών BS; MEL: δείγμα με προσθήκη BS από ζύμη)



Γράφημα 14: Μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού των γαλακτοβάκιλλων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ξινόγαλα από αγελαδινό γάλα χαμηλών λιπαρών με το στέλεχος ACA-DC 183 (control: δείγμα ελέγχου, LAB: δείγμα με προσθήκη γαλακτικών BS; MEL: δείγμα με προσθήκη BS από ζύμη)

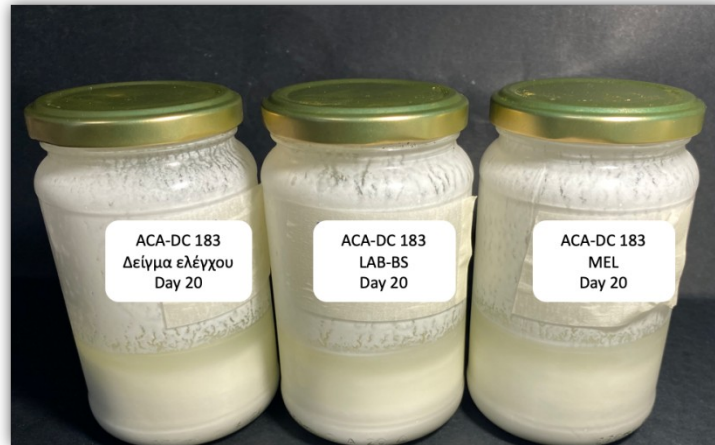
Συγκρίνοντας το Γράφημα 11 με το Γράφημα 13 (μεταβολή του ποσοστού συναίρεσης), παρατηρείται ότι η εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών δε συνέβαλε στη βελτίωση της συναίρεσης στο γάλα χαμηλών λιπαρών σε σύγκριση με το πλήρες. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι τα ποσοστά συναίρεσης είναι υψηλότερα (περί το 60-70% κατά την αποθήκευση), η προσθήκη των LAB BS και στην περίπτωση αυτή οδήγησε σε χαμηλότερα ποσοστά (60%) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου και τα MEL (64%). Η παρατήρηση αυτή ενδέχεται να σχετίζεται με τον ενδογενή ρόλο των βιοεπιφανειοδραστικών στα γαλακτικά βακτήρια, ο οποίος σχετίζεται με την αφομοίωση των συστατικών του υποστρώματος.

Αναφορικά με το Γράφημα 12, ο μικροβιακός πληθυσμός παρουσιάζεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το πλήρες αγελαδινό γάλα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ωστόσο, και στην περίπτωση αυτή η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών από τα γαλακτικά βακτήρια συνέβαλε θετικά στη διατήρηση και ανάπτυξη των γαλακτικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος συσχετίζεται και με την ολική ογκομετρούμενη οξύτητα, η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, εκφραζόμενη ως %γαλακτικού οξέος.

Πίνακας 6 Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ξινόγαλα με γάλα πλήρες και χαμηλών λιπαρών με το στέλεχος ACA-DC 183

<i>Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα (% γαλακτικού οξέος/100 g προϊόντος)</i>			
<i>Αγελαδινό γάλα πλήρες λιπαρών</i>			
Day	Control	LAB	MEL
0	0,359	0,360	0,287
5	0,413	0,423	0,333
10	0,403	0,483	0,396
15	0,394	0,448	0,403
20	0,430	0,467	0,456
<i>Αγελαδινό γάλα χαμηλών λιπαρών</i>			
0	0,460	0,619	0,523
5	0,596	0,690	0,605
10	0,659	0,662	0,615
15	0,663	0,689	0,632
20	0,710	0,712	0,642

Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται τα διαφορετικά προϊόντα που παράχθηκαν με το στέλεχος ACA-DC 183 και πλήρες αγελαδινό γάλα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (4°C, 20 ημέρες), όπου και είναι εμφανής η συναίρεση και ο διαχωρισμός του ορού γάλακτος.



Εικόνα 18: Παραγωγή ξινογάλακτος με το στέλεχος ACA-DC 183 (Day 20)



Εικόνα 19 Παραγωγή ξινογάλακτος με το στέλεχος ACA-DC 183 χρησιμοποιώντας αγελαδινό γάλα χαμηλών λιπαρών (Day 15)

Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών σε τρόφιμα, ενώ ακόμα πιο σπάνιες είναι αυτές που αφορούν στις βιοεπιφανειοδραστικές από γαλακτικά βακτήρια. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι προηγούμενες μελέτες εντοπίζονται στην εφαρμογή σε προϊόντα αρτοποιίας ή βουτήματα (λ.χ. cookies, muffins) ή ως επικάλυψη σε κρέας με βάση την αντιμικροβιακή τους δράση (Campos et al., 2013; Inès and Dhouha, 2015; Beatriz G. Ribeiro et al., 2020).

Επιπρόσθετα, για το ξινόγαλο, δεν προστέθηκε κανένα βελτιωτικό υφής ή σταθεροποιητής ώστε να μελετηθεί αποκλειστικά το αποτέλεσμα από τη βιοεπιφανειοδραστική, σε αντίθεση με άλλες μελέτες όπου η μήτρα του τροφίμου αποτελεί

συνήθως ένα αρκετά σύνθετο σύστημα (π.χ. salad dressing, milk bread) συνεπώς ενδέχεται να αναπτύσσονται διάφορες αλληλεπιδράσεις. Συμπερασματικά, η προσθήκη φάνηκε να επιδρά στο μικροβιακό πληθυσμό, ωστός χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την ακριβή ερμηνεία και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που απορρέουν από την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης και σε τυρόγαλα είναι τα εξής:

- Περίπου το 50% των στελεχών είχαν χαμηλότερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες ζύμωσης συγκριτικά με τις 72.
- Τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλα σημείωσαν χαμηλότερη επιφανειακή τάση από τα αντίστοιχα στο M2.
- Το στέλεχος E10 (37,7 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 24 ώρες ζύμωσης στα εκχυλίσματα PBS στο M2
- Το στέλεχος LQC 713 (45,5 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 24 ώρες στα εκχυλίσματα PBS στο τυρόγαλα
- Το στέλεχος E108 (50 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 72 ώρες ζύμωσης στα εκχυλίσματα PBS στο M2
- Το στέλεχος LQC 842 (44,5 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 72 ώρες ζύμωσης στα εκχυλίσματα PBS στο τυρόγαλα
- Η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών στο οξύγαλα παρουσίασε επίδραση στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού αλλά δε βελτίωσε το ποσοστό συναίρεσης στην περίπτωση του γάλακτος χαμηλών λιπαρών.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adamberg, K., Kask, S., Laht, T. M., & Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00537-8)

Ahmadi-Ashtiani, H.-R.; Baldisserotto, A.; Cesa, E.; Manfredini, S.; Sedghi Zadeh, H.; Ghafori Gorab, M.; Khanahmadi, M.; Zakizadeh, S.; Buso, P.; Vertuani, S. Microbial Biosurfactants as Key Multifunctional Ingredients for Sustainable Cosmetics. *Cosmetics* 2020, 7, 46. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020046>

Alkan, Zerrin; Erginkaya, Zerrin; Konuray, Gözde; & Turhan, Emel Ünal (2019) "Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium," *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: Vol. 43: No. 5, Article 14. <https://doi.org/10.3906/vet-1903-48>

Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., & Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource technology*, 213, 262-269.

Araújo SCS, Silva-Portela RCB, de Lima DC, et al. MBSP1: a biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation. *Sci Rep*. 2020;10:1340. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58330-x>.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (pp. 1e66). New York: Marcel Dekker

Bakhshi N, Soleimanian-Zada S, Sheikh-Zeinoddin M. Dynamic surface tension measurement for the screening of biosurfactants produced by *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896. *Enzyme Microbiol Technol*. 2017;101:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.010>.

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.

Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., Nyayanit, N. V, 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production . Front. Microbiol.

Bhange K, Chaturvedi V, Bhatt R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. Biotechnol Rep (Amst). 2016 Apr 13;10:94-104. doi: 10.1016/j.btre.2016.03.007. PMID: 28352529; PMCID: PMC5040875.

Bhawsar, S.D., Path, S.D., Chopade, B.A., 2011. Antimicrobial Activity of Purified Emulsifier of *Acinetobacter* Genospecies Isolated From Rhizosphere of Wheat. Agric. Sci. Dig. 31, 239–246.

Bjerk, T.R.; Severino, P.; Jain, S.; Marques, C.; Silva, A.M.; Pashirova, T.; Souto, E.B. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. *Bioengineering* 2021, 8, 115. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080115>

Calabrese, I., Gelardi, G., Merli, M., Liveri, M.L.T., Sciascia, L., 2017. Clay-biosurfactant materials as functional drug delivery systems: Slowing down effect in the in vitro release of cinnamic acid. *Appl. Clay Sci.* 135, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.10.039> .

Campos, J. M., Stamford, T. L., & Sarubbo, L. A. (2014). Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 3234-3252.

Campos, J. M., Stamford, T. L., Rufino, R. D., Luna, J. M., Stamford, T. C. M., & Sarubbo, L. A. (2015). Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, 2, 1164-1170.

Campos, J. M., Stamford, T. L. M., & Sarubbo, L. A. (2019). Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation*, 30(4), 313-324.

Castellano, P., González, C., Carduza, F., & Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science*, 85, 394-401

Carvalho, F.; Prazeres, A.R.; Rivas, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 2013, 445-446, 385–396.

Costa, S. G., Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., Nitschke, M., & Contiero, J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1063-1072.

Deak, N. A., & Johnson, L. A. (2006). Functional properties of protein ingredients prepared from high-sucrose/low-stachyose soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(9), 811-818.

FAO., World Health Organization, World Health Organization. Food Safety Programme, World Health Organisation Staff, Food Safety Programme, Joint FAO/WHO Consultation on Health Implications of Acrylamide in Food, & WHO. (2002). *Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002*. World Health Organization.

Faria, N. T., Marques, S., Fonseca, C., & Ferreira, F. C. (2015). Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048T. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 58–65.

Fei, D., Zhou, G. W., Yu, Z. Q., Gang, H. Z., Liu, J. F., Yang, S. Z., ... & Mu, B. Z. (2020). Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 109-118.

Fernández-Peña, L., Guzmán, E., Leonforte, F., Serrano-Pueyo, A., Regulski, K., Tournier-Couturier, L., ... & Luengo, G. S. (2020). Effect of molecular structure of eco-friendly glycolipid biosurfactants on the adsorption of hair-care conditioning polymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110578.

Garti, N., Clement, V., Leser, M., Aserin, A., & Fanun, M. (1999). Sucrose ester microemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 80(2-3), 253-296.

Geetha, S.J., Banat, I.M., Joshi, S.J., 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>.

Genetic Engineering and Biotechnology Journal, Vol. 2011: GEBJ-29, αποδεκτή έκδοση, 7 Νοεμβρίου 2011 (Τύπος χειρόγραφου: Κριτική) <http://astonjournals.com/gebj>

Gerson, D. F., & JE, Z. (1979). Microbial biosurfactants.

Gudiña, E. J., & Rodrigues, L. R. (2019). Research and production of biosurfactants for the food industry. *Bioprocessing for Biomolecules Production*, 125-143.

Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2011) Biosurfactant-Producing Lactobacilli: Screening, Production Profiles, and Effect of Medium Composition. *Appl Environ Soil Sci* 2011:1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/201254>

Hajfarajollah, H., Eslami, P., Mokhtarani, K., Noghabi, A., 2018. Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 65, (6) 768–783 DOI: 10.1002/bab.1686.

Henkel Marius, Rudolf Hausmann, Chapter 2 - Diversity and Classification of Microbial Surfactants, Douglas G. Hayes, Daniel K.Y. Solaiman, Richard D. Ashby, *Biobased Surfactants* (Second Edition), AOCS Press, 2019, Pages 41-63, ISBN 9780128127056, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00002-2>.

Kachrimanidou V, Papadaki A, Lappa I, et al (2021) Biosurfactant Production from Lactobacilli: An Insight on the Interpretation of Prevailing Assessment Methods. *Appl Biochem Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03686-7>

Karnwal, A., 2021. Biosurfactant Production Using Bioreactors from Industrial Byproducts. *Biosurfactants a Sustain. Futur.* 59–78. <https://doi.org/10.1002/9781119671022.ch3>

Klotz S, Kuenz A, Prüße U (2017) Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chem* 19:4633–4641. <https://doi.org/10.1039/c7gc01796k>

Kiran, G.S., Thomas, T.A., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Bioresource Technology Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced

by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour. Technol.* 101, 2389–2396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.023>.

Lappa, I.K.; Papadaki, A.; Kachrimanidou, V.; Terpou, A.; Koulougliotis, D.; Eriotou, E.; Kopsahelis, N. Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. *Foods* 2019, 8, 347. <https://doi.org/10.3390/foods8080347>

Layman, P. L. (1985). Industrial surfactants set for strong growth. *Chem Eng News*, 23, 23-48.

Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Intasit, R., Maneerat, S., & Saimmai, A. (2020). Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 148, 104911.

Liu, S., Han, Y., & Zhou, Z., 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643-651.)

Makkar, R., & Cameotra, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 428-434.

Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology*, 30(11), 558-565.

Markande, A.R., Nerurkar, A.S., 2019. Microbial Bioemulsifiers & Their Roles in the Natural Environment. In: Katiyar, V., Joshi, A. (Eds.), *MICROBIAL RESEARCH : An Overview*. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 1–21.

Markande, A.R., Patel, D., Varjani, S., 2021. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology* 330, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>

Meena KR, Kanwar SS., (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int.* 2015;2015:473050. doi: 10.1155/2015/473050. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25632392; PMCID: PMC4303012.

Misailidis, Nikiforos & Petrides, Demetri. (2020). Sophorolipids (Biosurfactants) Production via Fermentation - Process Modeling and Techno-Economic Assessment (TEA) using SuperPro Designer.

Mohanty, S.S., Koul, Y., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H.H., Chang, J.S., Wong, J.W.C., Bui, X.T., 2021. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microb. Cell Fact.* 20, 120. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>

Moldes, A. B., Torrado, A. M., Barral, M. T., & Domínguez, J. M. (2007). Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4481–4486. <https://doi.org/10.1021/jf063075g>

Mulligan, C. B., & Shleifer, A. (2005). The Extent of the Market and the Supply of Regulation. *The Quarterly Journal of Economics*, 120(4), 1445-1473.

Neu, T.R., 1996. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. *Microbiol. Rev.* 60, 151–166.

Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.

Nitschke, M., & Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), 631-638.

Noah, K. S., Bruhn, D. F., & Bala, G. A. (2005). Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 465-473). Humana Press.

Oliva, A., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2020). Effect of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidylserine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110576.

Patel S, Homaei A, Patil S, Daverey A. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:27–37.

Perfumo A, Rudden M, Marchant R, Banat IM. Biodiversity of Biosurfactants and Roles in Enhancing the (Bio)availability of Hydrophobic Substrates. T. Krell (ed.), *Cellular Ecophysiology of Microbe, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiol.* 2017. https://10.1007/978-3-319-20796-4_35-1)

Perfumo, A., Rudden, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. *Cellular ecophysiology of microbe: hydrocarbon and lipid interactions. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer: Cham*, 75-103.

Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18(6), 1277-1281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.10.008>

Ramírez IM, Tsaousi K, Rudden M, Marchant R, Alameda EJ, Román MG, et al. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour Technol.* 2015;198:231–6.

Rebello, S., Anoopkumar, A. N., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., & Aneesh, E. M. (2020). Comparative life-cycle analysis of synthetic detergents and biosurfactants—an overview. *Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts*, 511-521.

Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., Yu, J., Yi, H., Ye, S., Deng, R., 2018. Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Sci. Total Environ.* 610–611, 1154–1163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089>.

Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.

Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, Oliveira R (2006) Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochem Eng J* 28:109–116. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.06.001>

Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.

- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2007). Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 81(2), 358-370.
- Rodrigues, L., Van der Mei, H. C., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4408-4410.
- Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005-1016.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(1), 1-14.
- Sandeep, L., Sinha, R., 2017. Biosurfactant: Pharmaceutical Perspective. *J. Anal Pharm. Res.* 4, 19–21. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.04.00105>.
- Sana, S., Datta, S., Biswas, D., Auddy, B., Gupta, M., Chattopadhyay, H., 2018. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. *Wound Med.* 23, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.09.006>.
- Santos, D.K.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Satpute, Surekha K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 28, 436–450. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>

Satpute, S.K., Plaza, G.A., Banpurkar, A.G., 2017. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. *Manag. Syst. Prod. Eng.* 25, 46–54. <https://doi.org/10.1515/mspe-2017-0007>

Sharma, D. (2016). *Biosurfactants in food*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.

Sharma, D., Kalita, S., Duarah, K., 2017. Isolation and Characterization of Bio Surfactant Producing Micro Organisms and to Determine i t ' s in Vitro Antagonistic Activity against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Curr. Trends Sci. Technol.* 7, 20355–20367.

Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S. (2016). *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Cham: Springer.

Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Bansal, A., & Procha, S. (2014). Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *The Scientific World Journal*, 2014.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. d. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D. D., Pandey, A., and Thomaz-Soccol, V., 2010 *Food Technol. Biotechnol.* 48, 413–434.

Tan YN, Li Q. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. *Microb Cell Fact.* 2018;17:1–13

Turkmen, N. (2017). The nutritional value and health benefits of goat milk components. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (pp. 441-449). Academic Press.

United Nations Environment Programme. Food waste index. 2021. <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-wasteindex-report-2021>.

Van der Vegt, W., Van der Mei, H. C., Noordmans, J., & Busscher, H. J. (1991). Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *35*(6), 766-770.

Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 24(6), 604-620.

Vasiljevic, T., and Shah, N. P. (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 7, July 2008, Pages 714-728.

Martine M.C.Velraeds,Henny C.van der Mei, Gregor Reid, Henk J.Busscher, (1996). Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 8, Issues 1–2, 10 December 1996, Pages 51-6.

Vecino, X., Devesa-Rey, R., Cruz, J.M., Moldes, A.B., 2013. Evaluation of biosurfactant obtained from *Lactobacillus pentosus* as foaming agent in froth flotation. *J. Environ. Manage.* 128, 655–660.

Velraeds MMC, Van Der Mei HC, Reid G, Busscher HJ (1996) Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 8:51–61. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(96\)01297-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(96)01297-0)

Williams, W., & Trindade, M. (2017). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants. In *Functional metagenomics: tools and applications* (pp. 95-117). Springer, Cham.

Wittgens, A., Santiago-Schuebel, B., Henkel, M. et al. Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*—a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 1229–1239 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8702-x>

Wood, B., and Holzapfel, W. (1995) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer, New York, NY.

Zanotto AW, Valério A, de Andrade CJ, Pastore GM. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103: 8647-8656. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10123-7>.

Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L. et al. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 2749–2764 (2020).
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>

[360 Research Reports – Worldwide Market Research Report, Analysis & Consulting.](https://www.360researchreports.com/globalbiosurfactants-market-17043331)

Διαθέσιμο στο <<https://www.360researchreports.com/globalbiosurfactants-market-17043331>> Προσβαση 05/01/2023.

Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης, (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος: Ζυμούμενα προϊόντα, Παγωτό, Κρέμα-Βούτυρο. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη

Ριτζούλης, Χ. Φυτικοχημεία τροφίμων, 2011, Εκδόσεις Τζιόλα. Θεσσαλονίκη