

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΣ ΤΡΑΝΤΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Φεβρουάριος 2022

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΤΡΟΦΙΜΑ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Το όνομα του επιβλέποντος εδώ

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλες ενώσεις, με μία υδρόφοβη και μία υδρόφιλη ομάδα, παράγονται από μικροβιακά στελέχη και μπορούν να αντικαταστήσουν τις συνθετικές επιφανειοδραστικές που παράγονται από το πετρέλαιο. Ωστόσο, το υψηλό κόστος παραγωγής δυσχεραίνει την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα. Για το λόγο αυτό, επιδιώκεται η χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως τα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων, ως χαμηλού κόστους υποστρώματα για τις μικροβιακές ζυμώσεις. Αντίστοιχα, η αξιολόγηση γαλακτικών βακτηρίων, δύναται να επιτρέψει την εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένης της μη-παθογόνου φύσης τους σε σύγκριση με παθογόνα βακτήρια ή/και ζύμες. Συνεπώς, η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολήθηκε με την αξιολόγηση της ικανότητας παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με τη χρήση γαλακτικών βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υπόστρωμα (M2) με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και το τυρόγαλο ως απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων, με κύρια πηγή άνθρακα τη λακτόζη. Στα γαλακτικά βακτήρια, οι βιοεπιφανειοδραστικές δύνανται να παράγονται είτε στο υπερκείμενο της ζύμωσης, είτε προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα. Για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις και δείγματα λαμβάνονταν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Για την εκτίμηση των βιοεπιφανειοδραστικών μετρήθηκε η επιφανειακή τάση, η μετατόπιση ελαίου και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης ενώ για τη μικροβιακή ανάπτυξη, μετρήθηκε η κατανάλωση σακχάρων, η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους και γαλακτικού οξέος.

Επιπρόσθετα, με βάση προηγούμενη μελέτη αναφορικά με γαλακτικά βακτήρια και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, επιλέχθηκε το στέλεχος *L. fermentum* ACA 182, που παράγει βιοεπιφανειοδραστικές, οι οποίες απομονώθηκαν και εφαρμόστηκαν στην παραγωγή γαλακτοκομικού προϊόντος και ειδικότερα ξινογάλακτος. Επιλέχθηκαν τέσσερις τύποι διαφορετικού γάλακτος (ήτοι αγελαδινό και κατσικίσιο, πλήρη και μειωμένων λιπαρών) και για κάθε πείραμα συμπερίληφθηκαν τρεις περιπτώσεις: μόνο η προσθήκη των κυττάρων (προκαλλιέργειας), κύτταρα και βιοεπιφανειοδραστική από το συγκεκριμένο στέλεχος και κύτταρα και προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών MEL (με δομικές μονάδες λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης). Το τελικό προϊόν (ξινόγαλα ή sour milk)

μετά το πέρας της ζύμωσης αποθηκεύτηκε στους 4°C και μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά πέντε ημέρες. Μετρήθηκε το ποσοστό συναίρεσης, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα και η καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού. Συμπερασματικά, μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας φάνηκε ότι και στα δυο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να παραχθούν επιφανειοδραστικές ουσίες, με το τυρόγαλο να είναι αυτό που παρατηρήθηκαν συνολικά οι χαμηλότερες μετρήσεις της επιφανειακής. Όσον αφορά στα αποτελέσματα για την εφαρμογή σε γαλακτοκομικό προϊόν, παρατηρήθηκε ότι οι επιφανειοδραστικές λειτούργησαν καλύτερα στα γάλατα με πλήρη λιπαρά, καθώς επέδειξαν καλύτερη συνοχή, εμφανίζοντας μικρότερο ποσοστό συναίρεσης συγκριτικά με τα αντίστοιχα γάλατα χαμηλών λιπαρών.

ABSTRACT

Biosurfactants constitute amphiphilic compounds, comprising both a hydrophobic and a hydrophilic moiety in their structure, produced by microbial entities. Biosurfactants can substitute for their chemically obtained counterparts, but large scale production is hindered due to the high cost of production. thus, renewable resources, including food industry waste streams and by-products have been evaluated as low-cost substrates for the fermentative production of biosurfactants. On top of that, lactic acid bacteria have been assessed for their ability to produce biosurfactants, that will further allow for food applications, considering their GRAS status, compared to pathogenic bacteria usually employed in biosurfactants production. Therefore, the current study undertook the evaluation of several lactobacilli strains for their ability to synthesize biosurfactants, using both a conventional fermentation media (M2) containing glucose but also cheese whey, containing primarily lactose. Cheese whey was included as a low cost fermentation supplement, obtained as a by-product from cheese manufacturing. Biosurfactants in lactobacilli can be produced either extracellularly or cell-bound. To assess the biosurfactant production ability, fermentations were performed and samples were withdrawn at regular time intervals. Surface tension measurements, oil displacement test and emulsification activity were used to estimate biosurfactant production, whereas sugar consumption, production of total dry weight and lactic acid were quantified to monitor microbial growth.

In parallel, following a previously published screening method for biosurfactant production using lactobacilli strains, a potential biosurfactant producer, specifically *L. fermentum* ACA 182 was selected to be applied in dairy product formulation. Four different types of milk were selected (cow milk and goat milk, both in full fat and reduced fat) and the each experimental set up included three different cases: the control (denoted only by the addition of bacterial cells), the addition of LAB biosurfactants with bacterial cells, and MEL (mannosylerythritol lipids) biosurfactants with bacterial cells. At the end of fermentation sour milk was stored at 4°C and measurements of syneresis, total titrable acidity and microbial counts were performed every five days. Conclusively, the ability of several strains to reduce surface tension, thus producing biosurfactants was evidenced in both substrates, whereby, utilization of cheese whey demonstrated lower values for surface tension measurements, indicating enhanced production. In the context of further application,

full fat milk resulted in better syneresis, thus better cohesion compared to reduced fat skim milk. In goat skim milk, the addition of biosurfactants seemed to enhance the syneresis parameter, indicating further study with respect to the concentration of biosurfactants added.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες: Δομή και ταξινόμηση	14
1.1.1. Γλυκολιπίδια	15
1.1.2. Ραμνολιπίδια	15
1.1.3. Σοφορολιπίδια	15
1.1.4. Λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης (MEL's)	16
1.1.5. Λιποπεπτίδια και Λιποπρωτεΐνες	16
1.2. Παραγωγή και ρόλος των βιοεπιφανειοδραστικών	16
1.3. Σύγκριση βιοεπιφανειοδραστικών με χημικά παραγόμενες	17
1.4. Ιδιότητες	18
1.4.1. Επιφανειακή τάση	18
1.4.2. Κρίσιμη συγκέντρωση μικελίου CMC (Critical Micelle Concentration) ..	19
1.4.3. Γαλάκτωμα	19
1.4.4. Σταθερότητα	20
1.5. Εφαρμογές	20
1.5.1. Εφαρμογές στα τρόφιμα	21
1.5.2. Παγωτό	24
1.6. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από προβιοτικά βακτήρια και οι δυνατότητες εφαρμογής τους σε προϊόντα τροφίμων	24
1.7. Υποστρώματα για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών	24
1.7.1. Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα	25
1.7.2. Φυτικά έλαια και υπολείμματα λαδιών	25
1.7.3. Απόβλητα απόβλητα ελαιοτριβείου (OMWE)	25
1.7.4. Αμυλώδη υποστρώματα	26
1.7.5. Μελάσα	26
1.7.6. Βιομηχανία γάλακτος	26
1.8. Πιθανή μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών	27
1.9. Το Τυρόγαλα	27
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1. Βιολογικό υλικό	32
3.2. Θρεπτικό υπόστρωμα	32

3.3. Ζύμωση για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων	34
3.4. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών	34
3.5. Αναλυτικές μέθοδοι	35
3.5.1. Προσδιορισμός βιομάζας.....	35
3.5.2. Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος	36
3.6. Αναλύσεις διαλογής στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες	36
3.6.1. Μέτρηση επιφανειακής τάσης.....	36
3.6.2. Δοκιμή γαλακτωματοποίησης	37
3.6.3. Δοκιμή μετατόπισης ελαίου	38
3.7. Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων παραγωγών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	39
3.7.1. Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος	39
3.7.2. Αναλύσεις ξινογάλακτος:	40
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1. Αξιολόγηση συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	43
4.1.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.....	43
4.1.2. Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	45
4.1.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.....	46
4.1.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	50
4.1.5. Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (θρεπτικό μέσο M2)	55
4.2. Αξιολόγηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	57
4.2.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των 24 και 72 ωρών	57
4.2.2. Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	59
4.2.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.....	60

4.2.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	65
4.2.5. Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος.....	67
5. Εφαρμογές	72
5.1. Αποτελέσματα για τη συναίρεση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.....	73
5.2. Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης	79
5.3. Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar	81
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Στελέχη που επιλέχθηκαν.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Πίνακας 2: Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2)	33
Πίνακας 3: Παραγωγή γαλακτικού οξέος (g/L) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (θρεπτικό μέσο M2)	55
Πίνακας 4: Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος.....	68
Πίνακας 5: Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (4 °C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως γαλακτικό οξύ	80
Πίνακας 6: Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar.....	81
Πίνακας 7: Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar.....	82

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Συγκέντρωση γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2.....	44
Γράφημα 2: Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2.....	46
Γράφημα 3: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	48
Γράφημα 4: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	50
Γράφημα 5: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	52
Γράφημα 6: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	54
Γράφημα 7: Συγκέντρωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος.	58
Γράφημα 8: Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό μέσο	60
Γράφημα 9: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.	62
Γράφημα 10: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	63
Γράφημα 11: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	65
Γράφημα 12: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	67
Γράφημα 13: Κατανάλωση λακτόζης μετά από 72 ώρες ζύμωσης	70
Γράφημα 14: Συναίρεση στο ACA 182 Goat milk.....	74
Γράφημα 15: Συναίρεση στο ACA 182 Low fat Goat milk	75
Γράφημα 16: Συναίρεση στο ACA 182 Cow milk.....	76
Γράφημα 17: Συναίρεση στο ACA 182 Low fat Cow milk	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της επιφανειακής τάσης	18
Εικόνα 2: Τυρόγαλα πριν την απομάκρυνση πρωτεϊνών.....	33
Εικόνα 3: Προετοιμασία υποστρωμάτων για αποστείρωση	33
Εικόνα 4: Μembrάνες διαπίδυσης.....	35
Εικόνα 5: Τενσιόμετρο	37
Εικόνα 6: Wilhelmy plate	37
Εικόνα 7: Γαλάκτωμα σε υπερκείμενο	38
Εικόνα 8: Γαλάκτωμα σε PBS	38
Εικόνα 9: Απεικόνιση μετατόπισης ελαίου	39
Εικόνα 10: Τριβλίο με ανεπτυγμένες αποικίες	41
Εικόνα 11: Falcon που απεικονίζεται η συναίρεση του γάλακτος	41
Εικόνα 12: Ογκομετρούμενη οξύτητα	42
Εικόνα 13: Ξινόγαλα εμπορικό.....	77
Εικόνα 14: ACA 182 Goat milk	78
Εικόνα 15: ACA 182 Goat milk low fat	78
Εικόνα 16: ACA 182 Low fat Cow milk	79

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι ενώσεις που μειώνουν την επιφανειακή ή διεπιφανειακή τάση ενός υγρού ή μεταξύ δύο υγρών, ή ακόμα και μεταξύ υγρού και στερεού. Οι τασενεργές ενώσεις είναι χαρακτηριστικές οργανικές ενώσεις που περιέχουν υδρόφοβες ομάδες (τις ουρές τους) και υδρόφιλες ομάδες (τα κεφάλια τους). Επομένως, ένα τασενεργό μόριο περιέχει και υδατο-αδιάλυτο (και ελαιοδιαλυτό συστατικό) και υδατο-διαλυτό συστατικό. Τα βιοεπιφανειοδραστικά έχουν τις ιδιότητες μείωσης της επιφανειακής τάσης, σταθεροποίησης γαλακτωμάτων, δημιουργίας αφρισμού και είναι συνήθως μη τοξικά και βιοδιασπώμενα. Το ενδιαφέρον για τις μικροβιακές επιφανειοδραστικές έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της ποικιλομορφίας τους, του φιλικού προς το περιβάλλον χαρακτήρα τους, και της ικανότητας βιοδιάσπασης που συνάδει με πληθώρα εφαρμογών. Αυτά έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανίες όπως σε καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, υγροσκοπικά, συντηρητικά τροφίμων και απορρυπαντικά. Προς το παρόν, η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από μικροβιακά στελέχη χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος παραγωγής, το οποίο σχετίζεται με τη χρήση συνθετικών μέσων καλλιέργειας. Έτσι, δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στην αξιοποίηση διαφόρων χαμηλού κόστους αγροτοβιομηχανικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων φυτικών ελαίων, αποβλήτων αποστακτηρίων και γαλακτοκομικών προϊόντων, μελάσα σόγιας, ζωικό λίπος, απόβλητα και αμυλούχα απόβλητα ως πρώτες ύλες. Αυτά τα απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε μεγάλη κλίμακα με προηγμένη τεχνολογία, το οποίο και αποτελεί ένα μείζον ερευνητικό θέμα τα τελευταία χρόνια (Saharan 2011).

Οι δυνατότητα χρήσης των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε διάφορες εφαρμογές αυξάνεται, καθώς εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε συνήθεις μεθόδους επεξεργασίας λαμβάνουν χώρα στις βιομηχανίες. Μπορούν να ανταγωνιστούν τα συνθετικά επιφανειοδραστικά, καθώς διατηρούν τις ιδιότητές τους, όντας ταυτόχρονα βιοαποικοδομήσιμες και χαμηλής τοξικότητας ουσίες. Μεταξύ των μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά, ορισμένες ζύμες δεν παρουσιάζουν κινδύνους τοξικότητας ή παθογένειας, γεγονός που τις καθιστά ιδανικές για χρήση σε σκευάσματα τροφίμων. (Ribeiro, 2020)

Οι βιοεπιφανειοδραστικές δρουν ως απορρυπαντικά, διαβρεκτικοί παράγοντες, γαλακτωματοποιητές, παράγοντες αφρισμού και παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η διαβροχή, η γαλακτωματοποίηση, ο αφρισμός και η απορρυπαντική δράση είναι μερικές από τις σημαντικές εφαρμογές ή/και ιδιότητες των επιφανειοδραστικών ουσιών που ενθαρρύνουν την εκτεταμένη χρήση τους σε διάφορες επεξεργασίες τροφίμων. Οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για μελλοντικές προοπτικές στην επεξεργασία τροφίμων, στα καλλυντικά σκευάσματα και ως ενεργά συστατικά τροφίμων. (Sharma, D. 2016)

1.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες: Δομή και ταξινόμηση

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παρουσιάζουν την ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση στη επιφάνεια ενός διφασικού συστήματος και να δρουν ως γαλακτωματοποιητές (Sharma 2014). Οι βιοεπιφανειοδραστικές περιέχουν και υδρόφοβα (π.χ. κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, υδροξυλιπαρά οξέα) και υδρόφιλα (π.χ. υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες, μονοσακχαρίτες κ.α.) αμινοξέα, πεπτίδια, καρβοξυλικό οξύ, αλκοόλη, φωσφορικά) παραγόμενα τμήματα τα οποία συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια μεταξύ υγρών φάσεων, και επομένως μπορούν να μειώσουν την επιφανειακή/διεπιφανειακή τάση στα υγρά. (Saharan et al. 2011; Banat et al. 2010; Van Hamme et al. 2006). Ανάλογα με της σύσταση τους προκύπτουν διάφορες ομάδες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με κυριότερα τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια, λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες και πολυμερή (Sharma, 2016)

Ταξινόμηση βιοεπιφανειοδραστικών

Κριτήρια για την ταξινόμηση των βιοεπιφανειοδραστικών, αποτελούν το μοριακό βάρος (υψηλό ή χαμηλό), ο τύπος έκκρισης από το κύτταρο (ενδοκυτταρικό, εξωκυτταρικό ή προσκολλημένο σε μικροβιακά κύτταρα), το ιοντικό φορτίο του μορίου (ανιονικό, κατιονικό, μη ιονικό ή ουδέτερο) και η χημική δομή (Mnif, 2017). Για αυτά τα μόρια μικροβιακής προέλευσης, η χημική δομή θεωρείται η βάση για την ταξινόμηση ως λιποπολυσακχαρίτης, λιποπρωτεΐνη, βιοπολυμερές, φωσφολιπίδιο, λιποπεπτίδιο ή γλυκολιπίδιο.

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη χημική τους σύσταση και τη μικροβιακή προέλευση. Οι Rosenberg και Ron (1999) πρότειναν

τη διαίρεση τους σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες μειώνουν αποτελεσματικά την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση και συνήθως παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα και πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία είναι πιο αποτελεσματικά ως προς τη δημιουργία γαλακτωμάτων και σταθεροποιητών αλλά δεν μειώνουν απαραίτητα την επιφανειακή ή τη διεπιφανειακή τάση. Από τις πιο μελετημένες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν τα ραμνολιπίδια (γλυκολιπίδια), που παράγονται από τα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, το *surfactin* (στα λιποπεπτίδια) από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, *emulsan* (πολυμερικό βιοεπιφανειοδραστικό) από το βακτήριο *Acinetobacter calcoaceticus* και τα σοφορολιπίδια (γλυκολιπίδια) που παράγονται από στελέχη ζύμης όπως *Starmerella bombicola* (Bonmatin et al. 2003; Van Bogaert et al. 2007, Abdel-Mawgoud et al. 2010; Geys et al. 2014)

1.1.1. Γλυκολιπίδια

Η δομή των γλυκολιπιδίων αποτελείται από ένα μόριο λιπαρού οξέος συνδεδεμένο με ένα μόριο λιπιδίου μέσω ενός γλυκοσιδικού δεσμού. Ανάλογα με τη φύση του υδατάνθρακα, τα γλυκολιπίδια μπορεί να είναι ραμνολιπίδια, λιπίδια τρεαλόζης, λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης (MELs), ή σοφορολιπίδια. Διαφορετικοί μικροοργανισμοί παράγουν διαφορετικά γλυκολιπίδια τα οποία αποτελούν μια ομάδα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επιφανειακή τάση (Williams, 2017).

1.1.2. Ραμνολιπίδια

Τα ραμνολιπίδια είναι από τα πιο ευρέως μελετημένα γλυκολιπίδια και αποτελούνται από μονάδες σακχάρου ραμνόζης που ενώνονται με έναν εστερικό δεσμό με μονάδες 3-υδροξυ λιπαρού οξέος μέσω ενός β-γλυκοσιδικού δεσμού (Perfumo, 2017). Το πιο γνωστό στέλεχος που έχει αναφερθεί πως παράγει αυτού του είδους τις βιοεπιφανειοδραστικές είναι το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* για το οποίο πρώτη αναφορά έγινε από τους Jarvis και Johnson το 1949.

1.1.3. Σοφορολιπίδια

Η δομή των σοφορολιπιδίων αποτελείται από ένα μόριο σακχάρου σοφορόζης ενωμένο σε ένα υδροξυλιωμένο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας (Ozdener, 2019). Είναι μόρια χαμηλής τοξικότητας, σταθερά σε διάφορες συνθήκες, βιοαποικοδομήσιμα,

μειώνουν την επιφανειακή τάση και δε συμβάλουν στη δημιουργία γαλακτωμάτων (Sharma, 2016)

1.1.4. Λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης (MEL's)

Τα MEL χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μαννόζης και ερυθριτόλης συνδεδεμένη με ένα λιπαρό οξύ και υποδιαιρούνται ανάλογα με το μήκος της υδρόφοβης αλυσίδας (λιπαρό οξύ) και το βαθμό του κορεσμού και/ή ακετυλίωσης στις θέσεις C4 και C6 του μονοσακχαρίτη (Ribeiro, 2020). Μπορούν να παραχθούν κατά τη στάσιμη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών (πχ: *Schizonella melanogramma*) που τις παράγουν και λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας για αυτούς (Arutchelvi, 2018)

1.1.5. Λιποπεπτίδια και Λιποπρωτεΐνες

Τα λιποπεπτίδια έχουν στη δομή τους μια λιπιδική ουρά συνδεδεμένη με πεπτιδικά μόρια που μπορούν να βρίσκονται διατεταγμένα με γραμμικό ή κυκλικό τρόπο. Η σουρφακτίνη (surfactin), με το ανιονικό φορτίο, θεωρείται η κύρια ένωση λιποπεπτιδίων που παράγεται από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, και παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Υπάρχουν αρκετές μελέτες για την παραγωγή και την ποικιλομορφία των εφαρμογών της λόγω της ικανότητάς της να μειώνει την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση ακόμη και όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (επιφανειακή τάση : 27,9 mN/m) (Sharma, 2016).

1.2. Παραγωγή και ρόλος των βιοεπιφανειοδραστικών

Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφιφιλικές ενώσεις που παράγονται συνήθως από μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια και ζυμομύκητες στην κυτταρική τους επιφάνεια ή εξω-κυτταρικά και εμφανίζουν ιδιότητες όπως η μείωση της επιφανειακής τάσης και η γαλακτωματοποίηση (Sharma 2016). Μικροοργανισμοί που είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές είναι στελέχη του είδους *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, αλλά και αρκετά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε μέσο με βάση το λάδι, τότε, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται και συσσωρεύονται στο μέσο ανάπτυξης. Στόχος των ουσιών αυτών είναι η γαλακτωματοποίηση συστατικών των υποστρωμάτων τα οποία στη συνέχεια καταναλώνονται από τον ίδιο το μικροοργανισμό (Sharma, 2016).

1.3. Σύγκριση βιοεπιφανειοδραστικών με χημικά παραγόμενες

Αυτή η ποικιλία των χημικών δομών αποτελεί ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των βιοεπιφανειοδραστικών σε σύγκριση με τα συνθετικά, καθώς παράγονται ορισμένοι δομικοί τύποι επιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιώντας βιολογικά συστήματα με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά και εφαρμογές που δεν μπορούν να συντεθούν εύκολα με χημικές διεργασίες (Gerson, 1979).

Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές είναι παθογόνοι και δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε εμπορικά σκευάσματα. Γι' αυτό και η ανάπτυξη-παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από μη παθογόνους μικροοργανισμούς είναι ιδιαίτερα σημαντική. Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες και γαλακτωματοποιητές έχουν ερευνηθεί ως εναλλακτική για τις χημικώς συντιθέμενες συμβατικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών είναι γενικά συγκρίσιμες με χημικά συντιθέμενες ενώσεις.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές, πλεονεκτούν ως προς την ιδιότητα τους να μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμες πηγές ή βιομηχανικά απόβλητα και είναι «φιλικές» προς το περιβάλλον αφού είναι χαμηλής τοξικότητας και βιοδιασπώμενες. Επιπλέον, έχουν πολλαπλές βιολογικές επιφανειοδραστικές δραστηριότητες. Πολλά από τα τρόφιμα, τα προϊόντα περιποίησης, τα καλλυντικά και τα φαρμακευτικά προϊόντα που καταναλώνονται περισσότερο είναι γαλακτώματα. Το φάσμα των εφαρμογών για τα τασιενεργά συστατικά και τους γαλακτωματοποιητές είναι τεράστιο. Υπάρχει ζήτηση για νέες και καινοτόμες επιφανειοδραστικές ουσίες. Ειδικά στη βιομηχανία τροφίμων, νέες και ασφαλείς επιφανειοδραστικές ουσίες είναι επιθυμητές καθώς υπάρχει περιορισμένος αριθμός επιφανειοδραστικών και εγκεκριμένων γαλακτωματοποιητών (Sharma 2016). Ένα ακόμη πλεονέκτημα τους είναι ότι παραμένουν σταθερές σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασίας, pH και αλάτων) (Sharma 2015).

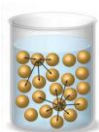
Τα μειονεκτήματα της παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών σε υψηλές ποσότητες εντοπίζονται στο υψηλό κόστος παραγωγής τους σε σύγκριση με τις χημικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές ουσίες, γεγονός που έχει εμποδίσει την ευρεία εφαρμογή τους σε βιομηχανικό επίπεδο. Το κόστος παραγωγής για τα

περισσότερα βιοεπιφανειοδραστικά δεν ανταγωνίζεται εκείνα των χημικών επιφανειοδραστικών. Ωστόσο, στη βιομηχανία τροφίμων, όπου παράγονται προϊόντα υψηλής αξίας, αυτό το μειονέκτημα θα μπορούσε είναι λιγότερο σημαντικό σε σύγκριση με άλλους κλάδους. Επίσης, μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές στρατηγικές για τη μείωση του κόστους παραγωγής τους, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης χαμηλού κόστους και βιώσιμων υποστρωμάτων (όπως αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα ή απόβλητα), τη βελτιστοποίηση της παραγωγής διεργασιών, καθώς και τη βελτίωση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών μικροοργανισμών.

1.4. Ιδιότητες

1.4.1. Επιφανειακή τάση

Οι οργανωμένες δυνάμεις μεταξύ των υγρών μορίων είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο γνωστό ως επιφανειακή τάση (surface tension, ST). Δημιουργεί ένα επιφανειακό «φίλμ» που το κάνει εξαιρετικά δύσκολο για ένα αντικείμενο να μεταφερθεί από την επιφάνεια, αντί να μεταφερθεί όταν είναι εντελώς βουτηγμένο. Η ίδια κατάσταση ισχύει και στη διεπιφάνεια των δύο ρευστών που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους, όπως το λάδι σε νερό και είναι γνωστό ως διεπιφανειακή τάση (interfacial tension, IFT). Συνήθως, μονάδα μέτρησης για την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση είναι το mN/m (που είναι συγκρίσιμο με dynes/cm). Το δυναμικό ενός βιοεπιφανειοδραστικού αξιολογείται από την ικανότητά του να μειώνει την επιφανειακή τάση του υγρού παραγωγής.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της επιφανειακής τάσης

Ένα αποτελεσματικό βιοεπιφανειοδραστικό μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση του νερού από 72,0 σε 35,0 mN/m (Mulligan, 2005). Σύμφωνα με τα περιγραφόμενα πρότυπα, η ελάχιστη μείωση της επιφανειακής τάσης κατά 8 mN/m, θεωρείται κριτήριο για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος ως αποτελεσματικός μικροοργανισμός παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας (Van der Vegt et al. 1991).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ανάμεσα στα διαφορετικά γαλακτικά βακτήρια (LAB) που αξιολογήθηκαν για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, η μέγιστη παραγωγή εντοπίζεται συνδεδεμένη στα κύτταρα σε σύγκριση με τις εξωκυτταρικά παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη *Pseudomonas* και *Bacillus*, που έχουν χαρακτηριστεί για την αρκετά υψηλή παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, τις παράγουν εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης. Οι Gudiña et al. (2013) διαπίστωσαν το γεγονός ότι η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από στελέχη LAB βρέθηκε να σχετίζεται με την ανάπτυξη και υπήρξε παράλληλη σχέση μεταξύ της χρήσης της πηγής άνθρακα, της παραγωγής βιομάζας και τη μείωση της επιφανειακής τάσης.

1.4.2. Κρίσιμη συγκέντρωση μικυλίου CMC (Critical Micelle Concentration)

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα μικύλια δημιουργούνται όταν η συγκέντρωση της βιοεπιφανειοδραστικής υπερβεί μία συγκεκριμένη συγκέντρωση, την κρίσιμη συγκέντρωση για μικύλια ή cmc (critical micelle concentration). Στη συγκεκριμένη συγκέντρωση παρατηρείται μια απότομη αλλαγή των μακροσκοπικών παραμέτρων ενός διαλύματος με επιφανειοδραστικές ενώσεις (σταθεροποίηση της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης, αύξηση της θολότητας και μεταβολή της σκέδασης φωτός γενικότερα, αύξηση του μαγνητικού συντονισμού, μείωση της αγωγιμότητας). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στην απότομη αλλαγή φάσης του τασιενεργού από μεμονωμένα μόρια σε μικύλια. Το cmc χρησιμοποιείται ως το βασικότερο κριτήριο για τη σχετική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μιας τασιενεργής ουσίας και σχετίζεται με τις μετέπειτα εφαρμογές της (Ριτζούλης, 2017).

1.4.3. Γαλάκτωμα

Ένα γαλάκτωμα είναι ένας συνδυασμός δύο ή περισσότερων διαλυμάτων που είναι συνήθως μη αναμίξιμα. Τα γαλακτώματα είναι μέρος διφασικών ουσιών που ονομάζονται κολλοειδή. Σύμφωνα με τη θεωρία της επιφανειακής τάσης, η γαλακτωματοποίηση πραγματοποιείται με τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης μεταξύ δύο φάσεων. Οι βιο-γαλακτωματοποιητές είναι βιολογικής φύσης και παράγονται είτε από τα μικροβιακά κύτταρα ή τα εξωκυτταρικά που παράγονται με γαλακτωματοποιητικές ενώσεις (Sharma 2016). Τα γαλακτώματα είναι ετερογενή συστήματα, που αποτελούνται από τουλάχιστον δύο μη αναμίξιμα υγρά (γενικά μια υδατική και μια ελαιώδη φάση) όπου ένα από αυτά διασπείρεται στο άλλο με τη μορφή σταγονιδίων. (Gudiña and R. Rodrigues, 2019)

1.4.4. Σταθερότητα

Η πρακτική εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών εξαρτάται σημαντικά από τη σταθερότητα τους σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, τιμές pH και επίπεδα αλατότητας. Συνήθως μελετάται η επίδραση κάθε συνθήκης ξεχωριστά, αξιολογώντας την επίδραση κάθε παραμέτρου ανεξάρτητα. Ωστόσο, δύναται να αξιολογηθεί και η συνεργιστική τους επίδραση στη σταθερότητα μιας βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας μέσω της χρησιμοποίησης πειραματικού σχεδιασμού. Έχειδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η μεγαλύτερη επίδραση σχετίζεται με την τιμή pH, ακολουθούμενη από την αλατότητα και τη θερμοκρασία. Αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι η τιμή pH, επιφέρει τη μέγιστη επίδραση και στη δημιουργία γαλακτώματος. Οι ιδιότητες αυτές, όπως προαναφέρθηκε, σχετίζονται με τις περαιτέρω εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα στην αλατότητα περιορίζει τη χρήση τους στη βιολογική αποκατάσταση του περιβάλλοντος, όπου τα επίπεδα αλατότητας είναι αρκετά υψηλά. Σε αντίστοιχη μελέτη, οι Augustine et al. (2010) ανέφεραν ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές από το είδος *Lactobacillus* spp. παρουσίασαν υψηλή ανθεκτικότητα σε διαφορετικές θερμοκρασίες, όπως φάνηκε από τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, ενώ αντίστοιχα η αντοχή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων τεκμηριώθηκε από τη σταθερότητα του δείκτη γαλακτωματοποίησης.

1.5. Εφαρμογές

Το εύρος των χημικών δομών που παρατηρούνται στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες συνεπάγεται ένα αντίστοιχα μεγάλο εύρος πιθανών εφαρμογών στις βιομηχανίες γαλακτοκομικών, τροφίμων, ποτών, καλλυντικών, απορρυπαντικών-καθαριστικών, φαρμακευτικών κ.λπ. (M. Nitschke & Costa, 2007; Marcia Nitschke & Silva, 2018).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές διαθέτουν ισχυρές αντιμικροβιακές εφαρμογές που περιλαμβάνουν αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και αντι-ικές ιδιότητες (Rodrigues, 2006). Οι χρήσεις που σχετίζονται με τις ιατρικές εφαρμογές αφορούν στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης των παθογόνων, καθιστώντας τις ουσίες αυτές χρήσιμες για τη διαχείριση διαφόρων ασθενειών αλλά ενδεχομένως και ως φορείς για προβιοτικά στελέχη (Rodrigues, 2007, Rodrigues

2004). Ωστόσο, παρά τις τεράστιες δυνατότητες των βιοεπιφανειοδραστικών στον ιατρικό τομέα, η χρήση τους παραμένει περιορισμένη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής τους και λόγω της έλλειψης πληροφοριών για την τοξικότητά τους στο ανθρώπινο σύστημα.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές χρησιμοποιούνται επίσης σε διάφορα άλλα προϊόντα, αντικαθιστώντας εν μέρει ή πλήρως τις χημικά παραγόμενες επιφανειοδραστικές ουσίες σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης (Louhasakul Y2020; Oliva A, 2020) όπως απορρυπαντικά για το πλύσιμο ρούχων και οικιακά καθαριστικά (Marchant R, Banat IM2012) (Fei D.2020), προϊόντα καθαρισμού προσωπικής υγιεινής και καλλυντικά (Perfumo 2017; Rebello S, 2020; Fernández-Peña L2020). Όσον αφορά στη γεωργία, τα βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα του εδάφους αφαιρώντας βαρέα μέταλλα και αναστέλλοντας την καταστροφική δραστηριότητα πολλών παρασίτων, όπως μύκητες, ζιζάνια και προνύμφες εντόμων, που προκαλούν μειώσεις στα κέρδη (Sachdev DP, Cameotra SS.2013).

1.5.1. Εφαρμογές στα τρόφιμα

Η βιομηχανία τροφίμων επιβάλλει αυστηρά μέτρα ελέγχου των μικροοργανισμών προκειμένου να παράγει προϊόντα που διασφαλίζουν την ασφάλεια των καταναλωτών και δε βλάπτουν την υγεία. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά σημαντικό για το τελικό προϊόν να έχει υψηλό επίπεδο ποιότητας και αποδοχής από τους καταναλωτές, λαμβάνοντας υπόψη το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τρόφιμα που έχουν λιγότερες τεχνητές και χημικές συνθετικές ενώσεις και είναι πλούσια σε φυσικά συστατικά. (Hasenhuettl GL2019). Ωστόσο, η παρουσία τους σε σκευάσματα έχει περιορισμούς όσον αφορά στη χρήση σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν μαγείρεμα σε φούρνο μικροκυμάτων και ακτινοβολία, καθώς αυτές οι φυσικές ενώσεις μπορούν να χάσουν μερικές από τις αρχικές τους ιδιότητες. Έτσι, νέα πρόσθετα τροφίμων με πυκνωτικές, σταθεροποιητικές και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες καθώς επίσης και αντιοξειδωτικές, αντιβιοφίλμ και αντιμικροβιακές ιδιότητες έχουν παραχθεί, απομονωθεί και ταυτοποιηθεί. (Ribeiro 2020).

Με βάση τις ενδιαφέρουσες ιδιότητές τους, οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να βρουν αρκετές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, ως παράγοντες διαβροχής, ή να βοηθήσουν στην ανάμειξη των συστατικών των τροφίμων, λόγω των επιφανειακών και γαλακτωματοποιητικών τους δραστηριοτήτων. Λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά σε σκευάσματα τροφίμων και ως παράγοντες για την αναστολή του σχηματισμού βιοφίλμ και της προσκόλλησης μικροοργανισμών σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Επίσης, λόγω των μη τοξικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καθαριστικά για την αφαίρεση και την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών από εξοπλισμούς και επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων (Nitschke and Costa 2007; Campos et al. 2013).

Εκτός από τον ρόλο τους ως παράγοντες που προάγουν το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, οι επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν πολλές άλλες εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της συσσωμάτωσης των σφαιριδίων λίπους σε προϊόντα όπως παγωτό ή σαντιγί, για βελτίωση της υφής και της διάρκειας ζωής των προϊόντων που περιέχουν άμυλο ή για τη βελτίωση της συνοχής και της υφής τους με βάση τα λιπαρά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στα προϊόντα αρτοποιίας, χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση των ρεολογικών χαρακτηριστικών ή ιδιοτήτων, βελτιώνουν την ικανότητα κατακράτησης νερού και της μεταχείρισης της ζύμης, καθώς διευκολύνουν την ανάμειξη των υλικών. επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια στη διασπορά της μαργαρίνης καθώς και κατά τη διαδικασία μαγειρέματος λιπών και ελαίων, για την παρεμπόδιση της δημιουργίας κρυστάλλων σε αρτύματα για σαλάτες, για την παρεμπόδιση της κολλώδους υφής σε καραμέλες, για την τροποποίηση του ιξώδους της σοκολάτας, για την ενίσχυση της στιλπνής όψης (γυαλάδα-λαμπερότητα) σε επιστρώσεις ζαχαροπλαστικής, για τη βελτίωση της διαδικασίας απόψυξης σε χτυπημένες επιστρώσεις ζαχαροπλαστικής, και σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα για κατοικίδια με υψηλό ποσοστό υγρασίας (Garti 1999, Nitschke and Costa 2007, Hasenhuettl και Hartel 2008).

Γενικότερα, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είτε απευθείας ως πρόσθετα τροφίμων για την ενίσχυση της εμφάνισης και της σταθερότητας των τροφίμων ή έμμεσα ως σκευάσματα απορρυπαντικών για τον καθαρισμό επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα

και αποτρέπουν μόλυνση των τροφίμων. Ωστόσο, παρά τις πολλά υποσχόμενες ιδιότητές τους, η εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών ως πρόσθετα σε μεγάλη κλίμακα στη βιομηχανία τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Ένας από τους λόγους είναι οι ελάχιστες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητά τους, δεδομένου ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές που έχουν παραχθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις, προέρχονται κυρίως από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus* τα οποία χαρακτηρίζονται ως δυνητικά παθογόνα (opportunistic pathogens).

Αντιθέτως, υπάρχουν άλλοι μικροοργανισμοί που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές και χαρακτηρίζονται ως GRAS (Generally Recognised As Safe) και χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων (όπως οι ζύμες *Yarrowia lipolytica* ή *Candida utilis*, και τα γαλακτικά βακτήρια), γεγονός το οποίο επιτρέπει την εφαρμογή των μεταβολιτών τους στην παραγωγική διαδικασία τροφίμων, καθώς δεν παρουσιάζουν κινδύνους τοξικότητας ή παθογένειας.

Ακόμα, στις πιθανές εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών συγκαταλέγεται η χρήση τους ως παράγοντες γαλακτωματοποίησης σε προϊόντα τροφίμων, όπως αρτύματα (ντρέσινγκ) σαλάτας, ψωμί, κέικ, μπισκότα και παγωτό. Οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες καθώς και η δυνατότητα παρεμπόδισης της προσκόλλησης των παθογόνων στελεχών, αποτελούν χαρακτηριστικά μείζονος σημασίας, καθιστώντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στο κομμάτι αυτό (Ribeiro, 2020).

Ορισμένοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μικροβιακά επιφανειοδραστικά ως γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα όπως π.χ: ντρέσινγκ μαγιονέζας και σαλάτας για βελτίωση της συνοχής και της υφής. Για παράδειγμα, οι βιοεπιφανειοδραστικές από το στέλεχος *C. utilis*, που χαρακτηρίζεται ως σύμπλοκο υδατάνθρακα-πρωτεΐνης-λιπιδίου χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη καλύτερης σταθερότητας και συνοχής στα αρτύματα σαλάτας όταν αναμιγνύεται με μεταλλική σπάτουλα μετά από ένα μήνα αποθήκευσης. Στην προαναφερθείσα μελέτη, η βιοεπιφανειοδραστική προστέθηκε σε συγκέντρωση 0,7% (w/v) σε συνδυασμό με κόμμι γκουάρ και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (Campos J M, 2019.)

1.5.2. Παγωτό

Δεν υπάρχουν ειδικές αναφορές για τη χρήση βιοεπιφανειοδραστικών σε κατεψυγμένα επιδόρπια. Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης βιοεπιφανειοδραστικών ως γαλακτωματοποιητές στα παγωτά με στόχο τη βελτίωση της υφής και της ποιότητας του προϊόντος. Αυτό η βελτίωση μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των βιοεπιφανειοδραστικών να βελτιώνουν τη συνοχή και να διατηρούν τις φυσικές ιδιότητες καθώς και να διαλυτοποιούν τα αρωματικά έλαια που προστίθενται για να ενισχύσουν τη γεύση. (Anjum F, 2016; Kieliszek M, 2017).

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

Τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν όφελος για την υγεία στον ξενιστή» (FAO/WHO 2002). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί δύνανται να παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις όπως βακτηριοσίνη, βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του άνθρακα, διακετύλιο, αντιμικροβιακές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και υπεροξειδίο του υδρογόνου, που εμποδίζουν την ανάπτυξη πιθανών παθογόνων (Sharma 2016). Διάφορες μελέτες βρήκαν ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι παραγωγοί βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με καλές δυνατότητες ως αντιβιοτικά και σε θεραπευτικά και σε σκευάσματα τροφίμων (Sharma and Saharan 2016; Sharma et al. 2016).

1.7. Υποστρώματα για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, μείζονος σημασίας ανασταλτικός παράγοντας για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε βιομηχανική κλίμακα αποτελεί το υψηλό κόστος παραγωγής. Αυτό σχετίζεται κατά κύριο λόγο με το κόστος του θρεπτικού υποστρώματος (upstream), το κόστος ανάκτησης και καθαρισμού (downstream) αλλά και τις χαμηλές αποδόσεις που παρατηρούνται στις διεργασίες ζύμωσης, παράλληλα με τη χαμηλή παραγωγικότητα. Για το λόγο αυτό, σημαντικό κομμάτι της έρευνας αναφορικά με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών επικεντρώνεται στην αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, ειδικότερα στα πλαίσια της

κυκλικής βιοοικονομίας. Τα απόβλητα ρεύματα, δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως χαμηλού κόστους θρεπτικά υποστρώματα στις διεργασίες βιομετατροπής, ώστε να αντικαταστήσουν τις εμπορικές και υψηλού κόστους πρώτες ύλες.

1.7.1. Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα

Τα απόβλητα αυτά λαμβάνονται με χαμηλό κόστος από τις αντίστοιχες μεταποιητικές βιομηχανίες και είναι τόσο ισχυρά όσο και τα υποστρώματα χαμηλού κόστους για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε βιομηχανικό επίπεδο. Γεωργικά απόβλητα όπως ρυζόνερο και νερό από την επεξεργασία δημητριακών, οσπρίων και μελάσας έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως εξαιρετικά υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.

1.7.2. Φυτικά έλαια και υπολείμματα λαδιών

Το τηγανέλαιο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες τόσο από τη βιομηχανία τροφίμων όσο και από την οικιακή χρήση. Μπορεί να λειτουργήσει ως αποτελεσματική και φθηνή πρώτη ύλη για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Pekin G, 2005). Ομοίως, πολλά φυτικά έλαια όπως το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο (Rahman 2002) έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Απορρίμματα λαδιών από τα διυλιστήρια πετρελαίου και τη βιομηχανία τροφίμων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλα υποστρώματα για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Απόβλητα λάδια που παράγονται από οικιακές χρήσεις, φυτικά έλαια διυλιστήρια ή οι βιομηχανίες σαπουνιού έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι κατάλληλα για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών μέσω μικροβιακής ζύμωσης (Benincasa M, 2002; Bednarski W, 2004; Nitschke M 2003).

1.7.3. Απόβλητα απόβλητα ελαιοτριβείου (OMWE)

Η διαδικασία της παραγωγής του ελαιολάδου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλης ποσότητας υγρών αποβλήτων. Η μεγάλη ποικιλία των συστατικών που βρίσκονται στο OMWE (υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες, σάκχαρα, λιπίδια και φαινολικές ενώσεις) καθιστά δύσκολη την επεξεργασία τους, και η διάθεσή τους γίνεται κρίσιμο περιβαλλοντικό πρόβλημα (Niaounakis M, Halvadakis CP, 2006). Έτσι, η αξιοποίηση αυτών των υλικών είναι σημαντική τόσο από περιβαλλοντική όσο και από οικονομική άποψη και μπορεί να θεωρηθεί όχι μόνο ως απόβλητο προς επεξεργασία αλλά και ως πρώτη ύλη για ανάκτηση άλλως χρήσιμων συστατικών.

1.7.4. Αμυλώδη υποστρώματα

Τα αμυλώδη απόβλητα, όπως για παράδειγμα αυτά που προέρχονται από τη μεταποιητική βιομηχανία πατάτας, αποτελούν φθηνές πρώτες ύλες κατάλληλες για την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών. Οι πατάτες αποτελούνται γενικά από 80% νερό, 17% υδατάνθρακες, 2% πρωτεΐνες, 0,1% λιπαρά και 0,9% βιταμίνες, ανόργανα μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Είναι πλούσια πηγή άνθρακα (με τη μορφή αμύλου και σακχάρων), αζώτου και θείου (από πρωτεΐνη), ανόργανων μετάλλων, ιχνοστοιχείων και βιταμινών. Ο Thompson (Thompson DN, 2000) ανέφερε τη χρήση λυμάτων πατάτας με υψηλή περιεκτικότητα σε στερεά (HS) και χαμηλών στερεών (LS) ως υποστρώματα για την παραγωγή επιρφακτίνης. Απόβλητα επεξεργασίας πατάτας (απόβλητα από βιομηχανίες επεξεργασίας πατάτας) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικού από το στέλεχος *B. subtilis* (Noah KS, 2005).

1.7.5. Μελάσα

Η μελάσα αποτελεί ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης που προέρχεται κατά την παραγωγή ζάχαρης από ζαχαροκάλαμα, ή ζαχαρότευτλα και είναι πλούσια πηγή διαθέσιμου άνθρακα και πηγή αζώτου. Έχει αναφερθεί η χρήση της για την παραγωγή ραμνολιπιδίων με χρήση του βακτηρίου *P. aeruginosa* (στέλεχος GS3). Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών έφτασε στο μέγιστο όταν χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός 7% (v/v) μελάσα και 0,5% (v/v) απόβλητα υγρών από καλαμπόκι. (Deak NA, Johnson LA, 2006.)

1.7.6. Βιομηχανία γάλακτος

Το τυρόγαλο από τις γαλακτοβιομηχανίες είναι επίσης ένα φθινό και βιώσιμο υπόστρωμα για ζύμωση βιοεπιφανειοδραστικών. Περίπου 6 λίτρα ορού γάλακτος παράγονται ανά κιλό τυριού. Ενα μεγάλο μέρος του ορού γάλακτος από τον οργανωμένο γαλακτοκομικό τομέα δεν αξιοποιείται και διατίθεται στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, αν και περιέχει πολύτιμα θρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα και βιταμίνες). Έτσι, τα λύματα από τη γαλακτοκομική βιομηχανία, γνωστά ως λύματα γαλακτοκομικών προϊόντων υποστηρίζουν την καλή μικροβιακή ανάπτυξη και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (Dubey K, Juwarkar A, 2004; Siddhartha GV 2009).

1.8. Πιθανή μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών

Τα συμβατικά αντιμικροβιακά φάρμακα είχαν τη συνεχή πρόκληση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα λόγω της μικροβιακής προσαρμογής στα αντιβιοτικά. Έτσι, οι μικροβιακές επιφανειακές ουσίες με σημαντική αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσαν να είναι οι παράγοντες επιλογής για αποτελεσματικές θεραπευτικές εφαρμογές. Η γαλακτωματοποίηση των ελαίων και του λίπους είναι ζωτικής σημασίας για την αρτοποιία και τα σχετικά παρασκευάσματα. Η προσθήκη υπαρχόντων γαλακτωματοποιητικών λύσεων δεν αντέχει στις απαιτήσεις των καταναλωτών. Έτσι, υπάρχει συνεχής ανάγκη για μη συμβατικά διαλύματα γαλακτωματοποίησης όπως μικροβιακά επιφανειοδραστικά. Στο εγγύς μέλλον, τα μικροβιακά επιφανειοδραστικά θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων, σταθερών γαλακτωμάτων και πηκτικών παραγόντων που μπορούν να βελτιώσουν την υφή των σκευασμάτων αρτοποιίας. Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για μελλοντικές προοπτικές στην επεξεργασία τροφίμων, στα καλλυντικά σκευάσματα και ως ενεργά συστατικά τροφίμων. Περαιτέρω προοπτικές των βιοεπιφανειοδραστικών στο μέλλον εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα, την παραγωγή χαμηλού κόστους και τη σταθερότητά τους σε διάφορα βιομηχανικά παρασκευάσματα. Για την απαίτηση πράσινων λύσεων στα τρόφιμα και τη θεραπεία, η περαιτέρω έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στην παραγωγή χαμηλού κόστους, στην αξιολόγηση της τοξικότητας και στην ενθάρρυνση της χρήσης αυτών των πράσινων επιφανειοδραστικών σε μελλοντικές εξελίξεις. (Sharma D. 2016).

1.9. Το Τυρόγαλα

Τυρόγαλα, είναι «το προϊόν που λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς, και φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης». Κατά την τυροκόμηση του αγελαδινού γάλακτος, το 10-20% των συνολικών συστατικών του μεταφέρεται στο τυρί και το 80-90% στο τυρόγαλα, που είναι το υποπροϊόν. Τα συστατικά αυτά δεν κατανέμονται κατά όμοιο τρόπο μεταξύ τυριού και τυρογάλακτος. Στο πρώτο μεταφέρονται σε μεγάλο ποσοστό οι πρωτεΐνες και το λίπος, ενώ στο δεύτερο το νερό και τα υδατοδιαλυτά συστατικά. Είναι προφανές ότι τα ποσοστά αυτά ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του τυριού που παρασκευάζεται και την τεχνολογία που εφαρμόζεται κατά περίπτωση. Υπολογίζεται ότι 9 kg

τυρογάλακτος, προκύπτουν από την παραγωγή 1 kg τυριού. Το τυρόγαλα περιέχει μεγάλη ποικιλία οργανικών και ανόργανων ουσιών και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε λακτόζη. Σε αυτό μεταφέρεται κατά την τυροκόμηση περίπου το 50% των στερεών συστατικών του αγελαδινού, το 45% του γίδινου και το 40% του πρόβειου γάλακτος.

Από το τυρόγαλο, μεγάλες ποσότητες απορρίπτονται σε λίμνες, ποταμούς και θάλασσες. Η ενέργεια αυτή, πολύ γρήγορα αποδείχθηκε ανεπιτυχής, καθώς η μαζική απόρριψη τυρογάλακτος στους ποταμούς και στις λίμνες δέσμευε σημαντική ποσότητα οξυγόνου τους για την αποσύνθεση της οργανικής του ουσίας, με αποτέλεσμα τα ψάρια να παθαίνουν ασφυξία. Στις συνθήκες αυτές το τυρόγαλα αποτελούσε ουσιαστικά ένα υποπροϊόν άνευ αξίας, ενοχλητικό για τις βιομηχανίες, καθώς απαιτούσε σημαντικό κόστος για την επεξεργασία του, πριν απορριφθεί στο περιβάλλον. Συνεπώς όταν απορρίπτεται στο περιβάλλον, προκαλεί σημαντική ρύπανση. Μάλιστα σε πολλές χώρες απαγορεύεται η απόρριψή του στο αποχετευτικό δίκτυο των πόλεων, εάν δεν έχει προηγηθεί κάποια επεξεργασία μείωσης της οργανικής του ουσίας. Υπολογίζεται ότι, κατά μέσο όρο, ένα τυροκομείο, που επεξεργάζεται 100 τόνους γάλα την ημέρα, παράγει τυρόγαλα που ρυπαίνει όσο τα απόβλητα πόλης 55.000 κατοίκων περίπου, ενώ υπάρχουν και απόψεις που υποστηρίζουν μία αντιστοιχία ρύπανσης ενός λίτρου τυρογάλακτος ανά άτομο. (Εμμανουήλ Μιχ. Ανυφαντάκης).

Το τυρόγαλο συνήθως είτε απορρίπτεται, είτε χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στις ζωοτροφές, ωστόσο είναι σημαντικό να αξιοποιηθεί βιοτεχνολογικά ειδικότερα στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας που δύνανται να επαναχρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων. Η διαχείριση και η αξιοποίηση του τυρογάλακτος βασίζονται κυρίως στην εφαρμογή φυσικοχημικών και βιολογικών μεταχειρίσεων. Οι φυσικοχημικές μπορεί να περιλαμβάνουν την καθίζηση των πρωτεϊνών και τη χρήση μεμβρανών για φιλτράρισμα, ώστε να παραχθεί σκόνη πρωτεΐνης τυρογάλακτος, λακτόζη και ιχνοστοιχεία. Από την άλλη πλευρά, οι βιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβάνουν τη μικροβιακή μετατροπή της λακτόζης σε οργανικά οξέα, αλκοόλες, μεθάνιο, υδρογόνο και βιοπολυμερή (Zotta et al., 2020). Κάποια από τα προαναφερθέντα προϊόντα έχουν ήδη εμπορευματοποιηθεί και καταλαμβάνουν σημαντικό μερίδιο της αγοράς, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη του ορού τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής. Ωστόσο είναι μείζονος σημασίας να αξιοποιηθεί το

τυρόγαλο και στις μικροβιακές διεργασίες για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα βιοπολυμερή και η βακτηριακή κυτταρίνη αλλά και η παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων. Προηγούμενες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη χρήση του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών με στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (Rodrigues et al. 2006; Gudina et al., 2012).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης αφορά στην εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων που αξιολογούν τη δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ένα μεγάλο αριθμό στελεχών γαλακτικών βακτηρίων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα, ένα συνθετικό με βάση τη γλυκόζη και το τυρόγαλο, ως απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων με βάση τη λακτόζη. Αξιολογήθηκε η παραγωγή βιομάζας, η παραγωγή γαλακτικού οξέος και η κατανάλωση σακχάρων αναφορικά με τη μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συσχετίστηκε με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, της μετατόπισης ελαίου και του δείκτη γαλακτωματοποίησης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο για τις εξωκυττάριες επιφανειοδραστικές όσο και για αυτές που δύνανται να παράγονται πάνω στα βακτηριακά κύτταρα.

Παράλληλα, με βάση προηγούμενη μελέτη επιλογής γαλακτικών βακτηρίων για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, επιλέχθηκε ένα από τα πιο υποσχόμενα στελέχη και εφαρμόστηκαν οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές σε τρόφιμα (και ειδικότερα στην παραγωγή ξινογάλακτος).

Όσον αφορά στην καινοτομία της παρούσας μελέτης, καταρχήν περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές (πέραν των γαλακτοκομικών προϊόντων) και αξιολογείται η δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών. Παράλληλα, ακολουθώντας προηγούμενη μελέτη, περιλαμβάνει την εφαρμογή αυτών των βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών σε τρόφιμα, και ειδικότερα σε γαλακτοκομικό προϊόν, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα να επανεισαχθούν αυτά τα συστατικά στην ίδια βιομηχανία στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πίνακας 1: Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Κωδικός στελέχους	Είδος
SK	<i>Pediococcus acidilactici</i>
SK1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
SK2	<i>Pediococcus acidilactici</i>
SK3	<i>Levilactobacillus brevis</i>
SK4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
SK5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLL1-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OLL1-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLL2-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OLL2-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLL3-1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLL3-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLS1-1	<i>Levilactobacillus brevis</i>
OLS2-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OLS2-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
OLS3-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>
F1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
F3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
F5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
F8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
PE6	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
PE11	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
MEB-3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
MEB-21	<i>Pediococcus acidilactici</i>
ME3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
ME4	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
OLX1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXAL-2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>

3.1. Βιολογικό υλικό

Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που επιλέχθηκαν προς μελέτη της ικανότητάς τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες ανήκουν στη συλλογή γαλακτικών βακτηρίων του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Η φύλαξη των στελεχών γίνεται σε φιαλίδια ειδικού τύπου (cryovials), όγκου 2 mL στους -80°C σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (DifcoTM, USA), εμπλουτισμένο με 25% γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121°C , 20 λεπτά). Πριν τη χρήση τους πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας των καλλιιεργειών με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς και ακολουθούσε εμβολιασμός των προκαλλιιεργειών υπό ασηπτικές συνθήκες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 mL αποστειρωμένου MRS. Η επώαση των προκαλλιιεργειών έγινε σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 12 ώρες.

3.2. Θρεπτικό υπόστρωμα

Για τη διεξαγωγή της ζύμωσης απαραίτητη είναι η προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος. Σε πρώτο στάδιο οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε συνθετικό υπόστρωμα με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (θρεπτικό M2), η σύσταση του οποίου αναγράφεται στον Πίνακα 2. Στη συνέχεια, τα ίδια στελέχη αξιολογήθηκαν σε ζυμώσεις με τη χρήση αποπροτεϊνωμένου τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα. Ο σκοπός αυτών των πειραμάτων έγκειται στην αξιοποίηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως πηγή άνθρακα. Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης είναι ευγενική χορηγία του Τυροκομείου Γαλιατσάτος στην Κεφαλονιά και προέρχεται μετά και την παραγωγή μυζήθρας. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το τυρόγαλα θερμαίνεται στους $55-60^{\circ}\text{C}$ και ρυθμίζεται η τιμή $\text{pH}=10$ με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH 5M) για 3 λεπτά. Ακολουθεί ρύθμιση του $\text{pH}=3,5$ για 5 λεπτά με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl 5 M). Με το πέρας των 5 λεπτών, προστίθεται ποσότητα NaOH 5M ώστε η τελική τιμή pH του τυρογάλακτος να είναι 4,7 όπου είναι και το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Τέλος, διάλυμα ZnSO_4 προστίθεται στο τυρόγαλα στην απαιτούμενη ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωση Zn σε αυτό να είναι να είναι 10 mM. Ακολούθησε θέρμανση στους 121°C , 20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση ($4,200\text{ g}/20\text{ λεπτά}/4^{\circ}\text{C}$, Rotina 420R, Hettich Zentrifugen)

και διήθηση υπό κενό ώστε να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και η διαύγαση του τυρογάλακτος. Πριν την πλήρωση των κωνικών φιαλών το τυρόγαλα υπέστη την κατάλληλη αραίωση μέχρι αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~20 g/L. Μετά την προετοιμασία των υποστρωμάτων και στις δύο περιπτώσεις, ακολούθησε πλήρωση των κωνικών φιαλών στις οποίες διεξήχθησαν οι ζυμώσεις (95 mL) υποστρώματος, ρύθμιση της τιμής του pH και αποστείρωσή τους στους 121°C, 20.λεπτά



Εικόνα 2: Τυρόγαλα μετά την καθίζηση και πριν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών



Εικόνα 3: Προετοιμασία υποστρωμάτων για αποστείρωση

Πίνακας 2: Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2)

M2	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	20

Εκχύλισμα ζύμης	8
Θεικό αμμώνιο	5
Επταένυδρο φωσφορικό κάλιο	1
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο	0,3
Όξινο ανθρακικό νάτριο	5

3.3. Ζύμωση για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων

Μετά την επώαση των προκαλλιιεργειών, που αποτέλεσαν το 5% του όγκου της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του υποστρώματος σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Ακολούθησε επώαση των καλλιιεργειών για 24 και 72 ώρες για κάθε στέλεχος. Η θερμοκρασία της ζύμωσης παρέμενε σταθερή στους 37°C κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ενώ η τιμή του pH ρυθμιζόταν όποτε ήταν απαραίτητο ώστε να παραμένει στο 6,7. Με την ολοκλήρωση της ζύμωσης, λήφθηκαν τα απαραίτητα δείγματα για τον προσδιορισμό του ολικού ξηρού βάρους (total dry weight), της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Εν συνεχεία, τα κύτταρα διαχωρίστηκαν από το υγρό της ζύμωσης μέσω φυγοκέντρησης. Τα κύτταρα αξιοποιήθηκαν για τον έλεγχο παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που βρίσκονται συνδεδεμένες σε αυτά ενώ στο υγρό της ζύμωσης εξετάστηκε η παρουσία μη συνδεδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης, όπως παρουσιάζεται σε επόμενη ενότητα. Επιπρόσθετα, για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, μετρήθηκε η μετατόπιση ελαίου και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης.

3.4. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών

Με την ολοκλήρωση των ζυμώσεων στις κωνικές φιάλες, το υγρό της ζύμωσης διαχωρίστηκε από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (6450 g, 15 min, Rotina 420R, Hettich, Germany). Ακολούθησε καθαρισμός (ξέπλυμα) των κυττάρων με προσθήκη H₂O, το οποίο αναδεύτηκε με τα κύτταρα και στη συνέχεια διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δεύτερη φορά και στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH 7,0. Η αναλογία όγκου δείγματος: όγκου PBS ήταν (6:1 v/v). Η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών έγινε στους 4°C για 12 ώρες υπό ανάδευση. Τέλος,

πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα, ενώ το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με φιλτράρισμα (0,22 μm pore-size filter, Millipore) μέσω μεμβρανών διαπίδυσης (Cellu-Sep® molecular weight cut-off 6-8 kDa). Μετά τον καθαρισμό ακολουθεί μέτρηση της επιφανειακής τάσης, του δείκτη γαλακτωματοποίησης και της μετατόπισης ελαίου.



Εικόνα 4: Μεμβράνες διαπίδυσης

3.5. Αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1. Προσδιορισμός βιομάζας

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το ολικό ξηρό βάρος ώστε να αξιολογηθεί η μικροβιακή ανάπτυξη. Σε κάθε περίπτωση, 2 mL δείγματος λαμβάνονται από το δείγμα και τοποθετούνται σε προζυγισμένα φιαλίδια των 2 mL (τύπου erppendorf). Τα δείγματα υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση (Nuve NF 048) για 10 λεπτά στις 5200 στροφές και τα κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του θρεπτικού υποστρώματος. Ακολουθεί απόρριψη του διαχωρισμένου νερού και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο στους 65°C μέχρι απόκτησης σταθερού βάρους. Εν συνεχεία, ζυγίζονται ξανά τα φιαλίδια, όταν φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπολογίζεται η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους η οποία βασίζεται στη διαφορά βάρους και εκφράζεται σε γραμμάρια ανά λίτρο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για το κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιστοιχούν στο μέσο όρο κάθε μέτρησης.

3.5.2. Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος

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

3.6. Αναλύσεις διαλογής στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν

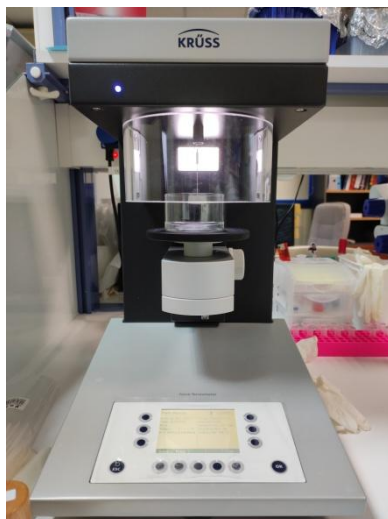
βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Η δυνατότητα των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις, να παράγουν συνδεδεμένες ή μη συνδεδεμένες με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εξακριβώθηκε μέσω των παρακάτω αναλύσεων. Οι αναλύσεις έλαβαν χώρα τόσο στο υπερκείμενο της ζύμωσης όσο και στα εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

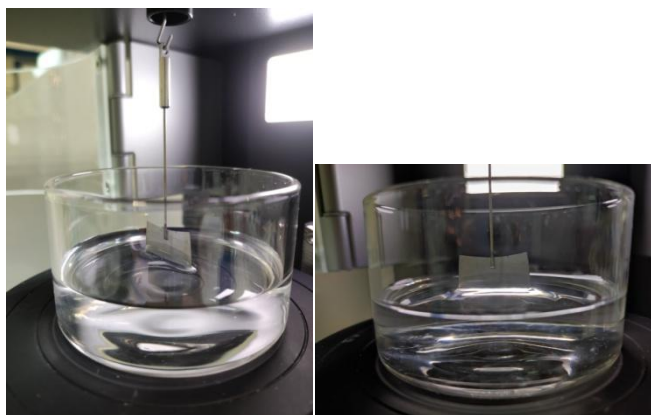
3.6.1. Μέτρηση επιφανειακής τάσης

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

χρησιμοποιήθηκε τενσιόμετρο (K20 Krüss tensiometer, KRÜSS GmbH, Germany), απαιτούνται 20 mL δείγματος σε θερμοκρασίας περιβάλλοντος (25°C). Πριν την κάθε μέτρηση το πλακίδιο καθαρίζεται με οργανικούς διαλύτες οι οποίοι εξατμίζονται με πέρασμα του πλακιδίου από φλόγα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (n=2) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 5: Τενσιόμετρο για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης



Εικόνα 6: Χρήση του Wilhelmy plate

3.6.2. Δοκιμή γαλακτωματοποίησης

Ο προσδιορισμός του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}) αποτελεί μια γνωστή μέθοδο για την εξακρίβωση της ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες. Κατά την πειραματική διαδικασία αξιολογήθηκαν τα υπερκείμενα μετά από φυγοκέντρηση καθώς και το εκχύλισμα με τις ακατέργαστες βιοεπιφανειοδραστικές μετά από εκχύλιση με PBS. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε 1 mL από το εκάστοτε δείγμα και 1 παραφινέλαιο και ακολούθησε

έντονη ανάδευση με vortex στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Τα δείγματα εξετάστηκαν μετά από 24 h και καταγράφηκε το ύψος του γαλακτώματος καθώς και το ολικό ύψος του μίγματος. Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης προσδιορίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

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

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



Εικόνα 7: Γαλάκτωμα σε υπερκείμενο

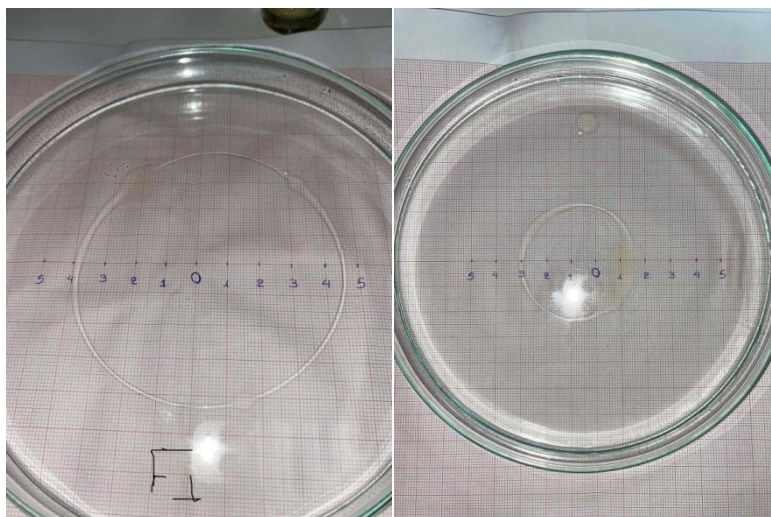


Εικόνα 8: Γαλάκτωμα σε PBS

3.6.3. Δοκιμή μετατόπισης ελαίου

Σε γυάλινα τρίβλια τοποθετούνται 50 mL dH₂O και 50 μL λάδι τύπου 20W-50. Στη συνέχεια 20 μL από το εκάστοτε δείγμα τοποθετούνται στο κέντρο της

κηλίδας που έχει σχηματιστεί από το λάδι με σκοπό τον έλεγχο σχηματισμού δακτυλίου και κατά συνέπεια της μετατόπισης του ελαίου. Ακολουθεί μέτρηση και καταγραφή της διαμέτρου του δακτυλίου που προκύπτει λόγω της παρουσίας βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο δείγμα.



Εικόνα 9: Απεικόνιση μετατόπισης ελαίου

3.7. Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων παραγωγών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Για την παρασκευή του ξινογάλακτος χρησιμοποιήθηκαν στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία είχε εξακριβωθεί σε προηγούμενα πειράματα (Kachrimanidou et al., 2021) η ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Αρχικά παρασκευάστηκαν προκαλλιέργειες με θρεπτικό μέσο MRS με τις οποίες εμβολιάστηκαν τα διάφορα είδη γάλακτος και αποτέλεσαν εναρκτήριες καλλιέργειες για τη γαλακτική ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια. Η προετοιμασία των προκαλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50 mL με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.1 σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

3.7.1. Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος

Μετά την επώαση των προκαλλιεργειών, έγινε παραλαβή των κυττάρων μέσω φυγοκέντρησης, ξέπλυμα αυτών υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση παστεριωμένου γάλακτος και επαναδιάλυσή τους σε συγκεκριμένο όγκο γάλακτος προκειμένου να διασφαλίζεται επαρκής αριθμός κυττάρων για την έναρξη της ζύμωσης του γάλακτος. Στη συνέχεια 20 mL καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε 180 mL γάλακτος σε γυάλινους

περιέκτες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37°C. Το pH του παραγόμενου προϊόντος ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι αυτό να φτάσει σε τιμή pH<4,5. Σε αυτό το στάδιο, ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ζύμωσης του ξινογάλακτος και ακολούθησε η αποθήκευσή τους στους 4°C για 15 ημέρες. Εκτός από το ξινόγαλα που παρασκευάστηκε με χρήση στελεχών γαλακτικών βακτηριών, παρασκευάστηκε και ξινόγαλα στο οποίο προστέθηκε επιπλέον ποσότητα ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ποσότητα ώστε να αντιστοιχεί στην κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων. Στην πρώτη περίπτωση οι ακατέργαστες βιοεπιφανειοδραστικές γλυκολιποπρωτεϊνικής σύστασης, προήλθαν από ζύμωση γαλακτικών βακτηριών σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος (LAB). Στη δεύτερη περίπτωση, οι βιοεπιφανειοδραστικές προήλθαν από τη ζύμωση του στελέχους *Pseudozyma antarctica* και είχαν σύσταση λιπιδίων συνδεδεμένες με μανόζη και ερυθριτόλη (mannosylerythritol lipids, MEL) (Faria et al., 2014).

3.7.2. Αναλύσεις ξινογάλακτος:

Για τον έλεγχο της επίδρασης των στελεχών/ παραγωγών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στην παραγωγή του ξινογάλακτος, ελέγχθηκε η διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού, το ποσοστό συναίρεσης και η ογκομετρούμενη οξύτητα. Τα δείγματα λαμβάνονταν ανά 5 ημέρες και η συνολική διάρκεια κάθε πειράματος διήρκεσε 15 ημέρες.

Καταμέτρηση αποικιών

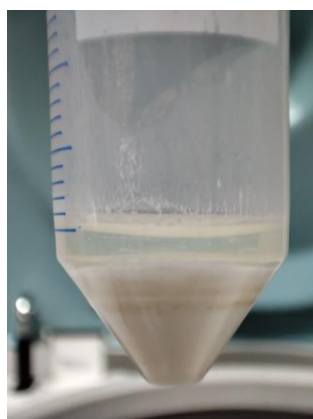
Για την καταμέτρηση αποικιών 100 μ L δείγματος τοποθετούνται σε 900 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Ringer $\frac{1}{4}$ ώστε να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες αραιώσεις. Στη συνέχεια μετά την ομογενοποίησή του με ανάδευση ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την επίτευξη της κατάλληλης συγκέντρωσης για την καταμέτρηση αποικιών. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν και στη συνέχεια πραγματοποιείται εμβολιασμός με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης σύμφωνα με την οποία 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετείται σε αποστειρωμένο τριβλίο και στη συνέχεια προστίθενται 20 mL θρεπτικού υποστρώματος MRS Agar. Τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 37 °C και με το πέρας των 48 ωρών μετρούνται οι σχηματιζόμενες αποικίες.



Εικόνα 10: Τριβλίο με ανεπτυγμένες αποικίες

Ποσοστό Συναίρεσης

Η συναίρεση αποτελεί μια μέτρηση που σχετίζεται με τη συνεκτικότητα του γιαουρτιού ή του ξινογάλακτος στη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς αφορά στο διαχωρισμό του ορού τυρογάλακτος στο τελικό προϊόν. Για τον προσδιορισμό του ποσοστού συναίρεσης, 5g ξινογάλακτος τοποθετούνται σε προζυγισμένο περιέκτη (falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C, 2000 rpm για 10 min. Το νερό που δεν συγκρατήθηκε απορρίφθηκε και το δείγμα ζυγίστηκε εκ νέου προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό συναίρεσης του. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο των μετρήσεων.



Εικόνα 11: Falcon που απεικονίζεται η συναίρεση του γάλακτος

Ογκομετρούμενη οξύτητα

Για την μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας, 5g γάλακτος ζυγίζονται σε κωνική φιάλη των 250 mL και στην συνέχεια προστίθενται 10 mL dH₂O και 3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Ακολουθεί ογκομέτρηση (τιτλοδότηση) με NaOH 0,1 M μέχρι αλλαγής χρώματος στο τελικό σημείο (ροζ). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται

εις διπλούν και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο και εκφράζονται ως προς γαλακτικό οξύ που είναι και το κυρίαρχο οξύ στο τελικό προϊόν.



Εικόνα 12: Μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Αξιολόγηση συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Για τον έλεγχο της πορείας της ζύμωσης προσδιορίστηκε η κατανάλωση γλυκόζης και η παραγωγή βιομάζας. Ως ένδειξη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έγινε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης και η μετατόπιση ελαίου. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης, πραγματοποιήθηκε τόσο στα υπερκείμενα της ζύμωσης για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών όσο και στα εκχυλίσματα του PBS για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο το M2 και το τυρόγαλα και δείγματα λαμβάνονταν ανά 24 και 72 ώρες. Η τιμή pH ρυθμιζόταν μετά από μέτρηση και μέσω της προσθήκης αποστειρωμένης βάσης ή οξέος.

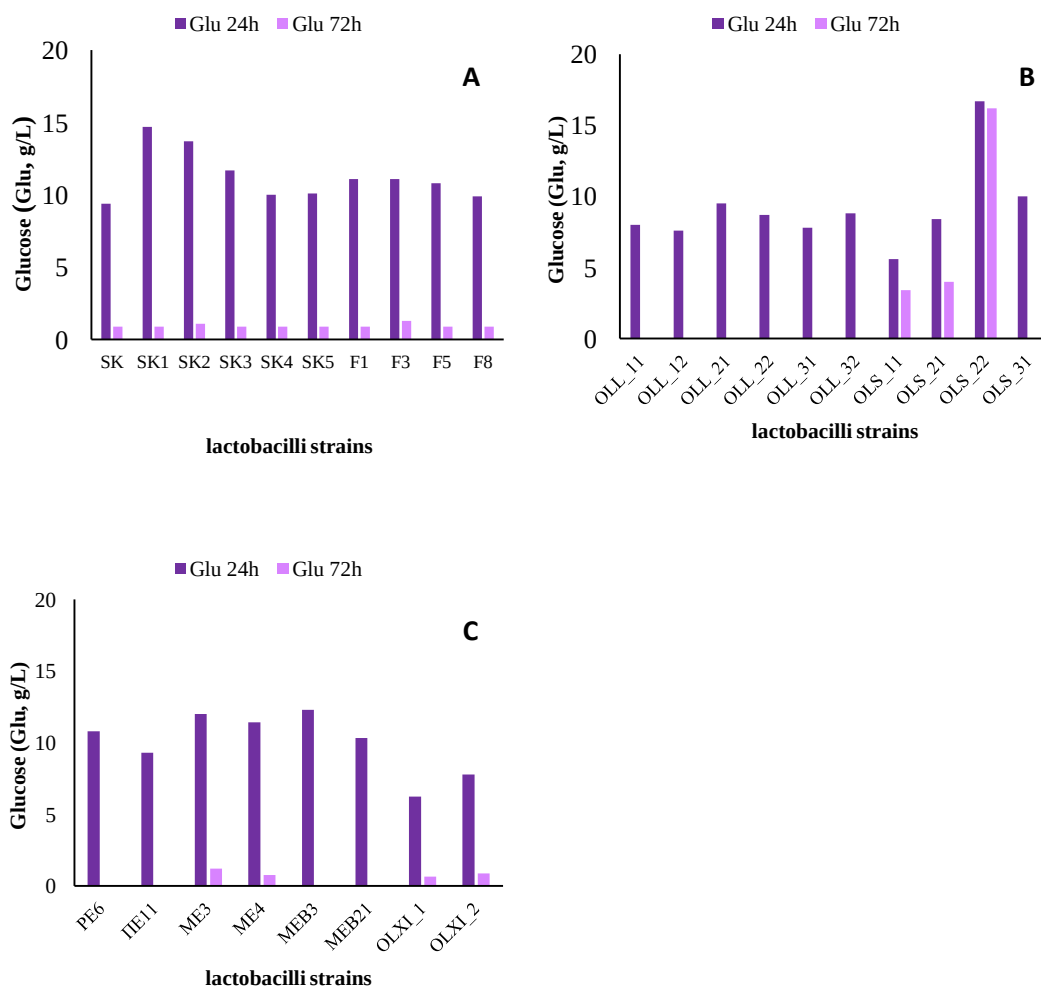
4.1.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Όπως αναφέρθηκε, αρχικά μελετήθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη και η πιθανή παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών χρησιμοποιώντας συνθετικό θρεπτικό μέσο (M2) με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L. Το Γράφημα 1 περιγράφει τη συγκέντρωση γλυκόζης στο υπερκείμενο μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης, όπως μετρήθηκε με την HPLC. Όσον αφορά στις 24 ώρες ζύμωσης, η μεγαλύτερη κατανάλωση παρατηρήθηκε στο στέλεχος OLS 1.1 (ήτοι 14,4 g/L), το οποίο ωστόσο φαίνεται να μειώνει το ρυθμό κατανάλωσης στη συνέχεια δεδομένου ότι έμεινε ακατανάλωτη συγκέντρωση γλυκόζης στις 72 ώρες (3,4 g/L). Γενικότερα, εύκολα παρατηρείται ότι μέχρι τις 24 ώρες, η πλειονότητα των στελεχών έχει καταναλώσει περί τα 10 g/L γλυκόζης, με εξαίρεση ορισμένα στελέχη.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το Γράφημα 1 φαίνεται ότι τα περισσότερα στελέχη έχουν καταναλώσει σχεδόν πλήρως τη γλυκόζη μέχρι τις 72 ώρες. Εξαίρεση αποτέλεσε το στέλεχος OLS 2.2 το οποίο δεν καταναλώσε γλυκόζη, πιθανώς λόγω παρεμπόδισης στη μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και τα στελέχη OLS 1.1 και 2.1 τα οποία άφησαν υπολειπόμενη γλυκόζη. Αυτό, συνάδει και με τα αποτελέσματα της

βιομάζας (Γράφημα 2), όπου εύκολα φαίνεται η χαμηλή παραγωγή βιομάζας στο OLS 2.2 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Όπως προαναφέρθηκε, το στέλεχος με την ελάχιστη κατανάλωση είναι το OLS 2.2 με κατανάλωση γλυκόζης 3,8 g/L μετά από 72 ώρες ζύμωσης. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι στελέχη που παρουσίασαν μικρή κατανάλωση στις 24 ώρες, όπως το SK1 και SK2, εν συνεχεία αύξησαν το ρυθμό κατανάλωσης μέχρι τις 72 ώρες. Στελέχη που κατανάλωσαν πλήρως την γλυκόζη μέχρι τις 72 ώρες είναι τα OLL1.1, OLL1.2, OLL2.1, OLL2.2, OLL3.1, OLL3.1, OLS3.1, PE6, ΠΕ11, ΜΕΒ3 και ΜΕΒ21.



Γράφημα 1: Συγκέντρωση γλυκόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2

4.1.2. Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Το Γράφημα 2 (A, B και C) παρουσιάζει την παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2. Η παραγόμενη βιομάζα στην πλειοψηφία των στελεχών ήταν σύμφωνα και με το μέσο όρο της βιβλιογραφίας.

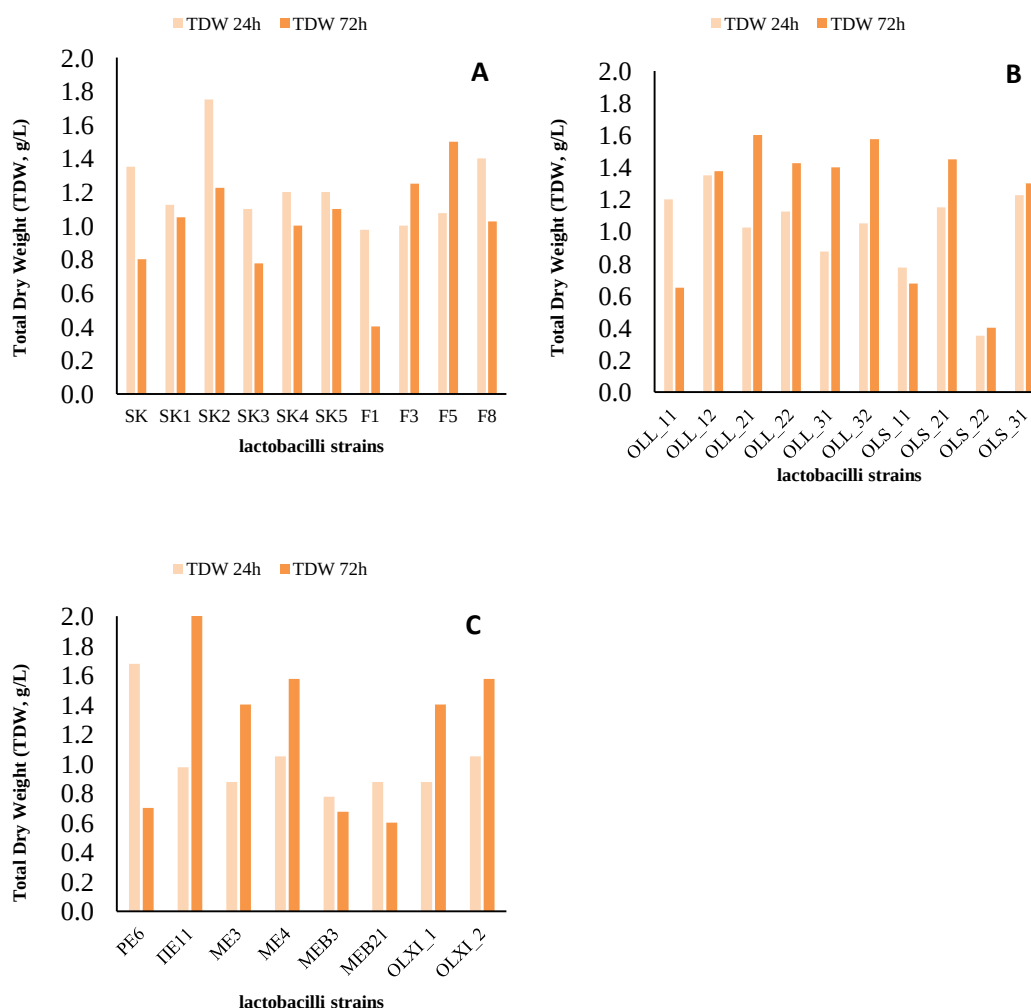
Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας σε πολλές περιπτώσεις σχετίζεται με την υψηλότερη κατανάλωση γλυκόζης. Από τα Γραφήματα 1 και 2 φαίνεται ότι όπου υπάρχει αύξηση της βιομάζας, συνήθως υπάρχει και ανάλογη αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης. Στο στέλεχος OLS2.2 φαίνεται έντονα η ιδιαίτερα χαμηλή κατανάλωση της γλυκόζης όπου έχει καταναλώσει 3,8 gr/L γλυκόζη με το αντίστοιχα χαμηλό ολικό ξηρό βάρος του (0,35-0,40 gr/L) τόσο στην μέτρηση των 24 όσο και στην μέτρηση των 72 ωρών.

Επίσης παρατηρείται ότι αναφορικά με το ολικό ξηρό βάρος, 50% των στελεχών (14 από το σύνολο των 28), η παραγωγή είναι μεγαλύτερη στις 72 ώρες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όπου η παραγωγή βιομάζας είναι υψηλότερη στις 24 ώρες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν έντονη μικροβιακή ανάπτυξη κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, ενώ παράλληλα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην έλλειψη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών που ενδέχεται να παρεμποδίσουν ή και να μειώσουν το ρυθμό της μικροβιακής αύξησης (Gudina et al., 2011; Klotz et al., 2017).

Την χαμηλότερη παραγωγή ολικού ξηρού βάρους τόσο στις 24 αλλά όσο και στις 72 ώρες παρουσιάζεται στο στέλεχος OLS2.2 (0,35-0,40 g/L), το οποίο δεν κατανάλωσε και τη γλυκόζη (Γράφημα 1 B). Αντίστοιχα, τη μεγαλύτερη παραγωγή συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη έχει το ΠΕ11 το οποίο είχε τελικό βάρος 2,45 g/L στις 72 ώρες, το οποίο είχε καταναλώσει πλήρως και τη γλυκόζη.

Ωστόσο, έχει προηγουμένως δειχθεί ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας δεν συνεπάγεται τη βέλτιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, παρά το γεγονός ότι η σύνθεση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι συνδεδεμένη με την κυτταρική αύξηση, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Kachrimanidou et al., 2021). Ειδικότερα για τα γαλακτικά βακτήρια, οι βιοεπιφανειοδραστικές δύνανται στη στατική είτε στην

εκθετική φάση (Velraeds et al., 1996; Gudiña et al., 2011; Kachrimanidou et al., 2021).



Γράφημα 2: Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2

4.1.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης

Επόμενο στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το συνθετικό μέσο M2. Οι βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά μετρήθηκαν στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση. Αντίστοιχα, μετρήθηκε και το εκχύλισμα

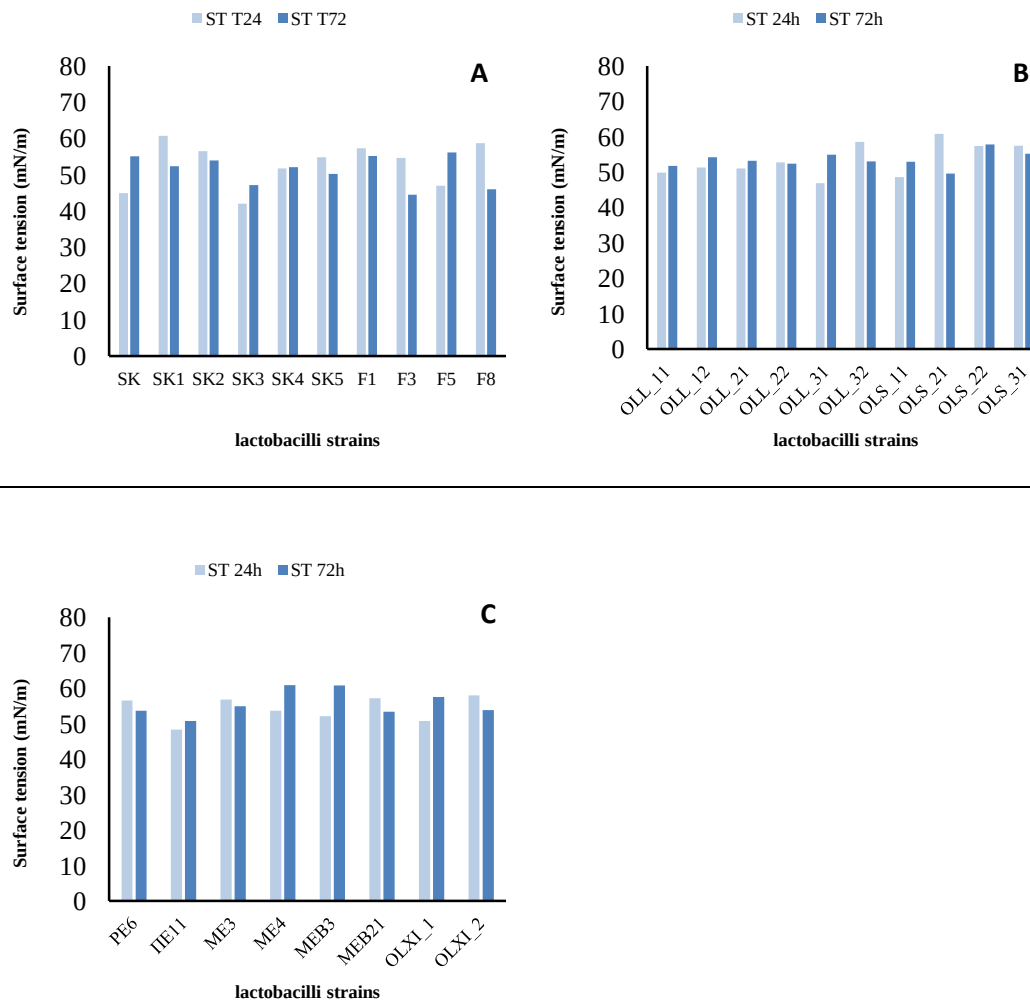
από PBS για τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται επάνω στα βακτηριακά κύτταρα.

Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό ζύμωσης

Το Γράφημα 3 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επίσης, στο Γράφημα 3 είναι φανερό ότι αναφορικά με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης που πραγματοποιείται, το 50% των στελεχών (14 από το σύνολο των 28) παρουσιάζουν χαμηλότερη μέτρηση επιφανειακής τάσης στις 24 ώρες.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι τα στελέχη SK, SK3 και F5 είχαν την χαμηλότερη τιμή επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης (44,9 , 42, 47 mN/m αντίστοιχα) όπως φαίνεται και από το Γράφημα 3 Α. Όσον αφορά στα στελέχη με τη χαμηλότερη τιμή μετά από 72 ώρες, παρατηρείται για τα SK3 και F3 με 47.1 και 44.5 mN/m αντίστοιχα.

Συνολικά, τη μικρότερη μέτρηση επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρουσίασε το στέλεχος SK3 (42 mN/m), ενώ μετά από 72 το στέλεχος F3 (44,5 mN/m). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση επιφανειακής τάσης και στο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα M2 το οποίο έχει επιφανειακή τάση 65,3 mN/m για να υπάρχει ως μέτρο σύγκρισης. Το στέλεχος που παρουσίασε την καλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης σαν σύνολο φαίνεται να είναι το στέλεχος SK3 με μέτρηση 42-47,1 mN/m.



Γράφημα 3: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

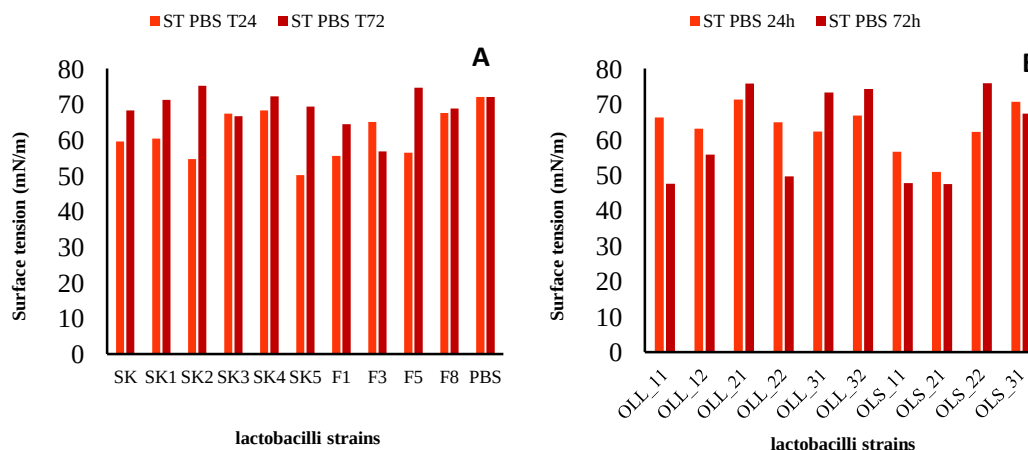
Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

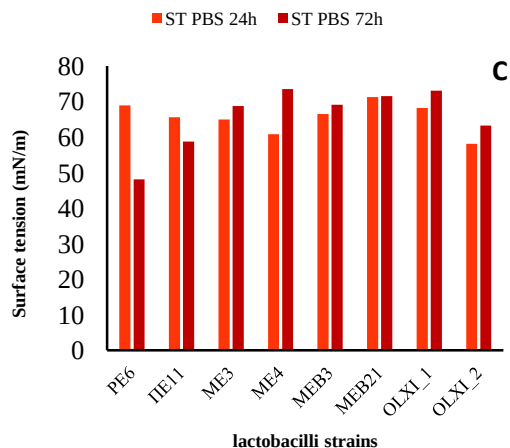
Το Γράφημα 4 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επιπρόσθετα, το Γράφημα 4 Α περιέχει και τη μέτρηση για το PBS για σύγκριση. Παρατηρείται ότι τα στελέχη SK2, SK5 και F1 παρουσίασαν τη χαμηλότερη τιμή για την επιφανειακή τάση μετά από 24 ώρες, ήτοι 54,6 , 50,1 και 55,5 mN/m αντίστοιχα (Γράφημα 4 Α). Όσον αφορά στο Γράφημα 4 Β, οι χαμηλότερες τιμές παρουσιάζονται στα στελέχη OLL 1.1 (47,5 mN/m), OLL 2.2 (49,6 mN/m) και OLS 1.1 (47,7 mN/m), OLS 2.1 (47,4 mN/m) μετά

από 72 ώρες ζύμωσης. Στο Γράφημα 4 C, η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στο στέλεχος PE6 (48,1 mN/m) μετά από 72 ώρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα στέλεχος χαρακτηρίζεται ως παραγωγός βιοεπιφανειοδραστικών όταν επιφέρει μείωση της επιφανειακής τάσης >8 mN/m (Rodrigues et al., 2006). Η μείωση της επιφανειακής τάσης υπολογίστηκε αφαιρώντας την εκάστοτε μέτρηση από την τιμή του PBS. Στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, η μείωση της επιφανειακής τάσης ήταν στο εύρος 16,5-24,6 mN/m.

Αξιοσημείωτη επίσης, φαίνεται να είναι η μέτρηση της επιφανειακής τάσης που παρατηρείται στα στελέχη OLS1.1 και OLS2.1 (47,4-50,8 mN/m) στις 24 αλλά και στις 72 ώρες. Ωστόσο για ορισμένα στελέχη η μείωση της επιφανειακής τάσης είναι από ασήμαντη έως μηδενική. Σε αυτή την κατηγορία στελεχών ανήκουν τα: SK3, SK4, F8, OLL2.1, OLL3.2, OLS3.1 και MEB21, τα οποία φαίνεται να έχουν υψηλή επιφανειακή τάση και στις 24 αλλά και στις 72 ώρες. Παρά το γεγονός αυτό, τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν και με λακτόζη ως θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς η πηγή άνθρακα δύναται να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Kachrimanidou et al., 2021).

Γενικότερα φαίνεται να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της χαμηλής βιομάζας και της χαμηλής μείωσης της επιφανειακής τάσης σε κάποια από τα στελέχη. Από το Γράφημα 1, 2 και 4 παρατηρείται ότι το στέλεχος PE6 στις 72 ώρες ζύμωσης έχει καταναλώσει πλήρως την γλυκόζη, έχει χαμηλή παραγωγή βιομάζας ενώ παράλληλα μειώνει σημαντικά την επιφανειακή τάση, δηλαδή πάνω από 20 mN/m.





Γράφημα 4: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

4.1.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Αξιολόγηση μετατόπισης ελαίου στα υπερκείμενα υγρά ζύμωσης

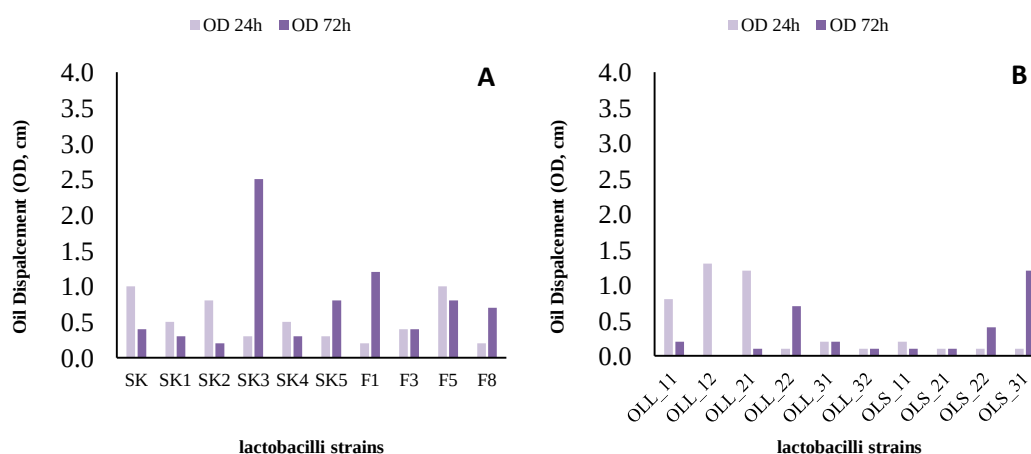
Το Γράφημα 5 παρουσιάζει τη μετατόπιση ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα (Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό) στη μέτρηση της επιφανειακής τάσης των υπερκείμενων υγρών, το 50% των στελεχών εμφάνισε χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά από 24 ώρες ζύμωσης, έτσι και στη μετατόπιση ελαίου παρατηρήθηκε ότι το 50% των στελεχών εμφάνισε μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου μετά από 24 ώρες ζύμωσης. Επιπρόσθετα, υπήρξαν κάποια στελέχη που παρουσίασαν την ίδια μετατόπιση ελαίου μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Αυτά τα στελέχη είναι τα F3, OLL 3.1, OLL 3.2, OLS 2.1, ME3, ME4, OLXI_1 και OLXI_2.

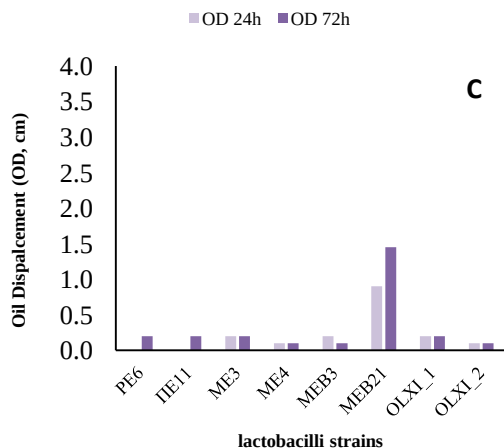
Η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη στη ζύμωση των 24 ωρών, σύμφωνα με το Γράφημα 5, παρατηρείται στο OLL 1.2 (1,3 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο SK3 (2,5 cm) με έντονη διαφορά από τα υπόλοιπα. Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών συμβαίνει στα OLL 2.2, OLL 3.2, OLS 2.1, OLS 2.2, OLS 3.1, ME4 και OLXI_2 (0,1 cm), ενώ για τις 72 στα OLL 2.1,

OLL 3.2, OLS 1.1, OLS 2.1, ME4, MEB3 και OLXI_2 (0,1 cm). Τα στελέχη που παρουσίασαν μηδενική μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών είναι τα PE6 και ΠΕ11, ενώ για τις 72 ώρες είναι το OLL 1.2.

Όσον αφορά στο στέλεχος SK3, στις 72 ώρες ζύμωσης όπου καταγράφεται μετατόπιση ελαίου 2,5 cm στο Γράφημα 5 και σε συνδυασμό με το Γράφημα 3, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου παρατηρείται στο ίδιο στέλεχος που παρατηρείται και μια από της χαμηλότερες επιφανειακές τάσεις, καθώς το στέλεχος SK3 στις 72 ώρες ζύμωσης σημειώνει επιφανειακή τάση 47,1 mN/m. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα στελέχη SK, F5, OLL 1.2, OLL 2.1 μετά από 24 ώρες και F8, OLS3.1 μετά από 72 ώρες, τα οποία δημιούργησαν μετατόπιση ελαίου από 0.7-1.3 cm και είχαν επιφανειακή τάση από 44.9-55.2 mN/m.

Ακόμη, άξιο προσοχής είναι και το στέλεχος MEB21, το οποίο παρουσίασε συνδυασμό υψηλής μετατόπισης ελαίου με χαμηλή μέτρηση επιφανειακής τάσης και μετά τη ζύμωση των 24 αλλά και των 72 ωρών, με μετατόπιση 0,9 και 1,45 cm και επιφανειακή τάση 57 και 53,3 mN/m αντίστοιχα.





Γράφημα 5: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Αξιολόγηση της μετατόπισης ελαίου στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

Η μέτρηση της μετατόπισης ελαίου αποτελεί μια ακόμα συνήθη μέθοδο που εφαρμόζεται για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Το Γράφημα 5 παρουσιάζει τη μετατόπιση από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

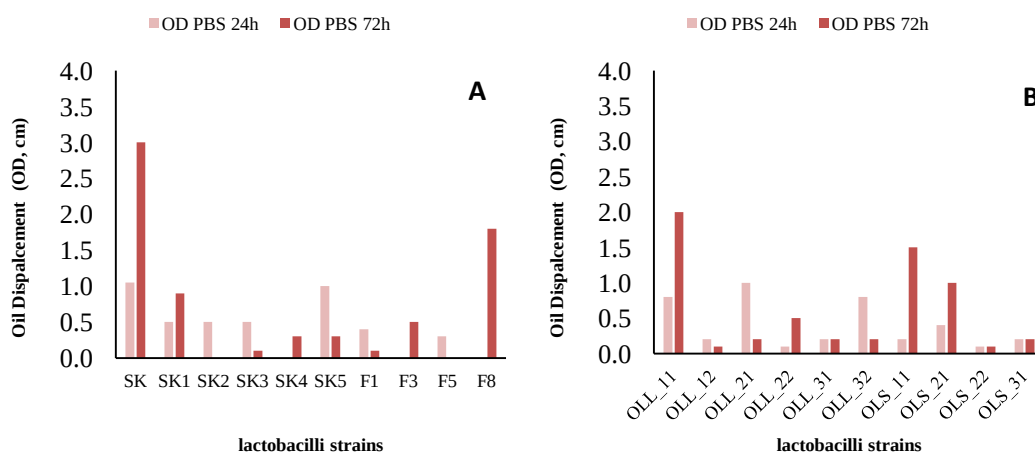
Με βάση το Γράφημα 6, η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρατηρείται στο SK, SK5, OLL 2.1 (1-1,2 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο SK (3 cm) . Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τις 24 ώρες συμβαίνει στο OLL 2.2 (0,1 cm) και στο OLS 2.2 (0,1 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο SK3 , F1, OLL 1.2, OLS 2.2 και στο ME4 (0,1 cm). Υπάρχουν επίσης και κάποια στελέχη που δεν παρουσίασαν την παραμικρή μετατόπιση, όπως για παράδειγμα τα στελέχη SK4, F3 και F8 μετά από ζύμωση 24 ωρών, ενώ μετά από ζύμωση 72 ωρών είναι τα SK2 και F5. Γενικότερα την μεγαλύτερη συνολικά μετατόπιση σαν στέλεχος παρουσίασε το SK (1,05-3 cm), ενώ την μικρότερη το OLS 2.2 (0,1).

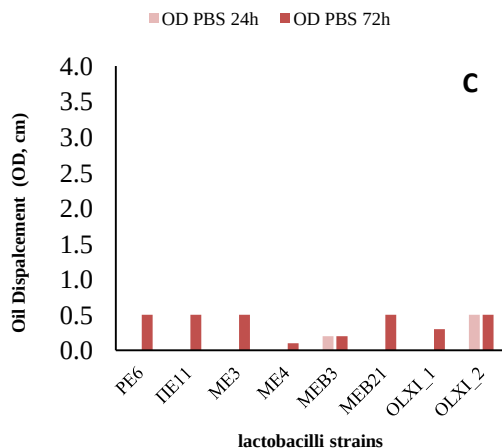
Παρατηρείται ότι σε πολλές περιπτώσεις η μετατόπιση της σταγόνας λαδιού και η δημιουργία μιας καθαρής ζώνης σχετίζεται εν μέρη με την παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Συγκρίνοντας το Γράφημα 6 με το Γράφημα 4 παρατηρείται ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα στελέχη που εμφάνισαν

υψηλή μετατόπιση ελαίου κατέγραψαν και χαμηλή επιφανειακή τάση. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη όπως το OLL 1.1 και το OLS 1.1 μετά από 72 ώρες ζύμωσης σημείωσαν 2 και 1,5 cm μετατόπιση ελαίου και η μέτρηση στις ίδιες ώρες η επιφανειακή τους τάση ήταν 47,5 και 47,7 mN/m αντίστοιχα. Επίσης στο στέλεχος OLS 1.1 μετά από τις 72 ώρες ζύμωσης παρατηρείται ιδιαίτερα χαμηλή κατανάλωση της γλυκόζης και αντίστοιχα χαμηλή παραγωγή βιομάζας. Ανάποδα το στέλεχος OLL 1.1 έχει χαμηλή παραγωγή βιομάζας παρά το γεγονός ότι κατανάλωσε τελικά όλη την ποσότητα της γλυκόζης.

Εξαίρεση αποτελούν τα στελέχη όπως το SK και το F8, τα οποία παρά την σχετικά μεγάλη μετατόπιση ελαίου που παρουσιάζουν μετά από 72 ώρες ζύμωσης 3 cm και 1,8 cm, δεν παρουσιάζουν την ανάλογη χαμηλή επιφανειακή τάση στις αντίστοιχες ώρες και σημειώνουν επιφανειακή τάση 68,2 και 68,8 mN/m αντίστοιχα.

Από το Γράφημα 1,2,4 και 6 παρατηρείται ότι το στέλεχος SK5 στις 24 ώρες ζύμωσης, έχοντας καταναλώσει την μισή γλυκόζη, έχει μέτρια παραγωγή βιομάζας (1,2 g/L) και μια πολύ καλή μέτρηση επιφανειακής τάσης αφού έχει καταφέρει να μειώσει την επιφανειακή τάση σχεδόν 20 mN/m και έχει δημιουργήσει μια αρκετά υψηλή μετατόπιση ελαίου 1cm.





Γράφημα 6: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Συμπερασματικά, μεταξύ των υπόλοιπων στελεχών που έχουν μελετηθεί στο M2, φάνηκε ότι το στέλεχος OLS 2.1 σύμφωνα με το Γράφημα 1 έχει κάνει καλή αξιοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος αφού στις 72 ώρες είχε καταναλώσει συνολικά 16 g/L γλυκόζη ενώ μέχρι τις 24 ώρες ζύμωσης είχε καταναλώσει μόλις τα 11,6 g/L. Το συγκεκριμένο στέλεχος, όπως φαίνεται από το Γράφημα 2, αύξησε την παραγωγή της βιομάζας του στα 1,02 g/L για τις 24 ώρες και 1,60 g/L τις 72 ώρες αντίστοιχα και παρατηρείται από το Γράφημα 4, κατάφερε να μειώσει την επιφανειακή τάση στα εκχυλίσματα PBS στο 50,8 και 47,4 mN/m. Στο Γράφημα 6, το ίδιο στέλεχος φαίνεται να δημιουργεί μια αρκετά μεγάλη μετατόπιση ελαίου στα εκχυλίσματα PBS στα 0,4 cm και 1 cm μετά από 24 και 72 ώρες αντίστοιχα.

Αντιθέτως, το στέλεχος το οποίο δεν φάνηκε να αξιοποιεί ιδιαίτερα τη γλυκόζη που περιέχει το θρεπτικό υπόστρωμα είναι μεταξύ άλλων το OLS 2.2 και όπως διαπιστώνεται από το Γράφημα 1 έχει καταναλώσει ελάχιστη γλυκόζη καθώς η γλυκόζη που κατανάλωσε μετά από 24 ώρες ζύμωσης είναι 3,3 g/L και μετά από 72 ώρες είναι 3,8 g/L (από τα 20 g/L αρχικά). Αυτό όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 4 και στο Γράφημα 2 έχει επιπτώσεις τόσο στην παραγωγή βιομάζας, η οποία μετά τις 24 ώρες είναι 0,35 g/L και μετά τις 72 ώρες είναι 0,40 g/L, όσο και στην μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα ρυθμιστικού διαλύματος PBS στα οποία μετά από 24 ώρες είναι 62,1 και μετά από 72 είναι 75,8 mN/m.

4.1.5. Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (θρεπτικό μέσο M2)

Σύμφωνα με τον πίνακα XX η μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη, παρατηρήθηκε από το στέλεχος ΠΕ11 με 11,8 g/L, ενώ αντίστοιχα η μικρότερη, με μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα, από το OLS 2.2 με 3,2 g/L. Όσον αφορά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 72 ώρες η μεγαλύτερη παρατηρήθηκε στο SK1 με 20 g/L, ενώ η μικρότερη και πάλι στο OLS 2.2 με 4,1 g/L όπως ήταν αναμενόμενο.

Το στέλεχος ΠΕ11 που σημείωσε την μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 ώρες ζύμωσης, στον ίδιο χρόνο σημείωσε επίσης υψηλή κατανάλωση γλυκόζης, υψηλή παραγωγή βιομάζας και μια από τις χαμηλότερες επιφανειακές τάσης στα υπερκείμενα όπως αποδεικνύεται και από τα Γραφήματα 1 C, 2C και 3 C. Αντίστοιχα, το στέλεχος SK1, εκτός από την μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 72 ώρες ζύμωσης, είχε επίσης αρκετά υψηλή παραγωγή και στις 24 ώρες. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα γραφήματα 1 A, 2 A και 3 A φαίνεται ότι κατανάλωσε σχεδόν όλη την διαθέσιμη γλυκόζη, είχε μεγάλη παραγωγή βιομάζας και μείωσε την επιφανειακή τάση στο υπερκείμενο των 72 ωρών.

Πίνακας 3: Παραγωγή γαλακτικού οξέος (g/L) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (θρεπτικό μέσο M2)

Strain	24 h	72 h
SK	10.8	18.5
SK1	10.9	20.0
SK2	10.4	18.2
SK3	8.9	9.1
SK4	11.2	18.1
SK5	11.3	18.0
F1	10.9	18.5
F3	10.1	18.0
F5	10.2	18.6
F8	10.4	16.1
OLL_11	9.2	17.3

OLL_12	10.1	17.8
OLL_21	9.6	17.6
OLL_22	11.6	19.1
OLL_31	11.3	16.8
OLL_32	10.6	18.9
OLS_11	7.2	7.7
OLS_21	9.4	15.6
OLS_22	3.2	4.1
OLS_31	9.9	16.3
PE6	11.6	18.2
ΠΕ11	11.8	18.5
ME3	6.71	15.8
ME4	7.75	16.6
MEB3	6.92	11.6
MEB21	8.94	16.6
OLXI_1	11.42	18.1
OLXI_2	10.96	18.0

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

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

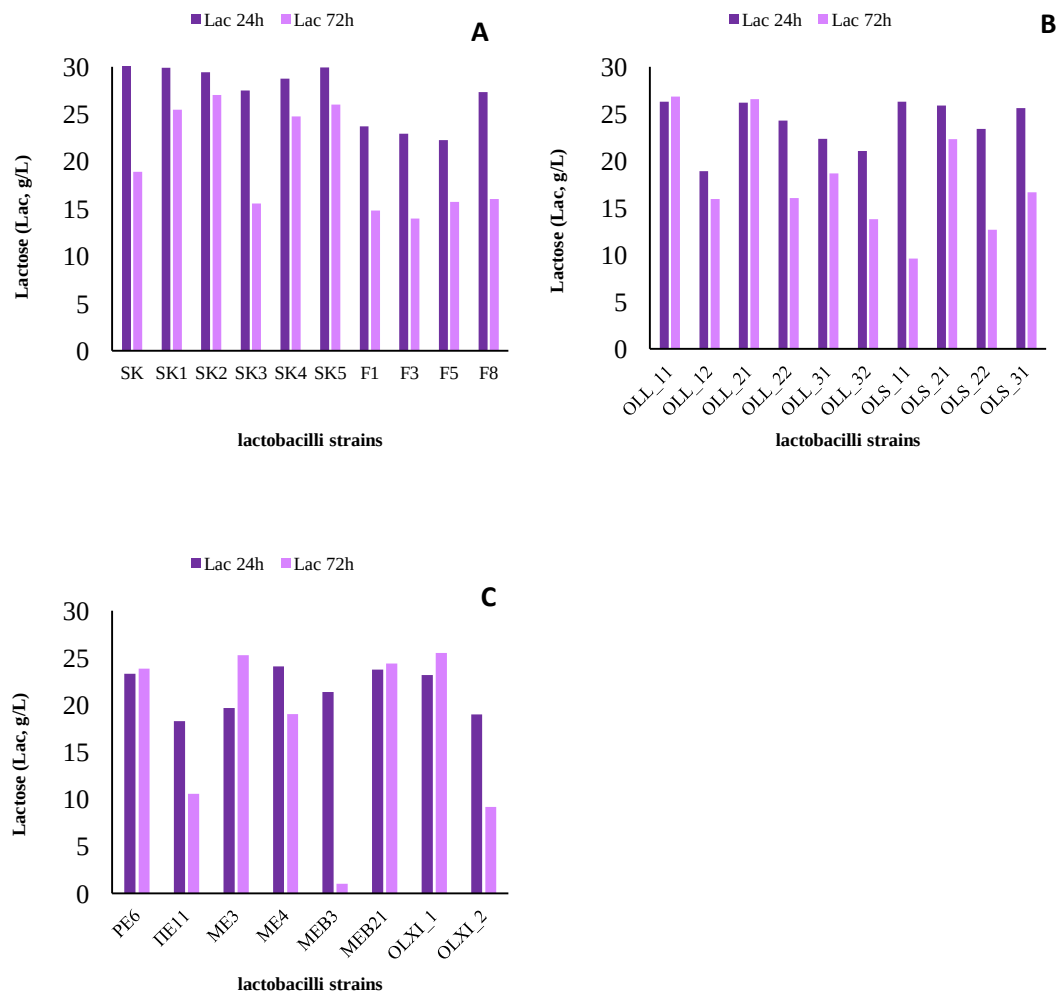
Αντίστοιχα λοιπόν, και σε αυτό το υπόστρωμα, όπως και στο M2, προσδιορίστηκε η κατανάλωση λακτόζης και η παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της επιφανειακής τάσης και της μετατόπισης ελαίου για τον έλεγχο ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα υπερκείμενα της ζύμωσης για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών αλλά και στα εκχυλίσματα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα.

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

Αρχικά ερευνήθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και η ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εφαρμόζοντας το τυρόγαλα ως θρεπτικό υπόστρωμα, με λακτόζη ως πηγή άνθρακα, σε αρχική συγκέντρωση ~32 g/L. Το Γράφημα 7 περιγράφει τη συγκέντρωση λακτόζης στο υπερκείμενο μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης, σύμφωνα με τις μετρήσεις της HPLC.

Σύμφωνα με το Γράφημα 7, η κατανάλωση λακτόζης φαίνεται να είναι αισθητά μικρότερη συγκριτικά με την κατανάλωση γλυκόζης του M2 (Γράφημα 1). Στο Γράφημα 1, η πλειονότητα των στελεχών καταναλώνει πλήρως την γλυκόζη, ενώ στο Γράφημα 7 φαίνεται στις 72 ώρες ζύμωσης τα στελέχη να έχουν καταναλώσει συνολικά μικρότερη ποσότητα. Παρατηρώντας το Γράφημα 7, έντονη διαφορά

παρουσιάζει το στέλεχος MEB 3 το οποίο παρόλο που στις 24 ώρες έχει μικρή κατανάλωση λακτόζης εν τέλει καταφέρνει να καταναλώσει σχεδόν όλη την λακτόζη μετά από 72 ώρες ζύμωσης. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει και την μεγαλύτερη συνολική κατανάλωση. Όσον αφορά στις 24 ώρες, πολλά είναι τα στελέχη τα οποία παρουσίασαν ιδιαίτερα μικρή κατανάλωση. Τέτοια στελέχη είναι τα SK, SK1, SK2, SK3, SK4, SK5 και το F8. Από αυτά, στελέχη που συνέχισαν να έχουν μικρή κατανάλωση λακτόζης και μετά το πέρας της ζύμωσης των 72 ωρών είναι τα SK1, SK2, SK4 και SK5. Ενώ αυτά που αρχικά σημείωσαν κάποια κατανάλωση αλλά δεν την συνέχισαν τόσο έντονα μετά από 72 ώρες είναι τα OLL 1.1, OLL1.2, OLL 2.1, OLS 2.1, PE6, MEB21 και το OLI_1.



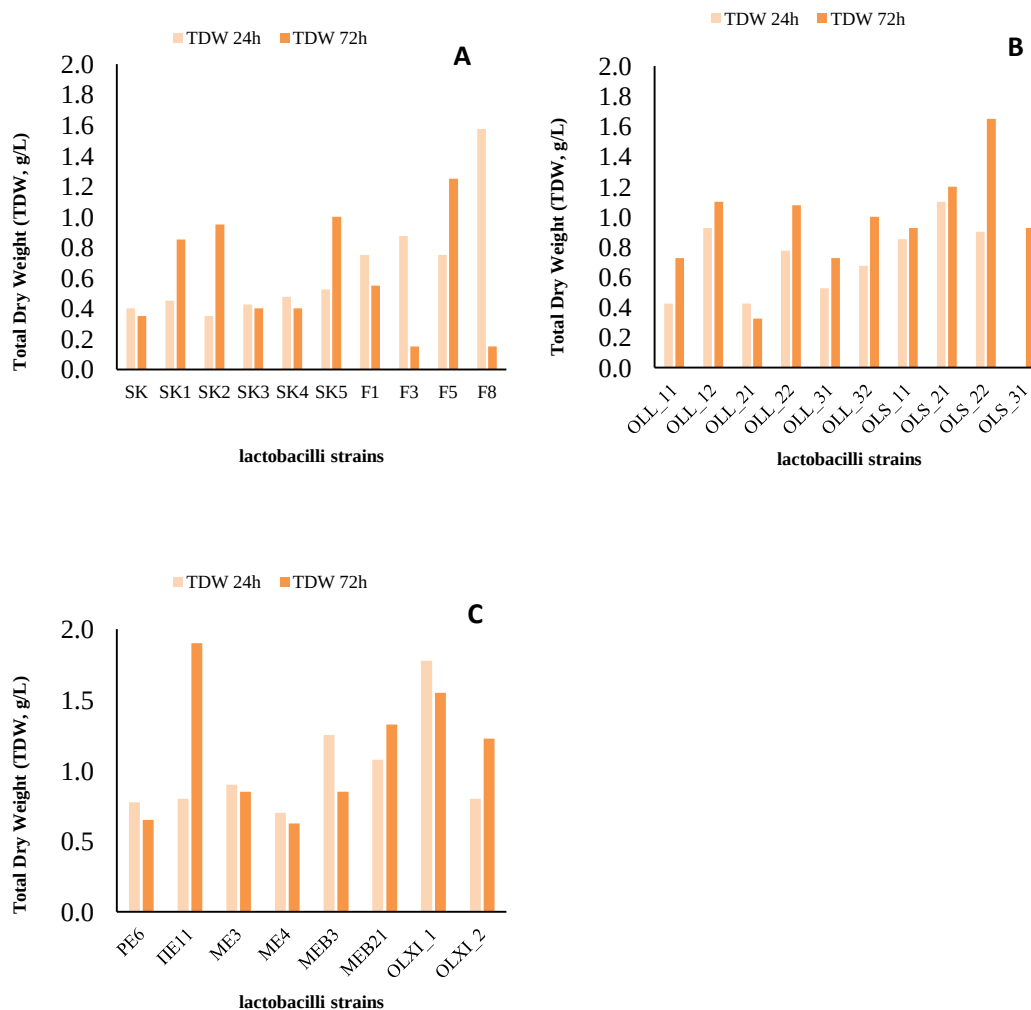
Γράφημα 7: Συγκέντρωση λακτόζης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο τυρογάλακτος.

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

Το Γράφημα 8 (Α, Β και C) παρουσιάζει την παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό μέσο. Συγκρίνοντας τα Γραφήματα 7 και 8 εύκολα φαίνεται ότι όπου υπάρχει αυξημένη παραγωγή βιομάζας, στην πλειονότητα των περιπτώσεων υπάρχει και αυξημένη κατανάλωση λακτόζης. Συνεπώς, παρατηρείται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας συνδέεται με την κατανάλωση της λακτόζης, για παράδειγμα στα στελέχη F1, F5, OLL 1.2, OLL 2.2, OLL 3.2, OLS 2.2, ΠΕ11, ΜΕΒ3 και OLXI_2.

Από το Γράφημα 8, εύκολα διαπιστώνεται ότι τα περισσότερα στελέχη είχαν μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας μετά από τις 72 ώρες ζύμωσης συγκριτικά με την αντίστοιχη παραγωγή των 24 ωρών. Όσον αφορά στις 24 ώρες τα στελέχη με μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας είναι το F8 με βιομάζα 1,57 g/L και το OLXI_1 με βιομάζα 1,78 g/L, ενώ μεγαλύτερη παραγωγή στις 72 ώρες είχαν το OLS 2.2 με 1,07 g/L και το ΠΕ11 με 1,90 g/L. Αντιστρόφως, αυτά με την μικρότερη παραγωγή είναι το SK2 με 0,35 g/L για τις 24 και το F3, F8 με 0,15 g/L για τις 72 ώρες.

Συγκρίνοντας το Γράφημα 7 με το Γράφημα 8, ενδιαφέρον παρουσιάζει το στέλεχος F8 το οποίο παρά το γεγονός ότι στις 24 ώρες ζύμωσης έχει καταναλώσει μικρή ποσότητα λακτόζης 4,69 g/L, την ίδια ώρα έχει μεγάλη παραγωγή ολικού ξηρού βάρους 1,57 g/L. Το ίδιο στέλεχος στις 72 ώρες έχει καταναλώσει 15,96 g/L λακτόζης, ενώ σε αυτό το σημείο η παραγωγή βιομάζας του είναι 0,15 g/L. Στελέχη με παρόμοια παραγωγή βιομάζας στις 24 και 72 ώρες είναι τα SK, SK3, SK4, OLL 2.2, OLS 1.1, OLS 2.1, ΠΕ11, ΜΕ3 και το ΜΕ4.



Γράφημα 8: Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό μέσο

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

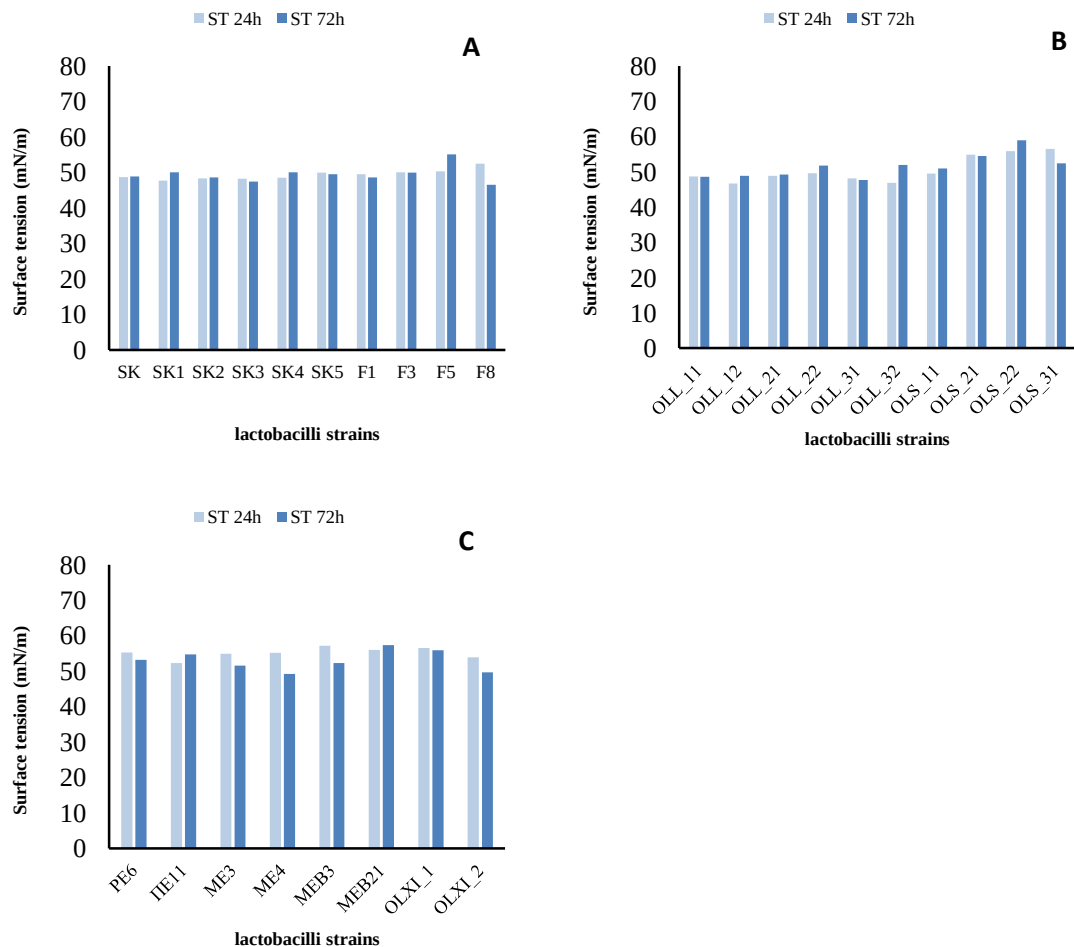
Στην επόμενη ενότητα μελετήθηκε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για τον έλεγχο και την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, με θρεπτικό υπόστρωμα το τυρόγαλα. Αντίστοιχα και με το προηγούμενο πείραμα, μετρήθηκε τόσο το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, για τις βιοεπιφανειοδραστικές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

Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό ζύμωσης

Το Γράφημα 9 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρωση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επίσης, έγινε μέτρηση της επιφανειακής τάσης στο τυρόγαλα η οποία είναι 45-46 mN/m για να υπάρχει ως μέτρο σύγκρισης.

Από το Γράφημα 9 είναι εύκολα αντιληπτό ότι η μείωση επιφανειακής τάσης είναι παρόμοια τόσο ανάμεσα στα στελέχη όσο και ανάμεσα στις ώρες ζύμωσης. Το στέλεχος με τη μικρότερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το OLL 1.2 με 46,7 mN/m με μικρή διαφορά από το OLL 3.2 (46,8 mN/m). Αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα των γραφημάτων 7 B, 8 B και 9 B , καθώς και τα δύο αυτά στελέχη παρουσιάζουν υψηλή κατανάλωση λακτόζης και επίσης υψηλή παραγωγή βιομάζας. Αντίστοιχα για τις 72 ώρες είναι το SK3 με 47,4 mN/m το οποίο έχει εξίσου υψηλή κατανάλωση λακτόζης και παραγωγή βιομάζας όπως φαίνεται και από τα Γραφήματα 7 A και 8 A. Όλα τα προαναφερθέντα στελέχη εμφανίζουν υψηλή μετατόπιση ελαίου στα υπερκείμενα υγρά ζύμωσης σύμφωνα με τα γραφήματα 11 A και 11 B.

Από την άλλη πλευρά το στέλεχος με τη μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το MEB3 με 57,1 mN/m, ενώ για τις 72 το OLS2.2 με 58,9 mN/m.



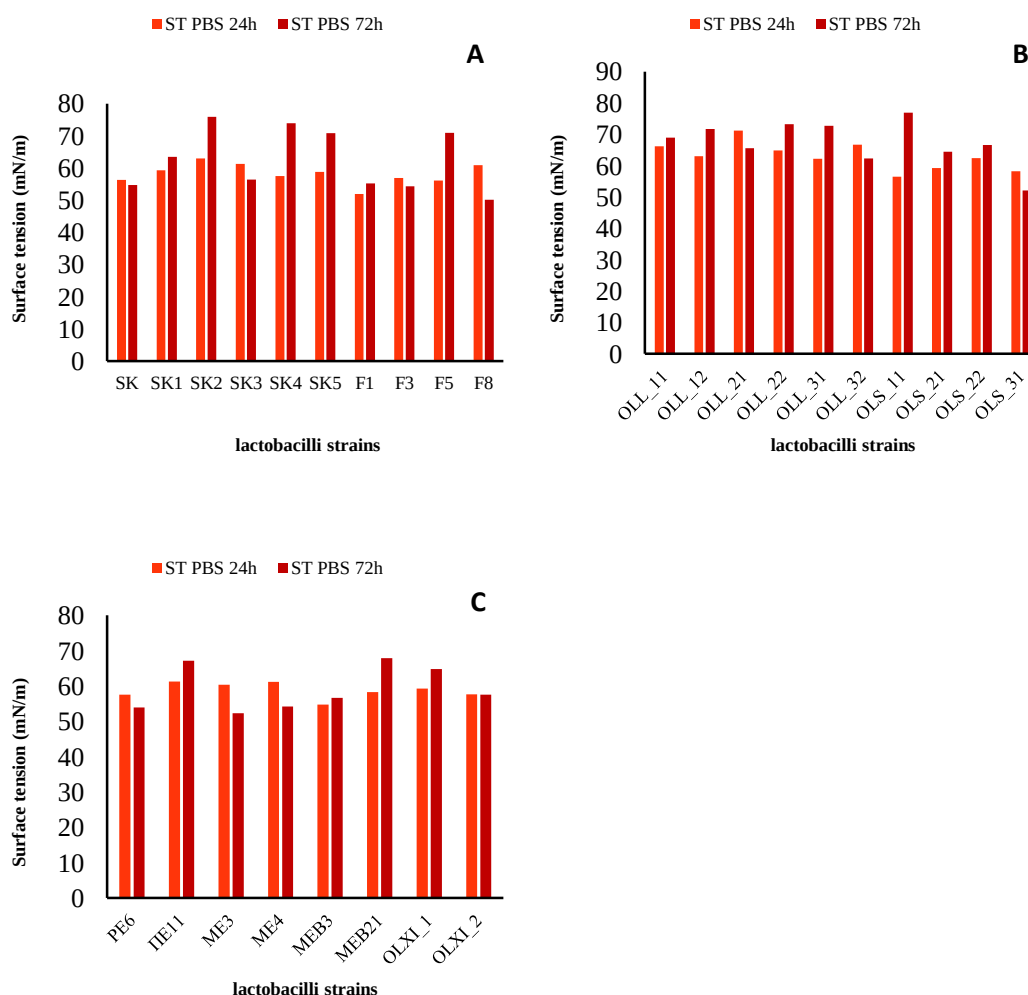
Γράφημα 9: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

Το Γράφημα 10 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης Όσον αφορά στα εκχυλίσματα PBS και σύμφωνα με το Γράφημα 10, τα στελέχη φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάση μετά τις 24 ώρες ζύμωσης, με την επιφανειακή τάση να αυξάνεται μετά τις 72 ώρες στην πλειονότητα των στελεχών. Το στέλεχος με την μικρότερη επιφανειακή τάση για τις 24 ώρες είναι το MEB 3 με 54,7 mN/m (Γράφημα 10 C) και για τις 72 είναι το F8 με 50,1 mN/m (Γράφημα 10 A). Αντίστοιχα, το στέλεχος με την μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το

OLL2.1 με 71,2 mN/m (Γράφημα 10 B) , ενώ για τις 72 το SK2 με 75,9 mN/m (Γράφημα 10 A).

Γενικότερα, συγκρίνοντας το Γράφημα 8 με το Γράφημα 10 φαίνεται ότι εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, τα στελέχη τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας στις 24 ώρες ζύμωσης από τις 72, έχουν και μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 από ότι στις 72 . Εξίσου ισχύει ότι τα στελέχη με μεγαλύτερη βιομάζα στις 72 έχουν και μεγαλύτερη επιφανειακή στις 72. Η παρατήρηση αυτή δύναται να υποδηλώνει ότι η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σχετίζεται με τη παραγωγή της βιομάζας. Οι προαναφερόμενες εξαιρέσεις αφορούν στα στελέχη SK4, F1, OLL3.2, OLS3.1 και το OLXI_2.



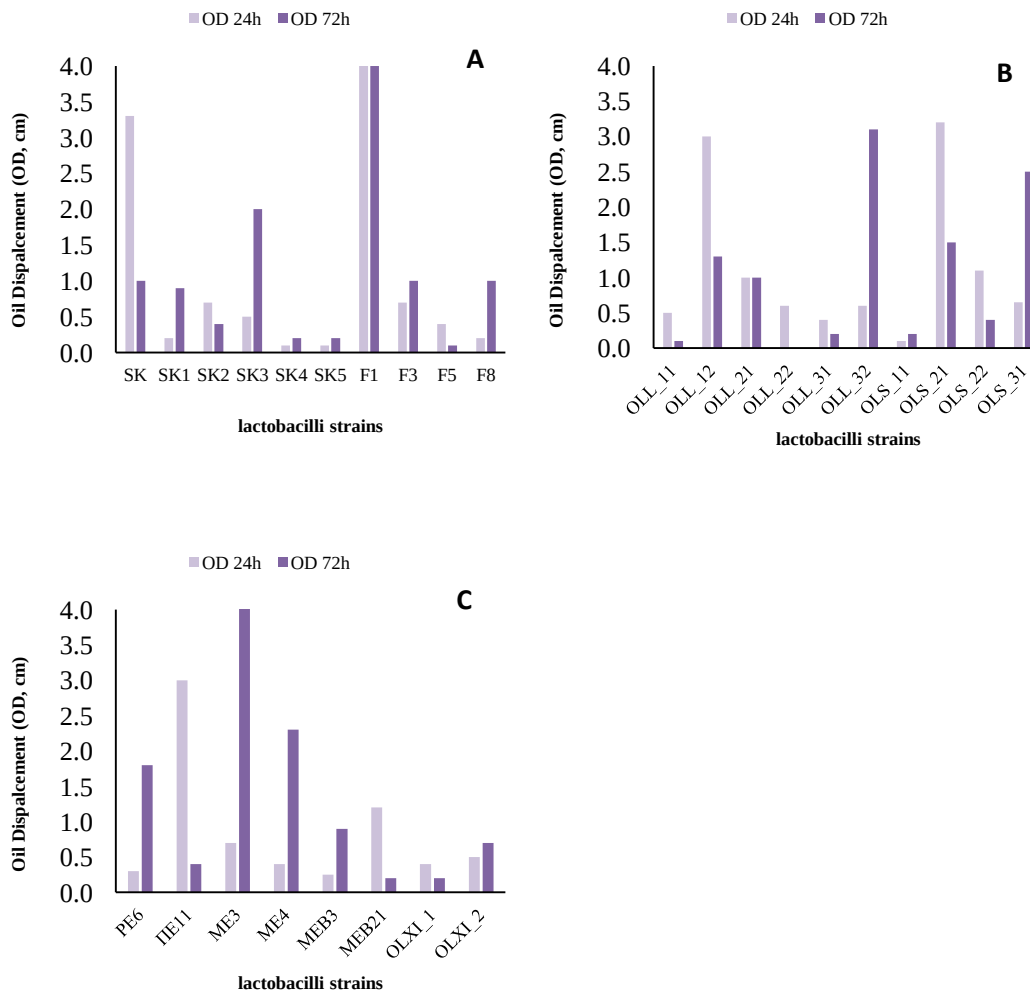
Γράφημα 10: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

Αξιολόγηση μετατόπισης ελαίου στα υπερκείμενα υγρά ζύμωσης

Το Γράφημα 11 παρουσιάζει τη μετατόπιση ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επιπλέον, μετρήθηκε η μετατόπιση που δημιουργεί το τυρόγαλα και είναι 4,5 cm.

Η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη στη ζύμωση μετά τις 24 ωρών, σύμφωνα με το γράφημα 11, παρατηρείται στο F1 το οποίο έχει δημιουργήσει μετατόπιση 4,1 cm και ακολουθούν τα OLS 2.1 με 3,2 cm και OLL 1.2, ΠΕ11 με 3 cm, ενώ για τις 72 ώρες στο ME3 με 4,1cm και στο F1 με 4 cm. Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών συμβαίνει στα στελέχη SK4 και SK5 με 0,1 cm, ενώ για τις 72 στα F5 και OLL1.1 με 0,1 cm. Το στέλεχος που παρουσίασε μηδενική μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 72 ωρών είναι το OLL 2.2, ενώ στο δείγμα ζύμωσης των 24 ωρών δεν υπήρξε τέτοιο στέλεχος. Το στέλεχος που παρουσίασε την μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου στο υπερκείμενο ζύμωσης συνολικά είναι το F1.

Συγκρίνοντας το Γράφημα 11 με το Γράφημα 12, είναι εύκολα αντιληπτή η διαφορά του μεγέθους της μετατόπισης ελαίου ανάμεσα στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS. Τα υπερκείμενα παρουσιάζουν περισσότερα στελέχη που κάνουν μετατόπιση αλλά είναι και μεγαλύτερες οι μετατοπίσεις που δημιουργούν. Ανάλογη συμπεριφορά, όπως προκύπτει από το Γράφημα 9 και Γράφημα 10, υπάρχει και ανάμεσα στις μετρήσεις επιφανειακής τάσης μεταξύ των υπερκείμενων και των εκχυλισμάτων PBS της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα υπερκείμενα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου, δείχνουν να αντιστοιχούν και σε μια χαμηλότερη μέτρηση της επιφανειακής τάσης σε σύγκριση με την μετατόπιση ελαίου και την μέτρηση της επιφανειακής τάσης που έχουν τα εκχυλίσματα PBS. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη σύσταση του τυρογάλακτος το οποίο επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.



Γράφημα 11: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

4.2.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχύλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

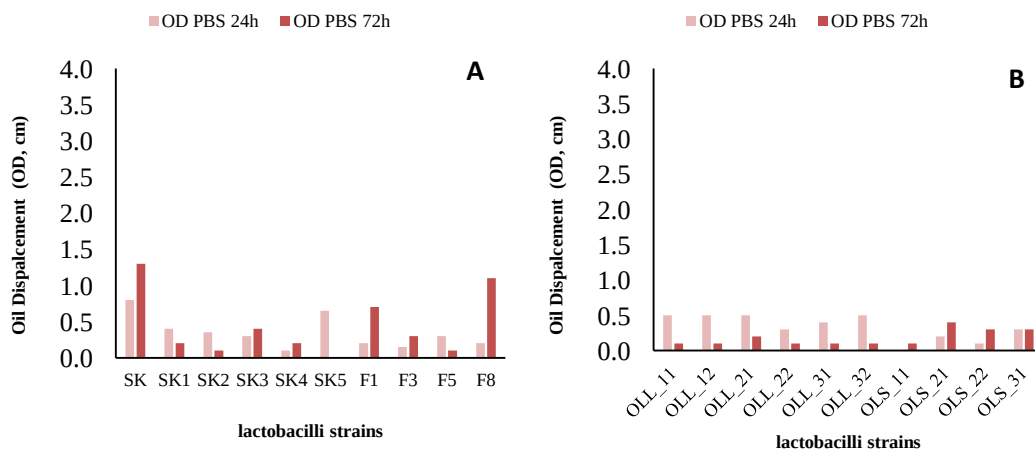
Αξιολόγηση της μετατόπισης ελαίου στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

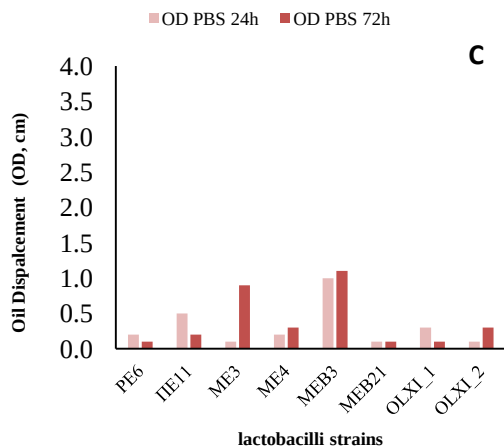
Το Γράφημα 12 παρουσιάζει τη μετατόπιση από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Με βάση το Γράφημα 12, η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρατηρείται στο MEB3 (1 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο SK (1,3 cm). Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τις 24 ώρες συμβαίνει στο στέλεχος SK4, OLS 2.2, ME3 και OLXI_2 όπου είναι ίση με 0,1 cm σε όλες τις περιπτώσεις. Αναφορικά με τις 72 ώρες, η μικρότερη μετατόπιση

παρατηρείται από τα στελέχη SK2, F5, OLL 1.1, OLL 1.2, OLL 2.2, OLL 3.1, OLL 3.2, OLS 1.1, PE6, MEB21 και OLXI_1 με μετατόπιση και πάλι ίση με 0.1 cm. Μηδενική μετατόπιση ελαίου παρουσιάζεται και σε αυτό το υπόστρωμα, αλλά σε πολύ λιγότερα στελέχη συγκριτικά με τα αντίστοιχα στο M2 (Γράφημα 6). Σε αυτή την περίπτωση είναι τα στελέχη OLS 1.1 μετά από 24 ώρες και SK5 μετά τις 72. Γενικότερα την μεγαλύτερη συνολικά μετατόπιση σαν στέλεχος παρουσίασε το SK και το MEB 3.

Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον έχει το στέλεχος F1 το οποίο σύμφωνα με το Γράφημα 12 παρουσιάζει σημαντική μετατόπιση ελαίου μετά από 24 και 72 ώρες (0,2-0,7 cm) σε συνδυασμό με το Γράφημα 7 όπου δείχνει υψηλή κατανάλωση λακτόζης και το Γράφημα 8 που φαίνεται η υψηλή παραγωγή βιομάζας. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει και χαμηλή μέτρηση επιφανειακής τάσης, όπως φαίνεται από το Γράφημα 10, γεγονός που σημαίνει ότι οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές είναι ικανές να προκαλέσουν σημαντική μείωση της επιφανειακής τάσης. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και τα στελέχη ME3 και MEB 3 με το τελευταίο να έχει την μεγαλύτερη κατανάλωση λακτόζης, την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και την μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου από τα υπόλοιπα.

Το στέλεχος SK παρά την μικρή παραγωγή βιομάζας του (Γράφημα 8), έχει καταναλώσει σημαντική ποσότητα λακτόζης (γράφημα 7), έχει δημιουργήσει μεγάλη μετατόπιση ελαίου (Γράφημα 12) και έχει σημειώσει χαμηλή μέτρηση επιφανειακής τάσης (Γράφημα 10). Παρόμοια συμπεριφορά έδειξαν και τα στελέχη F3 και F8.





Γράφημα 12: Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

4.2.5. Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος

Τα γαλακτικά βακτήρια κατά την ανάπτυξη τους παράγουν γαλακτικό οξύ, σαν αποτέλεσμα η τιμή pH στο θρεπτικό μέσο να μειώνεται. Ωστόσο, η μορφή ιονισμού στη οποία βρίσκεται το γαλακτικό οξύ επηρεάζει κατ' επέκταση τη συμπεριφορά του βακτηρίου, και αυτό αντίστοιχα έχει σαν αποτέλεσμα να διαφέρει και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Adamberg, Kask, Laht, & Paalme, 2003; Aline, Marielle, & Catherine, 2009).

Συγκρίνοντας τους Πίνακες 3 και 4 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (θρεπτικό μέσο M2) είναι φανερά μεγαλύτερη από την παραγωγή γαλακτικού οξέος χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος. Όσον αφορά στο γαλακτικό οξύ που παράχθηκε μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος την μεγαλύτερη τιμή για τις αντίστοιχες ώρες φαίνεται να έχει το F1 με 7,86 g/L ενώ μετά από 72 ώρες ζύμωσης το PE6 με 19,56 g/L.

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 4.2.4. οι ιδιότητες του στελέχους F1 και σε συνδυασμό με τον πίνακα 4, αυτό το στέλεχος έχει καταφέρει να δώσει τα

καλύτερα συνολικά αποτελέσματα, καθώς φαίνεται να έχει αξιοποιήσει στο καλύτερο δυνατό το θρεπτικό υπόστρωμα, με σημαντική παραγωγή βιομάζας, γαλακτικού οξέος, βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και υψηλή μετατόπιση ελαίου.

Πίνακας 4: Παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα τη λακτόζη του τυρογάλακτος

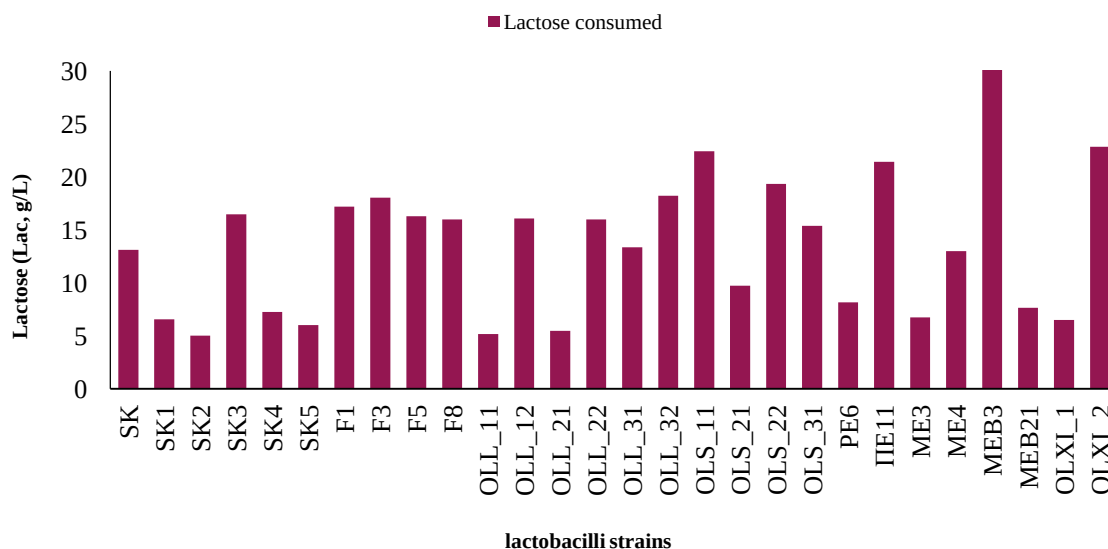
Strain	24 h	72 h
SK	0.83	7.57
SK1	0.83	2.44
SK2	0.83	0.83
SK3	4.02	10.14
SK4	0.83	2.43
SK5	0.83	2.11
F1	7.86	11.06
F3	6.65	12.09
F5	7.03	10.74
F8	4.19	10.75
OLL_11	0.83	0.83
OLL_12	5.18	10.10
OLL_21	0.83	1.49
OLL_22	6.34	8.65
OLL_31	5.30	8.60
OLL_32	5.83	9.54
OLS_11	0.83	2.92
OLS_21	1.84	0.00
OLS_22	6.61	10.28
OLS_31	1.87	7.18
PE6	4.40	19.56
ΠΕ11	5.69	1.36
ME3	3.09	17.29

ME4	2.65	6.57
MEB3	4.06	1.06
MEB21	2.22	1.48
OLXI_1	1.90	2.11
OLXI_2	5.20	13.89

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων στη κατανάλωση λακτόζης, ακόμα και μετά από την ζύμωση των 72 ωρών, παρέμεινε αρκετή συγκέντρωση η οποία δεν καταναλώθηκε. Μάλιστα, σε αρκετές περιπτώσεις η αρχική συγκέντρωση λακτόζης δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές στην τελική κατανάλωση (Γράφημα 7). Επιπλέον, εύκολα διαφαίνεται ότι συγκρίνοντας την κατανάλωση στα δυο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, η μεγαλύτερη κατανάλωση πηγής άνθρακα παρατηρήθηκε στο συνθετικό υποστρώματα M2 το οποίο περιείχε γλυκόζη (Γράφημα 1).

Επίσης από τα γραφήματα φαίνεται ότι η ανάπτυξη βιομάζας (Γράφημα 8) σε πολλές περιπτώσεις συνδέεται με την υψηλότερη κατανάλωση λακτόζης (Γράφημα 7), χωρίς ωστόσο αυτό να διασφαλίζει και τη μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (Γραφήματα 9 και 10).

Συνολικά η μεγαλύτερη κατανάλωση λακτόζης μετά από 72 ώρες ζύμωσης όπως φαίνεται και από το Γράφημα 13, παρατηρείται στο στέλεχος MEB3 με κατανάλωση 30,97 g/L. Κατανάλωση μεγαλύτερη από 20 g/L υπάρχει μετά τις 72 ώρες ζύμωσης στα στελέχη OLS1.1, ΠΕ11 και OLXI_2 τα όποια όπως φαίνεται και από το Γράφημα 8 παρουσιάζουν και αντίστοιχα μεγάλη παραγωγή βιομάζας.



Γράφημα 13: Κατανάλωση λακτόζης μετά από 72 ώρες ζύμωσης

Συμπερασματικά, τα στελέχη που συνολικά παρουσίασαν τα βέλτιστα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας το τυρόγαλο ως υπόστρωμα ήταν τα στελέχη F1 και MEB3. Τα στελέχη αυτά αξιοποίησαν το θρεπτικό υπόστρωμα και επέδειξαν ιδιαίτερα υψηλή κατανάλωση λακτόζης με το MEB3 να έχει την υψηλότερη όλων (Γράφημα 13). Αντίστοιχα, κρίθηκε σημαντική η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθώς η επιφανειακή τάση μετρήθηκε 51.9-55.2 mN/m για το F1 και 54.7-56.6 mN/m για το MEB3. Ωστόσο, το στέλεχος F1 όταν αναπτύχθηκε στο θρεπτικό μέσο M2 με γλυκόζη, δεν παρουσίασε σημαντική μείωση της επιφανειακής τάσης (55,5-64,4 mN/m στα εκχυλίσματα PBS). Αντίστοιχα και το MEB3 στο M2 είχε επιφανειακή 66.5-69.1 mN/m.

Όσον αφορά στο στέλεχος OLS2.1 που παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα στο θρεπτικό υπόστρωμα M2 είχε επιφανειακή τάση 47,4-50,8 mN/m, στο τυρόγαλο είχε 59,2-64,4 mN/m που σημαίνει ότι με αυτό το θρεπτικό δεν κατάφερε να μειώσει εξίσου σημαντικά την επιφανειακή τάση.

Γενικότερα τα στελέχη που έχουν χαμηλότερη επιφανειακή τάση στο M2 είναι τα SK5, OLL1.1, OLL1.2, OLL2.2, OLS1.1. Αντιθέτως, στελέχη που έχουν χαμηλότερη επιφανειακή στο τυρόγαλο είναι τα SK, SK3, SK4, F1, F8, OLS3.1, OLXI_1, MEB3. Τα υπόλοιπα στελέχη στη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, έδωσαν παρόμοιες μετρήσεις, με μικρές διαφορές στο κάθε υπόστρωμα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι χαμηλότερες μετρήσεις συνολικά της επιφανειακής τάσης σημειώθηκαν με μικρή διαφορά στα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλο ως θρεπτικό μέσο. Επιπλέον και στα δύο υποστρώματα η επιφανειακή τάση ήταν χαμηλότερη μετά τις 24 ώρες ζύμωσης συγκριτικά με τις 72.

5. Εφαρμογές

Είναι γεγονός πως τα γαλακτικά βακτήρια έχουν ευρεία χρήση και αποτελούν μια κατηγορία μεγάλης σημασίας για την βιομηχανία τροφίμων. Αυτό οφείλεται στο ότι τα οργανικά οξέα που παράγουν (γαλακτικό και οξικό οξύ) δρουν σαν φυσικά συντηρητικά βελτιώνοντας παράλληλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάποιων από των προϊόντων. Επίσης, ορισμένα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται ως προβιοτικά, και έχουν την ικανότητα να ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου και να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών (Axelsson 2004; Castellano et al 2010). Η φυσική παρουσία τους στα τρόφιμα σε συνδυασμό με την αξιοποίησή τους από τα παλαιότερα χρόνια τους προσέδωσε τον χαρακτηρισμό GRAS (generally recognized as safe) ως προς την ανθρώπινη κατανάλωση (Liu et al. 2011).

Όσον αφορά στην απορρόφηση της πηγής άνθρακα, τα γαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να διασπούν τη λακτόζη στο εσωτερικό των κυττάρων τους με τη βοήθεια της β-γαλακτοσιδάσης (λακτάσης) και να προκύπτουν ως προϊόντα γλυκόζη και γαλακτόζη. Στη συνέχεια, μέσω ενζυμικών δράσεων, από τη γλυκόζη, προκύπτει γαλακτικό οξύ, ενώ η γαλακτόζη μετατρέπεται αρχικά σε γλυκόζη και στη συνέχεια γίνονται διάφορες μεταβολές μέσω της μεταβολικής οδού Meyerhof-Emden (Ζερφυρίδης, 2001)



Όσον αφορά στις εφαρμογές στα ξινογάλατα επιλέχθηκαν προς μελέτη ένα αγελαδινό πλήρες γάλα, το ίδιο αγελαδινό με χαμηλά λιπαρά, ένα κατσικίσιο πλήρες και το ίδιο με χαμηλά λιπαρά. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει η επιλογή της σύγκρισης τόσο για τα αποτελέσματα που προκύπτουν εξαιτίας της ζωικής προέλευσης του γάλατος αλλά δίνεται επίσης και η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων με βάση την περιεκτικότητα των λιπαρών του κάθε γάλακτος.

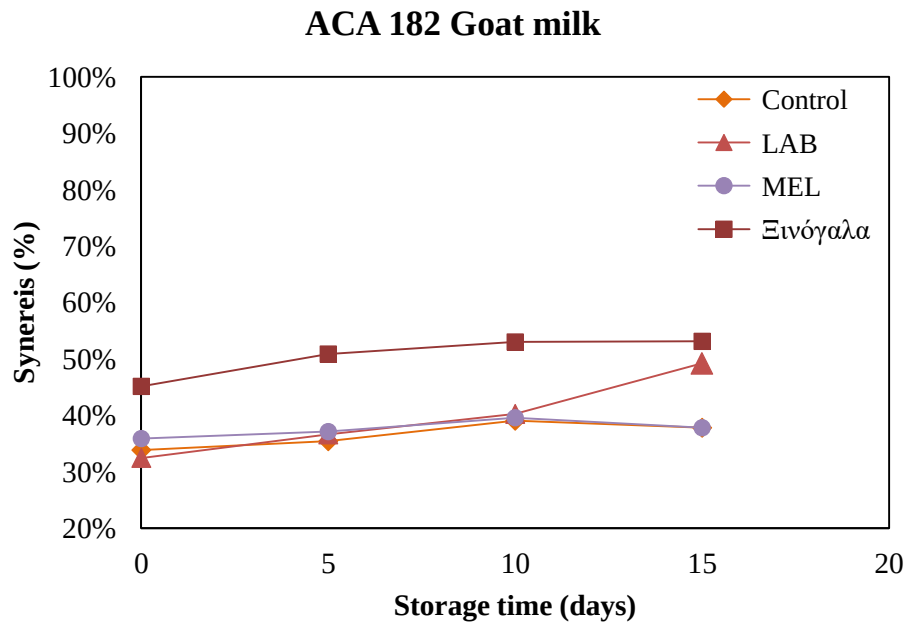
Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για κατανάλωση κατσικίσιου γάλατος έχει αυξηθεί σημαντικά σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια. Έχει γίνει πλέον γνωστό ότι

εκτός από τις θετικές επιδράσεις στα φυσικά και αισθητικά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών προϊόντων, τα λιπίδια του κατσικίσιου γάλακτος παρέχουν καλύτερη δυνατότητα πέψης με μικρό μέγεθος σφαιριδίων λίπους και υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα βραχείας και μέσης αλυσίδας. Το κατσικίσιο γάλα κατέχει σημαντικό ρόλο στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην ανάπτυξη και πρόληψη ασθενειών, έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη, είναι πιο εύπεπτο συγκριτικά με το αγελαδινό και λόγω του ότι είναι πλούσιο σε ολιγοσακχαρίτες είναι σημαντικό για την προστατευτική λειτουργία της εντερικής χλωρίδας έναντι των παθογόνων και στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος. Ένα από τα μεγαλύτερα προτερήματά του είναι η θεραπευτική του δράση στην αλλεργία που προκαλεί το αγελαδινό γάλα, την πιο κοινή τροφική αλλεργία, η οποία προκαλεί πολλούς θανάτους στα βρέφη. Το κατσικίσιο γάλα είναι μια πολύτιμη πηγή τροφής ζωικής πρωτεΐνης, φωσφόρου και ασβεστίου (Turkmen, N. 2017).

5.1. Αποτελέσματα για τη συναίρεση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης

ACA 182 Goat milk

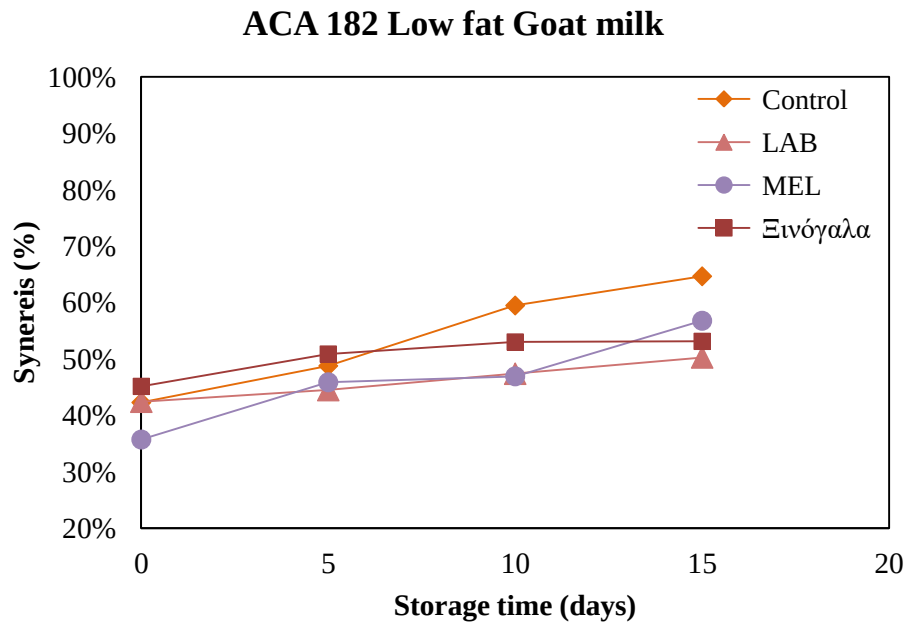
Το πλήρες κατσικίσιο γάλα εμβολιάστηκε με το στέλεχος ACA 182. Στο Γράφημα 14 φαίνεται το ποσοστό συναίρεσης που εμφάνισε το κάθε γάλα ανάλογα με τον προστιθέμενο μικροοργανισμό και ανάλογα με την διάρκεια αποθήκευσης. Επίσης στο Γράφημα 14 υπάρχει και το ποσοστό συναίρεσης του εμπορικού ξινογάλακτος ως μέτρο σύγκρισης. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 14 την μέρα μηδέν και τα 3 γάλατα έχουν συγκρατήσει την συνοχή του γάλατος πολύ καλύτερα από το εμπορικό σε όλες τις μέρες αποθήκευσης σημειώνοντας περίπου 10% μικρότερο ποσοστό συναίρεσης από αυτή του ξινογάλακτος, με εξαίρεση το LAB το οποίο μετά την μέρα 10 το ποσοστό συναίρεσης του αρχίζει να αυξάνεται αλλά ακόμα και στην μέρα 15 το LAB (49,2%) έχει ποσοστό συναίρεσης μικρότερο από το ξινόγαλα (53,1%).



Γράφημα 14: Συναίρεση στο ACA 182 Goat milk

ACA 182 Low fat Goat milk

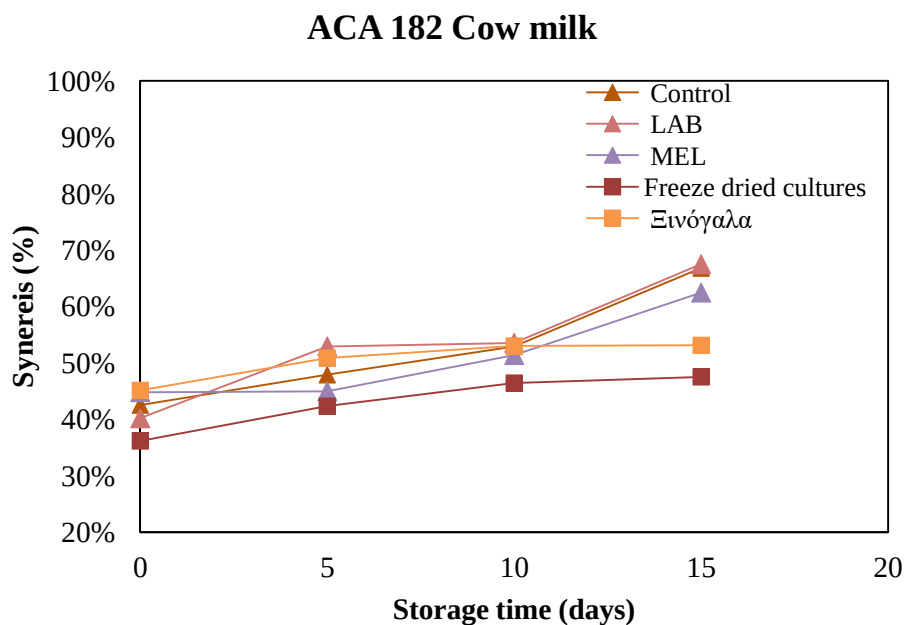
Στο κατσικίσιο γάλα χαμηλών λιπαρών, στο Control μετά την μέρα 5 άρχισε να αυξάνεται το ποσοστό συναίρεσης του και στην μέρα 10 (59,46%) και 15 (64,63) είχε πλέον την υψηλότερη συναίρεση από όλα τα υπόλοιπα. Το MEL το οποίο ξεκίνησε και με την χαμηλότερη συναίρεση όλων (35,69%), παρά το γεγονός ότι μέχρι την μέρα 10 συμβάδιζε με το LAB και εξακολουθούσε να κρατάει χαμηλότερη συναίρεση από το ξινόγαλα, μετά την μέρα 10 δεν κατάφερε να την κρατήσει και άρχισε να αυξάνεται. Στις 15 μέρες το MEL (56,75%) είχε ήδη μεγαλύτερη συναίρεση από το ξινόγαλα (53,1%).



Γράφημα 15: Συναίρεση στο ACA 182 Low fat Goat milk

ACA 182 Cow milk

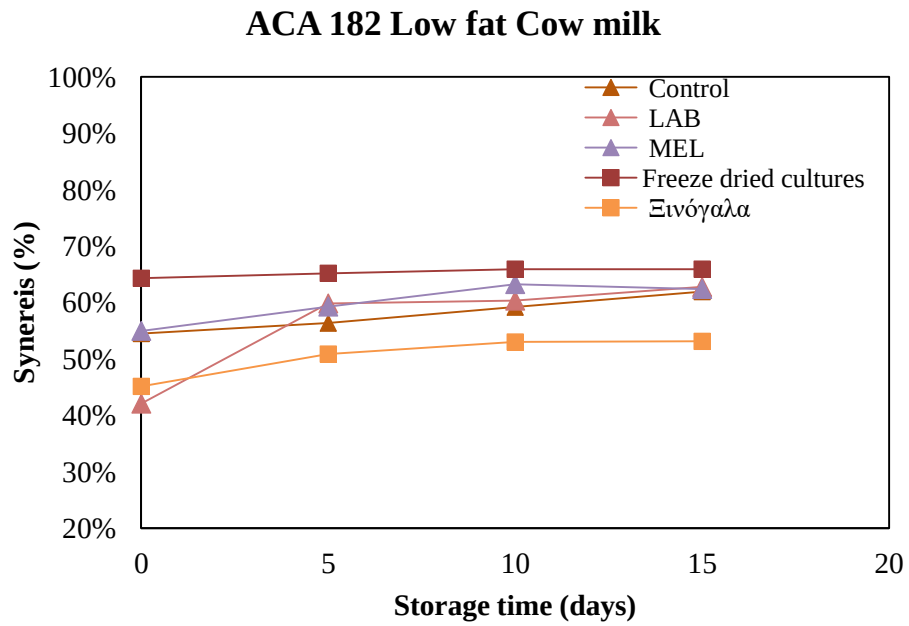
Στο πλήρες αγελαδινό γάλα σύμφωνα με το Γράφημα 16, το χαμηλότερο ποσοστό συναίρεσης έχει το Freeze dried cultures το οποίο φαίνεται να έχει και μία σημαντική ομοιότητα με το ξινόγαλο όσον αφορά στο ποσοστό συναίρεσης σε σχέση με τον χρόνο αποθήκευσης. Παρά το γεγονός ότι στις 0, 5, 10 μέρες το Control LAB και MEL κυμαίνονταν σε παρόμοιες τιμές με το ξινόγαλα (40,18-52,98%), μετά την αποθήκευση των 10 ημερών η αύξηση του ποσοστού συναίρεσής τους ήταν φανερά μεγαλύτερη από του ξινογάλακτος. Στις 15 μέρες η συναίρεση των Control, LAB και MEL ήταν από 62,45-67,47% ενώ το ξινόγαλα είχε 53,10%.



Γράφημα 16: Συναίρεση στο ACA 182 Cow milk

ACA 182 Low fat Cow milk

Στο αγελαδινό γάλα χαμηλών λιπαρών, όπως φαίνεται και από το Γράφημα 17 φαίνεται ότι κανένα δεν κατάφερε να μειώσει την συναίρεση περισσότερο από το εμπορικό ξινόγαλα (45,12-52,98%) σε καμία από τις ημέρες αποθήκευσης. Μόνο το LAB στην μέρα 0 είχε κατά λίγο μικρότερη συναίρεση (42,06%) σε σχέση με το ξινόγαλα, μια ικανότητα την οποία όπως φαίνεται είχε ήδη χάσει μέχρι την μέτρηση των 5 ημερών. Το Control, LAB και MEL έχουν πολύ παρόμοια ποσοστά συναίρεσης σε κάθε μέρα, με το LAB να διαφέρει στο ποσοστό συναίρεσης την μέρα 0 όπως προαναφέρθηκε παραπάνω. Και στα 3 με την πάροδο των ημερών η συναίρεση σταδιακά αυξάνεται. Το Freeze dried cultures παρά την υψηλή συναίρεση του, φάνηκε να παραμένει σταθερό στην πάροδο του χρόνου (64,28-65,90%).



Γράφημα 17: Συναίρεση στο ACA 182 Low fat Cow milk



Εικόνα 13: Εμπορικό Ξινόγαλα



Εικόνα 14: ACA 182 Goat milk



Εικόνα 15: ACA 182 Goat milk low fat



Εικόνα 16: ACA 182 Low fat Cow milk

5.2. Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης

Όσον αφορά στην ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, όπως φαίνεται και από τον πίνακα στην πλειονότητα των περιπτώσεων στην μέρα 0 σε κάθε γάλα έχει παραχθεί η μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος στο Control. Εξάιρεση αποτελεί το Goat milk Low fat το οποίο έχει την μεγαλύτερη παραγωγή για μέρα 0 στο LAB (2,40 g/L). Γενικά ωστόσο, φαίνεται ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος ανάμεσα σε Control, LAB και MEL για την μέρα 0. Εμφανής διαφορά υπάρχει στο Goat milk Low fat στο Control (1.77g/L) οποίο η παραγωγή είναι αρκετά χαμηλότερη συγκριτικά με LAB και MEL (2.28-2.40 g/L)

Στη μέρα 5 υψηλότερη παραγωγή φαίνεται να έχουν και πάλι τα Control στα γάλατα Cow milk και Goat milk, ενώ τα αντίστοιχα γάλατα χαμηλών λιπαρών πλέον εμφανίζουν την μεγαλύτερη παραγωγή στο LAB.

Στη μέρα 10 από την έναρξη της αποθήκευσης, παρατηρείται ότι στο Cow milk η μεγαλύτερη τιμή εντοπίζεται στο LAB (2.33 g/L) με μικρή διαφορά από το MEL (2.24 g/L). Έτσι και στο Goat milk, η περίπτωση με το MEL (1.86 g/L) παρουσιάζει μικρή διαφορά από το Control (1.83 g/L). Το Cow milk Low fat έχει την μεγαλύτερη τιμή οξύτητας με την προσθήκη MEL (4.14 g/L), ενώ το Goat milk Low fat έχει την μικρότερη παραγωγή με το MEL (2.25 g/L) ενώ το Control και το LAB είναι ίσα έχοντας μεγαλύτερη παραγωγή (2.34 g/L). Τέλος στη μέρα 15 παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη τιμή ολικής οξύτητας στα αγελαδινά υπάρχει στα Control (2.01 και 4.06 g/L), ενώ στα 2 κατσικίσια στο MEL (2.10 και 2.85 g/L).

Γενικά εύκολα διαφαίνεται ότι τα λιπαρά του γάλατος συσχετίζονται με την τιμή της ολικής οξύτητας. Αυτό το συμπέρασμα οφείλεται στο γεγονός ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα 2 πλήρη γάλατα εμφανίζουν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους παρά με τα αντίστοιχα γάλατά τους χαμηλών λιπαρών. Εξαίρεση αποτελεί η μέρα 15. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αγελαδινό χαμηλών λιπαρών γάλα, καθώς έχει ιδιαίτερα υψηλή ολική οξύτητα, ενώ σύμφωνα με το Γράφημα 17 παρουσιάζει και ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά συναίρεσης συγκριτικά με το εμπορικό ξινόγαλα.

Πίνακας 5: Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (4 °C). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως γαλακτικό οξύ

		Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα			
		Day 0	Day 5	Day 10	Day 15
<i>Cow milk</i>	ACA 182 Control	2.27	2.47	1.90	2.01
	ACA 182 LAB	2.13	2.31	2.33	1.90
	ACA 182 MEL	2.14	1.52	2.24	0.98
<i>Cow milk Low fat</i>	ACA 182 Control	3.61	3.66	4.02	4.06
	ACA 182 LAB	3.58	3.70	4.01	4.02
	ACA 182 MEL	3.57	3.51	4.14	3.99
<i>Goat milk</i>	ACA 182 Control	1.83	2.46	1.83	2.07
	ACA 182 LAB	1.63	2.07	1.62	1.92
	ACA 182 MEL	1.77	2.04	1.86	2.10

<i>Goat milk</i> <i>Low fat</i>	ACA 182 Control	1.77	1.98	2.34	2.37
	ACA 182 LAB	2.40	2.58	2.34	2.52
	ACA 182 MEL	2.28	2.55	2.25	2.85

5.3. Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar

Στην επόμενη ενότητα μελετήθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών που είχαν αναπτυχθεί σε τριβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS agar. Γενικά ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να παρουσιάζει μικρές διαφορές ανάλογα με τις διαφορετικές περιπτώσεις των πειραμάτων και ανάλογα με τον αριθμό των ημερών αποθήκευσης. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τον πίνακα παρατηρείται ότι με το πέρασ των ημερών ο μικροβιακός πληθυσμός σταδιακά μειώνεται σε όλα τα γάλατα (χωρίς σημαντικές διαφορές).

Πίνακας 6: Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar

	Storage	time	ACA	182	ACA	182	ACA	182
	(Days)		Control		LAB		MEL	
<i>Cow milk</i>	0		8.46		8.54		8.57	
	5		8.28		8.36		8.53	
	10		8.1		8.41		8.39	
	15		7.97		8.32		8.27	
<i>Low fat</i> <i>cow milk</i>	0		8.53		8.61		8.56	
	5		8.53		8.67		8.44	
	10		8.62		8.60		8.62	
	15		8.17		8.60		8.59	
<i>Commercial</i> <i>sour milk</i>	0		8.05					
	5		8.02					
	10		7.98					
	15		7.34					

Πίνακας 7: Μικροβιακός πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων μετά από καταμέτρηση αποικιών σε MRS agar

	Storage time (Days)	ACA 182 Control	ACA 182 LAB	ACA 182 MEL
<i>Goat</i>	0	8.32	8.43	8.46
<i>milk</i>	5	8.13	8.12	8.19
	10	8.31	8.34	8.19
	15	8.28	8.18	8.29
<i>Low</i>	0	8.30	8.57	8.41
<i>fat</i>	5	8.48	8.47	8.88
<i>goat</i>	10	8.61	8.60	8.61
<i>milk</i>	15	8.85	8.18	8.13

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη διερεύνησε τη δυνατότητα πληθώρας γαλακτικών στελεχών προς παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά υποστρώματα (ένα συνθετικό και ένα απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων). Εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όπως η μέτρηση επιφανειακής τάσης και μετατόπιση ελαίου μεταξύ άλλων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν και περιγράφηκαν αναλυτικά στις προηγούμενες ενότητες, συμπεραίνεται ότι:

- Τα περισσότερα στελέχη είχαν χαμηλότερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες ζύμωσης συγκριτικά με τις 72
- Τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλα σημείωσαν χαμηλότερη επιφανειακή τάση από τα αντίστοιχα στο M2.
- Το στέλεχος OLS2.1 (47,4 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 72 ώρες ζύμωσης στα εκχυλίσματα PBS στο M2.
- Το στέλεχος F8 (50,1 mN/m) είχε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση μετά τις 72 ώρες ζύμωσης στα εκχυλίσματα PBS στο τυρόγαλα.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε η εφαρμογή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια (από προηγούμενη μελέτη επιλογής βακτηρίων) στην παραγωγή γαλακτοκομικού προϊόντος (ξινογάλακτος) όπου μελετήθηκαν διάφορες παραμέτροι κατά της διάρκειας της αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Τα κατσικίσια γάλατα φάνηκε να έχουν καλύτερη συνοχή σε όλη την διάρκεια της αποθήκευσης.
- Τα full fat γάλατα διατήρησαν καλύτερη συνοχή από τα αντίστοιχα χαμηλών λιπαρών.
- Το χαμηλότερο ποσοστό συνάιρεσης σε όλη την διάρκεια της αποθήκευσης σημείωσε το ACA 182 Goat milk.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, Vol.2011: GEBJ-29, αποδεκτή έκδοση, 7 Νοεμβρίου 2011 (Τύπος χειρογράφου: Κριτική) <http://astonjournals.com/gebj>
2. Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(1), 1-14.
3. Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.
4. Sharma, D. (2016). *Biosurfactants in food*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
5. 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.
6. Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
7. Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.
8. Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 24(6), 604-620.
9. Mnif I, Ellouz-Chaabouni S, Ghribi D. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnol. *J Polym Environ*. 2017;4:1-15. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1076-4>)
10. Bonmatin, J. M., Laprévote, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(6), 541-556.

11. Van Bogaert, I. N., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(1), 23-34.
12. Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1323-1336.
13. Geys, R., Soetaert, W., & Van Bogaert, I. (2014). Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current opinion in biotechnology*, 30, 66-72.
14. Williams, W., & Trindade, M. (2017). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants. In *Functional metagenomics: tools and applications* (pp. 95-117). Springer, Cham.
15. Perfumo A, Rudden M, Marchant R, Banat IM. Biodiversity of Biosurfactants and Roles in Enhancing the (Bio)availability of Hydrophobic Substrates. T. Krell (ed.), Cellular Ecophysiology of Microbe, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiol.* 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20796-4_35-1)
16. Ozdener MH, Ashby RD, Jyotaki M, Elkaddi N, Spielman AI, Bachmanov AA, Solaiman DKY. Sophorolipid Biosurfactants Activate Taste Receptor Type 1 Member 3-Mediated Taste Responses and Block Responses to Bitter Taste In Vitro and In Vivo. *J Phys Chem B*. 2019;123(17):3841-3858. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b01013>.)
17. Sivakumar, P., & Arutchelvi, M. S. (2018). Modified composite power control strategy for grid connected wind-PV systems with unbalanced nonlinear current. *International Transactions on Electrical Energy Systems*, 28(9), e2587.
18. Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S. (2016). *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Cham: Springer.
19. Gerson, D. F., & JE, Z. (1979). Microbial biosurfactants.
20. Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S. (2016). *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Cham: Springer.
21. Gudiña, E. J., & Rodrigues, L. R. (2019). Research and production of biosurfactants for the food industry. *Bioprocessing for Biomolecules Production*, 125-143.

22. Mulligan, C. B., & Shleifer, A. (2005). The Extent of the Market and the Supply of Regulation. *The Quarterly Journal of Economics*, 120(4), 1445-1473.
23. Van der Vegt, W., Van der Mei, H. C., Noordmans, J., & Busscher, H. J. (1991). Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 766-770.
24. φυσικοχημεια τροφιμων χ.ριτζούλης
25. Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
26. Nitschke, M., & Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), 631-638.
27. Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.
28. Makkar, R., & Cameotra, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 428-434.
29. Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
30. Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2007). Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 81(2), 358-370.
31. Rodrigues, L., Van der Mei, H. C., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4408-4410.
32. Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Intasit, R., Maneerat, S., & Saimmai, A. (2020). Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks

- and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 148, 104911.
33. Oliva, A., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2020). Effect of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidylserine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110576.
 34. Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology*, 30(11), 558-565.
 35. Fei, D., Zhou, G. W., Yu, Z. Q., Gang, H. Z., Liu, J. F., Yang, S. Z., ... & Mu, B. Z. (2020). Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 109-118.
 36. Perfumo, A., Rudden, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. *Cellular ecophysiology of microbe: hydrocarbon and lipid interactions. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer: Cham*, 75-103.
 37. Rebello, S., Anoopkumar, A. N., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., & Aneesh, E. M. (2020). Comparative life-cycle analysis of synthetic detergents and biosurfactants—an overview. *Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts*, 511-521.
 38. Fernández-Peña, L., Guzmán, E., Leonforte, F., Serrano-Pueyo, A., Regulski, K., Tournier-Couturier, L., ... & Luengo, G. S. (2020). Effect of molecular structure of eco-friendly glycolipid biosurfactants on the adsorption of hair-care conditioning polymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110578.
 39. Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005-1016.
 40. Hasenhuettl, G. L. (2019). Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. In *Food emulsifiers and their applications* (pp. 11-39). Springer, Cham.
 41. Garti, N., Clement, V., Leser, M., Aserin, A., & Fanun, M. (1999). Sucrose ester microemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 80(2-3), 253-296.

42. Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (Eds.). (2008). *Food emulsifiers and their applications* (Vol. 19). New York: Springer.
43. Campos, J. M., Stamford, T. L. M., & Sarubbo, L. A. (2019). Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation*, 30(4), 313-324.
44. Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., & Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource technology*, 213, 262-269.
45. Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: a review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185-198.
46. FAO., World Health Organization, World Health Organization. Food Safety Programme, World Health Organisation Staff, Food Safety Programme, Joint FAO/WHO Consultation on Health Implications of Acrylamide in Food, & WHO. (2002). *Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002*. World Health Organization.
47. Layman, P. L. (1985). Industrial surfactants set for strong growth. *Chem Eng News*, 23, 23-48.
48. Campos, J. M., Stamford, T. L., & Sarubbo, L. A. (2014). Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 3234-3252.
49. Campos, J. M., Stamford, T. L., Rufino, R. D., Luna, J. M., Stamford, T. C. M., & Sarubbo, L. A. (2015). Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, 2, 1164-1170.
50. Pekin, G., Vardar-Sukan, F., & Kosaric, N. (2005). Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. *Engineering in Life Sciences*, 5(4), 357-362.
51. Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18(6), 1277-1281.

52. Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., & Moraes, I. O. (2002). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 54(4), 283-288.
53. Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., & Płaszczek, M. (2004). Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource technology*, 95(1), 15-18.
54. Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2003). Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. In *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 295-301). Humana Press, Totowa, NJ.
55. Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey.
56. Thompson, D. N., Fox, S. L., & Bala, G. A. (2000). Biosurfactants from potato process effluents. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 917-930). Humana Press, Totowa, NJ.
57. Noah, K. S., Bruhn, D. F., & Bala, G. A. (2005). Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 465-473). Humana Press.
58. Deak, N. A., & Johnson, L. A. (2006). Functional properties of protein ingredients prepared from high-sucrose/low-stachyose soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(9), 811-818.
59. Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Gottlieb, A., Rosenhak, S., & Ron, E. Z. (1988). Production of biodispersant by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 317-322.
60. Dubey, K., & Juwarkar, A. (2004). Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2.
61. Costa, S. G., Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., Nitschke, M., & Contiero, J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1063-1072.
62. Τυροκομία β' έκδοση Εμμανουήλ Μιχ. Ανυφαντάκης

63. Faria, N. T., Marques, S., Fonseca, C., & Ferreira, F. C. (2015). Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma antarctica* PYCC 5048T. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.10.008>
64. Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L. et al. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 2749–2764 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>
65. Kachrimanidou V, Papadaki A, Lappa I, et al (2021) Biosurfactant Production from Lactobacilli: An Insight on the Interpretation of Prevailing Assessment Methods. *Appl Biochem Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03686-7>
66. Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, Oliveira R (2006) Kinetic study of fermentative biosurfactant production by Lactobacillus strains. *Biochem Eng J* 28:109–116. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.06.001>
67. Velraeds MMC, Van Der Mei HC, Reid G, Busscher HJ (1996) Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by Lactobacillus strains. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 8:51–61. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(96\)01297-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(96)01297-0)
68. Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2011) Biosurfactant-Producing Lactobacilli: Screening, Production Profiles, and Effect of Medium Composition. *Appl Environ Soil Sci* 2011:1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/201254>
69. Klotz S, Kuenz A, Prüße U (2017) Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chem* 19:4633–4641. <https://doi.org/10.1039/c7gc01796k>
70. Adamberg, K., Kask, S., Laht, T. M., & Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00537-8)
71. Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (pp. 1e66). New York: Marcel Dekker

72. Castellano, P., González, C., Carduza, F., & Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science*, 85, 394-401.
73. (Liu, S., Han, Y., & Zhou, Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643-651.)
74. (Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης, (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος: Ζυμούμενα προϊόντα, Παγωτό, Κρέμα-Βούτυρο. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη 2001)
75. Turkmen, N. (2017). The nutritional value and health benefits of goat milk components. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (pp. 441-449). Academic Press.