

Ιόνιο Πανεπιστήμιο  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ  
ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ  
ΓΙΑ ΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΚΛΕΙΣΙΑΡΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αργοστόλι Κεφαλληνίας

2020

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα θερμά μου ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω σε όλους όσους μου στάθηκαν σε αυτά τα υπέροχα φοιτητικά χρόνια. Αρχικά ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον κύριο Νικόλαο Κοψαχείλη και στην κυρία Ευφημία Ηρειώτου ,δύο εξαιρετους επιστήμονες που πέρα από όλα όσα μου δίδαξαν στα φοιτητικά μου χρόνια, άθελά τους μου δίδαξαν και το πιο σημαντικό, πως αν αγαπάς αυτό που κάνεις μπορείς να καταφέρεις τα πάντα. Φυσικά δεν μπορώ να παραλείψω τη Βάσω για τη βοήθεια και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακή, αλλά και την Κατερίνα και την Λήδα, που μου πρόσφεραν την βοήθεια τους όποτε την χρειάστηκα. Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στην οικογένεια και τους φίλους μου που μου στάθηκαν όσο τίποτα στον κόσμο.

## **Τριμελής Επιτροπή**

Κοψαχείλης Νικόλαος

(Επιβλέπων καθηγητής )

Ευφημία Ηρειώτου

Καχριμανίδου Βασιλική

## Πίνακας περιεχομένων

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....                                                                                                         | 6  |
| ABSTRACT.....                                                                                                         | 7  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....                                                                                                       | 8  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                                                                                                         | 8  |
| 1.1 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.....                                                                                 | 8  |
| 1.1.1 Δομή και ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....                                                            | 8  |
| Χαμηλού μοριακού βάρους (LMW).....                                                                                    | 8  |
| Υψηλού μοριακού βάρους (HMW).....                                                                                     | 9  |
| 1.1.2 Εφαρμογή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....                                                                      | 10 |
| 1.1.3 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....                                                                      | 11 |
| 1.2 Γαλακτικά βακτήρια.....                                                                                           | 14 |
| 1.3 Τυρόγαλο - Προέλευση τυρογάλακτος.....                                                                            | 16 |
| 1.3.1 Σύσταση τυρογάλακτος.....                                                                                       | 17 |
| 1.3.2 Επεξεργασία και Αξιοποίηση τυρογάλακτος.....                                                                    | 17 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....                                                                                                       | 19 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                                                                                | 19 |
| 2.1 Προετοιμασία πειράματος.....                                                                                      | 21 |
| 2.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών στο τυρόγαλο.....                                                                          | 22 |
| 2.3 Αιμολυτική ικανότητα.....                                                                                         | 22 |
| 2.4 Μετατόπιση ελαίου.....                                                                                            | 23 |
| 2.5 Δείκτης γαλακτωματοποίησης.....                                                                                   | 23 |
| 2.6 Κατανάλωση λακτόζης.....                                                                                          | 24 |
| 2.7 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους, total dry weight.....                                                                | 25 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....                                                                                                       | 26 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ<br>ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ-ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....          | 26 |
| 3.1 Αιμολυτική ικανότητα.....                                                                                         | 26 |
| 3.2 Μετατόπιση ελαίου.....                                                                                            | 29 |
| 3.3 Δείκτης γαλακτωματοποίησης.....                                                                                   | 31 |
| 3.4 Κατανάλωση λακτόζης.....                                                                                          | 39 |
| 3.5 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους, total dry weight.....                                                                | 41 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....                                                                                                       | 43 |
| ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ<br>ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΟ ΤΥΡΟΓΑΛΟ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ..... | 43 |
| 4.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ pH.....                                                                           | 44 |
| 4.1.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΠΟ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ).....                                                            | 44 |
| 4.1.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΠΟ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ) ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ<br>ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ.....                          | 47 |
| 4.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΜΕ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ pH.....                                                                              | 55 |
| 4.2.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΑΔΕΥΣΗ.....                                                                                       | 55 |
| 4.2.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ).....                                                             | 63 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....                                                                                                       | 72 |
| ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....                                                                                  | 72 |
| 5.1 Επίδραση της ανάδευσης στις ζυμώσεις με έλεγχο pH και αερόβιες συνθήκες.....                                      | 72 |
| 5.2 Επίδραση του ελέγχου pH και η εφαρμογή αερόβιων ή μικροαερόφιλων συνθηκών.....                                    | 79 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....                                                                                                       | 86 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                                                                                           | 86 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....                                                                                                       | 87 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....                                                                                          | 87 |
| Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία.....                                                                                        | 87 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| Ξενόγλωσση βιβλιογραφία..... | 88 |
|------------------------------|----|

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται χρησιμοποιώντας σαν πρώτη ύλη το πετρέλαιο, είτε από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο το υψηλό κόστος παραγωγής τους, παράλληλα με τον τοξικό και δύσκολα βιοδιασπώμενο χαρακτήρα τους. Επίσης, καθώς παράγονται από παθογόνα στελέχη, δεν είναι δυνατό να ενταχθούν σε τρόφιμα και προϊόντα τροφίμων, αλλά και γενικά στη βιομηχανία τροφίμων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus*. Για να περιοριστεί το υψηλό κόστος παραγωγής, ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη τα απόβλητα τυροκόμησης. Κύριο απόβλητο των βιομηχανιών αυτών αποτελεί το τυρόγαλο, το οποίο αποτελεί μείζονος σημασίας όσον αφορά στη διαχείριση και την απόρριψη στο περιβάλλον, ωστόσο αποτελεί ένα φθηνό και ιδανικό υπόστρωμα για βιοτεχνολογικές εφαρμογές και ειδικότερα για την ανάπτυξη των βακτηρίων λόγω της περιεκτικότητας του σε λακτόζη.

Στο πρώτο στάδιο της εργασίας, μελετήθηκαν 50 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, τα οποία ελέγχθηκαν μέσω διαφορετικών πειραματικών μεθόδων με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία. Ειδικότερα μελετήθηκε η αιμολυτική ικανότητα, ο δείκτης γαλακτωματοποίησης και η μετατόπιση ελαίου ενώ αξιολογήθηκε και η κατανάλωση λακτόζης. Έπειτα έγινε αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους, και επιλέχθηκαν δέκα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων με την καλύτερη επίδοση ώστε να μελετηθούν περαιτέρω σε ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλο και πηγή άνθρακα τη λακτόζη.

Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων στο τυρόγαλο εφαρμόστηκαν και μελετήθηκαν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας οι οποίες συνδέονται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ειδικότερα μελετήθηκε η επίδραση του ελέγχου της τιμής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η επίδραση της ανάδευσης εφαρμόζοντας στατικές και αναδευόμενες συνθήκες καθώς και η επίδραση των αερόβιων ή μικροαερόφιλων συνθηκών καλλιέργειας. Συμπερασματικά, παρόλο που παρατηρήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε όλα τα στελέχη χρησιμοποιώντας το τυρόγαλο ως θρεπτικό υπόστρωμα, τα επιλεγμένα στελέχη παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση όσον αφορά την κατανάλωση λακτόζης, την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σχετιζόμενη με το δείκτη γαλακτωματοποίησης ( $E_{24,\%}$ ) και την παραγωγή ολικού ξηρού βάρους.

## ABSTRACT

Currently, surfactants production is relying either on petroleum utilisation as onset material or using bacterial strains. As a result, surfactant production entails a high cost of production, whereas the use of pathogenic strains hinders further implementation on food applications and food industry.

In the present study, biosurfactant production using *Lactobacillus* strains was investigated. On top of that, cheese whey was implemented as the fermentation feedstock aiming to reduce the production cost that hinders industrial production of biosurfactants. Cheese whey constitutes a by-product from cheese manufacturing that is currently underutilised and primarily disposed in the environment, causing environmental issues. However, the high lactose content can find biotechnological applications particularly in microbial bioconversion processes.

Initially, fifty different *Lactobacillus* strains were selected from several culture collections and were subsequently screened for their ability to produce biosurfactants using screening methods found in the literature. More specifically, haemolytic activity, emulsification index and oil displacement tests were employed. Lactose consumption was also evaluated as an indicator for further utilisation of cheese whey as the nutrient supplement. Ten different strains were selected for further study in bacterial bioconversion in shake flask cultures using lactose from cheese whey as the carbon source.

Subsequently, several parameters on culture conditions were assessed in different fermentation time points. More specifically, the effect of pH control during fermentation, the effect of agitation and static conditions and the effect of aerobic and microaerophilic conditions were evaluated. Biosurfactant production was observed in all occasions, regardless the significant variations following the different fermentation strategies. Lactose consumption and total dry weight production was also estimated along with emulsification index ( $E_{24, \%}$ ) that is related to biosurfactants production.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια (ενώσεις) παραγόμενα από μια πληθώρα μικροοργανισμών. Παρουσιάζουν ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την επιφανειακή τάση (Rodrigues, L. R. et al., 2008). Οι συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παράγονται κατά κύριο λόγο με χημικούς τρόπους με πρώτη ύλη το πετρέλαιο. Συνεπώς παρουσιάζουν σημαντικό κόστος ενώ παράλληλα η αποικοδόμησή τους στο περιβάλλον γίνεται δύσκολα με αποτέλεσμα να επέρχεται μεγάλη μόλυνση. Τα τελευταία χρόνια παράγονται επιφανειοδραστικά μόρια βιολογικής προέλευσης ώστε να αξιοποιηθούν από βιομηχανίες πετρελαίου, τροφίμων, καλλυντικών αλλά και φαρμάκων.

#### 1.1.1 Δομή και ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Αναφορικά με τη δομή τους, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλες ενώσεις και αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος. Το υδρόφοβο μέρος τείνει να δημιουργεί έναν πυρήνα αφήνοντας εκτεθειμένο το υδρόφιλο μέρος. Η ιδιότητα αυτή δίνει τη δυνατότητα σύνδεσης υδρογονανθράκων με νερό αλλά και γενικά τη σύνδεση σε διαστικά συστήματα και μεταξύ φάσεων διαφορετικής πολικότητας π.χ αέρα- υγρού, στερεού- υγρού, υγρού- υγρού. Αυτό οφείλεται στο ότι οι επιφανειοδραστικές ουσίες μειώνουν την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση ρυθμίζοντας την διάταξη των υγρών μορίων και επηρεάζοντας τον σχηματισμό στους δεσμούς υδρογόνου. Μια άλλη σημαντική ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι ότι μπορούν να σταθεροποιούν γαλακτώματα (γαλακτωματοποίηση) και να αποσταθεροποιούν γαλακτώματα (απογαλακτωματοποίηση) (Φωτοπούλου, Ν., 2019). Επίσης μία ακόμη ιδιότητα είναι οι αντιμικροβιακές ιδιότητες σε διάφορους μικροοργανισμούς, ειδικότερα παθογόνων, καθώς και ο μη τοξικός και ο βιοαποικοδομήσιμος χαρακτήρας τους (Zajic, J. E. et al., 1983).

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το μοριακό τους βάρος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν. Με αυτόν τον τρόπο διακρίνονται σε χαμηλού μοριακού βάρους και υψηλού μοριακού βάρους επιφανειακούς παράγοντες του οποίους θα αναλύσουμε παρακάτω.

#### ▪ Χαμηλού μοριακού βάρους (LMW)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα γλυκολιπίδια, τα λιποπεπτίδια (surfactin) και τα φωσφολιπίδια.

##### ➤ Τα γλυκολιπίδια

Ως επιφανειοδραστικοί παράγοντες έχουν μελετηθεί αρκετά με τους κυριότερους να είναι τα ραμνολιπίδια, σοφορολιπίδια και τα τρεαλολιπίδια.

Τα ραμνολιπίδια (Rhamnolipids), περιέχουν στη δομή τους μία ή δύο ραμνόζες και για λιπιδιακό μέρος ένα ή δύο υδροξυ-λιπαρά οξέα. Σε αυτήν την κατηγορία μεγάλη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί με το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* το οποίο ωστόσο είναι παθογόνο για τον άνθρωπο. Το καταλληλότερο υπόστρωμα για ανάπτυξη θεωρείται η γλυκόζη, η γλυκερόλη ή τα τριγλυκερίδια. Η ανάπτυξή τους επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, το οξυγόνο καθώς και τις πηγές άνθρακα και των θρεπτικών υλικών που βρίσκουν στη διάθεση τους (Lang, Siegmund., 2002).

Τα σοφορολιπίδια (Sophorolipids) διαφέρουν λίγο ως προς την δομή τους καθώς ένα διμερές σοφορόζης ενώνεται με γλυκοζιτικό δεσμό με μία μακριά αλυσίδα υδροξυ-λιπαρού οξέος. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν διάφορα στελέχη ζύμης όπως π.χ το γένος *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum*, *T. apicola* που δεν αποτελούν παθογόνα για τον άνθρωπο και ζυμομύκητες όπως π.χ το *Candida bombicola*.

Τα τρεαλολιπίδια (Trehalolipids) είναι γλυκολιπίδια τα οποία αποτελούνται από δύο μόρια γλυκόζης (δισακχαρίτης) συνδεδεμένα με α γλυκοσιδικό δεσμό. Τα λιπίδια αυτά προέρχονται από είδη όπως το Actinomycetes, το Mycobacterium, το Nocardia και το Corynebacterium (Lin, Sung-Chyr., 1996).

#### ➤ Τα λιποπεπτίδια

Τα λιποπεπτίδια αποτελούνται από ένα λιπίδιο που συνδέεται με μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Πολλά λιποπεπτίδια έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι μυκήτων, βακτηρίων και ιών ενώ τα αντιβιοτικά που περιέχουν στην δομή τους πεπτίδια φαίνεται να εμφανίζουν επιφανειακά δραστικές ιδιότητες. Τα αντιβιοτικά όπως η γραμμιδίνη, τα λιποπεπτιδικά αντιβιοτικά (πολυμυξίνες) και το κυκλικό λιποπεπτίδιο που παράγεται από τους βάκιλους, *B. polymyxa* και *B. subtilis* παρουσιάζουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες.

#### ➤ Τα φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα και φυσικά λιπίδια:

Διάφορα βακτήρια και ζυμομύκητες (π.χ. *Thiobacillus thiooxidans*, *Aspergillus* spp., *Arthobacter*, *P. aeruginosa*) έχουν τη δυνατότητα να βιοσυνθέτουν σημαντικές ποσότητες λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων όταν αναπτύσσονται σε L-αλκάνια. Οι προαναφερθείσες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες δύνανται να χρησιμοποιούνται σε ιατρικές εφαρμογές (Singh et al., 2012).

### ■ Υψηλού μοριακού βάρους (HMW)

Στις επιφανειοδραστικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες, πολυακρυλαμίδια, πολυβινυλική αλκοόλη) οι υδρόφοβες και οι υδρόφιλες ομάδες κατανέμονται εναλλάξ σε όλη τη δομή του μορίου (Kruglyakov, Pyotr M., 2000). Συνήθως παράγονται εξωκυτταρικά από διάφορα είδη βακτηρίων όπως τα *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizospora malanogramma*, *Ustilago maydis* και *Pseudomonas* spp. αποτελούνται από σύμπλοκα μεταξύ πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης, λιποπολυσακχαρίτων, λιποπρωτεΐνων, λιποσάνης και μαννοπρωτεΐνης και είναι αναγνωρισμένα ως πολυμερή βιοεπιφανειοδραστικά. Επίσης, μερικά από

τα παραπάνω στελέχη χρησιμοποιούνται σε προϊόντα εμπορικής χρήσης (π.χ. Liposan, alasan, lipomanan Emulsan) λόγω της ιδιότητας να δημιουργούν ισχυρά γαλακτώματα.

### 1.1.2 Εφαρμογή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών με βάση τη δομή και τις ιδιότητες που παρουσιάζουν. Ο κύριος τομέας που χρησιμοποιούνται αφορά στην εξαγωγή πετρελαίου και στον καθαρισμό των δεξαμενών, στη διευκόλυνση της μεταφοράς αργού πετρελαίου από τους αγωγούς, αλλά και στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από το έδαφος (Carrillo, P. G. et al., 1996, Singh Vandana., 2012). Επίσης μικροοργανισμοί όπως ο *Bacillus subtilis*, ο *Pseudomonas aeruginosa* και ο *Torulopsis bombicola* χρησιμοποιούν ως πηγές άνθρακα τους υδρογονάνθρακες και το αργό πετρέλαιο, συνεπώς δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων από τη θάλασσα σε περίπτωση ατυχήματος (Carrillo, P. G. et al., 1996).

Ως ένα ακόμα παράδειγμα, οι επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν συστατικό στα απορρυπαντικά πλυντηρίων και στα σαπούνια, διότι βοηθούν στον καθαρισμό και στην αφαίρεση λεκέδων. Ωστόσο, οι συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες λόγω της μη αποικοδόμησης και της τοξικότητας που παρουσιάζουν καθιστούν αυτό το έργο δύσκολο, καθώς μολύνουν το περιβάλλον, δυσχεραίνοντας έτσι την εφαρμογή τους. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες αλλά και μύκητες, δύνανται να παρουσιάσουν μια εναλλακτική λύση, για να αντιμετωπιστεί το χαρακτηριστικό της μη αποικοδόμησης που παρουσιάζουν οι συνθετικές επιφανειοδραστικές. Παρουσιάζουν ίδιες ή/και αντίστοιχες ιδιότητες με της χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες, διαφέρουν ωστόσο στο γεγονός ότι είναι βιοαποικοδομήσιμες και παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα τοξικότητας. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλούς τομείς χωρίς να παρουσιάζουν πρόβλημα, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν τους περιβαλλοντικούς κινδύνους, ενισχύοντας την αναζήτηση εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών (Fiechter, Armin., 1992).

Άλλες εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών απαντούν στη βιομηχανία καλλυντικών και των φαρμάκων, των τροφίμων αλλά και σε τομείς όπως η υγεία και η γεωργία, ενώ αρχίζουν να εντάσσονται στις βιομηχανίες χαρτιού, άνθρακα, κλωστοϋφαντουργίας, καθώς και επεξεργασίας πολτού και κεραμικών.

Αναφορικά με τη βιομηχανία καλλυντικών οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μελετώνται λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Ειδικότερα, η ικανότητα γαλακτωματοποίησης, η ικανότητα δέσμευσης νερού και οι ιδιότητες διαβροχής και αφρισμού δύνανται να αντικαταστήσουν τα χημικά επιφανειοδραστικά με σκοπό την δημιουργία καλύτερων προϊόντων. Μερικά από αυτά τα προϊόντα στη βιομηχανία καλλυντικών είναι καθαριστικά και προϊόντα μπάνιου, προϊόντα κατά της πιτυρίδας, διαλύματα φακών επαφής, κραγιόν, οδοντόκρεμες, καθαριστικά οδοντίνης, μαξιλάρια ακμής, αντιόξινα κ.τ.λ.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και στην ιατρική καθώς έχουν δείξει ισχυρή αντιμυκητιακή, αντιβακτηριδιακή και αντική δράση. Πιο συγκεκριμένα αντιμικροβιακή δραστηριότητα παρουσίασε το *B. Circulans* σε παθογόνα μικροβιακά στελέχη. Ακόμη, τα γλυκολιπίδια και τα λιποπεπτίδια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αντιβιοτικών (π.χ.

surfactin από το στέλεχος *B. Subtilis*) ενώ τα ραμνολιπίδια παράγονται από το βακτήριο *P. aeruginosa*.

Πλέον οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αρχίζουν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη βιομηχανία μεταποίησης τροφίμων. Λόγω της ικανότητας που έχουν να μειώνουν την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση προωθούν το σχηματισμό και την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων. Επίσης τα βιολογικά επιφανειοδραστικά θεωρούνται ως αντι-συγκολλητικοί παράγοντες αφού δεν επιτρέπουν την προσκόλληση παθογόνων οργανισμών σε στερεές επιφάνειες και περιοχές μόλυνσης (Rodrigues, L. R. et al., 2008). Μερικές ακόμα χρήσεις στη βιομηχανία τροφίμων αφορούν κυρίως τη βελτίωση της υφής των προϊόντων και την τροποποίηση των ρεολογικών ιδιοτήτων όπως για παράδειγμα της ζύμης σίτου, την παράταση ζωής σε προϊόντα που περιέχουν άμυλο, αλλά και την βελτίωση της συνεκτικότητας, της συσσωμάτωσης και της υφής σε προϊόντα με βάση το λίπος.

### 1.1.3 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Μέχρι σήμερα οι επιφανειοδραστικές ενώσεις συντίθενται χημικά, με το πετρέλαιο σαν πρώτη ύλη. Ωστόσο, το κόστος και ο εφοδιασμός του πετρελαίου, μαζί με τον τοξικό και δύσκολα βιοδιασπώμενο χαρακτήρα επιτείνουν τα περιβαλλοντικά προβλήματα που απορρέουν από την χρήση αυτών. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, δεν είναι σε θέση ακόμα να ανταγωνιστούν με τα χημικά συνθετικά προϊόντα. Αυτό οφείλεται υψηλό κόστος παραγωγής που προκύπτει από τη χρήση υποστρωμάτων υψηλού κόστους αλλά και από την επεξεργασία και ανάκτησή τους (downstream processing). Τα πλεονεκτήματα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (ιδιότητες γαλακτωματοποίησης, βιοαποικοδομησιμότητα, χαμηλή τοξικότητα) εντείνουν την έρευνα αναφορικά με την παραγωγή και τις εφαρμογές τους.

Η ποιότητα αλλά και η ποσότητα των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτάται όχι από το στέλεχος αλλά και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Ειδικότερα, επηρεάζονται από την επάρκεια των θρεπτικών υλικών (την πηγή άνθρακα και την πηγή αζώτου) που έχουν στην διάθεσή τους οι μικροοργανισμοί καθώς και τη μεταξύ τους αναλογία, όπως ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C:N). Πέρα από τα θρεπτικά υλικά σημαντικό ρόλο έχουν οι χημικές και φυσικές παράμετροι που όπως η θερμοκρασία, το pH, η παρουσία άλατος, αλλά και το επίπεδο οξυγόνου και η ταχύτητα ανάδευσης τα οποία όπως και σε κάθε άλλη ζύμωση, ασκούν σημαντική επίδραση στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Fakruddin, Md., 2012).

**Πηγές άνθρακα:** Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτάται από το υπόστρωμα στο οποίο θα αναπτυχθούν οι διάφοροι μικροοργανισμοί που θα τις παράξουν. Το πετρέλαιο, η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η γλυκερόλη, αποτελούν πολύ καλές πηγές υποστρώματος άνθρακα. Η φύση του υποστρώματος επηρεάζει τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα (κυρίως τη δομή) των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

**Πηγές αζώτου:** Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης που πρέπει να ληφθεί υπόψιν κατά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι το άζωτο καθώς είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη μικροβίων. Διάφορες αζωτούχες ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όπως το εκχύλισμα ζύμης, το θειικό αμμώνιο, το νιτρικό αμμώνιο, το νιτρικό νάτριο, το εκχύλισμα κρέατος και τα εκχυλίσματα βύνης. Η χρήση των ενώσεων και η

αρχική συγκέντρωση εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και το μέσο καλλιέργειας. Για παράδειγμα τα νιτρικά άλατα παρουσίασαν μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο *P. Aeruginosa*, ενώ το *Arthrobacter paraffineus* παρουσίασε μεγαλύτερη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών σε άλατα αμμωνίου.

**Συγκέντρωση άλατος:** Οι κυτταρικές δράσεις των διάφορων μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάζονται από τη συγκέντρωση άλατος σε ένα συγκεκριμένο μέσο, που σημαίνει ότι μπορεί να έχει αντίστοιχη επίδραση και στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

**Περιβαλλοντικοί παράγοντες:** Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτάται και από διάφορους παράγοντες καλλιέργειας όπως η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και η ταχύτητα ανάδευσης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τις συνθήκες ζύμωσης των διάφορων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποσότητα αλλά και η ποιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

**Οξυγόνο και ανάδευση:** Η παρουσία οξυγόνου και ο ρυθμός ανάδευσης μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, καθώς οι απαιτήσεις σε οξυγόνο μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος του μικροβιακού στελέχους.

Συμπερασματικά, η έρευνα αναφορικά με τη χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών διαρκώς εντείνεται τα τελευταία χρόνια. Το υψηλό κόστος παραγωγής, που προέρχεται από το θρεπτικό υπόστρωμα της ζύμωσης αλλά και το κόστος καθαρισμού και ανάκτησης δυσχεραίνουν τη βιομηχανική παραγωγή τους. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαίο να εντοπιστούν τρόποι και λύσεις που θα συντελέσουν στη μείωση αυτού του κόστους. Μια από τις προτεινόμενες στρατηγικές είναι η χρησιμοποίηση ανανεώσιμων πρώτων υλών και αποβλήτων τροφίμων στη διεργασία της ζύμωσης.

Διάφορες μελέτες της βιβλιογραφίας αφορούν στη χρησιμοποίηση αποβλήτων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με μικροβιακά στελέχη. Ειδικότερα, απόβλητα που προκύπτουν από την επεξεργασία ζαχαροκάλαμου (π.χ μελάσσα), αμυλούχων ουσιών, τυροκομικών προϊόντων, ακόμα και φυτικών ελαίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μειώνοντας το κόστος της πρώτης ύλης (Rodrigues, L. R. et al., 2008).

Μερικά παραδείγματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από μικροβιακά στελέχη αφορούν στο στέλεχος *Bacillus subtilis* που καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με απόβλητα από διεργασίας πατάτας και ξηρά άλευρα (μανιόκας) καθώς και η καλλιέργεια του στελέχους *Pseudomonas aeruginosa* σε φυτικά ελαία (σογιέλαιο, ηλιέλαιο, ηλίανθο κ.α.) ή απόβλητα τυροκομείου όπως το τυρόγαλο. Επίσης στο τυρόγαλο δοκιμάστηκαν και τα στελέχη *Streptococcus thermophilus* και *Lactococcus lactis* για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών παρουσιάζοντας υποσχόμενα αποτελέσματα.

Ωστόσο, τα στελέχη *Pseudomonas* και *Bacillus* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο αποκλείοντας με αυτόν τον τρόπο την εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε τρόφιμα. Από την άλλη πλευρά, τα γαλακτικά βακτήρια δύνανται να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, συνεπώς έχουν μελετηθεί σε διάφορες έρευνες αναφορικά με αυτή τους την ιδιότητα. Αντίστοιχα, το τυρόγαλο, ως παραπροϊόν της διαδικασίας τυροκόμησης, έχει εφαρμοστεί σε πληθώρα μελετών για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως θα αναφερθεί

στην επόμενη ενότητα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, συνεπώς αφορά στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα στη ζύμωση για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με γαλακτικά βακτήρια με απώτερο στόχο και την εφαρμογή σε τρόφιμα.

## 1.2 Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια των *Lactobacillaceae* (Gram+ βακτήρια) με κύρια γένη τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Από τα παραπάνω γένη, τα βακτήρια του είδους *Streptococcus* διακρίνονται σε παθογόνους κόκκους (σταφυλόκοκκοι-μαστίτιδες) αλλά και σε μη παθογόνα βακτήρια όπως το *Streptococcus lactis* και το *Streptococcus thermophilus* που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών και γιαούρτης. Το *Leuconostoc* που ανήκει στην ίδια οικογένεια διακρίνεται για την παραγωγή αιθανόλης και αρωματικών. (Κοτροκόης, Κ., Παπαδογιαννάκης, Ε., 2009)

Αναφορικά με το γένος *Lactobacillus*, είναι ραβδόμορφα βακτήρια, σχετικά μακριά και σχηματίζουν μια ελαφριά καμπύλη. Μπορούν να σχηματίζουν αλυσίδες κυττάρων και κατά γενικό κανόνα οι λακτοβάκιλλοι είναι ακίνητοι με εξαίρεση μερικούς που φέρουν περίτριχες βλεφαρίδες. Έχουν υψηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή τους (αμινοξέα, πεπτίδια βιταμίνες, άλατα κ.α.), είναι μικροαερόφιλα και αποδίδουν καλύτερη ανάπτυξη όταν υπάρχει 5-10% CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα. Επίσης δεν ανάγουν τα νιτρικά άλατα και δεν σχηματίζουν ινδόλη και υδρόθειο. Η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται από 2 °C έως 52 °C με την καλύτερη θερμοκρασία να βρίσκεται μεταξύ 30 °C και 40 °C. Ακόμη παρά το γεγονός ότι είναι οξεογαλακτικά βακτήρια η καλύτερη τιμή pH για την ανάπτυξή τους είναι η τιμή μεταξύ 4.0- 5.0 ενώ στις τιμές μεταξύ 7.0-14.0 ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται (Μπαλατσούρας, Γ. 2006, Salminen et al., 1993).

Ανάλογα το είδος του *Lactobacillus*, διακρίνονται τρεις κατηγορίες με βάσει την ζύμωσή τους ως εξής

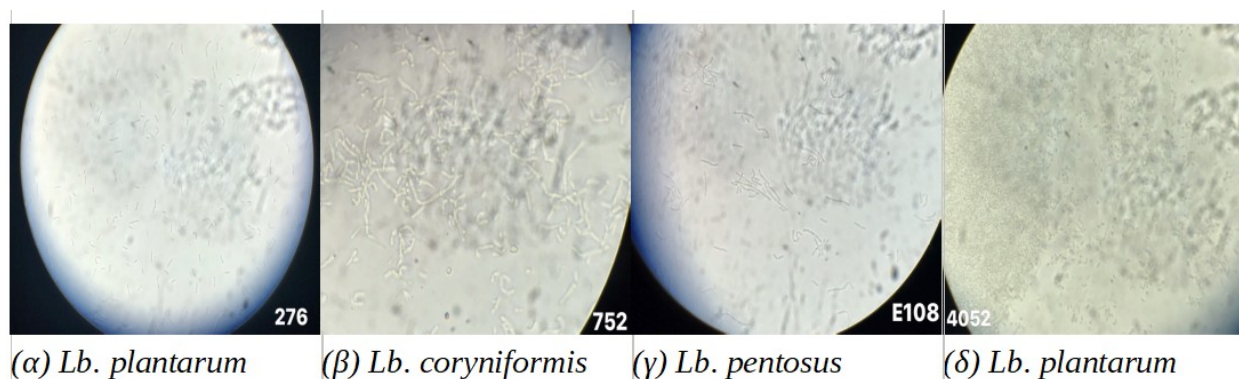
- ομοζυμωτικά
- προαιρετικά ετεροζυμωτικά
- υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) έχουν, ως προς την πλειοψηφία τους, χαρακτηριστεί ως GRAS συνεπώς είναι ασφαλή ως προς την χρήση τους σε διάφορα τρόφιμα και προϊόντα τροφίμων. Τεκμαίρεται ότι διαθέτουν ένα μείζονος σημασίας χαρακτηριστικό ώστε να μελετηθούν ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, καθώς μέχρι στιγμής έχουν παραχθεί κυρίως από παθογόνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς. Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια υποδεικνύει καινοτόμες χρήσεις και εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, φαρμακοβιομηχανιών αλλά και σε άλλους τομείς.

Σημαντική έρευνα έχει ήδη πραγματοποιηθεί με στελέχη του γένους *Lactobacillus*, καθώς έχει αποδειχτεί η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και μάλιστα με τις ίδιες ή αντίστοιχες ιδιότητες που παρουσιάζουν οι χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Επίσης εξετάζονται ως προς τις αντιμικροβιακές, αντιβιοτικές και αντι-προσκολλητικές ιδιότητες τους. Όπως αναφέρουν οι (Satpute, Surekha et al., 2016), οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που προέρχονται από το γένος *Lactobacillus* έχουν παρουσιάσει μεγάλη αντι-προσκολλητική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα αυτό να είναι χρήσιμο αργότερα στα τρόφιμα αλλά και στην

υγεία. Ένα παράδειγμα αποτελεί το *Lactobacillus lactis* στο οποίο οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές επέδειξαν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των παθογόνων *E. Coli* και *S.aureus* (Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S.,2016).

Οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που προέρχονται από LAB βακτήρια υποδεικνύουν προοπτικές για μελλοντικές και καινοτόμες εφαρμογές, όπως το σχηματισμό βιοφίλμ και την εφαρμογή σε τρόφιμα για προϊόντα με υψηλή προστιθέμενη αξία. Παράλληλα μέσω της αξιοποίησης βιομηχανικών αποβλήτων σαν θρεπτικό υπόστρωμα στη διαδικασία ζύμωσης δίνεται η δυνατότητα για μείωση του κόστους παραγωγής.



**Εικόνα 1.1:** Διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στο μικροσκόπιο.

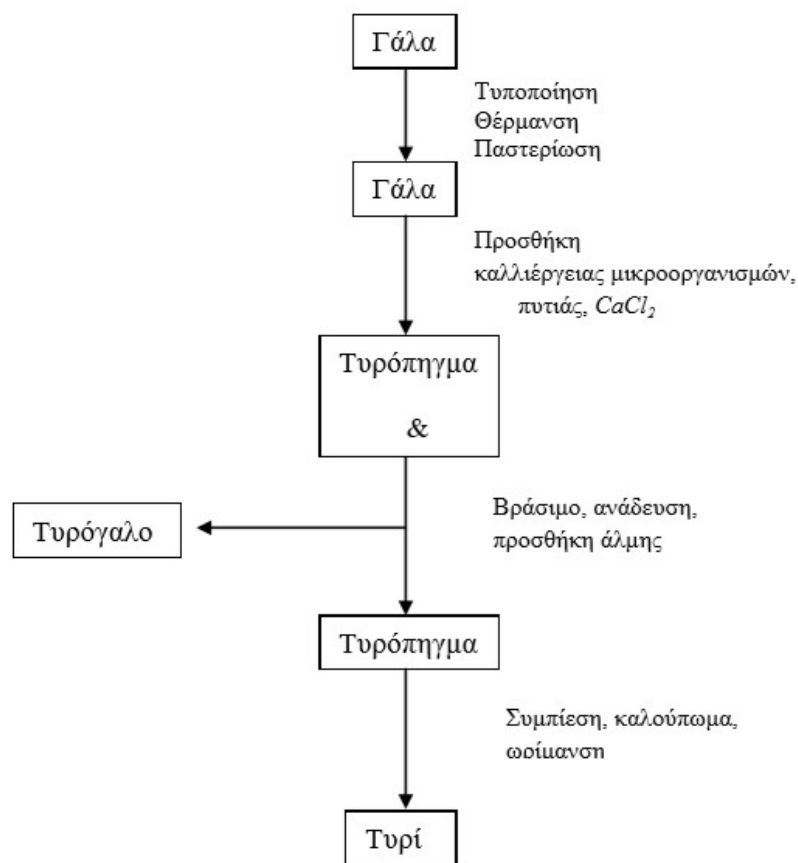
### 1.3 Τυρόγαλο - Προέλευση τυρογάλακτος

Οι βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων τείνουν να αυξάνονται και να παράγουν συνεχώς καινούρια προϊόντα καθώς προσαρμόζονται συνέχεια στην καταναλωτική αγορά, έχοντας όμως, σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο αριθμός των βιομηχανικών αποβλήτων που προκύπτουν από αυτές. Ένα από τα απόβλητα αυτά είναι και το τυρόγαλο. Το τυρόγαλο προκύπτει μέσα από την διαδικασία παραγωγής τυριών και ειδικότερα στην Ελλάδα κατά την παραγωγή της φέτας (Βλάχου, Κ., 2015, Νικολάου, Γ., 2013).

Ο ακριβής ορισμός του τυρογάλακτος σύμφωνα με τον Κανονισμό 625/30-3-1978 ΕΕ αφορά στο προϊόν το οποίο λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς ή/ και φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης. (Τομαρά, Δ., 2018). Επίσης, ο κώδικας αρχών και διεθνών οργανισμών FAO/WHO για το τυρόγαλο (Codex Stan A-7-1978) ορίζει ότι είναι το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια παρασκευής των τυριών, της καζεΐνης, ή παρόμοιων προϊόντων που λαμβάνονται από το τυρόπηγμα μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από το γάλα. Η πήξη επιτυγχάνεται μέσω της δράσης, κυρίως, ενζύμων τύπου πυτιάς (Τομαρά, Δ., 2018).

Σε παγκόσμια κλίμακα η παραγωγή τυρογάλακτος υπολογίζεται περί τους 160 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Στην Ελλάδα οι γαλακτοβιομηχανίες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην οικονομία της χώρας, παράγοντας παράλληλα και σημαντική ετήσια ποσότητα αποβλήτων. Συνεχίζει όμως να παράγει σημαντική ποσότητα αποβλήτων, τα οποία συνήθως καταλήγουν σε ποτάμια, λίμνες, και θάλασσες, μολύνοντας το περιβάλλον και τους υδάτινους υδροβιότοπους, με αρνητικό αντίκρυσμα. Αποτελεί ένα υγρό απόβλητο με κιτρινοπράσινο χρώμα λόγω της χρωστικής ριβοφλαβίνης (Βιταμίνη B2) η οποία υπάρχει στο γάλα και μεταφέρεται στο τυρόγαλο κατά την τυροκόμηση (Θεολόγου, Σ., 2018).

Η φέτα κατατάσσεται στα μαλακά τυριά και φτιάχνεται είτε από πρόβειο, αιγοπρόβειο ή ακόμα και αγελαδινό γάλα. Το γάλα παστεριώνεται (στους 63 °C για 30 λεπτά) ώστε να καταστραφούν τα παθογόνα βακτηρία που μπορεί να υπάρχουν ή και να έχουν αναπτυχθεί στο γάλα. Έπειτα το γάλα που θα τυροκομηθεί ψύχεται (στους 32-34 °C) και εμβολιάζεται με γαλακτικά βακτήρια (κυρίως οξεογαλακτικά) παραμένοντας στην ίδια θερμοκρασία για να επωαστούν και τοποθετείται η πυτιά για να προκληθεί πήξη του γάλακτος. Είναι μια διαδικασία που οφείλεται κυρίως στη ζύμωση που προκαλούν τα γαλακτικά βακτήρια στην λακτόζη, με αποτέλεσμα να παράγουν γαλακτικό οξύ και να μειώνουν το pH στο τυρόπηγμα προκαλώντας οξίνιση και ευνοώντας έτσι στην αποβολή τυρογάλακτος. (Μπλούκας, Ι., 2004).



**Σχήμα 1.1:** Διαδικασία παραγωγής τυριού (Βανετσανέας, Ν., 2012).

Κατά την τυροκόμηση, η προσθήκη αλατιού (NaCl) στο τυρόπηγμα μαζί με βράσιμο και ανάδευση βοηθάει σημαντικά στον διαχωρισμό και την αποστράγγιση του τυρογάλακτος από το τυρόπηγμα, ενώ παράλληλα συμβάλλει στη σκλήρυνση και την ωρίμανση του τυριού (Κοτροκόης, Κ., Παπαδογιαννάκης, Ε., 2009). Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται με διαίρεση και στράγγιση με τη μέθοδο της συμπίεσης του τυροπήγματος και την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερου τυρογάλακτος, καθώς και στην τελική μορφή (καλούπωμα) που θα πάρει το τυρί, εφόσον το τελικό στάδιο είναι η ωρίμανση και η αποθήκευση (Μπλούκας, Ι., 2004).

### 1.3.1 Σύσταση τυρογάλακτος

Όσον αφορά στη σύσταση του τυρογάλακτος, το μεγαλύτερο μέρος αποτελείται από νερό, ενώ σε ποσοστό περίπου 50 – 60% αντιστοιχεί η λακτόζη. Σε μικρότερο, αλλά εξίσου σημαντικό ποσοστό βρίσκονται οι πρωτεΐνες καθώς και μεταλλικά στοιχεία που από το γάλα μεταφέρονται στο τυρόγαλο. Αξιοσημείωτο είναι ότι την παραγωγή 1 Kg τυριού λαμβάνονται 9 λίτρα τυρόγαλου.

### 1.3.2 Επεξεργασία και Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Μέχρι στιγμής η πλήρης δυναμική του τυρογάλακτος δεν αξιοποιείται αρκετά, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος να καταλήγει στο περιβάλλον εντείνοντας την περιβαλλοντική ρύπανση. Το τυρόγαλο επιδέχεται κάποιου είδους επεξεργασία και με τη βοήθεια του ενζύμου λακτάση ή αλλιώς β-γαλακτοσιδάση, η λακτόζη ως ο κύριος δισακχαρίτης του τυρογάλακτος, υδρολύεται σε D- γλυκόζη και την D- γαλακτόζη. Με τον τρόπο αυτό, ήτοι την υδρόλυση του τυρογάλακτος, το προϊόν που θα προκύψει θα είναι γλυκύτερο του γάλακτος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φυσική γλυκαντική ύλη σε παρασκευάσματα παγωτού ή και γλυκισμάτων, στα οποία επιθυμητό χαρακτηριστικό είναι η κρεμώδης υφή (Μπατρίνου, Α., 2011).

Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε λακτόζη και πρωτεΐνη που περιέχει το τυρόγαλο, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αξιοποίηση και την παραγωγή προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία και τη μετέπειτα εφαρμογή τους στα τρόφιμα. Ο σκοπός έγκειται στην παραγωγή νέων προϊόντων μέσω της αξιοποίησης βιομηχανικών αποβλήτων, όπως το τυρόγαλο, μειώνοντας παράλληλα την οικολογική καταστροφή που προκαλείται από αυτά.

Μερικά παραδείγματα αξιοποίησης του τυρογάλου αποτελούν η παραγωγή βιοφιλμ και η παραγωγή καροτενοειδών με τη χρήση διάφορων μικροοργανισμών σε διεργασίες ζυμώσεων. Η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος μετά από επεξεργασία χρησιμοποιείται σε εμπορικά προϊόντα για τον εμπλουτισμό και την δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας αλλά και σαν ζωοτροφή.

### **Σκοπός της παρούσας εργασίας.**

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός είναι η αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων, όπως το τυρόγαλο, το οποίο αποτελεί ένα τεράστιο περιβαλλοντικό πρόβλημα λόγω της δύσκολης αποικοδόμησής του. Για την αξιοποίηση του λοιπόν το τυρόγαλο χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus*. Η ανάπτυξη και επιλογή των γαλακτικών βακτηρίων, που έγινε μέσα από διάφορες μεθόδους, έχει ως απώτερο σκοπό στις κατάλληλες συνθήκες να παραχθούν οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κάποια υλικά και μέθοδοι για να ερμηνευτεί η παραγωγή ή μη των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Στο πειραματικό μέρος λοιπόν θα χρησιμοποιηθούν κάποιοι μέθοδοι για να καταλήξουμε σε κάποια συγκεκριμένα στελέχη, τα οποία στην συνέχεια θα αξιοποιηθούν για τις ζυμώσεις στο τυρόγαλο, ώστε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα αν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θα παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ή όχι.

Οι πειραματικοί μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι εξής:

- a. Τεστ Αιμολυτικής ικανότητας
- b. Τεστ Μετατόπισης ελαίου
- c. Δείκτης γαλακτωματοποίησης
- d. Κατανάλωση λακτόζης
- e. Μέτρηση ξηρής βιομάζας

Το τεστ της αιμολυτικής ικανότητας έχει ως σκοπό να φανερώσει την ύπαρξη των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια μέσα από την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Το πείραμα της μετατόπισης ελαίου βασίζεται κυρίως στην δομή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος. Πιο συγκεκριμένα όταν παράγονται οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από τους μικροοργανισμούς, τείνουν να δημιουργήσουν ένα σφαιρικό σχήμα στο οποίο το κέντρο του θα αποτελείται από το υδρόφοβο μέρος αφήνοντας “εκτεθειμένο” το υδρόφιλο περιμετρικά δίνοντας έτσι μια δυνατότητα σύνδεσης με το νερό (Banat, et al., 1995). Με αυτήν την ιδιότητα μπορούν να δημιουργήσουν σε διαφορετικές πολικότητες συσσωματώματα και να μειώσουν την επιφανειακή τάση σε μια επιφάνεια ή σε ένα διφασικό σύστημα. Έτσι χάρη σε αυτήν την ικανότητα και με βάση την βιβλιογραφία (Walter et al., 2010; Freitas et al., 2014) τέθηκε σε εφαρμογή αυτό το πείραμα.

Το πείραμα για τον δείκτη γαλακτωματοποίησης βασίζεται στο πλεονέκτημα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών να μπορούν να σταθεροποιούν και να αποσταθεροποιούν γαλακτώματα. Ως γαλάκτωμα περιγράφεται ένα ετερογενές σύστημα το οποίο διακρίνουμε σε δύο τύπους, όταν προστίθεται έλαιο σε νερό (o/w) ή όταν προστίθεται νερό σε έλαιο (w/o) και το οποίο μετά την ανάμιξή του μπορεί να διατηρηθεί ομοιογενές για αρκετό καιρό. Αυτήν την ιδιότητα παρουσιάζουν και οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, εφόσον υπάρχουν, καθώς έχουν την ικανότητα να δημιουργούν ισχυρά γαλακτώματα και να διατηρούν το γαλάκτωμα (Velikonja and Kosaric., 1993).

Η κατανάλωση της λακτόζης και η μέτρηση της βιομάζας μας δίνει μια πιο αναλυτική εικόνα για την πορεία που έχει η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε οποιαδήποτε υπόστρωμα καθώς και ποιο στέλεχος αναπτύσσεται καλύτερα και σε ποιες συνθήκες.

Οι παραπάνω μέθοδοι θα εφαρμοστούν σε 50 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* και θα μελετηθούν για την παραγωγή, αλλά και το ποσοστό των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που θα παράξουν με βάση τα παραπάνω πειράματα. Πολλά από τα στελέχη ανήκουν στο ίδιο είδος, ωστόσο μπορεί τα στελέχη αυτά να προέρχονται από διαφορετικές συλλογές. Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ανήκουν σε 5 διαφορετικές συλλογές όπως αναφέρονται παρακάτω:

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CECT:** Spanish Type Culture Collection, Universitat de Valencia:

**ACA-DC:** Culture Collection. Laboratory of Dairy Research, Agricultural University of Athens:

**LQC:** Laboratory of Food Quality Control and hygiene, Agricultural University of Athens:

**FMCC:** Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, Agricultural University of Athens:

**Πίνακας 2.1:** Είδη του γένους *Lactobacillus* ανάλογα με το στέλεχος και την συλλογή στην οποία ανήκουν.

| Όνομα                              | Συλλογή | Στελέχη      | Όνομα                  | Συλλογή | Στελέχη     |
|------------------------------------|---------|--------------|------------------------|---------|-------------|
| <i>Lb. delbrueckii delbrueckii</i> | ACA-DC  | 81           | <i>Lb. plantarum</i>   | ACA-DC  | 201         |
| <i>Lb. lactis</i>                  | ACA-DC  | 124          |                        |         | 270         |
|                                    |         | 125          |                        |         | 271         |
|                                    |         | 127          |                        |         | 276         |
| <i>Lb. fermentum</i>               | ACA-DC  | 179          |                        |         | 280         |
|                                    |         | 182          |                        |         | 287         |
|                                    |         | 183          |                        |         | 288         |
| <i>Lb. coryniformis</i>            | LQC     | 752          |                        |         | 731         |
|                                    |         | 753          |                        |         | 761         |
| <i>Lb. acidophilus</i>             | CECT    | 903          |                        |         | 2221        |
|                                    | ACA-DC  | 2174         |                        |         | 2350        |
| <i>Lb. sakei</i>                   | LQC     | 780          |                        |         | 4039        |
|                                    |         | 854          |                        |         | 4052        |
| <i>Lb. pentosus</i>                | ACA-DC  | 759          |                        | LQC     | 817         |
|                                    | CECT    | 4023         |                        |         | 820         |
|                                    | FMCC    | B-329 (E108) |                        |         | 842         |
| <i>Lb. rhamnosus</i>               | ACA-DC  | 710          |                        | FMCC    | B-324 (E10) |
|                                    |         | 713          | <i>Lb. casei</i>       | LQC     | 824         |
|                                    |         | 2111         |                        |         | 841         |
|                                    |         | 2474         |                        |         | 846         |
|                                    |         | 3430         |                        |         | 855         |
|                                    | CECT    | 278          |                        |         | 639         |
|                                    |         | 2014         |                        |         | 763         |
|                                    | LQC     | 2020         | <i>Lb rhamnosus GG</i> | ATCC    | 53103       |
|                                    |         | 2030         |                        |         | (1,2,3,4)   |

## 2.1 Προετοιμασία πειράματος

Τα 50 στελέχη διατηρήθηκαν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε cryovials. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα στελέχη ανανεώνονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο MRS agar και μεταφέρονται προς επώαση σε θάλαμο στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Εν συνεχεία, με το μικροβιακό κρίκο μια ποσότητα κυττάρων (η καλλιέργεια στο τριβλίο ελέγχεται για επιμόλυνση) μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό μέσο MRS. Στη συνέχεια, μετά από επώαση 24 ωρών, τα στελέχη διατηρήθηκαν σε cryovials με γλυκερόλη (σε αναλογία 1:1) ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή προκαλλιέργειας για το σύνολο των πειραμάτων.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων τα γαλακτικά βακτήρια εμβολιάστηκαν σε σωληνάκια με MRS broth ως υπόστρωμα και επώαστηκαν για 72 ώρες στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  εκτός από το στέλεχος CECT 4023 που επώαστηκε στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Μετά την επώαση και κάτω από ασηπτικές συνθήκες λήφθηκε δείγμα για κάθε ένα στέλεχος το οποίο φυγοκεντρήθηκε και αποθηκεύτηκε στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι να αξιοποιηθεί στο κατάλληλο πείραμα.

Επίσης κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμα υπόστρωμα το Medium 2 ή αλλιώς M2, στο οποίο αναπτύχθηκαν τα 50 στελέχη και επώαστηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για 72 ώρες. Το Medium 2 ή M2 χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα γιατί δεν περιέχει, σε αντίθεση με το MRS, στην σύστασή του Tween 80, το οποίο παρουσιάζει ιδιότητες γαλακτωματοποίησης. Με τον τρόπο αυτόν συγκρίναμε τα αποτελέσματα με βάση το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα.

**Πίνακας 2.2:** Θρεπτικά συστατικά και οι συγκεντρώσεις που περιέχονται στο υπόστρωμα Medium 2

| Θρεπτικό συστατικό                                             | Συγκέντρωση (g/L) |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|
| Γλυκόζη (Glucose)                                              | 20                |
| Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)                                | 8                 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ammonium sulphate)               | 5                 |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Potassium phosphate dibasic)         | 1                 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnesium sulphate) | 0.3               |
| $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (Sodium acetate)            | 5                 |

Παρόμοια διαδικασία εφαρμόστηκε και στην περίπτωση κατά την οποία αξιολογήθηκε το τυρόγαλο ως θρεπτικό μέσο ζύμωσης με τα επιλεγμένα γαλακτικά βακτήρια. Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιήθηκαν προκαλλιέργειες με MRS broth για 14-16 ώρες σε θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  εκτός του 4023 που αναπτύχθηκε στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Έπειτα λήφθηκε ποσότητα 2 ml (υπό ασηπτικές συνθήκες) από το καθένα, η οποία φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές για 10 λεπτά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο του MRS προσεκτικά για να μείνουν καθαρά τα κύτταρα στον πυθμένα. Ο στόχος της διαδικασίας ήταν να χρησιμοποιηθούν μόνο τα βακτηριακά κύτταρα ως εμβόλιο χωρίς την παρουσία MRS.

## 2.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών στο τυρόγαλο

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ζύμωσης, εφαρμόστηκε μια διεργασία επεξεργασίας του τυρογάλακτος για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης. Με αυτόν τον τρόπο θα αποφευχθούν τυχόν παρεμποδίσεις και λανθασμένα αποτελέσματα που μπορεί να προκύψουν.

Η αρχική πρώτη ύλη τυρογάλακτος αποθηκεύτηκε στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι περαιτέρω επεξεργασία. Αρχικά, ρυθμίζεται η τιμή pH στο 4.2 με  $5\text{ N H}_2\text{SO}_4$ , ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες, στο ισοηλεκτρικό σημείο (Sharma, et al., 2014, Vera, et al., 2018). Στη συνέχεια το τυρόγαλο αποστειρώθηκε στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά για να γίνει η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.

Μετά το πέρας της αποστείρωσης το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών βρίσκεται στο πυθμένα του μπουκαλιού. Για να διευκολυνθεί η απομάκρυνση της πρωτεΐνης και να είναι καθαρό το υπερκείμενο γίνεται διήθηση, για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Εφόσον τελειώσει η διαδικασία της διήθησης το υπερκείμενο τοποθετείται πάλι για αποστείρωση στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μετά το πέρας τις διαδικασίας το τυρόγαλο μοιράζεται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες ή σωληνάκια επώασης, αφού πρώτα ρυθμιστεί το pH στο 6.7 (βέλτιστη τιμή ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων και αντίστοιχη του MRS) υπό ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένο  $5\text{ N KOH}$ .

## 2.3 Αιμολυτική ικανότητα

Για την προετοιμασία αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκε αιματούχο υπόστρωμα (Blood agar) περιεκτικότητας 5% (w/v) σε τριβλία petri. Με την βοήθεια γυάλινης πιπέτας paster, η οποία αποστειρώθηκε με ξηρή θερμότητα και κάτω από ασηπτικές συνθήκες, δημιουργήθηκαν στο υπόστρωμα τέσσερις μικρές οπές με διάμετρο περίπου 6 mm (όσο και η διάμετρος της πιπέτας) στις οποίες στην συνέχεια θα τοποθετηθεί ο μικροοργανισμός. Με αυτήν την διαδικασία αποτρέπεται η διασπορά του μικροοργανισμού σε ολόκληρο το υπόστρωμα και γίνεται καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Για κάθε ένα στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 40 ml εμβόλιο από την προ καλλιέργεια του MRS broth και τοποθετήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες και πολύ προσεκτικά, στην οπή που υπάρχει στο υπόστρωμα έτσι ώστε να μην διασκορπιστεί σε αυτό. Για κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Έπειτα τα τριβλία επωάστηκαν στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες (εκτός του 4023 που επωάστηκε στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Μετά από 48 ώρες αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα με βάση την ικανότητα αιμόλυσης που παρουσίασαν τα διάφορα στελέχη στο αιματούχο υπόστρωμα, δηλαδή απουσία ή παρουσία δακτυλίου που αντιστοιχεί στην ικανότητα αιμόλυσης.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο προσδιορισμός παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, καθώς οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες τείνουν να παρουσιάζουν μια ικανότητα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

## 2.4 Μετατόπιση ελαίου

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά διάφορα λάδια μηχανής (motor oil) όπως το 5W-30, το 10W-40 και το 20W-50, ώστε να διαπιστωθεί ποιο αποτελεί την καταλληλότερη επιλογή για τη διεξαγωγή του πειράματος. Επίσης τα λάδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές ποσότητες (0.2 ml, 0.1 ml) και δοκιμάστηκαν με Triton X-100 (0.5%) για να εντοπιστεί που πραγματοποιείται η καλύτερη μετατόπιση στο λάδι.

Σε γυάλινο τριβλίο petri διαμέτρου 15cm (το οποίο τοποθετήθηκε πάνω σε ένα μιλιμετρέ χαρτί) τοποθετήθηκαν 50 ml απιονισμένου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο. Με μια πιπέτα τοποθετήθηκε 0.1 ml λάδι μηχανής (motor oil) 20W-50 στην επιφάνεια του νερού. Εφόσον δημιουργήθηκε μία λεπτή στοιβάδα από το έλαιο αυτό, τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια με πολύ προσοχή και χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα 10  $\mu$ l (με πιπέτα) από την καλλιέργεια γαλακτικού βακτηρίου η οποία “τρυπήθηκε” έτσι ώστε ο μικροοργανισμός να έρθει σε επαφή με το νερό.

Με αυτόν τον τρόπο μόλις η καλλιέργεια έρθει σε επαφή με το νερό, εφόσον υπάρχουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες η σταγόνα του λαδιού θα μετατοπιστεί και θα δημιουργήσει έναν δακτύλιο όπου η εσωτερική του διάμετρος θα δείξει την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών για το συγκεκριμένο στέλεχος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το υδρόφιλο μέρος ενώνεται με το νερό και το υδρόφοβο μέρος με το έλαιο, οπότε η παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μειώνει την επιφανειακή τάση στο διάλυμα δημιουργώντας έτσι τη μετατόπιση στο λάδι και συνεπώς την δημιουργία κυκλικού δακτυλίου.

Το MRS broth το οποίο δημιούργησε στο πείραμα της μετατόπισης ελαίου έναν αρκετά μεγάλο δακτύλιο χωρίς να έχει εμβολιαστεί (λόγω τις σύστασής του που περιέχει Tween 80), δεν έδινε την δυνατότητα να διακρίνουμε αν η ύπαρξη του δακτυλίου και της μετατόπισης του λαδιού οφείλεται καθαρά στις παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ή αν οφείλεται στη σύσταση του MRS broth, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το Medium 2 ή M2. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν παρουσίασε μετατόπιση στο λάδι και για αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός δείκτης. Έτσι λοιπόν με την ίδια μεθοδολογία εφαρμόστηκε το τεστ μετατόπισης ελαίου σε όλα τα στελέχη, τα οποία αναπτύχθηκαν σε προκαλλιέργεια στο M2 και επώαστηκαν για 72 ώρες. Στο συγκεκριμένο πείραμα ως θετική απόκριση χρησιμοποιήθηκε Triton X-100, σε συγκεντρώσεις 0.10%, 0.25% και 0.50% (w/v), το οποίο αποτελεί μια χημική επιφανειοδραστική. Ως αρνητική απόκριση χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο, μη εμβολιασμένο MRS broth και Medium 2 (M2).

## 2.5 Δείκτης γαλακτωματοποίησης

Στο παρακάτω πείραμα αξιολογήθηκε η ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών να δημιουργούν γαλακτώματα, για να εξεταστούν τα γαλακτικά βακτήρια που έχουμε στην διάθεσή μας ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές δοκιμές για τη συγκριτική αξιολόγηση των διαφορετικών μεθόδων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Συνεπώς, εφαρμόστηκαν διάφορα έλαια,

και ειδικότερα ελαιόλαδο, το σογιέλαιο, το παραφινέλαιο καθώς και σε λάδια μηχανής (20W-50), ώστε να διαπιστωθεί σε ποιο από αυτά πραγματοποιείται καλύτερη γαλακτωματοποίηση. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε MRS, και χρησιμοποιήθηκαν 2 ml από κάθε καλλιέργεια. Τα δείγματα σε πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν χωρίς φυγοκέντρηση για την επιλογή του κατάλληλου ελαίου.

Η ποσότητα της καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκε το λάδι σε ίση ποσότητα (2 ml). Ακολούθησε ανάδευση με vortex (VELP Scientifica, ZX3) σε διαφορετικούς χρόνους (10sec, 1min, 2min) για να εντοπιστεί που πραγματοποιείται καλύτερη γαλακτωματοποίηση. Από τις προαναφερθείσες δοκιμές επιλέχθηκε το σογιέλαιο και το παραφινέλαιο και καταλληλότερος χρόνος κρίθηκε το 1 λεπτό.

Εν συνεχεία, εφόσον επιλέχθηκαν τα πειραματικά στάδια της μεθόδου, τα γαλακτικά βακτήρια επώαστηκαν, και λήφθηκε 2 ml δείγμα από το κάθε στέλεχος. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά και το υπερκείμενο του χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή γαλακτωματοποίησης με παραφινέλαιο και σογιέλαιο. Ειδικότερα, 2 ml ελαίου και 2 ml υπερκείμενο από την καλλιέργεια αναδεύτηκαν με vortex για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (3000 rpm) για να δημιουργηθεί σταθερό γαλάκτωμα. Τα σωληνάκια αφέθηκαν σε ηρεμία και η μέτρησή τους έγινε μετά από 24, 48 και 72 ώρες. Ωστόσο, το MRS περιέχει στη σύστασή του Tween 80 (επιφανειοδραστική ουσία), δημιουργήσε γαλάκτωμα, δυσχεραίνοντας τον προσδιορισμό της γαλακτωματοποίησης από τις πιθανές παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.

Για να αντιμετωπιστεί η παρεμπόδιση από το Tween 80, χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Medium 2 (M2) το οποίο δεν περιέχει Tween 80 και δε δημιουργεί γαλάκτωμα για τα πειράματα. Έτσι το πείραμα επαναλήφθηκε με την ίδια διαδικασία έχοντας όμως αναπτύξει τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων σε προκαλλιέργεια με θρεπτικό μέσο M2. Για θετικό έλεγχο στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το Triton X-100 (0.5%) και για αρνητικό έλεγχο, αποστειρωμένο και μη εμβολιασμένο MRS και M2.

Για να ερμηνευτούν σωστά τα αποτελέσματα στις 24, 48 και 72 ώρες καταγράφηκε το συνολικό ύψος και το ύψος του γαλακτώματος για κάθε στέλεχος και υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο το ποσοστό της γαλακτωματοποίησης:

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

Όπου  $H_{emulsion}$ : το ύψος του γαλακτώματος και  $H_{total height of liquid}$ : το συνολικό ύψος του μίγματος. Αντίστοιχα υπολογίστηκε και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης για  $E_{24}$ ,  $E_{48}$  και  $E_{72}$ , δηλαδή για τις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα.

## 2.6 Κατανάλωση λακτόζης

Στα πειράματα ελέγχθηκε και η κατανάλωση λακτόζης. Αρχικά μελετήθηκε ως ένα κριτήριο για την επιλογή στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν στο δεύτερο στάδιο των πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο το τυρόγαλο. Στο δεύτερο στάδιο των πειραμάτων και ειδικότερα στις βακτηριακές ζυμώσεις, η λακτόζη ποσοτικοποιήθηκε ώστε να εκτιμηθεί η πορεία της ζύμωσης και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Για το συγκεκριμένο πείραμα παρασκευάστηκε ένα υπόστρωμα λακτόζης (η σύστασή του αναφέρεται στον παρακάτω Πίνακα), με αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Το υπόστρωμα μοιράστηκε σε σωληνάκια με 10 ml συνολικό όγκο και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα σωληνάκια εμβολιάστηκαν με ένα στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου και επώαστηκαν σε κατάλληλη θερμοκρασία (30 °C και 37 °C) για 72 ώρες .

**Πίνακας 2.3:** Θρεπτικά υλικά και συγκεντρώσεις που περιέχονται στο υπόστρωμα λακτόζης.

| Υπόστρωμα Λακτόζης                                                 |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| Θρεπτικά υλικά                                                     | g/L |
| Λακτόζη (lactose)                                                  | 20  |
| Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)                                    | 8   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Ammonium sulfate) | 5   |
| MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (Magnesium sulfate)          | 5   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Potassium phosphate dibasic)      | 0.2 |

Μετά το πέρας της επώασης, λήφθηκε δείγμα από το κάθε σωληνάκι, το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο. Τα δείγματα αραιώθηκαν 1/10 με 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και εν συνεχεία ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman 0.2 μm. Τα δείγματα πήγαν αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-Shimadzu) με στήλη ROA-organic acid H<sup>+</sup> (300 mm μήκος × 7.8 mm εσωτερική διάμετρος, Phenomenex) συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer) και ροή 0.6 ml/min κάτω από συγκεκριμένη πίεση και θερμοκρασία φούρνου στους 65 °C.

## 2.7 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους, total dry weight

Η μέτρηση της ξηρής βιομάζας πραγματοποιείται για να αξιολογηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς είναι συνήθως ανάλογη της ανάπτυξης.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκε το τυρόγαλο ως μέσο ζύμωσης, λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα 2 ml. Ακολουθείται φυγοκέντρηση, (με φυγόκεντρο NF 048) στις 5000 στροφές για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά για τις υπόλοιπες αναλύσεις ενώ τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στη μέτρηση της ξηρής βιομάζας. Σε ζυγό ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία, ζυγίστηκαν τα φιαλίδια στα οποία τοποθετείται η βιομάζα που προορίζεται για ξήρανση. Καταγράφηκε η ένδειξη του ζυγού για το κάθε φιαλίδιο έτσι ώστε να υπολογιστεί το καθαρό βάρος της ξηρής βιομάζας. Σε κάθε προζυγισμένο φιαλίδιο τοποθετήθηκε η βιομάζα η οποία έχει διαλυθεί με απιονισμένο νερό. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για ξήρανση σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 65 °C για περίπου 24 ώρες. Μετά το πέρας της ξήρανσης, τα φιαλίδια ζυγίζονται εκ νέου (αφού κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα) και από τη διαφορά βάρους υπολογίζεται η παραγωγή βιομάζας και εκφράζεται σε g/L. Αντίστοιχα μετρήθηκε και η παραγωγή βιομάζας στις προκαλλιέργειες χρησιμοποιώντας τα διαφορετικά υποστρώματα, ήτοι το M2 και το MRS.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΕΠΙ-ΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ-ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

#### 3.1 Αιμολυτική ικανότητα

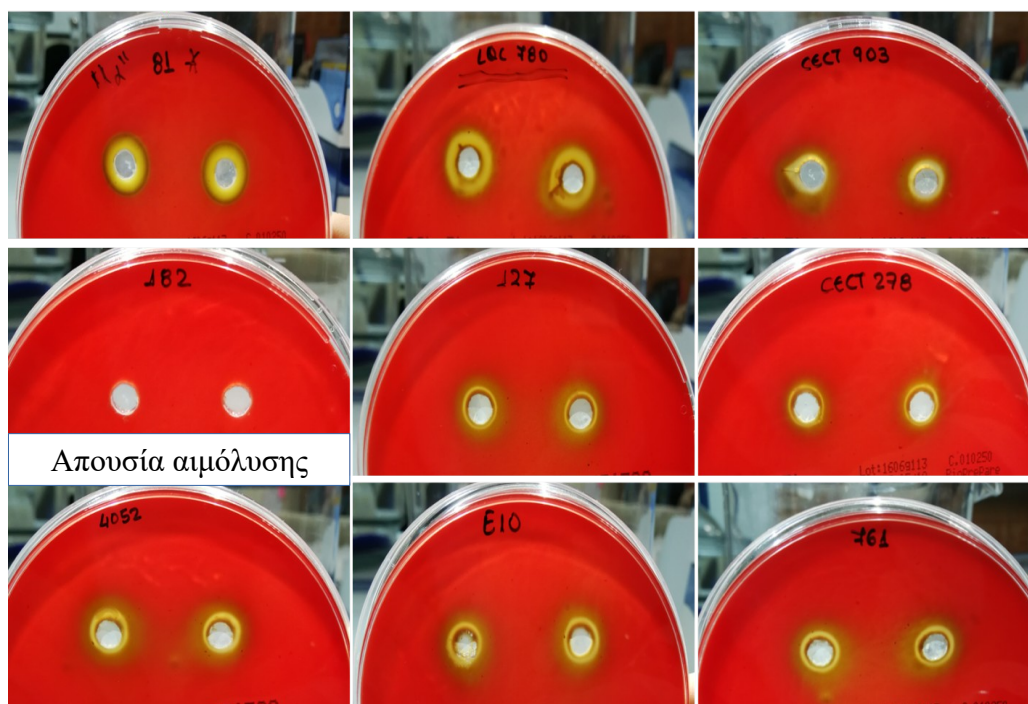
Η αιμολυτική ικανότητα είναι από της πρωταρχικές μεθόδους για την ένδειξη παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από ένα στέλεχος, όχι όμως και η πιο αξιόπιστη καθώς παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς που ίσως αυτοί να οδηγούν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Για παράδειγμα κάποια ένζυμα (λυτικά) μπορεί να προκαλέσουν λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα να δημιουργήσουν διαφανή ζώνη στο αιματούχο υπόστρωμα και να ερμηνευτεί λάθος το αποτέλεσμα. Επίσης οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορεί να παρουσιάσουν δυσκολία στην διάχυση τους και να αποτρέψουν την δημιουργία διάφανης ζώνης στο υπόστρωμα, καθώς και να μην συνδέονται άμεσα με αυτήν την μέθοδο της αιμόλυσης των κυττάρων.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τριβλία με αιματούχο υπόστρωμα (Blood agar, περιεκτικότητας 5% w/v) στα οποία δημιουργήθηκαν, κάτω από ασηπτικές συνθήκες 4 μικρές οπές με γυάλινη πιπέτα paster, η οποία αποστειρώθηκε με ξηρή θερμότητα (λύχνος bunsen).



**Εικόνα 3.1:** Τριβλία με blood agar πριν και μετά την δημιουργία των οπών.

Εφόσον τα τριβλία εμβολιάστηκαν με τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων και επώαστηκαν για 48 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία, κρίθηκαν με βάση την αιμόλυση (α, β ή γ) που εμφάνισαν στο υπόστρωμα γύρω από τις οπές που τοποθετήθηκε ο μικροοργανισμός. Παρακάτω στην εικόνα εμφανίζονται μερικά από τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων μετά από την επώαση τους για 48 ώρες.



Απουσία αιμόλυσης

**Εικόνα 3.2:** Η ικανότητα αιμόλυσης σε κάποια στελέχη μετά από την επώαση τους για 48 ώρες.

Στην εικόνα διακρίνεται ότι το στέλεχος 182 δεν κατάφερε να δημιουργήσει ζώνη στις 48 ώρες γύρο από την αποικία, έτσι θεωρήθηκε σαν απουσία αιμόλυσης ενώ τα υπόλοιπα στελέχη παρουσιάζουν αιμόλυση.

**Πίνακας 3.1:** Παρουσία αιμολυτικής ικανότητας για τα στελέχη με την ένδειξη (+) και με την ένδειξη (-) για τα στελέχη που δεν παρουσίασαν αιμολυτική ικανότητα.

| Στέλεχος    | Αποτελέσματα στο τεστ αιμόλυσης |
|-------------|---------------------------------|
| ACA-DC 0759 | (+)                             |
| ACA-DC 1531 | (+)                             |
| ACA-DC 6011 | (+)                             |
| ACA-DC 0710 | (-)                             |
| ACA-DC 0713 | (+)                             |
| ACA-DC 2111 | (+)                             |
| ACA-DC 2474 | (+)                             |
| ACA-DC 3430 | (+)                             |
| ACA-DC 0179 | (-)                             |
| ACA-DC 0182 | (-)                             |
| ACA-DC 0183 | (-)                             |
| ACA-DC 2174 | (+)                             |
| ACA-DC 0081 | (+)                             |
| ACA-DC 0201 | (+)                             |
| ACA-DC 0270 | (+)                             |
| ACA-DC 0271 | (+)                             |
| ACA-DC 0276 | (+)                             |
| ACA-DC 0284 | (+)                             |
| ACA-DC 0280 | (+)                             |
| ACA-DC 0287 | (+)                             |

|                   |     |
|-------------------|-----|
| ACA-DC 0288       | (+) |
| ACA-DC 2221       | (+) |
| ACA-DC 0731       | (+) |
| ACA-DC 0761       | (+) |
| ACA-DC 4039       | (+) |
| ACA-DC 2350       | (+) |
| ACA-DC 4052       | (+) |
| ACA-DC 0124       | (+) |
| ACA-DC 0125       | (+) |
| ACA-DC 0127       | (+) |
| LQC 752           | (+) |
| LQC 2030          | (+) |
| LQC 817           | (-) |
| LQC 2020          | (+) |
| LQC 763           | (+) |
| LQC 846           | (+) |
| LQC 842           | (+) |
| LQC 639           | (+) |
| LQC 854           | (+) |
| LQC 2014          | (+) |
| LQC 820           | (+) |
| LQC 824           | (+) |
| LQC 780           | (+) |
| LQC 855           | (+) |
| LQC 841           | (+) |
| LQC 753           | (+) |
| FMCC B-324 (E10)  | (+) |
| FMCC B-329 (E108) | (+) |
| CECT 278          | (+) |
| CECT 903          | (+) |
| CECT 4023         | (+) |
| ATCC 53103        | (-) |

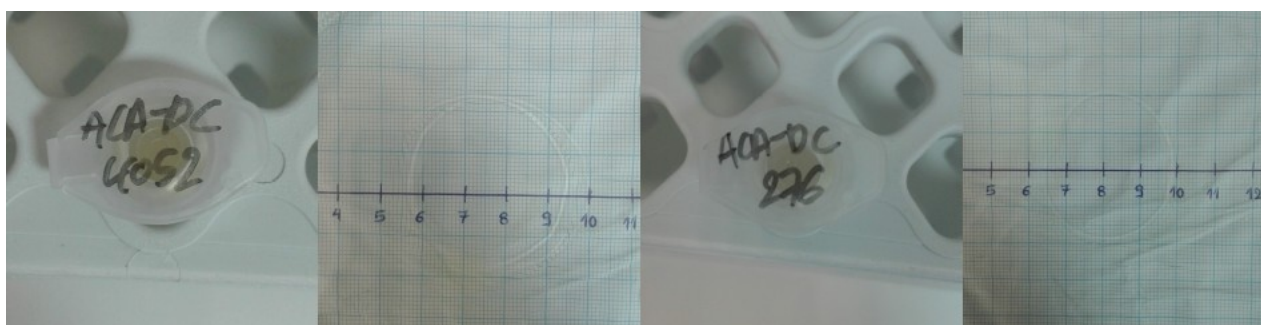
Με βάσει λοιπόν τον πίνακα το συμπέρασμα είναι ότι τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν αιμόλυση, εκτός από 6 στελέχη από διαφορετικές συλλογές τα οποία είναι τα εξής:

- ACA-DC 0710 (*Lb. rhamnosus*)
- ACA-DC 0179 (*Lb. Fermentum*)
- ACA-DC 0182 (*Lb. fermentum*)
- ACA-DC 0183 (*Lb. fermentum*)
- LQC 817 (*Lb. plantarum*)
- ATCC 53103 (*Lb rhamnosus GG*)

Αυτά τα στελέχη λοιπόν πιθανότατα να μην είναι ικανά να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, όμως η αιμολυτική ικανότητα δεν αποτελεί το μόνο και κύριο κριτήριο για τα παραπάνω στελέχη που μελετήθηκαν.

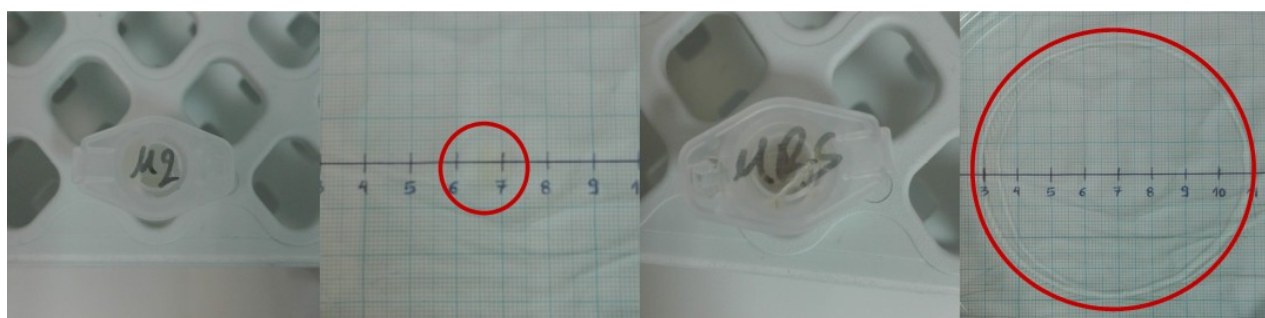
### 3.2 Μετατόπιση ελαίου

Η μέτρηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στη μετατόπιση που δημιουργούσε το λάδι καθώς και στην εσωτερική διάμετρο του δακτυλίου η οποία μετρήθηκε σε εκατοστά (cm). Εφόσον έγιναν κάποιες δοκιμές σε διαφορετικά λάδια, καταλληλότερο κρίθηκε το έλαιο 20W-50, το οποίο διατηρούσε σταθερό το δακτύλιο και απέδωσε ευκρινείς μετρήσεις. Τα υπόλοιπα λάδια (5W-30 και 10W-40), ενδεχομένως λόγω της διαφορετικής τους σύστασης, δε συνέβαλαν στη διατήρηση δακτυλίου ώστε να μετρηθεί και να αξιολογηθεί η πιθανή παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.



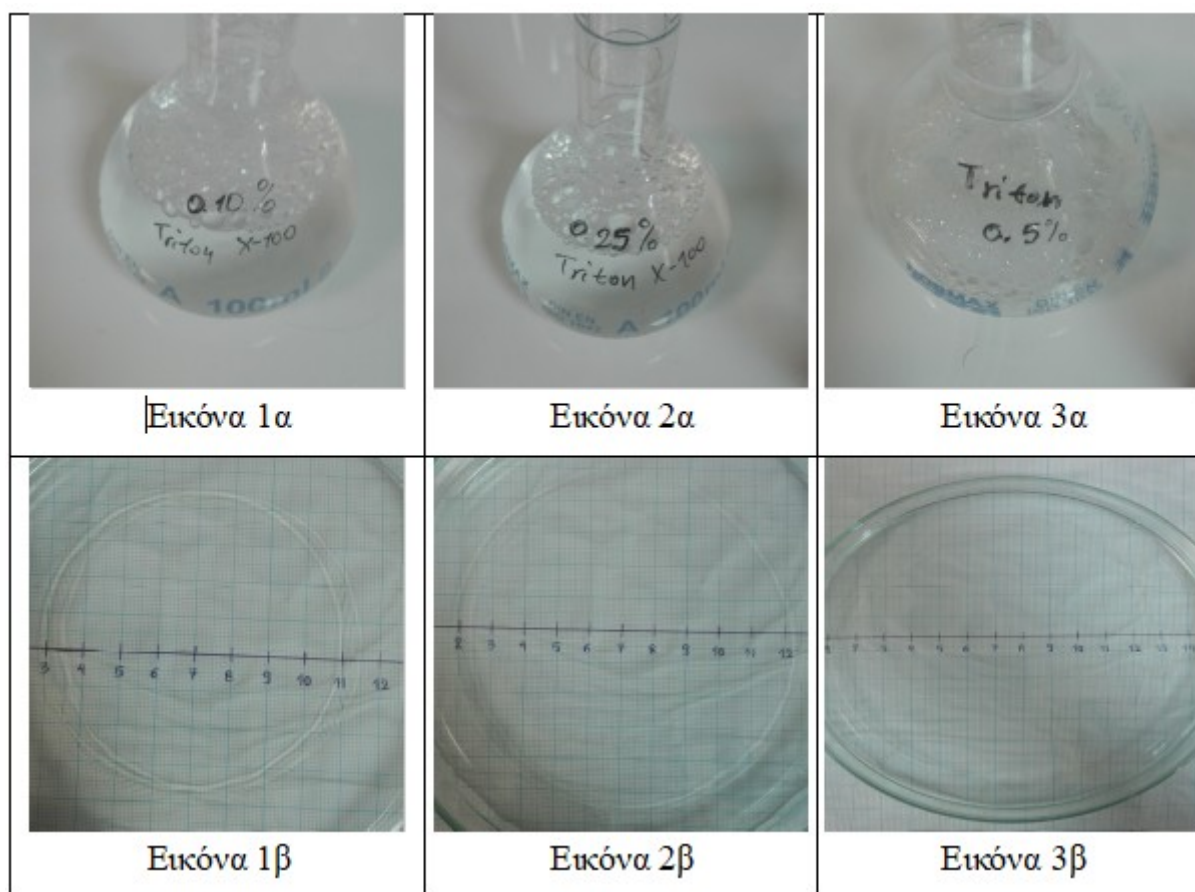
**Εικόνα 3.3:** Δημιουργία κυκλικού δακτυλίου λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης για τα στελέχη 4052 και 276 εμβολιασμένα σε υπόστρωμα M2.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο υποστρώματα το MRS και το M2 σαν αρνητικά control τα οποία αποστειρώθηκαν και χωρίς να εμβολιαστούν δοκιμάστηκαν στη μέθοδο ως προς τη μετατόπιση του ελαίου. Το M2 δεν έδωσε καμία μετατόπιση στο λάδι σε αντίθεση με το MRS το οποίο έδωσε έναν αρκετά μεγάλο κυκλικό δακτύλιο και μετατόπισε τη σταγόνα του λαδιού.



**Εικόνα 3.4:** Το υπόστρωμα M2 (αριστερά) δε δημιουργεί καμία μετατόπιση στο λάδι σε αντίθεση με το υπόστρωμα MRS (δεξιά) που δημιουργεί έναν αρκετά μεγάλο κυκλικό δακτύλιο.

Επίσης σαν θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Triton X-100, το οποίο αποτελεί μια χημική επιφανειοδραστική ουσία, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.10%, 0.25% και 0.5% w/v).



**Εικόνα 3.5:** Μετατόπιση ελαίου στο Triton X-100 (συγκεντρώσεις 0.10%, 0.25% και 0.5% w/v), που αποτελεί το θετικό control στο πείραμα.

Τα αποτελέσματα του πειράματος προήλθαν από την διαφορά των μετρήσεων, δηλαδή από την διαφορά των εκατοστών (cm) που έδωσαν τα στελέχη με την διαφορά των εκατοστών (cm) που έδωσαν το MRS και το M2 τα οποία αποτελούσαν και τον αρνητικό έλεγχο. Το κάθε στέλεχος είχε 3 επαναλήψεις από τις οποίες βγήκε ο μέσος όρος (Average) και η τυπική απόκλιση (Stdev) για το κάθε ένα ξεχωριστά.

**Πίνακας 3.2:** Μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη που ανήκουν στις συλλογές ATCC, CECT και LQC μετά από την διαφορά τους με το MRS και το M2.

| Στέλεχος   | Διαφορά από το MRS (cm) |       | Διαφορά από το M2 (cm) |       |
|------------|-------------------------|-------|------------------------|-------|
|            | Average                 | stdev | Average                | stdev |
| ATCC 53103 | 0.28                    | 0.57  | 2.33                   | 0.25  |
| CECT 278   | 1.13                    | 0.91  | 2.76                   | 0.68  |
| CECT 903   | -0.40                   | 1.79  | 0.00                   | 0.14  |
| CECT 4023  | 0.38                    | 1.02  | 2.84                   | 1.16  |
| LQC 2020   | 0.05                    | 0.48  | 1.64                   | 0.24  |
| LQC 780    | -0.12                   | 0.64  | 1.64                   | 0.13  |
| LQC 842    | 0.33                    | 0.97  | 1.89                   | 0.38  |
| LQC 639    | 0.43                    | 0.41  | 0.39                   | 0.38  |
| LQC 824    | -0.12                   | 1.08  | 0.61                   | 0.17  |
| LQC 753    | 0.48                    | 0.76  | 2.51                   | 0.13  |
| LQC 841    | 0.91                    | 0.37  | 0.75                   | 0.42  |
| LQC 2030   | -0.01                   | 0.13  | 2.14                   | 0.43  |

|                 |       |      |       |      |
|-----------------|-------|------|-------|------|
| <b>LQC 2014</b> | -0.07 | 0.71 | 1.50  | 0.74 |
| <b>LQC 854</b>  | 0.55  | 0.48 | -0.30 | 0.00 |
| <b>LQC 855</b>  | 0.30  | 0.63 | 0.53  | 0.56 |
| <b>LQC 846</b>  | 0.93  | 0.41 | 0.09  | 0.32 |
| <b>LQC 752</b>  | 1.43  | 0.41 | 1.65  | 0.26 |
| <b>LQC 763</b>  | 0.55  | 0.48 | 0.58  | 0.59 |
| <b>LQC 820</b>  | 1.05  | 0.25 | 2.83  | 0.60 |
| <b>LQC 817</b>  | 0.30  | 0.48 | 1.68  | 0.59 |

Για τα στελέχη που είχαν εμβολιαστεί στο MRS υπόστρωμα παρατηρήθηκε ότι όλα παρουσίασαν μια θετική απόκριση στην μετατόπιση του λαδιού, εκτός από τα στελέχη 903, 780, 824, 2030, 2014 τα οποία όταν αφαιρέθηκαν από το MRS έδωσαν αρνητική τιμή. Άρα συμπερασματικά τα συγκεκριμένα στελέχη πιθανότατα να μην μπορούν να μειώσουν την επιφανειακή τάση για να μετατοπίσουν το λάδι.

Το ίδιο ισχύει και για το θρεπτικό μέσο M2, στο οποίο αρνητική τιμή παρουσίασε το στέλεχος LQC 854, ενώ όλα τα υπόλοιπα είχαν θετική απόκριση μετά την αφαίρεσή τους από το υπόστρωμα. Άρα συμπερασματικά τα στελέχη που έδωσαν θετική απόκριση ενδέχεται να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και για αυτόν τον λόγο να μειώνουν την επιφανειακή τάση.

**Πίνακας 3.3:** Μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη που ανήκουν στις συλλογές ACA-DC και FMCC μετά από την διαφορά τους με το MRS και το M2.

| Στέλεχος           | Διαφορά από το MRS (cm) |       | Διαφορά από το M2 (cm) |       |
|--------------------|-------------------------|-------|------------------------|-------|
|                    | Average                 | stdev | Average                | stdev |
| <b>ACA-DC 731</b>  | 1.22                    | 0.29  | 2.44                   | 0.87  |
| <b>ACA-DC 124</b>  | 1.80                    | 0.29  | 1.81                   | 0.52  |
| <b>ACA-DC 125</b>  | 1.08                    | 0.41  | 1.75                   | 0.31  |
| <b>ACA-DC 270</b>  | 1.30                    | 0.44  | 2.81                   | 0.85  |
| <b>ACA-DC 2111</b> | 1.28                    | 0.17  | 2.19                   | 0.71  |
| <b>ACA-DC 4052</b> | 0.93                    | 0.43  | 2.69                   | 0.89  |
| <b>ACA-DC 127</b>  | 1.38                    | 0.96  | 1.64                   | 0.88  |
| <b>ACA-DC 713</b>  | 1.05                    | 0.41  | 2.69                   | 0.41  |
| <b>ACA-DC 2221</b> | 0.83                    | 0.21  | 3.00                   | 1.21  |
| <b>ACA-DC 2350</b> | 1.00                    | 0.55  | 2.25                   | 0.83  |
| <b>ACA-DC 2174</b> | 0.93                    | 0.54  | 2.94                   | 0.87  |
| <b>ACA-DC 759</b>  | 1.63                    | 0.43  | 2.44                   | 0.65  |
| <b>ACA-DC 179</b>  | 1.20                    | 0.17  | 1.79                   | 0.45  |
| <b>ACA-DC 280</b>  | 0.58                    | 1.99  | 2.01                   | 0.24  |
| <b>ACA-DC 201</b>  | 1.43                    | 0.25  | 1.65                   | 0.68  |
| <b>ACA-DC 182</b>  | 0.85                    | 0.73  | 2.06                   | 1.31  |
| <b>ACA-DC 761</b>  | 1.90                    | 0.44  | 2.08                   | 0.90  |
| <b>ACA-DC 710</b>  | 1.08                    | 0.68  | 2.44                   | 0.87  |
| <b>ACA-DC 4039</b> | 0.95                    | 0.91  | 1.82                   | 1.43  |
| <b>ACA-DC 276</b>  | 0.88                    | 1.15  | 1.50                   | 0.24  |
| <b>ACA-DC 183</b>  | 1.18                    | 0.48  | 3.98                   | 0.69  |
| <b>ACA-DC 271</b>  | 1.43                    | 0.26  | 1.64                   | 0.95  |
| <b>ACA-DC 287</b>  | 1.73                    | 0.55  | 2.06                   | 0.25  |
| <b>ACA-DC 288</b>  | 1.03                    | 0.45  | 2.64                   | 0.37  |

|                    |      |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|
| <b>ACA-DC 3430</b> | 1.13 | 0.38 | 3.81 | 1.38 |
| <b>ACA-DC 2474</b> | 0.55 | 2.04 | 2.56 | 0.63 |
| <b>ACA-DC 81</b>   | 1.35 | 0.28 | 0.61 | 0.30 |
| <b>FMCC E108</b>   | 1.40 | 0.44 |      |      |

Στον πίνακα παρατηρούμε ότι όλα τα στελέχη μετά την διαφορά τους από το ανάλογο υπόστρωμα έδωσαν θετικές τιμές. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα στελέχη της συλλογής ACA-DC και FMCC έχουν την ικανότητα να μειώσουν την επιφανειακή τάση και να μετατοπίσουν το λάδι, άρα κατά συνέπεια μπορεί να έχουν παραχθεί βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες στα συγκεκριμένα στελέχη.

### 3.3 Δείκτης γαλακτωματοποίησης

Αρχικά, για τη μέθοδο αυτήν χρησιμοποιήθηκαν λάδια διαφορετικού τύπου, όπως σογιέλαιο, παραφινέλαιο, ελαιόλαδο και λάδι μηχανής 20W-50 με βάση τις διάφορες μεθόδους της βιβλιογραφίας. Σε γυάλινο σωληνάκι τοποθετήθηκαν 2 ml από το κάθε ένα λάδι μαζί με την καλλιέργεια γαλακτικού βακτηρίου σε ίση ποσότητα (2 ml μη φυγοκεντρημένο), και αναδεύτηκαν σε διαφορετικούς χρόνους (10sec, 1min, 2min). Το γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε μετρήθηκε έπειτα από 24, 48, 72 και 96 ώρες.

Επίσης, όπως διακρίνεται και στην παρακάτω εικόνα έγινε δοκιμή γαλακτωματοποίησης σε δύο λάδια διαφορετικού τύπου με βάση το Triton X-100 (0.5%).



**Εικόνα 3.6:** Δοκιμή γαλακτωματοποίησης σε δύο διαφορετικά λάδια (20W-50 και ελαιόλαδο) με ανάδευση για 1 min σε vortex στη μέγιστη ταχύτητα.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε σαν βάση μη εμβολιασμένο και αποστειρωμένο υπόστρωμα M2, στο οποίο έγινε δοκιμή γαλακτωματοποίησης σε δύο διαφορετικά λάδια και το αποτέλεσμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 3.7:** Δοκιμή γαλακτωματοποίησης σε υπόστρωμα M2 σε δύο διαφορετικούς τύπους λαδιού (20W-50 και ελαιόλαδο) με ανάδευση 1 min σε vortex στη μέγιστη ταχύτητα.

Εφόσον το πείραμα εφαρμόστηκε σε όλα τα λάδια που είχαμε στην διάθεσή μας και σε διαφορετικούς χρόνους, παρατηρήθηκε ότι καλύτερη γαλακτωματοποίηση πραγματοποιείται στο σογιέλαιο και στο παραφινέλαιο μετά από ανάδευση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα.

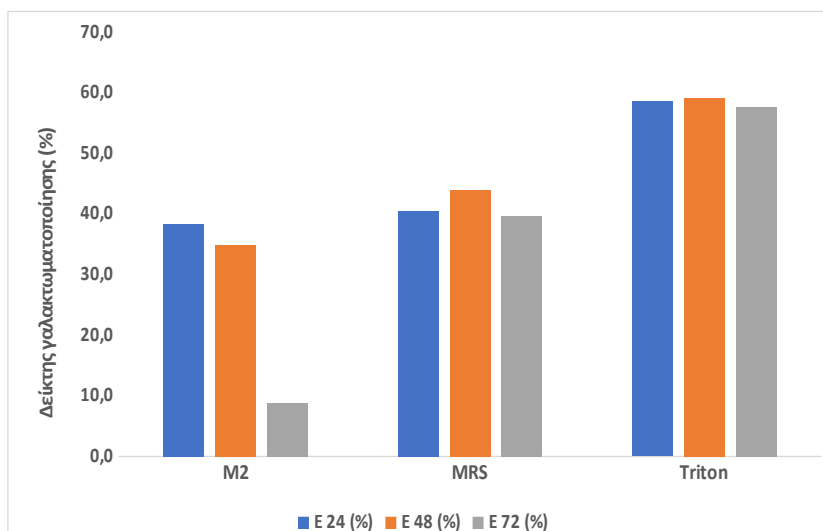
Όπως θα δούμε και παρακάτω τα αποτελέσματα τοποθετήθηκαν σε διαγράμματα αφού όμως πρώτα μετατράπηκαν σε ποσοστιαίες μονάδες με βάση την εξίσωση:

$$E_{time} = \left( \frac{H_{emulsion}}{H_{totalheightofliquid}} \right) \times 100\%$$

καθώς και για τον ανάλογο χρόνο μέτρησης. Το  $E_{24}$  για τις 24 ώρες, το  $E_{48}$  για τις 48 ώρες και το  $E_{72}$  για τις 72 ώρες.

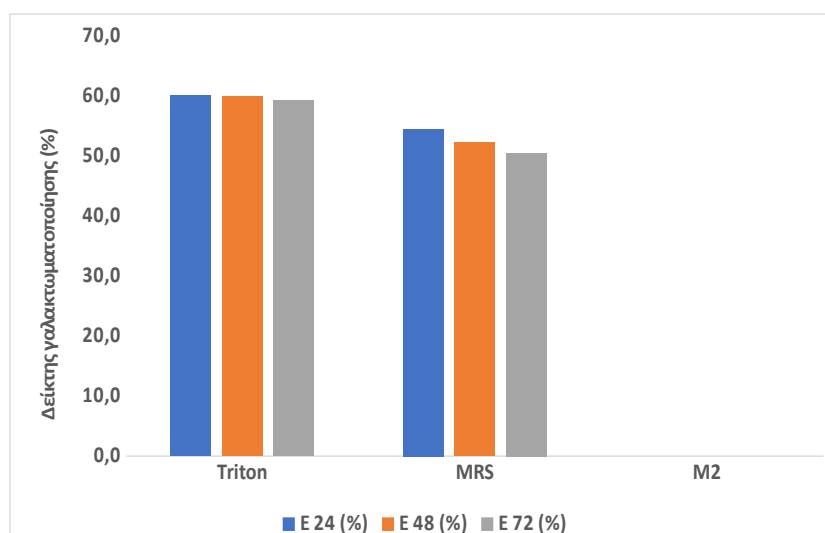
Για το συγκεκριμένο πείραμα ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το Triton X-100 (0.5%) και το MRS τα οποία έδωσαν γαλάκτωμα και για αρνητικό control το M2.

Στο διάγραμμα φαίνεται ο δείκτης γαλακτωματοποίησης για τα θετικά control στις 24, 48, 72 και 96 ώρες μέτρησης στο σογιέλαιο. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι και τα δύο δίνουν ένα αρκετά υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης (50% – 65%), το οποίο μένει σταθερό για όλες τις ώρες της μέτρησης. Αναφορικά με το Triton X-100, αποτελεί μια επιφανειοδραστική ουσία οπότε ήταν αναμενόμενο να έχει υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης, όμως το MRS, το οποίο δεν έχει εμβολιαστεί δίνει τόσο μεγάλο ποσοστό λόγω του Tween 80 που υπάρχει στην σύστασή του.



**Διάγραμμα 3.1:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στο M2, MRS και Triton X-100 (0.5%) στο σογιέλαιο μετά από 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης.

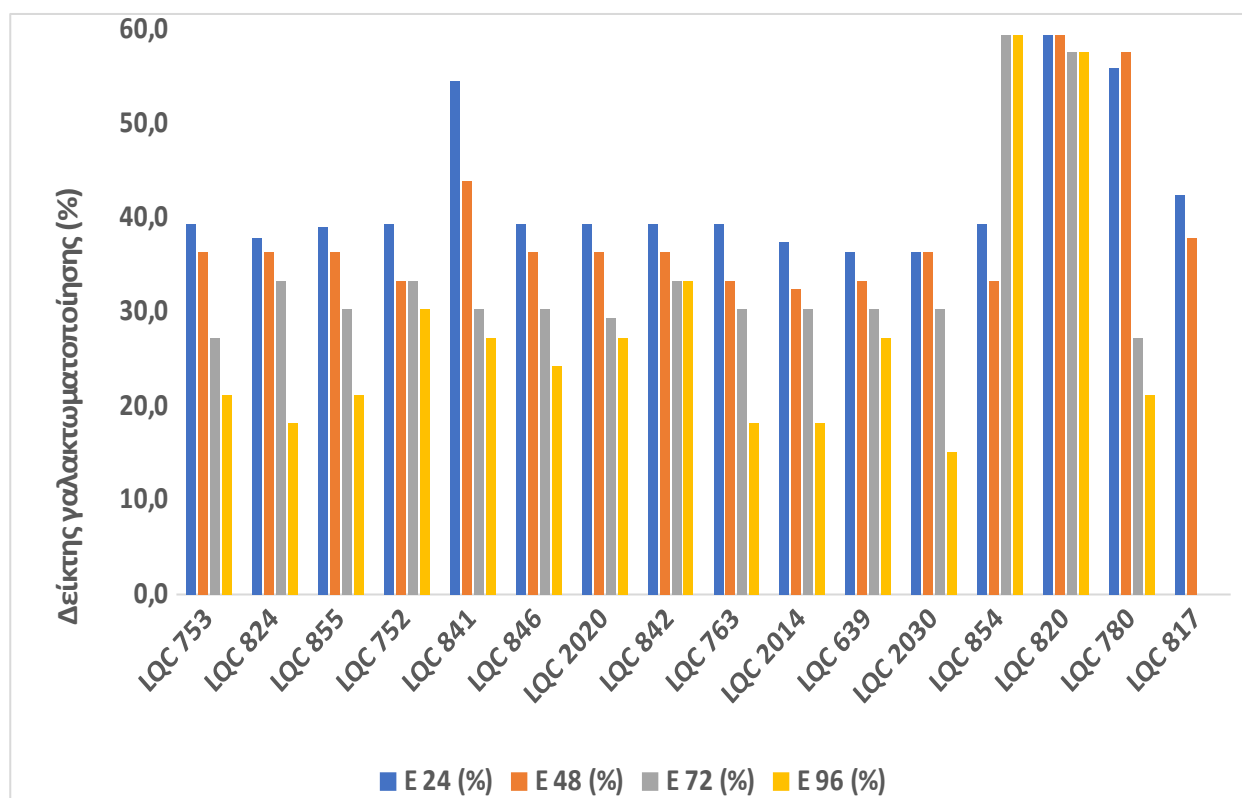
Όπως διακρίνουμε και παραπάνω το Triton X-100 (0.5%) δίνει ένα πολύ υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης (περίπου 60%) για όλες τις ώρες μέτρησης στο σογιέλαιο. Το MRS και το M2 ακολουθούν με ένα χαμηλότερο ποσοστό (40% - 50%) για όλες τις ώρες, με το M2 όμως να μειώνεται το ποσοστό γαλακτωματοποίησης κάτω από το 10% στις 72 ώρες.



**Διάγραμμα 3.2:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στο M2, MRS και Triton X-100 (0.5%) στο παραφινέλαιο μετά από 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης.

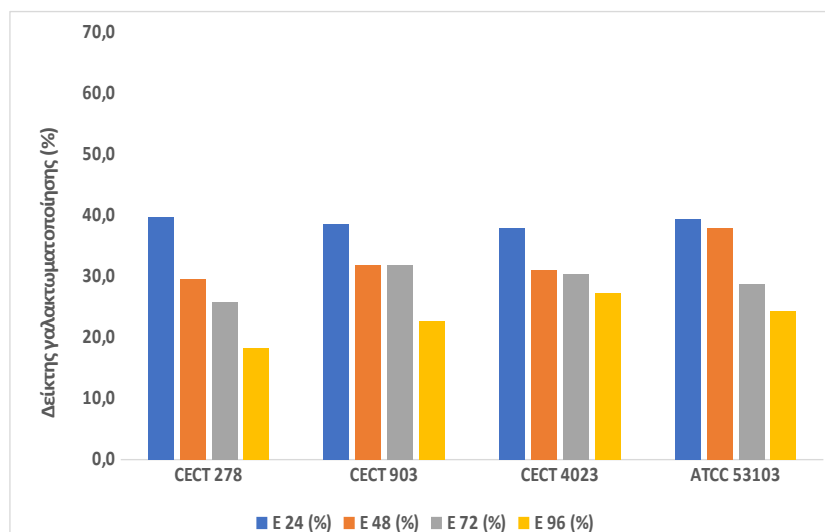
Επίσης ο δείκτης γαλακτωματοποίησης στο παραφινέλαιο για τα τρία control για τις 24, 48 και 72 ώρες, έδειξε το M2 να μην παρουσιάζει γαλάκτωμα σε καμία από τις μετρήσεις ενώ το MRS και το Triton X-100 (0.5%) έδωσαν ένα υψηλό ποσοστό γαλακτώματος (50% - 60%).

Όπως προαναφέρθηκε, αρχικά έγιναν δοκιμές γαλακτωματοποίησης στα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που ανήκουν στις συλλογές CECT, ATCC και LQC εμβολιασμένα σε υπόστρωμα MRS για 72 ώρες, από τα οποία λήφθηκε δείγμα 2 ml, το οποίο δεν φυγοκεντρήθηκε, και προστέθηκε 2 ml σογιέλαιο. Τα αποτελέσματα της γαλακτωματοποίησης εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Διάγραμμα 3.3:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης για όλα τα στελέχη LQC σε σογιέλαιο στις 24, 48, 72 και 96 ώρες μέτρησης του πειράματος.

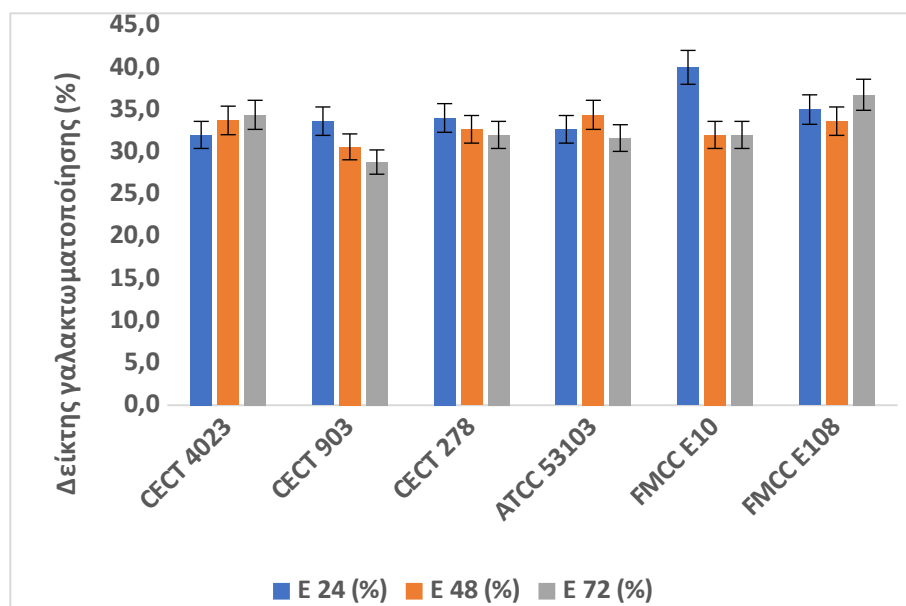
Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη LQC 841, 854, 820 και 780 δίνουν ένα πολύ μεγάλο ποσοστό γαλακτώματος το οποίο αγγίζει περίπου το 60% με το LQC 820 να έχει το υψηλότερο ποσοστό από όλα και να το διατηρεί σταθερό σε όλα τα χρονικά σημεία της μέτρησης. Τα υπόλοιπα στελέχη δίνουν ένα ποσοστό γύρω στο 30% - 40% για τις 24 και 48 ώρες ενώ στην πορεία το ποσοστό μειώνεται αρκετά για τις 72 και 96 ώρες.



**Διάγραμμα 3.4:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης για τα στελέχη CECT και ATCC, για τις 24, 48, 72 και 96 ώρες μέτρησης στο σογιέλαιο.

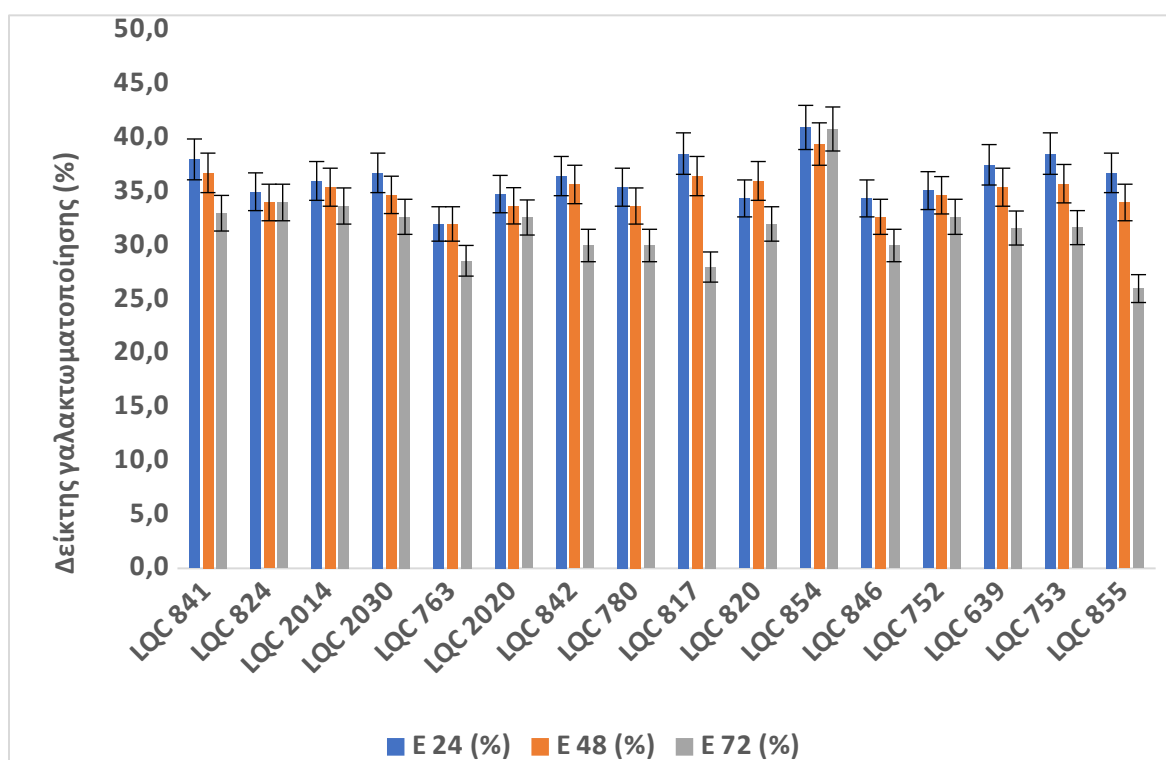
Στο διάγραμμα παρατηρήθηκε ότι όλα τα στελέχη έδωσαν περίπου το ίδιο ποσοστό γαλακτωματοποίησης (περίπου 40%) στις 24 ώρες μέτρησης του πειράματος, ενώ για τις υπόλοιπες ώρες 48, 72 και 96 το ποσοστό του γαλακτώματος αρχίζει να μειώνεται σταδιακά σε όλα τα στελέχη.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα στελέχη είναι εμβολιασμένα σε MRS το οποίο έδωσε ποσοστό γαλακτωματοποίησης 40% - 50%, άρα δεν είναι δυνατόν να κατανοήσουμε αν αυτό το γαλάκτωμα που δίνουν τα στελέχη οφείλεται στις παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ή στο υπόστρωμα. Για αυτόν τον λόγο, στο επόμενο βήμα, όλα τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε M2 το οποίο παρουσίασε ποσοστό 30% με 40% στο σογιέλαιο και καθόλου γαλάκτωμα στο παραφινέλαιο. Επίσης η δοκιμή έγινε σε φυγοκεντρημένα δείγματα ώστε να αποφευχθεί τυχόν παρεμπόδιση από τα κύτταρα. Ακόμη, οι μετρήσεις για τα γαλακτώματα μετρήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες ζύμωσης, καθώς δε φάνηκε μεγάλη διαφορά μεταξύ 72 και 96 ωρών. Το υπερκείμενο τους χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή γαλακτωματοποίησης στο παραφινέλαιο και στο σογιέλαιο, και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Διάγραμμα 3.5:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης για τα στελέχη CECT, ATCC και FMCC στο σογιέλαιο μετά από 24, 48 και 72 ώρες.

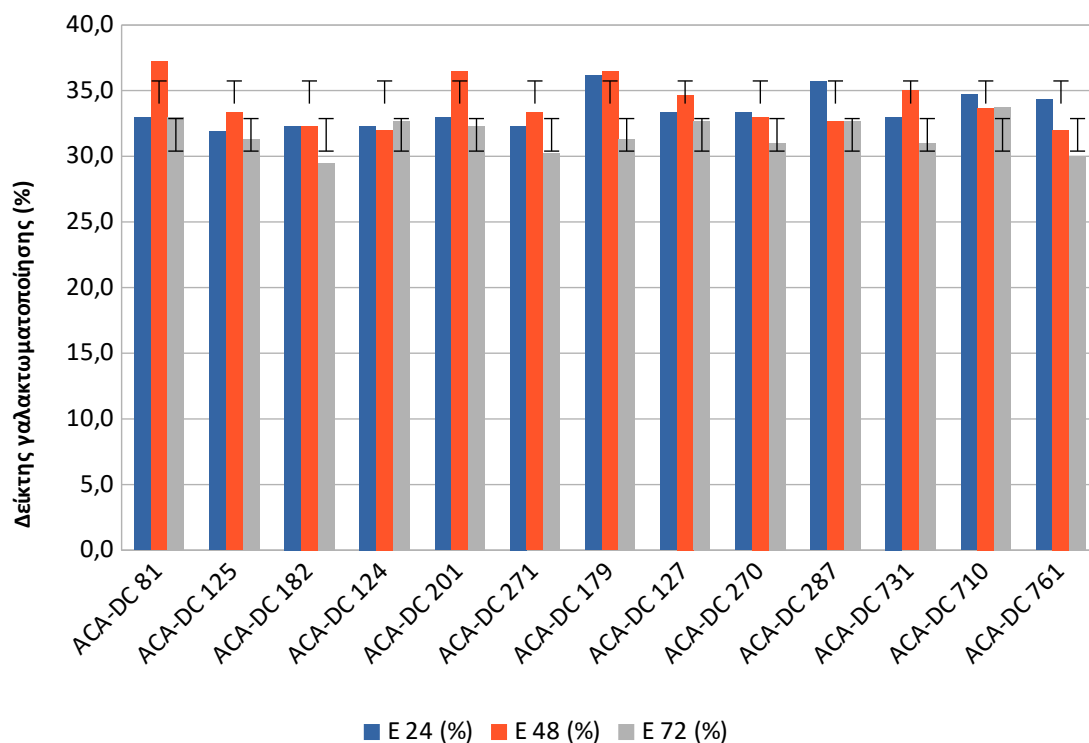
Παρατηρούμε ότι όλα τα στελέχη έδωσαν ένα αρκετά υψηλό ποσοστό γύρω στο 30% με 40%. Το E10 στο E<sub>24</sub> (%) έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό αλλά στις επόμενες ώρες το γαλάκτωμά του μειώθηκε στο 30%-35%.



**Διάγραμμα 3.6:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα στελέχη LQC στο σογιέλαιο στις 24, 48 και 72 ώρες του πειράματος.

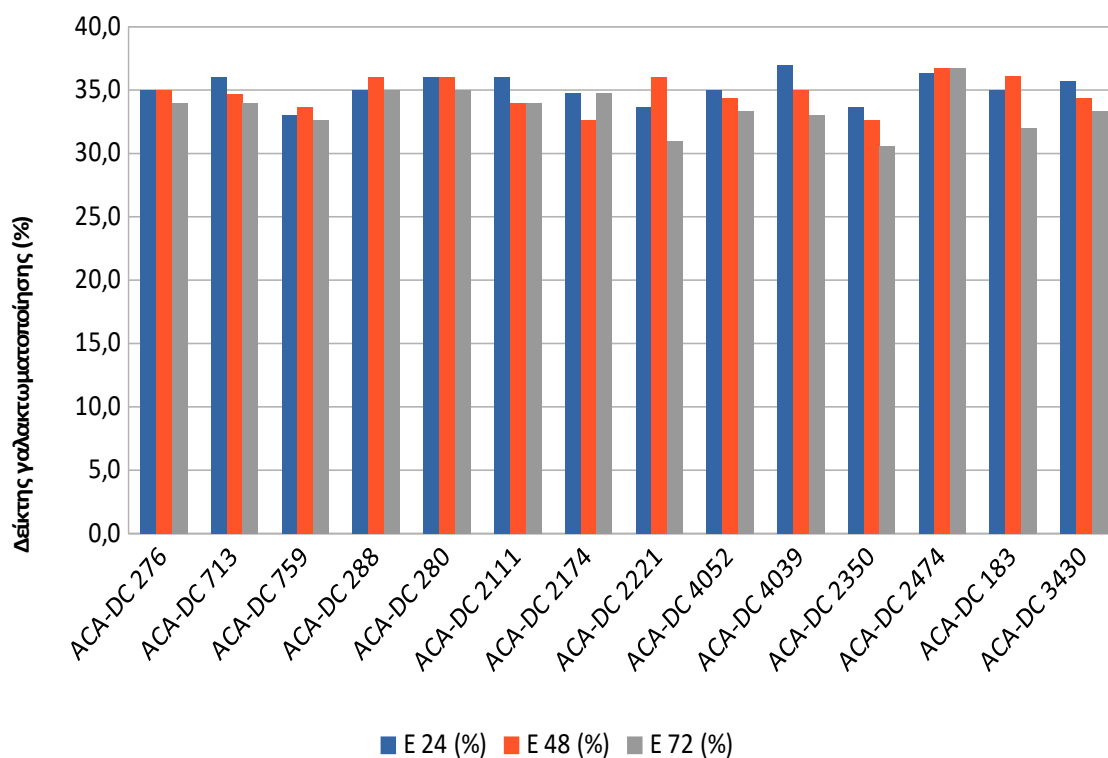
Στο παραπάνω διάγραμμα το στέλεχος LQC 854 είχε το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτώματος (περίπου 40%), με μία μικρή μείωση στις 48 ώρες. Τα υπόλοιπα στελέχη

ακολουθούν με ποσοστό γύρω στο 35% για το  $E_{24}$  (%), το οποίο μειώνεται σταδιακά στις 48 και στις 72 ώρες.



**Διάγραμμα 3.7:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα στελέχη της συλλογής ACA-DC στο σογιέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες του πειράματος.

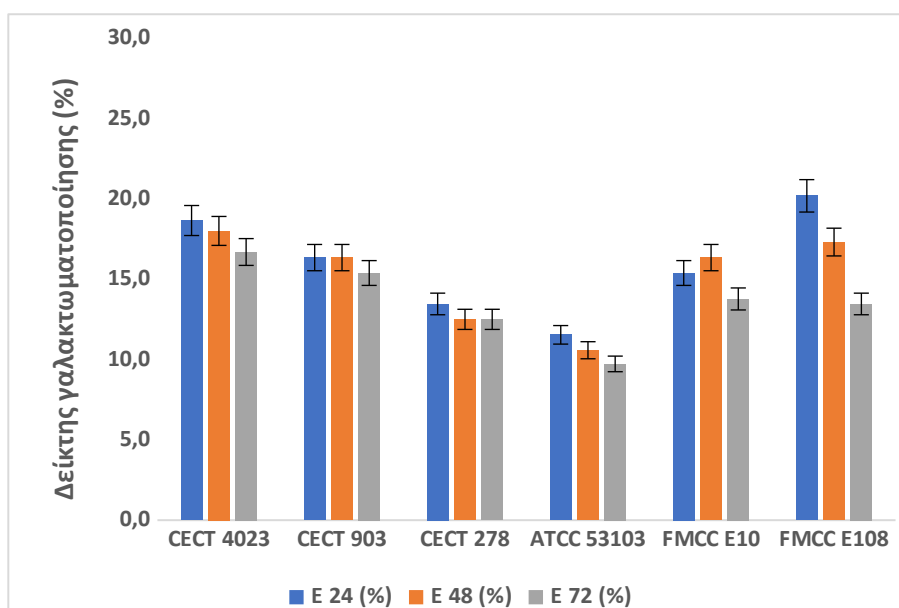
Όπως παρατηρήθηκε και παραπάνω όλα τα στελέχη είχαν ποσοστό γαλακτώματος περίπου 30% με 35%. Τα στελέχη 81 και 201 έδωσαν ποσοστό πάνω από 35% στις 48 ώρες μέτρησης, και το 179 και 287 να δίνουν αυτό το ποσοστό για τις 24 ώρες.



**Διάγραμμα 3.8:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα στελέχη της συλλογής ACA-DC στο σογιέλαιο στις 24, 48 και 72 ώρες μετρήσεων.

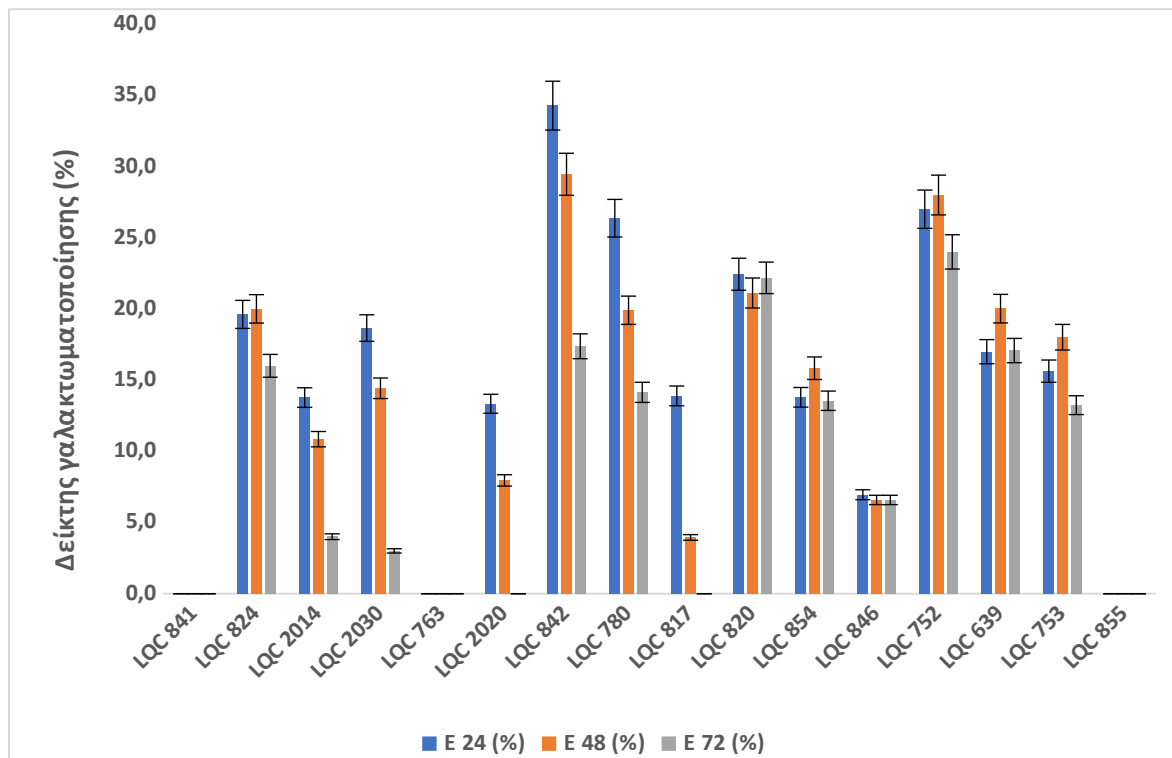
Παρατηρήθηκε στο παραπάνω διάγραμμα ότι όλα τα στελέχη έδωσαν ποσοστό γαλακτώματος γύρω στο 35% με καλύτερα να θεωρούνται τα στελέχη 2474 και 280 τα οποία κράτησαν σταθερό το γαλάκτωμά τους σε όλες τις ώρες της πειραματικής διαδικασίας.

Η δοκιμή γαλακτωματοποίησης εφαρμόστηκε και στο παραφινέλαιο με σκοπό να δούμε ανάμεσα στα δυο έλαια, που πραγματοποιείται καλύτερη γαλακτωματοποίηση και ποιο δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Με την ίδια μέθοδο και χρησιμοποιώντας το υπερκείμενο των δειγμάτων δίνονται τα αποτελέσματα στα παρακάτω διαγράμματα για τις 24, 48 και 72 ώρες που έγινε η μέτρηση για το πείραμα.



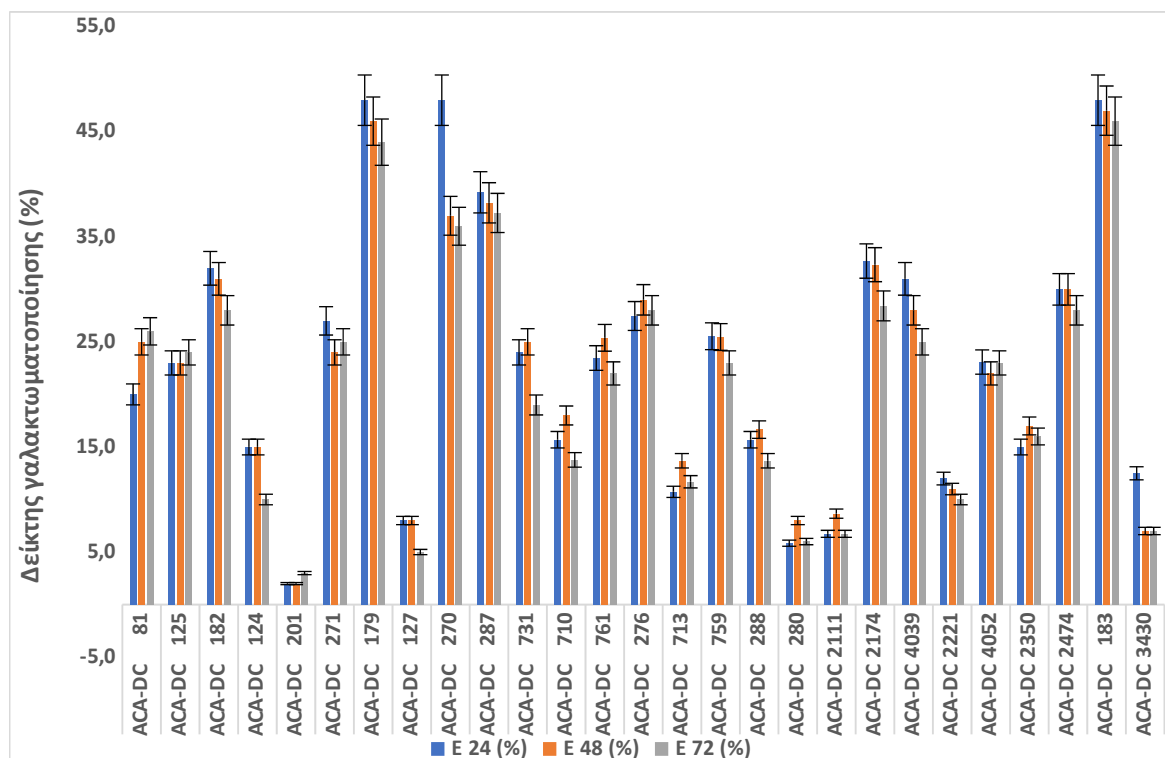
**Διάγραμμα 3.9:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης για τα στελέχη της συλλογής CECT, ATCC και FMCC στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες.

Όπως παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκει στο E108 καθώς και στο 4023 (περίπου στο 20%), ενώ το μικρότερο ποσοστό το δίνει το στέλεχος 53103 (περίπου 10%). Τα υπόλοιπα στελέχη 903, 278 και E10 διατηρούν ένα σταθερό ποσοστό γύρω στο 15%.



**Διάγραμμα 3.10:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα στελέχη LQC στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες του πειράματος.

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει όλα τα στελέχη της συλλογής LQC, με τα στελέχη 842 και 752 να δίνουν ένα ποσοστό γαλακτώματος 30% - 35% στις 24 ώρες το οποίο μειώνεται στις 72 ώρες του πειράματος. Τα στελέχη 841, 763 και 855 δεν παρουσίασαν καθόλου γαλάκτωμα, ενώ το 2020 και το 817 στις 72 ώρες το ύψος του γαλακτώματος μειώθηκε στο 0%. Τα υπόλοιπα στελέχη εμφανίζουν γαλάκτωμα στις 24 ώρες το οποίο όμως μειώνεται στις 48 ώρες με μεγάλη πτώση στις 72 ώρες.



**Διάγραμμα 3.11:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης για τα στελέχη ACA-DC στο παραφινέλαιο στις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω διάγραμμα το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτώματος το έδωσαν τα στελέχη 179 και 183 καθώς και το 270 για το E<sub>24</sub> (%) μόνο. Το μικρότερο ποσοστό εμφανίζεται για τα στελέχη 201, 127, 280 και 2111 τα οποία δίνουν ένα ποσοστό γύρω στο 5%. Τα υπόλοιπα στελέχη κυμαίνονται σε ποσοστό γαλακτώματος από 15% μέχρι 35% με διάφορες μεταβολές στις 48 και 72 ώρες του πειράματος.

### 3.4 Κατανάλωση λακτόζης

Η κατανάλωση λακτόζης είναι ένας σημαντικός παράγοντας καθώς μπορεί να δείξει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε διάφορα χρονικά σημεία της ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί όσο μεγαλώνουν τα γαλακτικά βακτήρια, στην συγκεκριμένη περίπτωση, τόσο πιο πολύ λακτόζη θα καταναλώσουν αφού αποτελεί και την βασική “τροφή” για την ανάπτυξή τους. Άρα όσο καταναλώνεται η λακτόζη τόσο αναπτύσσονται τα γαλακτικά βακτήρια και τόσο πιο γρήγορα θα παραχθούν και τα παραπροϊόντα, όπως το γαλακτικό οξύ και οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αν υπάρχουν.

Για το συγκεκριμένο πείραμα παρασκευάστηκε ένα υπόστρωμα στο οποίο η κύρια πηγή άνθρακα ήταν η λακτόζη σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Στο υπόστρωμα αυτό εμβολιάστηκαν όλα τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων, επώαστηκαν για 72 ώρες και λήφθηκε δείγμα προς ανάλυση με HPLC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, και ειδικότερα εμφανίζεται το ποσοστό επί τις εκατό της κατανάλωσης λακτόζης των γαλακτικών βακτηρίων μετά από 72 ώρες ζύμωσης σε όλα τα στελέχη.

**Πίνακας 3.4:** Ποσοστό (%) κατανάλωσης λακτόζης των γαλακτικών βακτηρίων μετά από 72 ώρες ζύμωσης σε όλα τα στελέχη.

| <i>Lactobacillus</i><br>ACA - DC | L <sub>72</sub><br>(%) | <i>Lactobacillus</i><br>LQC | L <sub>72</sub><br>(%) | <i>Lactobacillus</i><br>CECT | L <sub>72</sub><br>(%) | <i>Lactobacillus</i><br>ATCC | L <sub>72</sub><br>(%) |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|
| 81                               | 11.2                   | 639                         | 2.5                    | 278                          | 18.8                   | 53103                        | 1.7                    |
| 124                              | 33.3                   | 752                         | 24.1                   | 903                          | 0.8                    |                              |                        |
| 125                              | 30.4                   | 753                         | 25.9                   | 4023                         | 18.3                   |                              |                        |
| 127                              | 29.9                   | 763                         | 6.1                    |                              |                        |                              |                        |
| 179                              | 16.4                   | 780                         | 1.6                    |                              |                        |                              |                        |
| 182                              | 67.7                   | 817                         | 2.4                    |                              |                        |                              |                        |
| 183                              | 61.4                   | 820                         | 15.7                   |                              |                        |                              |                        |
| 201                              | 33.3                   | 824                         | 4.8                    |                              |                        |                              |                        |
| 270                              | 32.5                   | 841                         | 3.2                    |                              |                        |                              |                        |
| 271                              | 28.9                   | 842                         | 27.8                   |                              |                        |                              |                        |
| 276                              | 37.9                   | 846                         | 2.3                    |                              |                        |                              |                        |
| 280                              | 31.4                   | 854                         | 24.2                   |                              |                        |                              |                        |
| 287                              | 32.6                   | 855                         | 3.2                    |                              |                        |                              |                        |
| 288                              | 32.3                   | 2014                        | 27.2                   |                              |                        |                              |                        |
| 710                              | 33.8                   | 2020                        | 19.6                   |                              |                        |                              |                        |
| 713                              | 35.3                   | 2030                        | 24.0                   |                              |                        |                              |                        |

|      |      |  |  |  |  |  |  |
|------|------|--|--|--|--|--|--|
| 731  | 39.4 |  |  |  |  |  |  |
| 759  | 34.8 |  |  |  |  |  |  |
| 761  | 33.8 |  |  |  |  |  |  |
| 2111 | 38.5 |  |  |  |  |  |  |
| 2174 | 42.8 |  |  |  |  |  |  |
| 2221 | 37.1 |  |  |  |  |  |  |
| 2350 | 37.1 |  |  |  |  |  |  |
| 2474 | 37.9 |  |  |  |  |  |  |
| 3430 | 33.1 |  |  |  |  |  |  |
| 4039 | 33.4 |  |  |  |  |  |  |
| 4052 | 15.6 |  |  |  |  |  |  |

Με αρχική τιμή περίπου 20 g/L παρατηρήθηκε ότι από την συλλογή των στελεχών ACA-DC την μεγαλύτερη κατανάλωση παρουσίασαν τα στελέχη 183 και 182 σε ποσοστό 61.4% και 67.7% αντίστοιχα, ενώ τα στελέχη 81 και 4052 τα οποία είχαν ποσοστό 11- 15% παρουσίασαν την λιγότερη κατανάλωση λακτόζης όταν τα υπόλοιπα στελέχη είχαν ποσοστό περίπου 30- 35%.

Από την συλλογή των LQC το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης είχαν τα στελέχη 753, 842 και 2014 (25.9 - 27.8%), ενώ τα στελέχη 752, 820, 854, 2020 και 2030 έδωσαν ένα καλό ποσοστό κατανάλωσης όταν τα υπόλοιπα στελέχη είχαν συγκριτικά τη λιγότερη κατανάλωση με ποσοστό περίπου 2- 6% από την αρχική τιμή.

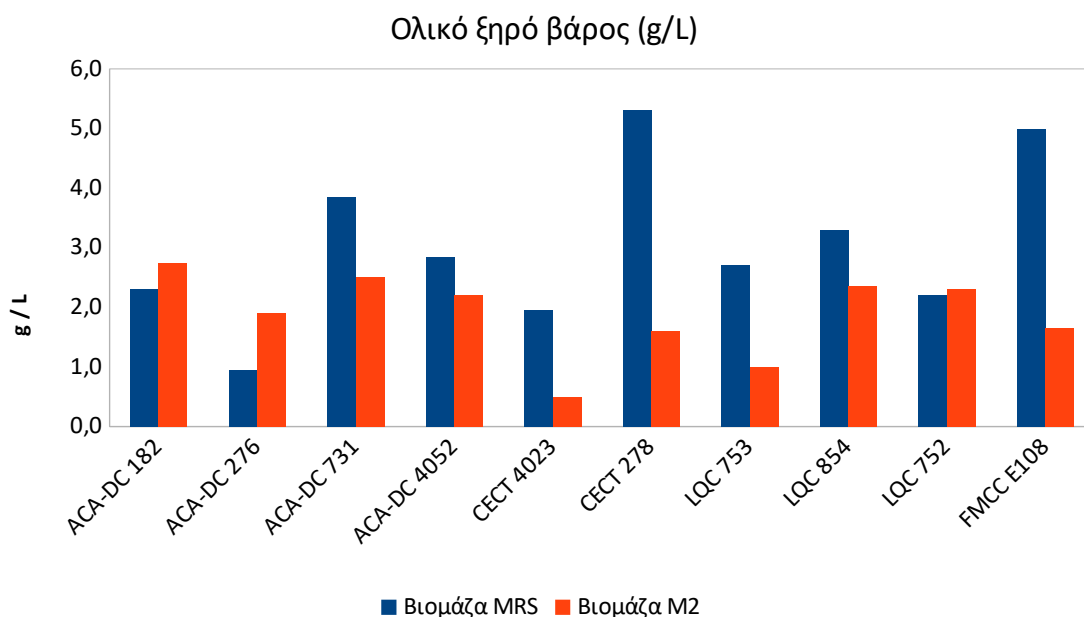
Τα στελέχη CECT 278 και 4023 έδειξαν ένα ποσοστό στο εύρος του 18% ενώ το στέλεχος 903 που ανήκει στην ίδια συλλογή εμφανίζει ένα πολύ χαμηλό ποσοστό (0.8%), άρα δεν κατανάλωσε σχεδόν καθόλου από την λακτόζη.

Το στέλεχος ATCC 53103 κατανάλωσε τη λακτόζη σε ποσοστό 1.7%, παρατήρηση που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Meurman et al., 1994).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων δεν υπήρξε διόρθωση της τιμής pH για κανένα από τα στελέχη, με αποτέλεσμα το pH να είναι αρκετά χαμηλό (4.0-4.5) λόγω του γαλακτικού οξέος που παράγουν τα βακτήρια. Καθώς λοιπόν δεν υπήρχαν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξή τους, ενδέχεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες pH να αυξάνεται η κατανάλωση λακτόζης για κάποια από τα βακτηριακά στελέχη.

### 3.5 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους, total dry weight

Σε πρώτο στάδιο η μέτρηση του ολικού ξηρού βάρους πραγματοποιήθηκε στα δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Στόχος ήταν να αξιολογηθεί αν το θρεπτικό μέσο M2, το οποίο περιείχε λιγότερα θρεπτικά συστατικά παρεμπόδιζε τη βακτηριακή ανάπτυξη συγκριτικά με το MRS. Μετά από 24 ώρες ξήρανσης της βιομάζας (προερχόμενη από 72 ώρες καλλιέργειας), τα δείγματα ζυγίστηκαν εκ νέου και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στο παρακάτω διάγραμμα, εκφρασμένα σε συγκέντρωση g/L.



**Διάγραμμα 3.12:** Σύγκριση των στελεχών με βάση την βιομάζα τους μετά την ανάπτυξή τους για 72 ώρες σε υπόστρωμα MRS και M2 αντίστοιχα.

Όπως διακρίνεται από το παραπάνω διάγραμμα η ανάπτυξη των στελεχών είναι αρκετά ικανοποιητική και για τα δύο υποστρώματα, όμως φαίνεται ότι καλύτερη ανάπτυξη γίνεται στο MRS για όλα τα στελέχη πλην του 182 και 276 που παρουσιάζουν καλύτερη ανάπτυξη στο M2. Τα στελέχη 278 και E108 παρουσιάζουν την υψηλότερη βιομάζα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη στο θρεπτικό MRS, σε αντίθεση με τα στελέχη 276 και 4023 που παρουσιάζουν χαμηλή βιομάζα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το MRS είναι ένα πιο πλούσιο υπόστρωμα σε θρεπτικά συστατικά, ενώ επίσης η ύπαρξη του Tween βοηθάει στην καλύτερη διασπορά των συστατικών μέσα στο μίγμα αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα τους προς κατανάλωση.

Ωστόσο, ο σκοπός του συγκεκριμένου ήταν ναδειχθεί ότι η χρήση ενός πιο απλού θρεπτικού υποστρώματος δεν παρεμποδίζει τη βακτηριακή αύξηση και κατά συνέπεια την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΟ ΤΥΡΟΓΑΛΟ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μετά την πειραματική διαδικασία και εφόσον αξιολογήθηκαν συνολικά τα αποτελέσματα από το κάθε πείραμα, επιλέχθηκαν 10 γαλακτικά βακτήρια τα οποία είχαν την καλύτερη επίδοση στις περισσότερες μεθόδους επιλογής και κυρίως αναφορικά με το δείκτη γαλακτωματοποίησης.

Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι για τη διευκόλυνση της επιλογής των γαλακτικών βακτηρίων, σημαντικό ρόλο έπαιξε και η μέτρηση της μείωσης επιφανειακής τάσης με τενσιόμετρο η οποία μετρήθηκε αλλά εκτός του πλαισίου της παρούσης μελέτης. Αυτή η μέθοδος θεωρείται αρκετά αξιόπιστη για την ένδειξη παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και μαζί με τις υπόλοιπες μεθόδους επιλέχθηκαν τα εξής στελέχη για τις ζυμώσεις στο τυρόγαλο.

**Πίνακας 4.1:** Επιλεγμένα στελέχη μετά από αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

| Συλλογή | Αριθμός στελεχών | Είδος                   |
|---------|------------------|-------------------------|
| CECT    | <b>278</b>       | <i>Lb. acidophilus</i>  |
|         | <b>4023</b>      | <i>Lb. pentosus</i>     |
| LQC     | <b>752</b>       | <i>Lb. coryniformis</i> |
|         | <b>753</b>       | <i>Lb. coryniformis</i> |
|         | <b>854</b>       | <i>Lb. sakei</i>        |
| ACA-DC  | <b>182</b>       | <i>Lb. fermentum</i>    |
|         | <b>276</b>       | <i>Lb. plantarum</i>    |
|         | <b>731</b>       | <i>Lb. plantarum</i>    |
|         | <b>4052</b>      | <i>Lb. plantarum</i>    |
| FMCC    | <b>E108</b>      | <i>Lb. pentosus</i>     |

Όπως φαίνεται τα δέκα (10) στελέχη αυτά που θα αξιοποιηθούν τελικά για τις ζυμώσεις στο τυρόγαλο, ανήκουν στις συλλογές CECT, LQC, ACA-DC και FMCC, αλλά και σε διαφορετικά είδη του γένους *Lactobacillus*. Αυτά τα στελέχη έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με τις αρχικές μεθόδους επιλογής, αλλά και στη μείωση της επιφανειακής τάσης είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Ειδικότερα, τα στελέχη 278, 752, 854, 182, 4052 και E108 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης, καθώς και πολύ καλά αποτελέσματα σε ένα τουλάχιστον από τα πειράματα που υποβλήθηκαν, κυρίως στο δείκτη γαλακτωματοποίησης.

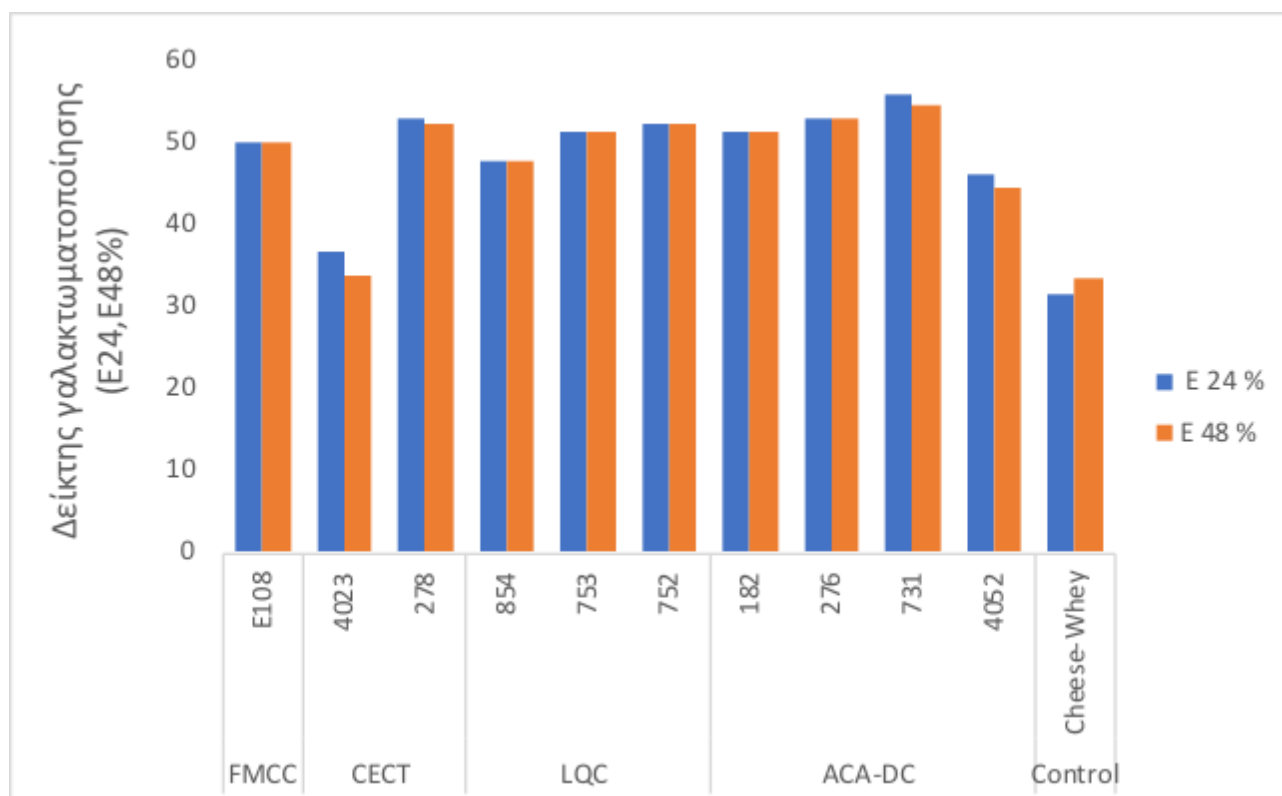
Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που επιλέχθηκαν θα αξιοποιηθούν στη συνέχεια σε ζυμώσεις με μόνο θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλο, αξιολογώντας διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση της ανάδευσης και ο έλεγχος του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τόσο σε μικροαερόφιλες όσο και σε αερόβιες συνθήκες, με απώτερο στόχο τη μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

#### 4.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ pH

Το πρώτο πείραμα αφορά στην ανάπτυξη των στελεχών χωρίς να ελεγχθεί το pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά και χωρίς ανάδευση, ήτοι στατικές συνθήκες για να ελεγχθεί η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθήκες μικροαερόφιλες για τα στελέχη. Εφόσον ακολουθήθηκε η διαδικασία για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και αποστείρωση στο τυρόγαλο, τοποθετήθηκε σε σωληνάκια με συνολικό όγκο 10 ml το κάθε ένα όπου εμβολιάστηκαν τα στελέχη και αναπτύχθηκαν σε κατάλληλη θερμοκρασία για 72 ώρες.

##### 4.1.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΠΟ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ)

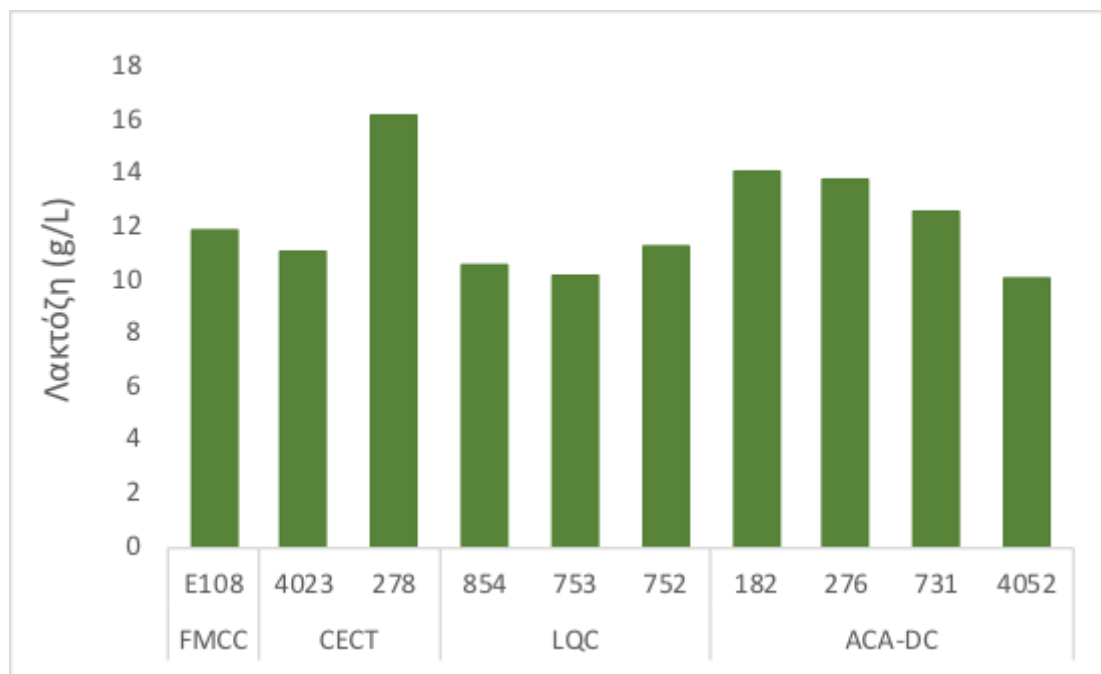
Μετά το πέρας της επώασης, από το κάθε στέλεχος λήφθηκε δείγμα 2 ml το οποίο φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε σωληνάκι μαζί με παραφινέλαιο για να γίνει το τεστ γαλακτωματοποίησης. Το ύψος του γαλακτώματος μετρήθηκε μετά από 24 και 48 ώρες για το δείγμα που λήφθηκε στις 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο.



**Διάγραμμα 4.1:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στο παραφινέλαιο μετά από 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο για τις 24 και 48 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι όλα τα στελέχη έδωσαν ένα υψηλό ποσοστό γαλακτώματος, περίπου στο 50%, εκτός από το στέλεχος CECT 4023 με ποσοστό γύρω στο 30% - 40%. Το τυρόγαλο την χρονική στιγμή μηδέν και χωρίς να έχει εμβολιαστεί δίνει ένα ποσοστό γαλακτώματος κοντά στο 30%, δυσχεραίνοντας με τον τρόπο αυτό τον ακριβή προσδιορισμό του ποσοστού γαλακτωματοποίησης.

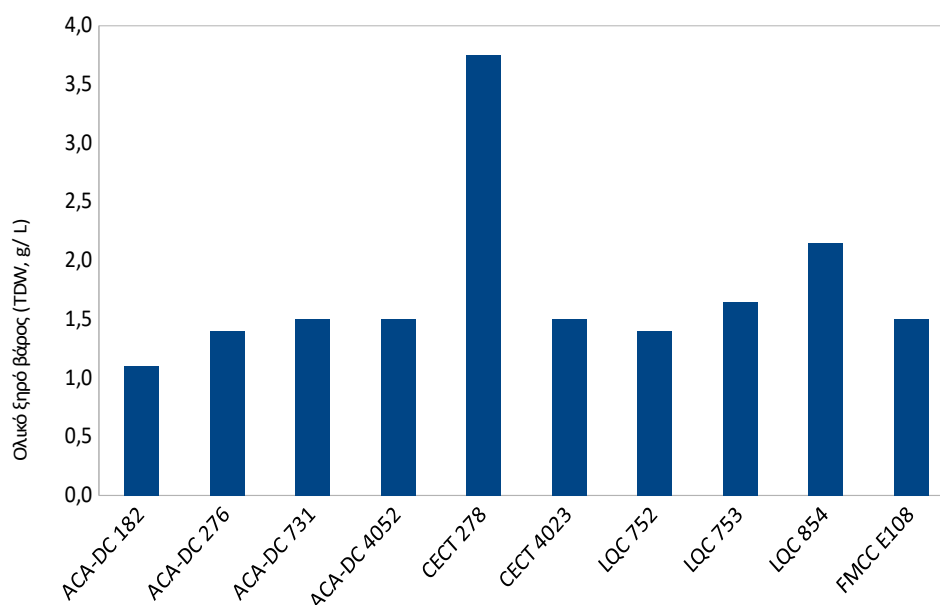
Μείζονος σημασίας ρόλο αποτελεί και η κατανάλωση λακτόζης, καθώς σχετίζεται με τη βακτηριακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση την ενδεχόμενη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανάλωση λακτόζης για όλα τα βακτηριακά στελέχη μετά από 72 ώρες ζύμωσης, χωρίς έλεγχο της τιμής pH.



**Διάγραμμα 4.2:** Κατανάλωση λακτόζης για όλα τα βακτηριακά στελέχη μετά από 72 ώρες ζύμωσης.

Το διάγραμμα παρουσιάζει την κατανάλωση λακτόζης έπειτα από 72 ώρες ζύμωσης για όλα τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ενώ η αρχική συγκέντρωση της λακτόζης στο τυρόγαλο μετρήθηκε 23.8 g/L. Η μεγαλύτερη κατανάλωση παρατηρήθηκε για το στέλεχος CECT 278. Παρόλα αυτά, όλα τα στελέχη κατανάλωσαν αρκετή από την αρχική λακτόζη που σημαίνει ότι όλα αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλο για 72 ώρες σε στατικές συνθήκες και χωρίς έλεγχο pH.

Μετά το τέλος του πειράματος μετρήθηκε και το ολικό ξηρό βάρος των στελεχών που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλο. Η μέτρηση έγινε μετά από ξήρανση της βιομάζας στους 65 °C για 24 ώρες και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. (TDW)



**Διάγραμμα 4.3:** Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους (Total Dry weight, TDW) σε στελέχη αναπτυγμένα στο τυρόγαλο μετά από 72 ώρες ζύμωσης.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα η υψηλότερη τιμή για τη βιομάζα εντοπίζεται στο στέλεχος CECT 278 και μετά ακολουθεί το στέλεχος LQC 854 ενώ την μικρότερη βιομάζα την έδωσε το στέλεχος ACA-DC 182. Συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα φαίνεται ότι η υψηλή κατανάλωση λακτόζης συνάδει με την παραγωγή βιομάζας για το στέλεχος CECT 278, ενώ παρατηρήθηκε και σχετικά υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης για το συγκεκριμένο στέλεχος.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκαν για το τεστ της μετατόπισης ελαίου για τις 24, 48 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο. Ως αρνητικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο, μη εμβολιασμένο τυρόγαλο τη χρονική στιγμή μηδέν. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα. Κάθε στέλεχος είχε από τρεις επαναλήψεις και στον Πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι.

**Πίνακας 4.2:** Δοκιμή μετατόπισης ελαίου στις 24, 48 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο.

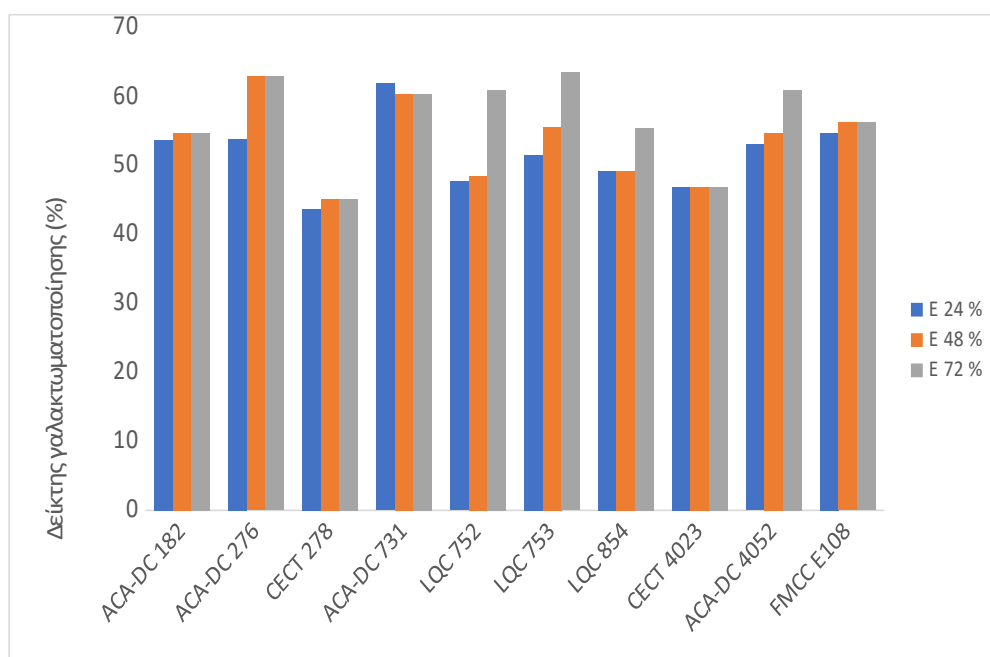
| Στελέχη            | Διαφορά με το τυρόγαλο |       |              |       |              |       |
|--------------------|------------------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|                    | Στις 24 ώρες           |       | Στις 48 ώρες |       | Στις 72 ώρες |       |
|                    | Average                | Stdev | Average      | Stdev | Average      | Stdev |
| <b>ACA-DC 182</b>  | 2.2                    | -0.26 | 2.5          | -0.48 | 2.1          | -0.59 |
| <b>ACA-DC 276</b>  | 1.7                    | 0.10  | 0.8          | -0.19 | 1.3          | 0.65  |
| <b>CECT 278</b>    | 2.0                    | 0.00  | 1.3          | -0.59 | 2.6          | 0.36  |
| <b>ACA-DC 731</b>  | 1.6                    | -0.25 | 1.4          | -0.11 | 2.1          | -0.16 |
| <b>LQC 752</b>     | 2.2                    | -0.26 | 1.4          | -0.10 | 1.4          | -0.59 |
| <b>LQC 753</b>     | 1.4                    | 0.71  | 1.5          | -0.44 | 2.1          | -0.5  |
| <b>LQC 854</b>     | 2.1                    | -0.65 | 1.2          | 0.65  | 1.8          | 0.00  |
| <b>CECT 4023</b>   | 0.1                    | 0.68  | 2.1          | 0.17  | 2.0          | -0.48 |
| <b>ACA-DC 4052</b> | 1.9                    | 0.05  | 2.1          | -0.59 | 1.9          | -0.51 |
| <b>FMCC E108</b>   | 2.1                    | 0.14  | 2.0          | 0.84  | 1.0          | 0.00  |
| <b>Cheese whey</b> | 4.8                    | 0.76  |              |       |              |       |

Στον πίνακα φαίνεται ότι όλα τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλο και υποβλήθηκαν στο τεστ της μετατόπισης ελαίου, μετά τη διαφορά τους με το τυρόγαλο έδωσαν θετικά αποτελέσματα για όλες τις ώρες του πειράματος.

#### 4.1.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΠΟ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ) ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ

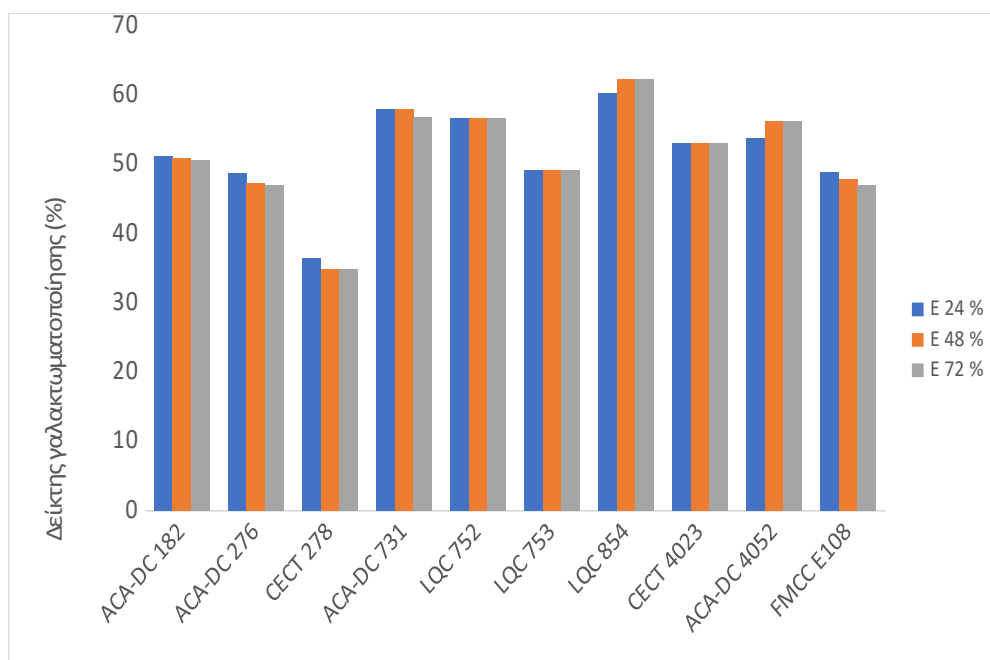
Δεδομένου ότι το προηγούμενο πείραμα παρουσίασε αξιόλογα αποτελέσματα αναφορικά με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών αλλά και την κατανάλωση λακτόζης, πραγματοποιήθηκε εκ νέου με τη διαφορά ότι δείγματα λήφθηκαν σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης, ήτοι 24, 48 και 72 ώρες ζύμωσης. Ο στόχος ήταν να παρατηρηθεί η εξέλιξη στην κατανάλωση λακτόζης, στη βακτηριακή ανάπτυξη καθώς και στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Συνεπώς, ακολουθήθηκε η ίδια διεργασία για την επεξεργασία του τυρογάλακτος και τα σωληνάκια εμβολιάστηκαν με το αντίστοιχο στέλεχος. Για κάθε χρονικό σημείο όπου και λήφθηκε δείγμα, αντιστοιχούσε ένα σωληνάκι, ώστε να διατηρηθούν οι μικροαερόφιλες συνθήκες. Η αρχική τιμή pH πριν την έναρξη της ζύμωσης ρυθμίστηκε στο 6.7. Για κάθε δείγμα στο αντίστοιχο χρονικό σημείο πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή γαλακτωματοποίησης όπως φαίνεται παρακάτω.



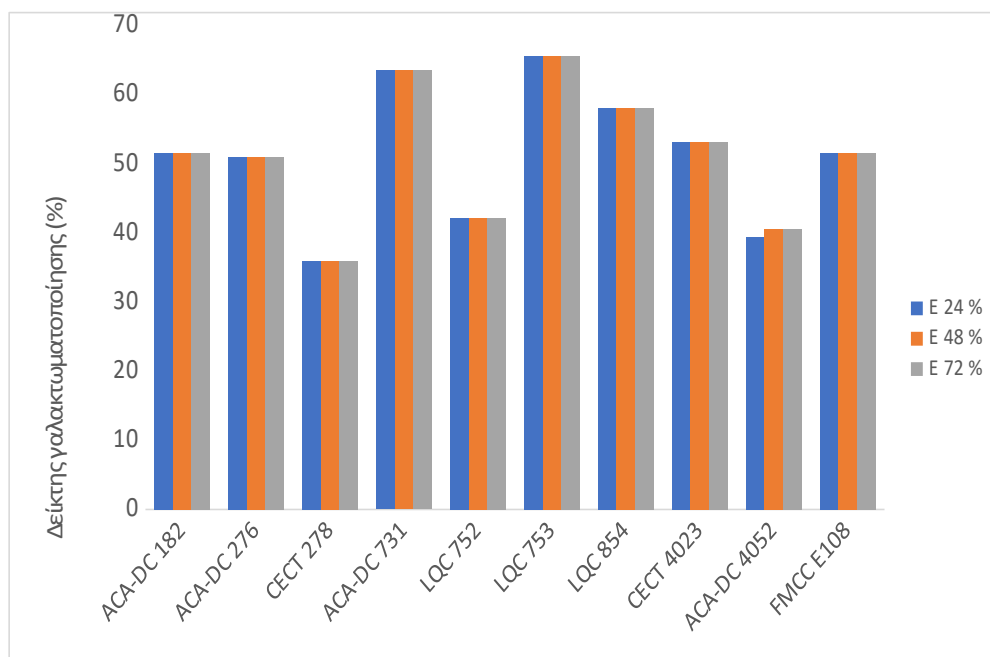
**Διάγραμμα 4.4:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 24 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη σε παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Όπως φαίνεται όλα τα στελέχη παρουσίασαν ένα υψηλό ποσοστό γαλακτώματος με τις μέγιστες τιμές να προέρχονται από τα στελέχη ACA-DC 276 και ACA-DC 731 με ποσοστό άνω του 60%. Το τυρόγαλο έδωσε ένα ποσοστό γαλακτωματοποίησης μεταξύ 19-22%, αρκετά μικρό σε σχέση με τα στελέχη.



**Διάγραμμα 4.5:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 48 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη σε παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Στο γράφημα φαίνεται ότι το καλύτερο ποσοστό γαλακτώματος έχει το στέλεχος LQC 854 με ποσοστό περίπου 60%, ενώ το μικρότερο ποσοστό ανήκει στο στέλεχος ACA-DC 182 και CECT 278.

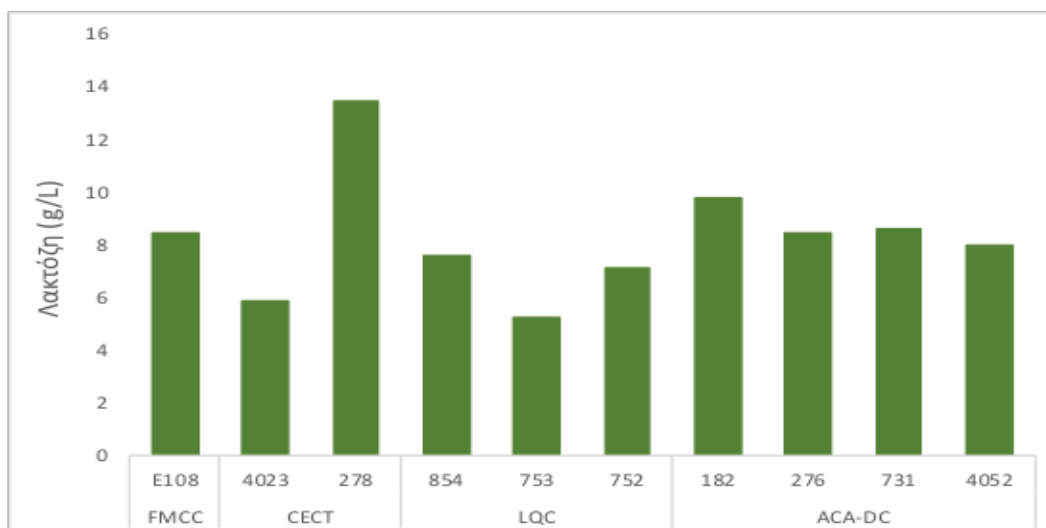


**Διάγραμμα 4.6:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 72 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Στο γράφημα φαίνεται ότι το υψηλότερο ποσοστό γαλακτώματος ανήκει στα στελέχη ACA-DC 731 και LQC 753 με ποσοστό άνω του 60% ενώ σε χαμηλότερο ποσοστό κυμαίνεται το στέλεχος CECT 278 και LQC 752.

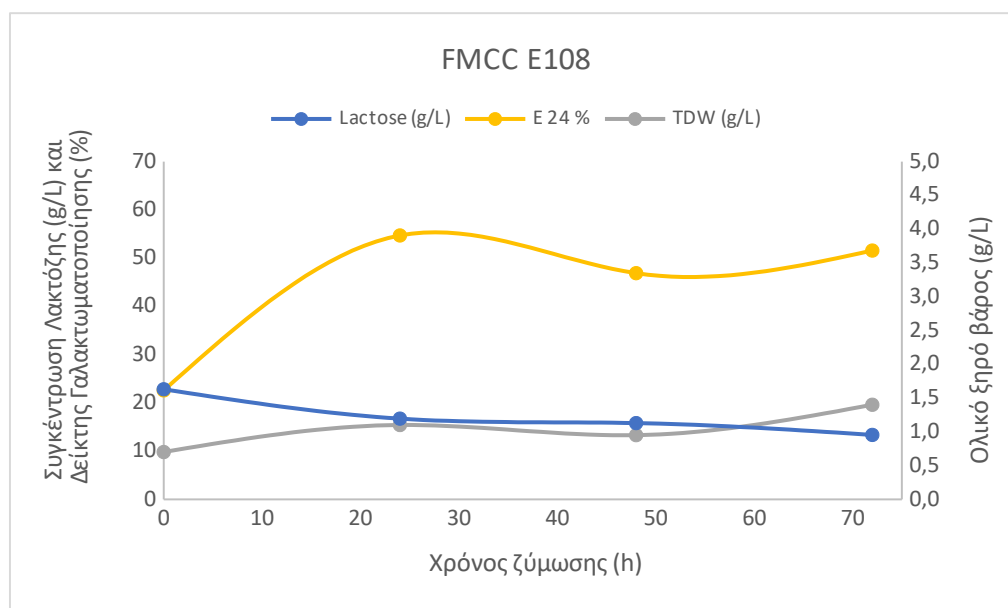
Για να δούμε την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων ελέγξαμε με HPLC την κατανάλωση λακτόζης για το κάθε στέλεχος στις 24, 48 και 72 ώρες της ζύμωσης στο τυρόγαλο σε

στατικές συνθήκες και χωρίς έλεγχο του pH, και τα αποτελέσματα φαίνονται στο επόμενο διάγραμμα.

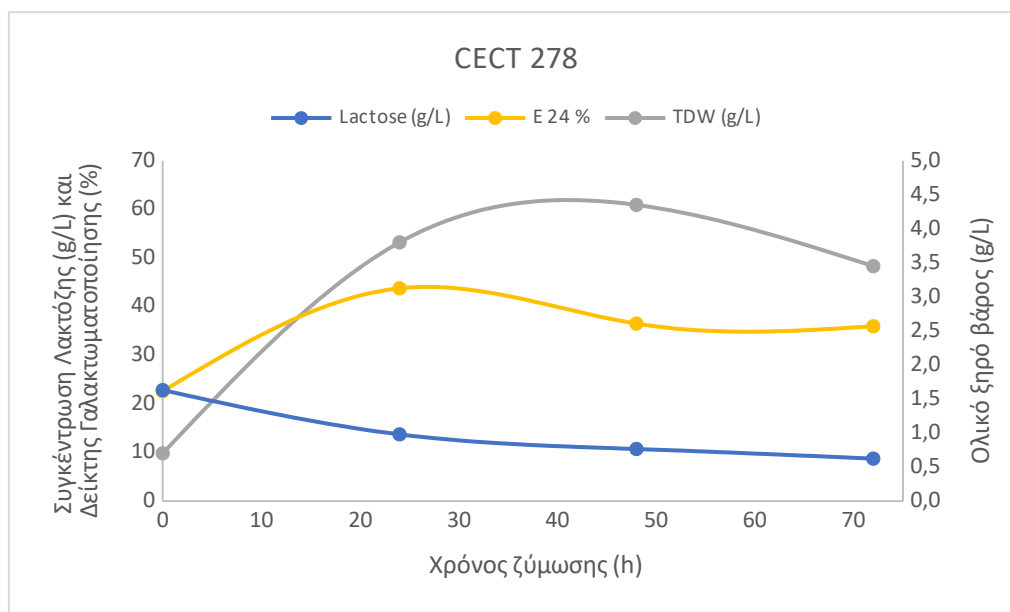


**Διάγραμμα 4.7:** Η κατανάλωση λακτόζης για όλα τα στελέχη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στο τυρόγαλο.

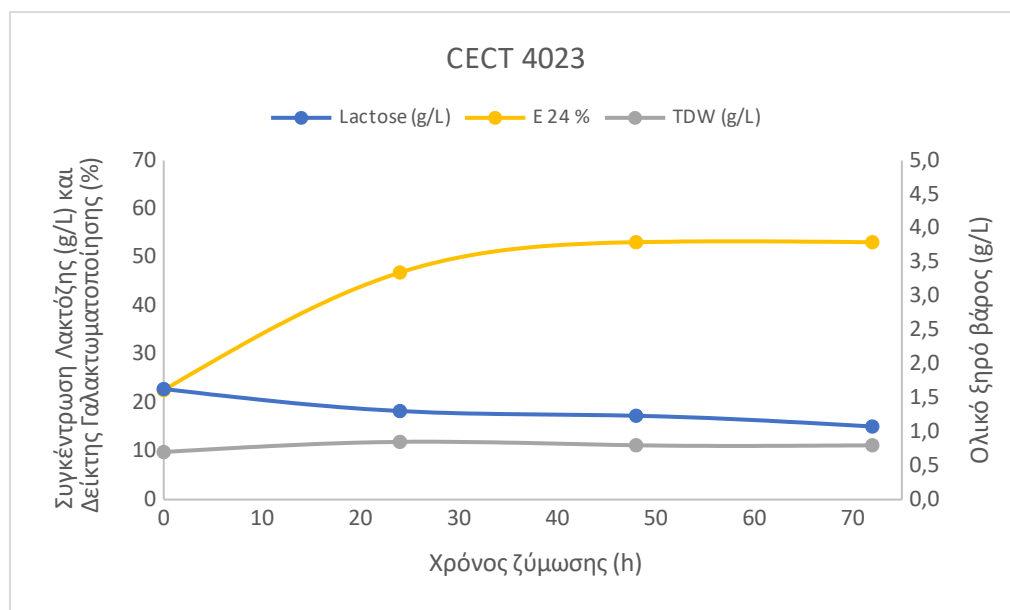
Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρχική τιμή της λακτόζης στο τυρόγαλο είναι 23.3 g/L, και εύκολα παρατηρείται ότι στο πέρας της ζύμωσης, η κατανάλωση της λακτόζης κρίνεται σημαντική σε όλα τα στελέχη σε όλα τα στελέχη. Ειδικότερα, η μεγαλύτερη κατανάλωση να φαίνεται στο στέλεχος CECT 278 όπου στις 72 ώρες έχουν καταναλωθεί 13.5 g/L λακτόζης (κατανάλωση 62%). Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζεται η κινητική της κατανάλωσης λακτόζης για όλα τα στελέχη καθώς και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους αλλά και η εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα διαφορετικά σημεία της ζύμωσης.



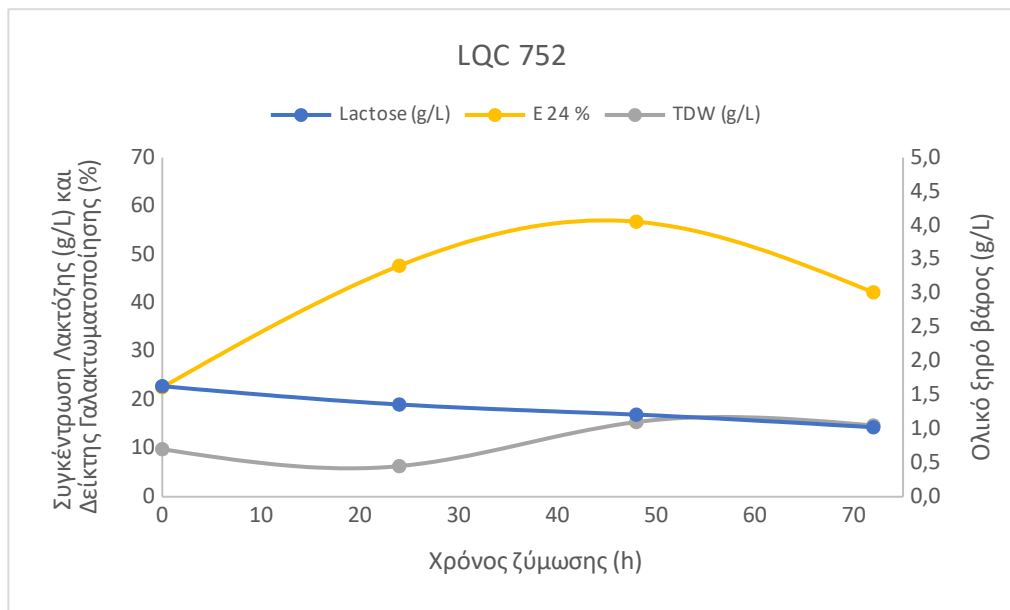
**Διάγραμμα 4.8:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους FMCC E108.



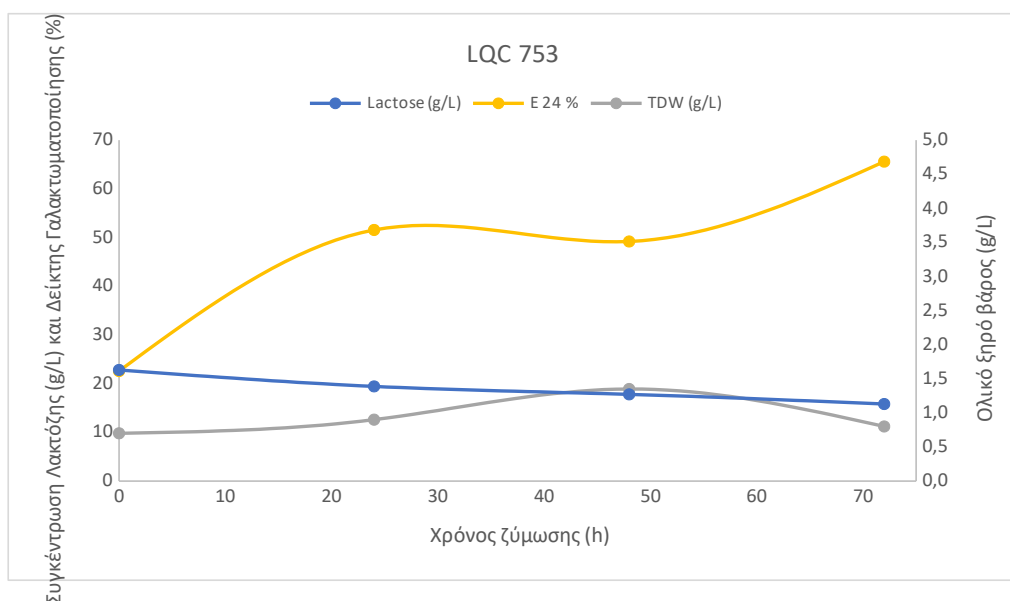
**Διάγραμμα 4.9:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 278.



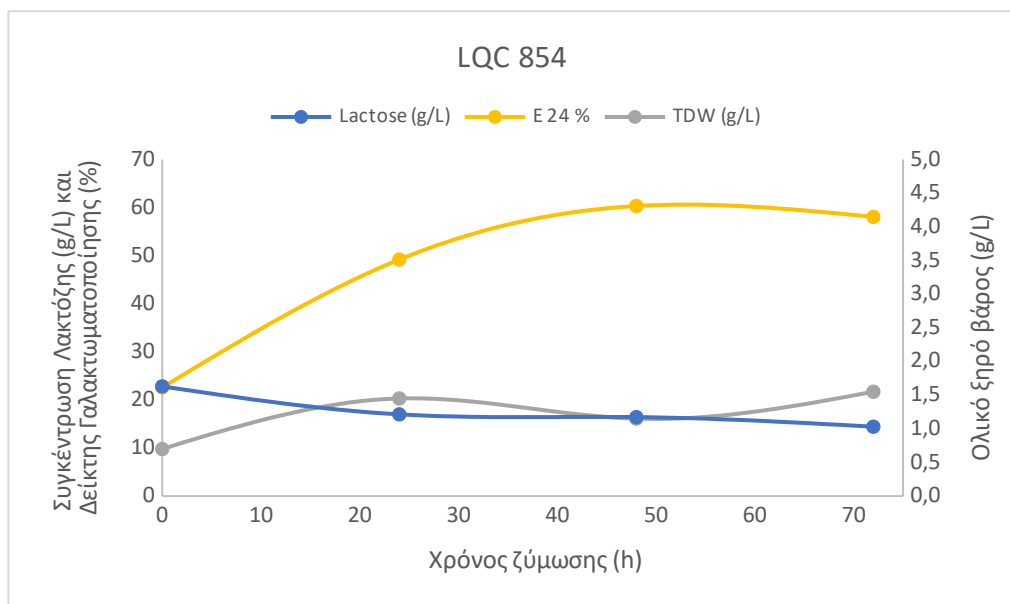
**Διάγραμμα 4.10:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 4023.



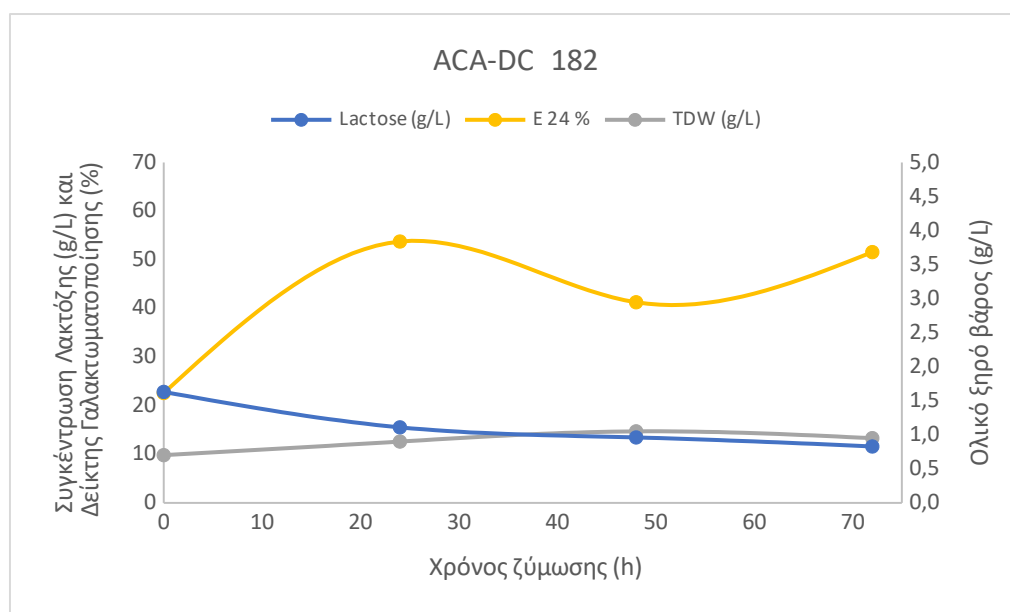
**Διάγραμμα 4.11:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 752.



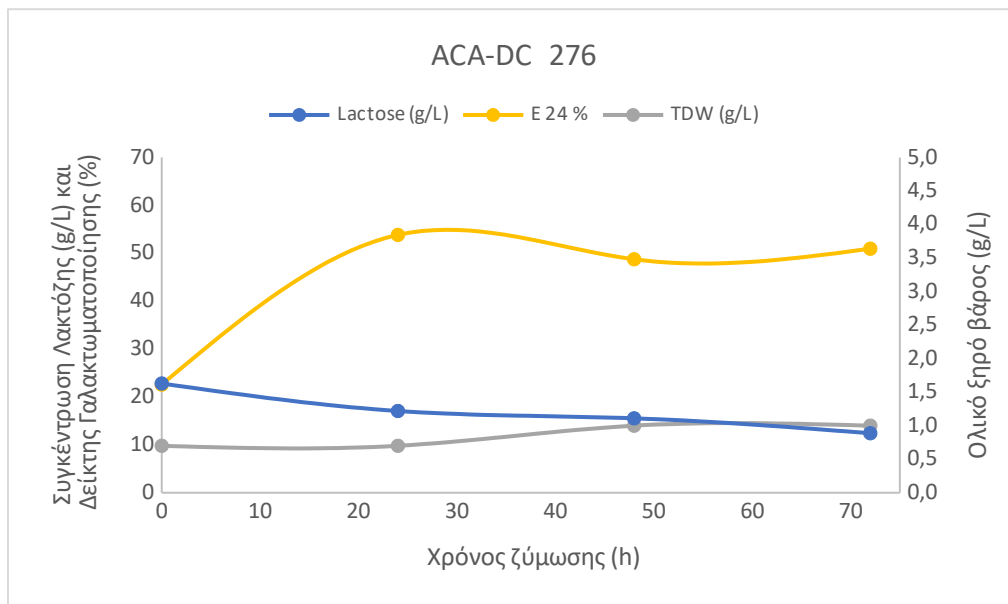
**Διάγραμμα 4.12:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 753.



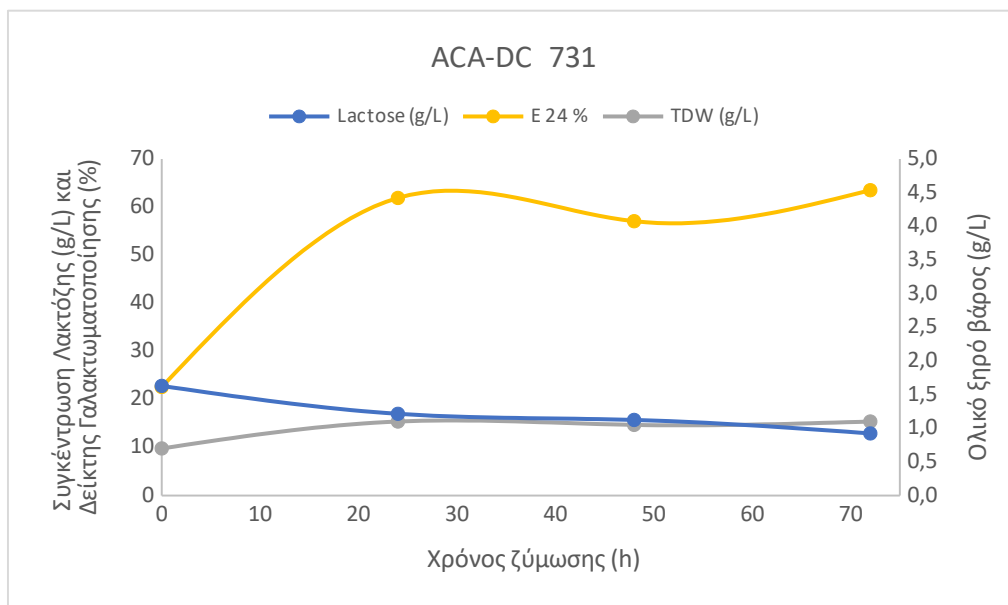
**Διάγραμμα 4.13:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 854.



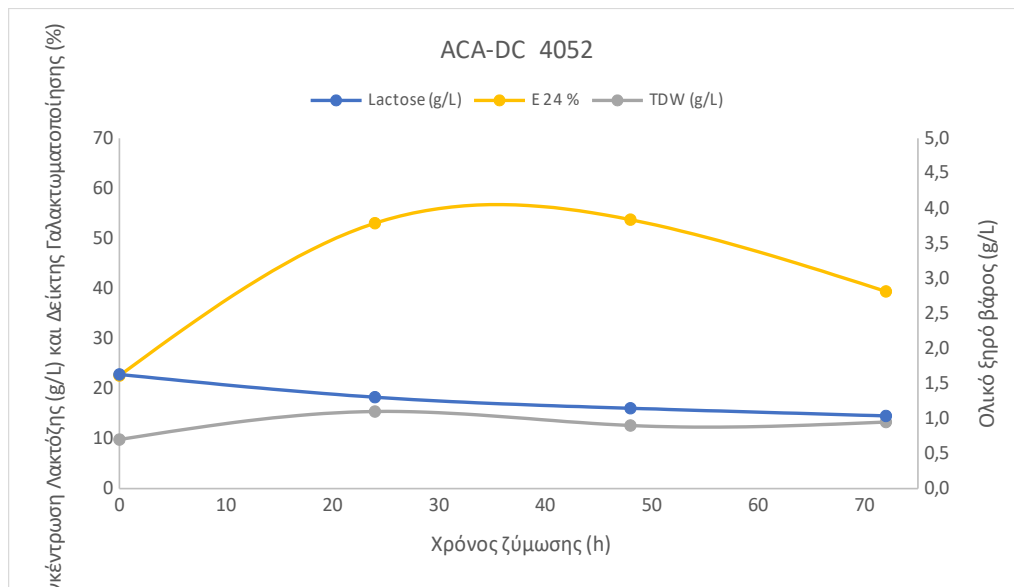
**Διάγραμμα 4.14:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 182.



**Διάγραμμα 4.15:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 276.



**Διάγραμμα 4.16:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 731.



**Διάγραμμα 4.17:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 4052.

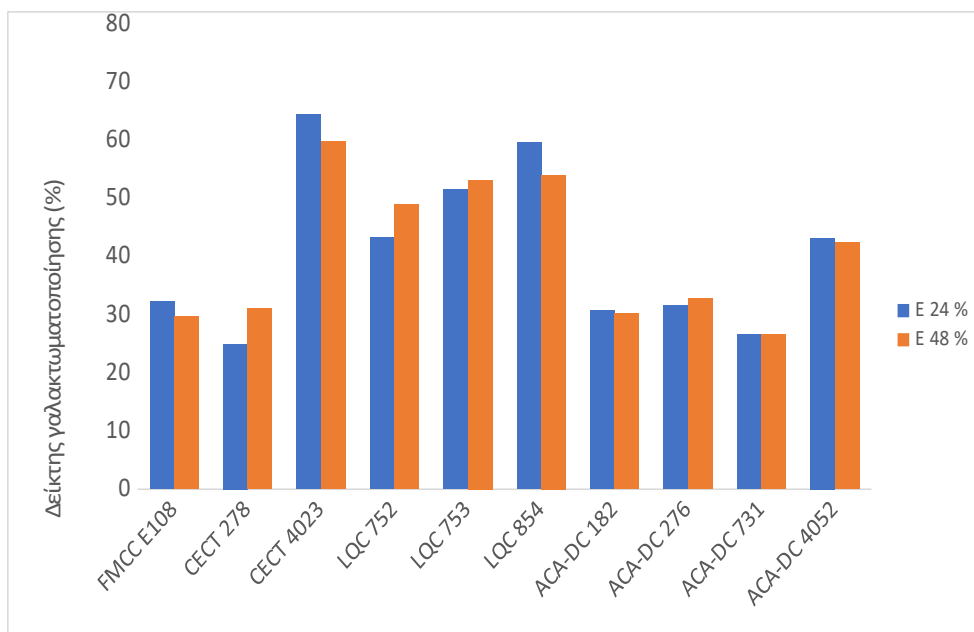
## 4.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΜΕ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ pH

### 4.2.1 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΑΔΕΥΣΗ

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες με 50 ml συνολικό όγκο ζύμωσης ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 6.7 για να γίνει η εκκίνηση της καλλιέργειας. Οι κωνικές φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφιλο βαμβάκι για να διατηρούνται αερόβιες συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε ανάδευση (180 rpm). Για τον εμβολιασμό τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε προκαλλιέργεια MRS broth στην κατάλληλη θερμοκρασία. Για τον εμβολιασμό, 2 ml προκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε τυρόγαλο και εμβολιάστηκαν στην αντίστοιχη κωνική (4% v/v αρχικό εμβόλιο).

Για τον έλεγχο του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης, σε κάθε στέλεχος αντιστοιχούσαν δύο κωνικές φιάλες. Η μία χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH, όπου υπό ασηπτικές συνθήκες μετρήθηκε και διορθώθηκε το pH, και στη συνέχεια προστέθηκε στην αντίστοιχη που χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία ίση ποσότητα αποστειρωμένης βάσης ή οξέος. Κατά την διάρκεια του πειράματος λήφθηκαν δείγματα στις 24, 48 και 72 ώρες της ζύμωσης.

Για όλα τα στελέχη πραγματοποιήθηκε δοκιμή γαλακτωματοποίησης στις 24, 48 και 72 ώρες χρησιμοποιώντας τα υπερκείμενα και τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα .

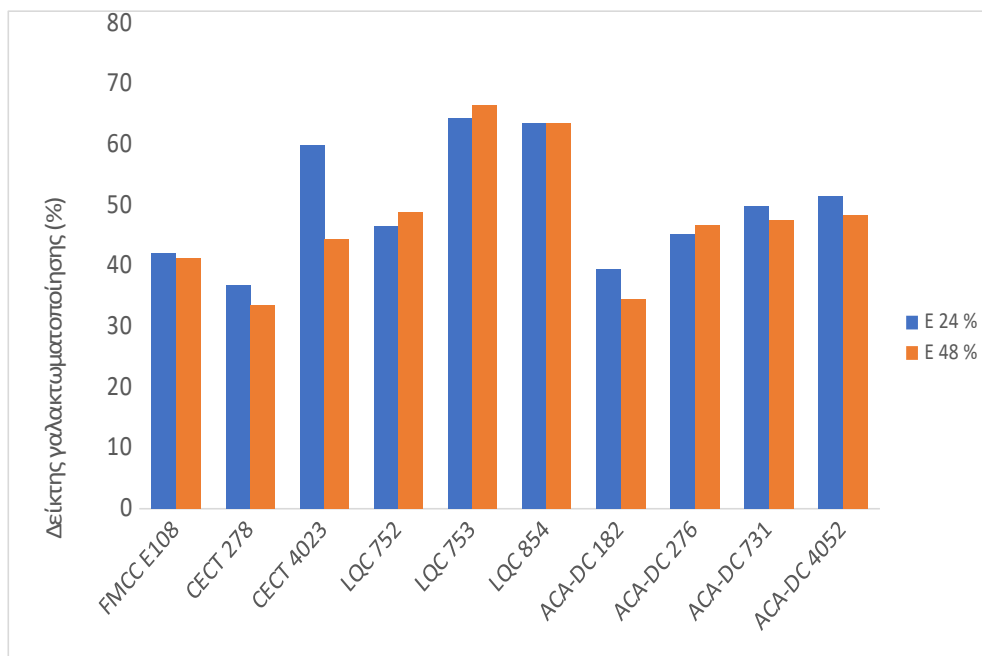


**Διάγραμμα 4.18:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 24 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24 και 48 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι για το E<sub>24</sub> (%) το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτώματος παρουσιάζουν τα στελέχη CECT 4023 και LQC 854 (περίπου 60%) για 24 ώρες της ζύμωσης ενώ τα υπόλοιπα στελέχη έχουν ένα ποσοστό γαλακτώματος (περίπου 30% με 50%). Αναφορικά με το E<sub>48</sub> (%) το γαλάκτωμα παραμένει σταθερό ή κατά περιπτώσεις μειώνεται, σε σύγκριση με τις 24 ώρες μέτρησης, σχεδόν για όλα τα στελέχη. Στα παρόντα πειράματα δεν αξιολογήθηκε το ποσοστό

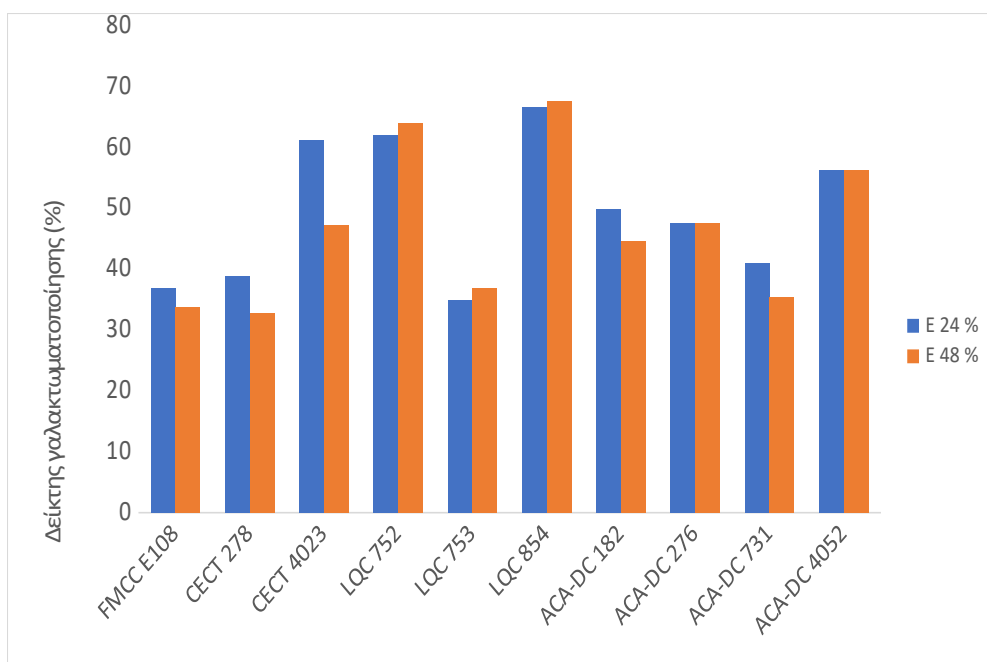
γαλακτωματοποίησης μετά από 72 ώρες δεδομένου ότι σε όλα προηγούμενα πειράματα παρατηρήθηκε ότι το γαλάκτωμα είτε παρέμενε σταθερό είτε μειωνόταν. Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο δείκτης γαλακτωματοποίησης μετά από 24 ώρες επαρκεί για την αξιολόγηση της παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών.

Επίσης το τεστ γαλακτωματοποίησης πραγματοποιήθηκε και για τα αντίστοιχα δείγματα στις 48 ώρες ζύμωσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

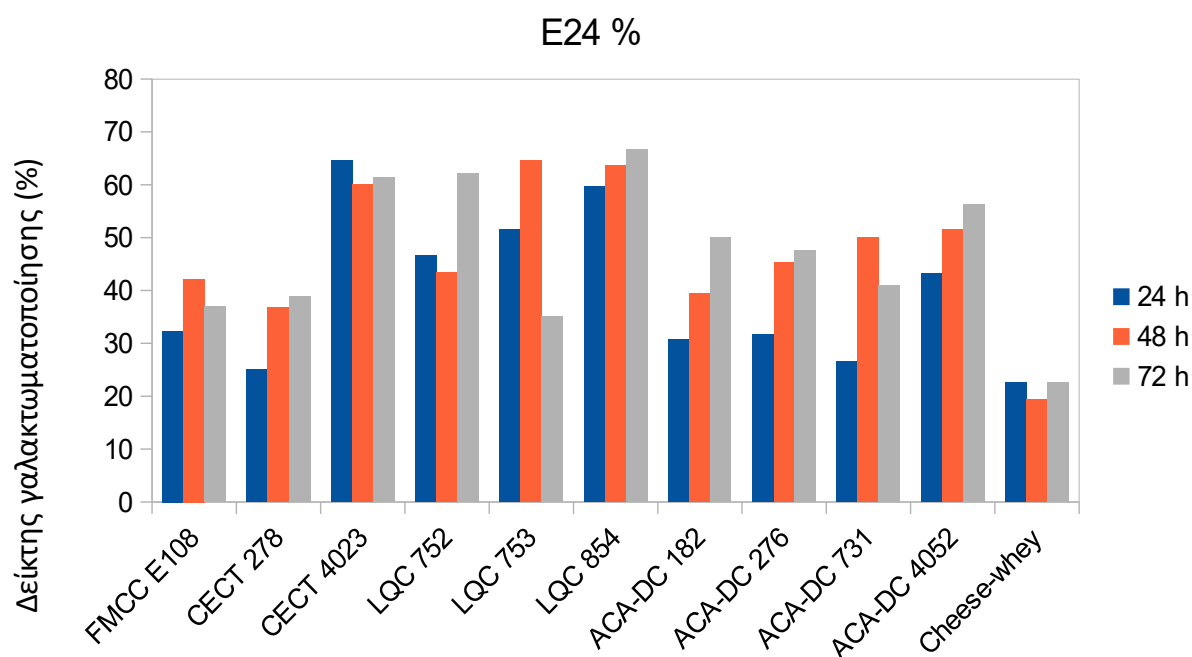


**Διάγραμμα 4.19:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 48 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24 και 48 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Στο διάγραμμα φαίνεται ότι τα στελέχη LQC 854, LQC 753 και CECT 4023 παρουσιάζουν ένα σημαντικό ποσοστό γαλακτώματος περίπου στο 60% ενώ το υπόλοιπα στελέχη έχουν χαμηλότερο ποσοστό στις 24 ώρες μέτρησης του πειράματος. Για τις 48 ώρες μέτρησης το ποσοστό μεταβάλλεται ελάχιστα σε σχέση με τις 24 ώρες του πειράματος, σημειώνοντας ότι το στέλεχος LQC 854 παραμένει σταθερό.

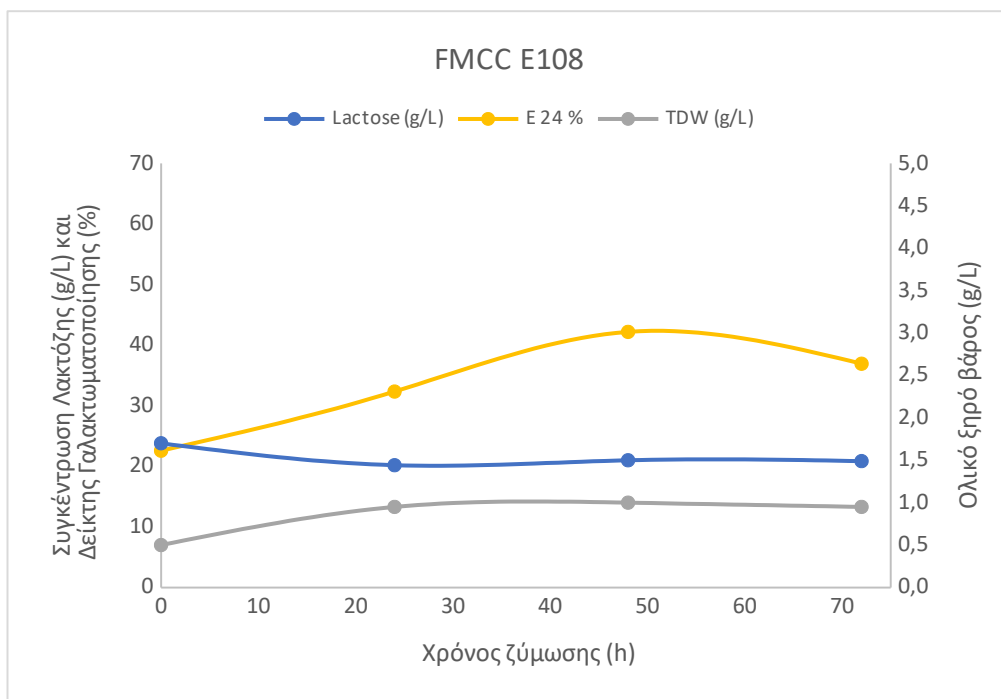


**Διάγραμμα 4.20:** Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 72 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24 και 48 ώρες μέτρησης του πειράματος.

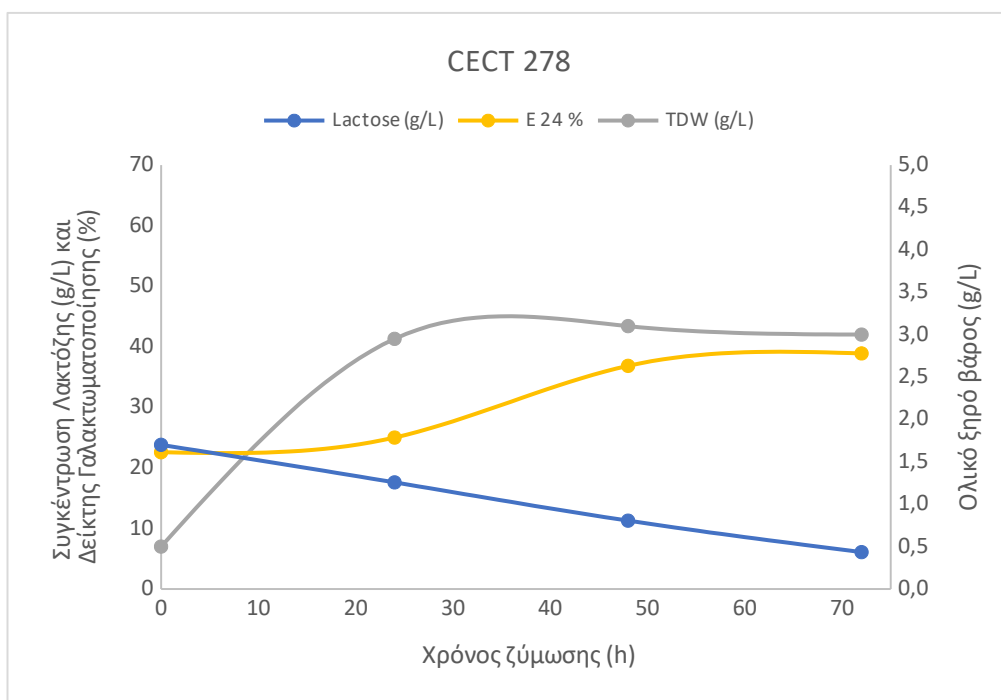


**Διάγραμμα 4.21:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) στα διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης σε όλα τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλο, σε συνθήκες ελεγχόμενου pH και ανάδευσης.

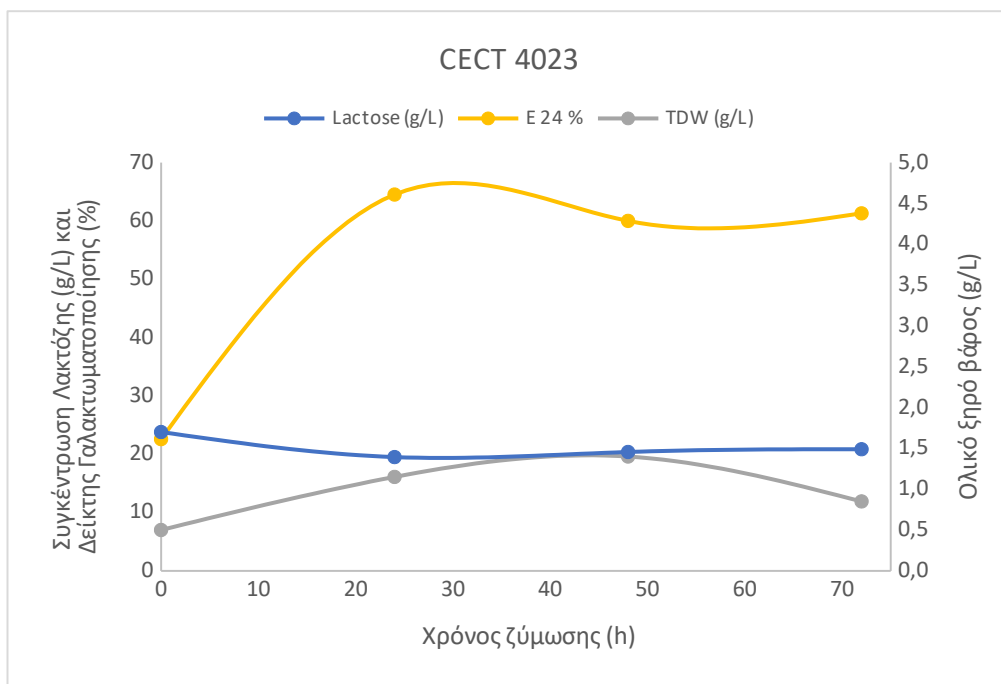
Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζεται η κινητική της κατανάλωσης λακτόζης για όλα τα στελέχη καθώς και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους αλλά και η εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα διαφορετικά σημεία της ζύμωσης.



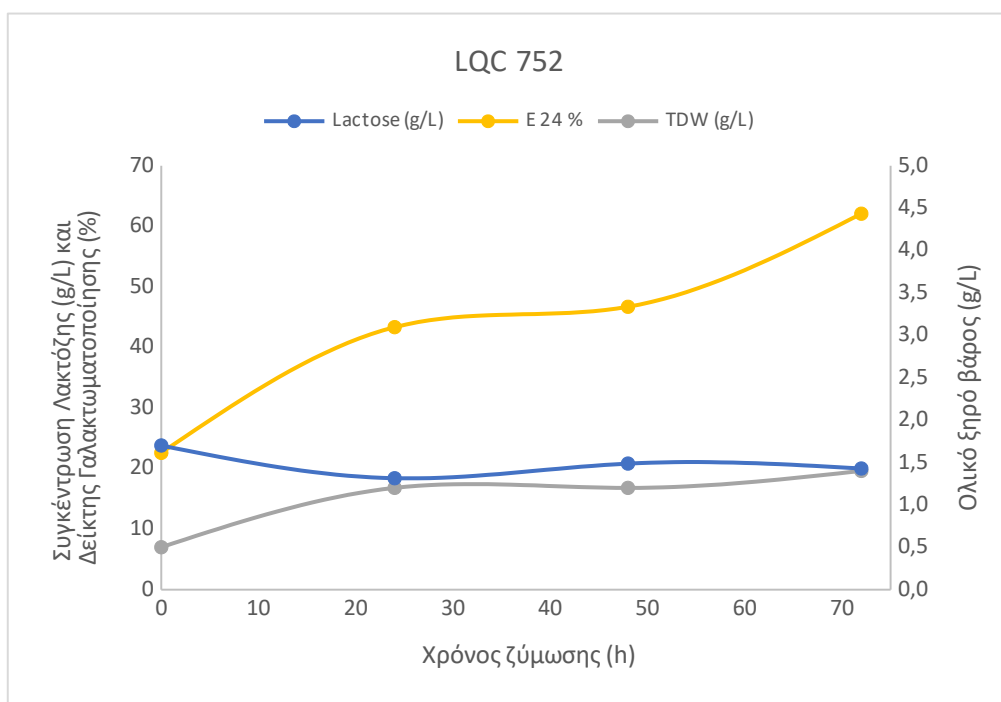
**Διάγραμμα 4.22:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους FMCC E108.



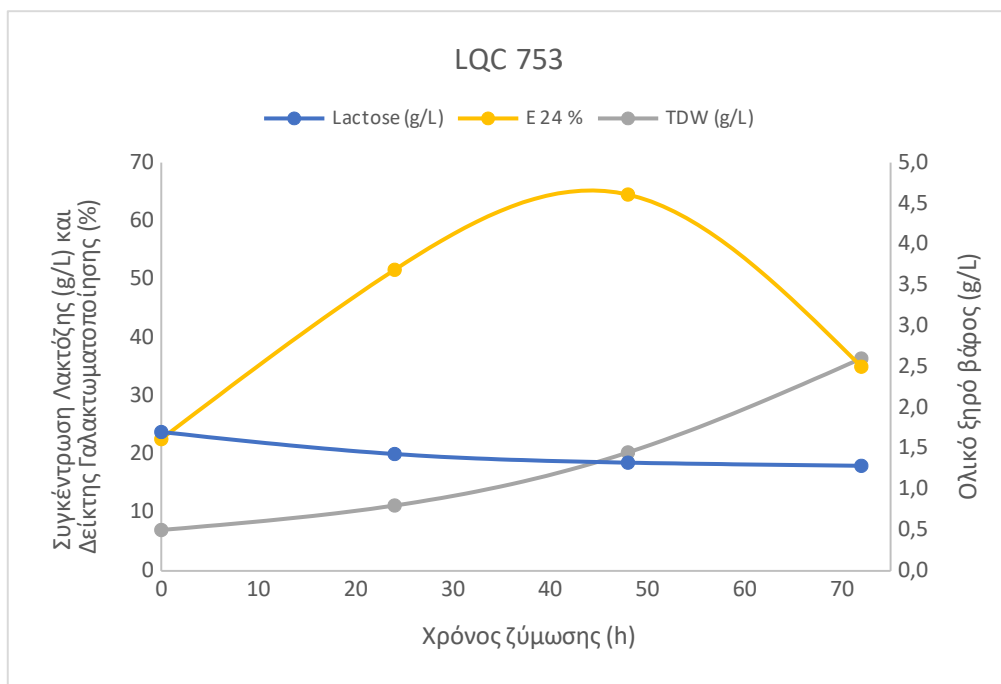
**Διάγραμμα 4.23:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 278.



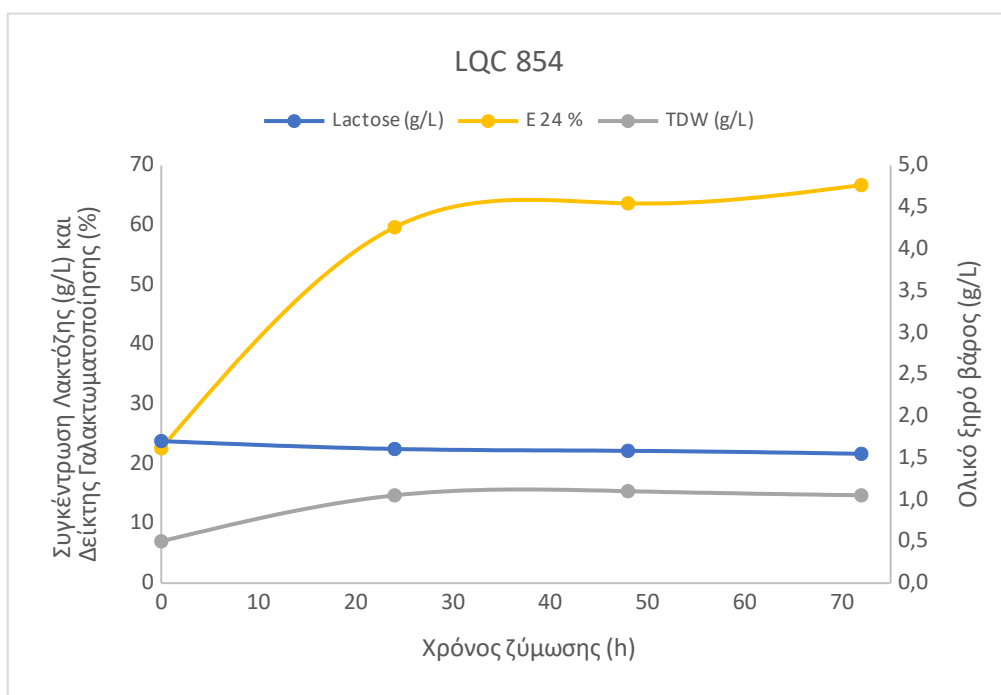
**Διάγραμμα 4.24:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 4023.



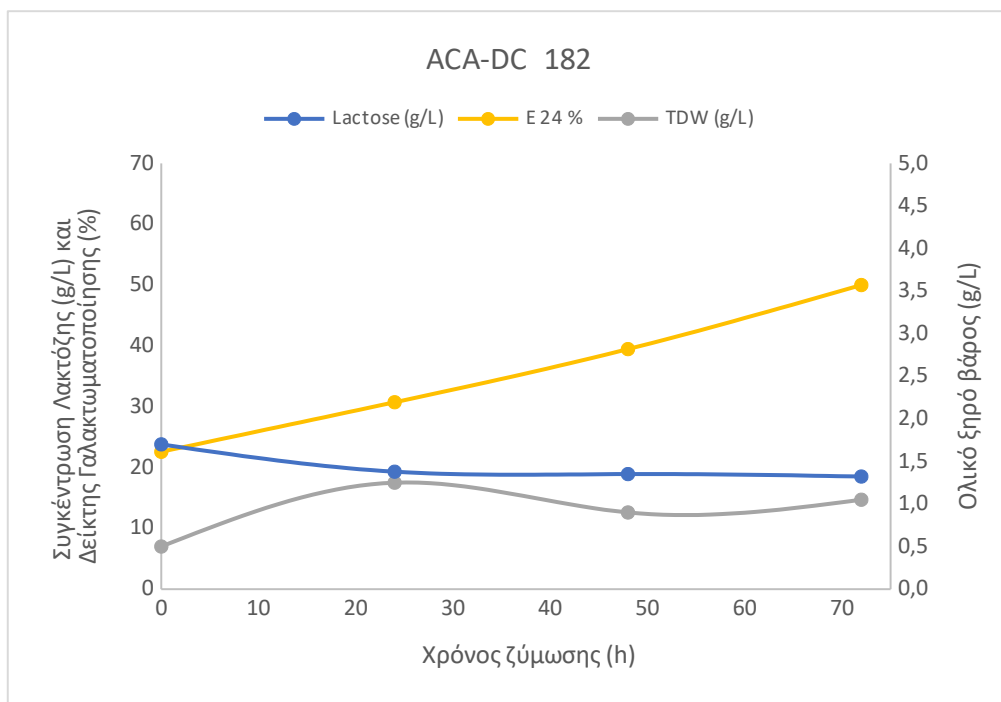
**Διάγραμμα 4.25:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 752.



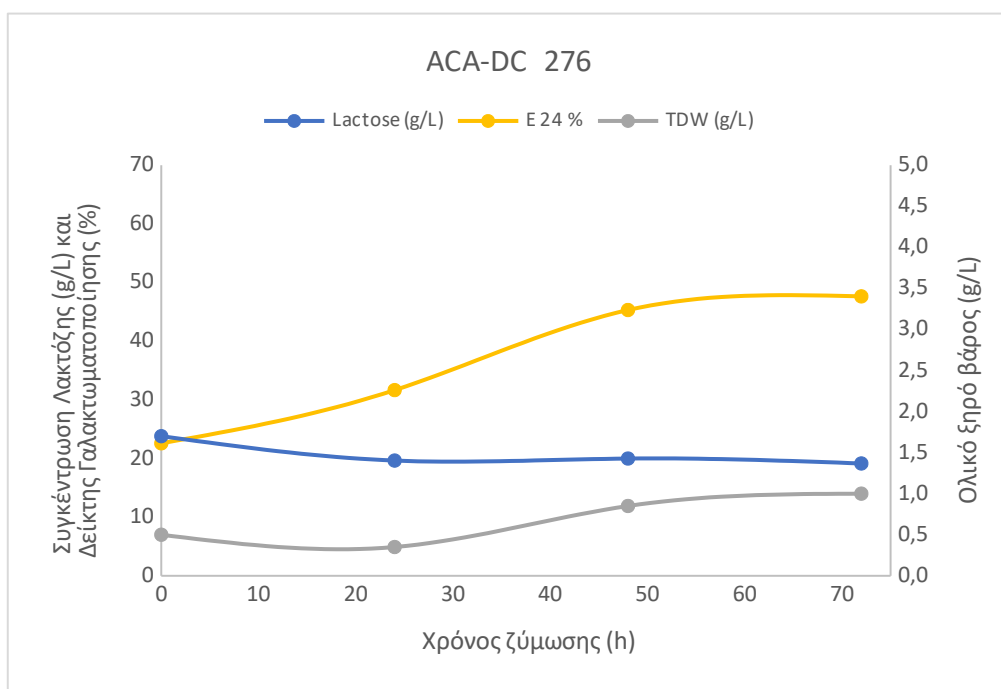
**Διάγραμμα 4.26:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 753.



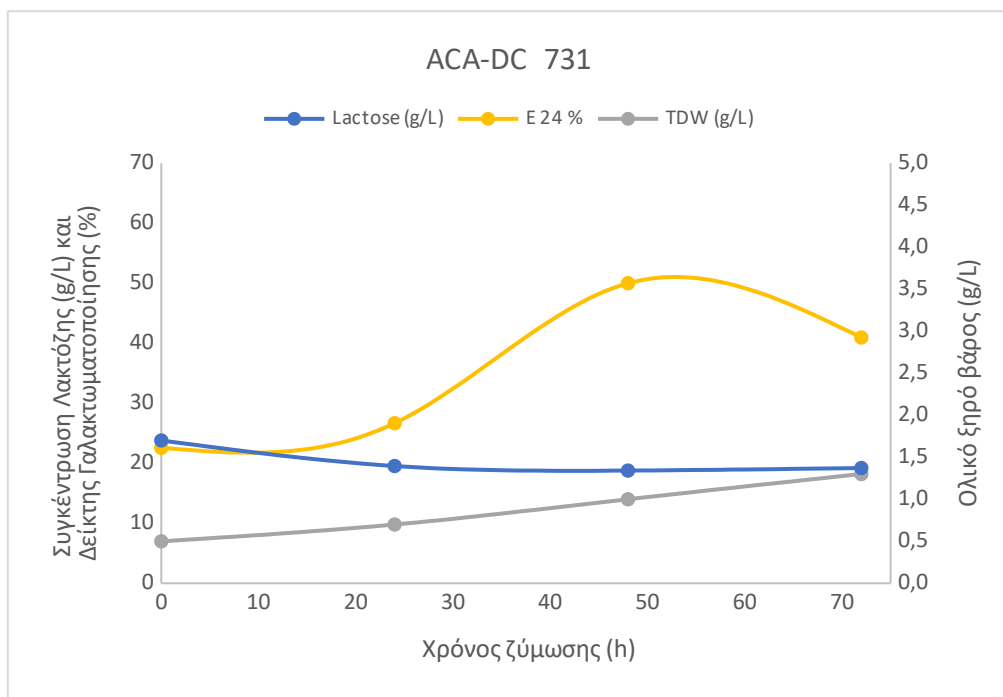
**Διάγραμμα 4.27:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 854.



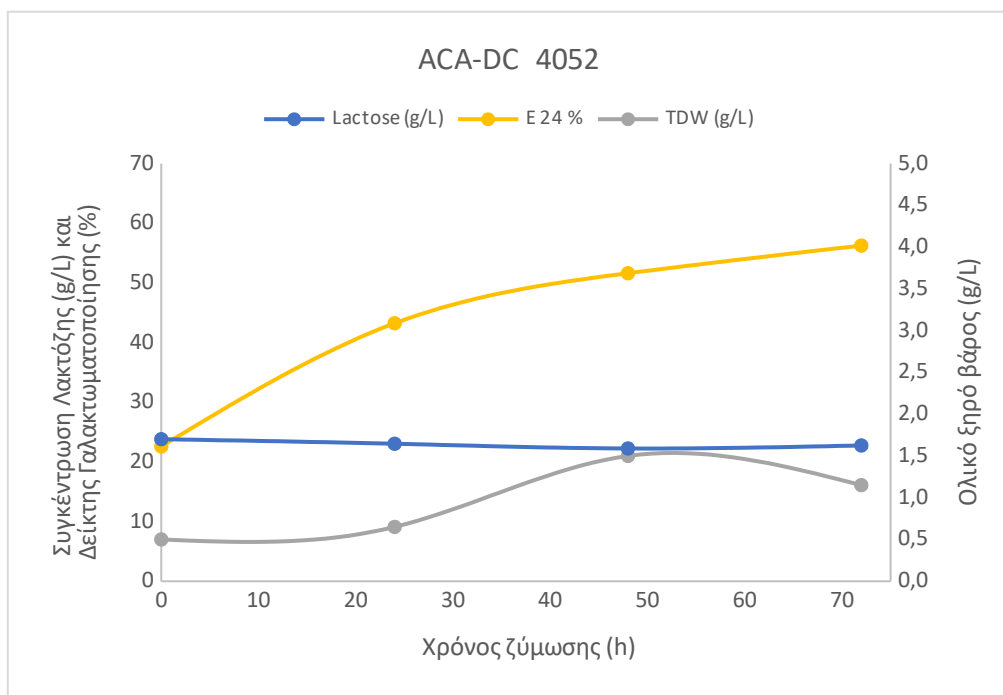
**Διάγραμμα 4.28:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 182.



**Διάγραμμα 4.29:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 276.



**Διάγραμμα 4.30:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 731.



**Διάγραμμα 4.31:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 4052.

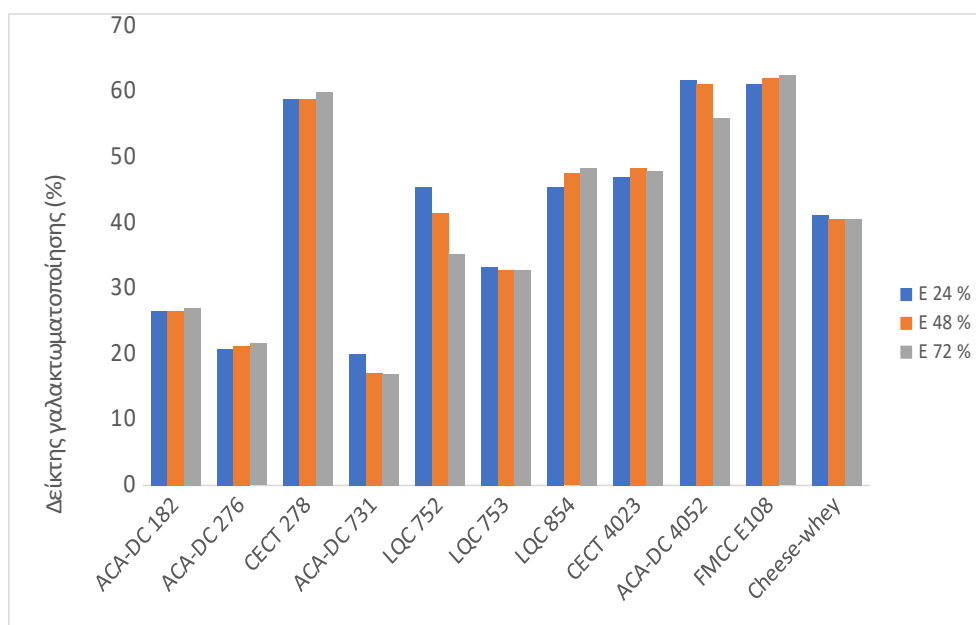
Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη κατανάλωση φαίνεται στο στέλεχος CECT 278 όπου στις 72 ώρες της ζύμωσης η λακτόζη είχε φτάσει στα 6 g/L. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη εμφανίζουν μία μικρή κατανάλωση αλλά όχι αρκετά ικανοποιητική, συνεπώς εικάζεται ότι η εφαρμογή της ανάδευσης δεν ευνόησε την ανάπτυξη των στελεχών. Η παρατήρηση αυτή δύναται να συσχετιστεί και με την παραγωγή ολικού ξηρού βάρους το οποίο υπολείπεται των

πειραμάτων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, εκτός από το στέλεχος CECT 278 που παρουσίασε τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Επίσης, όπως φαίνεται από το δείκτη γαλακτωματοποίησης αλλά και την παραγωγή ολικού ξηρού βάρους, τα στελέχη της συλλογής ACA-DC παρουσίασαν μέγιστες τιμές στις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης, καθώς και τα στελέχη CECT 278 και FMCC E108. Αξιοσημείωτο είναι ότι το στέλεχος CECT 278 παρουσίασε και τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Όσον αφορά στα στελέχη LQC 752, LQC 854 και CECT 4023 παρουσίασαν μέγιστο δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 48 ώρες καλλιέργειας.

#### 4.2.2 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (ΧΩΡΙΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗ)

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες με 50 ml συνολικό όγκο ζύμωσης ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 6.7 για να γίνει η εκκίνηση της καλλιέργειας. Οι κωνικές φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφιλο βαμβάκι για να διατηρούνται αερόβιες συνθήκες και αφέθηκαν σε στατικές συνθήκες στην κατάλληλη θερμοκρασία επώασης. Για τον εμβολιασμό τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε προκαλλιέργεια MRS broth στην κατάλληλη θερμοκρασία. Για τον εμβολιασμό, 2 ml προκαλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε τυρόγαλο και εμβολιάστηκαν στην αντίστοιχη κωνική (4% v/v αρχικό εμβόλιο).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε το τεστ γαλακτωματοποίησης για τα τρία διαφορετικά χρονικά σημεία. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε 24, 48 και 72 ώρες και υπολογίστηκαν σύμφωνα με το ποσοστό γαλακτωματοποίησης που απέδωσαν ( $E_{24}$ ,  $E_{48}$  και  $E_{72}$ ) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

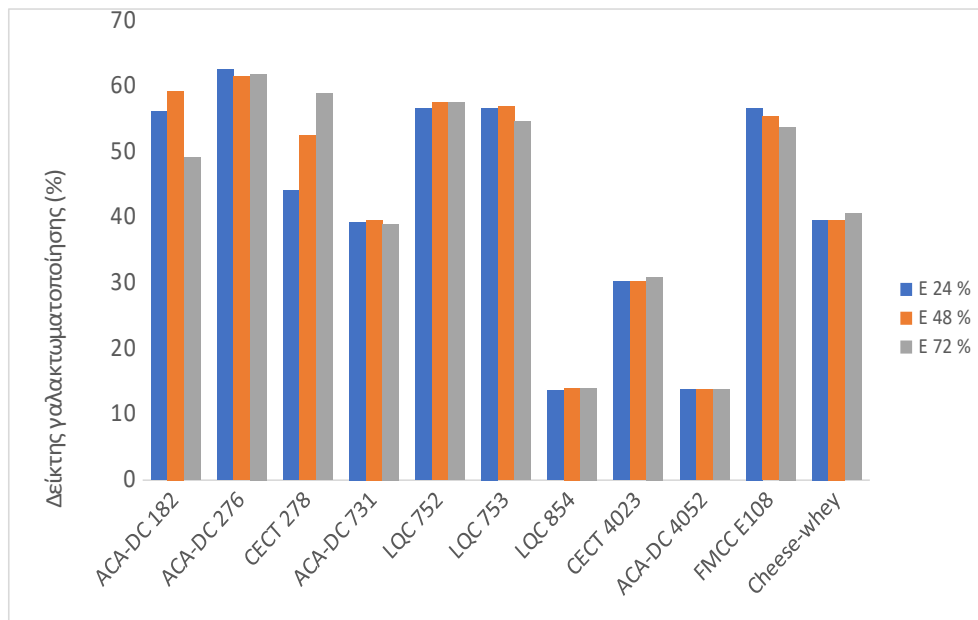


**Διάγραμμα 4.32:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 24 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Όπως διακρίνεται και παραπάνω το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτώματος προήλθε από τα στελέχη E108, 4052 και 278 (περίπου 60%) για όλες τις ώρες των μετρήσεων και ακολούθησαν τα υπόλοιπα στελέχη με ποσοστό περίπου από 20% μέχρι 50% με το μικρότερο ποσοστό να ανήκει

στα στελέχη 731 και 276, ενώ και το τυρόγαλο το οποίο δεν είναι εμβολιασμένο δίνει ένα αρκετά υψηλό ποσοστό ( περίπου στο 40%).

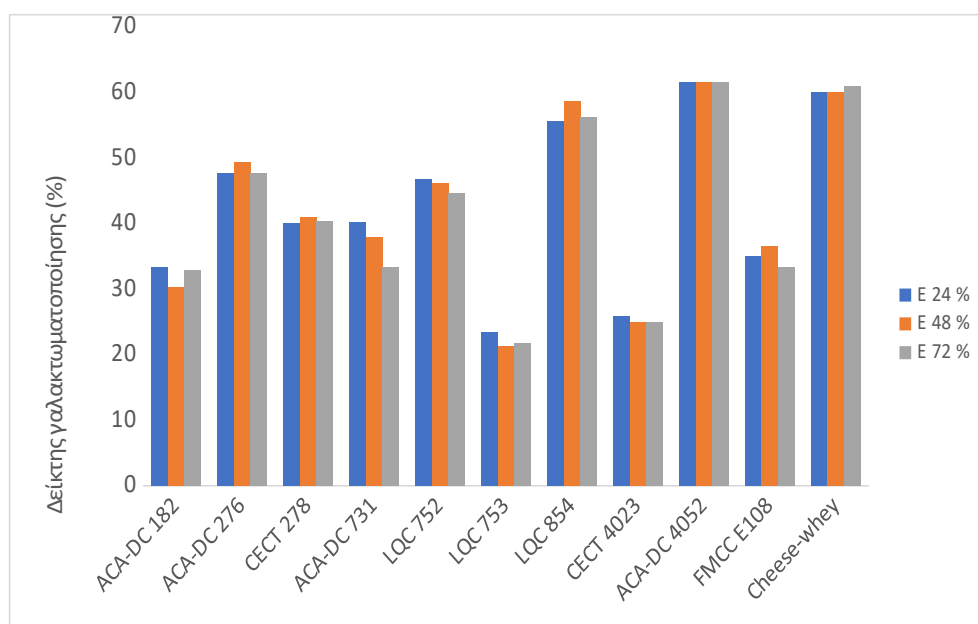
Αναφορικά με τα αποτελέσματα για το δείκτη γαλακτωματοποίησης στις 48 ώρες ζύμωσης του πειράματος για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω γράφημα.



**Διάγραμμα 4.33:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 48 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

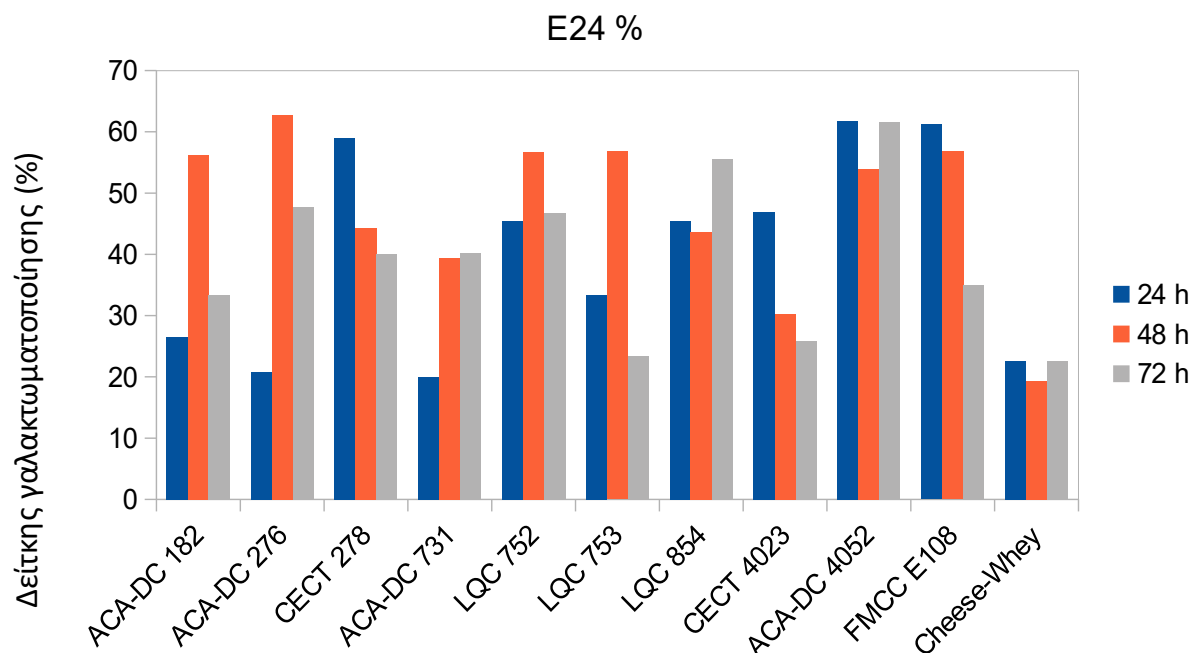
Στο διάγραμμα όλα τα στελέχη φαίνεται να δίνουν ένα αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό γαλακτώματος για όλες τις ώρες μέτρησης, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό ανήκει στα στελέχη 854 και 4052 (περίπου 10%).

Τα δείγματα μετρήθηκαν για τις 24, 48 και 72 ώρες του πειράματος στις 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω γράφημα.



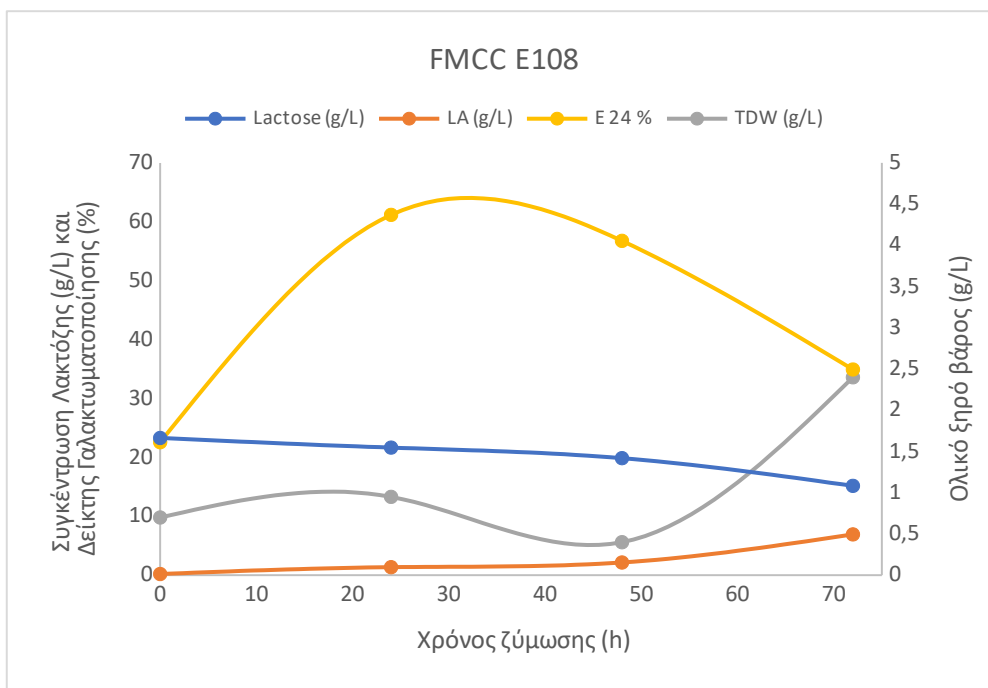
**Διάγραμμα 4.34:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης μετά από 72 ώρες ζύμωσης στα διαφορετικά στελέχη στο παραφινέλαιο για τις 24, 48 και 72 ώρες μέτρησης του πειράματος.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτωματοποίησης φαίνεται να προήλθε από το στέλεχος ACA-DC 4052 και LQC 854, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη κυμαίνονται στο ποσοστό μεταξύ 20% και 50% σε όλες τις ώρες της μέτρησης.

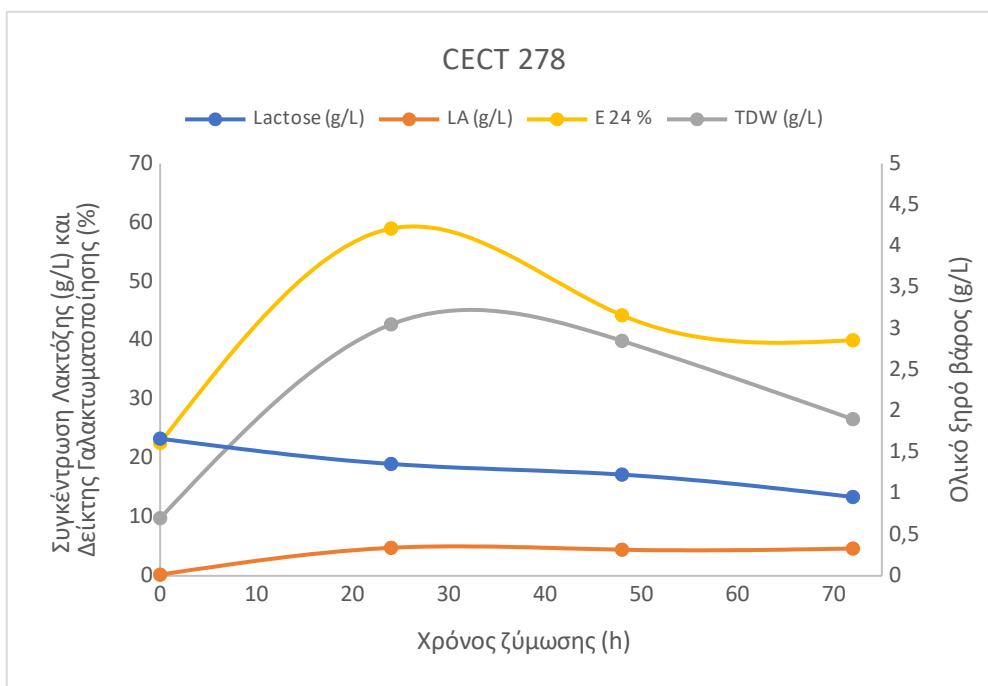


**Διάγραμμα 4.35:** Εξέλιξη του δείκτη γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) στα διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης σε όλα τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλο, σε ελεγχόμενο pH και στατικές συνθήκες.

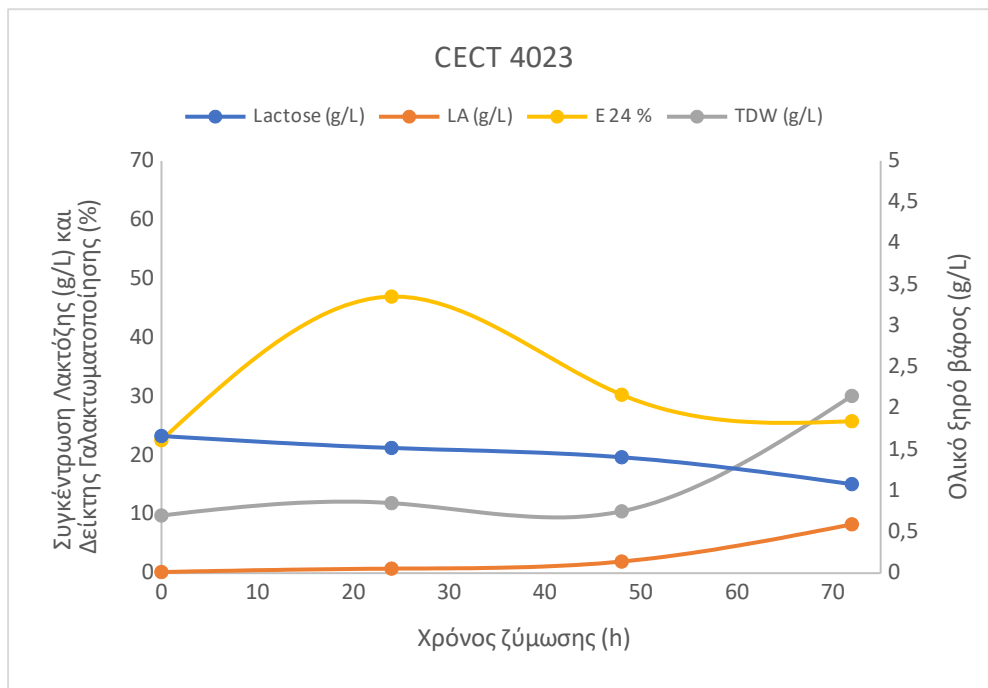
Αντίστοιχα με τα προηγούμενα πειράματα, πραγματοποιήθηκε για όλα τα στελέχη η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης λακτόζης στα διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης καθώς και η μέτρηση της παραγωγής ολικού ξηρού βάρους και σχετίστηκαν με το ποσοστό γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) το οποίο αντιστοιχεί με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Στην περίπτωση αυτή μετρήθηκε και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα ξεχωριστά για κάθε στέλεχος.



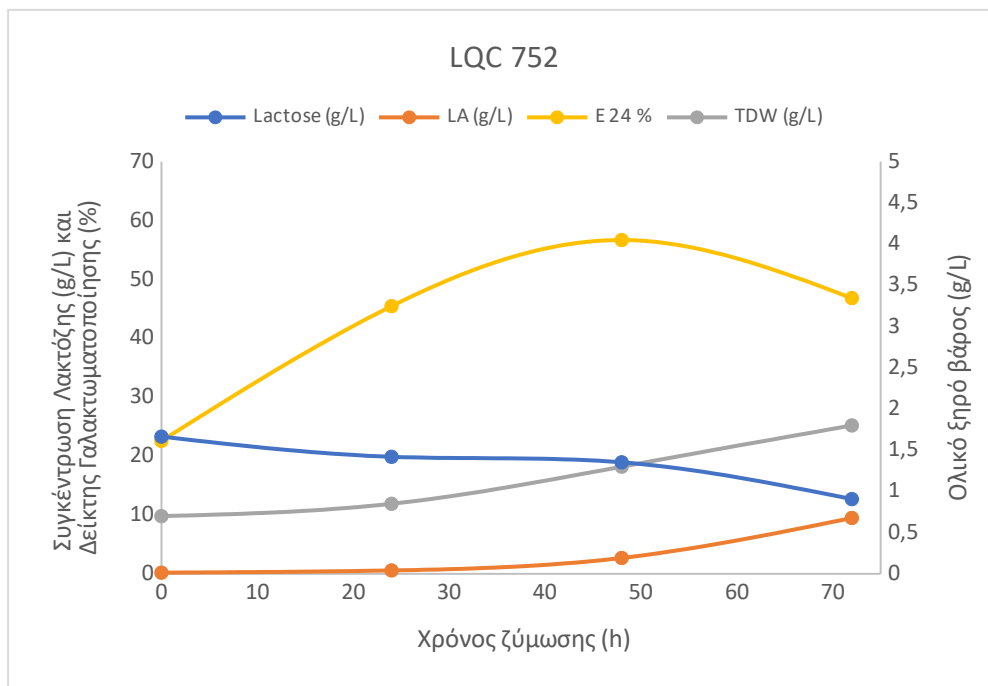
**Διάγραμμα 4.36:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους FMCC E108.



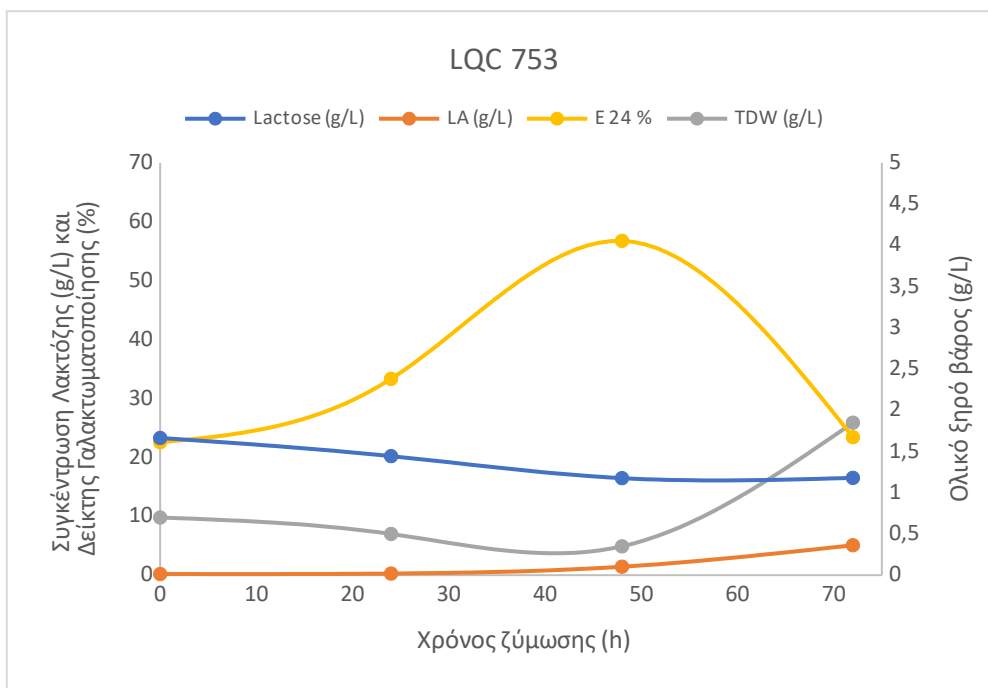
**Διάγραμμα 4.37:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 278.



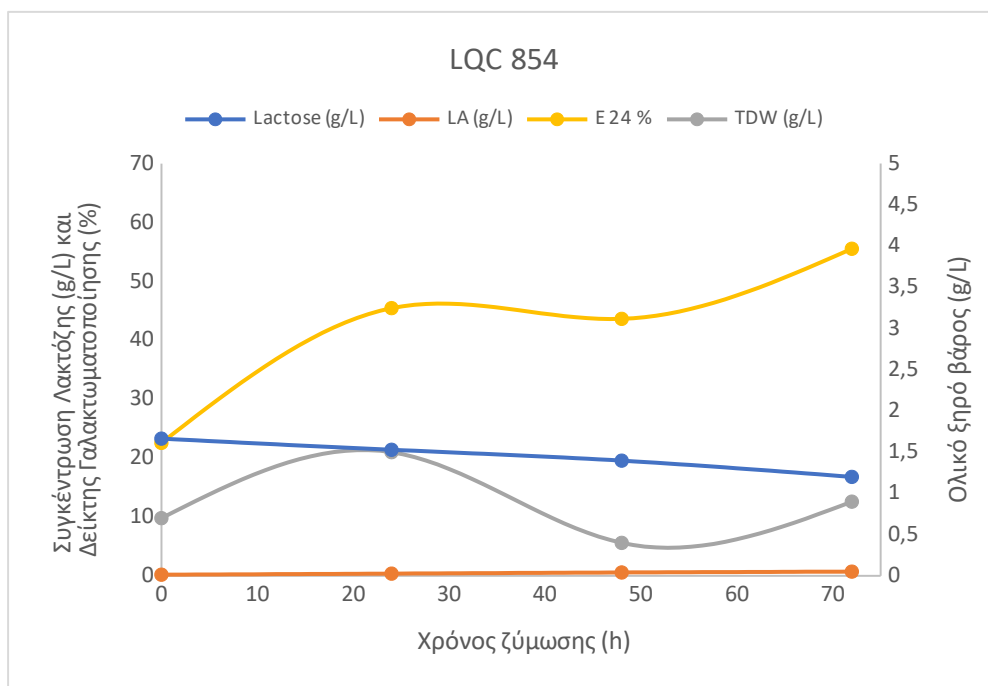
**Διάγραμμα 4.38:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 4023.



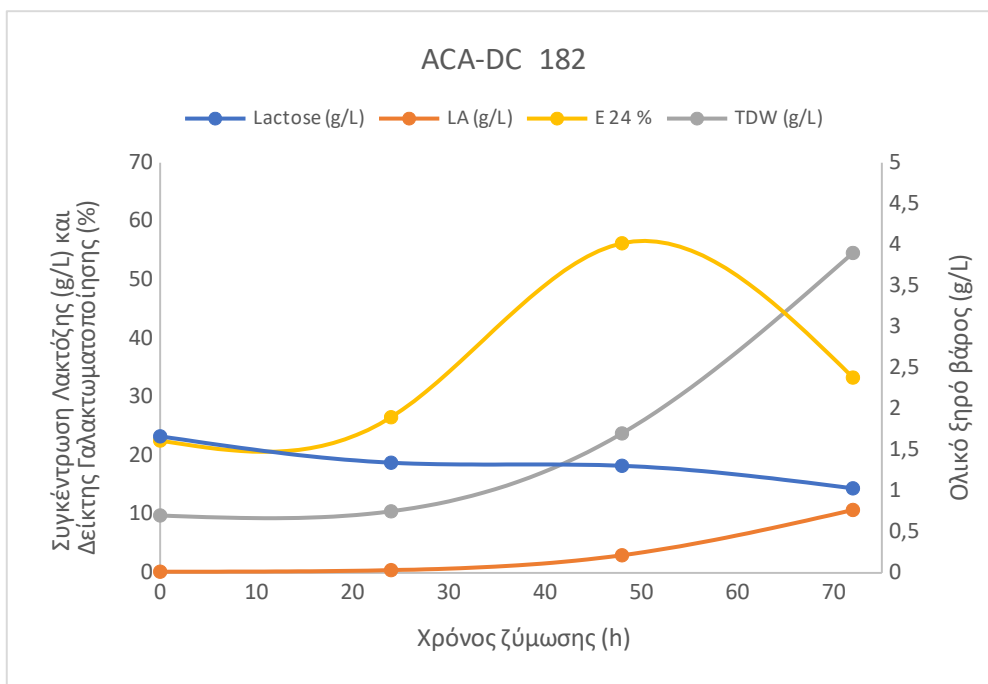
**Διάγραμμα 4.39:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 752.



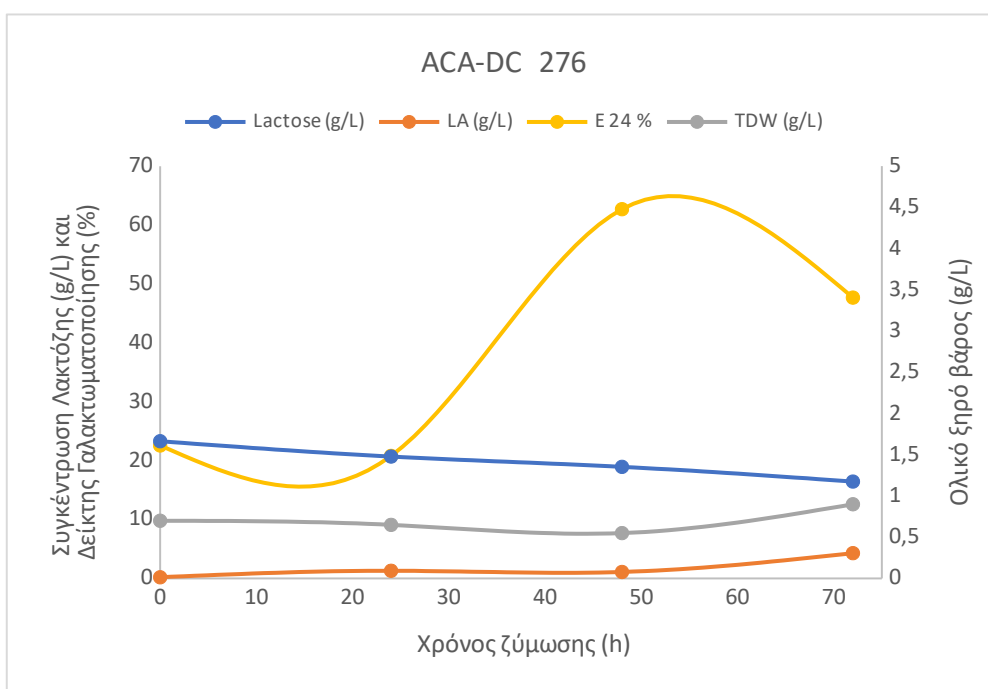
**Διάγραμμα 4.40:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 753.



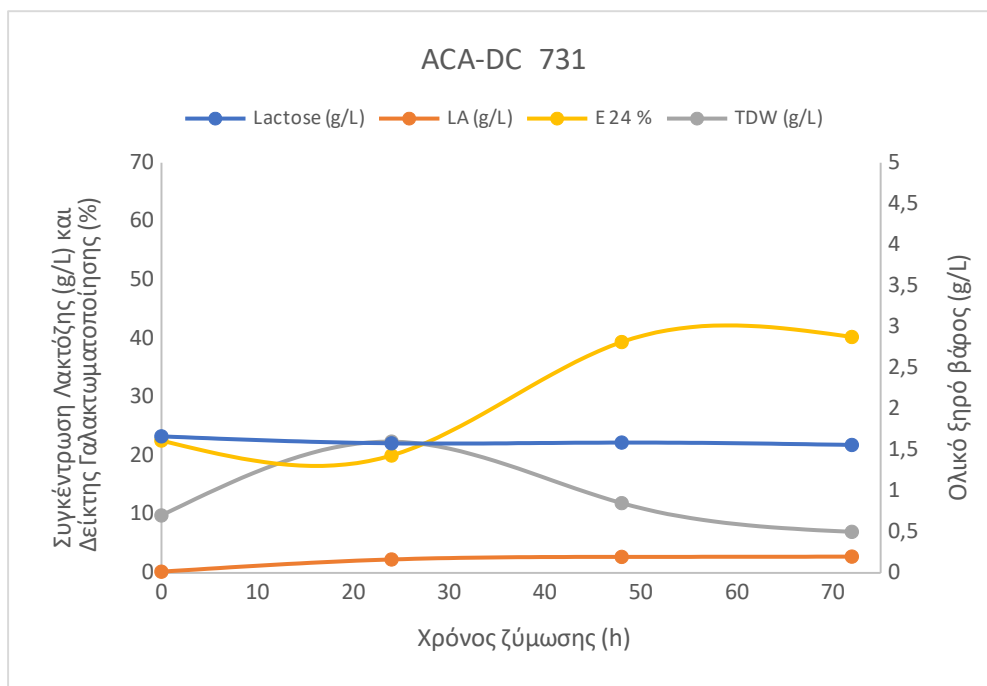
**Διάγραμμα 4.41:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 854.



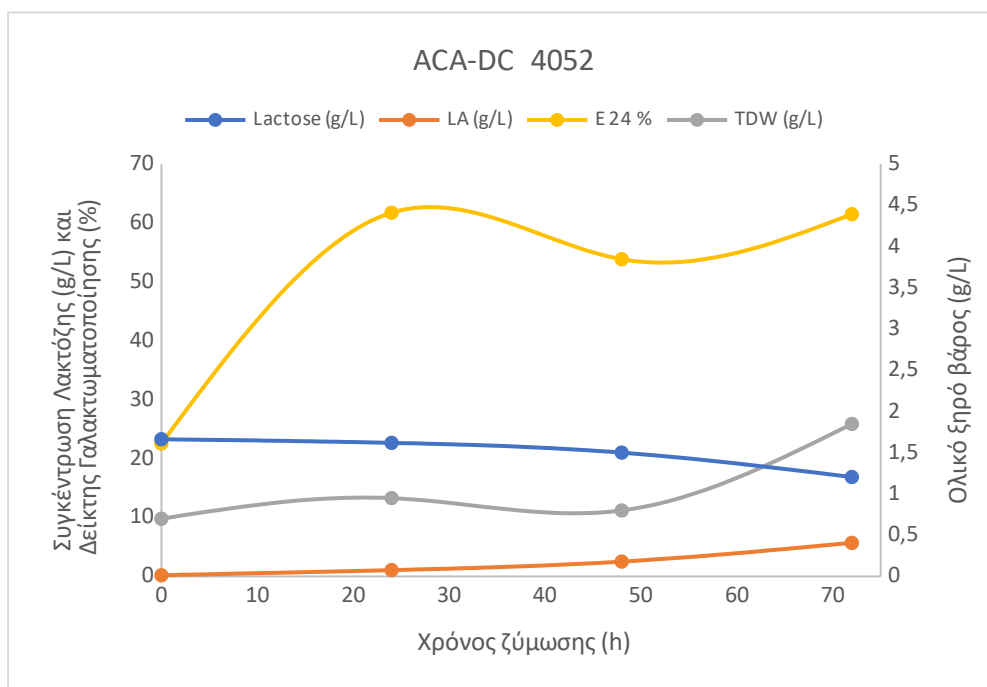
**Διάγραμμα 4.42:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 182.



**Διάγραμμα 4.43:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 276.



**Διάγραμμα 4.44:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 731.



**Διάγραμμα 4.45:** Κινητική κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (TDW) και γαλακτικού οξέος (LA) και εξέλιξη του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 4052.

Όπως φαίνεται από τα γραφήματα, η μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος αλλά και κατανάλωση λακτόζης παρουσιάζεται στα στελέχη ACA-DC 182 και LQC 752, κυρίως στις 72

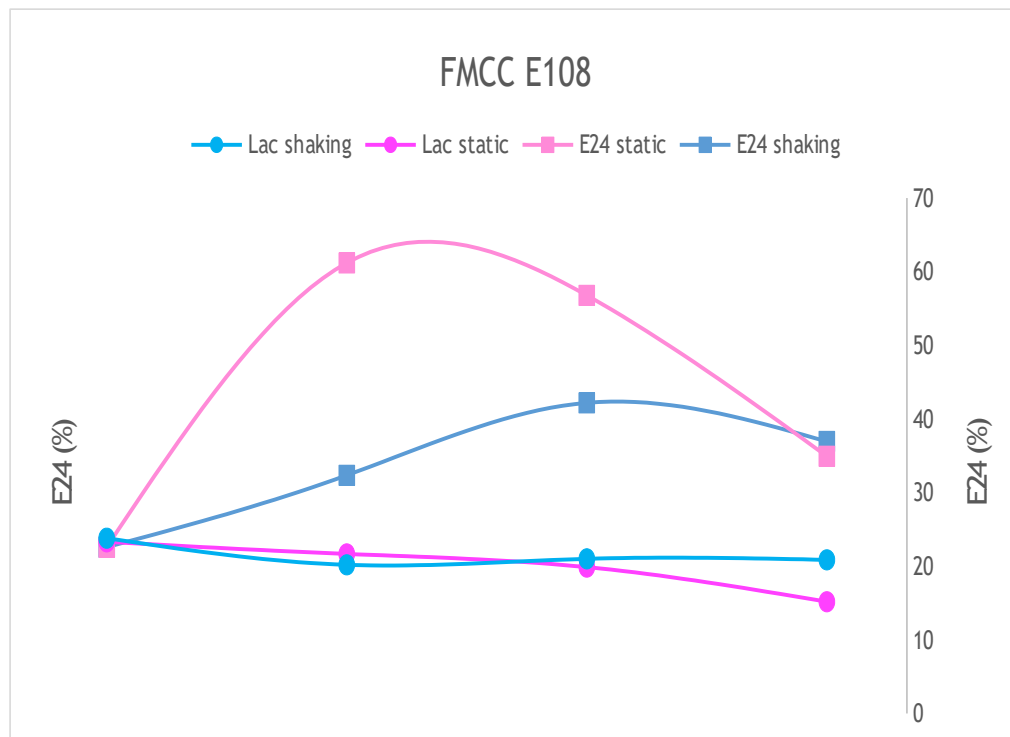
ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλο. Όσον αφορά στο ολικό ξηρό βάρος, φαίνεται ότι τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους, παρουσιάζονται διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα για όλα τα βακτηριακά στελέχη, είναι εμφανής η διαφορετική συμπεριφορά τόσο αναφορικά με το ρυθμό ανάπτυξης που σχετίζεται με την παραγωγή βιομάζας, όσο και με την κατανάλωση λακτόζης και το δείκτη γαλακτωματοποίησης. Ειδικότερα, τα στελέχη LQC 752, LQC 753 και LQC 854, καθώς και τα FMCC E108, CECT 278 και CECT 4023 παρουσίασαν μικρό lag phase σε σύγκριση με τα στελέχη της συλλογής ACA-DC. Επίσης, η μέγιστη παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών, σχετιζόμενη με το δείκτη γαλακτωματοποίησης, παρατηρήθηκε για κάποια στελέχη μετά από 24 ώρες ζύμωσης ενώ σε άλλα μετά από 48 ώρες. Ειδικότερα, τα στελέχη της συλλογής ACA-DC, δεδομένης και της φάσης υστέρησης που παρουσίασαν, εμφάνισαν μέγιστο  $E_{24}$  (%) μετά από 48 ώρες καλλιέργειας σε σύγκριση με τα στελέχη FMCC E108, CECT 278 και CECT 4023. Ακόμη, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε κάποια στελέχη, και ειδικότερα τα ACA-DC 182, ACA-DC 276, ACA-DC 4052, LQC 753, CECT 4023 και FMCC E108 παρουσίασαν στις 72 ώρες ζύμωσης μεγάλη παραγωγή γαλακτικού οξέος παράλληλα με μεγάλη αύξηση στη βιομάζα ενώ ο δείκτης γαλακτωματοποίησης παρουσίασε πτώση. Τα στελέχη ανήκουν σε διαφορετικά είδη (*L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. coryniformis* και *L. pentosus*) συνεπώς δε δύναται να σχετιστεί αυτή η παρατήρηση με το βακτηριακό είδος αλλά πιθανόν να συνδέεται άμεσα με το μεταβολισμό του κάθε βακτηρίου. Ωστόσο, θα ήταν χρήσιμο να αξιολογηθεί περαιτέρω σε μια επόμενη μελέτη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

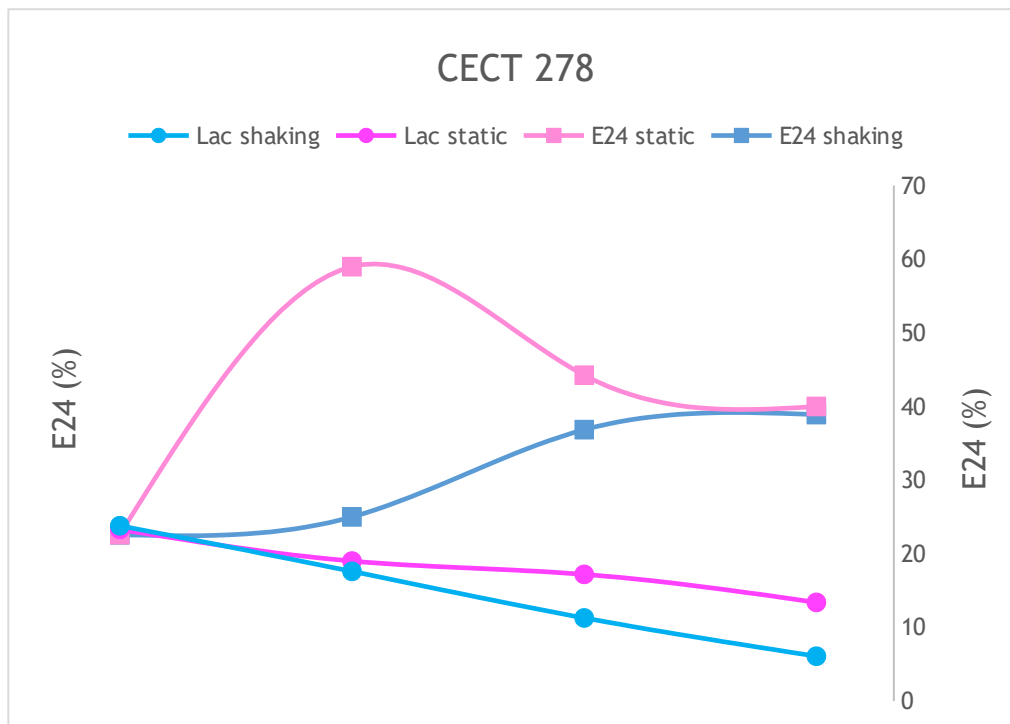
### ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 5.1 Επίδραση της ανάδευσης στις ζυμώσεις με έλεγχο pH και αερόβιες συνθήκες

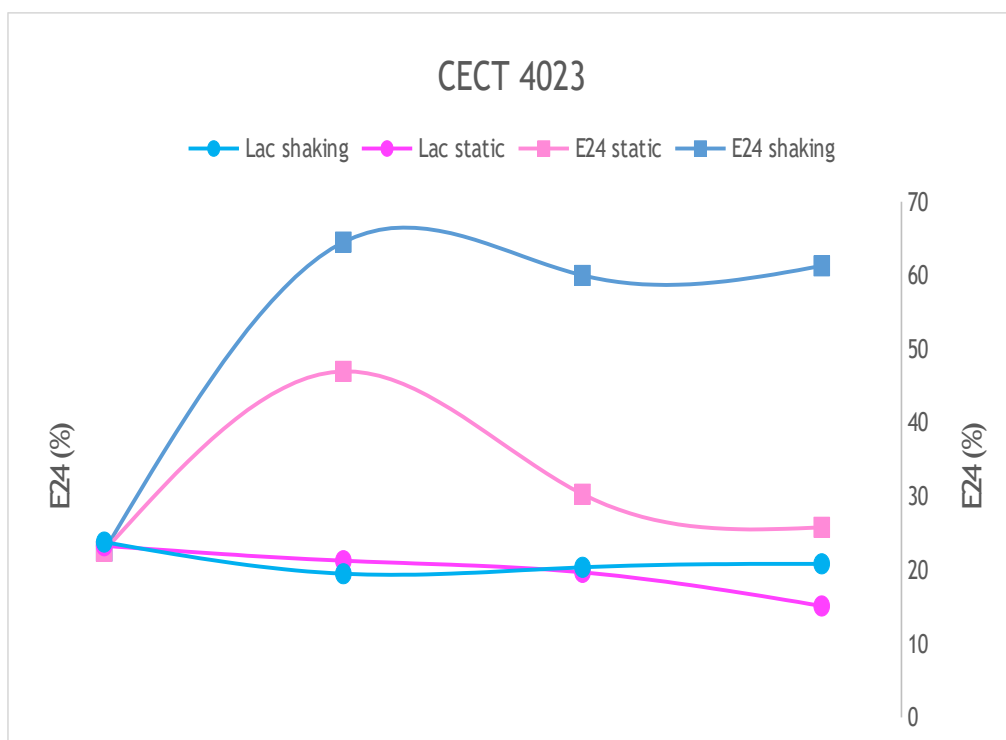
Όπως προαναφέρθηκε στα πειράματα αυτά ο στόχος ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση της ανάδευσης στη βακτηριακή ανάπτυξη. Στα επόμενα διαγράμματα, παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ της κατανάλωσης λακτόζης και της εξέλιξης του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα διαφορετικά σημεία της ζύμωσης σε αναδευόμενες και σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας.



**Διάγραμμα 5.1:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους FMCC E108 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).



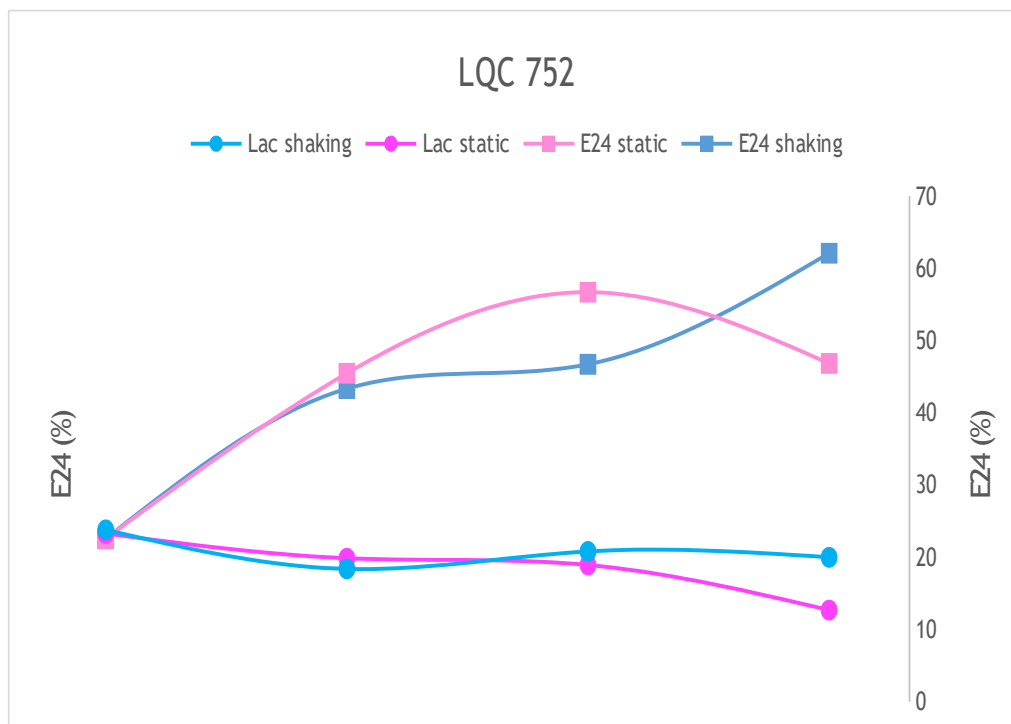
**Διάγραμμα 5.2:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 278 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).



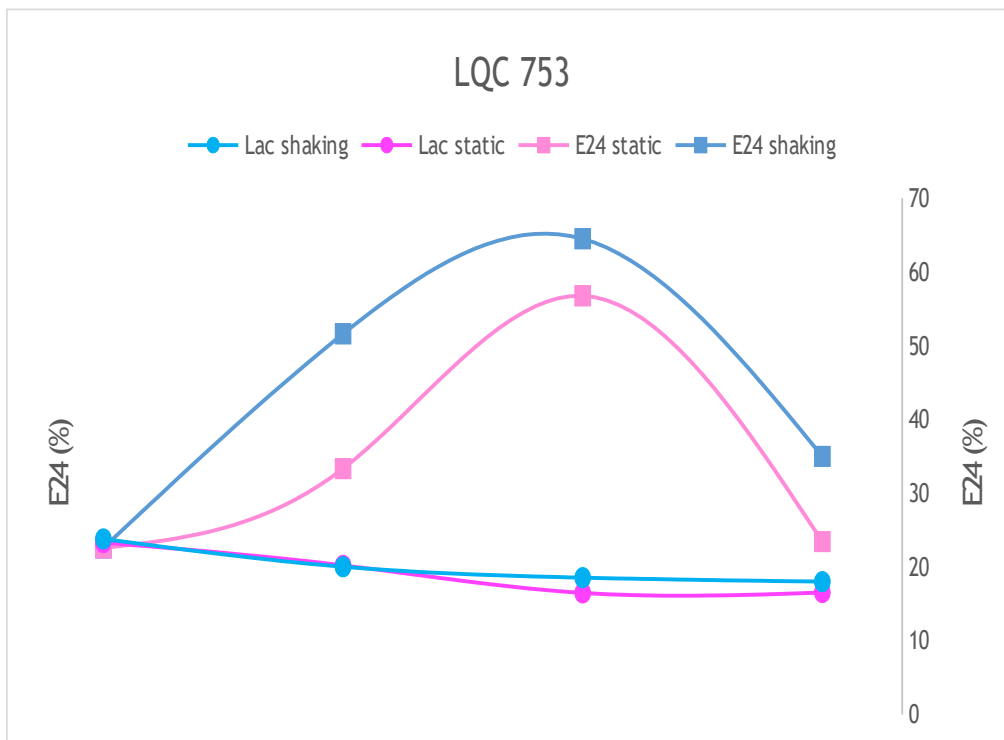
**Διάγραμμα 5.3:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 4023 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

Το στέλεχος FMCC E108 (*L. pentosus*) παρουσίασε υψηλότερο ποσοστό γαλακτωματοποίησης και κατανάλωση λακτόζης στις στατικές συνθήκες σε σύγκριση με την εφαρμογή ανάδευσης. Αντίστοιχα το στέλεχος CECT 4023, το οποίο ανήκει στο είδος *L. pentosus*,

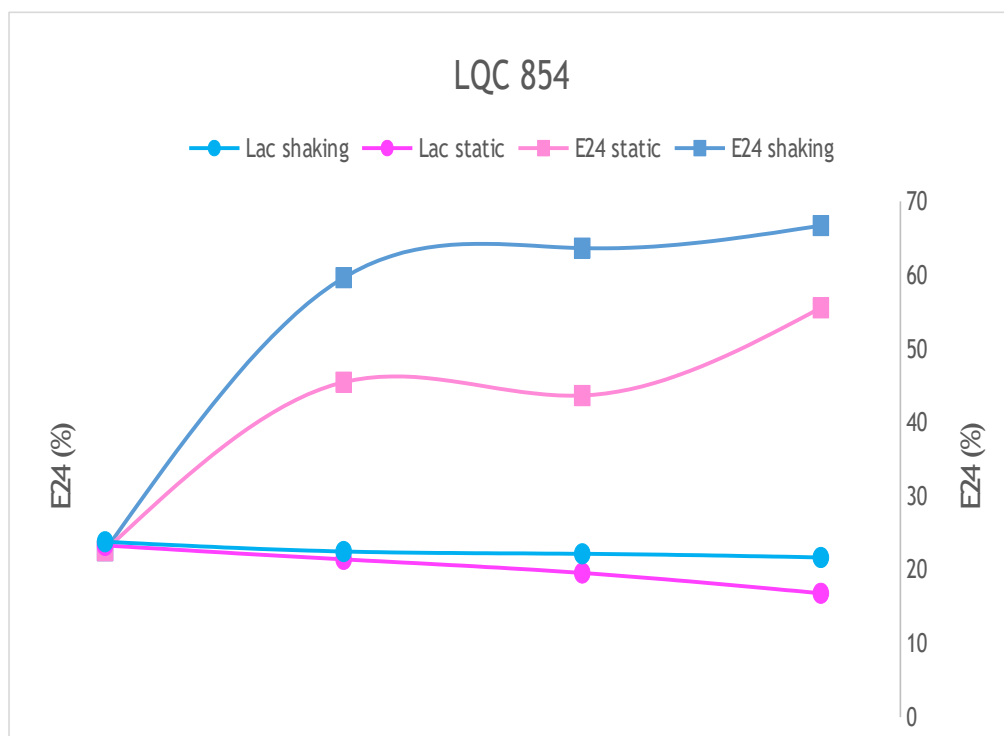
παρουσίασε καλύτερο ποσοστό  $E_{24}$  (%) σε συνθήκες ανάδευσης παρόλο που η κατανάλωση λακτόζης ήταν υψηλότερη στις στατικές συνθήκες. Η παρατήρηση αυτή δύναται να συνδέεται με τη παραγωγή βιομάζας, η οποία ήταν υψηλότερη στις στατικές συνθήκες (2.15 g/L) σε σύγκριση με τις αναδευόμενες (0.8 g/L). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και το στέλεχος CECT 278 (*L. acidophilus*), καθώς ο δείκτης  $E_{24}$  (%) ήταν υψηλότερος στις στατικές συνθήκες καλλιέργειας ενώ η κατανάλωση λακτόζης και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους ήταν υψηλότερες στις συνθήκες ανάδευσης.



**Διάγραμμα 5.4:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 752 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

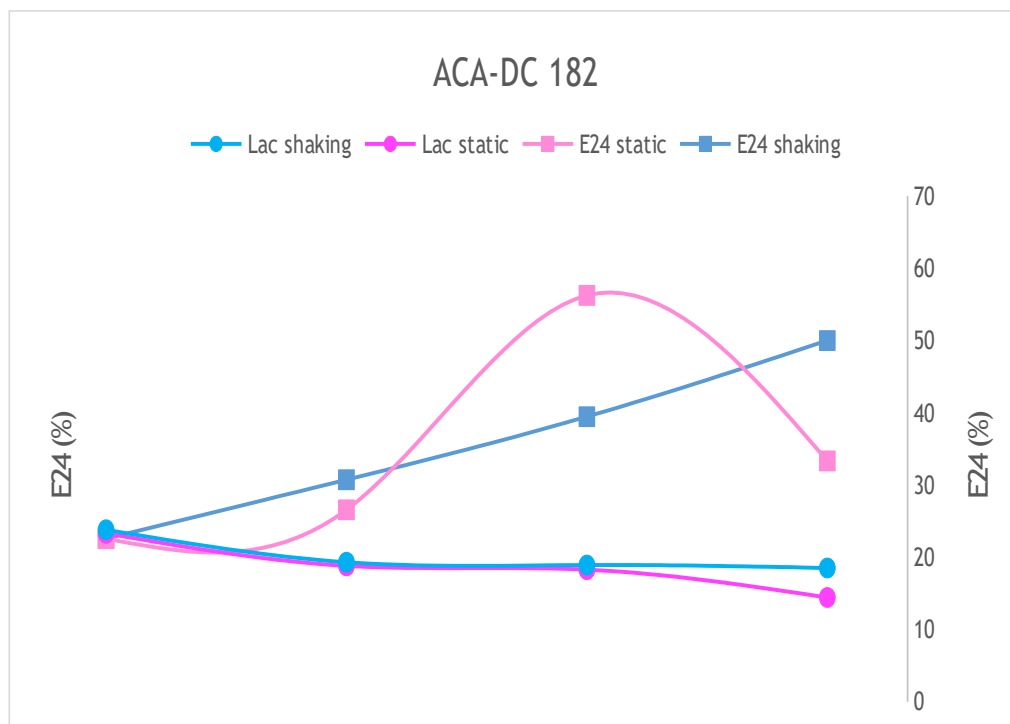


**Διάγραμμα 5.5:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 753 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

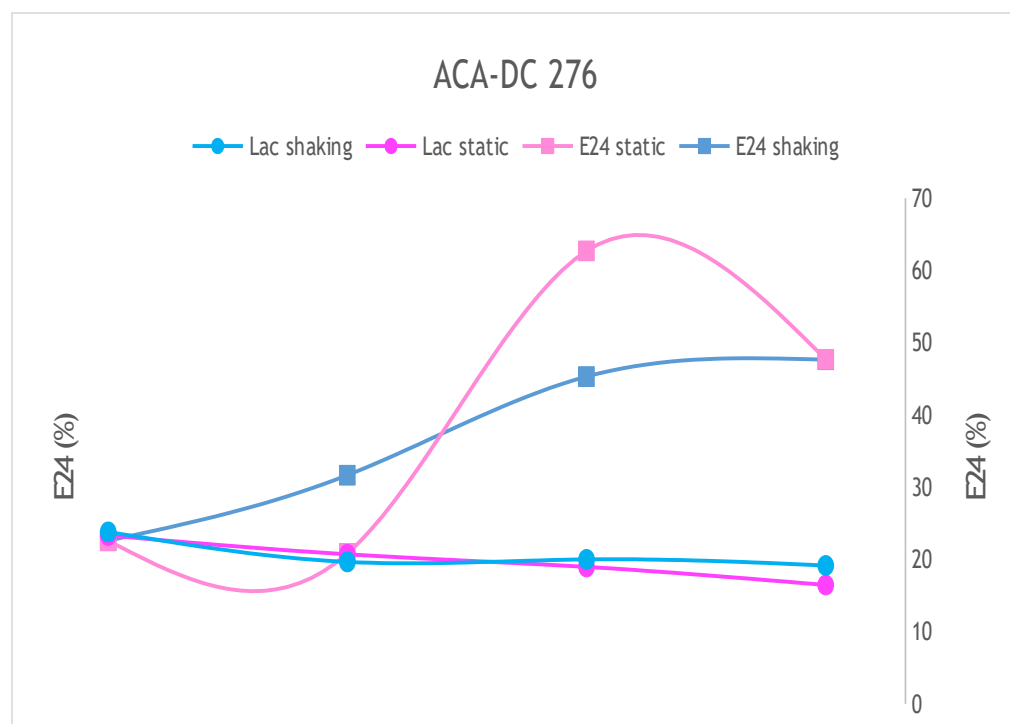


**Διάγραμμα 5.6:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 854 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

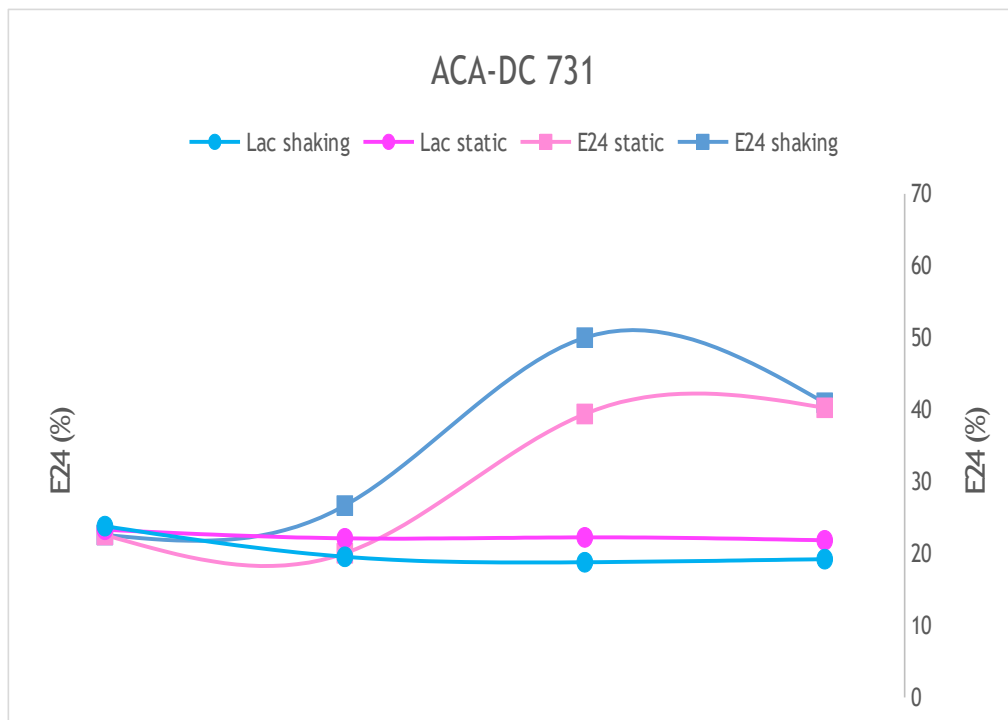
Όσον αφορά στα στελέχη της συλλογής LQC, και ειδικότερα τα LQC 752 και LQC 753 (*L. coryniformis*) και LQC 854 (*L. sakei*), παρατηρήθηκε ότι οι αναδευόμενες συνθήκες ευνόησαν το δείκτη γαλακτωματοποίησης, με τις μέγιστες τιμές να λαμβάνονται έπειτα από 48 ή 72 ώρες καλλιέργειας. Ωστόσο, η κατανάλωση λακτόζης ήταν υψηλότερη στις στατικές συνθήκες, όπου επίσης παρατηρήθηκε και υψηλότερη παραγωγή ολικού ξηρού βάρους.



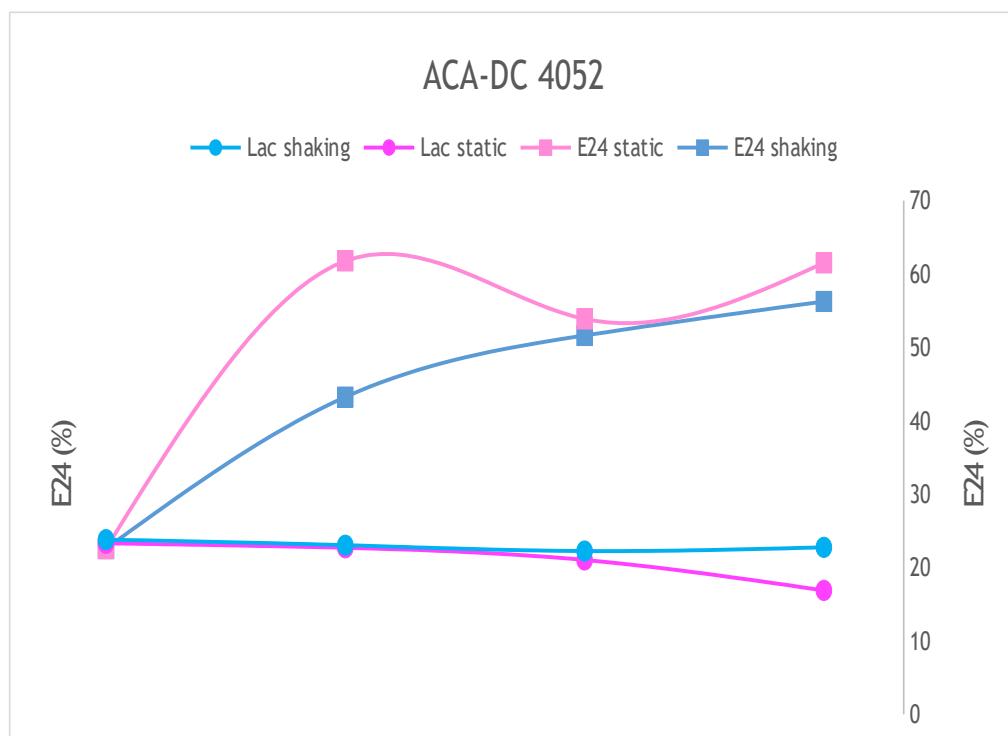
**Διάγραμμα 5.7:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 182 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).



**Διάγραμμα 5.8:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 276 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).



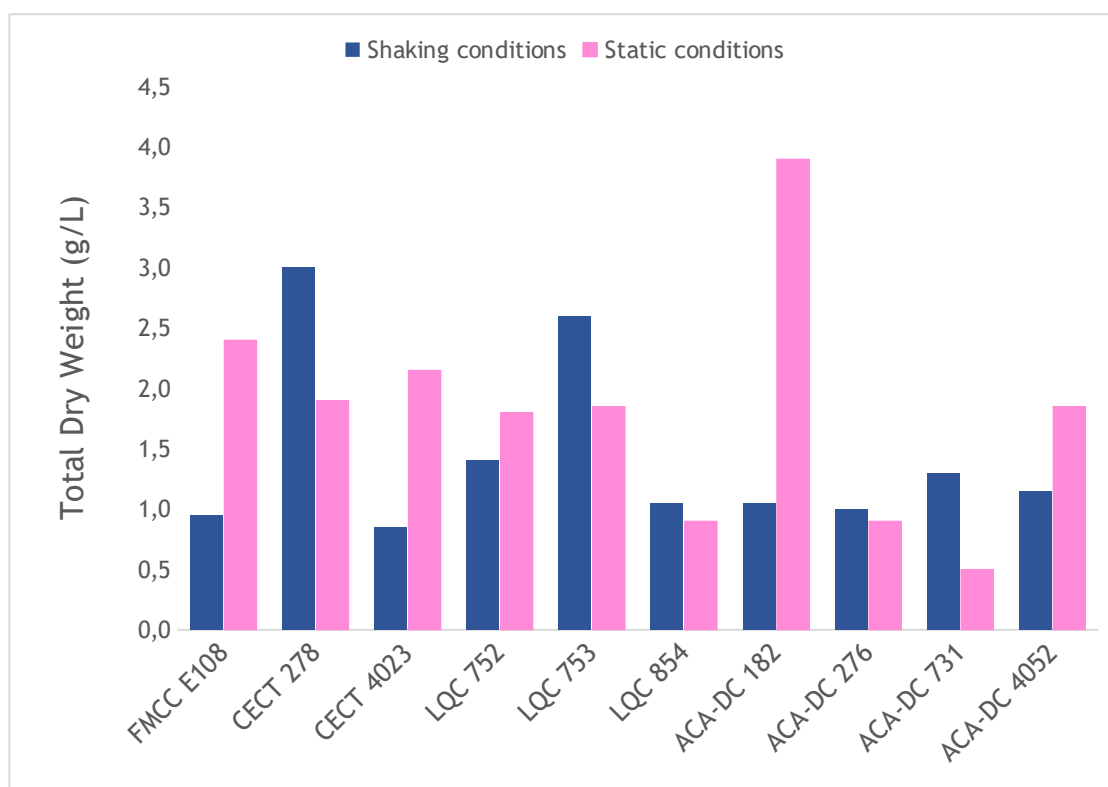
**Διάγραμμα 5.9:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 731 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).



**Διάγραμμα 5.10:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 4052 σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

Στα στελέχη της συλλογής ACA-DC, ανήκουν τρία στελέχη *L. plantarum* (ACA-DC 276, ACA-DC 731 και ACA-DC 4054 καθώς και ένα στέλεχος *L. fermentum* (ACA-DC 182). Παρόλα αυτά, η συμπεριφορά μεταξύ των στελεχών *L. plantarum* ήταν διαφορετική μεταξύ των πειραμάτων. Ειδικότερα, οι στατικές συνθήκες φάνηκαν να ευνοούν το δείκτη γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  για τα στελέχη ACA-DC 182, ACA-DC 276 και ACA-DC 4052 ενώ για το στέλεχος ACA-DC 731 η εφαρμογή ανάδευσης οδήγησε σε υψηλότερο  $E_{24}$ , το οποίο συνδέεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Επιπρόσθετα, η εφαρμογή ανάδευσης κατά τις καλλιέργειες των βακτηρίων φάνηκε να επηρεάζει και στην παραγωγή ολικού ξηρού βάρους, ωστόσο σημαντική διαφορά παρουσίασαν τα στελέχη FMCC E108 (*L. pentosus*), CECT 4023 (*L. pentosus*) και ACA-DC 182 (*L. fermentum*). Επίσης, παρόλο που οι τιμές για τη βιομάζα φαίνονται σχετικά χαμηλές, συμφωνούν με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες στη βιβλιογραφία για γαλακτικά βακτήρια. Για παράδειγμα σε μία μελέτη για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με το βακτήριο *L. helveticus* παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 3.12 g/L σε βιοαντιδραστήρα (Sharma et al., 2014). Σε μία άλλη μελέτη, όπου μελετήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με το στέλεχος *L. lactis* CECT 4434, οι τιμές βιομάζας σε κωνικές φιάλες υπό ανάδευση κυμάνθηκαν από 4.4-5.3 g/L χρησιμοποιώντας διάφορα θρεπτικά μέσα από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, συμπεριλαμβανομένου του τυρογάλακτος (Vera et al., 2018). Το γεγονός ότι η παραγωγή βιομάζας είναι αντιστρόφως ανάλογη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Ghasemi et al., 2019, όπου μελετήθηκαν διάφορα στελέχη, μεταξύ των οποίων το *L. plantarum* και το *L. rhamnosus*.



**Διάγραμμα 5.11:** Σύγκριση μεταξύ της παραγωγής ολικού ξηρού βάρους (Total dry weight, g/L) μετά από 72 ώρες καλλιέργειας σε όλα τα βακτηριακά στελέχη σε αναδευόμενες (shaking) και στατικές συνθήκες καλλιέργειας (static).

Επίσης, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες στις οποίες η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έχει πραγματοποιηθεί τόσο υπό αναδευόμενες όσο και υπό στατικές συνθήκες, παρόλο που η πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποιεί ανάδευση, τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρες (Moldes et al., 2013; Morais et al., 2017; Mouafo et al., 2018). Οι Madhu et al. (2014) μελέτησαν το στέλεχος *L. plantarum* τόσο σε στατικές όσο και σε αναδευόμενες συνθήκες όπου συμπέραναν ότι η μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών παρατηρήθηκε μετά από 72 ώρες καλλιέργειας σε στατικές συνθήκες. Παρόμοιο αποτέλεσμα αναφέρεται και σε μελέτη με το στέλεχος *L. acidophilus* (Brzozowski et al., 2009).

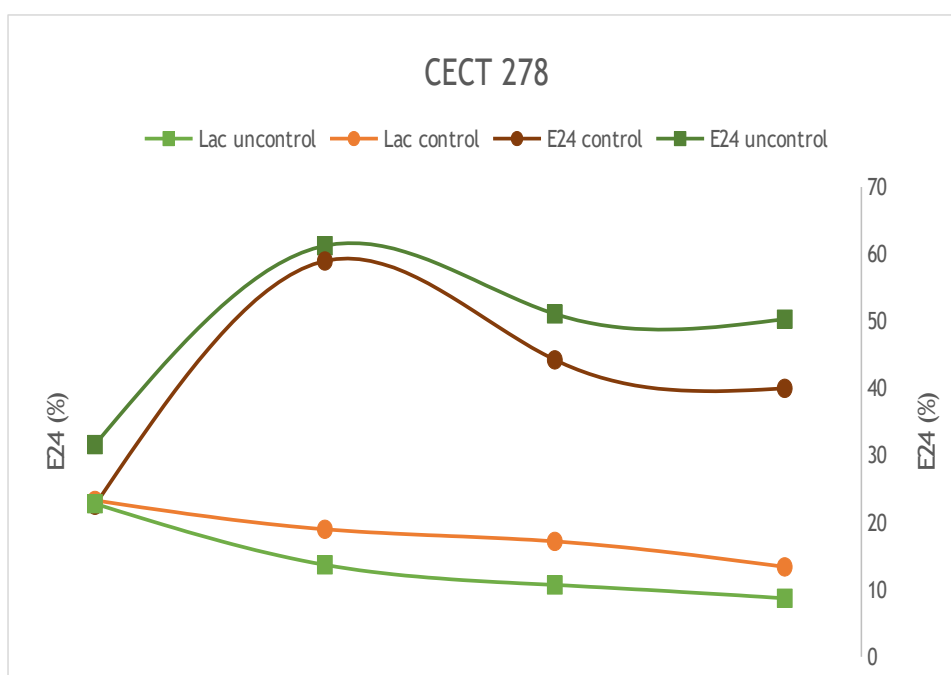
## **5.2 Επίδραση του ελέγχου pH και η εφαρμογή αερόβιων ή μικροαερόφιλων συνθηκών**

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι κατά κύριο λόγο υποχρεωτικά αναερόβια συνεπώς δύνανται να αναπτύσσονται τόσο αερόβια όσο και αναερόβια. Συνεπώς, στη δημοσιευμένη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες μελέτες όπου οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται είτε αερόβια (Madhu et al., 2014; Morais et al., 2017) είτε αναερόβια (Mercier et al., 1992; Sharma et al., 2014). Συνεπώς μελετήθηκε και στην παρούσα εργασία, η επίδραση του ελέγχου pH παράλληλα με την εφαρμογή αερόβιων ή μικροαερόφιλων συνθηκών, με κοινή παράμετρο τις στατικές συνθήκες καλλιέργειας. Στα επόμενα διαγράμματα ακολουθεί η σύγκριση μεταξύ της κατανάλωσης λακτόζης και της εξέλιξης του δείκτη γαλακτωματοποίησης  $E_{24}$  (%). Το πείραμα που επισημαίνεται ως control αντιστοιχεί στην περίπτωση που ελέγχεται η τιμή pH και επικρατούν αερόβιες συνθήκες σε

αντίθεση με το uncontrol, όπου η τιμή pH δεν ελέγχεται ή διορθώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και επικρατούν μικροαερόφιλες συνθήκες.

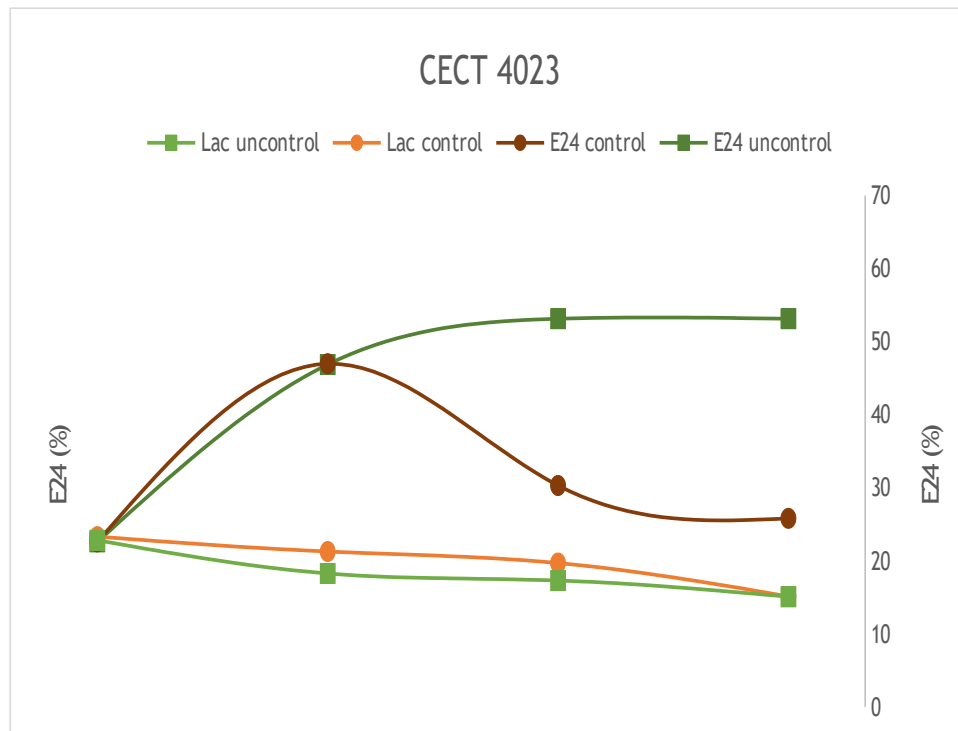


**Διάγραμμα 5.12:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους FMCC E108 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.

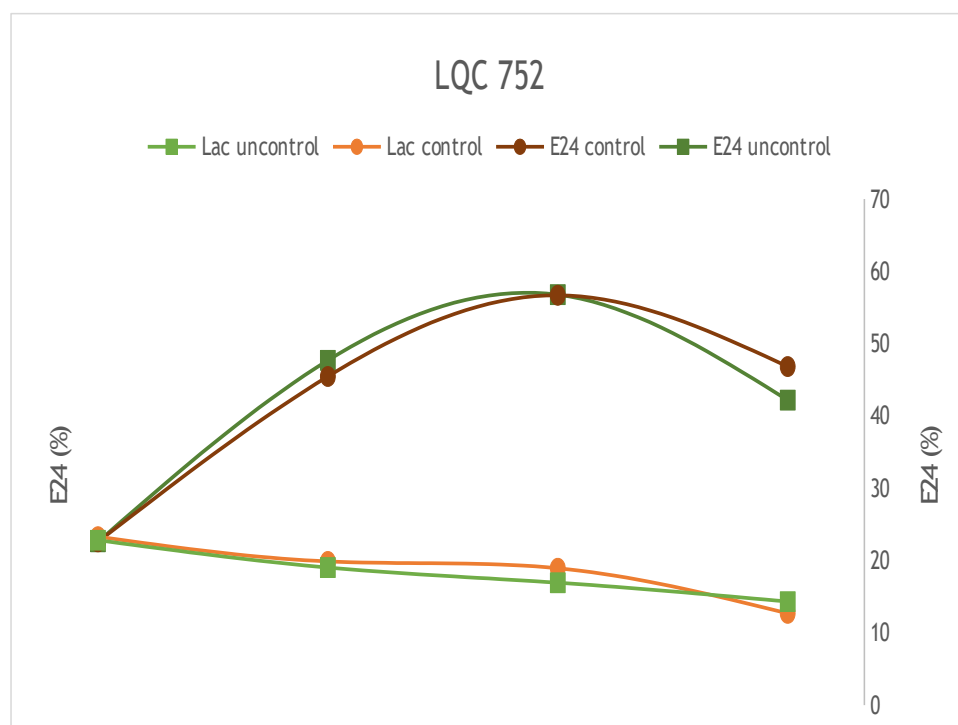


**Διάγραμμα 5.13:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους

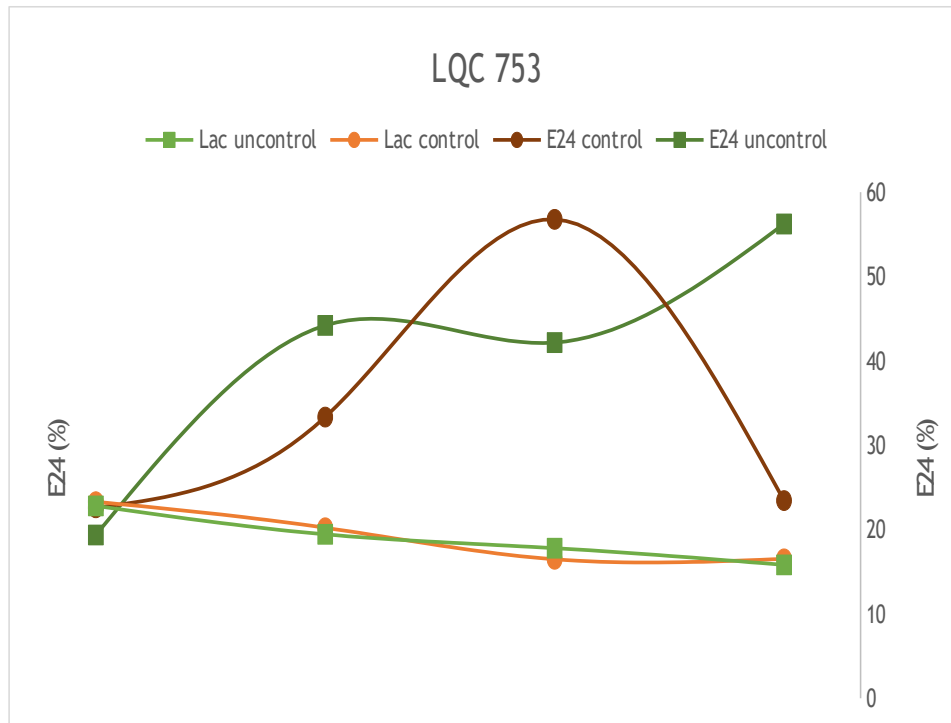
CECT 278 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



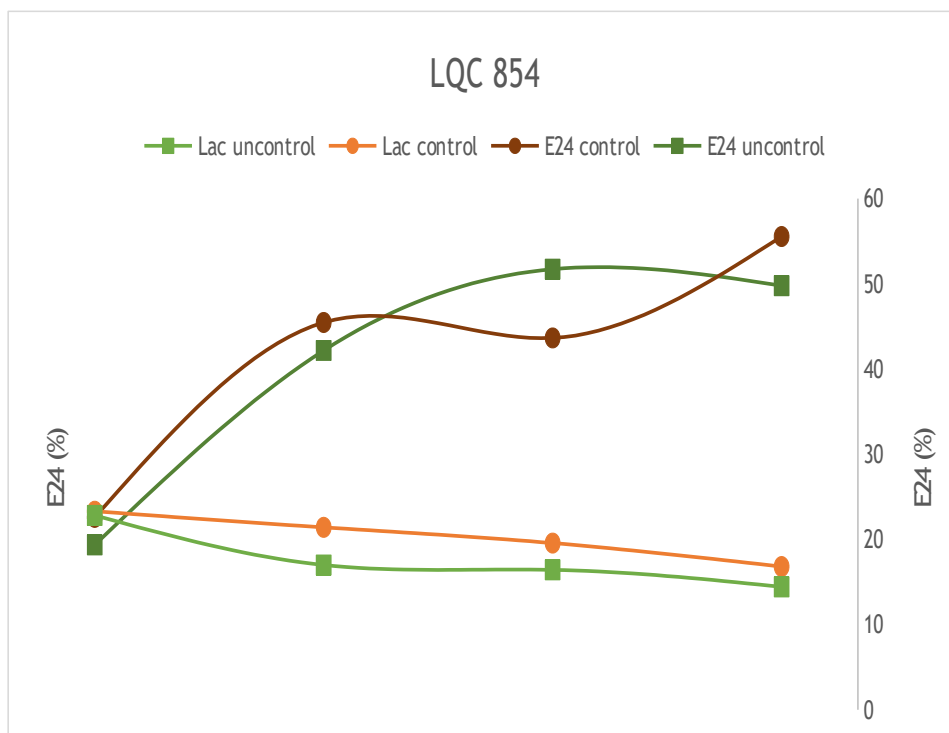
**Διάγραμμα 5.14:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους CECT 4023 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



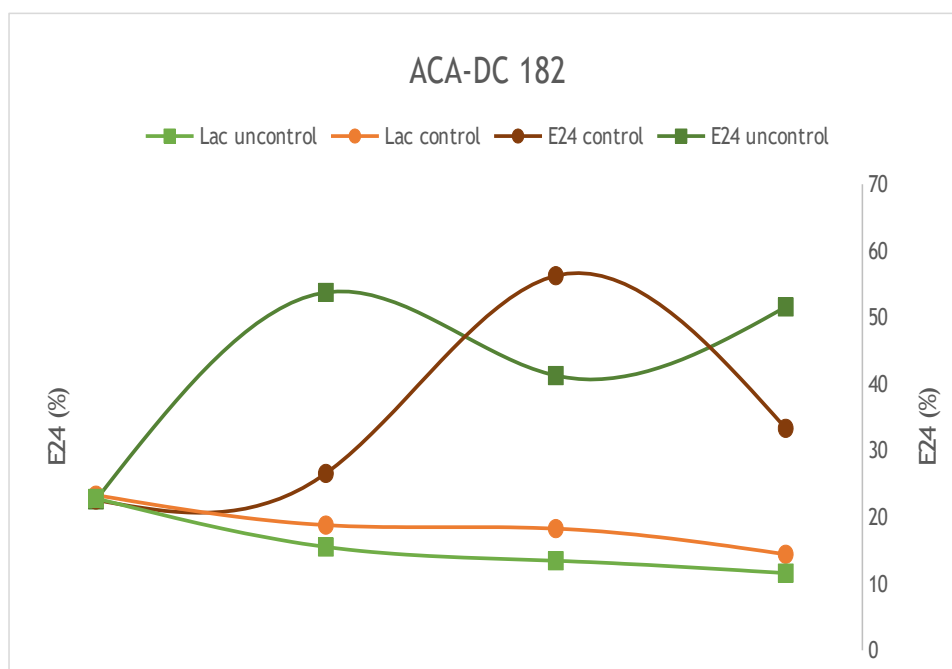
**Διάγραμμα 5.15:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 752 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



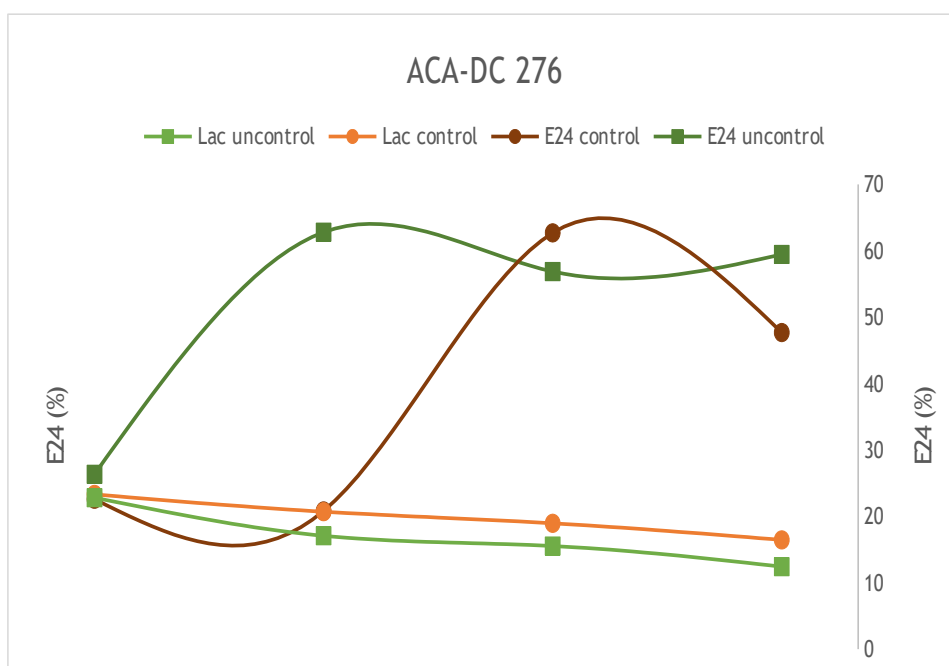
**Διάγραμμα 5.16:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 753 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



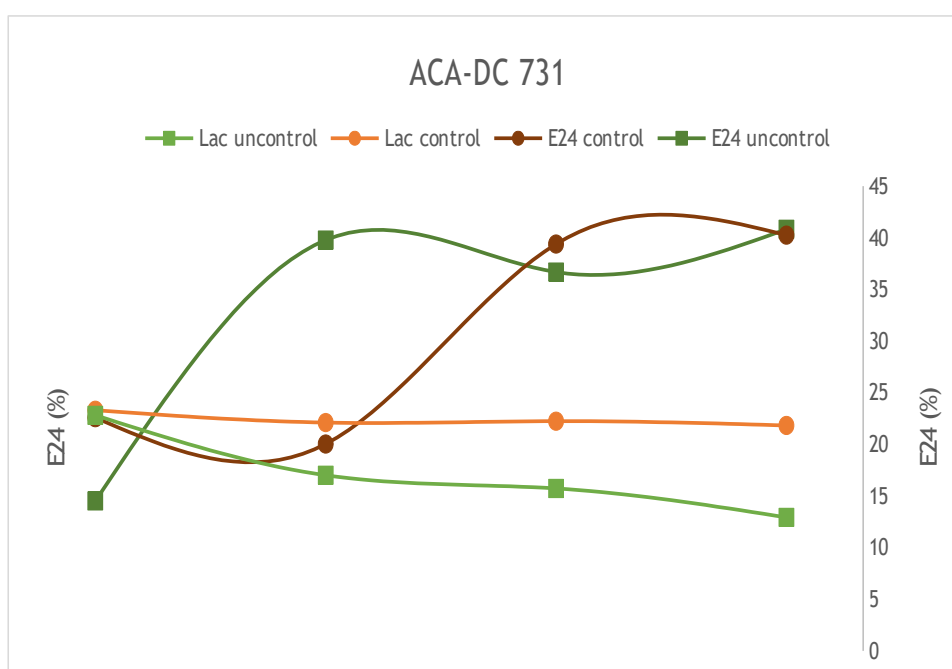
**Διάγραμμα 5.17:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους LQC 854 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



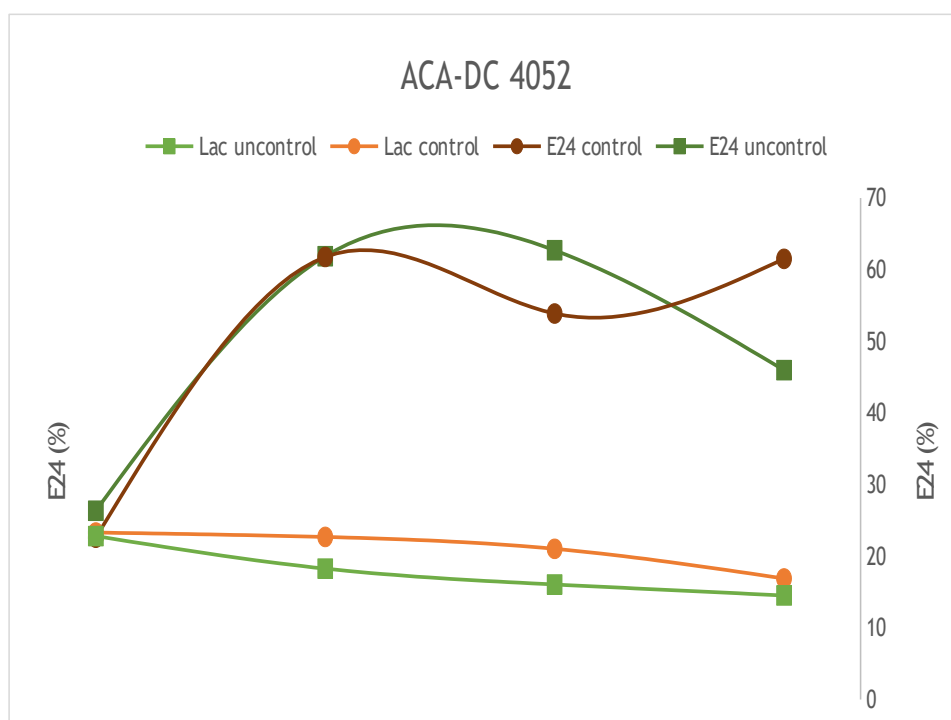
**Διάγραμμα 5.18:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 182 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



**Διάγραμμα 5.19:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 276 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



**Διάγραμμα 5.20:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 731 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.



**Διάγραμμα 5.21:** Σύγκριση μεταξύ της κινητικής κατανάλωσης λακτόζης (Lactose), και της εξέλιξης του ποσοστού γαλακτωματοποίησης E<sub>24</sub> (%) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους ACA-DC 4052 σε ελεγχόμενες και αερόβιες (control) και μη ελεγχόμενες και μικροαερόφιλες (uncontrol) συνθήκες καλλιέργειας.

Αντίστοιχα με την προηγούμενη σύγκριση, και στην περίπτωση αυτή ανάλογα με τα διαφορετικά βακτήρια παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ειδικότερα, τα στελέχη ACA-DC 182 (*L. fermentum*), και τα δύο στελέχη *L. plantarum* (ACA-DC 276 και ACA-DC 731) παρουσίασαν μεγαλύτερο δείκτη γαλακτωματοποίησης στις αναερόβιες συνθήκες στις 24 ώρες καλλιέργειας. Αντίστοιχη παρατήρηση δύναται να γίνει και για τα στελέχη της συλλογής LQC 752 και LQC 854 (*L. coryniformis* και *L. sakei* αντίστοιχα) καθώς και για το CECT 4023 (*L. pentosus*). Ωστόσο, αν συγκριθούν τα δύο στελέχη *L. pentosus* (CECT 4023 και FMCC E108), εύκολα φαίνεται ότι το δεύτερο στέλεχος παρουσίασε βέλτιστες τιμές κατά την καλλιέργεια με έλεγχο pH και αερόβιες συνθήκες. Συνεπώς, κρίνεται αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ακόμα και ανάμεσα στο ίδιο γένος βακτηρίων δύναται να υπάρχουν διαφορές οι οποίες σχετίζονται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και προέρχονται από το μεταβολισμό των βακτηρίων. Ωστόσο, με βάση τα παρόντα πειράματα δεν είναι εύκολο να τεκμηριωθεί αν οι αερόβιες ή οι μικροαερόφιλες συνθήκες ευνοούν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Συνεπώς περαιτέρω μελέτη κρίνεται απαραίτητη και ειδικότερα το πείραμα που θα αφορά στην καλλιέργεια υπό μικροαερόφιλες συνθήκες με παράλληλο έλεγχο της τιμής pH.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων μελετήθηκαν ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, αρχικά σε πειραματικό στάδιο από το οποίο επιλέχθηκαν αυτά με την καλύτερη επίδοση. Στη συνέχεια τα επιλεγμένα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για τις ζυμώσεις έχοντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλο. Τα στελέχη δοκιμάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, για να βρεθεί η καταλληλότερη συνθήκη για την βέλτιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.

Οι συνθήκες αφορούσαν κυρίως τον έλεγχο του pH, την παρουσία ή απουσία οξυγόνου, δηλαδή αν τα στελέχη χρειάζονται μικροαερόφιλες ή αναερόβιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθώς και τις συνθήκες ανάδευσης αναφορικά με την επίδραση στην παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Η συνθήκη κατά της οποίας το pH δεν ελέγχθηκε και δεν υπήρξε ανάδευση (άρα οι συνθήκες είναι αναερόβιες), έδειξε να έχει μια καλή πορεία και καλύτερα αποτελέσματα στο δείκτη γαλακτωματοποίησης σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Όμως όλα τα στελέχη παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά και διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης σε όλες τις συνθήκες.

Στον δείκτη γαλακτωματοποίησης ο οποίος συσχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, κάποια στελέχη παρόλο που οι συνθήκες της ζύμωσης παρέμειναν ίδιες, έδειξαν να έχουν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτώματος μετά από τις 48 ώρες ζύμωσης, ενώ κάποια άλλα στελέχη έδειξαν απότομη αύξηση στις 24 ώρες ζύμωσης. Τα στελέχη δεν δείχνουν καμία συσχέτιση μεταξύ τους έτσι υποθέτουμε ότι αυτό οφείλεται στον διαφορετικό μεταβολισμό του κάθε στελέχους.

Για την καλύτερη διευκρίνηση και πιο σαφή συμπεράσματα θα πρέπει να ελεγχθούν όλες οι παράμετροι. Είναι απαραίτητο λοιπόν να γίνουν περισσότερα πειράματα και περισσότερες μελέτες στο συγκεκριμένο θέμα, ώστε να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τις κατάλληλες συνθήκες ζύμωσης που απαιτούνται. Ειδικότερα, το επόμενο πείραμα θα αφορά στην καλλιέργεια των επιλεγμένων βακτηρίων υπό στατικές, μικροαερόφιλες συνθήκες και τον παράλληλο έλεγχο του pH. Επίσης, πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να μελετηθεί η επίδραση του λόγου άνθρακα προς άζωτο, ώστε να αποσαφηνιστεί η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και βιομάζας.

Ωστόσο τα αποτελέσματα κρίνονται υποσχόμενα ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus*, με απώτερο σκοπό να ενταχθούν στις βιομηχανίες τροφίμων και στα τρόφιμα, αλλά και την αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων (όπως το τυρόγαλο) για την μείωση του κόστους παραγωγής στα πλαίσια της βιοοικονομίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

#### Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Βενετσανέα, Ν. 2012 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΒΑΘΜΙΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΟΥ Πάτρα, Διδακτορική διατριβή.
2. Βλάχου Κ. 2015 Απορρύπανση τυρογάλακτος με χρήση κεφίρ προς παραγωγή γαλακτικού οξέος Πάτρα, Μεταπτυχιακή Διατριβή.
3. Θεολόγου, Σ. 2018 Σχεδιασμός & τεχνοοικονομική αξιολόγηση βιοδιυλιστηρίου για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και προϊόντων προστιθέμενης αξίας Αθήνα, Μεταπτυχιακή Διατριβή.
4. Κοτροκόης, Κ., Παπαδογιαννάκης, Ε. 2009 *Διατροφή και χημεία τροφίμων στην δημόσια υγεία* σσ182-193 Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδη
5. Μαντέλα Μαρία-Ειρήνη 2019 "Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και γενετοξικής/ αντιγενετοξικής δράσης επιφανειοδραστικών παραγόντων απομονωμένων από θαλάσσια βακτήρια. Αλεξανδρούπολη, Μεταπτυχιακή Διατριβή.
6. Μπαλατσούρας, Γ. 2006 *Μικροβιολογία Τροφίμων* σσ215-221 Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
7. Μπατρίνου, Α. 2011 *Σύγχρονη βιοτεχνολογία τροφίμων-γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα* σσ71-76 Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδη
8. Μπλούκας, Ι., 2004 *Επεξεργασία & Συντήρηση τροφίμων* σσ425-439. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη
9. Νικολάου, Γ., 2013 Μελέτη της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τυροκομικά απόβλητα για βέλτιστη παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος. Λεμεσός, Πτυχιακή Εργασία
10. Τομαρά, Δ., 2018 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ, ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΩΣ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΟ ΠΡΟΙΟΝ Καλαμάτα, Πτυχιακή εργασία.
11. Φωτοπούλου, Ν., 2019 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και εδώδιμα φιλμ: Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Αργοστόλι, Πτυχιακή Εργασία.

## Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Banat, I. M. "Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal—State of the Art." *Acta Biotechnologica* 15.3 (1995): 251-267
2. Brzozowski, B., Bednarski, W., & Dziuba, B. (2009). Functional properties of *Lactobacillus acidophilus* metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2467–2476. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3749>
3. Carrillo, P. G., et al. "Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12.1 (1996): 82-84.
4. Fakruddin, Md. "Biosurfactant: production and application." *J Pet Environ Biotechnol* 3.124 (2012): 2..
5. Fiechter, Armin. "Biosurfactants: moving towards industrial application." *Trends in biotechnology* 10 (1992): 208-217.
6. Freitas, Cláudia, et al. "Επιλογή πηγών άνθρακα χαμηλού κόστους για παραγωγή καροτενοειδών και λιπιδίων από τη ροζ ζύμη *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 με χρήση κυτταρομετρίας ροής". *Bioresource Technology* 158 (2014): 355-359.
7. Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., & Yousefi, G. (2019). Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. *Scientific Reports*, 9(1), 5287. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41589>
8. Iliada K. Lappa, Aikaterini Papadaki, Vasiliki Kachrimanidou, Antonia Terpou, Dionysios Koulougliotis, Effimia Eriotou and Nikolaos Kopsahelis. "Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications."
9. Kruglyakov, Pyotr M. *Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications*. Elsevier, 2000.
10. Lang, Siegmund. "Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7.1-2 (2002): 12-20.
11. Lin, Sung-Chyr. "Biosurfactants: recent advances." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology* 66.2 (1996): 109-120.
12. Mercier, P., Yerushalmi, L., Rouleau, D. and Dochain, D. (1992), Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55: 111-121. doi:10.1002/jctb.280550204
13. Moldes, A. B., Paradelo, R., Vecino, X., Cruz, J. M., Gudiña, E., Rodrigues, L., ... Barral, M. T. (2013). Partial Characterization of Biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and Comparison with Sodium Dodecyl Sulphate for the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil. *BioMed Research International*, 2013, 961842. <https://doi.org/10.1155/2013/961842>
14. Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of

- biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0769-7>
15. Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed Research International*, 2018, 5034783. <https://doi.org/10.1155/2018/5034783>
  16. Rodrigues, L. R., and J. A. Teixeira. "Biosurfactants production from cheese whey." *Advances in Cheese Whey Utilization* (2008): 81-104.
  17. Salminen, Seppo, and Atte Von Wright, eds. *Lactic acid bacteria*. New York, USA: Dekker, 1993.
  18. Satpute, Surekha K., et al. "Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications." *Journal of basic microbiology* 56.11 (2016): 1140-1158.
  19. Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Bansal, A., & Procha, S. (2014). Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactant. *The Scientific World Journal*, 2014, 493548. <https://doi.org/10.1155/2014/493548>
  20. Singh, Vandana. "Biosurfactant–Isolation, production, purification & significance." *Int J Sci Res Pub* 2.7 (2012): 1-4.
  21. Velikonja, J., and Kosaric. N. "Biosurfactants in food applications." *Surfactant Science Series* (1993): 419-419.
  22. Vera, E. C. S., de Azevedo, P. O. de S., Domínguez, J. M., & Oliveira, R. P. de S. (2018). Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 168–178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.02.011](https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.02.011)
  23. Walter, Michael G., et al. "Solar water splitting cells." *Chemical reviews* 110.11 (2010): 6446-6473.
  24. Zajic, J. E., William Seffens, and Chandra Panchal. "Biosurfactants." *Critical Reviews in Biotechnology* 1.2 (1983): 87-107.