

**«Χρήση εμπορικών θρεπτικών υποστρωμάτων και παραπροϊόντων
της γαλακτοβιομηχανίας για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών
ουσιών με εφαρμογή σε οξύγαλα».**

Πτυχιακή Εργασία

της

Παρασκευής Τοπαλίδου

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι, Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2022

«Χρήση εμπορικών θρεπτικών υποστρωμάτων και παραπροϊόντων της γαλακτοβιομηχανίας για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με εφαρμογή σε οξύγαλα».

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

ΚΟΨΑΧΕΙΛΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΚΑΧΡΙΜΑΝΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Υπεύθυνη Δήλωση

Με το παρόν κείμενο βεβαιώνω ότι η κάτωθι υπογράφων είμαι συγγραφέας της παρούσης πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ιόνιου Πανεπιστήμιου και η οποία παραδόθηκε, μετά από έγκριση του επιβλέποντας καθηγητή μου, σε έντυπη και ψηφιακή μορφή στη Γραμματεία του Τμήματος. Επίσης δηλώνω πως κάθε πηγή που χρησιμοποίησα (βιβλιογραφία, αρθρογραφία, δικτυογραφία), για την υποστήριξη των υποθέσεων της μελέτης και της ερευνάς μου, είναι πλήρως συμβατή με τα ακολουθούμενα επιστημονικά πρότυπα και, επιπλέον, αναφέρεται ρητά, υπό μορφή αναφοράς-παραπομπής, σε όλο το φάσμα κειμένων της παρούσης εργασίας. Το αυτό ισχύει για τη χρήση δευτερογενών δεδομένων (πινάκων, διαγραμμάτων και εικόνων), ιδεών και λέξεων, τα οποία και αναφέρονται είτε ακριβώς όπως υπάρχουν στις πηγές είτε μεθερμηνεύονται από εμένα.

Περίληψη

Οι βιοεπιφανειοδραστικές έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως πιθανοί αντικαταστάτες για χημικές επιφανειοδραστικές. Ο όρος γαλακτωματοποιητές αναφέρεται σε εκείνες τις ενώσεις που έχουν την ικανότητα να βοηθούν στην ομογενοποίηση της υγρής με την λιπαρή φάση. Μεγάλος αριθμός από τα τροφίμων, προϊόντων περιποίησης, καλλυντικών και φαρμακευτικών περιέχουν γαλακτώματα. Ως εκ τούτου, το φάσμα εφαρμογών για τις βιοεπιφανειοδραστικές είναι τεράστιο. Ωστόσο, η εφαρμογή εναλλακτικών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε καινοτόμα προϊόντα είναι περιορισμένη και έχει μόνο μία δεκαπενταετή παρουσία στον χώρο της έρευνας. Σήμερα μόνο τα ραμνολιπίδια, τα σοφορολιπίδια και τα λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης είναι τα εμπορικά συναφή βιοεπιφανειοδραστικά. Αν και είναι γνωστό εδώ και αρκετές δεκαετίες και η παραγωγή τους είναι τεχνικά εφικτή, περιορίζονται στις μικρές επιχειρήσεις και οι ευρείες εφαρμογές δεν είναι προβλέψιμες στο εγγύς μέλλον. Μικρός αριθμός επιφανειοδραστικών ουσιών και γαλακτωματοποιητών έχουν εγκριθεί μέχρι τώρα πιθανόν λόγω του ότι η βιοτεχνολογική παραγωγή τους δεν είναι τόσο οικονομικά ανταγωνιστική και για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται μια δύσκολη διαδικασία. Παρ'όλα αυτά υπάρχει ζήτηση για νέες και καινοτόμες επιφανειοδραστικές ουσίες. Στην παρούσα εργασία γίνεται μία προσπάθεια διαλογής, ανάμεσα στα πολλά είδη γαλακτικών βακτηρίων, αυτών που είναι κατάλληλα υπό ορισμένες συνθήκες να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Έγινε χρήση του συνθετικού υποστρώματος (M2) με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και σε δεύτερη φάση του τυρόγαλου 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 από όπου λαμβάνονται έπειτα από εκχύλιση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις και στα δείγματα που λαμβάνονταν σε δύο χρονικά σημεία (24 και 72 ώρες) μετρήθηκε η επιφανειακή τάση, η μετατόπιση ελαίου και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης. Επιπλέον μετρήθηκε και η κατανάλωση σακχάρων μέσω της HPLC παράλληλα και με την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Τέλος μετρήθηκε και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους και όλα σχετίστηκαν για την ανάδειξη των καλύτερων στελεχών.

ABSTRACT

Biosurfactants or microbial surfactants have attracted much interest in recent years as potential replacements for chemically produced surfactants. The term emulsifiers refers to those compounds that have the ability to assist in homogenization of the liquid with the fatty phase. A large number of foods, care products, cosmetics and pharmaceuticals contain emulsions. Therefore, the range of applications for biosurfactants is vast. However, the application of alternative biosurfactants in innovative products is limited and has only a fifteen-year presence in the field of research. Currently only rhamnolipids, sophorolipids and mannosylerythritol lipids are commercially relevant biosurfactants. Although they have been known for several decades and their production is technically feasible, they are limited and wide applications are not foreseeable in the near future. Few surfactants and emulsifiers have been approved so far probably because their biotechnological production is not as economically competitive and requires a difficult production process. Nevertheless, there is a demand for new and innovative surfactants. In this work, an attempt is made to select, among many species of lactic acid bacteria, those that are suitable under certain conditions to produce biosurfactants for us. Thus, the synthetic substrate (M2) was used with glucose as a carbon source and, in a second phase, whey as waste from the food industry, with lactose as the main carbon source. In lactic acid bacteria, biosurfactants can be produced either in the fermentation supernatant, or bound to the bacterial cells from where they are obtained after extraction in PBS buffer. To evaluate the biosurfactant production capacity, fermentations were carried out and the samples taken in two timepoints (24 and 72 hours), where surface tension, oil displacement and emulsification index were measured. In addition, the consumption of sugars was measured through HPLC, along with the production of lactic acid. Finally, total dry weight production was also measured and all the results were correlated to identify the most promising biosurfactant strains.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες: Ορισμός και κατηγορίες	13
1.1.1. Γλυκολιπίδια	14
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. Δράσεις	17
1.3.1. Επιφανειακή τάση.....	17
1.3.2. Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου CMC (Critical Micelle Concentration)	18
1.3.3. Δημιουργία γαλακτώματος	18
1.3.4. Σταθερότητα σε διάφορες συνθήκες.....	20
1.4. Εφαρμογές	20
1.4.1. Εφαρμογές στα τρόφιμα	21
1.4.2 Άλλες εφαρμογές	23
1.5 Σύγκριση βιοεπιφανειοδραστικών με χημικά παραγόμενες ουσίες	25
1.6. Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από προβιοτικά βακτήρια.....	26
1.6.1 Κατσικίσιο γάλα	27
1.7. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών	28
1.7.1. Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα	29
1.7.2 Απόβλητα και υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων	29
1.7.3 Βιομηχανία γάλακτος	32
1.8 Αξιοποίηση γαλακτικών βακτηρίων.....	32
1.9. Προοπτικές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	33
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	36

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
3.1 Μικροβιακά στελέχη-Γαλακτικά βακτήρια.....	37
3.2. Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων	38
3.3. Διαδικασία μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	40
3.4. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών.....	41
3.5. Αναλυτικές μέθοδοι.....	42
3.5.1. Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους (TDW, g/L)	42
3.5.2. Μέτρηση υπολειπόμενων σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος... ..	42
3.6. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια.....	43
3.6.1. Μέτρηση επιφανειακής τάσης	43
3.6.2. Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E ₂₄ %).....	44
3.6.3. Μέθοδος της μετατόπισης ελαίου.....	45
3.7. Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.....	46
3.7.1. Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος	46
3.7.2. Αναλύσεις ξινογάλακτος	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4.1. Αξιολόγηση συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	49
4.1.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.....	49
4.1.2. Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	52
4.1.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης με θρεπτικό M2.	54
4.1.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης	57

4.1.5 Παρατήρηση της δημιουργίας γαλακτώματος σε σχέση με την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα από PBS.	61
4.2. Αξιολόγηση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα με στόχο την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	64
4.2.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης της λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των 24 και 72 ωρών	65
4.2.2. Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	66
4.2.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης.....	68
4.2.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.....	73
4.2.5 Απεικόνιση της παραγωγής γαλακτώματος εξαιτίας της παρουσίας βιοεπιφανειοδραστικών με θρεπτικό μέσο το τυρόγαλο στις 24 και 72 ώρες ζύμωσης.	77
5. Αποτελέσματα για το κατσικίσιο γάλα.....	79
5.1 Συναίρεση στο πλήρες και στο κατσικίσιο με λιγότερα λιπαρά.....	79
5.2 Μικροβιακός πληθυσμός στο κατσικίσιο γάλα με πλήρη και χαμηλά λιπαρά	81
6. Συμπεράσματα	84
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 : ΜΟΡΦΗ ΓΛΥΚΟΛΙΠΙΔΙΟΥ	15
ΕΙΚΟΝΑ 2 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΥΓΡΟ (ΒΙΚΙΠΑΙΔΕΙΑ).....	18
ΕΙΚΟΝΑ 3 : ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΡΥΠΑΣΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ ΑΠΟ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ (MULLIGAN, 2005).	21
ΕΙΚΟΝΑ 4 : ΛΑΚΤΟΖΗ ΣΕ ΓΛΥΚΟΖΗ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΖΗ (ADMIN,2019).....	33
ΕΙΚΟΝΑ 5 : ΓΛΥΚΟΖΗ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΚΑΙ ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ (ΒΛΑΜΗΣ Α.).....	33
ΕΙΚΟΝΑ 6 : ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ ΜΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ M2 ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	40
ΕΙΚΟΝΑ 7 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ ...	41
ΕΙΚΟΝΑ 8 : ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ	42
ΕΙΚΟΝΑ 9 : ΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ	44
ΕΙΚΟΝΑ 10 : ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ ΣΕ PBS ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ OLXI_7 ΠΟΥ ΘΑ ΔΟΥΜΕ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΟΤΙ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑ ΑΠΟ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ	45
ΕΙΚΟΝΑ 11 : ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ	45
ΕΙΚΟΝΑ 12 : ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΕΛΑΙΟΥ ΣΕ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	46
ΕΙΚΟΝΑ 13 : ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	48
ΕΙΚΟΝΑ 14 : (Α) FULL-FAT GOAT MILK WITH E108 DAY 10, (Β) LOW-FAT GOAT MILK WITH E108 DAY 10, (Γ) FULL-FAT GOAT MILK WITH E108 DAY 15, (Δ) LOW- FAT GOAT MILK WITH E108 DAY 15.	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΞΙΟΛΟΓΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ	37
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (M2).....	39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΓΡΑΦΗΜΑ 1: ΓΡΑΦΗΜΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ Μ2.	52
ΓΡΑΦΗΜΑ 2 : ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ (TOTAL DRY WEIGHT, TDW) ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΟ Μ2 ΩΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.	53
ΓΡΑΦΗΜΑ 3 : ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	55
ΓΡΑΦΗΜΑ 4 : ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ PBS ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.	57
ΓΡΑΦΗΜΑ 5 : ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΕΛΑΙΟΥ (OIL DISPLACEMENT TEST) ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	59
ΓΡΑΦΗΜΑ 6 : ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΕΛΑΙΟΥ (OIL DISPLACEMENT TEST) ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ PBS ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	61
ΓΡΑΦΗΜΑ 7 : . ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ.....	62
ΓΡΑΦΗΜΑ 8 : ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ PBS ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ Μ2.	63
ΓΡΑΦΗΜΑ 9 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΓΡΑΦΗΜΑ.	66
ΓΡΑΦΗΜΑ 10 : ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ (TOTAL DRY WEIGHT, TDW) ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΟ ΤΥΡΟΓΑΛΑ ΩΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ.....	68
ΓΡΑΦΗΜΑ 11 : ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.	70
ΓΡΑΦΗΜΑ 12 : ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ PBS ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	72
ΓΡΑΦΗΜΑ 13 : ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΕΛΑΙΟΥ (OIL DISPLACEMENT TEST) ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.	74
ΓΡΑΦΗΜΑ 14 : ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΕΛΑΙΟΥ (OIL DISPLACEMENT TEST) ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ PBS ΣΕ 24 ΚΑΙ 72 ΩΡΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	76
ΓΡΑΦΗΜΑ 15 : ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ.	77
ΓΡΑΦΗΜΑ 16 : ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ PBS.....	78
ΓΡΑΦΗΜΑ 17 : ΣΥΝΑΙΡΕΣΗ ΣΤΟ ΠΛΗΡΕΣ ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ ΓΑΛΑ ΜΕ E108.....	79

ΓΡΑΦΗΜΑ 18 : ΣΥΝΑΙΡΕΣΗ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΑΜΗΛΑ ΛΙΠΑΡΑ ΜΕ Ε108.....	80
ΓΡΑΦΗΜΑ 19: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΤΟ ΠΛΗΡΕΣ ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ ΓΑΛΑ	82
ΓΡΑΦΗΜΑ 20 : ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΤΟ ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΑΜΗΛΑ ΛΙΠΑΡΑ	82

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα επιφανειοδραστικά είναι συστατικά τα οποία σταθεροποιούν μίγματα ελαίου και νερού μειώνοντας την επιφανειακή τάση στη διεπαφή. Γνωστά και ως αμφίφυλες ουσίες, αποτελούνται από μια μακριά υδρόφοβη μη πολική αλυσίδα/ουρά και από μια υδρόφιλη πολική κεφαλή. Η σύνθεση τους μπορεί να ποικίλλει αλλά έχουν κοινά στοιχεία. Τυπικά το υδρόφοβο τμήμα τους αποτελείται από κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, υδρόξυ-λιπαρά οξέα ή λιπαρές αλκοόλες, ενώ το υδρόφιλο τμήμα περιέχει συχνά ένα μόνο-, ολίγο- ή πολυσακχαρίτη, ένα αμινοξύ, πεπτίδιο ή πρωτεΐνη. Πλεονεκτικά, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμους πόρους ή βιομηχανικά απόβλητα και είναι βιοδιασπώμενες. Επιπλέον, έχει γίνει γνωστό ότι πολλά από αυτά έχουν πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες. Ανάλογα με το φορτίο της κεφαλής του, το επιφανειοδραστικό εντάσσεται σε μία από τις ακόλουθες υποκατηγορίες: ανιονικό, κατιονικό, αμφοτερικό και μη ιονικό. (D. Sharma, 2016)

Τα ανιονικά επιφανειοδραστικά έχουν αρνητικό φορτίο στην κεφαλή τους και χρησιμοποιούνται για τις εξαιρετικά καθαριστικές και αφριστικές τους ιδιότητες. Επειδή είναι πολύ ερεθιστικές για το δέρμα, συνδυάζονται συνήθως με μη ιονικές και αμφοτερικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Τα κατιονικά επιφανειοδραστικά έχουν θετικό φορτίο στην κεφαλή τους και χρησιμοποιούνται κυρίως για τις μαλακτικές τους ιδιότητες. Δεν είναι συμβατά με τα ανιονικά επιφανειοδραστικά, για τον λόγο αυτό η δημιουργία προϊόντος με καθαριστικές και συγχρόνως μαλακτικές ιδιότητες αποτελεί πρόκληση. Από την άλλη, τα αμφοτερικά επιφανειοδραστικά, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται έχουν είτε αρνητικό, είτε θετικό φορτίο στην κεφαλή τους. Χρησιμοποιούνται ως δευτερογενείς επιφανειοδραστικές ουσίες διότι η καθαριστική τους δυνατότητα είναι πιο ήπια σε σχέση με των ανιονικών επιφανειοδραστικών. Παρόλα αυτά ενισχύουν τον αφρισμό, μειώνουν τον ερεθισμό και προσφέρουν μαλακτικά οφέλη. Τελευταία τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά δεν περιέχουν κάποιο φορτίο στην κεφαλή τους. Χρησιμοποιούνται συχνότερα ως γαλακτωματοποιητές και διαλυτοποιητές. Παράλληλα, μπορούν επίσης να μειώσουν τον ερεθισμό, να ενισχύσουν τον αφρισμό και να προσφέρουν ήπιες καθαριστικές

ιδιότητες. 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 να βιοδιασπώνται που μας δίνει το περιθώριο αξιοποίησής τους σε πολλές περιπτώσεις. Μερικές εφαρμογές έρχονται να προστεθούν σε καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, υγροσκοπικά, συντηρητικά τροφίμων καθώς και απορρυπαντικά. Ωστόσο οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος παραγωγής και για αυτό δεν είναι ακόμη ευρεία η χρήση τους στον τομέα των βιομηχανιών. Έτσι μέχρι και σήμερα γίνεται χρήση των χημικά παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών και όσον αφορά στον τομέα της έρευνας, 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 που θα αποτελέσουν τα κατάλληλα υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Με αυτόν τον τρόπο δύναται να παραχθούν ποσότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ικανές να αντικαταστήσουν πλήρως τις χημικά παραγόμενες. (Saharan 2011).

Χρόνο με τον χρόνο οι βιοεπιφανειοδραστικές βρίσκουν εφαρμογή σε όλο και περισσότερα προϊόντα με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η ευρεία εφαρμογή τους. Συγκριτικά, μπορούν να ανταγωνιστούν τα συνθετικά επιφανειοδραστικά, καθώς διατηρούν τις ιδιότητές τους ενώ ταυτόχρονα διασπώνται μόνες τους και χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα, έχοντας έτσι ενεργό ρόλο στην προστασία του περιβάλλοντος. Μεταξύ των μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά, ορισμένες ζύμες δεν παρουσιάζουν κινδύνους τοξικότητας ή παθογένειας, γεγονός που τις καθιστά ιδανικές για χρήση ακόμα και σε σκευάσματα τροφίμων. (Ribeiro, 2020)

1.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες: Ορισμός και κατηγορίες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν την ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση στη επιφάνεια μεταξύ δύο φάσεων και να δρουν τελικά ως γαλακτωματοποιητές (Sharma 2014). Οι βιοεπιφανειοδραστικές αποτελούνται από 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 παραμένουν στη διεπιφάνεια μεταξύ υγρών φάσεων και μειώνουν κατά αυτόν τον τρόπο την επιφανειακή τάση δίνοντας τελικά ένα μονοφασικό γαλάκτωμα. (Saharan et al. 2011, Banat et al. 2010, Van Hamme et al. 2006). Ανάλογα με τη σύσταση τους ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες: τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια, λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες και πολυμερή (Sharma D., 2016)

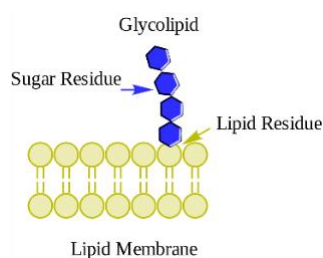
Τα βασικά κριτήρια για την ταξινόμηση των βιοεπιφανειοδραστικών, αποτελούν το μοριακό βάρος τους (υψηλό ή χαμηλό), την θέση του στο κύτταρο (ενδοκυτταρικό, εξωκυτταρικό ή προσκολλημένο σε μικροβιακά κύτταρα), το ιοντικό φορτίο της κεφαλής (ανιονικό, κατιονικό, μη ιονικό ή ουδέτερο) και τέλος τη χημική δομή (Mnif, 2017). Για την ταξινόμηση τους σε λιποπολυσακχαρίτης, λιποπρωτεΐνη, βιοπολυμερές, φωσφολιπίδιο, λιποπεπτίδιο ή γλυκολιπίδιο χρησιμοποιείται η χημική τους δομή.

Μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τις βιοεπιφανειοδραστικές με βάση τη χημική τους σύσταση και τη μικροβιακή προέλευση. Έχουμε έτσι τον διαχωρισμό τους σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες μειώνουν αποτελεσματικά την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση και συνήθως παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα και δευτερευόντως σε 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 όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν ευρέως μελετηθεί περισσότερο ανήκουν 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

Το γλυκολιπίδια είναι μεμβρανικά λιπίδια με υδατάνθρακες στις πολικές ομάδες κεφαλής. Περιέχουν ασύμμετρη κατανομή λιπιδίων μεταξύ της μεμβράνης, και βρίσκονται αποκλειστικά στο εξωτερικό των κυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον, είναι

ιδιαιτέρως πλούσια σε μεμβράνη πλάσματος. Το βασικό χαρακτηριστικό ενός γλυκολιπιδίου είναι η παρουσία ενός μονοσακχαρίτη ή ολιγοσακχαρίτη συνδεδεμένου σε διακριτό τμήμα του μορίου των λιπιδίων και μία κεφαλή ή πολική περιοχή, η οποία μπορεί να αποτελείται από διαφορετικά είδη μορίων, ανάλογα με το εν λόγω γλυκολιπίδιο. Γενικότερα, διαφορετικοί μικροοργανισμοί παράγουν διαφορετικά γλυκολιπίδια. (Abdel-mawgoud, A.M., & Stephanopoulos, G. ,2017)



Εικόνα 1 : Μορφή γλυκολιπιδίου

1.1.2. Ραμνολιπίδια

Τα ραμνολιπίδια είναι κατηγορία γλυκολιπιδίων τα οποία αποτελούνται από μονάδες σακχάρου ραμνόζης που ενώνονται με μονάδες 3-υδροξυ-λιπαρού οξέος μέσω ενός β-γλυκοσιδικού δεσμού (εστερικό δεσμό) (Perfumo, 2017). Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι το πρώτο βακτήριο που αναφέρθηκε να παράγει rhamnolipids και η παραγωγή του μεγιστοποιείται (100 g/L) όταν αναπτύσσεται σε σογιέλαιο. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Jarvis και Johnson το 1949. Επειδή όμως το στέλεχος αυτό είναι ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου γίνεται προσπάθεια να μεταφερθούν τα γονίδια που παράγουν rhamnolipids σε μη παθογόνα *Pseudomonas*.

1.1.3. Σοφορολιπίδια

Η δομή των σοφορολιπιδίων αποτελείται από ένα διμερές μόριο σακχάρου σοφορόζης ενωμένο με μακρά αλυσίδα υδρόξυ-λιπαρού οξέος (Ozdener, 2019). Παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (150 g/L) με υπόστρωμα λάδι και γλυκόζη. Είναι μόρια χαμηλής τοξικότητας που δεν βλάπτουν, σταθερά στις διαφορετικές συνθήκες, βιοαποικοδομήσιμα, μειώνουν την επιφανειακή τάση ωστόσο δεν έχουν ενεργό ρόλο 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 κατηγοριοποιούνται με βάση το μήκος που φτάνει η υδρόφοβη αλυσίδα τους δηλαδή το λιπαρό οξύ. Επιπρόσθετα, η διαβάθμιση τους εξαρτάται και από το βαθμό του κορεσμού στις θέσεις C4 και C6 του μονοσακχαρίτη (Ribeiro, 2020). Ο ρόλος τους είναι κυρίως αποθηκευτικός αφού αποτελούν τις αποθήκες ενέργειας των μικροοργανισμών που τις παράγουν. (Arutchelvi, 2018)

1.1.5. Λιποπεπτίδια και Λιποπρωτεΐνες

Τα μέλη αυτής της ομάδας έχουν γίνει γνωστά κυρίως ως αντιβιοτικά όπως το gramicidin από *Bacillus Brevis* και το polymixin από το *Bacillus Polymyxa*. Κάποια λιποπεπτίδια που παράγονται από *Bacillus* έχουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Τα λιποπεπτίδια αποτελούνται από μία λιπιδική ουρά όντας συνδεδεμένη με πεπτιδικά μόρια και υπάρχουν είτε γραμμικά είτε κυκλικά στο χώρο. Το surfactin παράγεται από το βακτήριο *B. Subtilis* και είναι η πιο ισχυρή επιφανειοδραστική ουσία. Αποτελείται από μία αλυσίδα 7 αμινοξέων που συνδέονται με ένα μόριο 3-υδρόξυ-13-μεθυλοτετραδεκανοϊκό οξύ. Η σουρφακτίνη ωστόσο παρουσιάζει χαμηλή παραγωγικότητα που φτάνει το μέγιστο των 3,5 g/L όταν βελτιστοποιηθούν το pH και η συγκέντρωση Fe. (9)

1.2. Παραγωγή και ρόλος των βιοεπιφανειοδραστικών

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια με υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα που διαχωρίζονται στη διεπιφάνεια μεταξύ ρευστών φάσεων με διαφορετική πολικότητα και δεσμούς υδρογόνου, όπως επιφάνειες λαδιού/νερού ή αέρα/νερού [(Banat, 1995, Morikawa et al., 2000), (Benincasa et al., 2002)]. Αυτές οι ιδιότητες βοηθούν τα επιφανειοδραστικά να μειώσουν την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση και να σχηματίσουν μικρογαλάκτωμα όπου οι υδρογονάνθρακες διαλυτοποιούνται στο νερό ή το νερό διαλύεται σε υδρογονάνθρακες (Mulligan, 2005). Τα επιφανειοδραστικά είναι μια από τις πιο ευέλικτες ομάδες χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες. Η αγορά τους είναι ανταγωνιστική και οι κατασκευαστές θα πρέπει να επεκτείνουν την παραγωγή επιφανειοδραστικών με φιλικό προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικό τρόπο. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα βιοεπιφανειοδραστικά οδήγησε σε μια έντονη

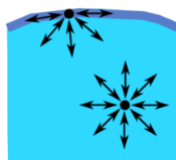
έρευνα για φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Η δομική ποικιλομορφία και οι λειτουργικές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών τα καθιστούν μια ελκυστική ομάδα ενώσεων για πιθανή χρήση σε μεγάλη ποικιλία βιομηχανικών, περιβαλλοντικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Οι μέθοδοι διαλογής διευκολύνουν την απόκτηση πιθανών μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά. Διατίθεται ποικιλία μεθόδων καθαρισμού και ανάλυσης για τον δομικό χαρακτηρισμό των βιοεπιφανειοδραστικών. Αυτή η ανασκόπηση στοχεύει στη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τους τύπους και τις ιδιότητες του βιοεπιφανειοδραστικού, τις μεθόδους μικροβιακής διαλογής καθώς και τη βιοσύνθεση, την εκχύλιση, τον καθαρισμό και τον δομικό χαρακτηρισμό του βιοεπιφανειοδραστικού με χρήση ραμνολιπιδίου ως μοντέλου βιοεπιφανειοδραστικού. Περιγράφει επίσης παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ραμνολιπιδίων. Ένας ακόμη ρόλος τους διαδραματίζεται στην ανάκτηση πετρελαίου χρησιμοποιώντας βιοεπιφανειοδραστικό από *Pseudomonas aeruginosa*. (Sunita J. Varjani , Vivek N. Upasani, 2017).

1.3. Δράσεις

1.3.1. Επιφανειακή τάση

Επιφανειακή τάση (υγρού-αερίου) χαρακτηρίζεται η τάση των υγρών να μειώσουν την επιφάνειά τους. Είναι ένα φυσικό φαινόμενο που οφείλεται στις δυνάμεις συνοχής μεταξύ των μορίων του υγρού, όπου τα εσωτερικά μόρια έλκουν αυτά που βρίσκονται στην επιφάνεια. Ως αποτέλεσμα των δυνάμεων αυτών, τα μόρια της επιφάνειας συνωστίζονται ώστε τελικά η επιφάνεια του υγρού να είναι η μικρότερη δυνατή. Για να αυξηθεί η επιφάνεια του υγρού θα πρέπει να μεταφερθούν μόρια από το εσωτερικό στην επιφάνεια. Αυτό απαιτεί δαπάνη έργου. Ο λόγος του έργου που απαιτείται για την αύξηση της επιφάνειας του υγρού, προς τη μεταβολή της επιφάνειας, είναι το μέτρο της επιφανειακής τάσης που μπορεί να αναφέρεται και ως συντελεστής επιφανειακής τάσης $\gamma=w/dA$. (Karakasidou G., 2020).

Για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης εφαρμόζεται η μέθοδος του δακτυλίου Du Nouy, του πλακιδίου Wilhelmy και άλλες.



**Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση της επιφανειακής τάσης στο υγρό
(Βικιπαίδεια)**

Μια βιοεπιφανειοδραστική ουσία που μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση του νερού από 72,0 σε 35,0 mN/m θεωρείται αποτελεσματική (Mulligan, 2005). Βάση προτύπων της βιβλιογραφίας, 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).

1.3.2. Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου CMC (Critical Micelle Concentration)

Η δημιουργία των μικκυλίων οφείλεται στη συγκέντρωση της βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας. Όταν η τιμή της συγκέντρωσης αυτής υπερβαίνει μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, ή αλλιώς την κρίσιμη συγκέντρωση των μικκυλίων (CMC), η συγκέντρωση εμφανίζει μια αλλαγή όσον αφορά της μακροσκοπικές παραμέτρους ενός διαλύματος με επιφανειοδραστικές ενώσεις (σταθεροποίηση της επιφανειακής τάσης και της ωσμωτικής πίεσης, αύξηση της θολότητας και μεταβολή της σκέδασης φωτός γενικότερα, αύξηση του μαγνητικού συντονισμού, μείωση της αγωγιμότητας). Αυτά συμβαίνουν εξαιτίας της μετατροπής του τασιενεργού από μεμονωμένα μόρια σε μικκύλια. Το τασιενεργό είναι μία ουσία που σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσροφείται σε κάποιες ή όλες της διεπιφάνειες του συστήματος και μεταβάλλει δραστικά το απαιτούμενο έργο για την επέκταση αυτών των διεπιφανειών. Το CMC χρησιμοποιείται ως το βασικότερο κριτήριο για τη σχετική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μιας τασιενεργής ουσίας και από αυτό εξαρτάται το πως θα χρησιμοποιηθεί. (Ριτζούλης, 2017).

1.3.3. Δημιουργία γαλακτώματος

Η γαλακτωματοποίηση είναι μια διαδικασία που σχηματίζει ένα υγρό, γνωστό ως γαλάκτωμα, που περιέχει πολύ μικρά σταγονίδια λίπους ή λαδιού που αιωρούμενα σε ένα ρευστό, συνήθως νερό (Das and Mukherjee, 2007, Pacwa Plociniczak et al.,

2011). Τα βιοεπιφανειοδραστικά υψηλού μοριακού βάρους είναι αποτελεσματικοί γαλακτωματοποιητές (Markande et al., 2013). Συχνά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα για την τόνωση της βιοαποκατάστασης και την απομάκρυνση των ελαίων ουσιών από το περιβάλλον (Ron and Rosenberg, 2002, Das και Mukherjee, 2007· Cerqueira et al., 2011,fatty ac Varjani, 2017).

Με βάση το υδρόφιλο- λιπόφιλο ισοζύγιο του, εξαρτάται αν ο γαλακτωματοποιητής προσφέρει καλύτερη διαλυτότητα νερού σε έλαιο ή λάδι σε νερό. Ο δείκτης υδροφιλικής- λιποφιλικής ισορροπίας (HLB) μιας επιφανειοδραστικής ουσίας (π.χ. γαλακτωματοποιητού) δείχνει κατά το πόσο υπερτερεί η μία φύση από την άλλη. Υπολογίζεται από τη μέτρηση τιμών για τις διαφορετικές περιοχές του μορίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο του Griffin ο δείκτης HLB (1954) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$HLB= 20 \cdot Mh/ M$$

Όπου: Mh είναι η μοριακή μάζα του υδρόφιλου μέρους του μορίου, M είναι η μοριακή μάζα όλου του μορίου.

$$1957, \text{ Davies:} \quad HLB= 7+m \cdot Hh-n \cdot Hl$$

Hh: τιμή υδροφιλικών ομάδων, m: αριθμός υδροφιλικών ομάδων. Hl: τιμή υδροφοβικών ομάδων, n: αριθμός υδροφοβικών ομάδων.

Η επιλογή του γαλακτωματοποιητού γίνεται με βάση το δείκτη υδροφιλικής- λιποφιλικής ισορροπίας (HLB). Ο δείκτης HLB μπορεί να παίρνει τιμές από το 0 ως το 20. Η τιμή 0 αντιστοιχεί σε ένα εξαιρετικά λιποφιλικό μόριο, ενώ η τιμή 20 σε ένα εξαιρετικά υδροφιλικό μόριο. Επομένως, χαμηλές τιμές HLB αντιστοιχούν σε γαλακτωματοποιητές που είναι διαλυτοί σε έλαια. Υψηλές τιμές αντιστοιχούν σε γαλακτωματοποιητές που είναι διαλυτοί σε νερό. Στην πράξη: 1. Σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές που είναι πιο διαλυτοί στο νερό (υψηλές τιμές HLB). 2. Σε γαλακτώματα νερό σε έλαιο χρησιμοποιούνται γαλακτωματοποιητές που είναι πιο διαλυτοί στο έλαιο (χαμηλές τιμές HLB).

Έτσι, μπορεί να ειπωθεί ότι η αποτελεσματικότητα του βιολογικού επιφανειοδραστικού προσδιορίζεται με τη μέτρηση της ικανότητάς του να αλλάζει την επιφανειακή τάση και τη διεπιφανειακή τάση, τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων και με τη μελέτη των υδρόφιλης-λιπόφιλης ισορροπίας του (Desai and Banat, 1997, Satpute et al., 2010a, Pacwa-Plociniczak et al, 2011, Souza et al, 2014).

1.3.4. Σταθερότητα σε διάφορες συνθήκες

Η αλλαγή στις διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος και επεξεργασίας μπορεί να επηρεάζει όπως είναι φυσικό και τη σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Οι συνθήκες που έχουν άμεση σχέση με την λειτουργία των επιφανειοδραστικών είναι οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, οι τιμές pH και τα επίπεδα αλατότητας. Συνήθως σημειώνεται την επίδραση που ασκείται από την κάθε παράμετρο ξεχωριστά και εξάγονται τα συμπεράσματα για το πως τελικά επιδρά ο συνδυασμός τους στη σωστή λειτουργία των ουσιών. Μεγαλύτερη επίδραση φαίνεται να έχει το pH τόσο στη δράση των βιοεπιφανειοδραστικών όσο και στην παραγωγή γαλακτώματος. Ανάλογα με τις ιδιότητες του κάθε είδους κρίνεται και ο χώρος που βρίσκουν εφαρμογή. Για παράδειγμα, 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. (Augustine et al.,2010). Έτσι και βιοεπιφανειοδραστικές που είναι περισσότερο ανθεκτικές στην αλατότητα δεν είναι δυνατή η χρήση τους στη βιολογική αποκατάσταση του περιβάλλοντος, όπου τα επίπεδα αλατότητας είναι αρκετά υψηλά.

1.4. Εφαρμογές

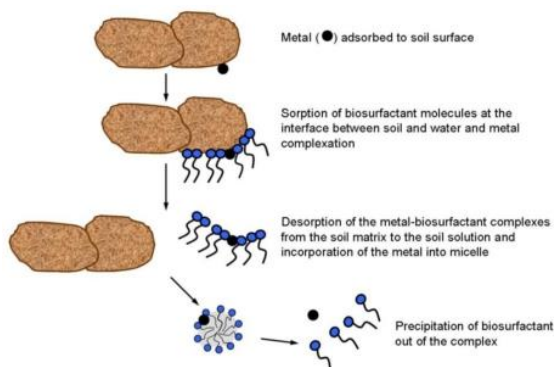
Εξαιτίας της πολύπλοκης χημικής τους δομής οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες βρίσκουν ευρεία εφαρμογών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών, καλλυντικών, απορρυπαντικών-καθαριστικών, φαρμακευτικών, προϊόντων περιποίησης, γαλακτοκομικών κ.λπ. (Marcia Nitschke & Costa, 2007).

Άλλες εφαρμογές μπορεί να σχετίζονται με την ιατρική και 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. Ακόμη παρουσιάζουν και πιο απλές αντιμικροβιακές ιδιότητες όπως: αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και αντιϊκές ιδιότητες (Rodrigues, 2007). Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η τοξικότητα που μπορεί να αφήνει η χρήση τους στο ανθρώπινο σώμα για αυτό και δεν πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές έχουν όμως αρχίσει να χρησιμοποιούνται σε διάφορα άλλα προϊόντα, αντικαθιστώντας εν μέρη ή πλήρως τις χημικά παραγόμενες

επιφανειοδραστικές ουσίες σε προϊόντα που κυκλοφορούν στην αγορά των καταναλωτών όπως απορρυπαντικά για το πλύσιμο ρούχων και οικιακά καθαριστικά (Roger Marchant, Ibrahim M. Banat, 2012), προϊόντα καθαρισμού προσωπικής υγιεινής και καλλυντικά (Perfumo 2017; Rebello S, 2020; Fernández-Peña L 2020).

Επιπλέον, έχουν εισαχθεί και στον τομέα της γεωργίας βελτιώνοντας την ποιότητα των εδαφών. Αυτό επιτυγχάνεται διαμέσου της καταστροφής πολλών ριζών που δίνουν τα παράσιτα και της αφαίρεσης των βαρέων. Τα βαρέα μέταλλα και τα παράσιτα όπως μύκητες, ζιζάνια και προνύμφες εντόμων, προκαλούν αλλοιώσεις η και ολική καταστροφή στα τρόφιμα με συνέπεια μειώσεις στα κέρδη του γεωργού (Sachdev DP, Cameotra SS. 2013). Η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για την βιοαποικοδόμηση των ρυπασμένων εδαφών από βαρέα μέταλλα βασίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μέταλλα (Εικόνα 2). Τα ανιονικά βιοεπιφανειοδραστικά σχηματίζουν σύμπλοκα με μέταλλα σε μία μη ιοντική μορφή με ιοντικούς δεσμούς. Έτσι, το σύμπλοκο μετάλλου – βιοεπιφανειοδραστικού απομακρύνεται στο διάλυμα του εδάφους εξαιτίας της μείωσης της διεπιφανειακής τάσης. Αντίθετα, τα κατιονικά βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να αντικαταστήσουν τα φορτισμένα ιόντα του μετάλλου.



Εικόνα 3 : Μηχανισμός δράσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ρυπασμένα εδάφη από βαρέα μέταλλα (Mulligan, 2005).

1.4.1. Εφαρμογές στα τρόφιμα

Η πιθανή χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών στον τομέα της επεξεργασίας τροφίμων παρουσιάζει πολλά οφέλη. Η πιο σημαντική είναι η χρήση τους ως συστατικά σύνθεσης και αντισυγκολλητικούς παράγοντες. Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων, οι +σταθεροποιητικές και αντιμικροβιακές δράσεις τους είναι σημαντικές ιδιότητες οι

οποίες θα μπορούσαν να διερευνηθούν στην επεξεργασία και τη σύνθεση τροφίμων. Εκτός από το να δρουν ως παράγοντες μείωσης της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης, προωθώντας τον σχηματισμό και την σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων παρουσιάζουν και πολλές άλλες λειτουργίες στα τρόφιμα όπως, η σταθεροποίηση αεριούχων συστημάτων και ο έλεγχος της συσσωμάτωσης των σφαιριδίων λίπους (Kachholz & Schlingmann, 1987).

Στην αρτοποιία με την προσθήκη ραμνολιπιδίου μπορεί να βελτιωθεί η σταθερότητας της ζύμης, η υφή, ο όγκος και η διατήρηση των προϊόντων αρτοποιίας (Van Haesendonck & Vanzeveren, 2004). Επίσης, χρησιμοποιούνται εστέρες λιπαρών οξέων, σορβόζη και σορβιτάνες.

Ακόμη, χρησιμοποιούνται για την παροχή ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων στους καταναλωτές. Μέσα στις βιομηχανίες στις εγκαταστάσεις παραγωγής, συσκευασίας αλλά και αποθήκευσης είναι πιθανή η ύπαρξη βακτηρίων ικανών να μολύνουν και να αλλοιώσουν τα τρόφιμα (Hood & Zottola, 1995). Έτσι, η βιομηχανία τροφίμων επιβάλλει αυστηρά μέτρα ελέγχου των μικροοργανισμών προκειμένου να παράγει προϊόντα που δε βλάπτουν την υγεία των καταναλωτών. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά σημαντικό για το τελικό προϊόν να έχει υψηλό επίπεδο ποιότητας, λαμβάνοντας υπόψη το αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για τρόφιμα που έχουν λιγότερες τεχνητές και χημικές συνθετικές ενώσεις και είναι πλούσια σε φυσικά συστατικά. (Hasenhuettl GL2019).

Βέβαια η προσθήκη τους σε τρόφιμα 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. Για τον λόγο αυτό, παρήχθησαν νέα πρόσθετα τροφίμων (E 1100–1599) με πυκνωτικές, σταθεροποιητικές και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες καθώς επίσης και αντιοξειδωτικές, αντιβιοφίλμ και αντιμικροβιακές ιδιότητες. (Ribeiro 2020).

Επιπλέον οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια στον διαχωρισμό των δύο φάσεων της μαργαρίνης καθώς και κατά τη διαδικασία μαγειρέματος λιπών και ελαίων, για την παρεμπόδιση της δημιουργίας κρυστάλλων. Αποτρέπουν την εμφάνιση κολλώδους υφής σε καραμέλες, τροποποιούν το ιξώδες της σοκολάτας και δίνουν περισσότερη γυαλάδα σε επιστρώσεις ζαχαροπλαστικής. Στη ζαχαροπλαστική επίσης βελτιστοποιούν την διαδικασία απόψυξης χτυπημένων

επιστρώσεων καθώς προσδίδουν μια ευκολία στην πλάση του προϊόντος. (Garti 1999, Nitschke and Costa 2007, Hasenhuettl και Hartel 2008).

Γενικότερα, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να εισέλθουν στο τρόφιμο είτε απευθείας ως πρόσθετα για την ενίσχυση της εμφάνισης και της σταθερότητας του ή έμμεσα ως συστατικά απορρυπαντικών για τον καθαρισμό επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και αποτρέπουν μόλυνση των τροφίμων. Ωστόσο, αυτές οι εφαρμογές δεν πραγματοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα στις βιομηχανίες τροφίμων και αυτό έχει τα αίτια του στο ότι διατίθενται ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητά τους, δεδομένου ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές που μας έχουν δώσει μέχρι τώρα υψηλές συγκεντρώσεις, προέρχονται κυρίως από βακτήρια του γένους *L. rhamnosus*. (Salman and Alimer, 2014).

Από την άλλη, υπάρχουν κατηγορίες μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και χαρακτηρίζονται ως GRAS (Generally Recognised As Safe). Ο όρος GRAS χρησιμοποιείται για να δηλώσει ότι αυτές οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς ουσίες στη λίστα του FDA των ΗΠΑ . Έτσι μπορούν να χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια σε πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων (όπως οι ζύμες *Yarrowia lipolytica* ή *Candida utilis*, και τα γαλακτικά βακτήρια). (Fickers et al., 2005)

Στο φάσμα των εφαρμογών που βρίσκουν θέση οι βιοεπιφανειοδραστικές συγκαταλέγεται και η χρήση τους ως παράγοντες γαλακτωματοποίησης σε προϊόντα τροφίμων, όπως αρτύματα (ντρέσινγκ) σαλάτας, ψωμί, κέικ, μπισκότα και παγωτό. Συγκεκριμένα βελτιώνουν την συνοχή και την υφή τους εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που διαθέτουν και έχουν δυνατότητα παρεμπόδισης της προσκόλλησης των παθογόνων στελεχών. Αυτά αποτελούν χαρακτηριστικά μείζονος σημασίας, καθιστώντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στο κομμάτι αυτό (Ribeiro, 2020).

1.4.2 Άλλες εφαρμογές

Ως παράγοντας αντιβιοφίλμ

Τα βιοφίλμ αποτελούν μικροβιακές κοινότητες στις οποίες δημιουργούν αποικίες ποικίλες αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες με καταστροφικές επιπτώσεις στην

ανθρώπινη υγεία. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες για την αναστολή της ανάπτυξης βιομεμβρανών, αλλά η υπερβολική αντοχή έναντι τέτοιων παραγόντων οδήγησε τους ερευνητές να αναγνωρίσουν μη συμβατικούς παράγοντες αντιβιοφίλμ. Ένας από τους κύριους παράγοντες της εμφάνισης οδοντικής πανώλης, ο *Streptococcus mutans* προσκολλάται στην επιφάνεια των δοντιών και έτσι προκαλεί το σχηματισμό οδοντικής τερηδόνας. Με την χρήση αντιβιοτικών για τον έλεγχο αυτής της μόλυνσης μπορεί να καταστραφούν και τα ωφέλιμα μικρόβια της στοματικής κοιλότητας. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η βιοεπιφανειοδραστική ουσία που προέρχεται από το *Lactobacillus acidophilus* που έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση του *S. mutans* στην επιφάνεια του δοντιού.(Dalili et al.) Γίνεται επίσης αναφορά για ένα νέο λιποπεπτιδικό παράγοντα βιοουρίας που ονομάζεται "coryxin" από το στέλεχος *Corynebacterium xerosis* NSS. Το βιοεπιφανειοδραστικό διέθετε την ανασταλτική και διασπαστική δράση έναντι των βιομεμβρανών του *Staphylococcus aureus* (82,5%), του *S. mutans* (80 %), του *E. Coli* (66 %) και του *P. aeruginosa* (30 %). Σε μια άλλη μελέτη βιοεπιφανειοδραστικό που προέρχεται από *Lactobacillus sp.* , το *CV8LAC* ανέστειλε την προσκόλληση δύο παθογόνων στελεχών παραγωγής βιοφίλμ *Candida albicans* έως και 82% και 81% αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, αυτά τα βιοεπιφανειοδραστικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταστροφή παθογόνων βιοφίλμ. (Muafo,2022).

Ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Τα αντιμικροβιακά μέσα έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά για τον έλεγχο και τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Η υπερβολική χρήση τέτοιων αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά. Οι μηχανισμοί δράσης των αντιμικροβιακών ενώσεων περιλαμβάνουν την αναστολή της πρωτεΐνης, του κυτταρικού τοιχώματος, τη ρήξη βακτηριακών μεμβρανών και σε ορισμένες περιπτώσεις παρεμβολή στη μεταβολική οδό. Τα ανθεκτικά βακτήρια χρησιμοποιούν διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς για την προστασία τους από αντιμικροβιακές ενώσεις, π.χ. ενζυμική αποικοδόμηση, τροποποίηση στόχου, αδρανοποίηση ή αλλοίωση αντιμικροβιακών ενώσεων κ.λπ. (Muafo,2022)

Η αντοχή πολλών φαρμάκων στα μικρόβια οδήγησε τους ερευνητές να αναζητήσουν εναλλακτικές αντιμικροβιακές ενώσεις για βιοϊατρικές και θεραπευτικές

εφαρμογές καθώς και για τη βιομηχανία τροφίμων. Σε μια μελέτη, η αντιμικροβιακή δράση ενός βιολογικού επιφανειοδραστικού προερχόμενου από *L. paracasei* sp. προσδιορίστηκε με τη μέθοδο μικροαραίωσης έναντι του *Staphylococcus aureus*, του παθογόνου *C. albicans*, του *Staphylococcus epidermidis*, του *Streptococcus agalactiae* και του *E. Coli*, προτείνοντας τη χρήση του ως εναλλακτικό αντιβιοτικό κατά κλινικά παθογόνα (Gudina EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR ,2010) . Οι Mandal et al. περιέγραψαν τύπους αντιμικροβιακών λιποπεπτιδίων από τα γένη *Citrobacter* και *Enterobacter* με δυνατότητα φαρμακευτικής, καλλυντικής εφαρμογής και βιοελέγχου. Από την άλλη, οι in vitro αντιμικροβιακές ιδιότητες του βιοεπιφανειοδραστικού που δεσμεύεται από κύτταρα που παράγονται από τους *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus jensenii*, αξιολογήθηκαν έναντι πολυανθεκτικών στελεχών που αποκάλυψαν βλάβη του κυτταρικού τοιχώματος στο *S. aureus* και αξιοσημείωτη βλάβη της μεμβράνης στο *A. baumannii* (Sambanthamoorthy K, Feng X, Patel R, Patel S, Paranaivitana,2014). Οι Saravanakumari και Mani (2010) χαρακτήρισαν τα γλυκολιπίδια από το *L. lactis* με ευρεία αντιβακτηριακή δράση. Αυτά τα βιοεπιφανειοδραστικά είχαν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες και μπορούσαν να χορηγηθούν με ασφάλεια από το δέρμα ή από το στόμα. Με βάση αυτές τις μελέτες διαφαίνεται η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών με προβιοτικά χαρακτηριστικά ως η κατάλληλη εναλλακτική λύση στη φαρμακοβιομηχανία που θα παρεμποδίσει πολλές κλινικές λοιμώξεις. Ενώ παράλληλα θα δημιουργεί λιγότερες ή καθόλου απειλητικές παρενέργειες.

1.5 Σύγκριση βιοεπιφανειοδραστικών με χημικά παραγόμενες ουσίες

Τα πλεονεκτήματα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έναντι των χημικά παραγόμενων επιγραμματικά είναι τα εξής: χαμηλή τοξικότητα, χαμηλή υπολειμματικότητα και βιοδιασπώμενα, φιλικά προς το περιβάλλον και παράγονται από ανανεώσιμες πηγές. Επιπλέον είναι εκλεκτικά και μας δίνουν τη δυνατότητα χρήσης τους σε εύρος συνθηκών καθώς παραμένουν σταθερά (συνθήκες θερμοκρασίας, pH και αλάτων) (Sharma, 2015). Τέλος η ποικιλία στη χημική δομή τους αποτελεί ένα ακόμη πλεονέκτημα σε σύγκριση με τα συνθετικά καθώς μας δίνουν ορισμένους τύπους επιφανειοδραστικών με χαρακτηριστικά που δεν μπορούν να παραχθούν με χημικές διεργασίες. (Hartel, 2001).

Πολλοί από τους μικροοργανισμούς που ως τώρα έχει διαπιστωθεί ότι παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές μπορεί να είναι παθογόνοι για τον ανθρώπινο

οργανισμό και έτσι είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα τροφίμων. Γι' αυτό το ενδιαφέρον της έρευνας εστιάζει στη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από στελέχη μη παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες και γαλακτωματοποιητές αν και δεν αποκλίνουν πολύ από την φυσικοχημική δομή των συνθετικών παράγονται ως εναλλακτική για τις χημικώς συντιθέμενες επιφανειοδραστικές με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές έχουν επίσης πολλαπλές βιολογικές επιφανειοδραστικές εφαρμογές. Βρίσκονται υπό τη μορφή γαλακτώματος σε αρκετά από τα τρόφιμα, τα προϊόντα περιποίησης, τα καλλυντικά και τα φαρμακευτικά προϊόντα που είναι διαθέσιμα στο καταναλωτικό κοινό. Ωστόσο, υπάρχει ενδιαφέρον και για νέες και καινοτόμες χρήσεις των επιφανειοδραστικών ουσιών που συνιστά μία παραγωγή οικονομικά συμφέρουσα και να υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας μεγάλων ποσοτήτων. Ειδικά στη βιομηχανία τροφίμων, νέες και ασφαλείς επιφανειοδραστικές ουσίες είναι περισσότερο αναγκαίες από ποτέ διότι αυξάνονται οι απαιτήσεις των καταναλωτών και μέχρι τώρα είναι διαθέσιμος μικρός αριθμός βιοεπιφανειοδραστικών και γενικότερα γαλακτωματοποιητών που μπορούν να αξιοποιηθούν με ασφάλεια για τον καταναλωτή. (Sharma 2016).

Οι βιομηχανίες τα τελευταία χρόνια στρέφουν το ενδιαφέρον τους στις βιοεπιφανειοδραστικές έναντι των χημικά παραγόμενων ουσιών παρά το υψηλότερο κόστος τους. Μάλιστα έχουν εφεύρει οι ίδιες καινοτόμες εφαρμογές ενώ παράλληλα χρηματοδοτούνται και κρατικές έρευνες με στόχο την μείωση αυτού του κόστους. Ένας τρόπος που εφαρμόζεται σταδιακά είναι η κατανάλωση βιώσιμων υποστρωμάτων (π.χ. αγροβιομηχανικά υποπροϊόντα ή απόβλητα) έχοντας το διπλό πλεονέκτημα και να μειωθεί το κόστος αλλά και να αξιοποιηθούν τα απόβλητα.

1.6. Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από προβιοτικά βακτήρια

. Η λέξη προβιοτικό είναι σύνθετη και προέρχεται από το λατινικό «pro» που σημαίνει υπέρ και το βίος, δηλαδή ζωή. Τα προβιοτικά, λοιπόν, είναι μικροοργανισμοί «υπέρ της ζωής». Κατά τον Fuller, «τα προβιοτικά, είναι ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα που ευεργετικά επηρεάζουν και βελτιώνουν την εντερική μικροχλωρίδα». Κατά τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών και κατά την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) ως προβιοτικά ορίζονται

«οι ζωντανοί μικροοργανισμοί (βακτήρια ή ζύμες), οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκή αριθμό παρέχουν ένα ή περισσότερα αποδεδειγμένα οφέλη για την υγεία του ξενιστή». Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) θεωρούνται τα σημαντικότερα προβιοτικά με ευεργετικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα (GI). Αυτό συμβαίνει επειδή μπορούν να μένουν ζωντανοί μέσα στο έντερο και να παρέχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία του ξενιστή ως αντιβιοτικά και θεραπευτικά. (Burgain et al. ,2011).

Σήμερα, τα προβιοτικά προϊόντα διευρύνουν διαρκώς το μερίδιό τους στη αγορά κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής. Στην Ευρώπη συγκεκριμένα, ο τομέας των γαλακτοκομικών καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εστιάζεται στα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Gasbarrini,2016).

1.6.1 Κατσικίσιο γάλα

Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση κατσικίσιου γάλακτος στην Ελλάδα κερδίζει ολοένα και μεγαλύτερο έδαφος, παρότι σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η πιο διαδεδομένη από οποιαδήποτε άλλη μορφή γάλατος εδώ και χρόνια. Πλέον, και στη χώρα μας, έχει αναγνωριστεί η θρεπτική του αξία, τα οφέλη του στην υγεία, αλλά και τα προτερήματά του σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα.

Μερικά από τα οφέλη του κατσικίσιου γάλακτος σε σύγκριση και με το αγελαδινό είναι:

- Το κατσικίσιο γάλα είναι μια πολύ πλούσια πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, περιέχοντας όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία αποτελούν βασικά δομικά στοιχεία των κυττάρων, των ιστών, των μυών και των οστών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και στην υγεία των καταναλωτών.
- Περιέχει λιγότερη λακτόζη σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα κάνοντας το πιο εύπεπτο για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη και σύνδρομο ευερέθιστου

εντέρου. Η λακτόζη δε, μειώνεται ακόμη περισσότερο στα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος, όπως είναι το τυρί.

- Το αγελαδινό γάλα περιέχει τις πρωτεΐνες A2 και A1 βήτα-καζεΐνη, ενώ το κατσικίσιο τυρί μόνο A2 βήτα-καζεΐνη η οποία σύμφωνα με μελέτες, υπερτερεί και είναι πιο εύπεπτη σε σχέση με την A1 βήτα-καζεΐνη του αγελαδινού γάλακτος.
- Περιέχει περισσότερο ασβέστιο και βιταμίνη A σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Ένα ποτήρι κατσικίσιο γάλα ή μια μερίδα κατσικίσιου τυριού μπορεί να καλύψει μέχρι και το 40% των ημερήσιων αναγκών σε ασβέστιο.
- Είναι πλούσιο σε ψευδάργυρο, ένα από τα πιο σημαντικά ιχνοστοιχεία. Ο ψευδάργυρος βοηθάει στην διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του οργανισμού, και πιο συγκεκριμένα, βελτιώνει την αναπαραγωγική υγεία, βελτιώνει την όραση, την υγεία του δέρματος, των μαλλιών και των οστών.
- Το κατσικίσιο τυρί είναι μια καλή πηγή σεληνίου, ενός από τα βασικότερα ιχνοστοιχεία με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Το σελήνιο βοηθά το σώμα σας να μειώσει τις βλάβες που προκαλεί στο DNA μας το οξειδωτικό στρες, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης παθήσεων, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νόσοι του θυρεοειδούς και κάποιες μορφές καρκίνου. (Κοντοδήμου Α., 2021)

1.7. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών

Η χρήση μικροοργανισμών ή προϊόντων τους σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες έχουν ως βασικό στόχο τον περιορισμό της ρύπανσης και της υποβάθμισης του περιβάλλοντος, διότι η χρήση χημικών επιφανειοδραστικών οδηγεί σε συσσώρευση αποβλήτων στο περιβάλλον. Με την χρήση ανανεώσιμων πηγών και την παραγωγή προϊόντων φιλικών προς το περιβάλλον επιτυγχάνεται και η βιοαποικοδόμηση τους με αποτέλεσμα τον περιορισμό αποβλήτων. Όπως έχει προαναφερθεί, ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια που παρεμποδίζουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, για τον βιομηχανικό τομέα, είναι το υψηλό κόστος παραγωγής. Μία παράμετρος αυτού του μείζονος ζητήματος αποτελεί το θρεπτικό υπόστρωμα, η ανάκτηση του, ο καθαρισμός του και οι χαμηλές αποδόσεις που εμφανίζονται στις διεργασίες της ζύμωσης. Στην επίλυση του προβλήματος εστιάζει και η συγκεκριμένη έρευνα η οποία για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών,

αξιοποιεί ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Μερικές από αυτές τις πηγές είναι και τα αγροτικά απόβλητα τα οποία συμβάλλουν και στον κύκλο της βιοοικονομίας. Κατά αυτόν τον τρόπο τα ίδια τα απόβλητα χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά υποστρώματα χαμηλού κόστους στις διεργασίες μετατροπής, ως αντικαταστάτες των εμπορικών πρώτων υλών που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια. [9]

1.7.1. Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα

Πρόκειται για απόβλητα τα οποία βρίσκουν εφαρμογή ως ισχυρά υποστρώματα στη βιομηχανία, για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Προέρχονται από μεταποιητικές βιομηχανίες και εμφανίζουν την ίδια ισχύ με τα υποστρώματα χαμηλού κόστους. Στην κατηγορία των γεωργικών αποβλήτων κατατάσσεται το ρυζόνερο και το νερό που προέρχεται από την επεξεργασία δημητριακών, οσπρίων και μελάσας και όλα αποτελούν εξαιρετικά υποστρώματα για την παραγωγή των συγκεκριμένων ουσιών.

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 αποτελούν το πιο γνωστό αμυλώδες λαχανικό και η θρεπτική τους αξία είναι υψηλή αφού αποτελούνται από 80% νερό, 17% υδατάνθρακες, 2% πρωτεΐνες, 0,1% λιπαρά και 0,9% βιταμίνες, ανόργανα μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Ωστόσο, τα θρεπτικά της συστατικά επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο παρασκευής της, καθώς και από τις συνθήκες και τη διάρκεια συντήρησης της. Το στέλεχος *B. subtilis* που προέρχεται από τα απόβλητα της επεξεργασίας πατάτας χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα. (Noah KS, 2005).

1.7.2 Απόβλητα και υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων

i. Υπολείμματα λαδιών

Ένας εναλλακτικός τρόπος παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να είναι το τηγανέλαιο. Το τηγανέλαιο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες τόσο από τη βιομηχανία τροφίμων όσο και από την οικιακή χρήση και σε αυτό οφείλεται το γεγονός ότι αποτελεί μία οικονομική πρώτη ύλη παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. (Pekin G, 2005). Πέρα από το τηγανέλαιο και άλλα λάδια φυτικής προελεύσεως (ηέλαιο, σογιέλαιο) χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό. (Rahman 2002). Επιπλέον,

οι περισσότερες βιομηχανίες τροφίμων παράγουν απόβλητα λαδιών που καταλήγουν να απορρίπτονται στο περιβάλλον. Με τη χρήση τους ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών αξιοποιούνται κατάλληλα και δεν αποτελούν απορρίμματα. Απόβλητα λάδια που παράγονται από οικιακές χρήσεις, φυτικά έλαια διυλιστήρια καθώς και διυλιστήρια πετρελαίου ή βιομηχανίες σαπουνιού έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι κατάλληλα για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών μέσω μικροβιακής ζύμωσης (Benincasa M, 2002; Bednarski W, 2004; Nitschke M 2003).

ii. Μελάσα

Η μελάσα είναι μία φυσική γλυκαντική ουσία, με μορφή παχύρευστου σιροπιού, συνιστά το κύριο παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής ζάχαρης από ζαχαρότευτλα (Pena et all. 2003) και ένα από τα παραπροϊόντα της παραγωγής ζάχαρης από τα ζαχαροκάλαμα και τα τεύτλα (Sirionuntapiboon et all. 2004). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί για ζάχαρη προσφέροντας πολλά οφέλη στην υγεία μας. Καθώς, είναι πλούσιο σε οργανική ύλη, αυτό το παραπροϊόν χρησιμοποιείται επικερδώς ως υπόστρωμα σε βιομηχανικές διαδικασίες και στη βιοτεχνολογία. Έχει αναφερθεί η χρήση της στη παραγωγή ραμνολιπιδίων μέσω του βακτηρίου *P. Aeruginosa* (στέλεχος GS3) καθώς και του στελέχους *Serratia rubidea* με μέγιστη παραγωγή με τον συνδυασμό 7% (v/v) μελάσα και 0,5% (v/v) απόβλητα υγρών από καλαμπόκι. (Deak NA, Johnson LA, 2006.)

iii. Τυρόγαλο

Το τυρόγαλα έχει διάφορες χρήσεις, μεταξύ άλλων στη γαλακτοβιομηχανία ως πρόσθετο στη διαδικασία τυποποίησης γάλακτος, ως διατροφικό συμπλήρωμα, καθώς και ως πηγή πρωτεϊνών. Με την κατάλληλη επεξεργασία του τυρόγαλου προκύπτουν τα νωπά τυριά τύπου μυζήθρας. Το τυρόγαλα αποτελεί απόβλητο της τυροκομικής βιομηχανίας, ιδιαίτερα επιβλαβές για το περιβάλλον όταν δεν γίνεται σωστή διαχείρισή του. Κατά την τυροκόμηση του αγελαδινού γάλακτος, το 10-20% των συνολικών συστατικών του μεταφέρεται στο τυρί και περίπου το 80-90% στο τυρόγαλα, που αποτελεί το υποπροϊόν. Έτσι έχουμε μία άνιση κατανομή των θρεπτικών αφού στο τυρόγαλα μένει σε μεγάλο ποσοστό το νερό και τα υδατοδιαλυτά συστατικά ενώ στο τυρί περνάνε οι πρωτεΐνες και το λίπος. Τα ποσοστά αυτά εξαρτώνται βέβαια και από το είδος του τυριού που παράγεται και την μέθοδο που εφαρμόζεται κάθε φορά. Επομένως, το τυρόγαλα περιέχει μεγάλη ποικιλία οργανικών και ανόργανων ουσιών

και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε λακτόζη. Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος (whey proteins) έχουν μεγαλύτερη θρεπτική αξία από την καζεΐνη του τυριού γιατί έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η λυσίνη (8 Lys /100 g pr) και σε μεγαλύτερη αναλογία. Σε αυτό μεταφέρεται κατά την τυροκόμηση περίπου το 50% των στερεών συστατικών του αγελαδινού, το 45% του γίδινου και το 40% του πρόβειου γάλακτος. Έτσι προκύπτει ότι το πρόβειο τυρόγαλα είναι σημαντικά πιο πλούσιο σε λίπος και πρωτεΐνες από το αγελαδινό. Στην περίπτωση των σκληρών τυριών μεταφέρεται περισσότερο λίπος στο τυρόγαλα απ' ό,τι των μαλακών. Γενικότερα, φαίνεται ότι από την παραγωγή 1 kg τυριού προκύπτουν περίπου 6 kg τυρογάλακτος.

Το τυρόγαλο που δεν χρησιμοποιείται καταλήγει να απορρίπτεται σε λίμνες, ποταμούς και θάλασσες. Διαπιστώθηκε όμως ότι τα ψάρια να πάθαιναν ασφυξία και πέθαιναν μαζικά. Έτσι, η ενέργεια αυτή, αποδείχθηκε σύντομα επιβλαβής, καθώς η μαζική απόρριψη τυρογάλακτος στους ποταμούς και στις λίμνες δέσμευε σημαντική ποσότητα του οξυγόνου που χρειαζόνταν για την αποσύνθεση της οργανικής του ουσίας και δεν κάλυπτε τις ανάγκες των ψαριών για οξυγόνο. Για τον λόγο αυτό το τυρόγαλα αποτελούσε ουσιαστικά ένα υποπροϊόν που δεν μπορούσε να αξιοποιηθεί και οι βιομηχανίες σπαταλούσαν χρόνο και χρήμα για να το επεξεργαστούν πριν καταλήξει στο περιβάλλον. Μάλιστα σε πολλές χώρες απαγορεύεται η απόρριψή του στο αποχετευτικό δίκτυο των πόλεων, εάν δεν έχει προηγηθεί πρώτα επεξεργασία για να μειωθεί η οργανική του ουσία. 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. Η ρύπανση που προκαλεί είναι ισοδύναμη με τα απόβλητα 0,7 ατόμων. (Εμμανουήλ Μιχ. Ανυφαντάκης).

Το τυρόγαλο συνήθως είτε απορρίπτεται, είτε χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στη διατροφή ζώων, κυρίως χοίρων με νωπό τυρόγαλα. Χρησιμοποιείται επίσης, για την παραγωγή τυριών, βουτύρου ή και για προϊόντα τυρογάλακτος (σκόνες, πρωτεΐνες, λακτόζη). Σήμερα όμως είναι σημαντικό να μπορούμε να το αξιοποιήσουμε και στη βιοτεχνολογία για δικό μας όφελος στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας με απώτερο στόχο να παράγονται βελτιστοποιημένα προϊόντα και ευεργετικά για την υγεία των καταναλωτών. Η διαχείριση και η αξιοποίηση του τυρογάλακτος βασίζονται κυρίως στην εφαρμογή φυσικοχημικών και βιολογικών μεταχειρίσεων. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι 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). Σήμερα, η αξιοποίηση του τυρογάλακτος έχει εξελιχθεί ραγδαία, γεγονός που αποδεικνύεται από την παρασκευή μεγάλης ποικιλίας προϊόντων με εφαρμογή νέων εξελιγμένων τεχνολογιών. (Ανυφαντάκης, 1998).

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. Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί έχει γίνει γνωστή η χρήση του τυρογάλακτος και ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (Rodrigues et al. 2006, Gudina et al., 2012).

1.7.3 Βιομηχανία γάλακτος

Το τυρόγαλο από τις γαλακτοβιομηχανίες είναι επίσης ένα φθινό και κατάλληλο υπόστρωμα για ζύμωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ένα κιλό τυρί θα μας δώσει περίπου 6 λίτρα ορού γάλακτος τα οποία δεν αξιοποιούνται και καταλήγουν να διατίθενται στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων. Πολλά από τα θρεπτικά συστατικά του τυριού που παράγεται μεταφέρονται στο υγρό που το περιβάλλει. Επομένως, ο ορός αυτός περιέχει πολύτιμα θρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα και βιταμίνες). Συμπερασματικά, το τυρόγαλο, γνωστό και ως λύματα γαλακτοκομικών προϊόντων υποστηρίζει την καλή μικροβιακή ανάπτυξη και δύναται με την χρήση κατάλληλων εφαρμογών να παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. (Dubey K, Juwarkar A, 2004; Siddhartha GV 2009).

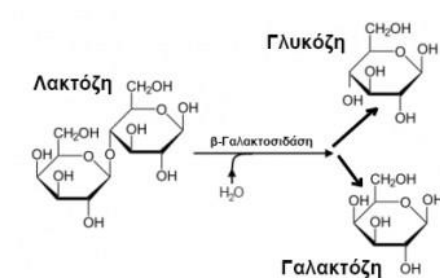
1.8 Αξιοποίηση γαλακτικών βακτηρίων

Υπάρχουν διάφοροι τύποι μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, με κυριότερα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB). Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι το μεγαλύτερο γένος βακτηρίων που αποτελείται από τουλάχιστον 50 είδη. Το LAB περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη *Lactobacillus*, ορισμένα είδη *Bifidobacteria*, *Enterococcus* και *Streptococcus* (Argyri, Zoumpoulou et al., 2013). Τα περισσότερα κύρια είδη LAB που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά

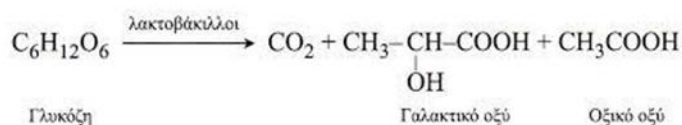
είναι ο *Lactobacillus acidophilus*, ο *Lactobacillus delbrueckii*, ο *Lactobacillus paracasei*, ο *Lactobacillus salivarius*, ο *Lactobacillus lactis*, ο *Lactobacillus plantarum*, ο *Enterococcus faecalis*, ο *Streptobacillus* και ο στρεπτόκοκκος. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη βακτηρίων βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο (Fuller R.,1989). Η μόνη προβιοτική ζύμη που χρησιμοποιείται είναι ο μη παθογόνος *Saccharomyces boulardii* (Kelesidis T.,2012).

1.8.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέος

Για να παραχθεί τελικά το γαλακτικό οξύ πρέπει να προηγηθεί κατανάλωση γλυκόζης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Η γλυκόζη προκύπτει όταν τα γαλακτικά βακτήρια με τη βοήθεια της β- γαλακτοσιδάσης (λακτάσης) διασπούν τη λακτόζη στο εσωτερικό των κυττάρων τους και λαμβάνουμε ως προϊόντα γλυκόζη και γαλακτόζη. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται στα ακόλουθα σχήματα:



Εικόνα 4 : Λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη (Admin,2019)



Εικόνα 5 : Γλυκόζη σε γαλακτικό και οξικό οξύ (ΒΛΑΜΗΣ Α.)

1.9. Προοπτικές των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Οι μελλοντικές προοπτικές δείχνουν ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες με αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και σταθεροποιητικές ιδιότητες θα αποδειχθούν ότι επηρεάζουν σημαντικά τους κλάδους στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή και θα δοθεί

έμφαση στη βελτίωση της απόδοσης σε μια οικονομικά βιώσιμη μεθοδολογία (Daniele Focosi, 2022). Ενδεικτικά, στον τομέα των φαρμάκων γνωρίζουμε ότι τα συμβατικά αντιμικροβιακά φάρμακα μπορεί να χάσουν σταδιακά την αποτελεσματικότητά τους λόγω της μικροβιακής προσαρμογής στα αντιβιοτικά. [12] Ενώ, οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες με σημαντική αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για αποτελεσματικές θεραπευτικές εφαρμογές σε βάθος χρόνων. Επιπρόσθετα, η γαλακτωματοποίηση των ελαίων και του λίπους είναι ζωτικής σημασίας στην αρτοποιία και η προσθήκη υπαρχόντων γαλακτωματοποιητικών μέσων δεν είναι αρκετή για να καλύψει τις ολοένα και αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών. Έτσι γίνεται προσπάθεια τα μικροβιακά επιφανειοδραστικά μέσα να παράγονται με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων, σταθερών γαλακτωμάτων και πηκτικών παραγόντων που μπορούν να βελτιώσουν την υφή των σκευασμάτων στην αρτοποιία. Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για μελλοντικές προοπτικές στην επεξεργασία τροφίμων, στα καλλυντικά σκευάσματα και ως ενεργά συστατικά τροφίμων.

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά και απαιτείται συνδυασμός πολλών μεθόδων διαλογής για να επιβεβαιωθεί η παραγωγή τους. Αυτά τα βιοεπιφανειοδραστικά ήταν ένα πολύπλοκο μείγμα πολλαπλών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των φωσφορικών αλάτων. Ως εκ τούτου, οι χημικές δομές των περισσότερων βιοεπιφανειοδραστικών που προέρχονται από LAB δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Η διαδικασία καθαρισμού είναι ένα σημαντικό βήμα που προηγείται του χαρακτηρισμού των βιοεπιφανειοδραστικών και η προκαταρκτική TLC και η βιοχημική ανάλυση μπορούν να βελτιώσουν τον καθαρισμό. Ένας συνδυασμός αρκετών χρωματογραφικών και φασματικών τεχνικών μπορεί να επιτρέψει τη δομική αποσαφήνιση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ανεξάρτητα από τη σύνθετη φύση τους. Ως εκ τούτου, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι ο δομικός χαρακτηρισμός των βιοτασιενεργών γαλακτοβακίλλων απαιτούσε έναν συνδυασμό βιοχημικών, ιοντικών και στοιχειακών αναλύσεων και αρκετών χρωματογραφικών και φασματικών τεχνικών. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τη βελτίωση και την αποσαφήνιση ορισμένων πτυχών των τεχνικών καθαρισμού και χαρακτηρισμού. Δεδομένου ότι τα βιοεπιφανειοδραστικά που προέρχονται από το LAB έχουν ιδιότητες που επιτρέπουν τη χρήση τους σε διάφορα βιομηχανικά πεδία, η δομική αποσαφήνιση αυτών των

βιοεπιφανειοδραστικών είναι απαραίτητη για την αύξηση της αξίας τους. Ως εκ τούτου, μελέτες που καταδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της δομής και της λειτουργίας των βιοεπιφανειοδραστικών από το LAB που αναφέρονται σπάνια στη βιβλιογραφία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω έρευνα. Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι μοναδικά μικροβιακά προϊόντα που παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μπορεί να γίνουν μελλοντικά υποκατάστατα των χημικά παραγόμενων. Λόγω των ξεχωριστών χαρακτηριστικών τους σε σύγκριση με τα χημικά παραγόμενα επιφανειοδραστικά, τα μικροβιακά επιφανειοδραστικά έχουν πρόσφατα κερδίσει σημαντική επιστημονική προσοχή. Η μη τοξικότητα, η βιοαποδομησιμότητα, η συμβατότητα με βιοσυντήρηση και η σύνθεση από φυσικά υποστρώματα είναι μερικά από τα διακριτικά χαρακτηριστικά των μικροβιακών τασιενεργών. Αυτή η ανασκόπηση, δίνοντας έμφαση στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη διαλογή, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται από το LAB, μπορεί να προκαλέσει ενδιαφέρον για μελέτες κλιμάκωσης και εφαρμοσμένη έρευνα για τα βιοεπιφανειοδραστικά. (H.T Mouafo et al., 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργαστηριακή μελέτη έχει ως απώτερο στόχο την διεύρυνση χρήσης γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με την εφαρμογή ποικίλων μεθόδων. 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 καθώς 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 εξωκυττάρια επιφανειοδραστικές όσο και για αυτές που δύνανται να παράγονται πάνω στα βακτηριακά κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη, η καινοτομία έγκειται στο γεγονός ότι αξιοποιείται μεγάλος αριθμός στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές, εκτός των γαλακτοκομικών προϊόντων και αξιολογείται η ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά ενεργά. Ταυτόχρονα, έχοντας ως βάση προηγούμενη μελέτη, προκύπτουν διάφορες εφαρμογές αυτών των βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών σε τρόφιμα, και ειδικότερα σε γαλακτοκομικό προϊόν, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα να επανεισαχθούν αυτά τα συστατικά που είχαν απορριφθεί ως απόβλητα, στην ίδια βιομηχανία μετά από επεξεργασία στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας. Επιπλέον, γίνεται και σύγκριση μεταξύ των στελεχών με βάση της ποσοτική τους παραγωγική διάθεση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μικροβιακά στελέχη-Γαλακτικά βακτήρια

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από διάφορες πηγές και ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Τα στελέχη παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και εν συνεχεία θα αναφέρονται με τον κωδικό που έχει αποδοθεί σε κάθε στέλεχος.

Πίνακας 1 : Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη

<u>Κωδική ονομασία στελέχους</u>	<u>Γένος και είδος στελέχους</u>
OLXI_2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_3	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
OLXI_8	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
VS 217	<i>Pediococcus acidilactici</i>
RS1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
RS2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
RS3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
RS4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
CB1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
CH1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
MPB5	<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>

OLXAL 3	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
ORE 5	<i>Not determined (n.d.)</i>
ALTH 4	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
OLTH 1	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
OLTH 3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
OLTH 1C	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
OLTH 4C	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
OLPIL 1	<i>n.d.</i>
OLPIL 1C	<i>n.d.</i>
OLS 1.2	<i>Levilactobacillus brevis</i>
PE 8	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
ΠΕ 10	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>

Η διατήρηση των στελεχών γινόταν σε ειδικού τύπου φιαλίδια (cryovials), με χωρητικότητα όγκου 2 mL στους -80°C, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco™, USA), εμπλουτισμένο με 25% γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121°C, για 20 λεπτά). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ειδικότερα πριν την έναρξη των πειραμάτων, πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας των καλλιεργειών με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς σε τρυβλίο. Εν συνεχεία, ακολουθούσε ο εμβολιασμός των προκαλλιεργειών υπό ασηπτικές συνθήκες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 mL αποστειρωμένου υποστρώματος MRS. Η επώαση των προκαλλιεργειών έγινε σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 12 ώρες.

3.2. Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων

Η αξιολόγηση των γαλακτικών βακτηρίων να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Αρχικά, εφαρμόστηκε συνθετικό υπόστρωμα με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (θρεπτικό M2), η σύσταση του οποίου παρατίθεται παρακάτω στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 : Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2)

<u>Θρεπτικό υπόστρωμα M2</u>	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης	20
Θειικό αμμώνιο	8
Επταένυδρο φωσφορικό κάλιο	5
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο	1
Γλυκόζη	0.3
Όξινο ανθρακικό νάτριο	5

Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το αποπροτεϊνωμένο τυρόγαλα, το οποίο περιέχει ως κύρια πηγή άνθρακα τη λακτόζη και αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας τροφίμων. Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρελήφθη από το Τυροκομείο Γαλιατσάτος που εδρεύει στην Κεφαλονιά και προήλθε μετά από την παραγωγή μυζήθρας. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το τυρόγαλα θερμαίνεται στους 55- 60°C. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται η τιμή pH=10 με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) και παραμένει σε αυτό για 3 λεπτά. Ακολουθεί ρύθμιση του pH=3,5 και παραμονή για 5 λεπτά με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl). Με το πέρας και των 5 λεπτών, προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα NaOH (5M) ώστε η τελική τιμή pH του τυρογάλακτος να είναι 4,7 το οποίο αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Στο τελικό βήμα, προστίθεται διάλυμα ZnSO₄ στο τυρόγαλα ώστε η τελική συγκέντρωση Zn σε αυτό να είναι να είναι 10 mM. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 121°C, για 20 λεπτά και μετά από αυτό το βήμα φυγοκεντρείται (4,200 g/ 20 λεπτά /4°C ,Rotina 420R, Hettich Zentrifugen). Το υπερκείμενο διηθείται υπό κενό ώστε να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και η διαύγαση του τυρογάλακτος. Το διαυγές πλέον τυρόγαλα, αραιώνεται κατάλληλα ώστε η αρχική συγκέντρωση λακτόζης να αντιστοιχεί περί τα 20 g/L. Και στις δύο περιπτώσεις θρεπτικών υποστρωμάτων (συνθετικό και τυρόγαλο), ρυθμίζεται η τιμή pH=6,8 και τα θρεπτικά αποστειρώνονται

σε αυτόκαυστο (20 minutes, 121°C). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες, σε τελικό όγκο 100 mL, ενώ το εμβόλιο της προκαλλιέργειας ήταν το 5% (vol/vol) του τελικού όγκου.



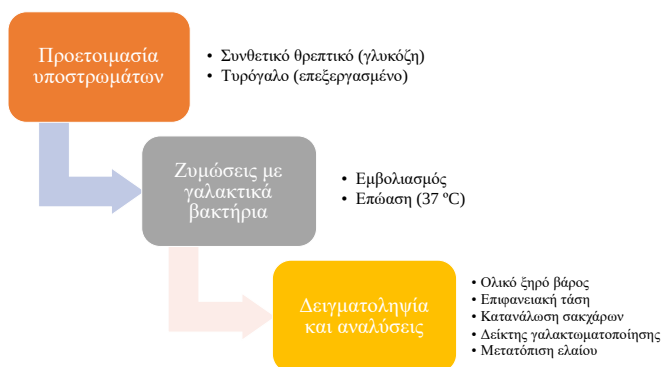
Εικόνα 6 : Κωνικές φιάλες με θρεπτικό υπόστρωμα M2 μετά την αποστείρωση

3.3. Διαδικασία μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Όπως προαναφέρθηκε αρχικά προετοιμάστηκαν οι προκαλλιέργειες των γαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες επώαστηκαν για 12 h (overnight) σε κλίβανο επώασης στους 37 °C. Εν συνεχεία, οι προκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των κύριων καλλιεργειών. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε υπο ασηπτικές συνθήκες. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 5% (ygl/vol) επί του όγκου της κύριας καλλιέργειας.

Μετά τον εμβολιασμό οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (37°C). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ελήφθησαν δείγματα μετά από 24 και 72 ώρες, ενώ η τιμή pH μετρήθηκε και διορθώθηκε καθημερινά ώστε να είναι στην τιμή 6,7. Το πρώτο βήμα της δειγματοληψίας ήταν η φυγοκέντρωση του συνολικού όγκου ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο από τα κύτταρα και να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες

αναλύσεις. Σε κάθε σημείο ζύμωσης μετρήθηκε η βιομάζα ή ολικό ξηρό βάρος (total dry weight, TDW) και η κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών έγινε με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, τόσο από το υπερκείμενο όσο και από το εκχύλισμα των κυττάρων, του δείκτη γαλακτωματοποίησης και της μετατόπισης ελαίου. Ο λόγος έγκειται γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια μπορεί να παράγουν στο βιοεπιφανειοδραστικές εξωκυττάρια (στο υπερκείμενο) ή συνδεδεμένες στα κύτταρα. Ειδικότερα, η δεύτερη περίπτωση περιγράφεται στην επόμενη ενότητα (Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών). Η επόμενη εικόνα περιγράφει σχηματικά την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό.



Εικόνα 7 : Πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη

3.4. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών

Όπως αναφέρθηκε, σε κάθε δειγματοληψία πρώτο βήμα αποτέλεσε ο διαχωρισμός του υγρού από τα κύτταρα μέσω φυγοκέντρωσης (6450 g, 15 min, Rotina 420R, Hettich, Germany). Ακολούθησε προσθήκη H₂O, ανάδευση και εκ νέου διαχωρισμός μέσω φυγοκέντρωσης για τον καθαρισμό των κυττάρων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δεύτερη φορά και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH 7,0 σε αναλογία όγκου δείγματος: όγκου PBS ήταν (6:1 v/v). Η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών πραγματοποιήθηκε στους 4°C για 12 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας αυτού του βήματος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση των κυττάρων και 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). Το διάλυμα που προέκυψε μετά και τον καθαρισμό από τις μεμβράνες χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης, του δείκτη γαλακτωματοποίησης και της μετατόπισης ελαίου.



Εικόνα 8 : Μεμβράνες διαπίδυσης

3.5. Αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1. Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους (TDW, g/L)

Η μέτρηση του ολικού ξηρού βάρους (ή βιομάζα) σχετίζεται με την αξιολόγηση της μικροβιακής ανάπτυξης κατά τη διεργασία της ζύμωσης. Για κάθε δείγμα (δηλαδή στις 24 και 72 ώρες ζύμωσης), λαμβάνονται σύνολο 4 mL (για δύο επαναλήψεις των 2 mL) και τοποθετούνται σε προζυγισμένα Eppendorf των 2 mL. Τα δείγματα τοποθετούνται σε φυγόκεντρο (Nuve NF 048) για 10 λεπτά, 5200 στροφές για τον διαχωρισμό των κυττάρων από το υγρό της ζύμωσης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό (dH₂O) για να απομακρυνθούν υπολείμματα του θρεπτικού υποστρώματος. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση, το νερό απορρίπτεται και τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο στους 65°C (24 h) έως σταθερού βάρους. Τα δείγματα ζυγίζονται και υπολογίζεται η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους η οποία βασίζεται στη διαφορά βάρους και εκφράζεται σε γραμμάρια ανά λίτρο (g/L). Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο που προήλθε από τις δύο μετρήσεις.

3.5.2. Μέτρηση υπολειπόμενων σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος

Ο προσδιορισμός της κατανάλωσης των σακχάρων και της παραγωγής γαλακτικού οξέος προσδιορίστηκαν μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απορρόφησης (HPLC, Agilent). Η μέτρηση των σακχάρων γίνεται στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης το

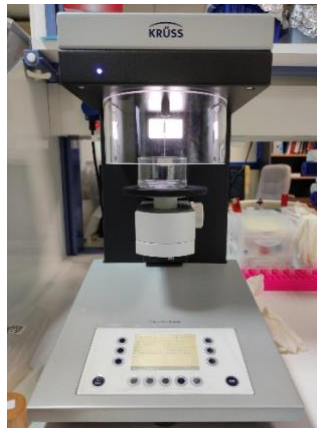
οποίο λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση στα 2 χρονικά σημεία (24 και 72 ώρες ζύμωσης). Πριν την ανάλυση, τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα και φιλτράρονται με ειδικό φίλτρο Whatman 0,2 μM και τοποθετούνται σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια (vials). Χρησιμοποιήθηκε στήλη ROA-organic acid H^+ (300 μήκος x 7.8 mm εσωτερική διάμετρο, Phenomenex), η οποία είναι συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer) και ροή 0,6 mL/min και θερμοκρασία φούρνου στους 65°C ενώ την κινητή φάση της ανάλυσης αποτελεί το H_2SO_4 10 mM.

3.6. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ενδέχεται, να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες συνδεδεμένες ή μη συνδεδεμένες με το κύτταρο. Η αξιολόγηση αυτής της δυνατότητας έγινε με συγκεκριμένες αναλύσεις οι οποίες στηρίχτηκαν σε προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας. Οι μέθοδοι έγιναν 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

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιβλιογραφία και στηρίζεται στη μείωση της επιφανειακής τάσης που επιφέρουν οι βιοεπιφανειοδραστικές σε σύγκριση με το διάλυμα PBS (72 mN/m). Η ανάλυση έγινε με τενσιόμετρο (K20 Krüss tensiometer, KRÜSS GmbH, Germany) 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 και η μείωση της επιφανειακής τάσης ενός υγρού συνδέεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε αυτό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 20 mL, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων, και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 9 : Τενσιόμετρο για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης

3.6.2. Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E₂₄ %)

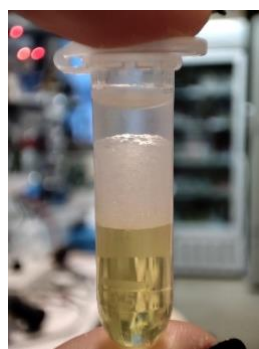
Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (E₂₄) είναι μια αρκετά γνωστή μέθοδος για την εκτίμηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν τα υπερκείμενα που προήλθαν μετά από φυγοκέντρηση καθώς επίσης το εκχύλισμα PBS που περιείχε τις από τα κύτταρα. Αναφορικά με τα βήματα της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε 1 mL από το δείγμα και 1 mL παραφινέλαιο. Τα δείγματα αναδεύτηκαν έντονα με vortex στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό, αφέθηκαν σε συνθήκες κόστους και ελέγχθηκαν μετά από 24 h. Καταγράφηκε το ύψος του γαλακτώματος καθώς και το ολικό ύψος του μίγματος και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης προσδιορίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

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

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



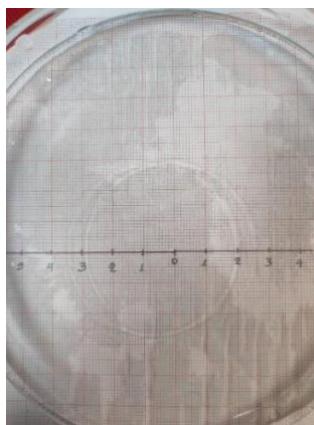
Εικόνα 10 : *Γαλάκτωμα σε PBS από το στέλεχος OLXI_7 που θα δούμε παρακάτω ότι αποτελεί ένα από τα θετικά στελέχη στη δημιουργία γαλακτώματος*



Εικόνα 11 : *Γαλάκτωμα σε υπερκείμενο*

3.6.3. Μέθοδος της μετατόπισης ελαίου

Για τη διεξαγωγή αυτής της μεθόδου τοποθετούνται σε γυάλινα τρυβλία 50 mL απιονισμένο νερό και 50 μ L λάδι μηχανής τύπου 20W-50. Στη συνέχεια 20 μ L από το ε δείγμα προστίθενται στο κέντρο της κηλίδας που έχει σχηματιστεί από το λάδι ώστε να ελεγχθεί ο σχηματισμός δακτυλίου περιμετρικά το οποίο αντιστοιχεί στη μετατόπιση του ελαίου. Ακολουθεί μέτρηση και καταγραφή της διαμέτρου του δακτυλίου που προκύπτει η οποία σχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο δείγμα.



Εικόνα 12 : Μετατόπιση ελαίου σε αποδοτικό στέλεχος

3.7. Παραγωγή ξινογάλακτος με χρήση γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Στο επόμενο βήμα της μελέτης έγινε εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε τρόφιμο, και ειδικότερα σε οξύγαλα (ξινόγαλα). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία είχε διαπιστωθεί η δυνατότητα να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε προηγούμενη μελέτη (Kachrimanidou et al., 2021). Παρασκευάστηκαν προκαλλιέργειες με θρεπτικό μέσο MRS οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την όξινη γαλακτική ζύμωση που πραγματοποιήθηκε. Η προετοιμασία των προκαλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50 mL με την ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε στην ενότητα 3.1 σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

3.7.1. Διαδικασία παραγωγής ξινογάλακτος

Μετά το πέρας της επώασης της προκαλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου MRS και ακολούθησε καθαρισμός των κυττάρων με γάλα, και φυγοκέντρηση. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, το γάλα απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε συγκεκριμένο όγκο γάλακτος ώστε να διασφαλιστεί ο επαρκής αριθμός κυττάρων για την έναρξη της ζύμωσης του γάλακτος. Στη συνέχεια, 20 mL της προκαλλιέργειας προστέθηκαν σε 180 mL γάλακτος σε γυάλινους περιέκτες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 37°C. Το pH ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι αυτό να φτάσει σε τιμή $pH < 4,5$ όπου και αντιστοιχεί στον τερματισμό της ζύμωσης. Εν συνεχεία, τα οξινοποιημένα πλέον δείγματα αποθηκεύονται στους 4°C για 15 ημέρες. Σε

κάθε περίπτωση, παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά είδη: ξινόγαλο μόνο με την καλλιέργεια του γαλακτικού βακτηρίου, με προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών από γαλακτικά βακτήρια και με προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών από στέλεχος ζύμης (*Pseudozyma antarctica* sp). Οι βιοεπιφανειοδραστικές από τα γαλακτικά βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί ως γλυκολιποπρωτεϊνικές δομές, ενώ οι βιοεπιφανειοδραστικές από τη ζύμη ανήκουν στα MEL (Faria et al., 2014). Η προσθήκη της εκάστοτε βιοεπιφανειοδραστικής έγινε πριν τον εμβολιασμό με την εναρκτήρια καλλιέργεια στην αντίστοιχη κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου.

Στα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα φαίνεται ότι τα περισσότερα στελέχη παράγουν το μεγαλύτερο ποσοστό βιοεπιφανειοδραστικών συνδεδεμένες στα κύτταρα παρά εξωτερικά από αυτά στο υπερκείμενο των γαλακτικών βακτηρίων (LAB). Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξωτερικά παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών αποτελούν τα στελέχη *Pseudomonas* και *Bacillus*.

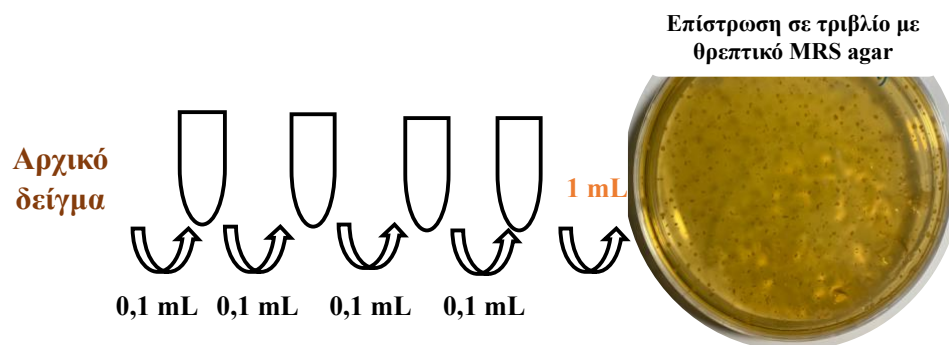
3.7.2. Αναλύσεις ξινογάλακτος

Με στόχο τη μελέτη της προσθήκης των στελεχών/ παραγωγών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στην παραγωγή του ξινογάλακτος, αξιολογήθηκε η διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού, το ποσοστό συναίρεσης και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα. Τα δείγματα λαμβάνονταν και επεξεργάζονταν ανά 5 ημέρες και η συνολική διάρκεια κάθε πειράματος διήρκεσε 15 ημέρες.

3.7.2.1 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Για την καταμέτρηση των αποικιών 100 μ L δείγματος τοποθετούνται σε 900 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Ringer $\frac{1}{4}$ ώστε να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις. Στη συνέχεια μετά την ομογενοποίησή του, με ανάδευση ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις (100 μ L δείγμα σε 900 μ L Ringer) μέχρι την επίτευξη της κατάλληλης συγκέντρωσης για την καταμέτρηση αποικιών. Μετέπειτα, πραγματοποιείται εμβολιασμός με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης κατά την οποία 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετείται σε αποστειρωμένο τρυβλίο και στη συνέχεια προστίθενται περίπου 20 mL θρεπτικού υποστρώματος MRS Agar, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 37°C και με το πέρας των 48 ωρών μετρούνται οι σχηματιζόμενες αποικίες. Οι αραιώσεις

πραγματοποιούνται εις διπλούν για το κάθε δείγμα και στη συνέχεια ο μέσος όρος αυτών καταγράφεται ως αποτέλεσμα και παρουσιάζεται.



Εικόνα 13 : Διαδικασία αραίωσης για καταμέτρηση των αποικιών

3.7.2.2 ΠΟΣΟΣΤΟ ΣΥΝΑΙΡΕΣΗΣ

Το ποσοστό συναίρεσης σχετίζεται με τη διατήρηση της συνοχής του γιαουρτιού ή του ξινογάλακτος, καθώς αφορά στο διαχωρισμό του ορού τυρογάλακτος στο προϊόν που μελετάται. Για τη μέτρηση του ποσοστού συναίρεσης, 5g ξινογάλακτος τοποθετούνται σε προ ζυγισμένο περιέκτη (falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4oC, 2000 rpm για 10 min. Το υγρό που δεν συγκρατήθηκε απορρίφθηκε και το δείγμα ζυγίστηκε εκ νέου ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό συναίρεσης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε δύο φορές και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο των μετρήσεων.

3.7.2.3 ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Για την μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας, 5g γάλατος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη (250 mL) και στην συνέχεια προστίθενται 10 mL dH₂O και 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Ακολουθεί τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1 M μέχρι αλλαγής χρώματος (ροζ). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο. Τα αποτελέσματα αναφορικά με την ολική ογκομετρούμενη οξύτητα, παρουσιάζονται ως προς την περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι το κυρίαρχο στο υπό μελέτη τρόφιμο.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κατανάλωσης γλυκόζης και του ποσοστού παραγωγής βιομάζας ώστε να διασφαλιστεί η πορεία της ζύμωσης. Στη συνέχεια, στα δείγματα μετρήθηκε η επιφανειακή τάση και η παραγωγή γαλακτώματος, ενώ παρατηρήθηκε και η μετατόπιση του ελαίου. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης, πραγματοποιήθηκε τόσο στα υπερκείμενα της ζύμωσης για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όσο και στα εκχυλίσματα του PBS για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται και είναι προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο το M2 και το τυρόγαλα ενώ τα δείγματα λαμβάνονταν ανά 24 και 72 ώρες. Η τιμή pH ρυθμιζόταν στο 6,7 μετά από μέτρηση καθημερινά και μέσω της προσθήκης αποστειρωμένου διαλύματος βάσης ή οξέος. Έπειτα βάζω το δείγμα από την κωνική σε περιέκτες (falcon) και πραγματοποιώ φυγοκέντρηση. Κρατάω σε ένα falcon το υπερκείμενο και σε ένα άλλο την βιομάζα (ίζημα). Προσθέτω περίπου 10 μ L διάλυμα PBS στη βιομάζα και το βάζω να φυγοκεντρηθεί ξανά. Τέλος τοποθετώ το υγρό του περιέκτη σε ειδικές μεμβράνες διαπίδυσης και αφήνω για 24 ώρες να αναδεύονται στο ψυγείο.

Στο δείγμα των μεμβρανών και στο υπερκείμενο της κωνικής μετρήθηκε επιφανειακή τάση, μετατόπιση ελαίου και παραγωγή γαλακτώματος. Επιπλέον, πραγματοποιούνται αραιώσεις στα δείγματα ώστε να μουν στην HPLC.

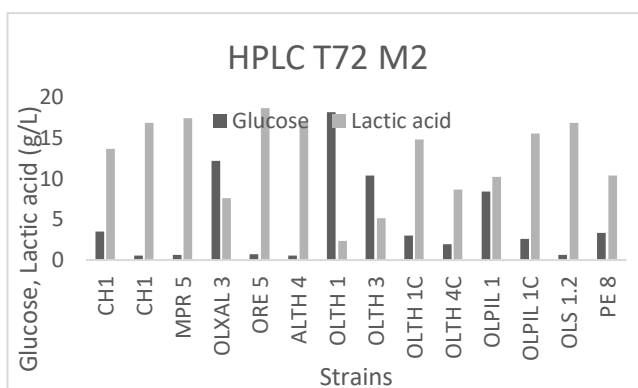
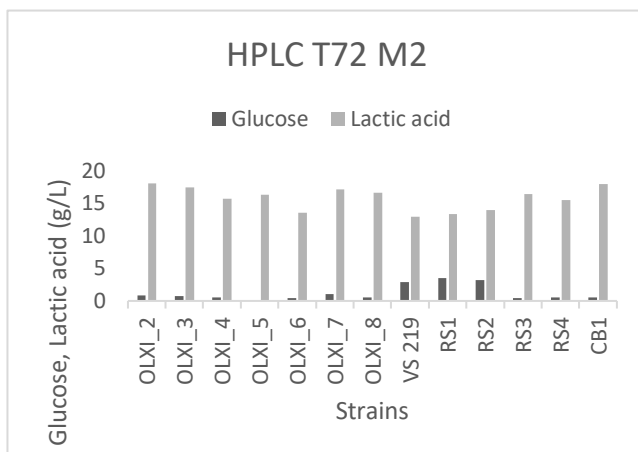
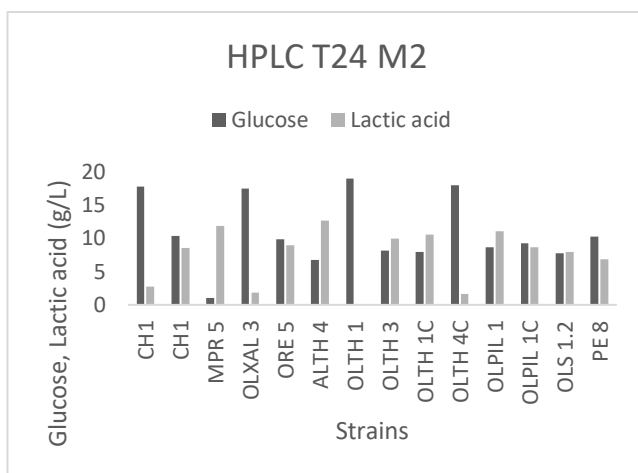
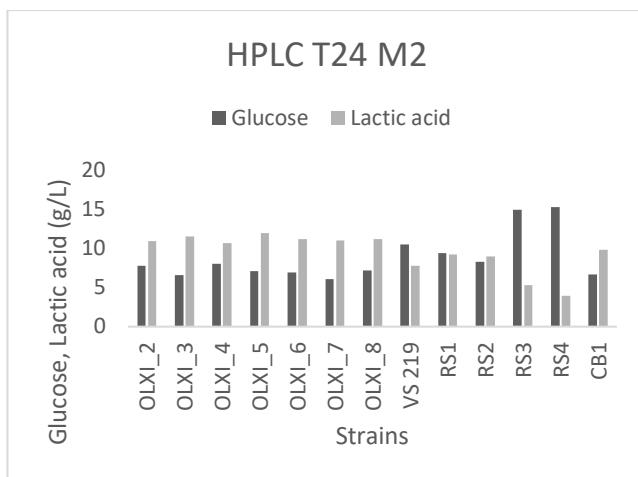
4.1.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

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 και γαλακτικού οξέος στο υπερκείμενο μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης, όπως μετρήθηκε με την HPLC. Όσον αφορά στις 24 ώρες ζύμωσης, η μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης παρατηρήθηκε στο στέλεχος MPR5 (ήτοι 19 g/L),

το οποίο ωστόσο σταματάει εκεί δεδομένου ότι έμεινε ακατανάλωτη η συγκέντρωση γλυκόζης στις 72 ώρες (1 g/L). Όσον αφορά την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει το στέλεχος ALTH 4 (12,7 g/L) αλλά και το MPR5 παράγει υψηλό ποσοστό (11,9 g/L), αφού όσο περισσότερη γλυκόζη καταναλώνεται τόσο γαλακτικό οξύ παράγεται. 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. Ορισμένα όμως στελέχη όπως: OXAL 3, OLTH 1 και OLTH 3 τα οποία δεν κατανάλωσαν σχεδόν καθόλου γλυκόζη ή σε πολύ μικρή ποσότητα, πιθανώς λόγω παρεμπόδισης στη μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και τα στελέχη VS219, RS1, RS2 και OLPIL1, τα οποία άφησαν υπολειπόμενη γλυκόζη. Αυτό, συνάδει και με τα αποτελέσματα της βιομάζας (Γράφημα 2), όπου εύκολα φαίνεται η χαμηλή παραγωγή βιομάζας στο VS 219 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Όπως προαναφέρθηκε, το στέλεχος με την ελάχιστη κατανάλωση είναι το OLTH 1 με κατανάλωση γλυκόζης 2.95 g/L μετά από 72 ώρες ζύμωσης. Ενώ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος παρήγαγε το στέλεχος ORE 5 (18,54 g/L). Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι στελέχη που παρουσίασαν μικρή κατανάλωση στις 24 ώρες, όπως το RS3, RS4 και OLTH 4C, εν συνεχεία αύξησαν το ρυθμό κατανάλωσης μέχρι τις 72 ώρες και αντίστοιχα στελέχη που είχαν μικρή απόδοση σε γαλακτικό οξύ στη συνέχεια παρήγαγαν περισσότερο (ORE 5). Στελέχη που κατανάλωσαν πλήρως την γλυκόζη μέχρι τις 72 ώρες είναι τα: OXLI_2, OXLI_3, OXLI_4, OXLI_5, OXLI_6, OXLI_7, OXLI_8, RS3, RS4, CB1, CH1, MPR5, ORE5, ALTH 4, OLS 1.2.



Γράφημα 1: Γράφημα συγκέντρωσης γλυκόζης και γαλακτικού οξέος στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο M2.

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

Το Γράφημα 2 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 που υπάρχει ήδη στη βιβλιογραφία.

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 OLXAL 3 που αναφέρθηκε παραπάνω και φαίνεται έντονα η ιδιαίτερα χαμηλή κατανάλωση της γλυκόζης με το αντίστοιχα χαμηλό ολικό ξηρό βάρος του (0,20 g/L) στη μέτρηση των 24 ωρών.

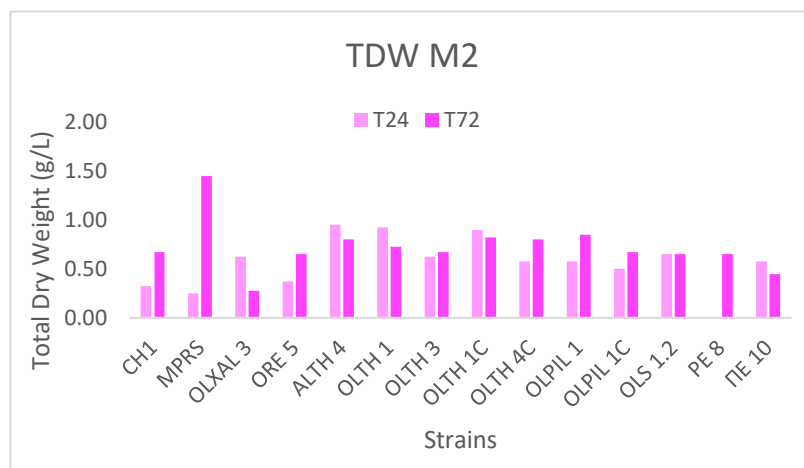
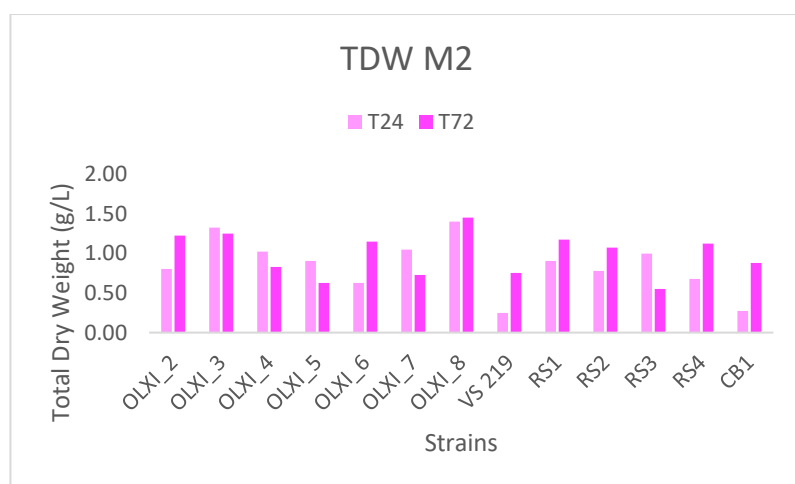
Επίσης παρατηρείται ότι αναφορικά με το ολικό ξηρό βάρος, σχεδόν στα μισά από τα στελέχη (14 από το σύνολο των 27), η παραγωγή είναι μεγαλύτερη στις 24 ώρες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όπου η παραγωγή βιομάζας είναι υψηλότερη στις 72 ώρες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν ευαισθησίες σε τυχόν έλλειψη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών απαραίτητα για την ανάπτυξη τους που ενδέχεται να παρεμποδίσουν ή ακόμα και να μειώσουν το ρυθμό της μικροβιακής αύξησης. Ενώ παράλληλα σε ορισμένα στελέχη φαίνεται έντονη μικροβιακή ανάπτυξη κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης. (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 VS 219 (0,68-0,85 g/L) και στο στέλεχος PE 8 (0,65 g/L), τα οποία δεν κατανάλωσαν και τη γλυκόζη (Γράφημα 1). Αντίστοιχα, τη μεγαλύτερη παραγωγή συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη έχει το MPR5 το οποίο είχε τελικό βάρος 1,92 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). Προκειμένου λοιπόν να εξάγουμε συμπεράσματα αν ένα στέλεχος έχει υψηλή απόδοση στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξετάζονται όλες οι δυνατές μέθοδοι και συγκρίνονται. 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 : Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο M2 ως θρεπτικό μέσο.



4.1.3. Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης με θρεπτικό M2.

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης έχουμε τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης για την αξιολόγηση κατά βάση 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, για τις βιοεπιφανειοδραστικές που δίνονται πάνω στα βακτηριακά κύτταρα, μετρήθηκε το εκχύλισμα από PBS.

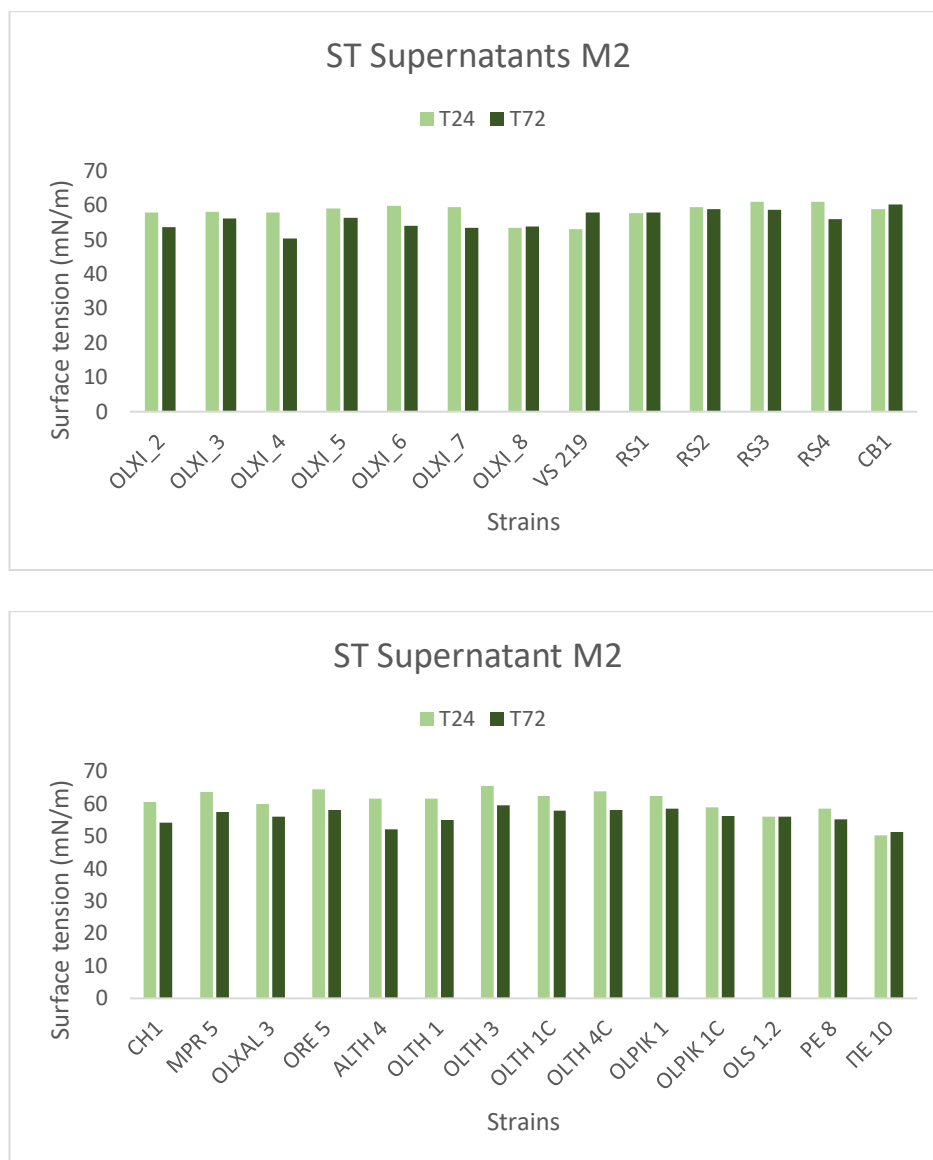
-ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ

Το Γράφημα 3 παρουσιάζει τις μετρήσεις της επιφανειακής τάσης στις οποίες υποβλήθηκαν όλα τα στελέχη, από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης αφού πρώτα πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρηση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επίσης, στο Γράφημα φαίνεται ότι μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης συμβαίνει κυρίως στο πέρας των 72 ωρών, αφού μόνο 4 από τα 27 στελέχη έχουν χαμηλότερη επιφανειακή τάση στις 24 από ότι στις 72 ώρες.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι τα στελέχη VS 219, CB1, OLS 1.2 και ΠΕ10 είχαν την χαμηλότερη τιμή επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης (53,1, 58,9, 55,9 και 50,2 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 OLXI_4, ALTH 4 και ΠΕ10 με 50,5, 52 και 51,2 mN/m αντίστοιχα.

Συνολικά, τη μικρότερη μέτρηση επιφανειακής τάσης μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρουσίασε το στέλεχος ΠΕ10 (50,2 mN/m), ενώ μετά από 72 το στέλεχος OLXI_4 (50,5 mN/m). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση επιφανειακής τάσης και στο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα M2 το οποίο έχει επιφανειακή τάση 65,1 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 ΠΕ10 με μέτρηση 50,2 και 51,2 mN/m στις 24 και 72 ώρες αντίστοιχα.

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



-ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΑΠΟ PBS

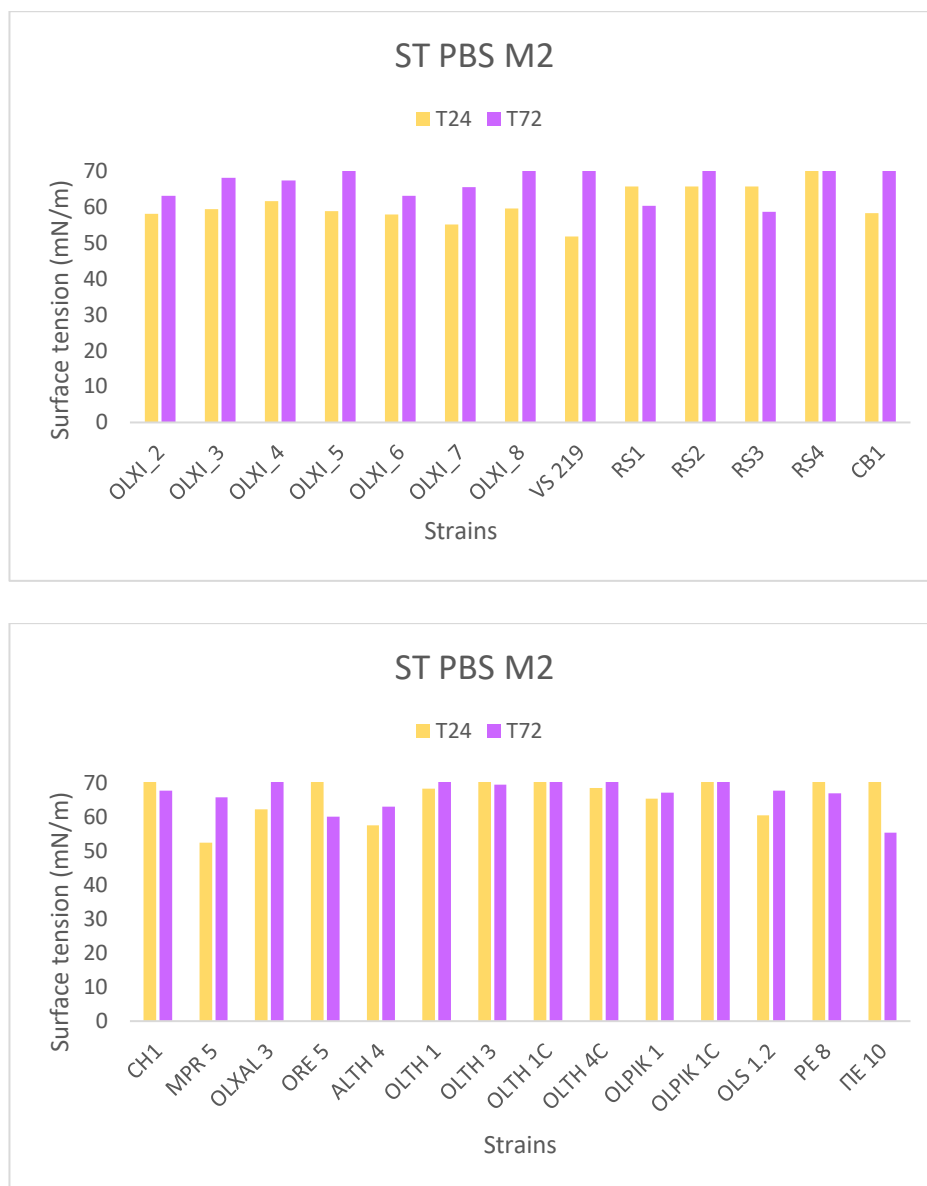
Το Γράφημα 4 μας δείχνει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν μετά από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS έπειτα από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο M2. Έτσι, παρατηρείται ότι τα στελέχη MPR5 (52,5mN/m), OLXI_7 (55,1 mN/m) και VS219 (51,8 mN/m) παρουσίασαν τη χαμηλότερη τιμή για την επιφανειακή τάση μετά από 24 ώρες. Συνολικά στα δείγματα που προήλθαν από εκχύλιση στο PBS τα 16 παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάσης στις 24 ώρες ζύμωσης. Μετά από 72 ώρες

ζύμωσης, βλέπω ότι στα στελέχη με την μεγαλύτερη μείωση είναι τα : RS3, ORE 5, ΠΕ10 με 58,7, 60,1 και 55,4 mN/m αντίστοιχες τιμές επιφανειακής τάσης. Συγκριτικά μετρήθηκε και η επιφανειακή τάση στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (70 mN/m). 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 κυμαίνεται μεταξύ 9,9-18,2 mN/m.

Ωστόσο για ορισμένα στελέχη η μείωση της επιφανειακής τάσης είναι από ασήμαντη έως μηδενική. Σε αυτή την κατηγορία στελεχών ανήκουν τα: RS4, OLTH 1, OLTH 3, OLTH 1C, OLTH 4C και OLPIK 1C, τα οποία φαίνεται να έχουν υψηλή επιφανειακή τάση και στις 24 αλλά και στις 72 ώρες. Παρά το γεγονός αυτό, έγινε μελέτη των στελεχών αυτών 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 τα Γραφήματα 1, 2 και 4 παρατηρείται ότι το στέλεχος MPR5 στις 72 ώρες ζύμωσης έχει καταναλώσει πλήρως την γλυκόζη, έχει χαμηλή παραγωγή βιομάζας ενώ παράλληλα μειώνει σημαντικά την επιφανειακή τάση, δηλαδή πάνω από 17 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:

Η μέτρηση της μετατόπισης ελαίου αποτελεί μια ακόμα συνήθη μέθοδο που εφαρμόζεται για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που όμως δεν μπορεί να χαρακτηρίσει από μόνη της αν ένα στέλεχος είναι ικανό ή όχι να

παράγει σε ικανοποιητικό βαθμό τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που μας ενδιαφέρουν.

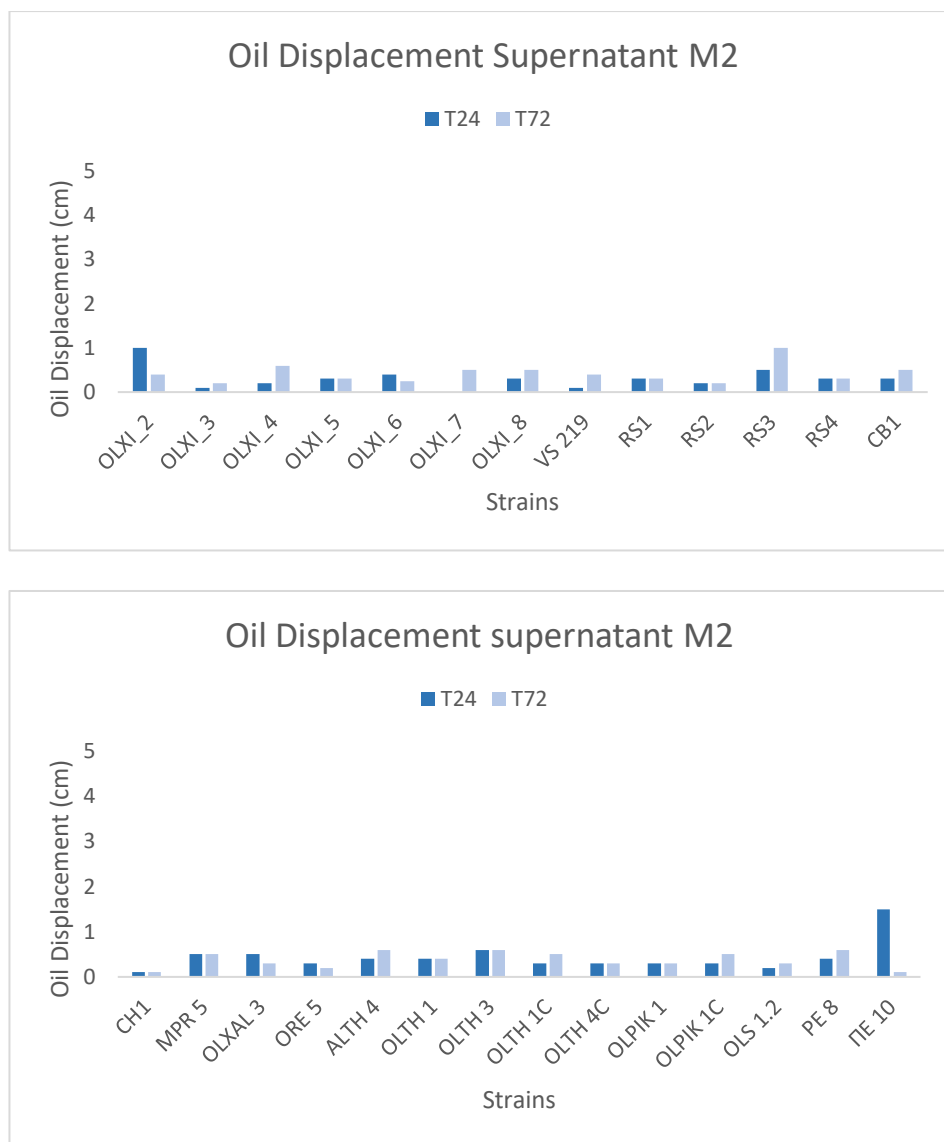
Το Γράφημα 5 παρουσιάζει τη μετατόπιση ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρωση, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Για τις πρώτες 24 ώρες, στο Γράφημα 5.1 παρατηρείται μόνο ένα στέλεχος το OLXI_2 το οποίο δίνει μετατόπιση του ελαίου 1 εκατοστό και στο άλλο ένα στέλεχος στο Γράφημα 5.2 με ακτίνα μετατόπισης 1,5 εκ. το ΠΕ10. Στο σύνολο των 72 ωρών μόνο το στέλεχος RS3 παρουσιάζει αξιοσημείωτη μετατόπιση ενός εκατοστού. Επιπρόσθετα, υπήρξαν κάποια στελέχη που παρουσίασαν την ίδια μετατόπιση ελαίου μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Αυτά τα στελέχη είναι τα: OLXI_5, RS1, RS2, RS4, CH1, MPR5, OLTH 1, OLTH 3, OLTH 4C και OLPIK 1.

Η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη στη ζύμωση των 24 ωρών, σύμφωνα με το Γράφημα 5, παρατηρείται στο ΠΕ 10 (1,5 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο RS3 (1 cm). Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών συμβαίνει στα OLXI_3, VS219 και CH1(0,1 cm), ενώ για τις 72 στα CH1 και ΠΕ10 (0,1 cm). Το στέλεχος που παρουσίασε μηδενική μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών ήταν το OLXI_7 .

Όσον αφορά στο στέλεχος ΠΕ10, στις 24 ώρες ζύμωσης όπου καταγράφεται μετατόπιση ελαίου 1,5 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 ΠΕ10 στις 24 ώρες ζύμωσης σημειώνει επιφανειακή τάση 50,2 mN/m. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα στελέχη RS3, MPR5, τα οποία δημιούργησαν μετατόπιση ελαίου από 0.5-1.0 cm και είχαν επιφανειακή τάση από 52.5-58.7 mN/m.

Ακόμη, άξιο προσοχής είναι και το στέλεχος OLTH3, το οποίο παρουσίασε συνδυασμό υψηλής μετατόπισης ελαίου (0.6 cm) με χαμηλή μέτρηση επιφανειακής τάσης και μετά τη ζύμωση των 24 αλλά και των 72 ωρών, με την επιφανειακή τάση να φτάνει μέχρι τα 65,4 και 59,4 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)

Το Γράφημα 6 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 στα OLXI_2, OLXI_7, RS1, OLXAL 3 (0,4-25 cm), ενώ για τις 72 ώρες στα OLXI_2, OLXI_6, OLXI_7, RS3, RS4, ORE 5, ALTH 4,

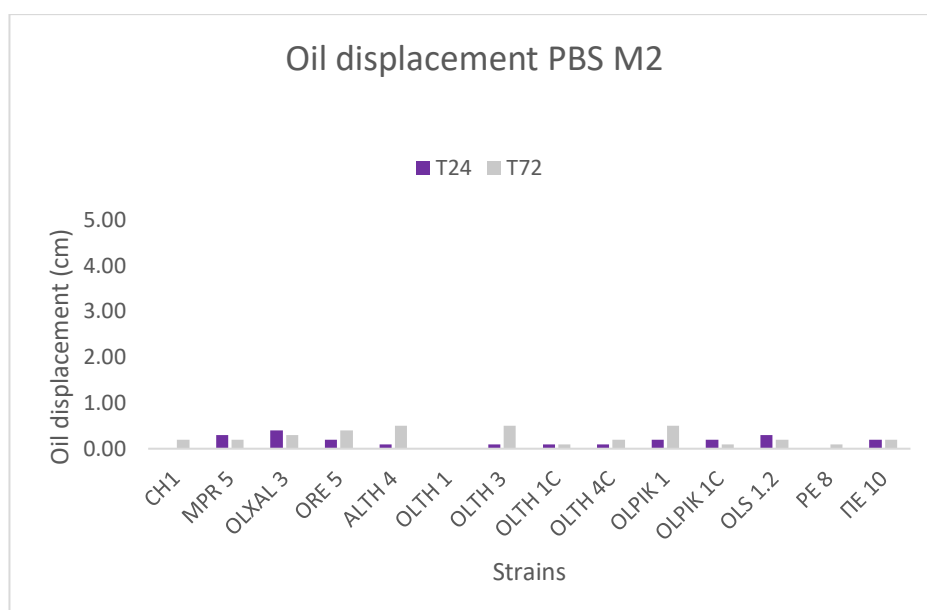
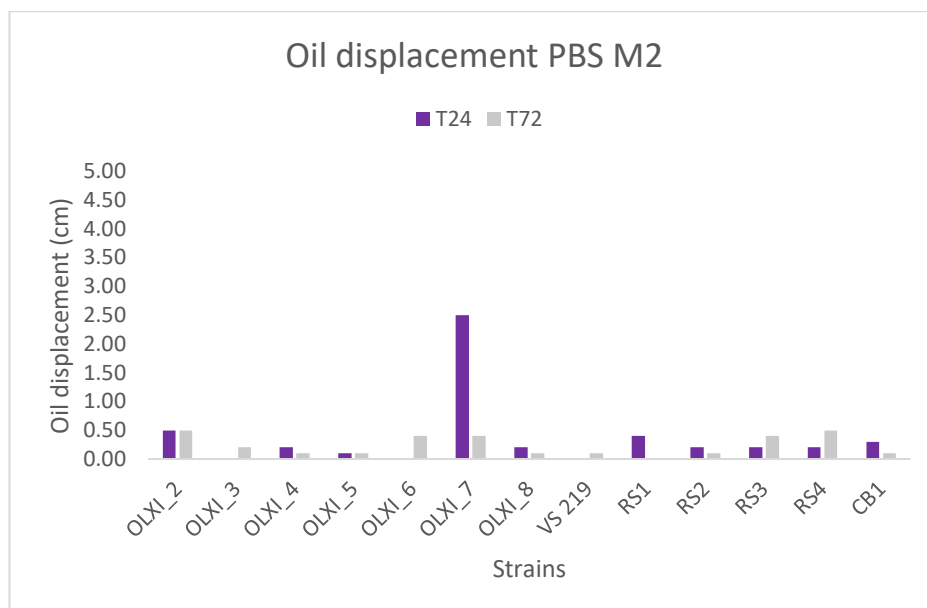
OLPIK 1 (0,4-0,5cm) . Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τις 24 ώρες συμβαίνει στα OLXI_5, ALTH 4, OLTH 3, OLTH 1C και OLTH 4C (0,1 cm), ενώ για τις 72 ώρες στα OLXI_4, OLXI_5, OLXI_8, VS219, RS2, CB1, OLTH 1C, OLPIK 1C και PE8 (0,1 cm). Υπάρχουν επίσης και κάποια στελέχη που δεν παρουσίασαν την παραμικρή μετατόπιση, όπως για παράδειγμα τα στελέχη OLXI_3, OLXI_6, VS 219, CH1, PE8 μετά από ζύμωση 24 ωρών, ενώ μετά από ζύμωση 72 ωρών είναι τα RS1 και OLTH 1. Γενικότερα την μεγαλύτερη συνολικά μετατόπιση σαν στέλεχος παρουσίασε το OLXI_7 (2,5 cm) στις 24 ώρες ζύμωσης.

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 OLXI_7 μετά από 24 ώρες ζύμωσης σημείωσε 2,5 cm μετατόπιση ελαίου και με τη μέτρηση στις ίδιες ώρες πήραμε επιφανειακή τάση 55,7 mN/m.

Εξαιρέση αποτελούν τα στελέχη όπως το VS219 (51,8 mN/m) και το ΠΕ10 (55,4 mN/m) ενώ παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή επιφανειακή τάση στις 24 και 72 ώρες αντίστοιχα δεν δίνουν αξιοσημείωτη μετατόπιση ελαίου (0,20 cm).

Από τα Γραφήματα 1,2,4 και 6 παρατηρείται ότι το στέλεχος OLXI_7 καταφέρνει στις 24 ώρες ζύμωσης, έχοντας καταναλώσει την μισή γλυκόζη, να έχει μια μέτρια παραγωγή βιομάζας (1,2 g/L) και μια πολύ καλή μέτρηση επιφανειακής τάσης αφού έχει καταφέρει να μειώσει την επιφανειακή τάση σχεδόν 15 mN/m και έχει δημιουργήσει μια αρκετά υψηλή μετατόπιση ελαίου που φτάνει μέχρι και τα 2,5cm.

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



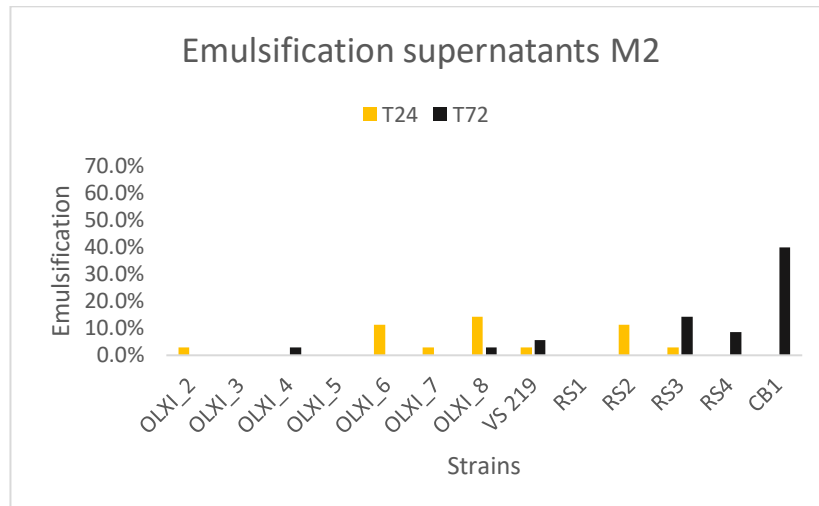
4.1.5 Παρατήρηση της δημιουργίας γαλακτώματος σε σχέση με την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα από PBS.

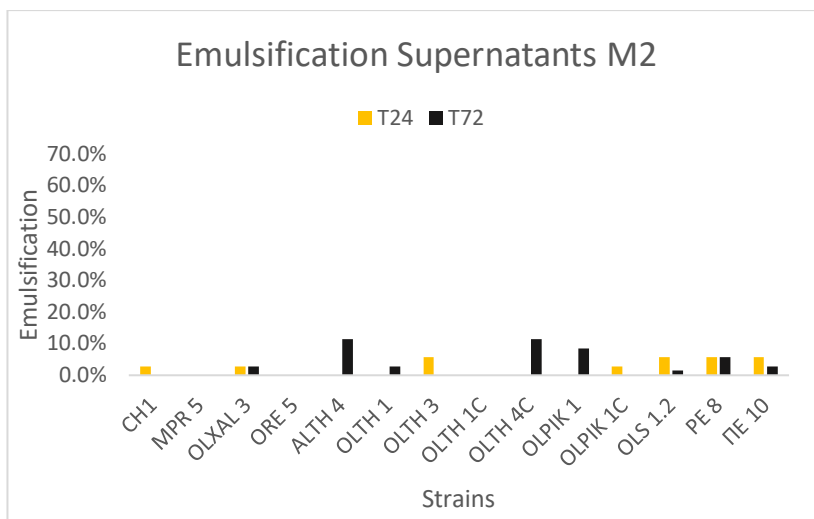
Γενικότερα στα περισσότερα δείγματα είχαμε μικρή έως και μηδενική παραγωγή γαλακτώματος. Αυτό συνδέεται και με τα όσα έχουν αναφερθεί από την βιβλιογραφία,

καθώς οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι δύσκολο να είναι τόσο αποδοτικές στις εφαρμογές τους σε σχέση με αυτές που παράγονται χημικά.

Ωστόσο, αναφορικά με το γράφημα 7 υπάρχουν ορισμένα εξ αυτών στελέχη που μας επιτρέπουν να δημιουργήσουμε γαλάκτωμα. Τα στελέχη που έχουν ποσοστό γαλακτωματοποίησης μεγαλύτερο από 10,00% στις 24 ώρες ζύμωσης είναι τα: OLXI_6 (11,4%), OLXI_8 (14,3%) και το RS2 (11,4). Ενώ αυτά που δίνουν αξιοσημείωτο ποσοστό στις 72 ώρες ζύμωσης είναι τα: RS3 (14,29%), CB1 (40,00%), ALTH 4 (11,43%), OLTH 4C (11,43%). Παρατηρώ ότι μόνο το στέλεχος CB1 εμφανίζει πολύ θετικό γαλάκτωμα στο υπερκείμενο του, με ποσοστό 40,00%. Αυτό είχε σημειώσει και αρκετά χαμηλή επιφανειακή τάση στις 24 ώρες (58,9%) και κατανάλωσε τελικά όλη τη γλυκόζη.

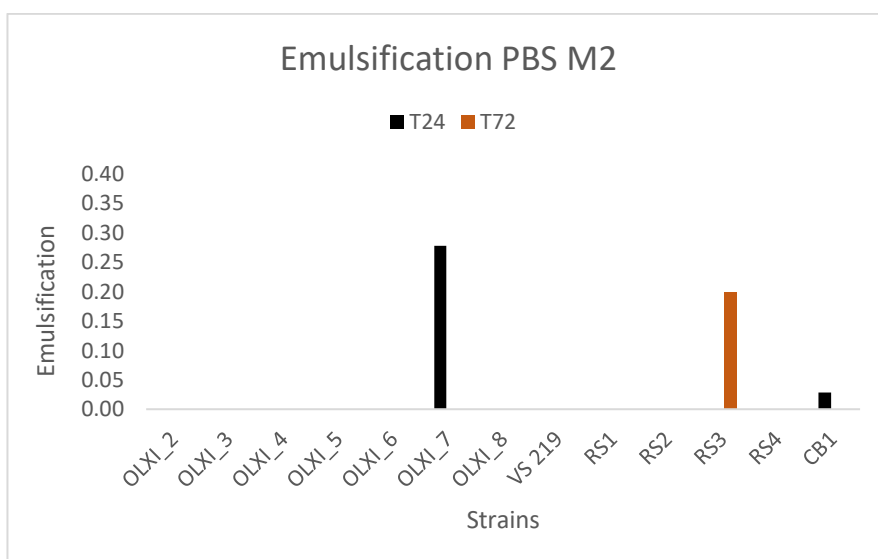
Γράφημα 7 : . Παραγωγή γαλακτώματος στο υπερκείμενο της ζύμωσης σε 24 και 72 ώρες.

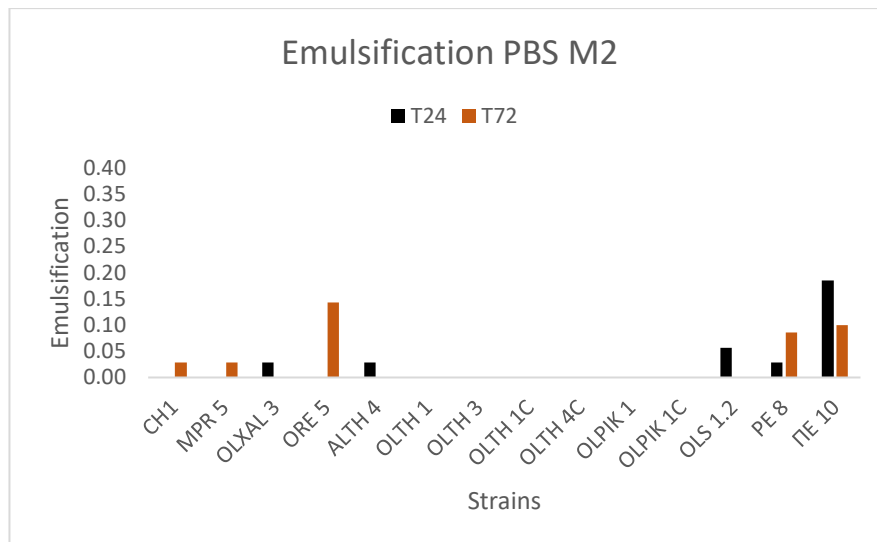




Στα εκχυλίσματα από PBS τα στελέχη που δημιούργησαν έστω και κάποιο γαλάκτωμα είναι εμφανώς λιγότερα από ότι στα υπερκείμενα των στελεχών. Στις 24 ώρες ζύμωσης δίνουν γαλάκτωμα τα OLXI_7 και ΠΕ 10 ύψους, 0,28 (27,8%) και 0,19 (18,6%) αντίστοιχα. Τέλος, στις 72 ώρες έχουμε τα RS3 (20,0%), ORE 5 (14,3%) και ΠΕ 10 (10.0%). Επομένως, αν και το OLXI_7 δίνει υψηλότερο γαλάκτωμα, το ΠΕ 10 χαρακτηρίζεται ως καλύτερος γαλακτοματοποιητής εφόσον δίνει και στις 2 φάσης της ζύμωσης γαλάκτωμα.

Γράφημα 8 : Γαλάκτωμα βιοεπιφανειοδραστικών από εκχύλισμα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό μέσο M2.





4.2. Αξιολόγηση της λακτόξης του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα με στόχο την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Σε δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το τυρόγαλα ώστε η λακτόζη που αυτό περιέχει να αξιοποιηθεί ως θρεπτικό μέσο. Παράλληλα, έγινε αξιολόγηση του τυρογάλακτος, ως μια χαμηλού κόστους πρώτη ύλη για τις μικροβιακές ζυμώσεις. Ο στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν διπλός, καθώς από τη μία πλευρά ενδέχεται να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ενώ ακόμη αποτελεί και ένα τρόπο διαχείρισης και καλύτερης αξιοποίησης των αποβλήτων των βιομηχανιών τροφίμων στα πλαίσια της κυκλικής βιοοικονομίας. Επιπρόσθετα, το τυρόγαλα αποτελεί ένα φυσικό υπόστρωμα που συμβάλλει ώστε τα γαλακτικά βακτήρια να αναπτυχθούν και περιέχει την λακτόζη ως πηγή άνθρακα. Στο στάδιο αυτό δοκιμάστηκαν όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα (θρεπτικό μέσο M2), δεδομένου ότι η πηγή άνθρακα σχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σύμφωνα και με προηγούμενες βιβλιογραφικές μελέτες (Gudiña et al., 2011; Kachrimanidou et al., 2021).

Αντίστοιχα λοιπόν, στο τυρόγαλα (Cheeseway), όπως και στο M2, προσδιορίστηκε η κατανάλωση λακτόξης 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 τόσο στα υπερκείμενα της ζύμωσης για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών

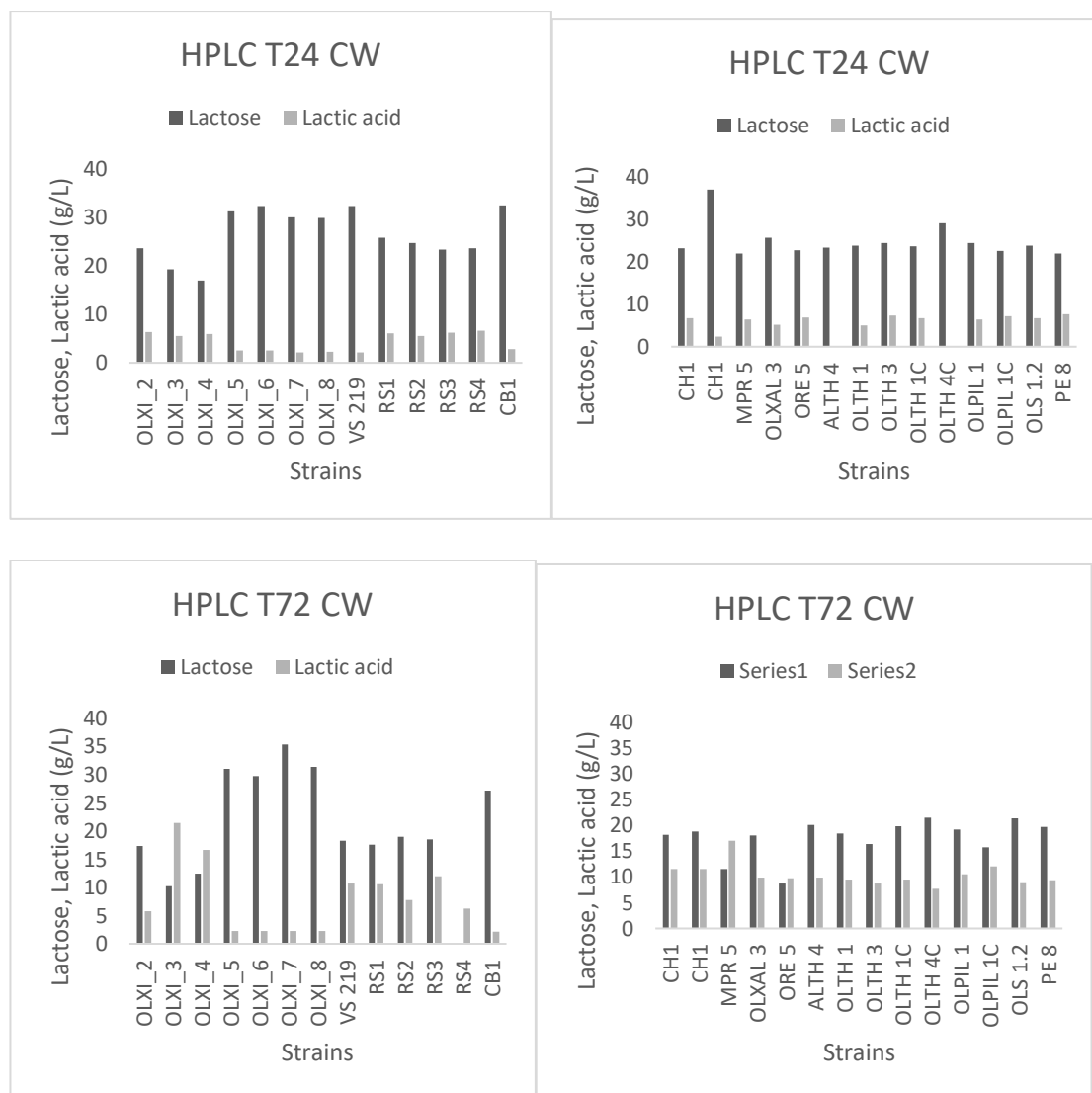
αλλά όσο και στα εκχυλίσματα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για την αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται προσδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα.

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

Σε πρώτο στάδιο 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 9 περιγράφει, τη συγκέντρωση λακτόζης στο υπερκείμενο μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης, σύμφωνα με τις μετρήσεις της HPLC.

Σύμφωνα με το Γράφημα 9, 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 9 φαίνεται στις 72 ώρες ζύμωσης τα στελέχη να έχουν καταναλώσει συνολικά μικρότερη ποσότητα. Παρατηρώντας το Γράφημα 7, έντονη διαφορά παρουσιάζει το στέλεχος RS4 το οποίο παρόλο που στις 24 ώρες έχει μικρή κατανάλωση λακτόζης εν τέλει καταφέρνει να καταναλώσει όλη την λακτόζη μετά από 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο. 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 OLXI_5, OLXI_6, VS 219, CB1 και το CH1, με μικρότερη κατανάλωση από όλα να έχει το CH1. Από αυτά, στελέχη που συνέχισαν να έχουν μικρή κατανάλωση λακτόζης και μετά το πέρας της ζύμωσης των 72 ωρών είναι τα OLXI_5, OLXI_6, OLXI_7, OLXI_8, και το CH1. Παράλληλα, βλέπω ότι δεν παράγεται σε μεγάλο βαθμό γαλακτικό οξύ με εξαίρεση το OLXI_3 που δίνει 21,5 g/L γαλακτικό οξύ. Στελέχη που αρχικά σημείωσαν κάποια κατανάλωση αλλά δεν την συνέχισαν με τόσο έντονο ρυθμό μετά από 72 ώρες είναι τα ALTH4 , OLS 1.2 και το P8.

Γράφημα 9 : Απεικόνιση κατανάλωσης λακτόζης και παραγωγής γαλακτικού οξέος σε γράφημα.



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

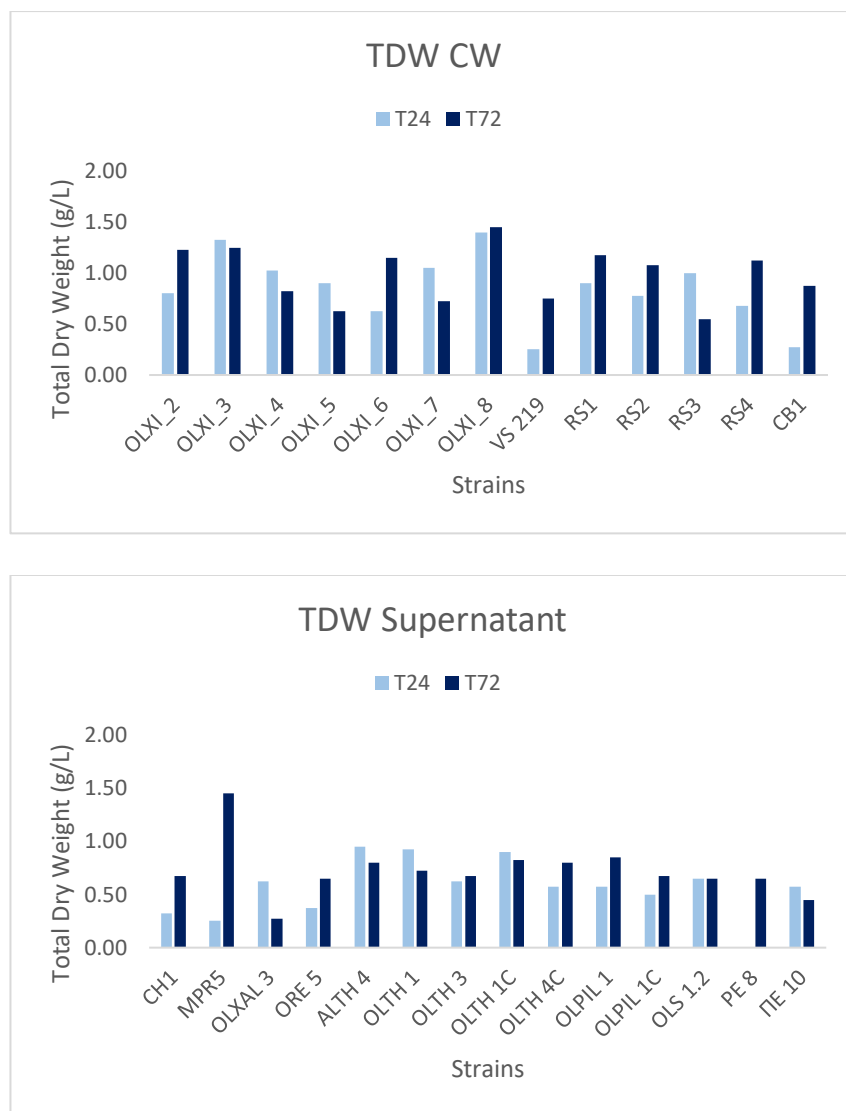
Το Γράφημα 10 αφορά την παραγωγή βιομάζας μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο τυρόγαλα ως θρεπτικό υλικό. Συγκρίνοντας τα Γραφήματα 9 και 10 θα παρατηρήσω ότι όπου υπάρχει αυξημένη παραγωγή βιομάζας, στην πλειονότητα των περιπτώσεων υπάρχει και αυξημένη κατανάλωση λακτόζης. Συνεπώς, παρατηρείται ότι

η ανάπτυξη της βιομάζας συνδέεται με την κατανάλωση της λακτόζης, για παράδειγμα στα στελέχη OLXI_3, RS1, RS2, RS4 και MPR5.

Από το Γράφημα 10, φαίνεται ότι σχεδόν τα μισά στελέχη (14) 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 τα OLXI_3 (1,32 g/L) και το OLXI_8 (1,40 g/L), ενώ στις 72 ώρες ζύμωσης περισσότερα στελέχη δίνουν υψηλή απόδοση βιομάζας και αυτά είναι τα εξής: OLXI_2 (1,22 g/L), OLXI_3 (1,25 g/L), OLXI_6 (1,15 g/L), OLXI_8 (1,45g/L), RS1 (1,18 g/L), RS4 (1,12 g/L) και MPR5 (1,45 g/L). Αντιστρόφως, αυτά με την μικρότερη παραγωγή είναι τα CB1 (0,27 g/L) και MPR5 (0,25 g/L) για τις 24 και το OLXAL3 με 0,28 g/L για τις 72 ώρες. Τέλος, το στέλεχος PE 8 στις 24 ώρες δεν παράγει καθόλου βιομάζα.

Επιπρόσθετα, αν παρατηρήσω το γράφημα 10 θα δω ότι ορισμένα στελέχη τα οποία δίνουν υψηλή παραγωγή ολικού ξηρού βάρους δεν έχουν το ίδιο καλή κατανάλωση λακτόζης όπως φαίνεται στο Γράφημα 9. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος OLXI_8 το οποίο έχει λακτόζη 29,9 g/L στις 24 και 31,4 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης ενώ παρουσιάζει πολύ καλή βιομάζα με 1,40 g/L και 1,45 g/L στις αντίστοιχες ώρες.

Γράφημα 10 : 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. Όπως και στο θρεπτικό M2, 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:

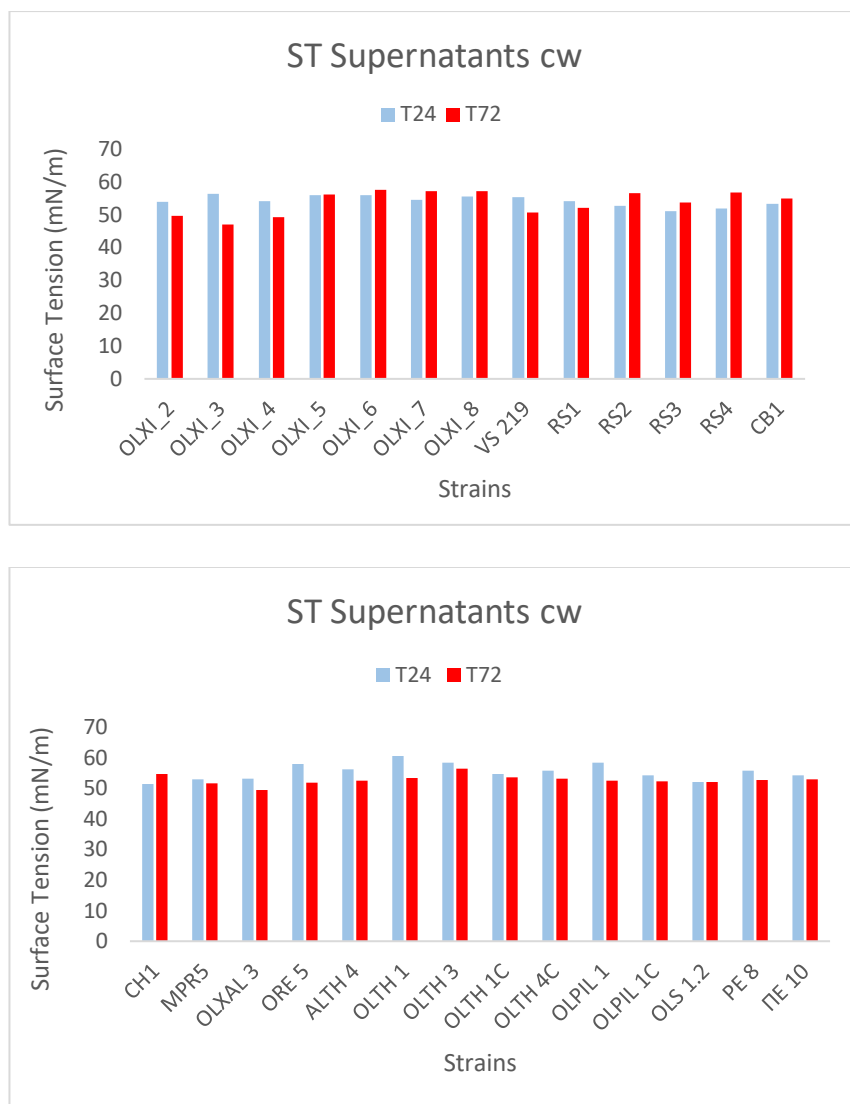
Το Γράφημα 11 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρωση δηλαδή στο υπερκείμενο, μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επίσης, έγινε μέτρηση της επιφανειακής τάσης στο τυρόγαλα η οποία είναι 45-46 mN/m για να υπάρχει ως μέτρο σύγκρισης και να γίνει κατανοητή η μείωση της επιφανειακής εξαιτίας των βιοεπιφανειοδραστικών όπου υπάρχει.

Από το Γράφημα 11 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 RS3 με 51 mN/m. Αντίστοιχα για τις 72 ώρες είναι το OLXI_3 με 46,9 mN/m το οποίο έχει εξίσου υψηλή κατανάλωση λακτόζης και παραγωγή βιομάζας όπως φαίνεται και από τα αντίστοιχα Γραφήματα.

Από την άλλη πλευρά το στέλεχος με τη μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το OLTH 1 με 60,6 mN/m, ενώ για τις 72 έχουμε το OLXI_6 με 57,6 mN/m με μικρή διαφορά από τα OLXI_7 και OLXI_8 με 57,2 mN/m.

Όπως θα παρατηρήσουμε, το στέλεχος που μας δίνει την χαμηλότερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες (RS3) έχει σχετικά υψηλή παραγωγή βιομάζας καθώς επίσης και μετατόπιση ελαίου που θα δούμε σε Γράφημα παρακάτω. Επιπλέον το OLXI_3 με την χαμηλότερη επιφανειακή τάση στις 72 ώρες μπορούμε να πούμε ότι είναι ένα πολύ αποτελεσματικό στέλεχος εφόσον δίνει πολύ μεγάλη μετατόπιση ελαίου (5 cm), υψηλό ποσοστό γαλακτωματοποίησης (37,14%) και βιομάζα (1,25 g/L).

Γράφημα 11 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

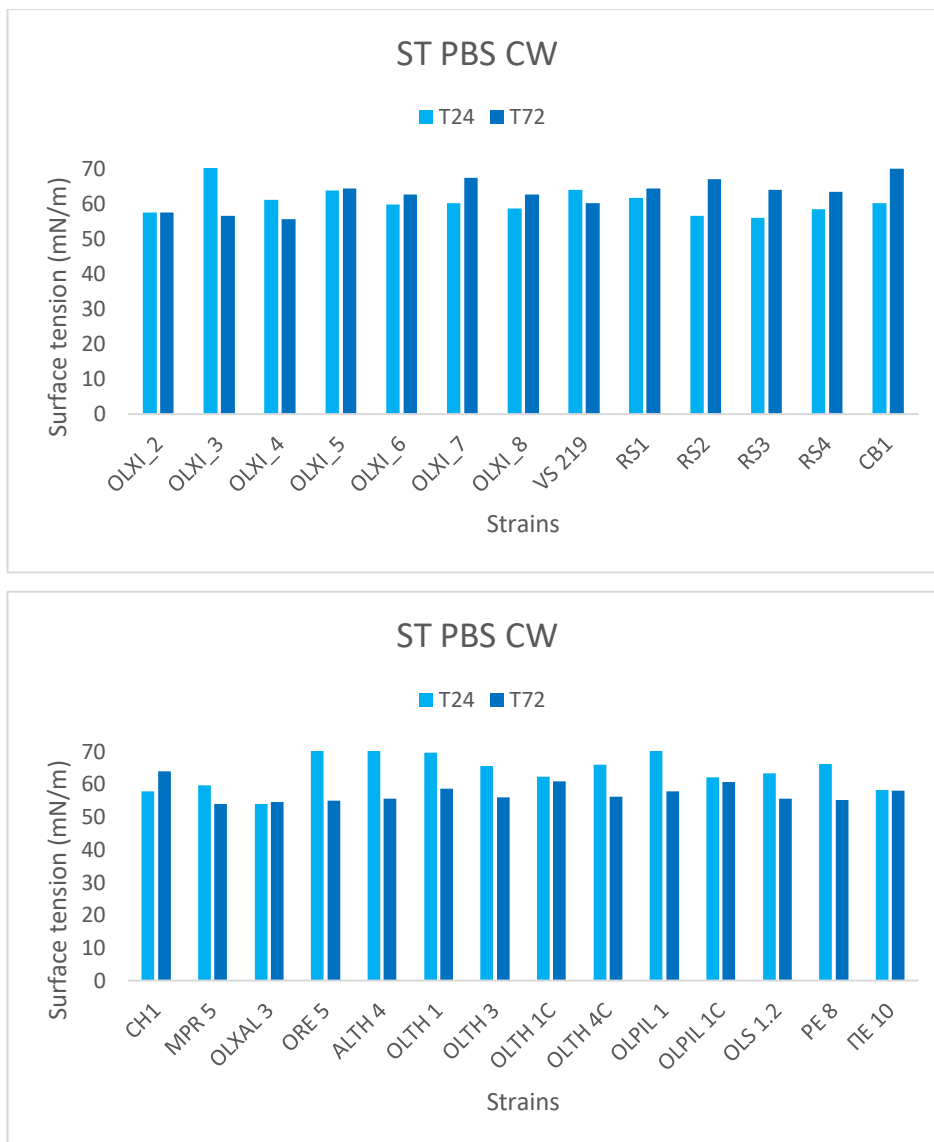


~ Αξιολόγηση των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS).

Το Γράφημα 12 παρουσιάζει τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων PBS μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης Όσον αφορά στα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων και σύμφωνα με το Γράφημα 12, τα στελέχη φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής τάση μετά τις 72 ώρες

ζύμωσης. Το στέλεχος με την μικρότερη επιφανειακή τάση για τις 24 ώρες είναι το RS3 με 56 mN/m και για τις 72 είναι το MPR 5 με 53,9 mN/m . Αντίστοιχα, το στέλεχος με την μεγαλύτερη επιφανειακή τάση στις 24 ώρες είναι το ORE 5 με 74,6 mN/m ενώ ακολουθεί το OLPIL 1 με αντίστοιχα μεγάλη τάση (71,1 mN/m) , ενώ για τις 72 ώρες το στέλεχος CB1 με 70,1 mN/m.

Γράφημα 12 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης



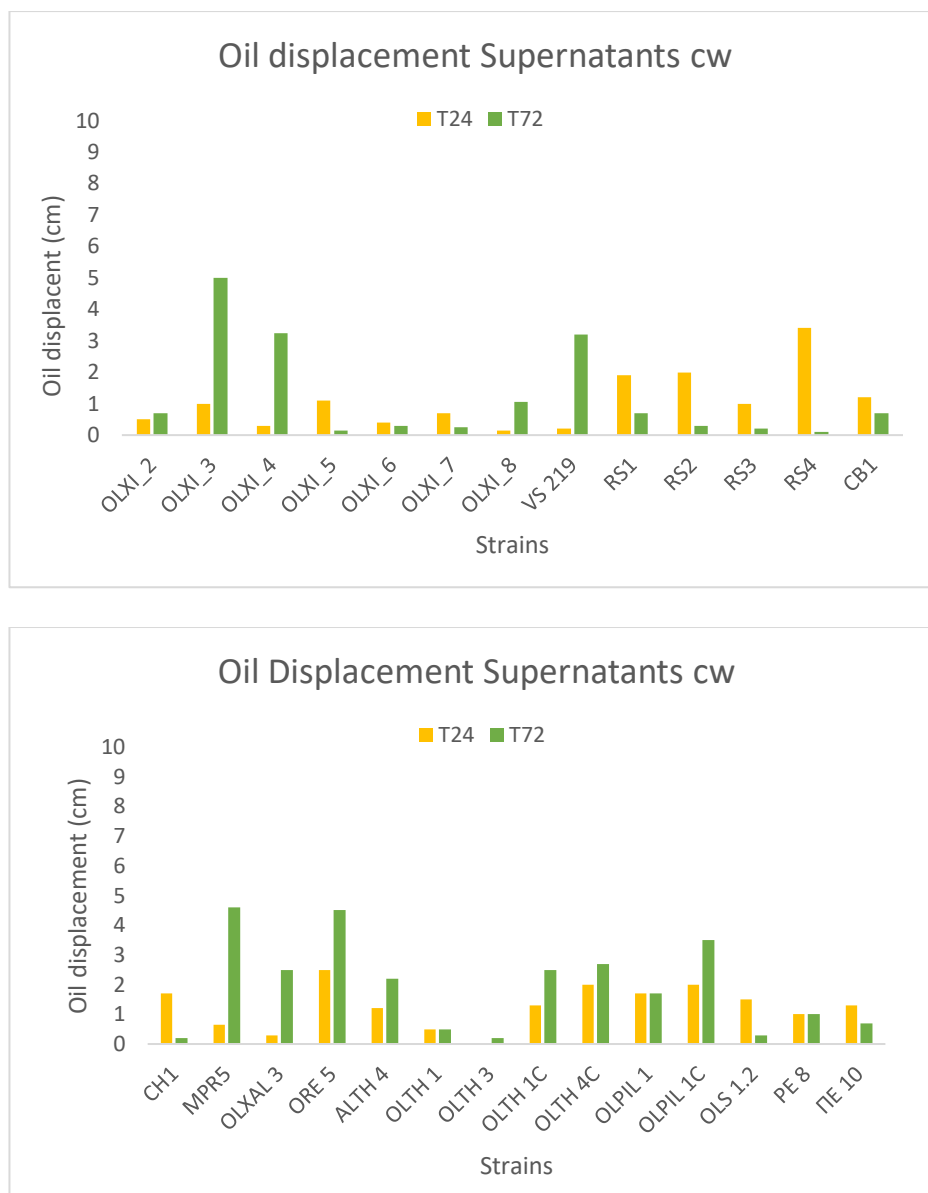
4.2.4. Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα pbs σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης

~ Αξιολόγηση μετατόπισης ελαίου στα υπερκείμενα υγρά ζύμωσης

Σε επόμενη ενότητα, στο Γράφημα 13 παρουσιάζεται η μετατόπιση ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, έπειτα από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επιπλέον, μετρήθηκε ότι η μετατόπιση που δημιουργεί το τυρόγαλα είναι ίση με 4,5 cm.

Η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη στη ζύμωση μετά τις 24 ώρες, σύμφωνα με το γράφημα 13, παρατηρείται στο RS4 το οποίο έχει δημιουργήσει μετατόπιση 3.4 cm. Ωστόσο το ίδιο στέλεχος στις 72 ώρες ζύμωσης δίνει την μικρότερη μετατόπιση με 0,1 cm. Από το γεγονός αυτό διακρίνεται ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές υπήρχαν στις 24 ώρες ζύμωσης αλλά στην πορεία καταστράφηκε η λειτουργία τους. Για τις 72 ώρες η μεγαλύτερη μετατόπιση εμφανίζεται στο MPR 5 (4,6 cm) ενώ ακολουθούν τα ORE 5 (4,5 cm), OLPIL 1C (3,5 cm), OLXI_4 (3,25 cm), VS 219 (3,2 cm). Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών συμβαίνει στο στέλεχος VS 219 με 0,2 και στα στελέχη OLXI_4 και OLXAL 3 με 0,3 cm, ενώ για τις 72 στο RS4 με 0,1 cm, στα RS3, CH1 και OLTH 3 με 0,2 cm και στα OLXI_6, RS2, OLS 1,2 με 0,3 cm. Το στέλεχος που παρουσίασε μηδενική μετατόπιση ελαίου για τη ζύμωση των 24 ωρών είναι το OLTH 3, ενώ στο δείγμα ζύμωσης των 72 ωρών δεν υπήρξε τέτοιο στέλεχος. Το στέλεχος που παρουσίασε την μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου στο υπερκείμενο ζύμωσης συνολικά είναι το MPR 5.

Γράφημα 13 : Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα υπερκείμενα σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης.



~ Αξιολόγηση της μετατόπισης ελαίου στα κύτταρα (εκχύλισμα PBS)

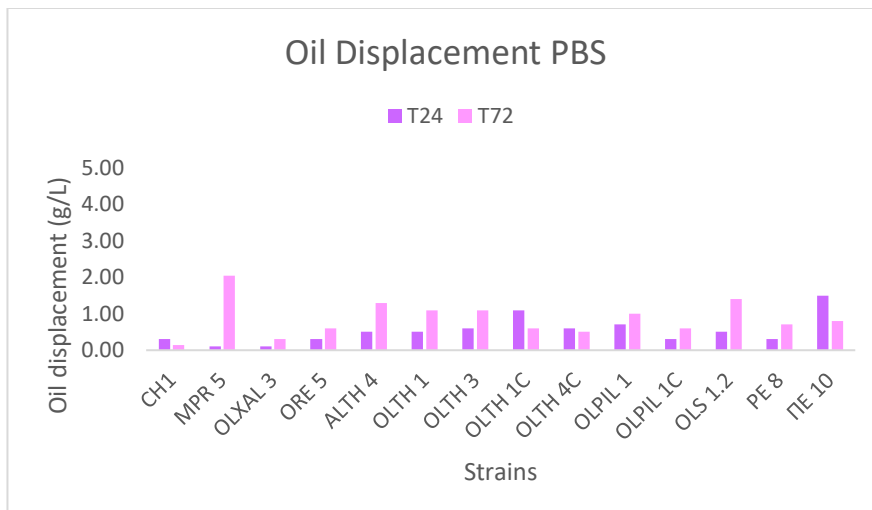
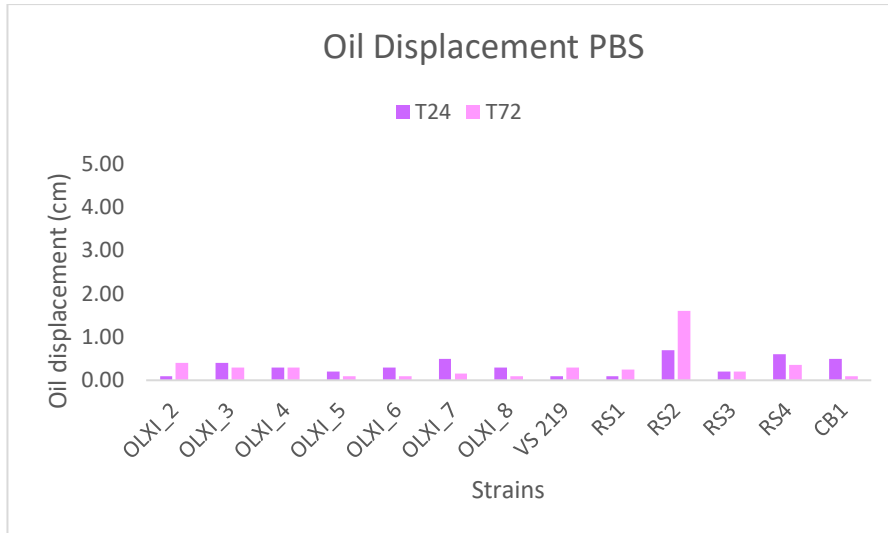
Συγκρίνοντας το Γράφημα 13 με το Γράφημα 14, είναι εύκολα αντιληπτή η διαφορά του μεγέθους της μετατόπισης ελαίου ανάμεσα στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS. Τα υπερκείμενα παρουσιάζουν περισσότερα στελέχη που κάνουν μετατόπιση

αλλά είναι και μεγαλύτερες οι μετατοπίσεις που δημιουργούν. Ανάλογη συμπεριφορά, όπως προκύπτει από το Γράφημα 11 και Γράφημα 12, υπάρχει και ανάμεσα στις μετρήσεις επιφανειακής τάσης μεταξύ των υπερκείμενων και των εκχυλίσμάτων 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 να οφείλεται και στη σύσταση του τυρογάλακτος το οποίο επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.

Το Γράφημα 14 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 14, η μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα στελέχη μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρατηρείται στο ΠΕ 10 (1,5 cm), ενώ για τις 72 ώρες στο ΜΡΡ 5 (2,05 cm). Αντίστοιχα η μικρότερη μετατόπιση ελαίου για τις 24 ώρες συμβαίνει στα στελέχη OLXI_2, VS 219, RS1, MPR5 και OLXAL 3 όπου είναι ίση με 0,1 cm σε όλες τις περιπτώσεις. Αναφορικά με τις 72 ώρες, η μικρότερη μετατόπιση παρατηρείται από τα στελέχη OLXI_5, OLXI_6, OLXI_8 και CB1 με μετατόπιση και πάλι ίση με 0.1 cm. Γενικότερα την μεγαλύτερη συνολικά μετατόπιση σαν στέλεχος παρουσίασε το ΜΡΡ 5. Συγκριτικά με το θρεπτικό Μ2 βλέπω ότι περισσότερα στελέχη δημιουργούν μετατόπιση του ελαίου με θρεπτικό μέσο το τυρόγαλο τόσο στα υπερκείμενα όσο και στα εκχυλίσματα από PBS.

Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον έχει το στέλεχος ΜΡΡ 5, το οποίο σύμφωνα με το Γράφημα 14 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου για τα εκχυλίσματα από PBS στις 72 ώρες και επιπλέον στις ίδιες ώρες μειώνει σημαντικά την επιφανειακή τάση (53,9 mN/m), περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο στέλεχος. Τέλος, το ίδιο στέλεχος ανήκει σε αυτά με την μεγαλύτερη παραγωγή ολικού ξηρού βάρους. Συμπερασματικά, μπορεί όλες αυτές οι παράμετροι να συγκλίνουν και να μας δίνουν τελικά ένα αποτέλεσμα για το κατά πόσο δύναται ή όχι το στέλεχος που μας απασχολεί να δίνει ευνοϊκά αποτελέσματα.

Γράφημα 14 : Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) στα εκχυλίσματα PBS σε 24 και 72 ώρες ζύμωσης



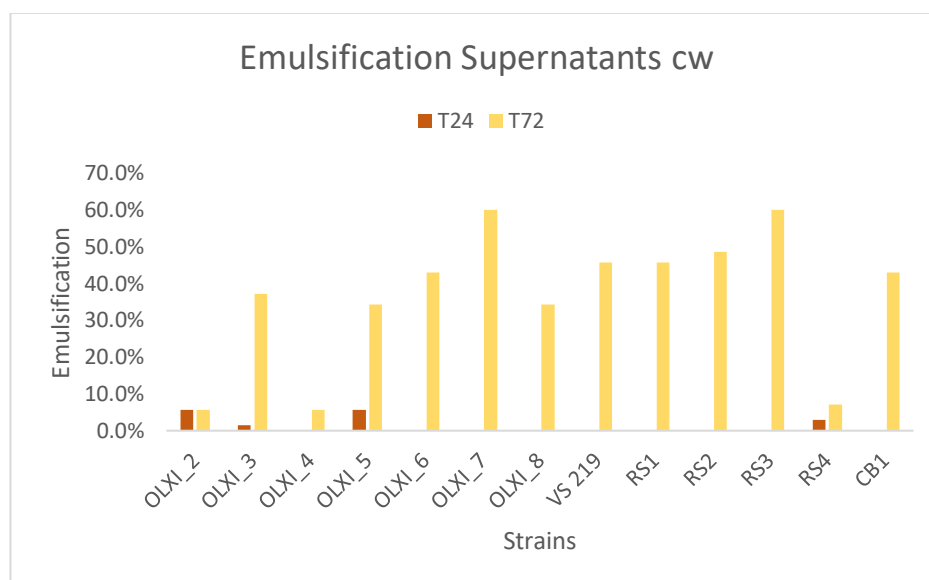
4.2.5 Απεικόνιση της παραγωγής γαλακτώματος εξαιτίας της παρουσίας βιοεπιφανειοδραστικών με θρεπτικό μέσο το τυρόγαλο στις 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

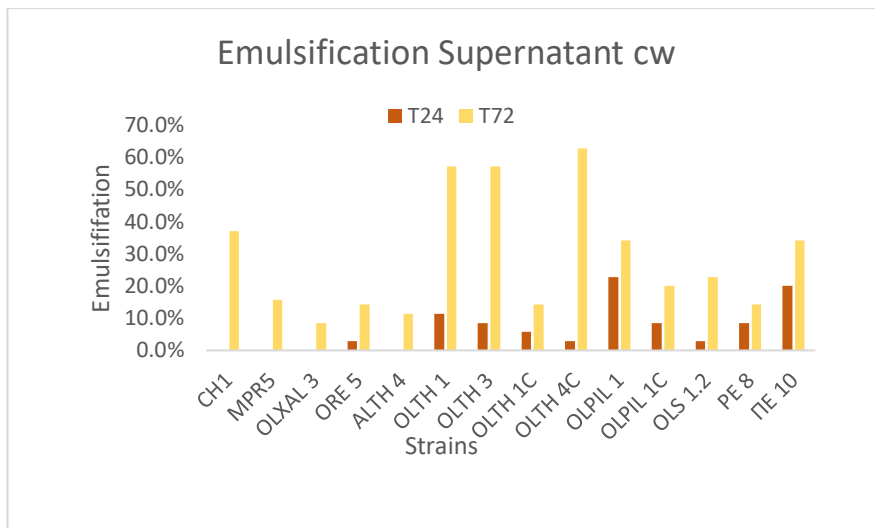
~ Αξιολόγηση της παραγωγής γαλακτώματος στις 24 και 72 ώρες.

Όσον αφορά τα υπερκείμενα φαίνεται ότι λίγα στελέχη είναι αυτά που δημιουργούν γαλάκτωμα στις 24 ώρες ζύμωσης. Τα στελέχη που σχηματίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό είναι το OLPIL 1 (22,9%) και το ΠΙΕ 10 (20%). Το ίδιο συμβαίνει και στα εκχυλίσματα από PBS (Γράφημα 16) με κυρίαρχα στελέχη το ΠΙΕ 10 (37,1%) και το CH1 (25,7%). Ωστόσο στο Γράφημα 15 είναι φανερό ότι τα υπερκείμενα δίνουν στις 72 ώρες πολύ υψηλά ποσοστά γαλακτώματος. Πρώτο φαίνεται να είναι το OLTN 4C με 62,86% και ακολουθούν τα: OLCI_7 και RS3 με 60%. Από την άλλη πλευρά δεν παίρνουμε το ίδιο υψηλές αποδόσεις στο PBS στις 72 ώρες. Το υψηλότερο ποσοστό έχει το στέλεχος OLPIL 1C με 28,6% και ακολουθούν τα OLCI_2, RS4, MPR5 με 17,1%.

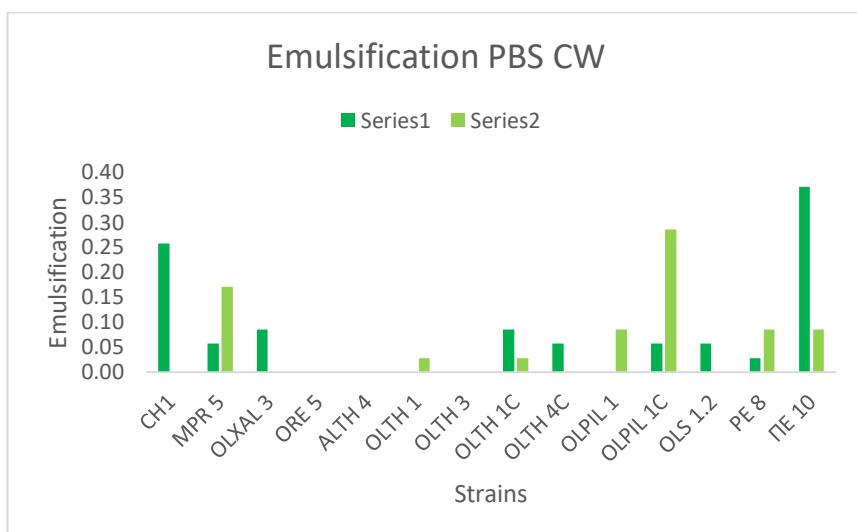
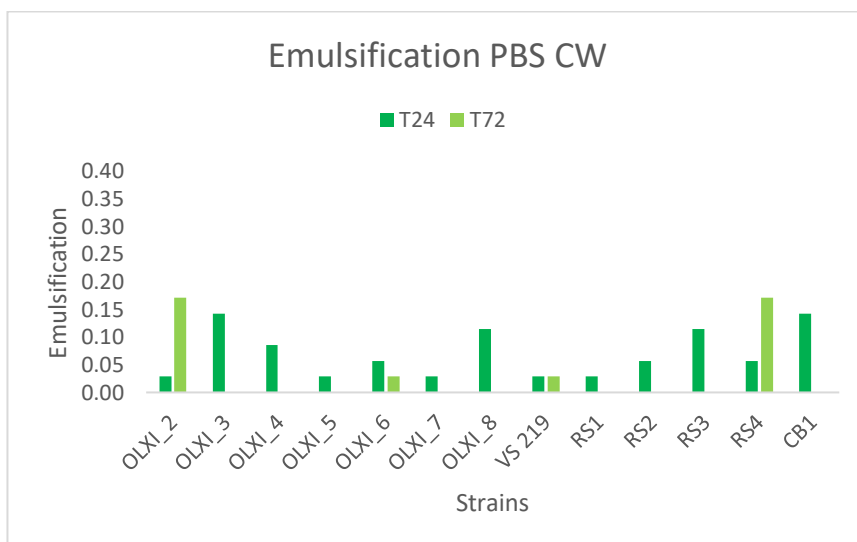
Αξιο αναφοράς είναι ότι τα στελέχη που μας έδωσαν τα μεγαλύτερα έως τώρα ποσοστά γαλακτώματος στα υπερκείμενα των 72 ωρών ζύμωσης, δηλαδή τα: OLTN 4C, OLCI_7 και RS3 δεν δημιουργούν καθόλου γαλάκτωμα ή δίνουν πολύ μικρό ποσοστό στις 24 ώρες ζύμωσης. Το ίδιο συμβαίνει και στα εκχυλίσματα από PBS τόσο για τις 24 όσο και για τις 72 ώρες ζύμωσης στο θρεπτικό μέσο.

Γράφημα 15 : Παραγωγή γαλακτώματος στα υπερκείμενα.





Γράφημα 16 : Παραγωγή γαλακτώματος στα εκχυλίσματα από PBS.

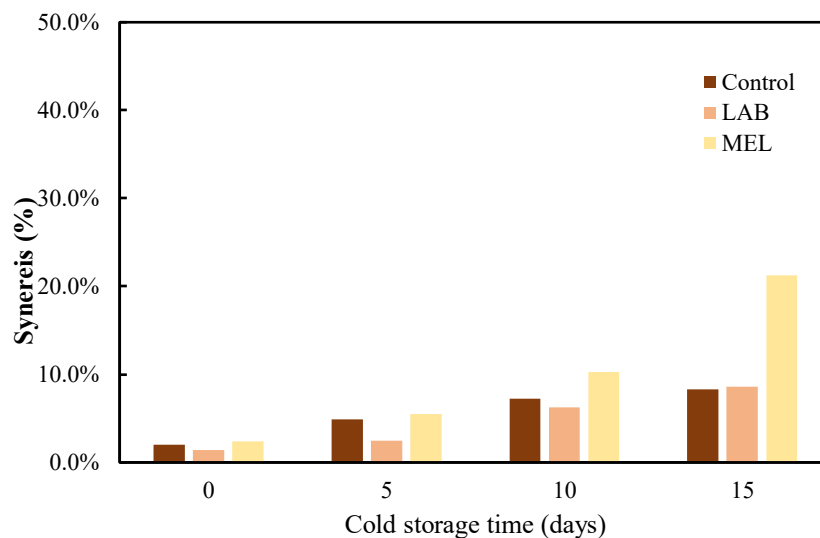


5. Αποτελέσματα για το κατσικίσιο γάλα

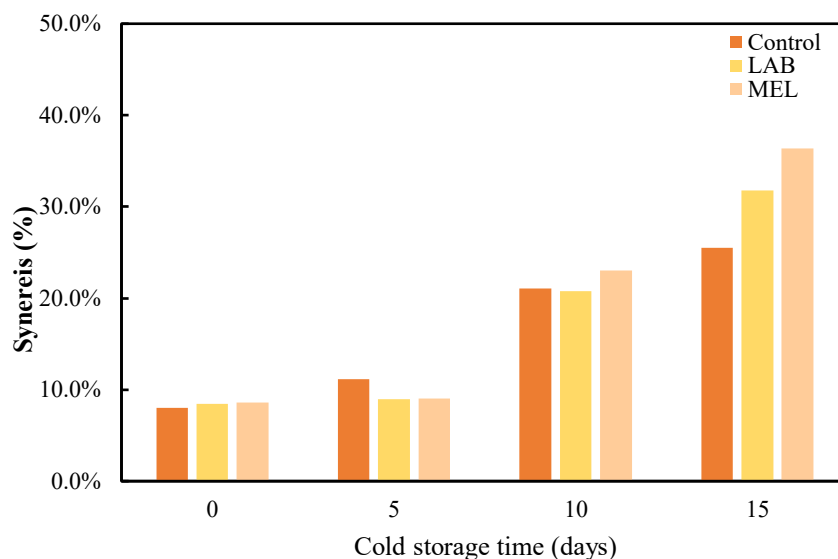
Παράλληλα με την διαλογή των στελεχών γαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε και εφαρμογή σε ξινόγαλα, στελέχους που είχε διαπιστωθεί από προηγούμενη μελέτη ότι παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Έτσι έγινε η προσθήκη του προβιοτικού στελέχους E108 σε κατσικίσιο γάλα και συγκρίθηκαν το κατσικίσιο γάλα με πλήρη λιπαρά και αυτό με λιγότερα λιπαρά. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της συναίρεσης και του μικροβιακού πληθυσμού στο πέρας των ημερών αποθήκευσης.

5.1 Συναίρεση στο πλήρες και στο κατσικίσιο με λιγότερα λιπαρά.

Γράφημα 17 : Συναίρεση στο πλήρες κατσικίσιο γάλα με E108



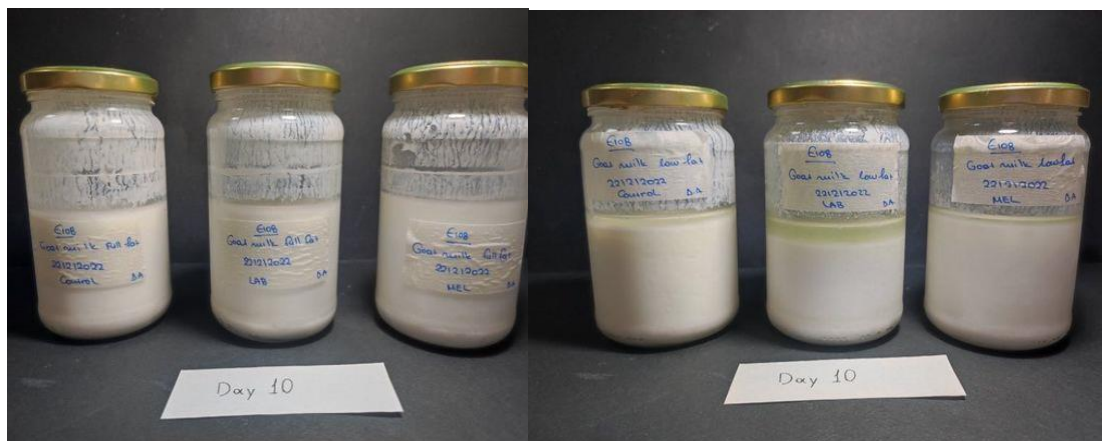
Γράφημα 18 : Συναίρεση στο γάλα με χαμηλά λιπαρά με E108



Από τα παραπάνω γραφήματα βλέπουμε ότι η συναίρεση στο πλήρες κατσικίσιο γάλα σε όλα τα είδη παραμένει σε χαμηλά ποσοστά σχεδόν όλες τις μέρες (περίπου 1-10%) με εξαίρεση το MEL στις 15 μέρες που εμφανίζει συναίρεση 21,28%. Από την άλλη, στο γάλα με χαμηλά λιπαρά η συναίρεση είναι πιο ανεβασμένη. Στις 0 μέρες είναι περίπου στο 8% και σταδιακά αυξάνεται φτάνοντας στις 15 ημέρες το Control στο 25,48%, το LAB 31,77% και τέλος το MEL στο 36,40%. Συγκρίνοντας λοιπόν τους δύο τύπους γάλακτος βλέπουμε ότι το πλήρες γάλα κατά την αποθήκευση του διατηρεί πιο σταθερή τη δομή του όπως θα δούμε και στις παρακάτω εικόνες, όπου βλέπουμε ότι το γάλα με χαμηλά λιπαρά σχηματίζει δύο φάσεις και στις 10 αλλά και στις 15 μέρες αποθήκευσης ενώ το πλήρες έχει συμπαγή μορφή. Αυτό συμβαίνει διότι στο πλήρες γάλα τα λιπαρά με την δράση των βιοεπιφανειοδραστικών ενώνονται με το νερό που περιέχει το γάλα με περισσότερους δεσμούς διατηρώντας σταθερή τη δομή τους. Αντίθετα στο άπαχο γάλα αυτή η συνοχή δεν μπορεί να διατηρηθεί αφού υπάρχουν λιγότερα λιπαρά άρα και λιγότεροι δεσμοί.

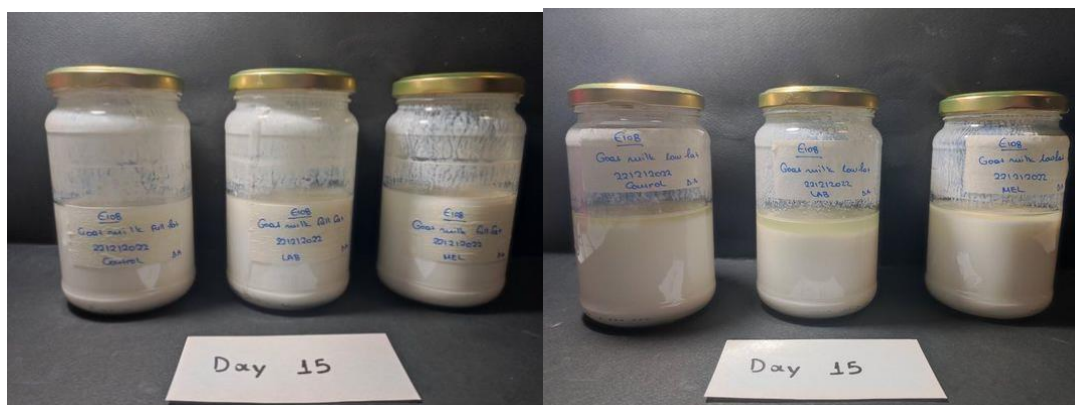
(A)

(B)



(Γ)

(Δ)

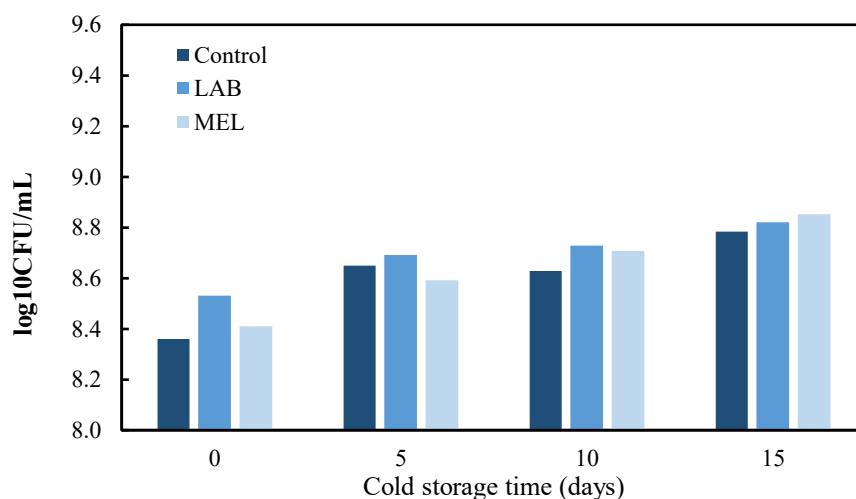


Εικόνα 14 : (Α) Full-fat goat milk with E108 Day 10, (Β) Low-fat goat milk with E108 Day 10, (Γ) Full-fat goat milk with E108 Day 15, (Δ) Low- fat goat milk with E108 Day 15.

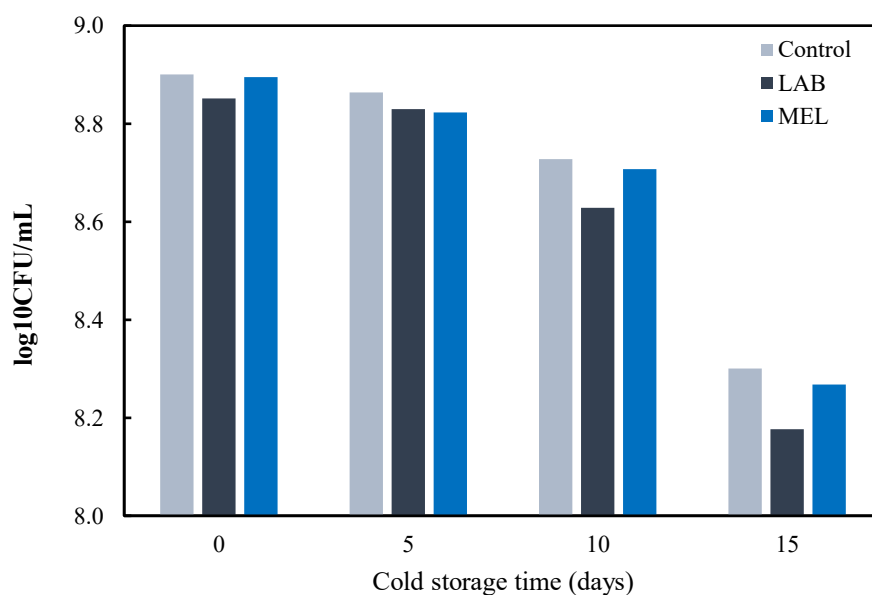
5.2 Μικροβιακός πληθυσμός στο κατσικίσιο γάλα με πλήρη και χαμηλά λιπαρά

Ο ρυθμός ανάπτυξης (Growth rate, μ) ισούται με την αύξηση/μείωση των κυττάρων ανά μονάδα χρόνου (cfu/g/h). Μπορεί να μετρηθεί με καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία, φασματοφωτομετρικά, ή με ξήρανση και ζύγιση της μικροβιακής βιομάζας. (Γιαβάσης, 2020). Ο μικροβιακός πληθυσμός αυξάνεται όσο το βακτήριο έχει θρεπτικά συστατικά να καταναλώσει. Ωστόσο στη φάση μείωσης ή παρακμής Ο μικροβιακός πληθυσμός μειώνεται γιατί: υπάρχει σημαντική ελάττωση θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου ενώ παράλληλα πραγματοποιείται και η σύνθεση σε μεγάλες ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι δρουν τοξικά και νεκρώνουν τα ζωντανά κύτταρα. (Καμιναρίδης, 2009).

Γράφημα 19: Μικροβιακός πληθυσμός στο πλήρες κατσικίσιο γάλα



Γράφημα 20 : Μικροβιακός πληθυσμός στο κατσικίσιο γάλα με χαμηλά λιπαρά



Στο Γράφημα 19 φαίνεται ότι ο μικροβιακός πληθυσμός σταδιακά αυξάνεται και στις 15 ημέρες ο μικροβιακός πληθυσμός φτάνει στην υψηλότερη συγκέντρωση, το οποίο σημαίνει ότι το πλήρες γάλα μέχρι και το τέλος της αποθήκευσης δεν έχει μπει στη φάση μείωσης. Αντίθετα το γάλα με χαμηλά λιπαρά στο Γράφημα 20, είναι σχεδόν σταθερό στις πρώτες 5 μέρες, ως τις 10 έχει μειωθεί ελάχιστα και παρατηρείται απότομη μείωση στις 15. Αυτό δείχνει ότι το γάλα με χαμηλά λιπαρά μπήκε στη φάση μείωσης. Επιπλέον δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα Control, LAB και MEL παρά μόνο στο πλήρες γάλα που στη μέρα 0 το LAB έχει ήδη περισσότερο πληθυσμό ενώ στο γάλα με χαμηλά λιπαρά στις 15 μέρες αποθήκευσης είναι αυτό με τον μικρότερο πληθυσμό.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το γάλα με λιγότερα λιπαρά δεν είναι τόσο ανθεκτικό στην αποθήκευση. Αυτό σχετίζεται και με την συνοχή του που δεν είναι το ίδιο καλή με αυτή του γάλακτος με πλήρη λιπαρά όπως είδαμε προηγουμένως στη συναίρεση.

6. Συμπεράσματα

Από το παρόν πείραμα έγινε η διαλογή των διάφορων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων ως προς αυτά που έχουν την ικανότητα να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε ορισμένη ποσότητα. Για τον σκοπό αυτής της πτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο πιθανά θρεπτικά υποστρώματα –M2 και Τυρόγαλο- με το ένα να δημιουργείται μέσα στο εργαστήριο και το άλλο προέρχεται από την βιομηχανία τροφίμων (απόβλητο) αντίστοιχα. Στην συνέχεια μέσω γραφημάτων συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα που έδωσαν τα στελέχη για κάθε μέθοδο που πραγματοποιήθηκε. Μεταξύ αυτών όσον αφορά:

- Την κατανάλωση γλυκόζης. Φαίνεται ότι με το M2 τα περισσότερα στελέχη έχουν καταναλώσει πλήρως την γλυκόζη στις 72 ώρες κάτι που δεν συμβαίνει για το τυρόγαλο, καθώς εκεί παρατηρείται ότι λίγα στελέχη καταναλώνουν γλυκόζη και το μόνο που την απορροφά πλήρως είναι το RS4.
- Την παραγωγή ξηρής βιομάζας. Είναι περίπου ίδια μεταξύ 24 και 72 ωρών με το στέλεχος MPR5 να παρουσιάζει ενδιαφέρον αφού στις 24 ώρες σχηματίζει βιομάζα μόλις 0,25 g/L και στις 72 ώρες να φτάνει το 1,45 g/L. Το ίδιο συμβαίνει και τυρόγαλο με το ίδιο στέλεχος. Στο τυρόγαλο βλέπουμε ωστόσο λίγο καλύτερα αποτελέσματα από ότι στο M2.
- Την επιφανειακή τάση. Στα υπερκείμενα έχουμε συνολικά μεγαλύτερη μείωση της επιφανειακής από ότι στο PBS. Ανάμεσα στα υπερκείμενα που ζυμώθηκαν στο M2 αυτά που μείωσαν περισσότερο την επιφανειακή τάση είναι το ΠΕ10 (50,2%) για τις 24 ώρες και το OLXI_4 (50,5%) για τις 72 ώρες. Ενώ, στο τυρόγαλο έχουμε το RS3 (51%) για τις 24 ώρες και το OLXI_3 (46,9%) για τις 72 ώρες.
- Την μετατόπιση ελαίου. Στο M2 έχουμε γενικά μικρή μετατόπιση τόσο στα υπερκείμενα όσο και στο PBS με εξαίρεση το OLXI_7 που έδωσε μετατόπιση

ελαίου 2,5 cm με μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα στελέχη. Όσον αφορά το τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο τυρόγαλο δίνουν τα περισσότερα στο υπερκείμενο τους μεγαλύτερες μετατοπίσεις από ότι στο M2 κυρίως στις 72 ώρες. Μεγαλύτερη μετατόπιση φαίνεται να έχει το MPR5 (4,6 cm). Στα εκχυλίσματα από PBS δεν έχουμε το ίδιο θετικά αποτελέσματα ωστόσο και εδώ το MPR5 δημιουργεί μεγαλύτερη μετατόπιση (2,05 cm).

- Την παραγωγή γαλακτώματος. Λίγα στελέχη δίνουν γαλάκτωμα και τα περισσότερα από αυτά φαίνεται να είναι στα υπερκείμενα στο τυρόγαλο. Πολύ υψηλό γαλάκτωμα δίνουν στο τυρόγαλο στις 72 ώρες τα υπερκείμενα των στελεχών OLTH 4 (62,86%), OLXI_7 και RS3 (60,00%). Άξιο αναφοράς είναι ότι τα ίδια στελέχη δεν παρουσιάζουν σχεδόν καθόλου γαλάκτωμα στις 24 ώρες.

Επιπλέον ελέγχθηκε ο ρόλος γνωστής δράσης βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας (E108) κατά την αποθήκευση κατσικίσιου γάλακτος πλήρων και χαμηλών λιπαρών, από όπου διαπιστώθηκε ότι:

- Το πλήρες κατσικίσιο γάλα διατηρεί καλύτερα τη συνοχή του συγκριτικά με αυτό με τα χαμηλά λιπαρά.
- Ενώ παράλληλα το γάλα με χαμηλά λιπαρά δεν διατηρεί τον μικροβιακό πληθυσμό του στις 15 μέρες που το αποθηκεύσαμε.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Banat, I., Makkar, R., & Cameotra, S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology* (53), 495-508
2. Sambanthamoorthy K, Feng X, Patel R, Patel S, Paranavitana C (2014) Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol* 14:197
3. Saravanakumari P, Mani K (2010) Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresour Technol* 101:8851–8854
4. Gudiñã EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2010) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 76:298–304
5. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KG, Tsakalidou E, Nychas GE, Panagou EZ, Tassou CC (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol* 33:282–291
6. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365–378
7. Kelesidis T (2012) Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther Adv Gastroenterol* 5:111–125
8. <https://el.thpanorama.com/articles/biologa/glucolpidos-clasificacin-estructura-y-funciones.html>
9. https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/BIO_U_154/%CE%94%CE%B9%CE%B1%CE%BB%CE%AD%CE%BE%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%9C%CE%B1%CE%B8%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/Lecture_11.pdf
10. https://www.google.com/search?q=%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CE%BF%CE%BB%CE%B9%CF%80%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CE%B1&sxsrf=ALiCzsYg6n8-1Gh0z-gikC6Gu42cmAQ-fw:1663930088223&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwi2r9vO3qr6AhWDHOwKHdM_A7gQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1920&bih=954&pr=1#imgsrc=0cMq4nZ9uPg0pM

11. <https://rotamathe.com/2020/03/15/%CF%84%CE%B9-%CE%B5%CE%AF%CE%BD%CE%B1%CE%B9-%CE%B7-%CE%B5%CF%80%CE%B9%CF%86%CE%B1%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AE-%CF%84%CE%AC%CF%83%CE%B7-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%BC%CE%B5-%CF%80%CE%BF%CE%B9%CF%8C/>
12. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/08/Ti-prepei-na-gnorizete-giatin-mikroviaki-antoxi.pdf>
13. <https://ktisis.cut.ac.cy/bitstream/10488/8648/1/%CE%A0%CE%91%CE%A0%CE%91%CE%9C%CE%91%CE%A1%CE%9A%CE%9F%CE%A5-%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%91%CE%97%CE%9B.pdf>
14. https://apothesis.lib.hmu.gr/bitstream/handle/20.500.12688/163/ApostolidouKassandra_KanelliAikaterini2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
15. Τυρόγαλο στο Λεξικό της κοινής νεοελληνικής. Ανάκτηση 13/11/2014.
16. 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.
17. Hippolyte T. Mouafo, Alphonse T. Sokamte, Augustin Mbawala, Robert Ndjouenkeu, Somashekar Devappa (Απρίλιος, 2022) : Food Bioscience-Βιοεπιφανειοδραστικά από βακτήρια γαλακτικού οξέος
18. Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2011) Biosurfactant-Producing Lactobacilli: Screening, Production Profiles, and Effect of Medium
19. https://hellanicus.lib.aegean.gr/bitstream/handle/11610/20518/%CE%A4%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%A0%CF%84%CF%85%CF%87%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AE%20%CE%A3%CF%84%CE%B1%CF%85%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%BF%CF%85%20%CE%94%CE%BF%CF%85%CE%BC%CE%BF%CF%85.pdf?sequence=1&isAllowed=n&fbclid=IwAR0EdBumSLShps3PgGLEt231d1iOW_wDEY_C1x3KiAY7otQCjo4hX2jSYUQ
20. Καμιναρίδης, Στ. και Μοάτσου, Γ., Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 2009.

21. Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
22. <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/CHEM2023/9%20%CE%A0%CF%81%CF%8C%CF%83%CE%B8%CE%B5%CF%84%CE%B1.pdf>
23. Εργαστήριο Μηχανικής Μεταποίησης Αγροτικών Προϊόντων. «Αξιοποίηση Τυρογάλακτος με Ζύμωση για Παραγωγή Αλκοόλης» (PDF). *fabe.gr*. Αρχειοθετήθηκε από το πρωτότυπο (PDF) στις 1 Μαΐου 2015. Ανακτήθηκε στις 12 Νοεμβρίου 2014.
24. «Παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων» (PDF). *Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Κύπρου*. Ανακτήθηκε στις 16 Σεπτεμβρίου 2019.
25. Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (1998) Ελληνικά Τυριά – Μια παράδοση αιώνων, σελ.117 – 128. Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Athens.
26. <https://www.freevia.gr/%CE%BA%CE%B1%CF%84%CF%83%CE%B9%CE%BA%CE%AF%CF%83%CE%B9%CE%BF-%CE%B3%CE%AC%CE%BB%CE%B1-%CE%BF%CF%86%CE%AD%CE%BB%CE%B7-%CF%85%CE%B3%CE%B5%CE%AF%CE%B1/>
27. Daniele Focosi, Production and Characterization of a Bioemulsifier Derived from Microorganisms with Potential Application in the Food Industry. Received: 23 May 2022 / Revised: 16 June 2022 / Accepted: 17 June 2022 / Published: 20 June 2022
28. https://www.google.com/imgres?imgurl=https://www.researchgate.net/publication/49854063/figure/fig5/AS:201524790730772@1425058662727/Mechanism-of-biosurfactant-activity-in-metal-contaminated-soil-74.png&imgrefurl=https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-biosurfactant-activity-in-metal-contaminated-soil-74_fig5_49854063&tbnid=bQSv3In8sPf60M&vet=1&dclid=J_tIK_vmxiZTE_M&w=459&h=303&hl=el&source=sh/x/im
29. <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/CHEM2023/10%20%CE%91%CE%BB%CE%BB%CE%BF%CE%B9%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82.pdf>

30. <https://www.dairy-services.com/%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CF%8C%CE%B6%CE%B7-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CF%8C%CE%B6%CE%B7-%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%BF%CE%BA%CE%BF%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CE%AC/>
31. 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
32. Nitschke, M., & Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), 631-638.
33. Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.
34. 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.
35. Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
36. https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/SE_TR_U114/%CE%93%CE%99%CE%91%CE%92%CE%91%CE%A3%CE%97%CE%A3-%CE%93%CE%95%CE%9D%CE%99%CE%9A%CE%97%20%CE%9C%CE%99%CE%9A%CE%A1%CE%9F%CE%92%CE%99%CE%9F%CE%9B%CE%9F%CE%93%CE%99%CE%91-2020.pdf
37. 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*.
38. Τυροκομία β' έκδοση Εμμανουήλ Μιχ. Ανυφαντάκης
39. <https://ocw.aoc.ntua.gr/modules/document/file.php/CHEMENG126/%CE%98%CE%B5%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20>

[%CE%95%CE%BD%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%204/Section%204b.pdf](#)

40. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852417301645?via%3Dihub>
41. Anila FariqAy, esha Saeed – Production and Biomedical Applications of Probiotic Biosurfactants -Received: 24 October 2015 / Accepted: 24 November 2015 Springer Science+Business Media New York 2016
42. Zerrin ALKAN1, Zerrin ERGİNKAYA, Gözde KONURAY, Emel TURHAN- Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium - Received: 18.03.2019, Accepted/Published Online: 13.08.2019, Final Version: 02.10.2019
43. Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in biotechnology.
44. 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.