

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΑΛΛΑΝΤΙΚΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
ΚΥΡΙΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΪΔΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Φεβρουάριος 2021

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΑΛΛΑΝΤΙΚΑ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαος Κοψαχείλης

Αικατερίνη Παπαδάκη

Βασιλική Καχριμανίδου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νίκο Κοψαχείλη Αναπληρωτή καθηγητή, που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του, να εργαστώ στο εργαστήριο του πάνω στο πείραμα της παρούσας μελέτης που μου ανέθεσε. Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι στην Δρ. Ιλιάδα Λάππα, η συμβολή της οποίας ήταν καταλυτική, τόσο στο στάδιο του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της μελέτης. Με τις συμβουλές και τις υποδείξεις της συντέλεσε ώστε να ανταπεξέλθω στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Επίσης, ανεκτίμητη ήταν και η ψυχική υποστήριξη και βοήθεια των φίλων μου κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου Αντωνία και Νίκο οι οποίοι πάντα με στηρίζουν και είναι δίπλα μου καθώς και για την βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τυρόγαλα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παραπροϊόντα της βιομηχανίας γάλακτος. Η μεγάλης κλίμακας παραγωγή του, οδηγεί ακόμα και σήμερα τις τυροκομικές μονάδες σε ανεξέλεγκτη απόρριψή του σε υδάτινους αποδέκτες με αποτέλεσμα την πρόκληση ευτροφισμού στα υδάτινα αλλά και μη οικοσυστήματα. Η αυστηροποίηση όμως της σχετικής νομοθεσίας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα επιστημονικών ερευνών, έχουν συμβάλει καταλυτικά στην αναστροφή της κατάστασης αυτής. Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια, γίνεται μια σημαντική προσπάθεια αξιοποίησης (αντί για απόρριψη) του τυρογάλακτος ως πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Στα πλαίσια αυτά, η συγκεκριμένη μελέτη εστίασε στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος, ως οικονομικό υπόστρωμα, για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Είναι γνωστό πως η δημιουργία και η χρησιμοποίηση συνθετικών μέσων για παραγωγή μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα είναι δαπανηρή. Το τυρόγαλα περιέχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρου (λακτόζης), καθιστώντας το ικανό να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα από τα μικροβιακά στελέχη. Επιπλέον, εκτός από την μείωση του βιομηχανικού κόστους, είτε αναφορικά με τις διαδικασίες απορρύπανσης είτε ως προς την προμήθεια των συνθετικών υποστρωμάτων, επιτυγχάνεται και μια φιλική περιβαλλοντικά επιλογή αφού αξιοποιείται ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας με υψηλό οργανικό φορτίο.

Ως εκ τούτου στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη καθώς και η αξιολόγηση της βιωσιμότητας και της ζυμωτικής ικανότητας μικροοργανισμών με σκοπό τη δημιουργία ‘ready to use’ εναρκτήριων καλλιεργειών. Συγκεκριμένα στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές απομονώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και συγκεκριμένα τα είδη *Lb. plantarum* LQC 820, και *Lb. sakei* LQC 854. Αρχικά, μελετήθηκε η ανάπτυξη των δύο παραπάνω στελεχών σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης, ήτοι τους 30 και 37 °C σε συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης, και έπειτα στις ίδιες θερμοκρασίες αξιολογήθηκε η ικανότητα τους ως προς τη ζύμωση της λακτόζης του τυρογάλακτος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το στέλεχος *Lb. plantarum* LQC 820 παρουσίασε καλύτερη ζυμωτική ικανότητα και στις δύο θερμοκρασίες. Επίσης ο μικροοργανισμός έδωσε τις πιο επιθυμητές αποδόσεις ως προς τη βιομάζα στους 37 °C

Κατόπιν η βιομάζα που συλλέχθηκε λυοφιλιώθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4 °C για διάστημα 120 ημερών με σκοπό τη μελέτη βιωσιμότητας του στελέχους μετά τη διεργασία της ξήρανσης αλλά και της ζυμωτικής του ικανότητας κατά τη χρονική διάρκεια της συντήρησης, τα οποία κρίθηκαν άκρως ικανοποιητικά με πληθυσμούς $>8 \log \text{ cfu/g}$.

ABSTRACT

Cheese whey is one of the most important by-products of the dairy industry entailing a substantial environmental impact. Currently, cheese whey deriving from the cheese factories/cheesemaking units is discharged uncontrollably in water recipients, resulting in eutrophication in aquatic and non-aquatic ecosystems. Nonetheless, European and National authorities have imposed severe legislations with respect to waste treatment after food manufacturing process. Therefore, research nowadays is focused on the valorisation of agro-industrial waste and by-products as raw materials to generate high value-added products. In this frame, this study focused on whey exploitation as an economical nutrient substrate for microorganisms growth, and more specifically lactic acid bacteria. The high cost of conventional synthetic media for large-scale production of microorganisms is well established.

However, cheese whey contains high sugar concentration (lactose), thus making it capable to be used as a carbon source by microbial entities. Also, besides the reduction of industrial cost, an environmentally friendly choice is achieved since an industrial by-product with a high organic load is further exploited within the general concept of bioeconomy.

Therefore, this study aimed to develop and evaluate the viability and fermentation capacity of microorganisms in order to create 'ready to use' starter cultures. More specifically, two different isolates of lactic acid bacteria were used, belonging to the genus *Lactobacillus* and particularly *Lb. plantarum* LQC 820, and *Lb. sakei* LQC 854. The growth for both strains was evaluated at two different growth temperatures, namely 30 and 37 °C on a synthetic lactose substrate. Moreover, at the same temperatures, the capacity on lactose fermentation was also assessed. The results showed that the strain *Lb. plantarum* LQC 820 presented better fermentative capacity at both temperatures. Also, this strain indicated better biomass yields at 37 °C. The collected biomass was then lyophilized and stored at 4 °C for 120 days. The viability of the strains was monitored after drying process and considered highly satisfactory with populations > 8 log cfu/g. In addition, lactose fermentation capacity was determined during the aforementioned storage period.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια	
1.1.1 Ταξινόμηση	2
1.1.2 Πηγές	4
1.1.3 Το γένος <i>Lactobacillus spp.</i> εναρκτήριες καλλιέργειες	15
1.2 Τυρόγαλα	
1.2.1 Σύσταση και τύποι τυρογάλακτος	24
1.2.2 Το τυρόγαλα ως απόβλητο	27
1.2.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος ως παραπροϊόν για τη βιομηχανία	28

Κεφάλαιο 2

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία δειγμάτων	33
2.2 Διαχείριση τυρογάλακτος	34
2.3 Ζυμώσεις λακτόζης	34
2.4 Προσδιορισμός λακτόζης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	35
2.5 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας	37
2.6 Λυοφιλίωση κυττάρων, αποθήκευση και μελέτη βιωσιμότητας	38
2.7 Μελέτη ζύμωσης τυρογάλακτος από λυοφιλιωμένες καλλιέργειες	40

Κεφάλαιο 3

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Κινητική ζύμωσης λακτόζης και παραγωγή βιομάζας οξυγαλακτικών βακτηρίων με πρώτη ύλη το τυρόγαλα	42
3.2 Λυοφιλίωση βιομάζας και μελέτη βιωσιμότητας	49
3.3 Δημιουργία και μελέτη 'Ready to use' εναρκτήριας καλλιέργειας	50

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

53

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γραφήματα

ΣΕΛΙΔΑ

Γράφημα 1. Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του <i>Lb. plantarum</i> 820 κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).....	43
Γράφημα 2. Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του <i>Lb. sakei</i> 854 κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).....	44
Γράφημα 3. Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του <i>Lb. plantarum</i> 820 κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).	45
Γράφημα 4. Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του <i>Lb. sakei</i> κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).	46
Γράφημα 5. Ραβδόγραμμα βιωσιμότητας των λυοφιλιωμένων κυττάρων του στελέχους <i>Lb. plantarum</i> 820 μετά από 120 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4 °C.....	49
Γράφημα 6. Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης λυοφιλιωμένων κυττάρων του <i>Lb. plantarum</i> 820 κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 37 °C.....	51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

1.1.1 Ταξινόμηση

Ο πρώτος τεχνικός ορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) έγινε από τον Orla-Jensen, ο οποίος και τα παρουσιάζει ως μη σπορογόνους θετικούς κατά gram κόκκους ή βάκιλλους, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ (Orla-Jensen S., 1919). Η ταξινόμηση αρχικά βασιζόταν στα μορφολογικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά. Στην πλειονότητα τους χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλοι μικροοργανισμοί παρότι πολλά είδη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και σε αρκετά υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτά τα κριτήρια ταξινόμησης οδήγησαν σε έναν πιο ευρύ ορισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων που περιλαμβάνει διαφορετικά γένη και είδη. Αρκετά αργότερα η πρόοδος στις μοριακές τεχνικές φυλογενετικής ταξινόμησης οδήγησε σε έναν πιο περίπλοκο χαρακτηρισμό τους (Klein et al., 1998; Holzapfel et al., 1997). Γενικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από χαμηλό περιεχόμενο σε GC βάσεις (<50 mol %), παρότι σε ορισμένα είδη έχει παρατηρηθεί ότι φτάνει μέχρι και τα 57 mol% (**Πίνακας 1.1**). Γενικότερα, είναι μικροοργανισμοί αρνητικοί στη δοκιμή της καταλάσης και στερούνται κυτοχρώματος. Στην πλειοψηφία τους θεωρούνται αναερόβια αλλά υπάρχει κ πληθώρα αερόαντοχων στελεχών καθώς επίσης και ανθεκτικών στα οξέα. Τα πιο γνωστά γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων που θεωρούνται συναφή με τα τρόφιμα είναι τα *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Oenococcus spp.*, *Tetragenococcus spp.*, *Carnobacterium spp.* και *Weissella spp.* Παρόλο που λέγεται ότι αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών έχει αποδειχτεί ότι όλα τα προαναφερθέντα γένη προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (Vandamme et al., 2014). Βάσει τελευταίων δημοσιεύσεων ως προς την ταξινόμησή τους, οι Lactobacillales περιλαμβάνουν 261 είδη προερχόμενα από 25 γένη και 26 φυλογενετικές ομάδες. Τα συγκεκριμένα είδη χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλή διαφοροποίηση σε φαινοτυπικό, οικολογικό και γονοτυπικό επίπεδο (Zheng J et al., 2020)

Η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικά γένη βασίζεται σε μεγάλο βαθμό, εκτός από τη μορφολογία, και στην ανάπτυξη τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στις μεταβολικές τους ιδιότητες. Αυτές αφορούν κυρίως τον τρόπο ζύμωσης της γλυκόζης, την παραγωγή γαλακτικού οξέος ή και την ικανότητα να

αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Οι αλληλεπιδράσεις τους στα τρόφιμα αποτέλεσε μεγάλο πεδίο έρευνας του 19^{ου} αιώνα και κορυφώθηκε το 1857 με την αναφορά του Louis Paster στη γαλακτική ζύμωση. Έκτοτε η έννοια των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως μια από τις σημαντικότερες ομάδες ζυμωτικών μικροοργανισμών συνδέθηκε με πολλές κατηγορίες τροφίμων, οδηγώντας στη χρησιμοποίηση τους ως εναρκτηρίες καλλιέργειες στην παρασκευή προϊόντων και στη βιομηχανοποίηση των ζυμώσεων στα τρόφιμα.

Πίνακας 1.1 Χαρακτηριστικά των κύριων γενών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Γένος	Σχήμα κυττάρων και διάταξη	Μεταβολισμός/Ζύμωση	DNA (mol % G+C)
<i>Lactobacillus spp.</i>	Βάκιλλοι συνήθως οργανωμένοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό, Ετεροζυμωτικό	35-53 34-53
<i>Leuconostoc spp.</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ετεροζυμωτικό	38-41
<i>Pediococcus spp.</i>	Κόκκοι σε τετράδες	Ομοζυμωτικό	34-42
<i>Enterococcus spp.</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	38-41
<i>Streptococcus spp.</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	34-46

1.1.2 Πηγές

Το οικοσύστημα των τροφίμων αποτελεί μια εξαιρετικά μεγάλη πηγή μικροβιακής ποικιλομορφίας στην οποία συνυπάρχουν πολλές βακτηριακές ομάδες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να βρεθούν σε πληθώρα προϊόντων όπως γαλακτοκομικά, δημητριακά, τεύτλα, πατάτες, μαγιά, ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, χυμούς, ψάρι που έχει υποστεί ζύμωση, καθώς επίσης και κατά την αποσύνθεση φυτικού υλικού και φρούτων (König and Fröhlich, 2009; Devi et al., 2013; Liu et al., 2014). Η πλειονότητα των ειδών *Lactobacillus* έχουν απομονωθεί από το γαστρεντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων. Επίσης ένας μεγάλος αριθμός ειδών *Lactobacillus* προέρχεται από λαχανικά και προϊόντα ζύμωσης (Todorov et al., 2009; Djadouni et al., 2012), ενώ είδη από το γένος *Leuconostoc* απομονώνονται κυρίως από κρέατα ή κλινικές πηγές, αν και μπορεί να προέρχονται επίσης από φυτικό υλικό, γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση και κρασιά. Τα είδη του γένους *Pediococcus* σχετίζονται κυρίως με την αλλοίωση των ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση, ιδίως τις μύρες. Επίσης τα είδη *Lactococcus* αν και έχουν απομονωθεί από φυτικό υλικό, βρίσκονται σε αφθονία σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το ξινόγαλα (Parada et al., 2007).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την πλειονότητα του μικροβιακού φορτίου κρεάτων και κρεατοσκευασμάτων υπό κενό (Ricke and Keeton, 1997) με κυριότερους αντιπροσώπους τα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus*. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται απομονώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων από διάφορα αλλαντικά. Πιο συγκεκριμένα σε παραδοσιακά ζυμούμενα λουκάνικα οι *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, και *Pediococcus* sp. είναι οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται συχνότερα και φαίνεται να έχουν προσαρμοστεί στις συγκεκριμένες συνθήκες ζύμωσης. Ως ευπροσάρμοστο είδος το *Lb. plantarum* έχει ταυτοποιηθεί συχνά ως μέρος της μικροβιακής μικροχλωρίδας των ζυμωμένων λουκάνικων.

Πιο συγκεκριμένα, το οικοσύστημα των κρεάτων μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη αρκετά μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών των οποίων η παρουσία βασίζεται σε παράγοντες που σχετίζονται με τη διαδικασία επεξεργασίας του κρέατος, τη μεταφορά του αλλά και την αποθήκευση του. Μελέτες που αφορούν τη μικροβιολογία κρέατος έχουν διαπιστώσει ότι η αλλοίωση τους προκαλείται από ένα κυρίαρχο μικροβιακό κλάσμα της αυτόχθονης μικροχλωρίδας, η οποία ενώ περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία ειδών αποτελείται

από μικρό αριθμό γενών (Nychas et al., 2007, 2008). Οι στρατηγικές που υιοθετούνται από τους μικροοργανισμούς για να αναπτυχθούν σε οικοσυστήματα κρέατος εξαρτώνται από περιβαλλοντικών συνθηκών, όπου ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες καθορίζουν τον τύπο και τον αριθμό των βακτηρίων που υπάρχουν στο κρέας. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι φυσικοχημικοί όπως η συγκέντρωση και διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η ενεργότητα νερού και η δομή κρέατος. Άλλοι παράγοντες είναι οι συνθήκες επεξεργασίας που αφορούν τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα οξυγόνου και τις συνθήκες αποθήκευσης. Η επίδραση όλων αυτών των παραγόντων στο κρέας είναι που καθορίζουν και τα διαφορετικά μικροβιακά οικοσυστήματα σε ψυγμένο συσκευασμένο ωμό κρέας, μαγειρεμένο κρέας και κρέας που έχει υποστεί ζύμωση. Παρόλα αυτά δεν έχει διευκρινιστεί γιατί το κρέας και τα προϊόντα κρέατος φέρουν συγκεκριμένους μικροοργανισμούς που δεν έχουν απομονωθεί από άλλα τρόφιμα. (Nychas et al., 2007, 2008).

Πίνακας 1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από παραδοσιακά ζυμούμενα αλλαντικά

Είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων	Πηγή απομόνωσης	Αναφορά
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/bavaricus</i>	Λουκάνικα	Hugas et al., (1993)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum</i> <i>Carnobacterium sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i>	Σαλάμι	Samelis et al., (1998)
<i>Lb. sakei/curvatus</i> <i>Pediococcus sp.</i>	Chorizo	Santos et al., (1998)
<i>Lb. sakei/curvatus/bavaricu</i>	Σαλάμι τύπου Νάπολης	Coppola et al., (2000)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/casei/brevis alimentarius</i>	Λουκάνικα	Cocolin et al., (2000)
<i>Lb. sakei/plantarum/curvatus</i>	Salsiccia and Soppressata	Parente et al., (2001)

<i>Leuc. carnosum/gelidum/pseudomesenteroides</i> <i>P. pentosaceus</i>		
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/paracasei</i>	Soppressata	Andriguetto et al., (2001)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum</i>	Σαλάμι Friulano	Cocolin et al., (2001)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/buchneri/paracasei</i> <i>E. faecium</i> <i>Pediococcus sp.</i> <i>Leuconostoc sp.</i>	Λουκάνικα	Papamanoli et al., (2003)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum</i> <i>E. faecium</i>	Fuet και Chorizo	Aymerich et al., (2003)
<i>Lb. sakei/curvatus/casei;</i> <i>E. casseliflavus Leuc. Mesenteroides</i> <i>Lac. lactis</i>	Φρέσκα λουκάνικα	Cocolin et al., (2004)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/brevis/paraplantarum</i> <i>Lac. lactis</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>Leuc. citreum/mesenteroides</i> <i>W. hellenica</i>	Σαλάμι Friulano	Comi et al., (2005)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/casei/paraplantarum</i> <i>Lac. lactis</i> <i>Leuc. citreum/ mesenteroides</i> <i>E. faecium/pseudoavium</i> <i>Weissella sp.</i>	Λουκάνικα	Rantsiou et al., (2005a)
<i>Lb. sakei/curvatus/paracasei</i> <i>Lac. garviae</i>	Σαλάμι Friulano	Rantsiou et al., (2005)

<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum</i> <i>Enterococcus sp.</i>	Λουκάνικα	Fontana et al., (2005)
<i>Lb. sakei/plantarum/paracasei/pentosus/brevis/rhamnosus; Lac. lactis;</i> <i>E. faecium; Leuconostoc sp.</i>	Λουκάνικα	Drosinos et al., (2005,2007)
<i>Lb. sakei/curvatus; Leuc. mesenteroides</i>	Chorizo fuet και Salchichón	Aymerich et al., (2006)
<i>Lb. curvatus/plantarum/brevis</i> <i>P. pentosaceus/acidilactici</i> <i>Leuc. mesenteroides</i>	Salchichón και Chorizo	Benito et al., (2007)
<i>Lb. sakei/curvatus</i>	Soppressata	Villani et al., (2007)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum</i> <i>Lac. lactis</i>	Σαλάμι Ciauscolo	Aquilanti et al., (2007)
<i>Lb. sakei/plantarum/brevis</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Leuc. carnosum/mesenteroides</i>	Λουκάνικα	Bonomo et al., (2008)
<i>Lb. sakei/curvatus/plantarum/pentosus/rhamnosus/brevis/paracasei/alimentarius/fermentum/bavaricus</i> <i>Lac. Lactis</i> <i>E. faecium</i> <i>P. pentosaceus/ acidilactici</i> <i>Leuc. mesenteroides</i>	Λουκάνικα	Kozacinski et al., (2008)
<i>Lb. sakei/plantarum/paraplantarum/brevis / Zeae/rhamnosus/paracasei</i> <i>E. faecium</i> <i>Leuc. Mesenteroides</i> <i>W. cibaria/ viridescens</i> <i>P. acidilactici/pentosaceus</i>	Λουκάνικα Alheira	Albano et al., (2008)

1.1.2 Χρήση οξυγαλακτικών βακτηριών και μικροβιακές ζυμώσεις

Τα ζυμούμενα τρόφιμα είναι από τις παλαιότερες μορφές επεξεργασμένων τροφίμων που υπάρχουν ακόμα και σήμερα στο σύγχρονο καθημερινό σιτηρέσιο. Παράγονται κατά την βιομετατροπή των σύνθετων οργανικών συστατικών σε απλούστερες ενώσεις στο τελικό προϊόν με την δράση μικροοργανισμών (Ojha et al., 2017). Το μεγαλύτερο μέρος της βιομετατροπής αυτής που αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια βασίζεται στη γαλακτική ζύμωση (Papadimitriou et al., 2015). Η πλειονότητα των ειδών της ομάδας αυτής έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe) καθώς δεν θεωρούνται επικίνδυνα για την υγεία.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι πολύ σημαντικοί μικροοργανισμοί για τη βιομηχανία τροφίμων αφού εκτός από τη ζυμωτική τους ικανότητα, διάφορα οφέλη στην υγεία και στη διατροφή έχουν ευρέως τεκμηριωθεί όπως η κατανάλωση προβιοτικών καλλιεργειών (Ιωάννα-Αρετή Αστερή, 2011). Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ευρέως στη συντήρηση των τροφίμων, καθώς μέσω της επιβράδυνσης της αλλοίωσης επιμηκύνουν το χρόνο ζωής των προϊόντων και διατηρούν τα θρεπτικά συστατικά (Ιωάννα-Αρετή Αστερή, 2011). Η ιδιότητα τους αυτή προκύπτει από την ικανότητά τους να παράγουν διάφορες ενώσεις όπως οργανικά οξέα, διακετυλένιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες κατά τις γαλακτικές ζυμώσεις (Sulieman 2017). Επιπλέον το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι οι πρωτεολυτικές τους ιδιότητες προσδίδουν χαρακτηριστικές ιδιότητες στα ζυμούμενα προϊόντα. Οι ιδιότητες αυτές συχνά αναφέρονται στη βελτίωση γεύσης όπου και διαμορφώνουν τα ιδιαίτερα γευστικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού, ή προσδίδουν το επιθυμητό άρωμα στα τυριά ή ακόμα την επιθυμητή οξύτητα διαφόρων προϊόντων κ.α.

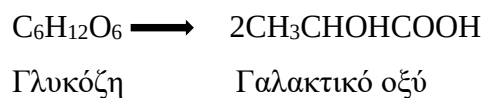
Μεταβολισμός

Υπάρχουν τρεις κύριοι οδοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της γεύσης στα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση; η γλυκόλυση (ζύμωση σακχάρων), η λιπόλυση (αποδόμηση του λίπους) και η πρωτεόλυση (αποδόμηση των πρωτεϊνών) (Law BA., 1999, Smit G et al., 2005, Tamime AY and Robinson RK, 1999). Παρόλα αυτά ο μεταβολισμός των σακχάρων είναι πρωταρχικής σημασίας.

Το κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η ζύμωση των υδατανθράκων με την φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Τα

βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν διάφορους υδατάνθρακες και συγγενικές ενώσεις με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ (Ιωάννα-Αρετή Αστερή, 2011). Η ικανότητα ζύμωσης της λακτόζης αναφέρεται ως το κύριο χαρακτηριστικό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η λακτόζη αποτελεί τον κύριο δισακχαρίτη του γάλακτος. Υπάρχουν δύο μεταβολικά μονοπάτια στα οξυγαλακτικά βακτήρια όσον αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης (Σχήμα 1.2): Στο πρώτο μονοπάτι ανήκουν τα ομοζυμωτικά βακτήρια και αφορούν κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus*. Στο δεύτερο μονοπάτι ανήκουν τα ετεροζυμωτικά βακτήρια, τα οποία αφορούν κυρίως είδη του γένους *Leuconostoc* αλλά και ορισμένα είδη του γένους *Lactobacillus*.

Στο σύνολο τους σε ποσοστό 80-98% τα ομοζυμωτικά βακτήρια μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ. Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία στερούνται φωσφοροκετολάσης, με αποτέλεσμα το μόνο τελικό προϊόν να είναι το γαλακτικό οξύ, μέσω της αντίδρασης της γαλακτικής αφυδρογονάσης.



Τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, μετατρέπουν την ποσότητα του σακχάρου σε γαλακτικό οξύ αλλά και σε CO₂, αιθανόλη και οξικό οξύ. Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται από την απουσία του ενζύμου αλδολάση, χρησιμοποιούν όμως τη μεταβολική οδό της φωσφοροκετολάσης που παράγει ακετυλο-P οξύ και 3-P-γλυκεριναλδεΐδη. Το ακετυλο-P οξύ, υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπεται σε αιθανόλη, αντίδραση η οποία αναγεννά NAD⁺. Η 3-P-γλυκεριναλδεΐδη μετατρέπεται μέσω της οδού EMP σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια παράγει γαλακτικό οξύ με τη μεσολάβηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης



Από 1 mole γλυκόζης παράγονται θεωρητικά ισοδύναμες ποσότητες (1 mole) γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος ή αιθανόλης, CO₂ και ATP.

- Φυσική ζύμωση: Η ζύμωση προκαλείται από την ενδογενή μικροχλωρίδα που δρα ως φυσικό εμβόλιο στο νωπό προϊόν, η οποία ενισχύει εκλεκτικά ή αναστέλλει την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα με κατάλληλες συνθήκες ζύμωσης (π.χ με προσθήκη NaCl, ξυδιού, αναερόβιο περιβάλλον κλπ.). Πλεονέκτημα της φυσικής ζύμωσης είναι τα διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (συνήθως πιο έντονη γεύση και άρωμα).
- Ελεγχόμενη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης: Πραγματοποιείται με την προσθήκη καθαρής καλλιέργειας με την χρήση επιλεγμένων μικροοργανισμών κατάλληλων για τη το είδος της συγκεκριμένη ζύμωσης του προϊόντος που επιθυμείται. Η καλλιέργεια προστίθεται σε υψηλό πληθυσμό ($10^6 - 10^8$ cfu/gr) στην αρχή της ζύμωσης ώστε να επικρατήσει έναντι ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Πλεονέκτημα της ελεγχόμενης ζύμωσης είναι η μικρότερη πιθανότητα αποτυχίας της ζύμωσης και η καλύτερη τυποποίηση του προϊόντος, υπό την έννοια των πιο σταθερών ποιοτικών χαρακτηριστικών.

Παραγωγή ενζύμων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι κύριοι και σημαντικότεροι παραγωγοί της β-γαλακτοσιδάσης, ένα ένζυμο ευρέως γνωστό και χρησιμοποιούμενο στην γαλακτοβιομηχανία (Karasova et al., 2002; Corral et al., 2006; Nguyen et al., 2007). Το ένζυμο αυτό υδρολύει την λακτόζη, ως τον κύριο υδατάνθρακα του γάλακτος, σε γλυκόζη και γαλακτόζη, σάκχαρα τα οποία μπορούν να απορροφηθούν από το εντερικό επιθήλιο (Troelsen, 2005; Vasiljevic and Jelen, 2001; Heyman, 2006). Χαμηλή δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης προκαλεί πεπτική ανεπάρκεια, που ονομάζεται δυσανεξία στη λακτόζη στις περισσότερες περιπτώσεις (Karasova et al., 2002; Vasiljevic and Jelen, 2001). Τα συμπτώματα δυσανεξίας της λακτόζης, όπως κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία ή φούσκωμα μετά την κατανάλωση της λακτόζης μπορούν να οδηγήσουν σε προβλήματα στην καθημερινή ζωή και σε καθημερινές δραστηριότητες.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται σήμερα στη γαλακτοβιομηχανία και παράγουν το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης ανήκουν στα γένη του *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.* περιλαμβάνοντας μια ευρεία γκάμα ειδών και στελεχών (Fernandez et al., 1999; Xanthopoulos et al., 1999; He et al., 2008). Οι οξυγαλακτικές αυτές

καλλιέργειες έχουν γίνει θέμα επιστημονικών μελετών για 3 συγκεκριμένους λόγους (Somkuti et al., 1998). Αρχικά, άτομα με δυσανεξία στην λακτόζη μπορούν να καταναλώσουν κάποια ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα με λίγες ή καθόλου ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επιπλέον οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλείς, ενώ και η β-γαλακτοσιδάση που παράγεται από αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς την ανάγκη εκτεταμένου καθαρισμού (Vasiljevic and Jelen, 2001). Επιπρόσθετα, ορισμένα στελέχη έχουν βρεθεί να έχουν προβιοτική δράση καθώς και βελτίωση στην πέψη της λακτόζης (Vinderola and Reinheimer, 2003).

Η παραγωγή λιπασών των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι σχετικά μικρή αλλά η πρωτεόλυση είναι το βασικό βιοχημικό μονοπάτι για την ανάπτυξη γεύσης σε ζυμούμενα τρόφιμα (Law BA., 1999; Smit G et al., 2005; Tamime AY and Robinson RK, 1999; Ammor MS and Mayo B, 2006). Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που προκύπτει από τις δραστηριότητες των ενζύμων της πυτιάς και της κυτταρικής πρωτεϊνάσης και πεπτιδάσης αποδίδει μικρά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε διάφορες αλκοόλες, αλδεΐδες, οξέα, εστέρες και θειούχες ενώσεις που οδηγούν στην ανάπτυξη συγκεκριμένης γεύσης κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Law BA., 1999; Souza MJ et al., 2001).

Παραγωγή βιταμινών

Οι βιταμίνες είναι απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά για το μεταβολισμό των ζωντανών οργανισμών. Λόγω ανεπαρκούς πρόσληψης από την τροφή ή μη ισορροπημένων διαιτών, οι ελλείψεις σε βιταμίνες στον άνθρωπο εξακολουθούν να είναι πολύ συχνές. Η βιοτεχνολογική παραγωγή βιταμινών κατά την οποία χρησιμοποιούνται τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως εναλλακτική λύση στην σύνθεση βιταμινών είναι υπό μελέτη για περισσότερο από μια δεκαετία (Taranto et al., 2003; De Angelis et al., 2014). Η ζύμωση τροφίμων με τη χρήση οξυγαλακτικών βακτηρίων προσφέρει μοναδικές ευκαιρίες για την ενίσχυση της διατροφικής αξίας των τροφίμων και την ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων με βελτιωμένη περιεκτικότητα σε βιταμίνες. Ως αποτέλεσμα του δευτερογενούς μεταβολισμού, ορισμένα στελέχη LAB συνθέτουν βιταμίνες της ομάδας Β όπως Β12 ή κοβαλαμίνη, Β11 ή φυλλικό οξύ και Β2 ή ριβοφλαβίνη. Από αυτή την άποψη, οι Taranto et al., (2003) ανέφεραν για πρώτη φορά τη σύνθεση της κοβαλαμίνης, μιας σύνθετης

ένωσης κορίνης, από τον *Lb. reuteri*. Από βιοτεχνολογική σκοπιά, το συγκεκριμένο είδος συγκαταλέγεται στους ισχυρούς υποψηφίους για την αύξηση της περιεκτικότητας σε κοβαλαμίνη σε ζυμούμενα τρόφιμα. Παρόλα αυτά ένας μεγάλος περιορισμός έγκειται στο γεγονός πως η κοβαλαμίνη δεν εκκρίνεται στο περιβάλλον αλλά ενδοκυτταρικά παραμένοντας στο κυτταρόπλασμα.

Επιπλέον, πολλά βιομηχανικά στελέχη που ανήκουν στο είδος *Lb. lactis* και *S. thermophilus* είναι ικανά να συνθέσουν φυλλικό οξύ, όπως έχει παρατηρηθεί σε γάλα που έχει υποστεί ζύμωση. Πιο πρόσφατα, οι Laiño et al., (2014) ανέφεραν την ικανότητα σύνθεσης φυλλικού οξέος ενός στελέχους *Lb. amylovorus* που χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ως συγκαλλιέργεια για την φυσική ενίσχυση του φολικού άλατος ζυμωμένου γάλακτος. Όσον αφορά τη ριβοφλαβίνη, η βιοσύνθεσή της έχει εντοπιστεί σε πολλά είδη λακτοβακίλλων και έχουν αναφερθεί ορισμένες εφαρμογές τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά και προϊόντα με βάση τα δημητριακά (Le Blanc et al., 2013). Γενικά, η παραγωγή βιταμινών από οξυγαλακτικά βακτήρια ποικίλλει σημαντικά ακόμα και σε επίπεδο στελέχους.

Βιοπροστατευτικές καλλιέργειες

Ως βιοπροστασία ορίζεται η ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων με τη χρήση φυσικώς απαντούμενων μικροοργανισμών ή τη χρήση των αντιμικροβιακών ενώσεων που εκείνα παράγουν. Η ζύμωση των τροφίμων είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος βιοπροστασίας από τα αρχαία ακόμη χρόνια. Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακούς μεταβολίτες, διάφορα οργανικά οξέα όπως το προπιονικό, το οξικό οξύ και το γαλακτικό οξύ ως τελικά προϊόντα. Συνήθως ένωση αποτελεί επίσης και το υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο δρα έναντι άλλων βακτηρίων (Oyewole OB., 1997). Με την παραγωγή των ενώσεων αυτών δημιουργείται ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Rattanakaikunsopon P and Phumkhachorn P, 2010). Για παράδειγμα, με τη μείωση του pH κάτω από 4.0 λόγω της παραγωγής του οξέος δύναται να σταματήσει η αύξηση αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορεί να μολύνουν το γάλα και να το καταστρέψουν (Aizhan Rakhmanova et al., 2018).

Μια σημαντική κατηγορία ενώσεων που επίσης δύνανται να παράξουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι βακτηριοσίνες. Ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια έχει βρεθεί να παράγουν βακτηριοσίνες (bacteriocins), δηλ. συγκεκριμένα πολυπεπτίδια που συντίθεται ριβοσωμικά από βακτήρια που μπορούν να έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική επίδραση έναντι άλλων βακτηρίων (McAuliffe et al., 2001, Ross et al., 2002) Οι βακτηριοσίνες είναι μεγάλης σημασίας ουσίες καθώς μπορούν να αποτρέψουν την αλλοίωση των τροφίμων μέσω της αναστολής αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Η πιο γνωστή βακτηριοσίνη είναι η νισίνη, η οποία έχει αποκτήσει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων σε τουλάχιστον 50 χώρες, ιδίως σε μεταποιημένα τυριά, γαλακτοκομικά προϊόντα και κονσερβοποιημένα τρόφιμα. (Delves-Broughton et al., 1996). Οι περισσότερες από τις προαναφερόμενες αντιμικροβιακές ουσίες διαθέτουν ένα σχετικά ευρύ φάσμα δράσης. Αντίθετα οι βακτηριοσίνες έχουν στενό αντιμικροβιακό φάσμα αναστέλλοντας κυρίως συγγενικά προς το παραγωγό είδος στελέχη. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, όπως της *Listeria monocytogenes* (Lappa et al., 2018; Saquid et al., 2019).

Επιπλέον οι αντιμυκητιακές ιδιότητες που εκφέρουν πολλά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν ευρέως αναφερθεί. Πρόσφατα οι έρευνες έχουν στραφεί επίσης και στη διερεύνηση στελεχών με ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκοτοξινών των μυκήτων είτε με την παραγωγή αντι-μυκοτοξινογόνων μεταβολιτών, είτε με την απορρόφησή τους (Lappa et al., 2018; Shehata et al., 2019; Muchialdin et al., 2020)

Επιπρόσθετα η χρήση προβιοτικών καλλιεργειών είναι από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους βιοπροστασίας που ξεπερνάει την έννοια του τροφίμου. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ως μια μεγάλη ομάδα προβιοτικών βακτηρίων. Ως προβιοτικό έχει οριστεί από τον Fuller ως << ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα διατροφής που επηρεάζει ευεργετικά το ζώο ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή του ισορροπία>> (FAO, 2013). Οι Salminen et al., πρότειναν επίσης ότι τα προβιοτικά είναι παρασκευάσματα μικροβιακών κυττάρων ή συστατικά μικροβιακών κυττάρων που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες η ζύμωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτρέπει τις διαρροϊκές παθήσεις με τα χαρακτηριστικά της

μεταβαλλόμενης σύνθεσης μικροοργανισμών στο έντερο (Schnurer J and Magnusson J,2005). Οι εμπορικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές τροφίμων περιλαμβάνουν κυρίως στελέχη *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* και *Propionibacterium spp.*, ενώ ειδικότερα τα είδη *Lactobacillus acidophilus*, *Lb.casei*, *Lb. reuteri*, *Lb.rhamnosus* και *Lb. plantarum* είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα, ως προβιοτικά, οξυγαλακτικά βακτήρια.

1.1.3 Το γένος *Lactobacillus* και εναρκτήριες καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες εκκίνησης ορίζονται ως μικροβιακά εμβόλια μεγάλου αριθμού κυττάρων ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, οι οποίες όταν προστεθούν σε μια πρώτη ύλη (ενός ακατέργαστου ή παστεριωμένου προϊόντος) μπορούν να επιταχύνουν αλλά και να κατευθύνουν την πορεία της ζύμωσης παράγοντας ένα διαφορετικό προϊόν (Leroy and De Vust, 2004). Ως καλλιέργειες εκκίνησης αναφέρονται δυνητικά όλες οι κατηγορίες μικροοργανισμών (βακτήρια, ζύμες και μύκητες) που ξεκινούν και διεξάγουν μια επιθυμητή ζύμωση και χρησιμοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα στη βιομηχανική παραγωγή. Αξίζει εδώ να σημειωθεί η λεπτή διαφορά που διαχωρίζει τις καλλιέργειες εκκίνησης από τις προστατευτικές. Πολλές φορές το ίδιο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως καλλιέργεια εκκίνησης είτε ως προστατευτική ανάλογα με τους τεχνολογικούς σκοπούς. Μια καλλιέργεια εκκίνησης έχει ως κύριο στόχο τον έλεγχο της διαδικασίας της ζύμωσης και την παραγωγή συγκεκριμένων τελικών προϊόντων (με π.χ. συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά). Η ενίστε αντιμικροβιακή δράση που πιθανόν να έχει η καλλιέργεια είναι δευτερεύουσας σημασίας. Αντιθέτως, όπως προαναφέρθηκε ο κύριος στόχος μιας προστατευτικής καλλιέργειας είναι η δράση έναντι αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Το γένος *Lactobacillus* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη της ομάδας των οξυγαλακτικών. Τα στελέχη του έχουν απομονωθεί από διάφορα υποστρώματα καθώς και ζυμούμενα τρόφιμα. Κατά τη ζύμωση η συσσώρευση κατά κύριο λόγο του γαλακτικού οξέος που παράγει, συντελεί στη μείωση του pH με αποτέλεσμα την ανασταλτική δράση κατά διαφόρων άλλων μικροοργανισμών. Πρόκειται για οξεάντοχους (συνήθως) μικροοργανισμούς, ικανούς να επιβιώνουν σε χαμηλά pH, ενώ είναι ικανά να επιβιώνουν της γαστρεντερικής οδού και να αποικίζουν επιτυχώς το γαστρεντερολογικό σωλήνα του οποίου και αποτελούν φυσική μικροχλωρίδα.

Τα πιο συνηθισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμώσεις τροφίμων αναφέρονται στον **Πίνακα 1.3**. Είναι γνωστό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτά ανήκουν στην κατηγορία των γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί γιαούρτι, ζυμούμενα γάλατα) όμως και άλλα τρόφιμα (π.χ. προϊόντα κρέατος, ψάρια, τουρσί, ελιές και μεγάλη ποικιλία δημητριακών) κατασκευάζονται σήμερα με την χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Όλα αυτά τα προϊόντα αρχικά παράγονταν με τη μέθοδο του back-slopping και τα χαρακτηριστικά του νέου προϊόντος βασίζονταν στα καλύτερα προσαρμοσμένα κυρίαρχα στελέχη του παλαιού, με τις πρώτες παραγωγές τους να βασίζονται σε αυθόρμητη ζύμωση που πρόκυπτε από την φυσική μικροχλωρίδα που υπήρχε στο αρχικό προϊόν και στο περιβάλλον του. Σήμερα, η πλειονότητα των ζυμούμενων τροφίμων παρασκευάζεται με την προσθήκη καλά καθορισμένων καλλιεργειών εκκίνησης, με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, ειδικά επιλεγμένων για το εκάστοτε επιθυμητό προϊόν (Bintsis, and Athanasoulas, 2015; Tamime A.Y., 2002; Parente and Cogan., 2004).

Πίνακας 1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια ως καλλιέργειες εκκίνησης (Bintsis., 2018).

Γαλακτοκομικά προϊόντα	Genera of LAB
Τυρί (Μεσόφιλοι εκκινητές)	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> <i>Lc. lactis ssp. lactis var. diacetylactis</i> <i>Leuc. mesenteroides ssp. cremoris</i>
Τυρί (Θερμόφιλοι εκκινητές)	<i>S. thermoplillus</i> <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>
Τυρί (Ανάμεικτοι εκκινητές)	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> <i>S. thermoplillus</i>
Γιαούρτι	<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση	<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i>
Γάλα	<i>Lb. acidophilus</i>
Βούτυρο και βουτυρόγαλα	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. lactis var. diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> , <i>Leuc. menesteroides ssp. cremoris</i>
Κεφίρ	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei spp. paracasei</i> , <i>Lc. lactis spp. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
Τραχανάς	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. lactis var. diacetylactis</i> , <i>Leuc. menesteroides ssp.</i>

	<i>cremoris</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> and <i>Lb. Acidophilus</i>
Ζυμούμενα προϊόντα κρέατος	
Ξηρά λουκάνικα	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>
Σαλάμι τύπου Milano	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Σαλάμι τύπου Piacentino	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. antri</i> , <i>Lb. oris</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. versmoldensis</i> , <i>Lb. zaeae</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. reuteri</i>
Ελληνικά τύπου ξηρά λουκάνικα	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. minor</i>
Τσορίθο	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
Ζυμούμενα προϊόντα ψαριών	
Thai fish	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i>
Ζυμούμενα προϊόντα φυτικής προέλευσης	
Τουρσί φρούτων και λαχανικών	
Λάχανο (Sauerkraut)	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Αγγούρι	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
Ελιές	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i>

Ζυμούμενα προϊόντα δημητριακών	
Προζύμι	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. sanfransiscensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>W. cibaria</i>
Κίμτσι	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>W. kimchii sp. nov.</i> , <i>Lb. kimchi</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>W. koreensis</i>
Bushera	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i> , <i>S. thermophilus</i>

Τύποι εναρκτηρίων καλλιέργειών

Οι καλλιέργειες εκκίνησης χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με τη σύσταση της μικροχλωρίδας από την οποία αποτελούνται, τη θερμοκρασία ανάπτυξης, τον τύπο των προϊόντων για τα οποία προορίζονται, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν και τον τύπο ζύμωσης, στις παρακάτω κατηγορίες (Moneim A., 2017)

A. Καλλιέργειες βασισμένες στην μικροχλωρίδα που τις αποτελούν

- **Μονή:** χρησιμοποιείται πάντα ένας και μόνο μικροοργανισμός. Το μειονέκτημα είναι ότι μπορεί να υπάρξει μη επιτυχής λειτουργία της καλλιέργειας, λόγω της επίθεσης βακτηριοφάγων το οποίο οδηγεί σε μεγάλη απώλεια στην παραγωγή.
- **Με συνδυασμένο συμβατό στέλεχος:** Δύο ποικιλίες καλλιεργειών που έχουν συμπληρωματικές δραστηριότητες σε γνωστές αναλογίες. Αυτό θα αυξήσει τις πιθανότητες για την επιτυχή λειτουργία της καλλιέργειας. Στην περίπτωση που υπάρχει επίθεση βακτηριοφάγων, συνήθως επηρεάζει μόνο τον ένα από τους δυο τύπους μικροοργανισμών και έτσι ο άλλος θα συνεχίσει την ζύμωση χωρίς κανένα πρόβλημα.

- **Μικτές καλλιέργειες:** Περισσότερα από δύο είδη μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν διαφορετικά προσδόκιμα χαρακτηριστικά όπως, παραγωγή οξέος, παραγωγή γεύσης, κ.α. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε άγνωστες ποσότητες.

Β. Βασιζόμενες στην θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Οι εναρκτήριες καλλιέργειες που βασίζονται στην θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών, χωρίζονται σε μεσόφιλες και θερμόφιλες.

- Μεσόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης:** Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης αυτών των

καλλιεργειών είναι 30 °C και με εύρος ανάπτυξης που κυμαίνεται σε 22-40°C, όπως:

- *Lb. lactis subsp. cremoris*
- *Lb. delbrueckii subsp. lactis*
- *Lb. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*
- *Leuc. mesenteroides subsp. cremoris*

- Θερμόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης:** Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης αυτών των καλλιεργειών είναι 40°C και οι μικροοργανισμοί δύνανται να αναπτυχθούν μεταξύ 32- 45°C, όπως:

- *St. salivarius subsp. thermophilus (S.thermophilus)*
- *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus*
- *Lb. delbrueckii subsp. lactis*
- *Lb. casei*
- *Lb. helveticus*
- *Lb. plantarum*

Γ. Καλλιέργειες βασιζόμενες στον τύπο ζύμωσης

Οι καλλιέργειες χωρίζονται ως ομοζυμωτικές και ετεροζυμωτικές με βάση τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από το μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 1.1.2. Κατ' επέκταση, εκτός από την παραγωγή του γαλακτικού οξέος οι καλλιέργειες εκκίνησης είναι επίσης χρήσιμες για την παραγωγή τροφίμων που αναφέρονται στον πίνακα 1.3.

Η καλλιέργεια εκκίνησης δύναται να βρίσκεται σε δύο κύριες διαφορετικές μορφές:

Υγρή καλλιέργεια

Η περιεκτικότητα των καλλιιεργειών αυτών είναι περίπου 1×10^9 κύτταρα ανά mL. Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν συνήθως πρέπει να έχει προηγηθεί η ανακαλλιέργεια τους, ώστε να αποκτήσουν την απαιτούμενη ζωτικότητα. Μπορούν να διατηρηθούν για μικρό χρονικό διάστημα και μόνο υπό ψύξη λόγω της αρνητικής επίδρασης που ασκεί το γαλακτικό οξύ που περιέχουν στα βακτηριακά κύτταρα. Η χρήση αυτής της μορφής των καλλιιεργειών περιορίζεται συνεχώς γιατί έχουν αναπτυχθεί άλλες μορφές πιο εύχρηστες και πιο ασφαλείς.

Λυοφιλωμένη καλλιέργεια

Σε αυτή την μορφή των καλλιιεργειών ο πληθυσμός των κυττάρων ανά γραμμάριο είναι 10^8 - 10^9 κύτταρα και δημιουργούνται με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης των υγρών καλλιιεργειών. Το πλεονέκτημα τους είναι ότι διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μπορούν να αποθηκευτούν στους 4 °C για πολλούς μήνες. Όπως και στις υγρές καλλιέργειες πριν τη χρήση τους συνήθως ανακαλλιιεργούνται σε κάποιο θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό την αναζωογόνηση των κυττάρων τους. Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια η χρήση των λυοφιλωμένων καλλιιεργειών έχει δοκιμαστεί και χωρίς το στάδιο της ανακαλλιέργειας.

Πίνακας 1.4: Λειτουργίες εναρκτηρίων καλλιιεργειών (Moneim A., Microbial starter cultures 2017)

Λειτουργία	Αποτέλεσμα
Παραγωγή οξέων: γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και CO ₂	• Σχηματισμός γέλης • Συναίρεση ορού γάλακτος για υφή • Συντήρηση γάλακτος • Βοήθεια στην ανάπτυξη της γεύσης
Παραγωγή αρωματικών συστατικών: διακετύλιο, ακεταλδεϋδη, ακετοΐνη	Μετάδοση των χαρακτηριστικών γεύσης των προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση
Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών	Σχηματισμός υφής
Συντήρηση προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση	• Μείωση του pH και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού • Παραγωγή γαλακτικού οξέος • Παραγωγή αντιβιοτικών • Παραγωγή H₂O₂ • Παραγωγή οξικού εστέρα
Σχηματισμός αερίου	• Σχηματισμός οπών σε ορισμένα τυριά • Παραγωγή ανοικτής υφής π.χ. Μπλε τυρί
Σχηματισμός σταθεροποιητή	Ανάπτυξη σώματος και ιξώδους π.χ. Πολυσακχαρίτες
Χρησιμοποίηση λακτόζης	• Μείωση της ανάπτυξης των αέριων και των αρωμάτων

	• Κατάλληλο για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη
Μείωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής	• Αύξηση συντήρησης των τροφίμων • Ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (γεύσης) των τροφίμων
Πρωτεόλυση και λιπόλυση	Βοηθά στην ωρίμανση τυριών
Παραγωγή ποικίλων ενώσεων	Παραγωγή αλκοόλης σε ορισμένα προϊόντα όπως το κεφίρ, το κούμης

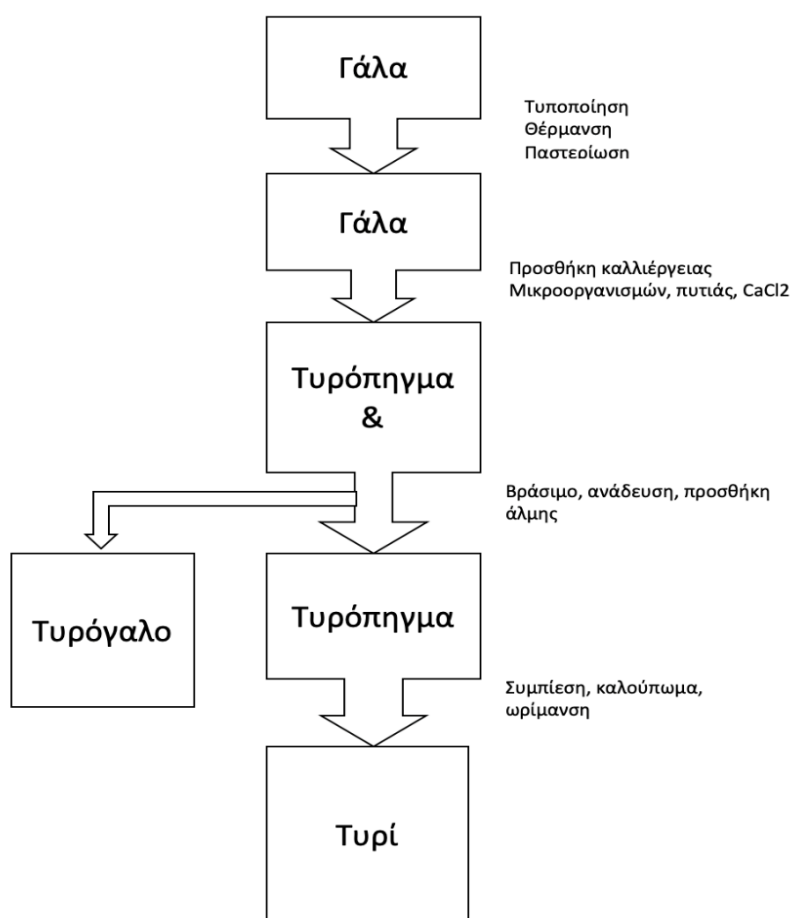
1.2 Τυρόγαλο

1.2.1 Σύσταση και τύποι τυρογάλακτος

«Τυρόγαλα» ή ορός γάλακτος είναι το υδαρές τμήμα του γάλακτος που λαμβάνεται μετά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος κατά την τυροκόμηση, με την χρήση πυτιάς ή οξέων, ή και φυσικοχημικών μεθόδων. (**Εικόνα 1.2.1**). Το τυρόγαλα αποτελεί ένα μεγάλης σημασίας παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας λόγω της υψηλής διατροφικής του σύνθεσης αλλά ταυτόχρονα λόγω της εξαιρετικά ρυπογόνου φύσης του παράλληλα με το μεγάλο όγκο παραγωγής. Το τυρόγαλα αποτελείται κυρίως από νερό αλλά περιέχει περίπου το 50% των στερεών συστατικών του γάλακτος. Από τα στέρεά του συστατικά η λακτόζη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της τάξης του 66-77% (w/w), οι πρωτεΐνες το 8-15 % (w/w) και τα ανόργανα στοιχεία το 7-15% (w/w) (Fernández-Gutiérrez et al., 2017). Περιέχει επίσης σε ένα μικρότερο ποσοστό μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχες ουσίες, όπως αμινοξέα, βιταμίνες (A, D και B5), ιχνοστοιχεία (ψευδάργυρος). Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος είναι λευκωματίνες (έως 90% κ.β.), λακτοφερίνη και ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν περίπου 20% κ.β. των πρωτεϊνών του γάλακτος. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν αντιϊικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποτελώντας ένα πολύτιμο προϊόν για τη βιομηχανία τροφίμων (Fernández-Gutiérrez et al., 2017). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν μεγαλύτερη θρεπτική αξία από την καζεΐνη του τυριού γιατί έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη, η λυσίνη και σε μεγαλύτερη αναλογία. Η ποσότητα τυρογάλακτος που παράγεται σχετίζεται με την ποσότητα παραγωγής τυριού αλλά και με την παραγωγικότητα με βάση τον τύπο γάλακτος που χρησιμοποιείται. Κατά κανόνα λαμβάνονται περίπου 9L τυρογάλακτος για κάθε 1Kg τυριού που παράγεται (Carvalho F. et al., 2013; Wang Z. et al., 2018). Η σύσταση του τυρογάλακτος ποικίλει και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ποιότητα και η σύσταση του γάλακτος, η τεχνική παραγωγής του τυριού, η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την πήξη (προσθήκη οξέων, ένζυμα, βιολογική οξίνιση) και η χρονική περίοδος (Tsakali et al., 2010; Prazeres et al., 2012; Carvalho 2013). Η παραγωγή του τυρογάλακτος μπορεί να προκύψει από γάλα οποιασδήποτε προέλευσης. Η διαδικασία παραγωγής του τυρόγαλου απεικονίζεται συνοπτικά στο **Σχήμα 1.2**.



Εικόνα 1.2 Τυρόγαλα



Σχήμα 1.3: Συνοπτική περιγραφή παραγωγικής διαδικασίας κατά την οποία παράγεται το τυρόγαλα

Με βάση τη διαδικασία παραγωγής και την πήξη της καζεΐνης, το τυρόγαλα μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: το όξινο, το οποίο έχει τιμή pH μικρότερη του 5.0, και το γλυκό με τιμές pH άνω του 5.6 (Tsakali et al., 2010). Το όξινο τυρόγαλα δημιουργείται μετά από ζύμωση ή προσθήκη ανόργανων ή οργανικών οξέων. Αντίστοιχα, το γλυκό δημιουργείται συνήθως μέσω της προσθήκης πρωτεολυτικών ενζύμων (Carvalho et al., 2013). Οι βασικές διαφορές μεταξύ του όξινου και γλυκού τυρογάλακτος έγκεινται στην περιεκτικότητα σε ασβέστιο, φωσφορικά άλατα, γαλακτικό οξύ τα οποία συναντώνται σε υψηλότερες τιμές στο όξινο (Bozanic et al., 2014). Παράλληλα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο και η λακτόζη είναι υψηλότερα στο γλυκό τυρόγαλα (Carvalho et al., 2013). Επιπλέον, σε αντίθεση με το όξινο, το γλυκό τυρόγαλα περιέχει γλυκομακροπεπτίδια που σχηματίζονται μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης και της κ-καζεΐνης (Bozanic et al., 2014). Στον Πίνακα 1.2.1 παρουσιάζεται η τυπική σύνθεση του γλυκού και όξινου τυρογάλακτος.

Πίνακας 1.2.1 Σύσταση (g/L) του γλυκού και όξινου τυρογάλακτος (Bozanic et al., 2014)

Τυρόγαλα	Ολικά στερεά	Λακτόζη	Πρωτεΐνες	Ασβέστιο	Φωσφορικά άλατα	Γαλακτικό οξύ	Χλωριούχα άλατα
Γλυκό	63-70	46-52	6-10	0,4-0,6	1-3	2	1,1
Όξινο	63-70	44-46	6-8	1,2-1,6	2-4,5	6,4	1,1

1.2.2 Το τυρόγαλα ως απόβλητο

Το τυρόγαλα όπως προαναφέρθηκε είναι το υγρό που απομένει από την παρασκευή του τυριού μετά το στάδιο της πήξης. Τις τελευταίες δεκαετίες, θεωρείται το πιο σημαντικό απόβλητο της γαλακτοκομικής βιομηχανίας και σχετίζεται με σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους. Το κύριο ζήτημα έγκειται στο υψηλό του οργανικό φορτίο, κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη αλλά και στην εμφάνιση σχεδόν βιοαποικοδομήσιμων πρωτεϊνών. (Yadav et al., 2015) Συγκεκριμένα έχουν μετρηθεί τιμές COD (Chemical Oxygen Demand) του τυρογάλακτος οι οποίες κυμαίνονται από 50,000 έως 80,000mg/L, και BOD (Biochemical oxygen demand= Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο) είναι περίπου 40,000 έως 60,000 mg/L (Chatzipaschali, et al., 2012) .Η ταχεία κατανάλωση οξυγόνου στο έδαφος που προκλήθηκε από την διάσπαση των πρωτεϊνών και των σακχάρων που περιέχονται στο τυρόγαλο θέτει ένα σημαντικό πρόβλημα απόρριψης μαζί με τις τεράστιες ποσότητες που δημιουργούνται. Η παγκόσμια παραγωγή τυρογάλακτος υπολογίστηκε το 2016στα 200 εκατομμύρια τόνους με ετήσια γραμμική αύξηση 3% τα τελευταία 21 χρόνια. (Domingos, et al., 2018) Εκτός από τα υψηλά ποσοστά σε οργανική ύλη, στο τυρόγαλα έχει παρατηρηθεί επίσης να εμπεριέχονται μικρά ποσοστά βαρών μετάλλων όπως ψευδάργυρος, κάδμιο, υδράργυρος, χαλκός, χρώμιο και μόλυβδος τα οποία συμβάλουν σημαντικά στη ρύπανση του περιβάλλοντος. Σύμφωνα με τα Ευρωπαϊκά πρότυπα η μόλυνση αυτή είναι τόσο υψηλή που ισούται με την μόλυνση μίας πόλης 50,000 κατοίκων. Αυτό δείχνει το σημαντικό επίπεδο μόλυνσης που απορρέει από τη βιομηχανία γάλακτος (Ostojic et.al., 2005). Η αποβολή των αποβλήτων από τις τυροκομικές μονάδες γίνεται μέσω σωληνώσεων σε συστήματα αποχέτευσης, λίμνες, θάλασσες, ωκεανούς, ποτάμια και σπηλιές. Η μόλυνση που προκαλείται από τα συγκεκριμένα απόβλητα είναι ιδιαίτερα σοβαρή καθώς προκαλούνται ζωτικές επιπτώσεις στους οργανισμούς που κατοικούν μέσα στο νερό με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος εξαφάνισης αυτών των οργανισμών λόγω της καταστροφής του διαλυμένου οξυγόνου. Από την παγκόσμια παραγωγή αξιοποιείται περίπου το 55 % του τυρογάλακτος, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτεται ως απόβλητο (Van A., 2014). Στις περιοχές γύρω από τυροκομεία παρατηρείται υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων και του περιβάλλοντος, δυσοσμία καθώς και σημαντικές επιπτώσεις στους υδρόβιους ζωικούς οργανισμούς όπως τα ψάρια καθώς πεθαίνουν από ασφυξία. Για τους παραπάνω λόγους σύμφωνα με την

Ελληνική νομοθεσία (Π.Δ. 252, Κ.Υ.Α. 5673/400/97) για την δανειοδότηση των τυροκομείων είναι απαραίτητη η εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού (Καραδήμα., 2009).

Προκειμένου να συμμορφωθούν με την περιβαλλοντική νομοθεσία, σχετικά με την εσφαλμένη διάθεση του τυρογάλακτος, οι βιομηχανίες αναζητούν εναλλακτικές λύσεις για την επαναχρησιμοποίησή του. Οι περισσότερες βιομηχανίες χρησιμοποιούν το τυρόγαλα μετατρέποντας το σε σκόνη, συμπυκνώματα πρωτεΐνης τυρογάλακτος, λακτόζη, και ανάμεικτα ποτά όπως γάλα που έχει υποστεί ζύμωση και το οποίο προστίθεται σε τυρόγαλα τυριού. Μία άλλη επιλογή αξιοποίησης είναι μέσω των διαδικασιών ζύμωσης για να παραχθούν υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα, όπως μονοκύτταρικές πρωτεΐνες, αλκοόλες (αιθανόλη και βουτανόλη), βιταμίνες και οργανικά οξέα όπως γαλακτικό, ηλεκτρικό, και προπιονικό οξύ) (Mollea et al., 2013; Dragone et al., 2009). Σε αυτά τα προϊόντα, συχνότερα χρησιμοποιείται συμπυκνωμένο τυρόγαλα λόγω των υψηλών θρεπτικών συστατικών του και λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε λακτόζη η οποία στην περίπτωση της ζύμωσης βοηθάει στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

1.2.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος ως παραπροϊόν για τη βιομηχανία

Το τυρόγαλα εκτός από ένα σημαντικό βιομηχανικό απόβλητο αποτελεί ένα υψηλής διατροφικής και τεχνολογικής αξίας παραπροϊόν, γι' αυτό και η αξιοποίηση του κρίνεται απαραίτητη. Περίπου 120 εκατομμύρια τόνοι ορού γάλακτος παράγονται ετησίως σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων μόνο το 50% χρησιμοποιείται για προϊόντα της ανθρώπινης διατροφής ή ως ζωοτροφές (Nikodinovic-Runic et al., 2013).

Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν ταυτόχρονα πολύ υψηλή βιολογική αξία αλλά και σημαντικό τεχνολογικό ενδιαφέρον. Ένα ευρύ φάσμα διατροφικής αλλά και ιατρικής αξίας έχει αποδοθεί στις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος και στα παράγωγά τους ως μια εξαιρετική πηγή βιοδραστικών πεπτιδίων. Τα βιομόρια αυτά ορίζονται ως πρωτεϊνικά θραύσματα με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, όπως ρύθμιση καρδιαγγειακού και γαστρεντερικού συστήματος, ακόμα και λιπώδους ιστού (Lagrange and Clark, 2019). Επιπλέον, η αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση για φυσικά συστατικά στα τρόφιμα οδήγησε σε σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, όσον αφορά την παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι

πρωτεΐνες ορού γάλακτος εμφανίζουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη υφή και ποιότητα των τελικών προϊόντων κυρίως όσον αφορά στις δομικές και στις ρεολογικές τους ιδιότητες. Οι πιθανές εφαρμογές τους περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη χρήση τους ως επιφανειακά ενεργά συστατικά, τροποποιητές υφής, πηκτικούς παράγοντες και παράγοντες αφρισμού, γαλακτωματοποιητές και διάφορες βιοδραστικές ιδιότητες (Lappa et al., 2019). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αναπτύξουν μακρο-, μικρο- και νανο-δομές με πολλά υποσχόμενες εφαρμογές στα τρόφιμα, όπως να αποτελέσουν τους φορείς για διάφορες βιοενεργές ενώσεις, οργανοληπτικά ή θρεπτικά συστατικά. Ως εκ τούτου, η αναδυόμενη ανάπτυξη τεχνικών επεξεργασίας τους θα μπορούσε να επιτρέψει περαιτέρω εφαρμογές που θα κατευθύνονται προς προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

Από τα συστατικά του τυρογάλακτος, η λακτόζη είναι το υπεύθυνο κλάσμα για το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ρύπανσης, ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η έρευνα για περαιτέρω αξιοποίησή της (Siso., 1996; Prazeres et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Nikodinovic-Runic et al., 2013). Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις πιθανές χρήσεις του τυρογάλακτος σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες.

Το κύριο συστατικό του τυρόγαλου είναι η λακτόζη, καθώς αποτελεί το σάκχαρο του γάλακτος. Είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από γαλακτόζη και γλυκόζη. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, όπως το *Lactobacillus* sp., το *Lactococcus* sp. και το *Leuconostoc* sp., είναι από τους αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί που καταναλώνουν λακτόζη μέσω του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι σε θέση να μετατρέψουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, αλλά όχι αιθανόλη. Ωστόσο, ένα στέλεχος του ομο-γαλακτικού ζυμωτικού βακτηρίου, *Lactococcus lactis*, έχει γενετικά τροποποιηθεί ώστε να είναι σε θέση να παράγει αποτελεσματικά αιθανόλη από ορό γάλακτος. (Liu J., 2016). Το γαλακτικό οξύ είναι ένα οργανικό οξύ με κορυφαία θέση λόγω των ευπροσάρμοστων εφαρμογών του σε χημικές, φαρμακευτικές και βιομηχανίες τροφίμων. Οι εφαρμογές του οι οποίες σχετίζονται με τα τρόφιμα αντιπροσωπεύουν το 85% της συνολικής παραγωγής, περίπου. Αυτό το οργανικό οξύ έχει αναγνωριστεί ως GRAS (generally recognized as safe) από το FDA (John R.P., 2009). Χρησιμοποιείται ως αρωματικό, ρυθμιστικό μέσο, αναστολέας βακτηριακής αλλοίωσης, μέσο όξυνσης, μαλακτικό ζύμης και γαλακτωματοποιητής (John R.P., 2007). Το μεγαλύτερο μέρος του

γαλακτικού οξέος παράγεται μέσω μικροβιακής ζύμωσης, κυρίως από στελέχη του είδους στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* ή *Lactobacillus amylophilus*, χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα τεύτλων, μελάσα, άμυλα και κυτταρινικά υλικά και τυρόγαλα.

Μια σημαντική διεργασία που απορρέει από τη ζύμωση της λακτόζης είναι η παραγωγή γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), μέσω της δράσης της β-γαλακτοσιδάση (EC 3.2.1.23), αποδίδοντας ένα μείγμα ολιγοσακχαριτών, μονο- και δισακχαριτών, με υψηλό εύρος συνδέσμων, κυρίως β1–4 και β1–6, αλλά επίσης β1–3 και β1–2 (Rastall R.A., 2012). Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες εμφανίζονται φυσικά στο γάλα ζώων και ανθρώπων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά παράγονται κυρίως από χημικά με γλυκοζυλίωση ή ενζυματικές οδούς για την κάλυψη των απαιτήσεων της αγοράς. Το παγκόσμιο μέγεθος αγοράς των γαλακτο-ολιγοσακχαριτών εκτιμάται ότι ήταν στα 703,8 εκατομμύρια δολάρια το 2017, και αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά έως το 2025, μετά την διαρκώς αυξανόμενη ζήτηση για κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής (Adroit market research, 2019). Οι πρεβιοτικές ιδιότητες των γαλακτο-ολιγοσακχαριτών έχουν αποδειχθεί ευρέως σε *in vitro* μελετών σε ζώα και ανθρώπους (συμπεριλαμβανομένων των μελετών με βρέφη). Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλείς (GRAS) στις Ηνωμένες Πολιτείες και χαρακτηρίζονται ως τρόφιμα για ειδική χρήση για την υγεία (FOSHU) στην Ιαπωνία, όπου έχουν εφαρμοστεί σε ένα φάσμα τελικά προϊόντα όπως γλυκαντικά, διογκωτικά και υποκατάστατα ζάχαρης.

Επιπλέον, μια από τις πιθανές αξιοποιήσεις του τυρογάλακτος είναι για η παραγωγή πολύ-υδροξυλκανοϊκών εστέρων (Polyhydroxyalkanoates, PHA) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών, τα οποία αποτελούν ένα μείζονος σημασίας περιβαλλοντικό πρόβλημα. Η χρήση της λακτόζης του τυρογάλακτος μπορεί δυνητικά να μειώσει το κόστος παραγωγής των PHA, επιλύοντας ταυτόχρονα ένα διττό περιβαλλοντικό πρόβλημα (Tiago et al., 2019).

Μια ακόμη εφαρμογή ως προς την αξιοποίηση του συγκεκριμένου κλάσματος αφορά τους εστέρες λακτόζης. Αν και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, έχουν βρει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Staro N., 2018). Αυτοί οι εστέρες ζάχαρης εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και σταθερότητας στα τρόφιμα, ενώ αυτοί μπορούν να εφαρμοστούν ως εναλλακτικές λύσεις χαμηλών λιπαρών. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντιμικροβιακή

δράση έναντι πολλών τροφικά παθογόνων, καθώς και φαρμακευτικές ιδιότητες όπως αντικαρκινική δραστηριότητα (Nooshkam M., 2018; Adroit market research, 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία δειγμάτων

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που ανήκαν στο γένος *Lactobacillus* και συγκεκριμένα τα είδη *L. plantarum* LQC 820, και *L. sakei* LQC 854. Τα συγκεκριμένα στελέχη έχουν ήδη χαρακτηριστεί με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους (συλλογή LQC, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών) και διατηρούνται στους -80 °C σε cryonials με θρεπτικό υπόστρωμα MRS και 20% γλυκερόλη (w/v). Τα στελέχη ανανεώθηκαν και ελέγχθηκαν για την καθαρότητα τους πριν χρησιμοποιηθούν στη μελέτη. Συγκεκριμένα, έγινε εμβολιασμός 50 μ L σε 5 mL MRS broth (Difko, Belgium). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h στους 30 °C. Παράλληλά, εφαρμόστηκε η μέθοδος της γραμμικής διασποράς (streaking) και έγινε οπτική και μικροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των αποικιών για την ομοιογένεια των καλλιιεργειών από τυχόν επιμολύνσεις. Μετά τον πρώτο ενοφθαλμισμό τα στελέχη ανανεώθηκαν διαδοχικά για άλλες 18h μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η επώαση έγινε στην ίδια θερμοκρασία σε κωνικές φιάλες των 250 mL χρησιμοποιώντας 50 mL MRS. Στη συνέχεια, οι ανεπτυγμένες καλλιέργειες της τάξης του $\sim 10^9$ cfu/mL χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια για τις εκάστοτε ζυμώσεις.



Εικόνα 2.1 Έλεγχος καθαρότητας μικροοργανισμών με την τεχνική της γραμμικής επίστρωσης (streaking)

2.2 Διαχείριση τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη παραλήφθηκε από τυροκομική μονάδα (Τυροκομείο Γαλιατσάτος, Ραζάτα, Κεφαλονιά) και συγκεκριμένα πρόκειται για το υγρό ρεύμα που εναπομένει μετά την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος (τύπου μυζήθρας). Στα πλαίσια του πειράματος πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του τυρογάλακτος σε δυο ρεύματα, λακτόζης και πρωτεΐνης. Για το διαχωρισμό τους εφαρμόστηκε η διαδικασία κατακρήμνισης των πρωτεϊνών με τη ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (pH 4.5) και κατόπιν θέρμανση. Ακολούθησε διήθηση του υπερκείμενου κλάσματος προκειμένου να απομακρυνθούν υπολειπόμενα κοκκία πηγματος. Το πλούσιο σε λακτόζη κλάσμα του τυρογάλακτος αποστειρώθηκε για 15' στους 121 °C για την περαιτέρω χρήση του ως υπόστρωμα ζύμωσης.

2.3 Ζυμώσεις λακτόζης

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης έγιναν δύο ζυμώσεις λακτόζης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες στους 30 °C και 37 °C. Στη μια περίπτωση, μία ζύμωση έγινε σε συνθετικό μέσο λακτόζης για την αξιολόγηση της ζυμωτικής ικανότητας των στελεχών και η δεύτερη έγινε σε τυρόγαλο με σκοπό την αξιολόγηση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας σε φιάλες Duran του 1L χρησιμοποιώντας συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης όπως αναφέρεται στον Πίνακα 2.1. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας, σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλο (~50 g/L λακτόζης) με προσθήκη των αντίστοιχων συστατικών (Πίνακας 2.1). Για τον εμβολιασμό του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε 5% (v/v) από την εκάστοτε οξυγαλακτική προ-καλλιέργεια. Το pH των ζυμώσεων ρυθμιζόταν με την προσθήκη KOH (5M) σε τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να μείνει σταθερό στο 6.5. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό στατικές συνθήκες χωρίς ανάδευση.

Πίνακας 2.1 Σύσταση συνθετικού υποστρώματος λακτόζης

Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Λακτόζη (Lactose)	45
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	5
(NH ₄) ₂ SO ₂ (Ammonium sulphate)	5
K ₂ HPO ₄ (Potassium phosphate dibasic)	1
MgSO ₄ 7H ₂ O (Magnesium sulphate)	0.3
CH ₃ COONa (Sodium acetate)	5

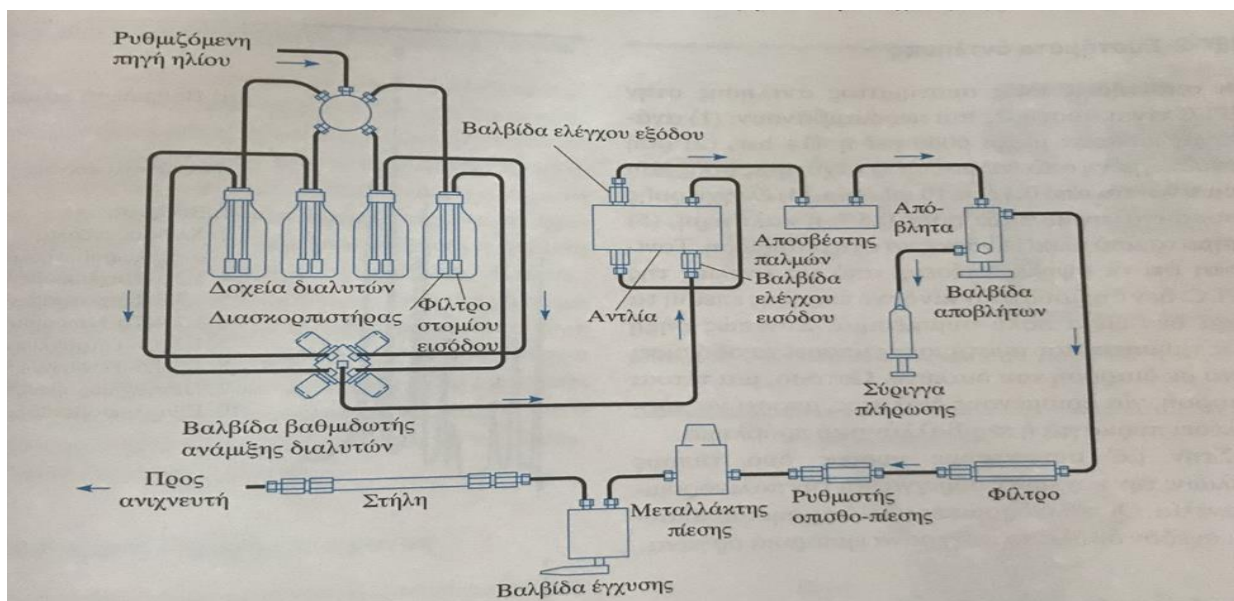
2.4 Προσδιορισμός λακτόζης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος χημικής ανάλυσης που βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση παραμένει σταθερή στο σύστημα και ονομάζεται «στατική φάση» (stationary phase) ενώ η άλλη λέγεται «κινητή φάση» (mobile phase) και διέρχεται μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της στατικής φάσης. Η κινητή φάση προκαλεί μετατόπιση των συστατικών του μίγματος σε διαφορετικές θέσεις μέσα σε μια χρωματογραφική στήλη με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους (Pecsok et al., 1980). Η υγρή χρωματογραφία είναι ένα σύστημα διαχωρισμού στο οποίο η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ενώ η στατική φάση ένα πορώδες μέσο (Pecsok et al., 1980). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Ο λόγος είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και

κυρίως, η δυνατότητα εφαρμογής της σε προσδιορισμούς ουσιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος σε πολλά επιστημονικά πεδία. Παραδείγματα αποτελούν οι υδατάνθρακες, τα φαρμακευτικά, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στερεοειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών (A. Skoog et al., 2017). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας για την μεταφορά ενός υγρού υπό υψηλή πίεση και η δημιουργία στηλών με εξειδικευμένα τεχνολογικά χαρακτηριστικά οδήγησε στη ραγδαία ανάπτυξη της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ή υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography High pressure Liquid Pressure Liquid Chromatography - HPLC) όπως αλλιώς αναφέρεται (Meyer., 1994) λόγω των υψηλών πιέσεων που επικρατούν.

Ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC αποτελείται από τα παρακάτω βασικά επιμέρους τμήματα (Εικόνα 2.2):

- Φιάλες διαλυτών
- Αντλία υψηλής πίεσης, σταθερής ροής
- Εισαγωγέα δείγματος
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτή
- Καταγραφικό



Εικόνα 2.2: Συνοπτικό διάγραμμα που δείχνει τα τμήματα ενός τυπικού οργάνου HPLC (Πηγή: principles of instrumental analysis , A Skoog et al,2017)

Η ανάλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος καθώς και η κατανάλωση της λακτόζης κατά τη διάρκεια των υγρών ζυμώσεων, όπως και η ανάλυση της παραγωγής γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με Ανιχνευτή διάθλασης (HPLC-RI) με στήλη Aminex HPX-87H column (300 mm length x 7.8 mm internal diameter). Η κινητή φάση ήταν 10 mM H₂SO₄ με ροή 0.6 mL/min και ο φούρνος ήταν ρυθμισμένος στους 65 °C (Papadaki et al., 2018).

2.5 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας

Για τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την ακόλουθη διαδικασία. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5,000 rpm, στους 5 °C για 10 λεπτά με σκοπό την απόρριψη του υποστρώματος. Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των δειγμάτων με απιονισμένο νερό με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του υποστρώματος και τοποθέτηση των δειγμάτων σε προζυγισμένα φιαλίδια (Μο). Η βιομάζα ξηράνθηκε στους 100 °C για περίπου 24-48h μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους. Μετά την ξήρανση και αφού τα φιαλίδια έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίστηκαν (Μ) σε ζυγό ακριβείας τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L (Papanikolaou and Aggelis., 2002; Wu et al., 2011; Wang et al., 2012).

Η βιομάζα (Total Dry Weight, TDW) ή αλλιώς το ολικό ξηρό βάρος αποδίδεται από τον τύπο:

$$TDW \text{ (g/L)} = [(M-Mo) \times 1000] / V$$

TDW: Συγκέντρωση Ολικού Ξηρού Βάρους (Βιομάζας) δείγματος g/L

Μο: Βάρος κενού προ ζυγισμένο γυάλινου φιαλιδίου βάρους προς τη ξήρανση g

Μ: Βάρος γυάλινου βάρους μετά την ξήρανση g

V: Όγκος δείγματος mL

2.6 Λυοφυλίωση κυττάρων, αποθήκευση και μελέτη βιωσιμότητας

Μία από τις σημαντικότερες διεργασίες ξήρανσης/αφυδάτωσης σε υγρά τρόφιμα είναι η λυοφυλίωση. Λυοφυλίωση ή αλλιώς κρυοξηρανση ορίζεται η μέθοδος αφυδάτωσης ενός προϊόντος όπου μέσω της γρήγορης κατάψυξης επέρχεται η εξάχνωση του σχηματισμένου πάγου σε συνθήκες θερμοκρασίας της τάσης ατμών κάτω του τριπλού σημείου του ύδατος χωρίς να προηγηθεί τήξη. Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόζεται τόσο σε διαφορετικά είδη τροφίμων όσο και σε μικροοργανισμούς. Η σωστή αποθήκευση των λυοφιλιωμένων προϊόντων τα κάνει να συντηρούνται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα διατηρώντας έτσι τις βιολογικές, φυσικές, οργανοληπτικές και χημικές ιδιότητες που έχουν και τα αντίστοιχα φρέσκα προϊόντα (Garcia-Amezquita et al., 2016). Η μέθοδος εφαρμόζεται επίσης και σε μικροοργανισμούς με σκοπό την καλύτερη αποθήκευσή τους μέσω της αύξησης της βιωσιμότητας των κυττάρων.. Η αργή ψύξη έχει βρεθεί πως σχηματίζει μεγάλους κρυστάλλους πάγου μέσα στο κύτταρο ενώ η γρήγορη μικρότερους. Έτσι δύναται να καταστρέψει τη δομή του δείγματος εφόσον οι κρύσταλλοι θα εισέλθουν στα κυτταρικά τοιχώματα. Πιο συγκεκριμένα το προϊόν που είναι προς ξήρανση αρχικά καταψύχεται και στη συνέχεια τοποθετείται σε θάλαμο υψηλού κενού. Μέσω της αντλίας κενού επιτυγχάνεται υψηλό κενό όπου συνεπάγεται την εξάχνωση του παγωμένου νερού. Πιο αναλυτικά ο σχηματισμός καθαρού πάγου στο εσωτερικό του προϊόντος προς ξήρανση σχηματίζεται όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 0°C και έτσι ο πάγος μπορεί να εξαχνωθεί με την εφαρμογή του κενού. Η εξάχνωση πραγματοποιείται αρχικά στην επιφάνεια του προϊόντος και βαθμιαία εισχωρεί προς το εσωτερικό διασφαλίζοντας μέσω της χαμηλής πίεσης πως η δομή του δείγματος να παραμείνει ακέραια. Περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου ξήρανσης. Ο κύκλος λυοφυλίωσης αποτελείται σε γενικό επίπεδο από τρία κύρια στάδια:

- A) Κατάψυξη: το διάλυμα μετατρέπεται σε πάγο και έτσι σχηματίζει το συμπτυκνωμένο κατεψυγμένο διάλυμα.
- B) Πρωτογενής ξήρανση: το κατεψυγμένο διάλυμα απομακρύνεται από το προϊόν με εξάχνωση.
- Γ) Δευτερογενής ξήρανση: το μη κατεψυγμένο νερό απομακρύνεται με εκρόφηση.

Τα μέρη των εργαστηριακών συσκευών που χρησιμοποιούνται για τη λυοφιλίωση είναι ο θάλαμος κατάψυξης και ο ψυχωμένος συμπυκνωτής

Από τον ψυχωμένο συμπυκνωτή διέρχονται οι υδρατμοί ενώ παράλληλα μπορεί να απομακρυνθεί ο πάγος που έχει σχηματισθεί χωρίς να διακόπτεται το κενό που έχει δημιουργηθεί στους θαλάμους και η αντλία που διατηρεί την πίεση στους θαλάμους κάτω των 4 mm Hg (Ζουμπούλης και συν., 2009).

Η λυοφιλίωση έχει καταστεί πλέον μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους ξήρανσης των μικροοργανισμών ειδικότερα στη γαλακτοβιομηχανία, όπου οι καλλιέργειες δύνανται να είναι έτοιμες προς χρήση και να διατηρούν τα χαρακτηριστικά τους με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός τυποποιημένου προϊόντος. Μερικά από τα κυριότερα πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης ως μεθόδου ξήρανσης είναι:

- Η διατήρηση των γενετικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων.
- Η διατήρηση του μεγαλύτερου ποσοστού βιωσιμότητας των μικροοργανισμών.
- Η δυνατότητα ξήρανσης μεγάλων ποσοτήτων βιομάζας.
- Η αύξηση της διάρκειας συντήρησης και αποθήκευσης.
- Η ευκολία μεταφοράς και αποθήκευσης του δείγματος λόγω μείωσης όγκου και βάρους.
- Η μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης λόγω του μικρού ποσοστού υγρασίας.
- Ηπιότερες συνθήκες ξήρανσης όσον αφορά στα επιθυμητά βιομηχανικά χαρακτηριστικά των καλλιιεργειών.

Το τελευταίο αποτελεί πλεονέκτημα καθώς οι παγοκρύσταλλοι που σχηματίζονται από την κατάψυξη και απομακρύνονται μέσω του θαλάμου κενού έχουν σαν αποτέλεσμα την προστασία των πρωταρχικών δομών των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό δεν επέρχονται τραυματισμοί των κυττάρων της καλλιέργειας καθώς η αφυδάτωση επέρχεται ταχύτατα με αποτέλεσμα την διατήρηση της βιωσιμότητας, της δραστηρότητας και των γενετικών χαρακτηριστικών τους (Davies., 1968).

Στην παρούσα μελέτη όσον αφορά την εφαρμογή της λυοφιλίωσης, η βιομάζα συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm για 10 min και η τελική συλλογή των κυττάρων έγινε μετά από διπλή έκπλυση με διάλυμα Ringer ($\frac{1}{4}$ strength) με σκοπό την απομάκρυνσή των υπολειμμάτων του υποστρώματος και των παραπροϊόντων της ζύμωσης. Η λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε υπό κενό σε σύστημα Freeze Dryer (BK-

FD12P, Biobase Biodustry Co., Ltd) υπό τις εξής συνθήκες: διάρκεια ψύξης 2h, θερμοκρασία ψύξης -30 °C, πίεση 0.8 mbar και χρόνος λυοφιλίωσης 24h.

Τα στελέχη αποθηκευτήκαν στους 4 °C και πραγματοποιήθηκε μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων με την απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού πριν, αμέσως μετά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης και για διάρκεια 4 μηνών. Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε υπόστρωμα MRS agar (Difco, Belgium). Μετά τον εμβολιασμό τα τριβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 72h. Στη συνέχεια καταμετρήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες και ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων εκφράστηκε σε log cfu/g.

2.7 Μελέτη ζύμωσης τυρογάλακτος από λυοφιλιωμένες καλλιέργειες

Το τελευταίο μέρος του πειράματος περιλάμβανε τη μελέτη της λειτουργικής σταθερότητας των λυοφιλιωμένων στελεχών ως προς την ικανότητα ζύμωσης της λακτόζης. Επιλέχθηκε προς λυοφιλίωση μόνο το στέλεχος *L. plantarum* LQC 820 για το οποίο είχαν παρατηρηθεί (συγκριτικά με το LQC 854) τα μεγαλύτερα ποσοστά ζύμωσης της λακτόζης αλλά και η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλο (~50 g/L λακτόζης) στους 37 °C όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

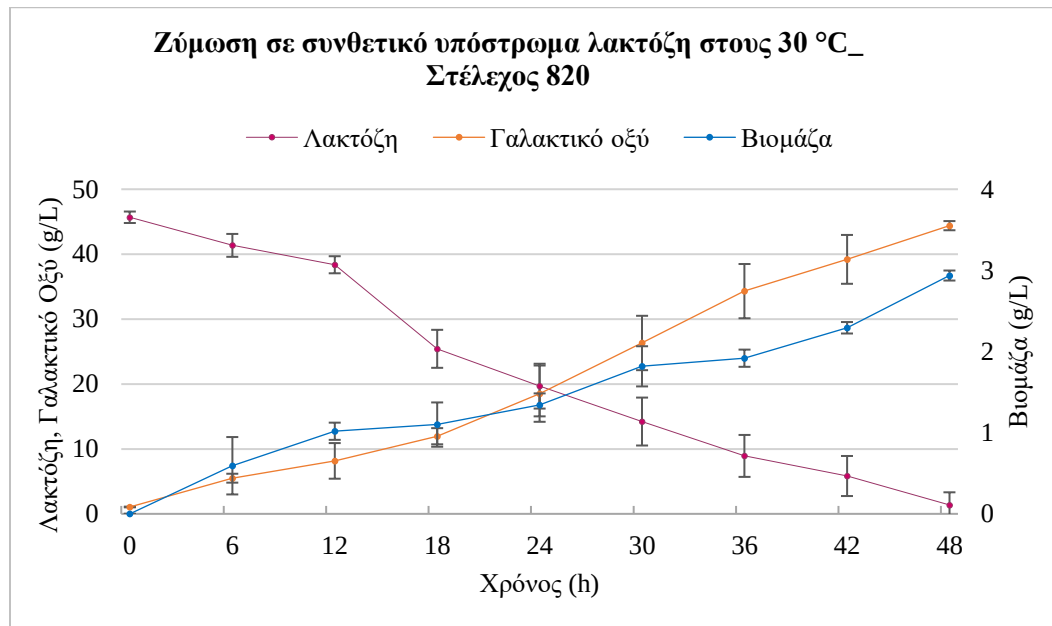
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Κινητική ζύμωσης λακτόζης και παραγωγή βιομάζας οξυγαλακτικών βακτηρίων με πρώτη ύλη το τυρόγαλο

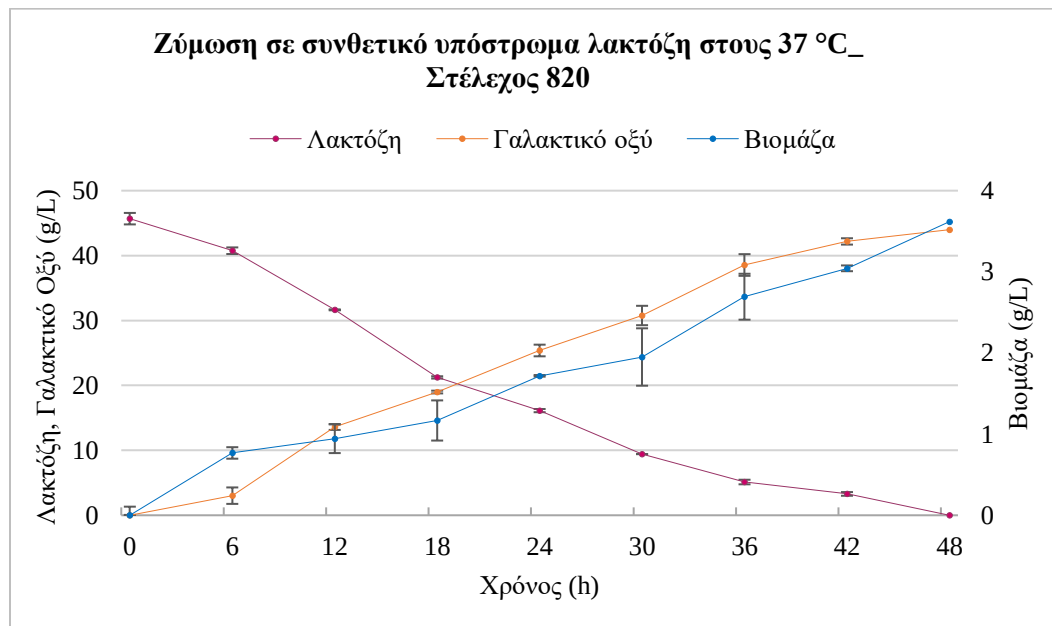
Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Εκτός από τις πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις, η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των LAB. Υπάρχει μια βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι υψηλότερος και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Parmjit and Panesar, 2007). Η βέλτιστη θερμοκρασία για ανάπτυξη επίσης ποικίλλει από 20 έως 45 °C (Dicks et al., 1995, Wood and Holzapfel, 1995). Επιπλέον, είναι γνωστό πως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης δεν συνάδει πάντοτε με τη βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης. Επίσης το pH είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που παίζει ρόλο τόσο στην ανάπτυξη των κυττάρων όσο και στη ζύμωση.

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που παρουσιάζουν τις κινητικές των ζυμώσεων, καθώς και την ανάπτυξη της βιομάζας των υπό μελέτη στελεχών στα υποστρώματα λακτόζης στους 30 και 37 °C. Πιο αναλυτικά και αναφορικά με τις αρχικές ζυμώσεις στο συνθετικό υπόστρωμα, το *Lb. plantarum* 820 (**Διάγραμμα 3.1.1**) έδειξε τη μεγαλύτερη ικανότητα ως προς τη ζύμωση της λακτόζης καταναλώνοντας σχεδόν και τα 45 g/L και στις δύο θερμοκρασίες. Επιπλέον, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος έφτασαν περίπου τα 44 g/L και 45 g/L στους 30 °C και 37 °C αντίστοιχα. Η παραγωγή της ξηρή βιομάζας προσδιορίστηκε στα 3 g/L και στα 3.6 g/L για τις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Το στέλεχος *Lb. sakei* 854 (**Διάγραμμα 3.1**) έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνο στους 30 °C όπου ζυμώνοντας 78% της λακτόζης, η παραγωγή ξηρής βιομάζας έφτασε στα 2.2 g/L. Τα γαλακτικό οξύ κυμάνθηκε σε 35 g/L και 9 g/L για τις δύο θερμοκρασίες αντίστοιχα.

A.



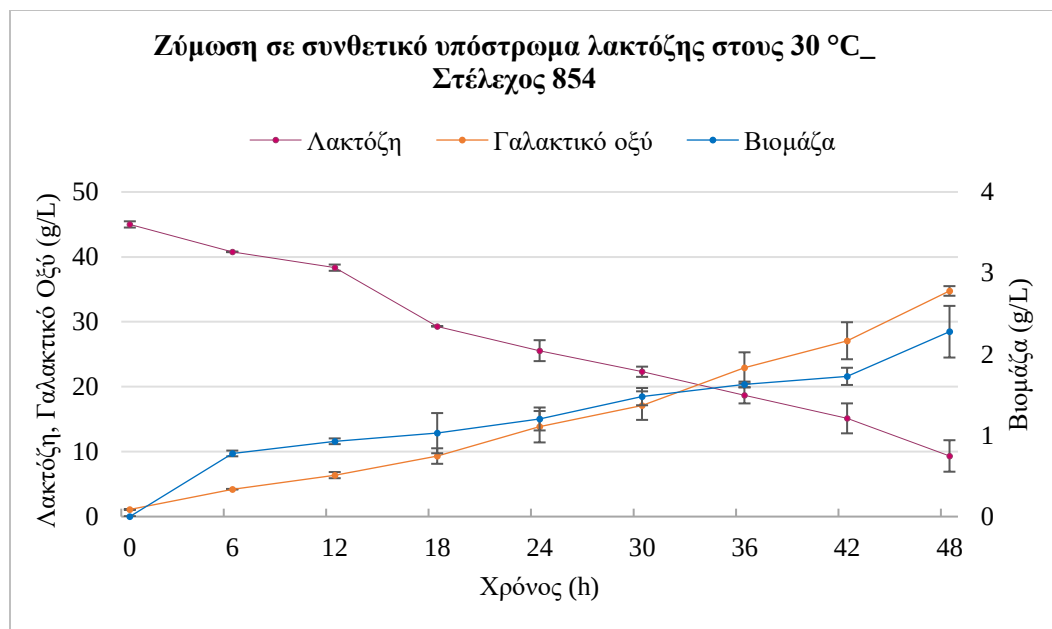
B.



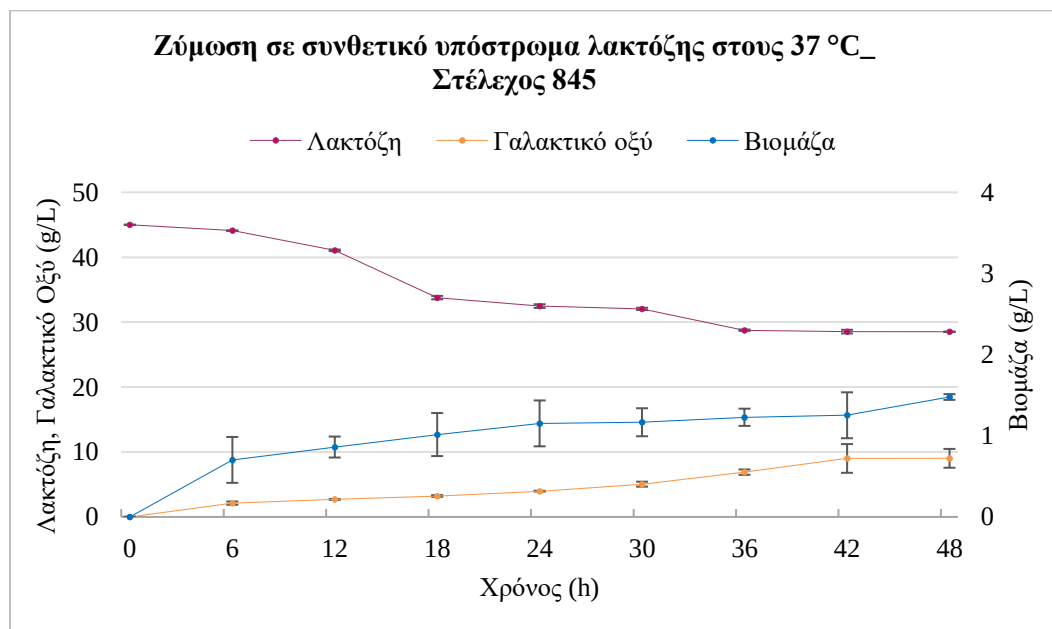
Διάγραμμα 3.1 Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *Lb. plantarum* 820 κατά την υγρή ζύμωση

σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).

A.



B.

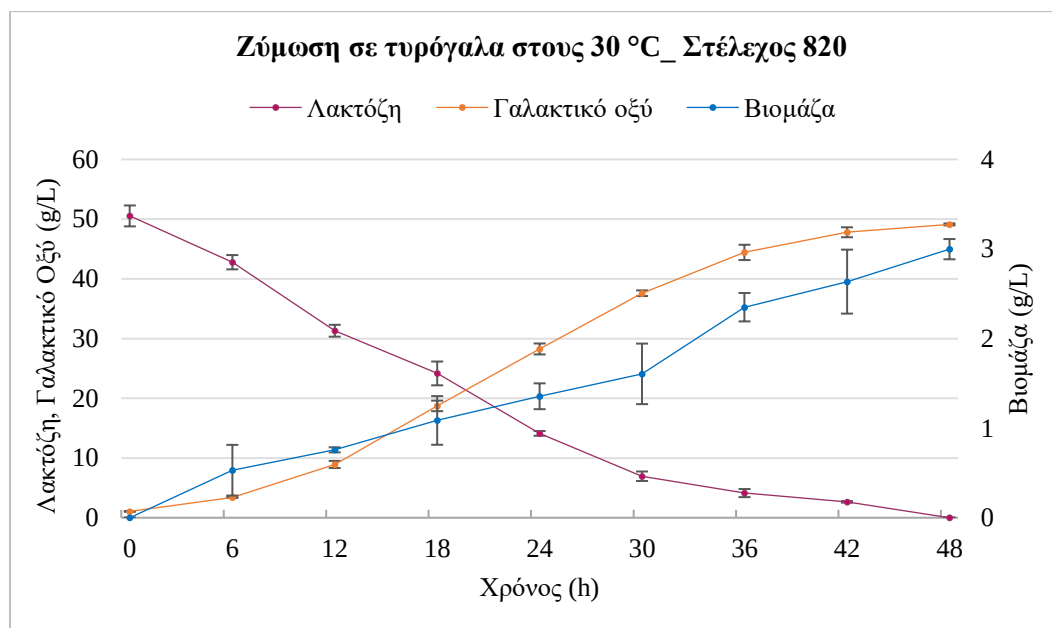


Διάγραμμα 3.2 Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *Lb. sakei* 854 κατά την υγρή ζύμωση σε

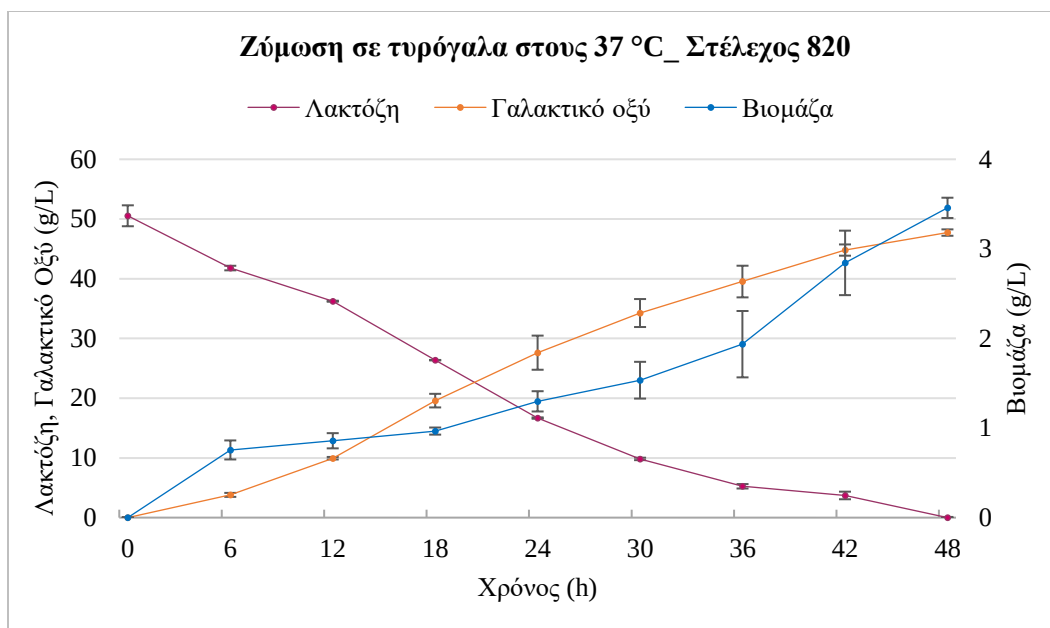
υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 30 °C (Α) και 37 °C (Β).

Αναφορικά με τις ζυμώσεις της λακτόζης του τυρογάλακτος, το στέλεχος *Lb. plantarum* 820 (Διάγραμμα 3.3) παρουσίασε επίσης τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς κατάφερε να καταναλώσει πλήρως τη λακτόζη και στις δύο θερμοκρασίες. Η παραγωγή της ξηρής βιομάζας προσδιορίστηκε περίπου στα 3 g/L και στις δύο θερμοκρασίες. Όσον αφορά τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος οι μετρήσεις έδειξαν παραγωγή περίπου 45 g/L. Τέλος αναφορικά με το στέλεχος *Lb. sakei* 854 (Διάγραμμα 3.4) τα αποτελέσματα επέδειξαν πως και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες τα επίπεδα ζύμωσης της λακτόζης κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης του 20%. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και ως προς την παραγωγή του γαλακτικού οξέος αλλά και της ξηρής βιομάζας.

A.

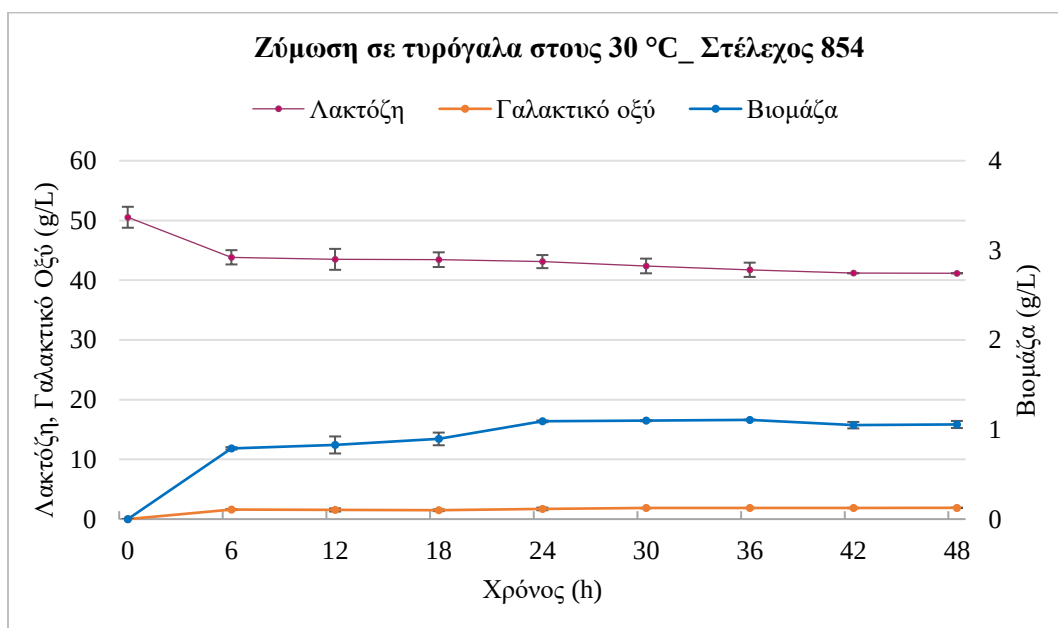


B.

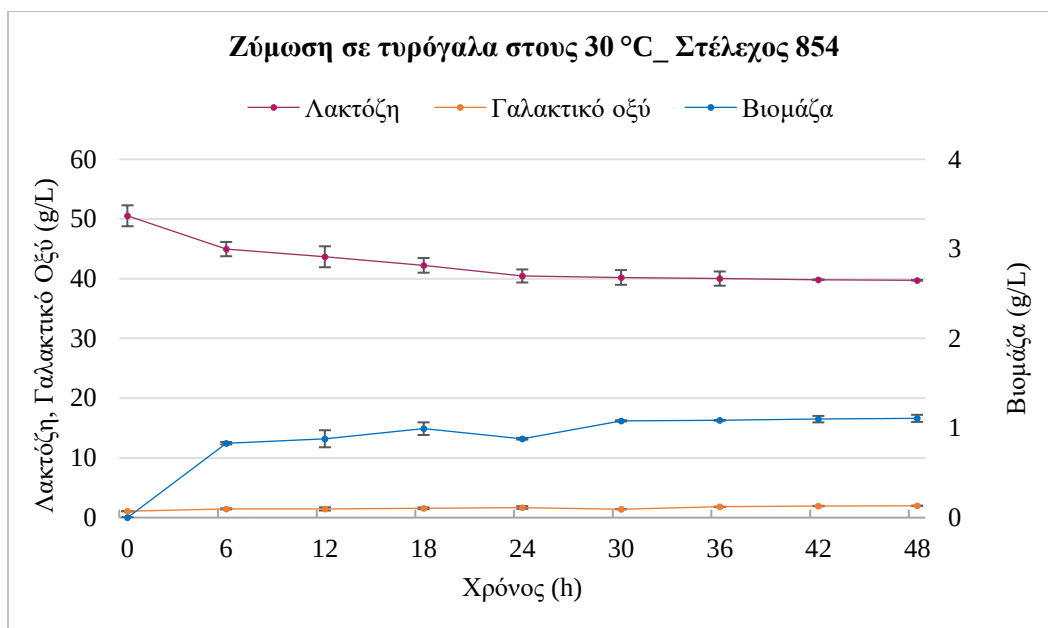


Διάγραμμα 3.3 Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *Lb. plantarum* 820 κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).

A.



B.



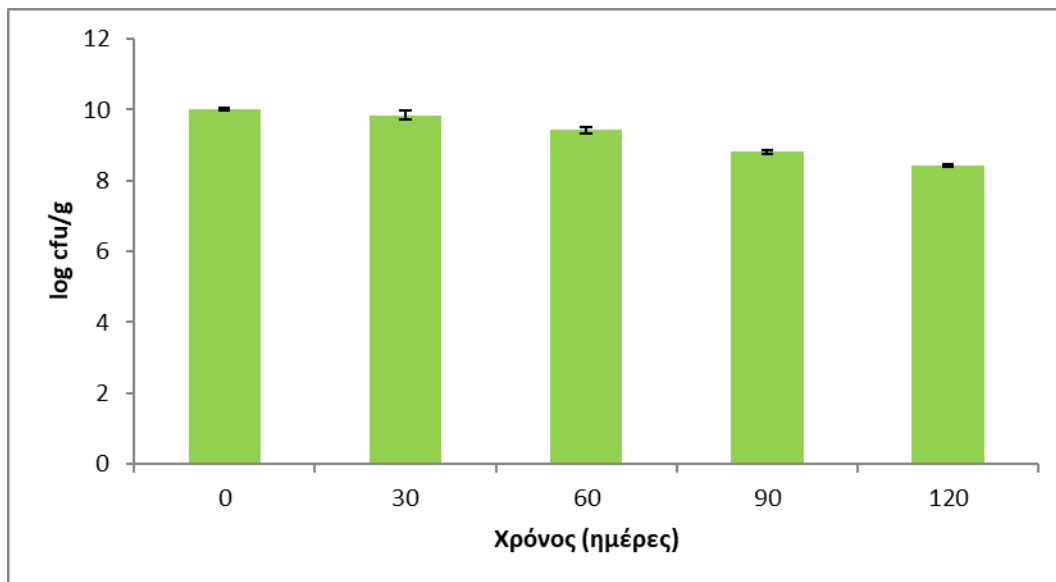
Διάγραμμα 3.4 Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *Lb. sakei* 854 κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 30 °C (A) και 37 °C (B).

Η χρήση αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων ως προς την παραγωγή βιομάζας οξυγαλακτικών κυττάρων έχει αναδειχθεί σε πληθώρα μελετών (Gao et al., 2007; Manzoor et al., 2017). Είδη του γένους *Lactobacillus* sp. έχουν αναφερθεί ξανά ως προς τη χρήση τους για παραγωγή βιομάζας (Mu et al., 2009; Hwang et al., 2015) και το στέλεχος *Lb. plantarum* είναι ένας από ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη (Brinques et al., 2010; Coghetto et al., 2017; Salma et al., 2017, Cerdeira et al., 2019). Με αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία αναδεικνύεται πως το τυρόγαλα εξυπηρετεί την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Macedo et al., 2002; Burns et al., 2008; Huang et al., 2017). Παρόλα αυτά η προσθήκη συμπληρωματικών πηγών αζώτου συχνά είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί αύξηση των κυττάρων ανάλογη ή και μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα συνθετικά υποστρώματα (MRS) (Lavari et al., 2014; Hanoune et al., 2015; Maldivo et al., 2019). Συγκεκριμένα σε πρόσφατη μελέτη τους οι Rapizadeh et al., (2020) αναφέρουν πως η μικρή περιεκτικότητα του τυρογάλακτος σε οργανικό άζωτο απαιτεί την προσθήκη συμπληρωμάτων για τη βελτίωση της ανάπτυξης μικροβιακών στελεχών. Σε μια παρόμοια

μελέτη με την χρήση αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος, οι Salma et al., (2017) ανέδειξαν παραγωγή μικροβιακής βιομάζας 3.25 g/L από το είδος *L. helveticus* μετά από ζύμωση τυρογάλακτος στους 40 °C χρησιμοποιώντας επιπλέον πηγές αζώτου όπως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης. Αναφορικά με τη σύσταση του συνθετικού υποστρώματος, η σύνθεση των θρεπτικών στοιχείων είναι καίριας σημασίας για τη λειτουργικότητα, τη μεταβολική δραστηριότητα, την ανάπτυξη της βιομάζας, την κυτταρική βιωσιμότητα και την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Macedo et al., 2002; Adebayo-Tayo and Onilude, 2009; Peighambardoust et al., 2011; Hayek and Ibrahim, 2013; Bulatović et al., 2014).

3.2 Λυοφιλίωση βιομάζας και μελέτη βιωσιμότητας

Στο **Διάγραμμα 3.5** παρουσιάζεται η μελέτη βιωσιμότητας των λυοφιλιωμένων κυττάρων του *Lb. plantarum* 820. Ο πληθυσμός της αρχικής καλλιέργειας ήταν της τάξης των 10^{10} cfu/ml πριν τη λυοφιλίωση. Όπως παρατηρείται, η επεξεργασία δεν φάνηκε να επηρέασε τη βιωσιμότητα του συγκεκριμένου στελέχους καθώς αμέσως μετά τη λυοφιλίωση οι πληθυσμοί καταγράφηκαν στα ίδια επίπεδα των 10 log. Πιο συγκεκριμένα τις πρώτες 60 ημέρες ο πληθυσμός του *Lb. plantarum* μειώθηκε κατά μέσο όρο 1 log cfu/g. Τέλος, στις 120 ημέρες φάνηκε πως η βιωσιμότητα της αρχικής καλλιέργειας μειώθηκε περίπου κατά ποσοστό 17%. Γενικότερα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η βιωσιμότητα έδειξε μικρή πτώση μένοντας παρόλα αυτά σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση του στελέχους σε περαιτέρω βιοδιεργασίες.



Διάγραμμα 3.5: Ραβδόγραμμα βιωσιμότητας των λυοφιλιωμένων κυττάρων του στελέχους *Lb. plantarum* 820 μετά από 120 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4 °C.

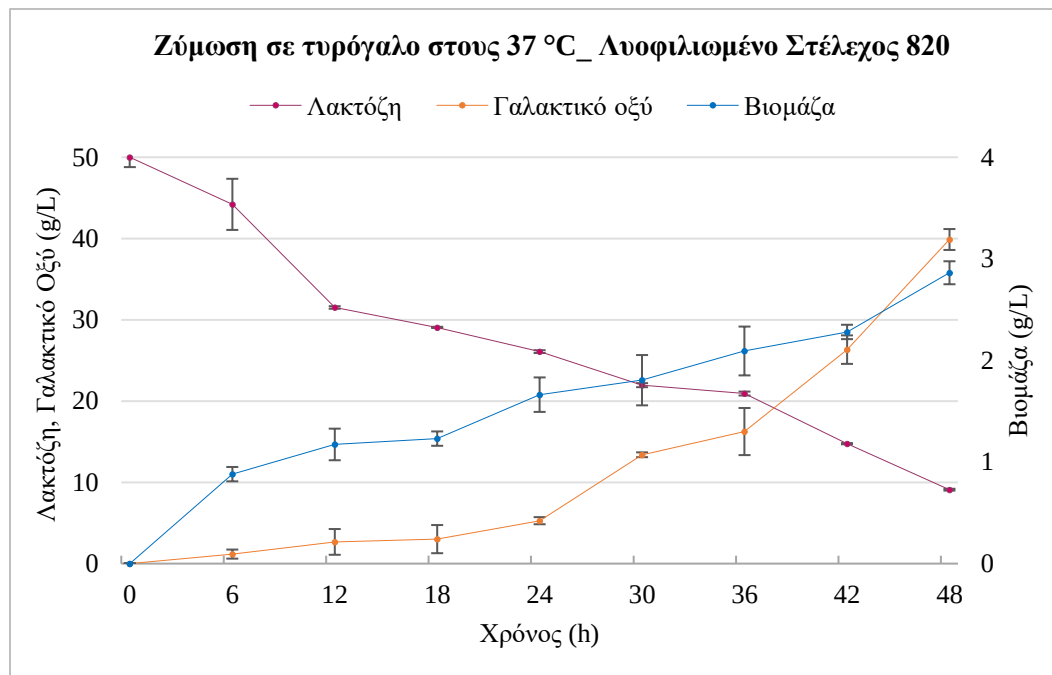
Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα με παλαιότερες μελέτες παρατηρείται ότι κατά την αποθήκευση υπάρχει συνήθως μια μικρή απώλεια βιώσιμων κυττάρων. Σε

αυτό σημαντικό ρόλο παίζει ο εκάστοτε μικροοργανισμός που έχει χρησιμοποιηθεί αλλά και το μέσο στο οποίο έχει αναπτυχθεί. Παρατηρείται ότι σε μελέτες όπου έχει χρησιμοποιήσει ως μέσο το τυρόγαλο, υπάρχει μικρότερη απώλεια βιώσιμων κυττάρων κατά την αποθήκευση (Tlygo et al., 2016; Huang et al., 2017). Ένα παράδειγμα αναφέρεται στη μελέτη των Lavari et al., (2014), όπου στους δύο πρώτους μήνες αποθήκευσης στους 5°C αναφέρεται μείωση των πληθυσμών κατά 1.25 ή 0.5 log για τους μικροοργανισμούς *Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus*. Στη μελέτη αναφέρεται επίσης πως όταν χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ανάπτυξης αποβουτυρωμένο γάλα παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες απώλειες ($P= 0,0457$) βιωσιμότητας, σε σύγκριση με τις απώλειες των κυττάρων που καταγράφηκαν όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε σε τυρόγαλο αναφορικά με το *Lb. gasseri*. Επιπλέον, όπως αναφέρεται και στη συγκεκριμένη μελέτη, σημαντικό ρόλο παίζει και η διαδικασία της λυοφιλίωσης που προηγείται της αποθήκευσης αφού διαφορετικές θερμοκρασίες κατά τη λυοφιλίωση δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα βιωσιμότητας κατά την αποθήκευση των στελεχών.

3.3 Δημιουργία και μελέτη “Ready to use” εναρκτηρίας καλλιέργειας

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων η λυοφιλωμένη καλλιέργεια *Lb. plantarum* 820 (στην οποία παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά ζύμωσης της λακτόζης) αξιολογήθηκε στη βέλτιστη θερμοκρασία των 37 °C, ως προς τη ζυμωτική του ικανότητα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα της οξυγαλακτικής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για ζύμωση τυρογάλακτος περιεκτικότητας 5% λακτόζης και παρατηρήθηκε η λειτουργική σταθερότητά τους αμέσως μετά τη λυοφιλίωση. Αναλυτικά στο **Διάγραμμα 3.6** παρουσιάζεται η κινητική της ζύμωσης και τα προϊόντα της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα ως προς την κατανάλωση της λακτόζης αξιολογήθηκαν αντίστοιχα με τα αυτά που ελήφθησαν από τα μη λυοφιλωμένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος 820 κατανάλωσε τη λακτόζη σε ποσοστό 82%. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος και ειδικότερα στις πρώτες 24h και η παραγωγή στο τέλος της ζύμωσης προσδιορίστηκε 39.8 g/L. Τέλος, παρατηρήθηκε και μια μικρή μείωση παραγόμενης τελικής βιομάζας της τάξης του ~20% καθώς η βιομάζα στο τέλος της

διεργασίας προσδιορίστηκε στα 2.86 g/L. Η ανάπτυξη λυοφιλιωμένης αρχικής καλλιέργειας του στελέχους *Lb. plantarum* 820 κρίθηκε άκρως επιτυχής καθώς χρησιμοποιήθηκε εκ νέου και απευθείας σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα με πλήρως ικανοποιητικές ζυμωτικές επιδόσεις.



Διάγραμμα 3.6: Κινητική αύξησης της ξηρής βιομάζας (db), της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης λυοφιλιωμένων κυττάρων του *Lb. plantarum* 820 κατά την υγρή ζύμωση σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 37 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπεράσματα

Η διαχείριση των βιομηχανικών αποβλήτων αποτελεί παγκοσμίως ένα ευαίσθητο θέμα δεδομένου του συνεχώς αυξανόμενου όγκου τους. Όπως προαναφέρθηκε το τυρόγαλο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, όχι μόνο λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου αλλά και της ιδιαίτερα υψηλής παγκόσμιας παραγωγής του. Αρχικά το τυρόγαλο αποτελούσε ένα ουσιαστικά άνευ αξίας απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας, λόγω της σημαντικής οικολογικής επιβάρυνσης και του υψηλού κόστους διαχείρισης και διεργασιών απόρριψης, χωρίς να αξιοποιείται η υψηλή βιολογική και τεχνολογική του αξία. Παρόλα αυτά το οικολογικό πρόβλημα που απορρέει ανάγεται κυρίως στη λακτόζη και όχι τόσο στις πρωτεΐνες οι οποίες αξιοποιούνται για την παραγωγή άλλων τυριών τυρογάλακτος αλλά και διαφόρων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Κατόπιν αυτών, η ολιστική αξιοποίηση του καθορίστηκε ως επιτακτικής σημασίας στην εξελισσόμενη βιομηχανία και έχει τα τελευταία χρόνια τραβήξει το παγκόσμιο ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα πλήθος μελετών να έχουν επικεντρωθεί προς αυτή την κατεύθυνση. Οι περισσότερες μελέτες σήμερα εστιάζουν στην ανάκτηση της πρωτεΐνης του τυρογάλακτος και στη μετέπειτα χρήση της λακτόζης για παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κυρίως μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Στη παρούσα μελέτη, το πλούσιο σε λακτόζη τυρόγαλο αξιοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη καλλιεργειών εκκίνησης. Συγκεκριμένα ανάμεσα στα οξυγαλακτικά βακτήρια που διερευνήθηκαν ως προς την ικανότητα ζύμωσης του τυρογάλακτος, αναδείχθηκε το στέλεχος *Lb. plantarum*, το οποίο μελετήθηκε περαιτέρω για την καταλληλότητα του ως αρχική καλλιέργεια. Το στέλεχος αξιολογήθηκε σε βελτιωμένες συνθήκες ανάπτυξης, συλλέχθηκε, ξηράνθηκε και στη συνέχεια μελετήθηκε, σε εργαστηριακή κλίμακα, ως προς τη λειτουργικότητά του. Συνολικά τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ικανοποιητικές αποδόσεις ζύμωσης και ανέδειξαν την καταλληλότητα του τυρογάλακτος για χαμηλού κόστους παραγωγή καλλιεργειών εκκίνησης, οι οποίες μπορούν να εισαχθούν και να βρουν εφαρμογή σε πληθώρα τροφίμων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγγλική βιβλιογραφία

1. Abdel, M.S., (2017). Mixrobal starter cultures, LAP LAMBERT Academic Publishing.
2. Adroit market research. Available online: <https://www.adroitmarketresearch.com/industry-reports/galactooligosaccharides-gos-market> (accessed on 15 June 2019).
3. Ammor, M.S., Mayo, B., (2006). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci* 76: 138–146.
4. Ananou, S., Maqueda, M., Martinez–Bueno, M., et al. Biopreservation, (2007). An Ecological Approach to Improve the Safety and Shelf–Life of Foods. *FORMATEX*:1–12.
5. Bintsis, T., (2018). Lactic Acid Bacteria: their applications in foods.
6. Bintsis, T., Athanasoulas., (2015). A. Dairy starter cultures. In: Papademas, P., editor. *Dairy microbiology, a practical approach*, CRC Press, Boca Raton, FL, 114–154.
7. Bintsis, T., (2018). Review, Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics.
8. Bozanic, R., Barukcic, L., Lisak, K.(2014). Possibilities of Whey Utilisation. *Austin J. Nutr. Food Sci.*, 2(7), 1036
9. Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the total Environment*, 445, 385–396.
10. Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445–446, 385–396.
11. Carvalho, F.; Prazeres, A.R.; Rivas, J., (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.*, 445–446, 385–396.
12. Castillo, F.J., (1990). Lactose metabolism by yeasts. *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, ed H. Verachtert & R. De Mot. Marcel Dekker, New York, pp297–320.
13. Chammas, G., Saliba, R., Corrie, G., Beal, C., (2006). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”
14. Chatzipaschali, A.A.; Stamatis, A.G., (2012). Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies*, 5, 3492–3525.
15. Corning G.W., Kroger Co., (1981). Corning and Kroger turn whey to yeast.
16. Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget M.F., (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*.;21(4):370–380.
17. De Angelis, M., Bottacini, F., Fosso, B., et al., (2014). *Lactobacillus rossiae*, a vitamin B12 producer, represents a metabolically versatile species within the Genus *Lactobacillus*. *PLoS One* 9, (9):e107232.
18. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., et al., (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*.;69(2): 193–202.

19. Devi, M.; Rebecca, L.J.; Sumathy, S., (2013). Bactericidal activity of the lactic acid bacteria *Lactobacillus delbreukii*. J. Chem. Paharm. Res.2013,5, 176–180
20. Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D., (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 395–397.
21. Djadouni, F.; Kihal, M., (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. Braz. Arch. Biol. Technol., 55, 435–443)
22. Domingos, J.M.B.; Puccio, S.; Martinez, G.A.; Amaral, N.; Reis, M.A.M.; Bandini, S.; Fava, F.; Bertin, L., (2018). Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. Chem. Eng. J., 336, 47–53
23. Dragone, G., Mussatto, S.I., e Silva, J.B.A., Teixeira, J.A., (2011). Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. Biomass Bioenergy.;35(5):1977–1982.
24. Elwy, A.A, Mohamed, E.A. El-Hack, Alagawany, M., A.Swelum, A., O.Osman, A., M.Saadeldin, I., Abdel-Hamid, M., O.S.Hussein, E.S., (2019). Use of Whey Protein Concentrates in Broiler Diets. J Appl. Poultry Research Volume 28, Issue 4, December (2019), Pages 1078-1088.
25. FAO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO*; FAO: Rome, Italy, (2013).
26. Fernández, C., Cuetos, M. J., Martínez, E. J., Gómez, X. (2015). Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. Biomass and Bioenergy,81, 55-62.
27. Fuller, R., (1989). A review: Probiotics in man and animals. J Appl Bact.;66(5):365-378.
28. Guorong, W., Ning, L., Mingruo Guo., (2018). Use of Whey Protein as a Natural Polymer for Tissue Adhesive: Preliminary Formulation and Evaluation In Vitro.
29. Heyman, M.B., (2006). Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents
30. Jelen, P., (2002). Utilization and products, Encyclopedia of Dairy Sciences, Whey processing (2004), pp.2739-2745.
31. Jinshui, Z., Wittou, S., Salvetti, E., Franz, C. M.A.P., Hugh, M.B.H., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Gänzle Giovanna, E., Felis,M.G., Lebeer, S., (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*.
32. John, R.P, G.S. A, Nampoothiri, K.M, Pandey, A., (2009). Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnol Adv 2009; 27:145-52.
33. John, R.P, Nampoothiri, K.M, Pandey, A., (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 74:524-34.
34. Karasova, P., Spiwok, V., Mala, S., Kralova, B., Russell, N.J, (2002). Beta-galactosidase activity in psychrotrophic microorganisms and their potential use in food industry. Czech J. Food Sci., 20: 43–47.

35. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41:103–125.
36. König, H.; Fröhlich, J., (2009). Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., Eds.; Springer: Heidelberg/Berlin, Germany.
37. Laiño, J.E., Juarez Del Valle, M., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G., (2014). Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. *Int J Food Microbiol* 191, 10–16.
38. Lappa, I.K., Papadaki A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis D., Eriotou E., Kopsahelis, N., (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347.
39. Lavari, L., Paez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., (2014). Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic *lactobacilli*. *J Dairy Res* 2014 Aug;81(3):267-74. doi: 10.1017/S0022029914000156.
40. . 2014 Aug;81(3):267-74. doi: 10.1017/S0022029914000156.
41. Law, B.A., (1999). Cheese ripening and cheese flavour technology, In: Law BA, Editor, *Tech of Cheesemak*, Sheff: Sheffield Academic Press Ltd., 163–192.
42. LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., et al. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 24, 160–168.
43. Leroy, F., Vuyst L.D., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Science and Technology*, 15, 67-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
44. Liu, J.; Dantoft, S.H.; Würtz, A.; Jensen, P.R.; Solem, C., (2016). A novel cell factory for efficient production of ethanol from dairy waste. *Biotechnol. Biofuels* 2016, 9, 33.
45. Liu, W.; Pang, H.; Zhang, H.; Cai, Y., (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*; Zhang, Y., Cai, Y., Eds.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands.
46. McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25(3):285–308.
47. Shehata, M.G., Badr, A.N., El Sohaimy, S.A, Asker, D., Awad, T.S., (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives, *Annals of Agricultural Sciences*, Volume 64, Issue 1, 2019, Pages 71-78,
48. Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., (2013). Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: *Food Industry*. Itália: InTech; 2013:549–588.
49. Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G., (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applic: Second edition*
50. Muhialdin, B.J., Saari, N., Meor Hussin A.S., (2020). Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply. *Molecules*. 2020;25(11):2655. Published (2020) Jun 7.
51. Nanoparticle-templated nanofiltration membranes for ultrahigh performance desalination. *Nat. Commun.*, 9, (2004).
52. Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S. T., Babu, R., Werker, A., Connor, K. E. O. (2013). Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer

- (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 84, 139–200.
53. Nooshkam, M.; Babazadeh, A.; Jooyandeh, H., (2018). Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 80, 23–34.
 54. Nychas, G.J., Marshal, D., Sofos, J. (2007). Meat poultry and seafood. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J., Montville (eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, pp. 91–110. USA: ASM Press.
 55. Nychas, G.J., Skandamis, P., Tassou, C., Koutsoumanis, K., (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, 78:77–89.
 56. Orla-Jensen, S., (1919). *The lactic acid bacteria*. Fred Host and Son, Copenhagen, Denmark.
 57. Ostojić, S., Pavlović, M., Živić, M., Filipović, Z., Gorjanović, S., Hranisavljević, S., Dojčinović, M. (2005). Processing of whey from dairy industry waste. *Environmental Chemistry Letters*, 3(1), 29–32.
 58. Oyewole, O.B., (1997). Lactic fermented foods in Africa and their benefits
 59. Papadimitriou, K., Pot, B., Tsakalidou, E., (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Curr Opin Food Sci* 2:29–35.
 60. Parada, J.L.; Caron, C.R.; Medeiros, A.B.P.; Soccol, C.R., (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50, 521–542.
 61. Parente, E., Cogan, T.M., (2004). Starter cultures: general aspects. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, editors. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, 4th ed. Elsevier Acad. Press, London, UK,; 123–147.
 62. Parmjit, S., Panesar, John, F., Kennedy, Charles, J., Knill, and Kosseva, M., (2010). Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey, Vol.53, n. 1: pp. 219-226, January- February 2010 ISSN 1516-8913.
 63. Pecsok, R., Shields, L., Cairns, T., McWilliam, I. (1980). Σύγχρονες μέθοδοι στη χημική ανάλυση. Αθήνα: Εκδόσεις Γ.Α. Πνευματικός.
 64. Peleg, M., (1995). A model of temperature effects on the microbial populations from growth to lethality. *Journal of Science Food and Agriculture*, 68, 83–89.
 65. Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J., (2012). Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manage.* 110, 48–68. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018
 66. Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., (2012). Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manag.*; 110:48–68.
 67. Rakhmanova, A., Kamran Shah Z.A.K., (2018). A mini review fermentation and preservation role of Lactic Acid Bacteria. *MOJ Food Process Technol.* 2018;6(5):414-417. DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00197
 68. Rastall, R.A., (2012). Galacto-Oligosaccharides as Prebiotic Food Ingredients. In *Prebiotics: Development & Application*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 101–109
 69. Rattanakaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., (2010). Lactic Acid Bacteria: Their Anti-Microbial Compounds their Uses in Food Production. *Ann Biol Res.*; 1(4):218–228.

70. Ricke, S.C., Keeton, J.T., (1997). Fermented meat poultry and fish products. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds) Food microbiology: fundamentals and frontiers, 1st edn. ASM Press, Washington, DC, pp 610–628
71. Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. Intern J Food Microb. ;79(1-2):3–16.
72. Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., & Flandrois, J.P., (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Applied and Environmental Microbiology, 61, 610–616.
73. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., et al., (1999). Probiotics: how should they be defined? Trends Food Sci Techn.;10(3):107-110.
74. Schnurer, J., Magnusson, J., (2005). Anti-Fungal Lactic Acid Bacteria as Bio Preservatives. Trends Food Sci Technol.;16(1-3):70–78.
75. Siso, M., (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technology, 57(1), 1–11.
76. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch S.R., (2017). Principles of instrumental analysis.
77. Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J., (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiol Rev 29: 591–610.
78. Somkuti, G.A., Dominiecki M.E., Steinberg, D.H., (1998). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with Ethanol. Curr Microbiol 1998 Apr;36(4):202-6. doi: 10.1007/s002849900294.
79. Song, H., Gaucher, F., Cauty, C., Jardin, J., Yves Le Loir, Jeantet, R., Xiao Dong C., Gwénaél J.,(2018). Growth in Hyper-Concentrated Sweet Whey Triggers Multi Stress Tolerance and Spray Drying Survival in *Lactobacillus casei* BL23: From the Molecular Basis to New Perspectives for Sustainable Probiotic Production. Front. Microbiol., 22 October 2018 |
80. Souza, M.J., Ardo, Y., McSweeney, P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis in cheese. Int Dairy J 11: 327–345.
81. Staroń, J.; Dąbrowski, J.M.; Cichoń, E.; Guzik, M., (2018). Lactose esters: Synthesis and biotechnological applications.Crit. Rev. Biotechnol. 2018, 38, 245–258.
82. Tamime, A.Y., (2002). Microbiology of starter cultures. In: Robinson RK, editor. Dairy microbiology handbook, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, New York, 2002; 261–366.
83. Tamime, A.Y., Robinson, R.K., (1999). Yoghurt Science and Technology, 2 Eds., Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
84. Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., et al. (2003). *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. J Bacteriol 185, 5643–5647.
85. Tiago, M.M.M., Amaro, Davide, R., Comi G., Iacumin L., (2019). Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. Front. Microbiol., 09 May.
86. Todorov, S.D., (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—Production genetic organization. Braz. J. Microbiol. 2009, 40, 209–221.
87. Troelsen, J.T., (2005). Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Volume 1723, Issues 1–3, 25 May 2005, Pages 19-32

88. Tsakali, E., Petrotos, K., D'Allessandro, A., Goulas, P., (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In 6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry FOODSIM.
89. Van Alfen, N.K., (2014). Encyclopedia of agriculture and food systems (2nd ed.). London, England; Waltham, Massachusetts: Acad Press, Elsevier Scien & Tech.
90. Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B., (2014). Phylogenetics and systematics, p 31–44. In Holzapfel WH, Wood BJB. (ed), Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom.
91. Vasiljevic, T., Jelen, P., (2001). Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria
92. Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance
93. Wang, Z.; Wang, Z.; Lin, S.; Jin, H.; Gao, S.; Zhu, Y.; Jin, J., (2018). Nanoparticle-templated nanofiltration membranes for ultrahigh performance desalination.
94. Wood, B. J. B., & Holzapfel, W. H., (1995). The genera of lactic acid bacteria (1st ed.). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
95. Yadav, J.S.S.; Yan, S.; Pilli, S.; Kumar, L.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y., (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. Biotechnol. Adv., 33,756–774.
96. Zhang, T., McCarthy, J., Wang, G.R., Liu, Y.Y., Guo, M.R., (2015). Physiochemical properties, microstructure, and probiotic survivability of nonfat goats' milk yogurt using heat-treated whey protein concentrate as fat replacer. J. Food Sci., 2015, 80, M788-M794.

Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αστερή, Ι.Α., (2011.), Νέα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από ελληνικά παραδοσιακά τυριά-Μελέτη του τεχνολογικού δυναμικού, των φυσιολογικών ιδιοτήτων και του πλασμιδιακού περιεχομένου, Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. Αντωνίου, Κ., (2009), Προσδιορισμός φαρμάκων με πρωτοταγή ή δευτεροταγή αμινομάδα με φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές μεθόδους σε σκευάσματα και βιολογικά υγρά με ταυτόχρονη συγκριτική μελέτη, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
3. Βλάχου, Κ., (2015), Απορρύπανση τυρογάλακτος με χρήση κεφίρ προς παραγωγή γαλακτικού οξέος.
4. Γεωργαράκης, Μ., (2009), Μέθοδοι ελέγχου φαρμάκων, Θεσσαλονίκη.
5. Καραδήμα, Κ., (2009), Εκτίμηση της τοξικότητας διαφόρων σταδίων επεξεργασίας αποβλήτων τυροκομικών μονάδων με χρήση βιοδεικτών. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα βιολογίας, Τομέας βιολογίας ζώων.
6. Λάππα, Ι., (2012),-Διερεύνηση της μικροχλωρίδας της Στάκας- Ταυτοποίηση βακτηρίων με την πρωτεωμική τεχνολογία της Φασματομετρίας Μαζών.

7. Μπαλασκα Μ, Τ., (2014), Μελέτη της βιοτεχνολογικής παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης μέσω βακτηριακών ζυμώσεων.