

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ
ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ
ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΠΟΛΥΧΡΟΝΗ ΛΟΥΚΙΑ ΡΑΦΑΕΛΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2023

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ
ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ
ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαο Κοψαχείλη, Αν. Καθηγητής

Αικατερίνη Παπαδάκη, Επ. Καθηγήτρια

Δρ. Χαρίλαο Παπαποστόλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των όξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και σημαντικό ερευνητικό πεδίο καθώς έχειδειχθεί πως εμφανίζουν σημαντικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν προς όφελος του ανθρώπου με διάφορους τρόπους. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη έγινε μια πρώτη προσπάθεια ανάδειξης του προβιοτικού δυναμικού στελεχών όξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν από λευκό τυρί Κεφαλονιάς. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν *in vitro* η επιβίωσή των μικροοργανισμών παρουσία οξέων (pH 2,5) και χολικών αλάτων (1%), η πιθανή αιμολυτική τους δράση αλλά και η πιθανή αντιμικροβιακή ικανότητα τους έναντι τροφιμογενών παθογόνων. Στα αποτελέσματα των συγκεκριμένων δοκιμασιών καταγράφηκαν 12 στελέχη με υψηλή αντοχή σε όξινο περιβάλλον δίνοντας πληθυσμούς βιώσιμους πληθυσμούς που κυμάνθηκαν από 6,32-8,59 log cfu/mL. Στη συνέχεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε πως τα 5 από τα 12 στελέχη δεν εμφάνισαν αιμολυτική δράση και χαρακτηρίστηκαν ως ασφαλή με βάση τη συγκεκριμένη ιδιότητα. Η αντιβακτηριακή δράση των 5 επιλεγμένων στελεχών ελέγχθηκε έναντι 4 κοινών παθογόνων μικροοργανισμών με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τέλος, τα στελέχη δοκιμάστηκαν επίσης ως προς την τεχνολογική ιδιότητα της οξίνισης του γάλακτος παρουσιάζοντας μια ικανή δυναμική οξίνισης εντός των πρώτων 6 ωρών. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν άλλα στελέχη όξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία αξιοποιήθηκαν σε δοκιμές που αφορούσαν στην ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Στην περίπτωση αυτή στόχος ήταν η εύρεση στελεχών που μπορούν να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες παρέχουν σημαντικές ιδιότητες όπως η μείωση της επιφανειακής τάσης, η δημιουργία γαλακτωμάτων και λόγω των ιδιοτήτων τους ενδιαφέρουν αρκετά τη βιομηχανία καθώς δύνανται να αξιοποιηθούν σε πλήθος εφαρμογών.. Στην παρούσα μελέτη τα στελέχη που μελετήθηκαν κατά τη διαδικασία του screening φάνηκε πως δύνανται να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης αλλά και σε υπόστρωμα τυρογάλακτος. Σε επόμενο στάδιο ένα από τα καλύτερα στελέχη το *L. fermentum* F70 αναφορικά με τα αποτελέσματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών επιλέχθηκε για να πραγματοποιηθούν ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρες σε συνθετικά υποστρώματα με γλυκόζη και λακτόζη ως πηγή άνθρακα αλλά και σε υπόστρωμα τυρογάλακτος. Τα αποτελέσματα σε αυτή την περίπτωση έδειξαν πως το στέλεχος δύνανται να αξιοποιήσει πλήρως τις πηγές άνθρακα σε όλες τις περιπτώσεις, παρόλα αυτά για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από τη χρήση της λακτόζης, τόσο σε συνθετικό υπόστρωμα όσο και της λακτόζης του τυρογάλακτος, καθώς είχαν όμοια αποτελέσματα. Η επιφανειακή τάση μειώθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό τις 6 πρώτες ώρες της ζύμωσης σε όλες τις περιπτώσεις και η χαμηλότερη τιμή της επιφανειακής τάσης σημειώθηκε στη ζύμωση με το συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης (35,7 mN/m) και 0.35 g/L συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ακολούθησε η

ζύμωση με τη λακτόζη του τυρογάλακτος 39.3 mN/m χαμηλότερη τιμή επιφανειακής τάσης και όμοια συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (0.36 g/L) αποδεικνύοντας πως η χρήση του τυρογάλακτος δύναται να αντικαταστήσει πλήρως την χρήση συνθετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χωρίς αυτό να επηρεάσει την παραγωγή και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

ABSTRACT

The study of lactic acid bacteria is a particularly interesting and important research field, as it has been shown that they display important properties that can be used for various health benefits. In the present study, a first attempt was made to highlight the probiotic potential of lactic acid bacteria strains isolated from Kefalonia white cheese. Specifically, *in vitro* studies were performed including the survival of microorganisms in the presence of acids (pH 2.5) and bile salts (1%), their possible hemolytic activity, and their potential antimicrobial capacity against foodborne pathogens. In the results of the specific tests, 12 strains with high resistance to the acidic environment were recorded, with viable populations ranging from 6.32 to 8.59 log cfu/mL. Furthermore, it was observed that 5 of the 12 strains lacked hemolytic activity; hence, they were classified as safe due to this particular characteristic. The antibacterial activity of the five selected strains was also tested against four common pathogens with satisfactory results. Finally, the strains were also tested for the technological property of milk acidification, showing competent dynamic acidification within the first 6 hours.

Subsequently, other strains of lactic acid bacteria were selected and utilized in tests related to their ability to produce biosurfactants. In this case, the goal was to find strains that can produce these bioactive substances that exhibit significant properties, such as reducing surface tension, forming gels, having antimicrobial and antioxidant activity, and maintaining stability under various temperature and pH conditions. These substances are of considerable interest to the industry as they can be applied in various applications. Moreover, their biotechnological production from Generally Recognized as Safe (GRAS) lactic acid bacteria contributes to their utilization in the food and pharmaceutical industries, while the use of various waste materials as low-cost substrates supports the implementation of a process within the framework of the circular bioeconomy.

In the present study, the strains that were screened were found to be capable of producing biosurfactants in a synthetic glucose substrate as well as in a whey substrate. In the next stage, one of the most promising strains, *L. fermentum* F70, was chosen to carry out fermentations in bioreactors using synthetic substrates with glucose and lactose as carbon sources, as well as a whey substrate. The results in this case showed that the strain was able to fully utilize the carbon sources in all cases. However, the lowest surface tension value was achieved in the fermentation with the synthetic lactose substrate (35.7 mN/m) and a concentration of 0.35 g/L of biosurfactants. This was followed by the fermentation with whey lactose, which had a lower surface tension value of 39.3 mN/m and a similar concentration of biosurfactants (0.36 g/L), demonstrating that the use of whey lactose can completely replace the use of synthetic substrates for the production of bioactive substances without affecting the production and properties of the final product.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1

1.Εισαγωγή.....	11
1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	11
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	12
1.1.2 Κριτήρια ταξινόμησης.....	12
1.2 Χρήση στα τρόφιμα.....	13
1.2.1 Προβιοτικές καλλιέργειες.....	14
1.3 Βιοπροστατευτικά	17
1.3.1 Βακτηριοσίνες	17
1.3.2 Οξέα.....	19
1.4 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια.....	20
1.4.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων.....	21
1.6 Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	23
1.6.1 Επιφανειακή τάση	23
1.6.2 Γαλακτοματοποίηση.....	23
1.6.3 Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων.....	24
1.6.4 Αντιμικροβιακές ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	25
1.7 Ταξινόμηση και χαρακτηρισμός βιοεπιφανειοδραστικών.....	25
1.8 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα τρόφιμα.....	26
1.9 Λευκό τυρί άλμης και οξυγαλακτικά βακτήρια.....	27

Κεφάλαιο 2

2.Σκοπός.....	29
---------------	----

Κεφάλαιο 3

3.Υλικά και μέθοδοι.....	30
3.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός νέων στελεχών.....	30
3.2 Προβιοτικά τεστ.....	30
3.2.1 Αντοχή σε χαμηλό pH και χολικά άλατα.....	30
3.2.3 Αιμολυτική δραστηριότητα.....	30

3.2.3 Αντιμικροβιακές δραστηριότητες.....	31
3.3 Δοκιμή οξίνισης γάλακτος.....	32
3.4 Μικροβιακά στελέχη - Γαλακτικά βακτήρια.....	32
3.5 Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων.	33
3.5.1 Χρήση τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα- Αποπρωτεϊνοποίηση τυρογάλακτος.....	33
3.5.2 Παρασκευή συνθετικού υποστρώματος M2.....	33
3.6 Διαδικασία μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	34
3.7 Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών.	34
3.8 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους.	35
3.9 Μέτρηση υπολειπόμενων σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος.....	36
3.10 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια.....	36
3.10.1 Μέτρηση επιφανειακής τάσης.	36
3.10.2 Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E24 %).	37
3.10.3 Μέθοδος μετατόπισης ελαίου.	38

Κεφάλαιο 4

4.Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	39
4.1 Μελέτη προβιοτικού δυναμικού στελεχών.....	39
4.1.1 Αντοχή σε οξέα και χολικά άλατα.	39
4.1.2 Αιμολυτική δράση.	40
4.1.3 Αντιμικροβιακή ικανότητα.....	41
4.2 Οξεοπαραγωγική ικανότητα σε γάλα.	44
4.3 Μελέτη γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	45
4.3.1 Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθετικό υπόστρωμα.....	45
4.3.2 Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες.....	47
4.3.3 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω	48
4.3.4 Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα.....	50
4.4 Μελέτη γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με θρεπτικό υπόστρωμα τυρόγαλα.	53
4.4.1 Κατανάλωση λακτόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια	

της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε υπόστρωμα τυρογάλακτος.....	54
4.4.2 Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες.....	55
4.4.3 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.	55
4.4.4 Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα.....	57
4.5 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος <i>L. Fermentum</i> F70.	60

Κεφάλαιο 5

Συμπέρασμα	65
------------------	----

Κεφάλαιο 6

Βιβλιογραφία	67
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	67
Διεθνής Βιβλιογραφία.....	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Μείωση της επιφανειακής τάσης λόγω συσσώρευσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στις επιφάνειες (Sharma et al. 2016)......	23
Εικόνα 2 : Γαλακτωματοποίηση με τη μεσολάβηση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Neu and Poralla 1990).	24
Εικόνα 3 : Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (Sharma et al. 2016)	25
Εικόνα 4 : Παραγωγή λευκού τυριού.	28
Εικόνα 5 : Μεμβράνες διαπίδυσης	35
Εικόνα 7 : Γαλάκτωμα στελέχους F16.	38
Εικόνα 8 : Τρυβλίο petri με blood agar για τη διαδικασία αιμόλυσης.	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Ομάδες του γένους <i>Lactobacillus</i> με βάση τα προϊόντα ζύμωσης.....	13
Πίνακας 2 : Σύσταση τυρόγαλου (Πηγή : Καμιναρίδης Στέλιος)	22
Πίνακας 3 : Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη	32
Πίνακας 4 : Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2)	33
Πίνακας 5 : Παρουσίαση στελεχών κατά την αιμολυτική δράση.....	41
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους <i>L. Fermentum</i> F70 σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.....	63
Πίνακας 7: Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους <i>L. Fermentum</i> F70 σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.....	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 : Επιβίωση και αντοχή στελεχών σε οξέα και χολικά άλατα.	40
Γράφημα 2 : Αντιμικροβιακή δράση των στελεχών έναντι του παθογόνων μικροοργανισμών.....	44
Γράφημα 3 : Οξεοπαραγωγική ικανότητα σε γάλα των στελεχών σε skim milk.....	45
Γράφημα 4: Συγκέντρωση γλυκόζης στα υπερκείμενα καλλιέργειας μετά από 6,24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	46
Γράφημα 5 : Παραγωγή γαλακτικού οξέος στα υπερκείμενα καλλιέργειας μετά από 6,24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	48
Γράφημα 6: Ολικό ξηρό βάρος (TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης ως θρεπτικό υπόστρωμα.....	49
Γράφημα 7: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα της ζύμωσης μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα M2.....	50
Γράφημα 8 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα κυτταρών στις 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα M2.	51
Γραφημα 9:Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω), στα υπερκείμενα της ζύμωσης μετά από 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης M2.....	52
Γράφημα 10: Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω) στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα M2.....	54
Γράφημα 11 : Κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια σε 6, 24, 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.....	55

Γράφημα 12 : Παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια σε 6, 24, 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.....	55
Γράφημα 13 : Ολικό ξηρό βάρος (TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος....	56
Γράφημα 14 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα της ζύμωσης στις 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.	57
Γράφημα 15 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα rbs στις 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.	59
Γράφημα 16 : Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω) στα υπερκείμενα σε 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.	60
Γράφημα 17 : Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα εκχυλίσματα rbs σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.	61
Γράφημα 18 :Κινητική ανάπτυξης του στελέχους <i>L. Fermentum</i> F70 σε συνθετικό υπόστρωμα με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.....	62
Γράφημα 19 : Κινητική ανάπτυξης του στελέχους <i>L. Fermentum</i> F70 σε συνθετικό υπόστρωμα με λακτόζη ως πηγή άνθρακα.....	64
Γράφημα 20 : Κινητική ανάπτυξης του στελέχους <i>L. Fermentum</i> F70 σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Από τα αρχαία χρόνια τα οξυγαλακτικά βακτήρια είχαν ένα σημαντικό αντίκτυπο στον τρόπο ζωής, στον πολιτισμό και στις παραδόσεις του ανθρώπου. Τα τελευταία χρόνια δε, δεδομένης της διεύρυνσης της γνώσης στον τομέα των τροφίμων, απέκτησαν επίσης κ σημαντική οικονομική σημασία. Τα βακτήρια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τροφίμων που υπόκεινται στη διαδικασία ζύμωσης. Από άποψη ποιότητας εξασφαλίζουν τη ιδιαίτερη υφή και το άρωμα στα τρόφιμα, ενώ αποτελούν και φυσικά συντηρητικά, καθώς προκαλούν μείωση του pH των προϊόντων παράγοντας χαρακτηριστικά γαλακτικό οξύ. Επιπλέον παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές, ενώσεις όπως είναι το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η αιθανόλη καθώς και κάποιες βακτηριοσίνες (Van de Guchte et al. 2002, Lucke FK2000). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν επίσης ένα ασφαλές ιστορικό εφαρμογής στα τρόφιμα. Είναι οι πιο σημαντικοί μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην παραγωγή τροφίμων ζύμωσης όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ζυμούμενα δημητριακά, ζυμούμενα προϊόντα κρέατος, κρασί αλλά και μπύρα. Γενικότερα, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις παραπάνω ζυμώσεις πρέπει να χαρακτηρίζονται από κάποιες προϋποθέσεις, είτε αυτές αφορούν την ασφάλεια της διαδικασίας, είτε στην απόδοση που τη χαρακτηρίζει.

(Caplice & Fitzgerald, 1999)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα όπως σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη, φυτά, σε γαλακτοκομικά προϊόντα, ζυμούμενο κρέας και ψάρια, τεύτλα, πατάτες, πολτούς, ξινολάχανα, λάχανα τουρσί, ποτά, φυτά, ακόμα σε διάφορα οργανικά απόβλητα, (Stiles, 1996). Αποτελούν επίσης μέρος της υγιούς μικροχλωρίδας του ανθρώπινου εντερικού σωλήνα.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν περισσότερα από 60 γένη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, η ζύμωση των τροφίμων συχνά περιλαμβάνει τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* κ.λπ. (Mokoena, 2017 et. al). Ωστόσο, πρόσφατα προτάθηκε να συνδυαστούν οι οικογένειες *Lactobacillaceae* και *Leuconostocaceae* σε μία ενιαία. Επίσης, χωρίστηκαν σε 25 γένη τα μέλη του γένους *Lactobacillus*. Κάποια είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης για τη παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων. Επίσης κάποια είδη χρησιμοποιούνται ως εν δυνάμει προβιοτικά στελέχη, και έτσι πιθανά ασκούν ευεργετική δράση στο εντερικό μικροβίωμα.

1.1.2 Κριτήρια ταξινόμησης

Τα οξεόφιλα βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Firmicutes*, οικογένεια *Bacillaceae*, γένος *Lactobacillus* και εδώ και Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα δεδομένα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες και περιλαμβάνουν περίπου 40 γένη. Αυτό αντανakλά την πολυπλοκότητα και την ποικιλομορφία αυτής της ομάδας βακτηρίων και υποδηλώνει την ανάγκη για λεπτομερέστερη έρευνα και ταξινόμηση με βάση γενετικές πληροφορίες.

Η ταξινόμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στους παρακάτω παράγοντες:

- μορφολογία (ράβδοι, κόκκοι, τετράδες)
- στον τρόπο σχηματισμού του γαλακτικού οξέος (διαδικασία ζύμωσης)
- στην ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις οξέος και άλατος
- στην ανοχή τους στην αιθανόλη και σε αλκαλικά περιβάλλοντα
- στην σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους και των λιπαρών οξέων που περιέχουν
- στα ισομερή του γαλακτικού οξέος που παράγουν από την ζύμωση της γλυκόζης
- στην συμπεριφορά τους απέναντι στο οξυγόνο (αναερόβια ή μικροαερόβια ανάπτυξη)
- στην υδρόλυση της αργινίνης
- στον σχηματισμό ακετοΐνης
- στην παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών
- στις γενικότερες ανάγκες τους σε παράγοντες ανάπτυξης (Koning et al., 2009).

Με βάση τα προϊόντα ζύμωσης της γλυκόζης, το γένος *Lactobacillus* χωρίζεται σε τρεις ομάδες: (1) υποχρεωτικά ομοζυμωτικά βακτήρια, (2) προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια, (3) υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους, οι οποίοι ζυμώνουν αποκλειστικά την γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ. Οι μικροοργανισμοί της συγκεκριμένης ομάδας δεν ζυμώνουν τις πεντόζες και το γλυκονικό οξύ και στο σύνολο τους συνδέονται με ζυμώσεις φυτικών και γαλακτομικών υποστρωμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες (45-50°C). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους προαιρετικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους, οι οποίοι ζυμώνουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ και πολλοί από αυτούς παράγουν αέρια ζυμώνοντας τα γλυκονικά οξέα αλλά όχι την γλυκόζη. Επίσης είναι ικανοί να ζυμώσουν τις πεντόζες παράγοντας παράλληλα γαλακτικό και οξικό οξύ. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους, οι οποίοι ζυμώνουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, και/ή αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των μικροοργανισμών της ομάδας αυτής είναι η παραγωγή αερίων που οφείλεται στην ζύμωση της γλυκόζης. Μεταξύ των υποχρεωτικά ετεροζυμωτικών γαλακτοβακίλλων ιδιαίτερη προσοχή έχει τραβήξει ο *Lb. reuteri*

εξαιτίας μια οργανικής αντιμικροβιακής ουσίας που παράγει, της ρευτερίνης, η οποία δρα εναντίον ενός ευρέος φάσματος παθογόνων μικροοργανισμών (Stiles and Holzapfel, 1997).

Πίνακας 1: Ομάδες του γένους *Lactobacillus* με βάση τα προϊόντα ζύμωσης

1η ομάδα	2η ομάδα	3η ομάδα
Υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί	Προαιρετικά ετεροζυμωτικοί	Υποχρεωτικά ετερωζυμωτικοί
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. parakefir</i>
<i>Lb. Mali</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

Αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη βιομηχανία τροφίμων. (Vandamme et al. 1996).

1.2 Χρήση στα τρόφιμα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που συνδέονται συχνά με την τροφική βιομηχανία και την παραγωγή τροφίμων μπορούν συνοπτικά να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

1. ***Streptococcus***: Πολλά είδη του γένους *Streptococcus* συμμετέχουν στην παραγωγή τυριού, γιαούρτι και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων.
2. ***Lactococcus***: Το γένος *Lactococcus* περιλαμβάνει το *Lactococcus lactis*, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή τυριού και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων.
3. ***Enterococcus***: Τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* μπορούν να συμβάλουν στην ωρίμανση τυριού και σε άλλες διαδικασίες παραγωγής τροφίμων.
4. ***Lactobacillus***: Τα *Lactobacillus* είναι ευρέως γνωστά για τον ρόλο τους στην παραγωγή γιαούρτι, κεφίρ, και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και σε πολλά άλλα τρόφιμα.
5. ***Leuconostoc***: Τα *Leuconostoc* είναι σημαντικά στην παραγωγή τυριού και σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα.

6. ***Pediococcus***: Τα βακτήρια του γένους *Pediococcus* χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων.
7. ***Weissella***: Τα βακτήρια του γένους *Weissella* μπορούν να βρίσκονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα και να συμβάλουν στην ωρίμανσή τους.
8. ***Oenococcus***: Το γένος *Oenococcus* σχετίζεται με την οينوποίηση και βοηθά στην ζύμωση του κρασιού.
9. ***Carnobacterium***: Τα *Carnobacterium* είναι γνωστά για τη συμβολή τους στην ωρίμανση κρέατος.
10. ***Tetragenococcus***: Το γένος *Tetragenococcus* είναι συνδεδεμένο με την παρασκευή σόγιας και άλλων προϊόντων της σόγιας.

1.2.1 Προβιοτικές καλλιέργειες

Αρχικά, ο Louis Pasteur, ήταν αυτός που ταυτοποίησε ότι για τη διαδικασία της ζύμωσης είναι υπεύθυνα τα βακτήρια και οι ζύμες, χωρίς όμως να τα συνδέσει με οποιεσδήποτε εμφανείς επιπτώσεις στην υγεία. Έτσι, το 1905, ο Elie Metchnikoff (Ρώσος γεννήτορας του Βραβείου Νόμπελ), συνεργάστηκε με τον Pasteur στη δεκαετία του 1860 και κατάφερε να συνδέσει τη μακροζωία του πληθυσμού με τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση. Ο Eli Metchnikoff, είχε προτείνει ότι «Τα εντερικά μικρόβια, τα οποία παρουσιάζουν εξάρτηση από τα τρόφιμα, μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη μέτρων για την τροποποίηση της χλωρίδας στο σώμα μας και την αντικατάσταση των επιβλαβών μικροβίων από χρήσιμα μικρόβια».

Αργότερα, ο Henry Tissier, γάλλος παιδίατρος, διαπίστωσε ότι τα παιδιά με διάρροια είχαν μικρό αριθμό βακτηριδίων. Ακόμη παρατήρησε πως οι μικροοργανισμοί "*bifidobacterium*", τους οποίους είχε απομονώσει από ένα βρέφος, θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε ασθενείς που πάσχουν από διάρροια, για να βοηθήσουν στην αντικατάσταση της υγιούς χλωρίδας του εντέρου.

Ο Fuller, το 1991, όρισε τα προβιοτικά ως "ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα διατροφής, το οποίο επηρεάζει ευεργετικά το ζώο ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική του μικροβιακή ισορροπία". Ο όρος "προβιοτικό" είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά από τους Lilley και Stillwell το 1965 περιγράφοντας ουσίες που εκκρίνονται από ένα μικρόβιο που διεγείρει την ανάπτυξη άλλου. Το 2001, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) επαναπροσδιόρισε τα προβιοτικά ως «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε ικανοποιητικές ποσότητες, προσφέρουν πολλά οφέλη για την υγεία του ξενιστή». Στη συνέχεια ο Παγκόσμιος Οργανισμός Γαστρεντερολογίας, το 2013, εξέδωσε τις απαραίτητες οδηγίες για τις δοσολογίες των προβιοτικών και πρεβιοτικών με σκοπό την εξασφάλιση την απόδοσή τους. (McFarland, 2015). Μια από τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκε σε 30 ασθενείς με χρόνια δυσκοιλιότητα και διάρροια, στους

οποίους χορηγήθηκε ο μικροοργανισμός *Lactobacillus acidophilus*, με αποτέλεσμα να καταγραφεί βελτίωση των προβλημάτων και για τις 2 περιπτώσεις (McFarland, 2015). Οι συνεχείς έρευνες προάγουν την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της φυσικής μικροχλωρίδας και της ικανότητας της να μπορεί να αντιστέκεται σε παθογόνα βακτήρια .

Τα προβιοτικά συνήθως περιλαμβάνουν βακτήρια γαλακτικού οξέος και διφωσφορικά βακτήρια, αλλά μπορούν να περιλαμβάνουν και άλλα βακτήρια και ορισμένες ζύμες. Η ταυτοποίηση των στελεχών γίνεται με τη χρήση μοριακών τεχνικών όπως η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA και ο υβριδισμός DNA-DNA. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοριακές μέθοδοι αναπαραγωγής και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για περαιτέρω ταυτοποίηση των στελεχών. Παραδείγματα μοριακών μεθόδων περιλαμβάνουν την ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου και τον τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την παρουσία εξωχρωμοσωμικών γενετικών στοιχείων, την ικανότητα ζύμωσης σακχάρων και την ανίχνευση των τελικών προϊόντων ζύμωσης που προέρχονται από τη χρήση γλυκόζης. (Fijan, 2014).

Η ταξινόμια των προβιοτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος σχηματίστηκε σύμφωνα με μορφολογικά, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά με βάση τις φαινοτυπικές και γενωμικές τεχνικές. Τα πιο μελετημένα είναι τα γένη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Enterococcus*. Στο γένος *Lactobacillus* τα είδη που εμπεριέχονται αφορούν την ομάδα *L. acidophilus*, *L. casei* και *L. reuteri* και τα *Bifidobacterium* spp. (*B. Animalis*) που αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζυμωμένου γάλακτος και πρόσφατων προβιοτικών προϊόντων. Είδη του γένους *Lactobacillus* και του γένους *Bifidobacterium* είναι από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς ως προβιοτικά. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, όπως τα είδη του γένους *Lactobacillus*, χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση τροφίμων εδώ και χιλιάδες χρόνια και μπορούν να παρέχουν οφέλη για την υγεία. Ωστόσο, για να θεωρούνται προβιοτικά, τα μικρόβια πρέπει να έχουν υποβληθεί σε μελέτες σε ανθρώπους και να έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν οφέλη για την υγεία. Η ζύμωση τροφίμων παρέχει χαρακτηριστικό προφίλ γεύσης και χαμηλό pH, το οποίο εμποδίζει τη μόλυνση από πιθανούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ζύμωση εφαρμόζεται παγκοσμίως για τη διατήρηση διάφορων γεωργικών προϊόντων, όπως δημητριακά, ρίζες, κόνδυλοι, φρούτα, λαχανικά, γάλα, κρέας, ψάρια (Guarner et al., 2011). Η Ευρωπαϊκή Ένωση (European Food Safety Authority. 2021) έχει θεσπίσει το σύστημα Qualified Presumption of Safety (QPS) για την αξιολόγηση της ασφάλειας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές πριν εγκριθούν για χρήση στην ευρωπαϊκή αγορά. Το σύστημα QPS θεσπίστηκε για να διευκολύνει τη διαδικασία έγκρισης και περιλαμβάνει ορισμένα κριτήρια που πρέπει να πληρούν οι μικροοργανισμοί για να λάβουν τον χαρακτηρισμό QPS:

1. Σαφής ταξινόμια: Η ταξινομική ομάδα του μικροοργανισμού (γένος ή ομάδα συναφών ειδών) πρέπει να είναι καθορισμένη με σαφήνεια.
2. Επαρκής γνώση ασφάλειας: Πρέπει να υπάρχει επαρκής επιστημονική γνώση για την ασφάλεια του μικροοργανισμού.
3. Έλλειψη παθογόνων ιδιοτήτων: Πρέπει να υπάρχουν αποδείξεις και τεκμηριώσεις ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει παθογόνο δράση.
4. Προβλεπόμενη χρήση: Η προβλεπόμενη χρήση του μικροοργανισμού

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν γίνει όλο και πιο δημοφιλή τις τελευταίες δύο δεκαετίες λόγω των αυξανόμενων επιστημονικών αποδείξεων που υποστηρίζουν τα οφέλη τους για την ανθρώπινη υγεία. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τις θετικές επιπτώσεις των προβιοτικών βακτηρίων στη βελτίωση της πέψης, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, την αποτροπή των λοιμώξεων, την αντιμετώπιση των εντερικών διαταραχών, και άλλων παθήσεων. Οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών μπορεί να περιλαμβάνουν τη βελτίωση της ισορροπίας του εντερικού μικροβιώματος, την παραγωγή βιταμινών και άλλων ωφέλιμων μεταβολικών προϊόντων, την αντιμετώπιση του διαβήτη, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, τη βελτίωση της νευρολογικής λειτουργίας και την ενίσχυση της γενικής υγείας του εντέρου (Theofilopoulos et al. 2017,2018). Μερικές από τις ωφέλιμες επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία ειδικά στη λειτουργία του γαστρεντερικού μας συστήματος:

1. Μείωση του pH του εντέρου: Ορισμένα προβιοτικά μπορούν να μεταβάλλουν το pH του εντέρου, καθιστώντας το πιο κατάλληλο για την ανάπτυξη ευερέθιστων ευεργετικών βακτηρίων και αναστέλλοντας την ανάπτυξη επιβλαβών μικροοργανισμών.
2. Ανταγωνισμός θρεπτικών συστατικών: Τα προβιοτικά μπορούν να ανταγωνίζονται με άλλους μικροοργανισμούς για την πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά στο εντερικό περιβάλλον. Αυτός ο ανταγωνισμός μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη επιβλαβών μικροοργανισμών και να προάγει την υγεία του εντέρου.
3. Ενίσχυση της λειτουργίας του φραγμού του βλεννογόνου: Τα προβιοτικά μπορεί να ενισχύουν τον φραγμό του βλεννογόνου, που αποτελεί μια προστατευτική στρώση στην επιφάνεια του εντέρου. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της επισύνταξης παθογόνων μικροοργανισμών και να διατηρήσει την εντερική ακεραιότητα.
4. Ανοσοτροποποίηση: Τα προβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν διάφορες πτυχές της ανοσολογικής απόκρισης. Μπορεί να ενισχύσουν τη φαγοκυττάρωση, που αναφέρεται στην ικανότητα τους να απορροφούν μικροοργανισμούς αλλά και να προκαλούν κυτταρική απόπτωση.

Το φάσμα των προϊόντων διατροφής που περιέχουν προβιοτικά είναι πραγματικά ευρύ και συνεχώς αυξάνεται.

Τα κυριότερα προϊόντα που υπάρχουν στην αγορά είναι τα γαλακτοκομικά, συμπεριλαμβανομένων των ζυμωμένων γαλάτων (πχ γιαούρτι), του τυριού, του παγωτού, του βουτυρόγαλου, του γάλακτος σε σκόνη, με τα τελευταία να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μερίδιο των πωλήσεων. Επιπλέον των γαλακτοκομικών προϊόντων, υπάρχουν και άλλες εφαρμογές τροφίμων που περιλαμβάνουν προβιοτικά.

Οι μη γαλακτοκομικές εφαρμογές προβιοτικών προϊόντων περιλαμβάνουν:

Διάφορα τρόφιμα έχουν μελετηθεί σχετικά με τον εμπλουτισμό τους με προβιοτικά στελέχη και τα οφέλη που παρέχουν στον καταναλωτή. Προϊόντα με βάση τη σόγια, προβιοτικά μπορούν να προστεθούν σε προϊόντα με βάση τη σόγια, όπως γάλα σόγιας, τοφού, σόγιας γιαούρτι και άλλα σόγιας παραγώγων. Επιπλέον πολλές διατροφικές μπάρες που προορίζονται για σνακ και ενέργεια περιέχουν προβιοτικά για να προσφέρουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς κατά την κατανάλωση τους. Ορισμένα δημητριακά, όπως δημητριακά με προβιοτικά, μπορούν να παρέχουν τα οφέλη των προβιοτικών κατά την κατανάλωση τους. Επίσης μερικοί χυμοί μπορεί να περιέχουν προβιοτικά ως έναν τρόπο να προσφέρουν οφέλη για την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος.

Όλα αυτά τα προϊόντα συνιστούν μια εναλλακτική πηγή για την κατανάλωση προβιοτικών, καθώς παρέχουν διάφορες επιλογές για καταναλωτές με διαφορετικές προτιμήσεις διατροφής ή διαιτητικούς περιορισμούς. (Kechagia et al., 2013).

Η ασφάλεια των προβιοτικών στελεχών ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό είναι πρωταρχικής σημασίας. Ορισμένες πρωτοβουλίες της Ευρωπαϊκής κοινότητας (Ο κανονισμός για τα νέα τρόφιμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, QPS και PROSAFE), οι Ηνωμένες Πολιτείες (FDA και WHO) και ο Καναδάς (Health Canada: NHPR) έχουν καθορίσει κριτήρια για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών για την ανθρώπινη χρήση (de Melo Pereira et al., 2018). Πολλά από τα προβιοτικά που είναι διαθέσιμα στην αγορά απομονώθηκαν από υγιείς ανθρώπους. Η απομόνωση από υγιείς δότες έχει σκοπό να αυξήσει την προβιοτική συμβατότητα και την επιβίωση των προβιοτικών στο γαστρεντερικό σύστημα (GIT) του ανθρώπου.

1.3 Βιοπροστατευτικά

1.3.1 Βακτηριοσίνες

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παραγωγή τροφίμων απαλλαγμένων από χημικές ενώσεις. Ως άμεσο αποτέλεσμα αυτής της τάσης, αυξήθηκε και το ενδιαφέρον για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα μεταβολικά τους προϊόντα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εκτός από τις άλλες ενώσεις, παράγουν και βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα

να αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων των μικροοργανισμών όπως γένη των *Listeria spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.* *Bacillus spp.* και *Enterococcus spp.* (Metaxopoulos et al. 2002).

Οι βακτηριοσίνες είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά στο μοριακό τους βάρος, στις βιοχημικές τους ιδιότητες, στους ξενιστές εναντίον των οποίων δρουν, και στον τρόπο δράσης τους. Πιο συγκεκριμένα ο Klaenhammer (1988) ορίζει τις βακτηριοσίνες ως πρωτεΐνες ή ομάδες πρωτεϊνών με βακτηριοκτόνο δράση, οι οποίες στοχεύουν κυρίως είδη μικροοργανισμών τα οποία σχετίζονται στενά με τους μικροοργανισμούς που τις παράγουν. Αξίζει να αναφερθεί ότι και τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι ικανά να παράγουν βακτηριοσίνες (Metaxopoulos et al. 2002).

Η παραγωγή των βακτηριοσινών θεωρείται μια πολύ σημαντική ιδιότητα των οξυγαλακτικών στελεχών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων, αφού μέσω αυτών είναι δυνατό να επιτευχθεί η αναστολή ή η μείωση της ανάπτυξης πολλών αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλουν τα τρόφιμα.

Οι ομοιότητες που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια, αλλά και οι μεταξύ τους διαφορές, έχει επιτρέψει την κατηγοριοποίηση τους σε 4 κλάσεις οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Ο διαχωρισμός των βακτηριοσινών στις επιμέρους κλάσεις έγινε με βάση την μοριακή τους δομή, το μοριακό τους βάρος, την θερμική τους σταθερότητα και την μοριακή τους οργάνωση.

Κλάση 1 (λαντιβιοτικά): αποτελείται είτε από γραμμικά είτε από σφαιρικά πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (<5kD, με περίπου 18-38 αμινοξέα). Κλάση 2 (μη-λαντιβιοτικά): αποτελείται από θερμο-σταθερά πεπτίδια (<10kDa, με περίπου 37 έως 48 αμινοξέα), Κλάση 3: αποτελείται από θερμο-ευαίσθητα μόρια υψηλού μοριακού βάρους (>30kDa). Κλάση 4: αποτελούνται από σύνθετες βακτηριοσίνες, οι οποίες εκτός από το πρωτεϊνικό τμήμα τους περιέχουν και υδατάνθρακες ή και τμήματα λιπιδίων.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα βακτηριοσίνης αποτελεί η νισίνη, η οποία παράγεται από τα στελέχη του *Lactobacillus lactis*, και δρα εναντίον πολλών θετικών κατά Gram παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του γένους *Listeria spp.* (Μεταξόπουλος et al. 2003). Επίσης αποτρέπει την ανάπτυξη και την εκβλάστηση спорίων του γένους *Bacillus* αλλά και κλωστριδίων, και υπό προϋποθέσεις μπορεί να δράσει και εναντίον ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Stevens et al., 1991).

Η νισίνη είναι μια βακτηριοσίνη που έχει αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική κατά την εξάλειψη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα. Έχει ανακαλυφθεί ότι η νισίνη παρεμβαίνει στη διαδικασία πρόσληψης ενέργειας του κυττάρου, δημιουργώντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλώντας τη διάχυση του κυτταροπλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, η νισίνη αλληλεπιδρά με τη φωσφολιπάση, μια ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της φωσφολιπίδης του κυτταρικού μεμβράνης. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στη διάτρηση της μεμβράνης και στη δημιουργία πόρων, που επιτρέπουν στη

νισίνη να διαχυθεί μέσα στο κυτταροπλάσμα. Όταν η νισίνη είναι παρούσα στο κυτταροπλάσμα, επηρεάζει τη λειτουργία των βακτηριακών μεμβρανών και μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών. (Soomro et. al. 2002).

Ο *Lactobacillus plantarum* παράγει τις πλαταρικίνες S και T κατά τη ζύμωση της πράσινης ελιάς ισπανικού τύπου. Είναι δραστικές έναντι πολλών φυσικών ανταγωνιστών και μικροοργανισμών αλλοίωσης, όπως τα προπιονοβακτήρια και τα κλωστρίδια, με αποτέλεσμα ένα πιο αξιόπιστο προϊόν χωρίς να εξαλείφεται εντελώς η αυτόχθονη μικροχλωρίδα και να μειώνεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Από δείγματα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων της Αργεντινής απομονώθηκε ένας αριθμός εντερόκοκκων που παράγουν πρωτεϊνικές ενώσεις που αναστέλλουν το *Vibrio cholerae*. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί ήδη να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική συντήρηση των τροφίμων, ιδίως στις περιοχές όπου η χολέρα είναι επιδημική ή ενδημική (C. Hill, P. Ross, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002).

1.3.2 Οξέα

Η ζύμωση που επιτελείται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια οδηγεί στην παραγωγή οργανικών οξέων με κυριότερο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Η συσσώρευση, λοιπόν, του γαλακτικού οξέος στο υπόστρωμα και η συνακόλουθη μείωση του pH οδηγεί σε μια ευρέως φάσματος ανασταλτική δραστηριότητα εναντίον πολλών θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή δράση του γαλακτικού και των υπόλοιπων οξέων στο εκάστοτε υπόστρωμα αφορούν το εύρος μείωσης του pH, την σταθερά διάστασης (pKa) και την μοριακή συγκέντρωση. (Lucke, 2000).

Αξίζει να αναφερθεί ότι το οξικό οξύ έχει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από το γαλακτικό οξύ. Η ευαισθησία μικροοργανισμών στα δύο αυτά οξέα ποικίλλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού αλλά και την ταυτόχρονη δράση άλλων παραγόντων όπως είναι η ενεργότητα νερού (a_w) του υποστρώματος και η ύπαρξη νιτρωδών αλάτων (κυρίως στο κρέας) (Lucke, 2000).

Είναι γεγονός (Adams and Hall, 1988) ότι αυτά τα οξέα έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών σε όξινα περιβάλλοντα. Πιο αναλυτικά:

1. Αναστολή της ανάπτυξης: Και το οξικό και το γαλακτικό οξύ μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως ο *Staphylococcus aureus* και οι *Salmonella sp.* σε όξινα περιβάλλοντα με χαμηλό pH. Αυτό συμβαίνει επειδή η όξινη φύση των οξέων μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των βιολογικών μηχανισμών των μικροοργανισμών.
2. Συνεργιστική δράση: Τα δύο οξέα φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν για να αυξήσουν την αντιμικροβιακή δράση τους. Η έντονη όξινη επίδραση του γαλακτικού οξέος μπορεί να αυξήσει την αναλογία του αδιάστατου τμήματος του

οξικού οξέος, το οποίο έχει αντιμικροβιακή δράση. Αυτή η συνεργιστική δράση μπορεί να είναι αποτελεσματική κατά την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως η *Escherichia coli* και οι *Salmonella*.

1.4 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια

Βιοεπιφανειοδραστικές ή μικροβιακά παραγόμενες επιφανειοδραστικές, ονομάζονται ουσίες οι οποίες παράγονται από στελέχη διάφορων μικροοργανισμών (βακτήρια, ζύμες, μύκητες). Λόγω της αμφίφιλης δομής τους (υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά) οι ουσίες αυτές έχουν ως βασική τους ιδιότητα τη μείωση της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης μεταξύ μη αναμειγξων συστατικών, διαφορετικής πολικότητας αλλά και τη δημιουργία γαλακτωμάτων. Συγκρίνοντάς τις με τις αντίστοιχες συνθετικές επιφανειοδραστικές, οι βιοεπιφανειοδραστικές υπερτερούν σημαντικά λόγω των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων τους. Πρόκειται για χαμηλής τοξικότητας, βιοαποικοδομήσιμα μόρια, τα οποία δύνανται να διατηρήσουν τις ιδιότητες τους κατόπιν έκθεσής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, σε διάφορες τιμές pH αλλά και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (Sharma, 2016). Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί πως ορισμένες βιοεπιφανειοδραστικές εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα αλλά και την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Τα πλέον μελετημένα βακτηριακά στελέχη για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ανήκουν στα είδη *Pseudomonas* sp. και *Bacillus* sp., επειδή όμως είναι η χρήση αυτών αλλά και των προϊόντων που προέρχονται από αυτά είναι περιορισμένη λόγω της πιθανής παθογένειας που παρουσιάζουν, λύση σε αυτό αποτελεί η μελέτη νέων στελεχών, όπως τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognised as Safe), αφού οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές από τα εν λόγω στελέχη δύνανται να βρουν εφαρμογή ακόμη και στον τομέα των τροφίμων και της φαρμακευτικής. Επιπλέον, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι εν λόγω ζυμώσεις με γαλακτικά βακτήρια μπορούν να έχουν σαν υλικά εκκίνησης φθηνά ελαιούχα, σακχαρούχα ακόμα και λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων. Με τον τρόπο αυτό όχι μόνο τα απόβλητα θα αξιοποιηθούν και δεν θα αποτελέσουν παράγοντες επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, αλλά ταυτόχρονα, το κόστος παραγωγής που προκύπτει από την αγορά πρώτων υλών μειώνεται σημαντικά (Ribeiro, 2020). Η αποσαφήνιση της δομής και ο χαρακτηρισμός τους αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντικείμενα έρευνας σχετικά με τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες καθώς καθορίζει τις τελικές ιδιότητες και κατά συνέπεια τις εφαρμογές στις οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν. Το υδρόφοβο τμήμα τους αποτελείται συνήθως από κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και ύδροξυ- λιπαρά οξέα ενώ το υδρόφοβο από υδατάνθρακες (ολιγο-, μονο-, και πολυσακχαρίτες), υδροξύλια, καρβοξύλια, πεπτιδία και πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου ο χαρακτηρισμός τους βασίζεται στην αναλογία λίπος, πρωτεΐνες, πεπτιδία και σάκχαρα συνεπώς προκύπτουν βιοεπιφανειοδραστικές λιποπεπτιδικής, λιποπρωτεϊνικής, γλυκολιπιδικής κ.ο.κ σύστασης, (Rahman, Gakpe, 2008). Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε βιομηχανική

κλίμακα αναστέλλεται λόγω του αυξημένου κόστους παραγωγής το οποίο οφείλεται τόσο στην ανάκτηση και το χαρακτηρισμό του προϊόντος αλλά και σε ένα μεγάλο ποσοστό από το κόστος για την αγορά πρώτων υλών. Η αξιοποίηση διαφόρων, χαμηλού ή μηδενικού κόστους, παραπροϊόντων της βιομηχανίας, ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, δύναται να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών. Ενδεικτικά, το τυρόγαλα που προκύπτει από βιομηχανίες παραγωγής τυροκομικών ως παραπροϊόν και αποτελείται από υψηλά ποσοστά λακτόζης (40-60 g/L), διάφορα υδατοδιαλυτά συστατικά, πρωτεΐνη (1,4-33,5 g/L) και τα μεταλλικά άλατα 0.46-10% (Kopsahelis et al., 2018) μπορεί να αξιοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Επιπλέον ο μεγάλος όγκος της ετήσιας παραγωγής τυρογάλακτος παγκοσμίως (περίπου στα 160 εκ. τόνοι), καθιστά απαραίτητη την αξιοποίηση του προς αποφυγή επιπλέον περιβαλλοντικών ρύπων. Σε προγενέστερες μελέτες αναφέρεται η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *Lactobacillus helveticus* MRTL91 με μέγιστη παραγωγή 0,80 g/L από τους (Sharma et al., 2014), ενώ οι Rodrigues et al., (2006a) χρησιμοποίησαν το στέλεχος *L. pentosus* αλλά και το προβιοτικό στέλεχος *Lactococcus lactis* (Rodrigues et al., 2006b)

1.4.2 Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων

Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων είναι μια φιλική προς το περιβάλλον και βιώσιμη προσέγγιση που έχει κερδίσει την προσοχή τα τελευταία χρόνια. Η συγκεκριμένη τακτική συμβάλει αρχικά στην απομάκρυνση ρυπογόνων συστατικών τα οποία θα επιβάρυναν χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα. Τα συστατικά που περιέχονται στα απόβλητα περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις σε εναπομείναντα σάκχαρα και αζωτούχες ενώσεις τα οποία έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο για την βιολογική και την χημική τους οξείδωση. Τα συστατικά αυτά μπορούν να αποτελέσουν πηγές άνθρακα και αζώτου για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και κατά συνέπεια των αποφυγή δυσμενών επιπτώσεων για το περιβάλλον όπως ο ευτροφισμός. Παράλληλα με την πρακτική αυτή επιδιώκεται η μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής προϊόντων βιοτεχνολογικής προέλευσης, όπως είναι οι βιοεπιφανειοδραστικές καθώς μειώνεται το κόστος για την προμήθεια πρώτων υλών που αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό του κόστους παραγωγής τέτοιων προϊόντων .

Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να συνδυαστεί με την αξιοποίηση αποβλήτων και μάλιστα αυτό αποτελεί και ένα από τα βασικά τους πλεονεκτήματα έναντι των χημικών επιφανειοδραστικών που προέρχονται από το πετρέλαιο. Απόβλητα που έχουν αναφερθεί πως δύναται να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών προέρχονται από διάφορες πηγές του πρωτογενούς και δευτερογενούς τομέα όπως λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα οινοποιείων, απόβλητα πλούσια σε λάδι, μελάσα και απόβλητα τυροκομείων (Kaur., 2015; Vecino.,2017; Mouafo., 2018; Kachrimanidou.,2022)

Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό FAO και WHO(Codex Stan A-7-1978) «ο ορός γάλακτος (ή τυρόγαλα) είναι το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά την διάρκεια παρασκευής του τυριού, της καζεΐνης ή παρόμοιων προϊόντων με διαχωρισμό από το τυρόπηγμα μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από γάλα. Η πήξη επιτυγχάνεται μέσω της δράσης, κυρίως, ενζύμων τύπου πτυιάς». Ένας άλλος ορισμός που προκύπτει από τον κανονισμό ΕΕ 625/30-03-1978 είναι «το προϊόν που λαμβάνεται κατά την τυροκόμηση ή κατά την παραγωγή καζεΐνης με χρήση είτε οξέων, πτυιάς και/είτε φυσικοχημικών μεθόδων». Πιο συγκεκριμένα, είναι το διάλυμα που διαχωρίζεται μετά από την πήξη του γάλακτος και την απομάκρυνση του τυροπήγματος. Η σύσταση του τυρογάλακτος ποικίλει ανάλογα με το είδος του γάλακτος και κατά συνέπεια του τυριού από το οποίο προήλθε. Κύριο συστατικό του τυρογάλακτος είναι η λακτόζη και βρίσκεται σε συγκεντρώσεις (4,50-5,30% w/v), και ακολουθούν οι πρωτεΐνες (0,80-1,50% w/v) και το λίπος (0,2-1,3% w/v). Τα υπόλοιπα συστατικά που απαντώνται στο τυρόγαλα και βρίσκονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις είναι ανόργανα άλατα και μικρές ποσότητες γαλακτικού οξέος (Ανυφαντάκης, 2004).

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή 1 kg τυριού αποδίδονται περίπου 9 kg τυρογάλακτος (εξαρτάται από το είδος τυριού που παρασκευάζεται). Αναλογιζόμενοι ότι σύμφωνα με τη (Eurostat, 2020) το 2019 στην Ευρώπη, από τους 158 εκατ. τόνους γάλακτος το 94% κατευθύνθηκε προς παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, προκύπτει ένας πολύ μεγάλος όγκος τους συγκεκριμένου αποβλήτου ετησίως. Ταυτόχρονα το υψηλό οργανικό φορτίου του τυρογάλακτος το καθιστά απόβλητο υψηλού ρυπαντικού φορτίου μιας και η συγκέντρωση του σε BOD5 (ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για τη βιολογική οξείδωση του τυρογάλακτος σε διάστημα 5 ημερών) είναι 50.000- 80.000 mg/L ενώ αντίστοιχα η συγκέντρωσή του σε COD (ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση του τυρογάλακτος) είναι 40.000- 60.000 mg/ L. Η ποσότητα του τυρογάλακτος υπολογίζεται να αυξάνεται ετησίως κατά 3% (Larra et al., 2019)., συνεπώς είναι ξεκάθαρο ότι η απόρριψή του σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα συνεπάγεται αρνητικών συνεπειών για το περιβάλλον όπως ο ευτροφισμός και η αλλοίωση της βιοποικιλότητας (Prazeres et al., 2012)

Πίνακας 2 : Σύσταση τυρογάλακτος (Πηγή : Καμινारीδης Στέλιος)

Σύσταση Τυρογάλακτος		
Συστατικό	%	% της Ξ.0. του τυρογάλακτος
Ξηρή ουσία	6.5-8.00	100
Λακτόζη	4.5-5.3	60-70
Πρωτεΐνες	0.8	11-19

Λίπος	0.2-1.3	3-13
Ανόργανα άλατα	0.5-0.7	8-10
Γαλακτικό οξύ	0.1-0.6	

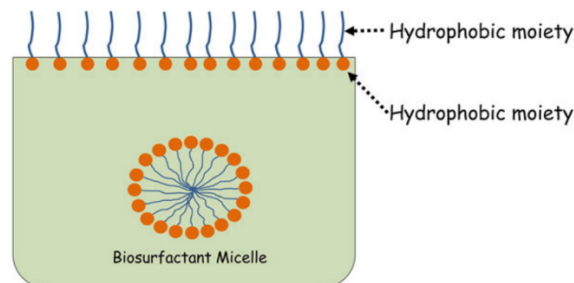
1.6 Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

1.6.1 Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση αναφέρεται στην τάση που έχουν υδάτινες επιφάνειες σε ηρεμία να συστέλλονται στη μικρότερη δυνατή επιφάνεια. Αυτή η τάση επιτρέπει σε αντικείμενα με μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό, όπως ξυραφάκια και έντομα, να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού χωρίς να βυθίζονται ούτε μερικώς.

Η επιφανειακή τάση προκύπτει από δύο κύριους μηχανισμούς. Ο ένας είναι η προς τα έσω δύναμη που δρα στα μόρια του υγρού και οδηγεί στη συστολή του υγρού. Ο δεύτερος είναι η εφαπτόμενη δύναμη που δρα παράλληλα με την επιφάνεια του υγρού. Αυτή η παράλληλη δύναμη αποκαλείται επιφανειακή τάση.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες βοηθούν στη μείωση της επιφανειακής τάσης και της διεπιφανειακής τάσης δύο μη αναμίξιμων διαλυμάτων (Sharma et al. 2015). Μια καλή βιοεπιφανειοδραστική ουσία μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση του νερού από 72 έως 35 mN/m (Mulligan 2005).



Εικόνα 1 : Μείωση της επιφανειακής τάσης λόγω συσσώρευσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στις επιφάνειες. (Sharma et al. 2016)

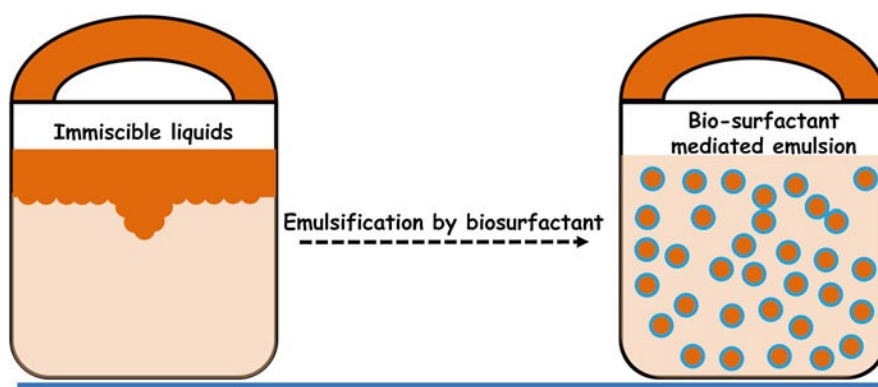
1.6.2 Γαλακτοματοποίηση

Το γαλάκτωμα είναι ένα μείγμα δύο ή περισσότερων διαλυμάτων που κανονικά δεν αναμιγνύονται. Τα γαλακτώματα αποτελούν μέρος μιας αμοιβαίας ταξινόμησης των διφασικών συστημάτων που ονομάζονται κολλοειδή. Οι βιογαλακτωματοποιητές είναι βιολογικά μείγματα, εξωκυτταρικοί μεταβολίτες μικροοργανισμών. Υπάρχουν περισσότερα από 250 διπλώματα ευρεσιτεχνίας για βιοεπιφανειοδραστικούς παράγοντες όπως το Emulsan και χρησιμοποιούνται κυρίως σε βιομηχανικά σκευάσματα για τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Δεδομένου ότι η αποτελεσματική γαλακτωματοποιητική τους

ικανότητα είναι πολύ ισχυρή, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών σκευασμάτων. (Saharan et al. 2011).

Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υφής των σκευασμάτων τροφίμων, όπως η συσσωμάτωση του λίπους, η παράταση της διάρκειας ζωής των σκευασμάτων με βάση τη ζάχαρη και η βελτίωση της υφής των σκευασμάτων με βάση το λάδι.

Οι ιδιότητες γαλακτωματοποίησης εξετάζονται από την άποψη της σταθερότητας του γαλακτώματος, της ικανότητας γαλακτωματοποίησης και της γαλακτωματοποιητικής δραστηριότητας των σκευασμάτων που βασίζονται σε μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες.

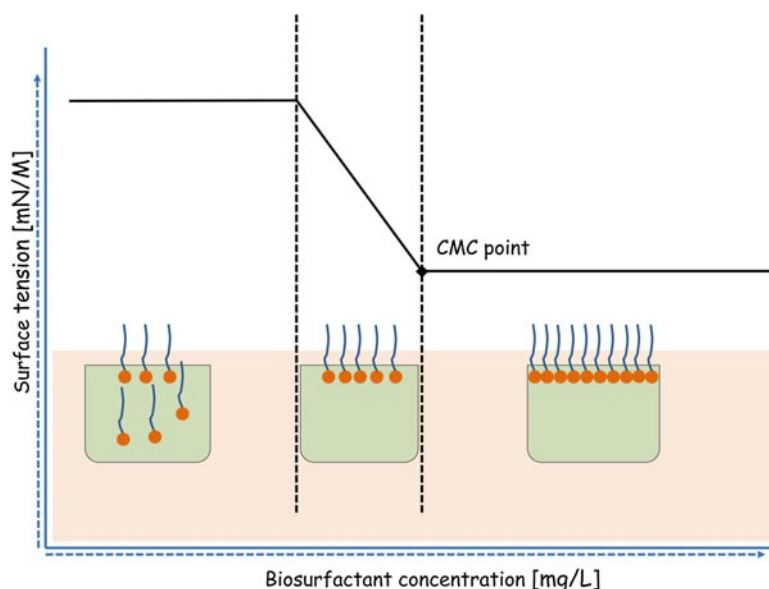


Εικόνα 2: Γαλακτωματοποίηση με τη μεσολάβηση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. (Neu and Poralla 1990).

1.6.3 Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων

Η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) ορίζεται ως η συγκέντρωση μιας αμφίφιλης ένωσης σε διάλυμα στην οποία αρχίζει ο σχηματισμός μικκυλίων.

Κατ' αρχήν, τα επιφανειοδραστικά μόρια αποτελούνται από δύο μέρη με διαφορετικές ιδιότητες. Το μέρος που αντιδρά με πολικά διαλύματα όπως το νερό θεωρείται υδρόφιλο και το μέρος που έλκεται από μη πολικά διαλύματα όπως οι υδρογονάνθρακες θεωρείται υδρόφοβο. Τέτοια αμφίφιλα μόρια συμπεριφέρονται διαφορετικά όταν αλληλεπιδρούν με το νερό. Τα μίγματα μικροβιακών επιφανειοδραστικών συγκεντρώνονται σε CMC λόγω ευαίσθητων υδρόφοβων δεσμών και δεσμών van der Waals και τα μικκύλια οργανώνονται για να συλλάβουν υδρόφοβα μόρια όταν γαλακτωματοποιούνται με νερό. (Saharan et al. 2011). Οι τιμές CMC διαφόρων ισχυρών και αποτελεσματικών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι συνήθως 10-40 φορές χαμηλότερες από εκείνες των συνθετικών επιφανειοδραστικών ουσιών- οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες με χαμηλότερες τιμές CMC μπορούν να παρέχουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα γαλακτωματοποίησης οι οποίες ενδιαφέρουν και μπορούν να αξιοποιηθούν από διάφορες βιομηχανίες. (Muthusamy et al. 2008).



Εικόνα 3 : Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (Sharma et al. 2016)

1.6.4 Αντιμικροβιακές ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Τα τελευταία χρόνια, η εμφάνιση παθογόνων μικροοργανισμών που δεν ανταποκρίνονται στα συμβατικά αντιβιοτικά έχει καταστήσει την αναζήτηση νέων αντιμικροβιακών μορίων σημαντική πρόκληση. Διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες από μικροοργανισμούς έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικές πηγές συμπλόκων με αποτελεσματικές βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντιμικροβιακές ιδιότητες (Donadio et al.2000) Μεταξύ αυτών, οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί ως κατάλληλη εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά χημικά φάρμακα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικοί θεραπευτικοί παράγοντες (Banat et al.2002)

Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί ως δυνητικοί θεραπευτικοί παράγοντες για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium* και *Bacillus subtilis*. *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Phytophthora infestans* και *Botrytis cinerea*. (Sharma et al. 2011, Sharma and Malik 2012, Benincasa et al. 2004, Haba et al. 2003, Nitschke and Costa 2007).

1.7 Ταξινόμηση και χαρακτηρισμός βιοεπιφανειοδραστικών

Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη μικροβιακή τους προέλευση και τη χημική τους δομή. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μικροβιακής προέλευσης μπορούν να ταξινομηθούν σε μόρια υψηλού μοριακού βάρους (συμπεριλαμβανομένων των πολυμερών και των

σωματιδιακών επιφανειοδραστικών ουσιών) και σε επιφανειοδραστικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (γλυκολιπίδια) (Rosenberg and Ron 1999).

Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλες και επομένως περιέχουν τουλάχιστον ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Το υδρόφοβο μέρος περιλαμβάνει συνήθως κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα με αλυσίδες 8 ή 18 ατόμων άνθρακα.

Η πρώτη και η πιο γνωστή κατηγορία είναι τα γλυκολιπίδια. Είναι τα πιο μελετημένα επιφανειοδραστικά λόγω της σύνθεσής τους. Είναι υδατάνθρακες που αποτελούνται από υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα ή λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας στα οποία είναι συνδεδεμένες ομάδες εστέρα ή αιθέρα. Τα ραμνολιπίδια, τα τρεαολιπίδια και τα σοχολιπίδια είναι τα πιο μελετημένα γλυκολιπίδια. Αποτελούνται συνήθως από μονοσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες με ένα προστιθέμενο λιπιδικό τμήμα που σχηματίζουν αυτά τα επιφανειοδραστικά χαμηλού μοριακού βάρους.

Μία ακόμη κατηγορία είναι τα σοφορολιπίδια. Τα σοφορολιπίδια ως βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι ένας τύπος γλυκολιπίδιου που παράγεται από διάφορα μη παθογόνα στελέχη ζυμομυκήτων. Οι Gorin et al. (1961) ανέφεραν για πρώτη φορά τα σοφορολιπίδια ως μικροβιακούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες.

Επίσης τα λιποπεπτίδια που είναι ουσίες που αποτελούνται από ένα λιπίδιο που είναι συνδεδεμένο με ένα πεπτίδιο. (Sharma D., 2016) Έχουν εντοπιστεί αρκετά βακτήρια που παράγουν τέτοιες ενώσεις που μοιάζουν με αντιβιοτικά- μεταξύ αυτών είναι γνωστό το κυκλικό λιποπεπτίδιο ή η ταρφακίνη από τον *Bacillus subtilis*.

Τα λιποπεπτίδια είναι κυκλικά πεπτίδια συνδεδεμένα με μόρια ακυλιωμένων λιπαρών οξέων. Τα λιποπεπτίδια παράγονται εξωκυτταρικά σε μέσα παραγωγής από πολλούς μικροοργανισμούς, ιδίως από *Bacillus*, *Lactobacillus* και ορισμένους ακτινομύκητες. Τα λιποπεπτίδια όχι μόνο μειώνουν την επιφανειακή τάση αλλά παρουσιάζουν επίσης σημαντική αντιβιοτική δράση.

1.8 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα τρόφιμα

Η βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να χρησιμοποιήσει τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες με δύο διαφορετικούς τρόπους: (α) έμμεση χρήση για την επεξεργασία/καθαρισμό των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα και (β) άμεση χρήση ως πρόσθετα/συστατικά τροφίμων (Abdul et al., 2014)

Οι ενσωμάτωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε υλικά συσκευασίας αποτελεί μια αναδυόμενη εναλλακτική λύση για την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων που συσκευάζονται. Συνεπώς, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαταστάτες διάφορων συντηρητικών τροφίμων όχι μόνο λόγω της αντιμικροβιακής αλλά και της αντιοξειδωτικής δράσης που ενδέχεται να παρουσιάζουν. Παράλληλα, η δομή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να αξιοποιηθεί για η δημιουργία γαλακτωμάτων, τη βελτίωση της υφής αλλά και να χρησιμοποιηθούν ως και σταθεροποιητές.

Έχει επίσης αναφερθεί η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα *Bacillus subtilis* ως γαλακτωματοποιητή στην παραγωγή μπισκότων. (Mnif et al. 2012) Η πολυμερής δομή του βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα που συνδυάζει πολυσακχαρίτες, λιπαρά οξέα και πρωτεϊνικά τμήματα υποστηρίζει ένα καλύτερο γαλακτωματοποιητικό δυναμικό και την ικανότητα σταθεροποίησης γαλακτωμάτων, οπότε αναφέρονται επίσης ως βιογαλακτωματοποιητές. (Uzoigwe et al., 2015)

Οι προσπάθειες για τη χρήση βιοεπιφανειοδραστικών σε συστήματα τροφίμων έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, για την επιτυχή αξιοποίησή τους, είναι επιτακτική ανάγκη να δοθεί έμφαση στην *in vivo* τοξικότητα. Στην πραγματικότητα, ο κύριος περιορισμός στη χρήση προϊόντων μικροβιακής προέλευσης είναι η ανησυχία σχετικά με την ασφάλειά τους. Ορισμένες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται από ευκαιριακά βακτήρια- συνεπώς, η αναζήτηση μη παθογόνων στελεχών, όπως ζύμες και προβιοτικά, ή η τροποποίηση της δομής για τη μείωση της τοξικότητας μπορεί να είναι καλές στρατηγικές για την επίλυση αυτού του προβλήματος. (Sagalowicz and Leser, 2010)

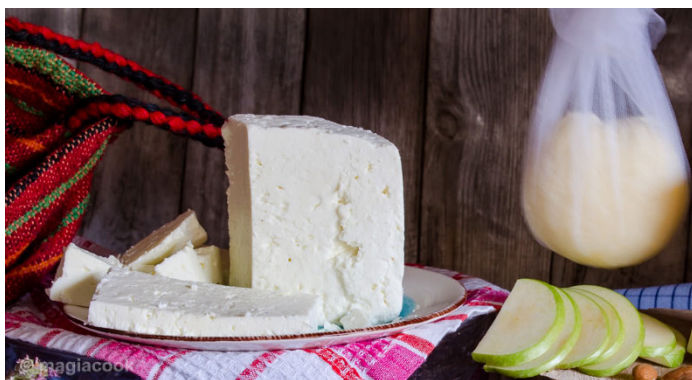
1.9 Λευκό τυρί άλμης και οξυγαλακτικά βακτήρια

Η χώρα μας έχει αξιοσέβαστη ιστορία και παραδόσεις. Κάποιες από τις παραδόσεις αναφέρονται στο γάλα και στα προϊόντα του. Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το γάλα ιερή τροφή, καθώς ο αρχηγός των θεών του Ολύμπου, ο Δίας, ανατράφηκε με το γάλα της νύμφης Αμάλθειας. Έτσι, σύμφωνα με τη μυθολογία, η τέχνη της τυροκομίας δόθηκε ως δώρο στους κοινούς θνητούς από τους θεούς του Ολύμπου. Ένα δώρο με παντοτινή αξία ήταν ο λόγος που το τυρί συμπεριλήφθηκε στο καθημερινό διαιτολόγιο των ανθρώπων. Η φέτα αναφέρεται σαν τρόφιμο το 2000 π.Χ. ενώ η τέχνη της τυροκομίας εκτιμάται ότι προέρχεται από την Ασία. Πριν 2500 χρόνια στην Ελλάδα το τυρί θεωρούνταν εξαιρετικό τρόφιμο και πωλούνταν σε άλλες Μεσογειακές χώρες. Το τυρί φέτα καταγράφεται αρχικά στη βυζαντινή αυτοκρατορία με το όνομα πρόσφατος – φρέσκος και συνδέθηκε με την Κρήτη (Cheesenet, 2004).

Το τυρί της Κεφαλονιάς είναι ένα παραδοσιακό τυρί που είναι γνωστό από την εποχή του Ομήρου. Αυτό το τυρί ξεκίνησε να παρασκευάζεται από τους Κεφαλονίτες τυροκόμους, οι οποίοι αργότερα διέδωσαν αυτήν την τέχνη σε ολόκληρη την Ελλάδα. Το τυρί της Κεφαλονιάς παρασκευάζεται από μίγμα πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος. Αυτό το μίγμα δίνει στο τυρί του χαρακτηριστική γεύση και υφή. Η παραγωγή του τυριού ακολουθεί παραδοσιακές μεθόδους, με τη χρήση φυσικών συστατικών και την εφαρμογή παραδοσιακών τεχνικών. Το τυρί της Κεφαλονιάς έχει μία χαρακτηριστική γεύση και άρωμα, και χρησιμοποιείται σε πολλές παραδοσιακές ελληνικές συνταγές. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το τυρί της Κεφαλονιάς έχει παρόμοια παραδοσιακά τυριά σε άλλα μέρη της Ελλάδας, όπως το τυρί της Ζακύνθου και το τυρί της Κρήτης, τα οποία

παρασκευάζονται επίσης από μίγμα πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος. Αυτά τα τυριά αντικατοπτρίζουν την πλούσια παράδοση τυροκομίας στην Ελλάδα.

Η παρασκευή του λευκού τυριού στην Κεφαλονιά ακολουθεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού προέρχεται κυρίως από ορεινές περιοχές, όπου οι συνθήκες και το περιβάλλον συμβάλλουν στην παραγωγή υψηλής ποιότητας γάλακτος. Όσον αφορά τη συσκευασία, το λευκό τυρί παρέχεται στον καταναλωτή κυρίως σε ξύλινα βαρέλια ή μεταλλικά δοχεία, καλυμμένο με άλμη. Αυτό βοηθά στη διατήρηση της φρεσκάδας του προϊόντος και των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Επιπλέον, το λευκό τυρί μπορεί να διατίθεται και σε αεροστεγείς συσκευασίες πλαστικών σακουλιών ή ατομικά πλαστικά δοχεία με άλμη. Για την διατήρηση του λευκού τυριού, συνίσταται η αγορά του απευθείας από το δοχείο, καλυμμένο με άλμη. Εάν το προϊόν είναι προ-συσκευασμένο, η συσκευασία πρέπει να περιέχει άλμη για να διατηρείται υγρό. Εάν δεν καταναλωθεί όλο το τυρί αμέσως, μπορεί να διατηρηθεί σε άλμη ή δοχείο με γάλα για να διατηρηθεί η υγρασία και η γεύση του. Συνιστάται η φύλαξη του λευκού τυριού σε ψυγείο σε θερμοκρασία από 0 έως 2 βαθμούς Κελσίου, όπου μπορεί να διατηρηθεί για περίπου 3 μήνες. Είναι σημαντικό να τηρούνται οι σωστές συνθήκες φύλαξης και να ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή για να διατηρηθεί η ποιότητα και η ασφάλεια του προϊόντος.



Εικόνα 4 : Παραγωγή λευκού τυριού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν στελέχη γαλακτικών βακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν από λευκό τυρί Κεφαλονιάς. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στα παρακάτω:

- Στον καθαρισμό στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν σε λευκό τυρί Κεφαλονιάς
- Στη μικροσκοπική και μακροσκοπική παρατήρηση των σχηματιζόμενων αποικιών
- Στη μελέτη του προβιοτικού δυναμικού των απομονομένων στελεχών (αντοχή σε οξέα και χολικά άλατα, αιμολυτική ικανότητα, δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών κ.α)
- Στη μελέτη της ικανότητας γαλακτικών βακτηρίων να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μέσω της εφαρμογής διαφόρων τεχνικών όπως η μέτρηση της επιφανειακής τάσης και του δείκτη γαλακτωματοποίησης
- Στη χρήση υγρών αποβλήτων που προέρχονται από βιομηχανίες παραγωγής τυροκομικών (τυρόγαλα) με σκοπο ως υποστρώματα για την βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών
- Στη μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος (συνθετικά υποστρώματα λακτόζης, γλυκόζης και λακτόζης του τυρογάλακτος στην αύξηση του μικροοργανισμού και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χαρακτηρισμός νέων στελεχών

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν μικροβιακές απομονώσεις από δείγμα από λευκό τυρί Κεφαλονιάς και συγκεκριμένα από την περιοχή της Πύλαρου που βρίσκεται στη βορειοδυτική πλευρά του νησιού (παραγωγός Δαράτος). Όλες οι επιλεγμένες εν δυνάμει οξυγαλακτικές αποικίες εξετάστηκαν επίσης ως προς τη μορφολογία των κυττάρων με χρώση κατά Gram και υποβλήθηκαν σε δοκιμή παραγωγής καταλάσης. Οι ταυτοποιημένοι θετικοί κατά Gram ράβδοι ή κοκκία μεταφέρθηκαν εν νέου σε θρεπτικά διαλύματα MRS ή M17, αντίστοιχα με 25% γλυκερόλη (v/v) και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C για τη συνέχεια των πειραμάτων.

3.2 Προβιοτικά τεστ

3.2.1 Αντοχή σε χαμηλό pH και χολικά άλατα

Με σκοπό να προσδιορίσουμε τις απομονώσεις που δύνανται να επιβιώνουν κατά τη διέλευσή τους στο γαστρεντερικό σωλήνα εξετάστηκε όπως παρουσιάζεται στη μελέτη των Saliba et al. (2021). Εν συντομία, κυτταρικές καλλιέργειες 18 ωρών συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (5000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C), πλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7,2 και εμβολιάστηκαν σε παρασκευασμένο PBS σε pH 2,5. Παρομοίως, τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS (pH 8,0) που περιείχε 1% (w/v) χολικά άλατα (OXOID, Hampshire, UK). Η ανθεκτικότητα των εκάστοτε πληθυσμών αξιολογήθηκε κατά το χρόνο εμβολιασμού καθώς και 3 ώρες μετά την επώαση στους 37 °C. Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των δεκαδικών αραιώσεων με την απαρίθμηση των αντίστοιχων αποικιών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επιβίωσης (%) = $(\log \text{cfu A} / \log \text{cfu B}) \times 100\%$. Τα εναιωρήματα βακτηρίων σε κανονικό διάλυμα MRS (pH 6,5, που δεν περιέχει χολικά άλατα) θεωρήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας σε οξέα και χολικά άλατα του εξεταζόμενου στελέχους LAB.

3.2.3 Αιμολυτική δραστηριότητα

Με σκοπό την εκτίμηση πιθανής αιμολυτικής δράσης των απομονώσεων, καλλιέργειες κυττάρων 18 ωρών επιστρώθηκαν σε τριβλία υποστώματος αιματούχου agar (5%) με τη μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης και επωάστηκαν στους 30°C και 37°C για 48h (Zoumporoulou et al., 2020). Η αντίδραση αιμόλυσης χαρακτηρίστηκε με την παρατήρηση: πρασινωπή ή ελαφρώς αποχρωματισμένη ζώνη γύρω από την αποικία

(β-αιμόλυση) – ανοιχτοκίτρινες ή διαυγείς ζώνες γύρω από τις αποικίες (α-αιμόλυση). Οι αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν κανονικά χωρίς κάποια διακριτή ζώνη στην περιφέρειά τους χαρακτηρίστηκαν αρνητικές ως προς την αιμόλυση (γ-αιμόλυση) και οι συγκεκριμένες απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη, δεδομένου ότι θεωρήθηκαν ασφαλείς ως προς το συγκεκριμένο κριτήριο εφόσον δεν παρουσίασαν κάποια αιμολυτική δραστηριότητα.

3.2.4 Αντιμικροβιακές δραστηριότητες

Το φάσμα της αντιμικροβιακής δραστηριότητας προσδιορίστηκε με τη χρήση των ακόλουθων στελεχών παθογόνων μικροοργανισμών: *Listeria monocytogenes* FMCC 124, *Staphylococcus aureus* 134 FMCC, *Pseudomonas aeruginosa* FMCC 223, *Aspergillus flavus* F7, *Aspergillus niger* F8 (τα συγκεκριμένα στελέχη παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα), καθώς και *Klebsiella oxytoca* 1333, *Staphylococcus epidermitis* P121 και *Clostridium difficile* (τα οποία παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα). Για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές ανακαλλιέργειες για την επαναδραστηριοποίηση των κυττάρων στους 37 °C για 24 h σε υπόστρωμα TSB (tryptic soy broth) και στη συνέχεια φρέσκα κύτταρα. Η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των υπό μελέτη οξυγαλακτικών βακτηριών προσδιορίστηκε με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (Nelios et al. 2022). Εν συντομία, υπερκείμενα χωρίς κύτταρα (cell free supernatants, CFSs) συλλέχθηκαν από καλλιέργειες 24 ωρών (MRS, 37 °C). Τα κύτταρα απομακρύνθηκαν μετά από φυγοκέντρηση (12.000 × g, 10 λεπτά, 4 °C) και το pH των CFSs αντικαταστάθηκε στο 6,5 χρησιμοποιώντας 5 N NaOH προκειμένου να αποτραπεί η επίδραση των οργανικών οξέων των καλλιεργειών. Ελήφθησαν δείγματα αποστειρωμένα με τη χρήση φίλτρου (0,22 μm) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τα CFS χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 90% σε μικροπλάκα 96 βοθρίων σε τελικό όγκο 200 μL. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν εναιωρήματα κυττάρων των παθογόνων στελεχών συγκέντρωσης 10⁵ cfu/mL σε υπόστρωμα MRS τα οποία και αναμείχθηκαν με το εκάστοτε CFS, και επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Η αναστολή ανάπτυξης των παθογόνων παρουσία των CFSs καταγράφηκε φασματοφωτομετρικά στα 600 nm σε μεσοδιαστήματα 0 και 24 ωρών. Οι μετρήσεις απορρόφησης καταγράφηκαν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο μικροπλάκων Epoch 2 (Biotech, Agilent, Santa Clara, ΗΠΑ). Η επίδραση των CFSs αξιολογήθηκε ως το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης και υπολογίστηκε ως εξής: Παρεμπόδιση % = [1-(OD_A/OD_C) × 100], όπου OD_A η οπτική πυκνότητα που καταμετρήθηκε από την ανάπτυξη του παθογόνου παρουσία τους οξυγαλακτικού

CFS και ODc η οπτική πυκνότητα του δείγματος ελέγχου που αφορά την ανάπτυξη του παθογόνου απουσία CFS.

3.3 Δοκιμή οξίνισης γάλακτος

Στο συγκεκριμένο πείραμα ελέγχθηκε η ικανότητα των οξυγαλακτικών στελεχών να προκαλούν οξίνιση (πτώση του pH) σε αποβουτυρωμένο γάλα - skim milk (10% w/v, Condalab, Madrid, Spain). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη φρέσκιας καλλιέργειας κυττάρων 1% σε αποστειρωμένο υπόστρωμα «skim milk» και ακολούθησε επώαση για 24h στους 37°C. Τα επίπεδα pH του θρεπτικού υποστρώματος ελέγχθηκαν σε χρόνο 0 και έπειτα από 3, 6, 9, 12, 24h επώασης.

3.4 Μικροβιακά στελέχη - Γαλακτικά βακτήρια

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από λευκό τυρί Κεφαλονιάς. Τα στελέχη εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα και στη συνέχεια αναφέρονται με τον κωδικό που έχει αποδοθεί σε κάθε στέλεχος.

Πίνακας 3 : Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη .

<u>Κωδική ονομασία στελέχους.</u>	<u>Γένος και είδος στελέχους.</u>
F_16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_55	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
F_70	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
F_89	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_107	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>
F_120	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>
F_162	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_180	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_194	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_214	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>
F_216	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>
F_220	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
F_222	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

F_254	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
-------	--------------------------------------

Η διατήρηση των στελεχών γινόταν σε ειδικού τύπου φιαλίδια (cryovials), με χωρητικότητα όγκου 2 mL στους -80oC, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (DifcoTM, USA), εμπλουτισμένο με 25% γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121oC, για 20 λεπτά).

3.5 Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων.

3.5.1 Χρήση τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα- Αποπρωτεϊνοποίηση τυρογάλακτος

Η αποπρωτεϊνοποίηση του τυρογάλακτος είναι απαραίτητη πριν τη χρήση του ως θρεπτικό υπόστρωμα.

Η αποπρωτεϊνοποίηση του τυρογάλακτος είναι η διαδικασία απομάκρυνσης των περισσότερων πρωτεϊνών από το φρέσκο τυρογάλα για να ληφθεί ένα υγρό χωρίς πρωτεΐνες που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για μικροβιακή ανάπτυξη.

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Οξίνιση: Στη συνέχεια, το pH του φιλτραρισμένου τυρογάλακτος μειώνεται σε μια τιμή περίπου 4,7 αφού έχουμε προσθέσει υδροχλωρικό οξύ και ακολούθησε θερμική επεξεργασία (121/15 min). Αυτό προκαλεί τη μετουσίωση και την πήξη των πρωτεϊνών, σχηματίζοντας μια στερεή μάζα.

Πήξη: Στη συνέχεια, οι πηκτικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται από το υγρό τμήμα του τυρογάλακτος με διήθηση υπό κενό. Αυτή η διαδικασία δίνει ένα υγρό που περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της λακτόζης, των ανόργανων συστατικών και άλλων θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στον τυρόγαλα.

3.5.2 Παρασκευή συνθετικού υποστρώματος M2.

Το θρεπτικό μέσο M2 είναι ένας τύπος μέσου ανάπτυξης που χρησιμοποιείται συνήθως για την καλλιέργεια μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών. Είναι ένα μη επιλεκτικό μέσο γενικής χρήσης που περιέχει μια ποικιλία θρεπτικών ουσιών που υποστηρίζουν την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων, ζυμομυκήτων και άλλων μικροοργανισμών.

Πίνακας 4 : Σύσταση συνθετικού υποστρώματος γλυκόζης (M2) .

Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος M2	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης	20
Θεικό αμμόνιο	8

Επταένυδρο φωσφορικό κάλιο	5
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο	1
Γλυκόζη	0.3
Όξινο ανθρακικό νάτριο	5

3.6 Διαδικασία μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Η μικροβιακή ζύμωση είναι μια κοινή μέθοδος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Όπως προαναφέρθηκε αρχικά προετοιμάστηκαν οι προκαλλιέργειες των γαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες επωάστηκαν για 12 h (overnight) σε κλίβανο επώασης στους 37 °C. Εν συνεχεία, οι προκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των κύριων καλλιιεργειών. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε υπο ασηπτικές συνθήκες. Ο όγκος του εμβολίου ήταν 5% (v/v) επί του όγκου της κύριας καλλιέργειας. Μετά τον εμβολιασμό οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (37°C). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λήφθηκαν δείγματα μετά από 4, 24 και 72 ώρες ενώ μετρήσεις pH και διορθώσεις γινόντουσαν καθημερινά. Το πρώτο βήμα της δειγματοληψίας ήταν να διαχωριστεί ο όγκος από κάθε κωνική σε δύο falcon ώστε ο συνολικός όγκος να φυγοκεντρηθεί και να διαχωριστεί στη συνέχεια το υπερκείμενο από τα κύτταρα. Σε κάθε σημείο της ζύμωσης μετρήθηκε η βιομάζα ή αλλιώς το ολικό ξηρό βάρος καθώς και η κατανάλωση σακχάρων και παραγωγή γαλακτικού οξέος. Για να αξιολογηθεί η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ακολούθησε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης, τόσο στο υπερκείμενο όσο και στο εκχύλισμα των κυττάρων, μετρήθηκε ο δείκτης γαλακτωματοποίησης και η μετατόπιση ελαίου.

3.7 Εκχύλιση και παραλαβή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών συνήθως περιλαμβάνει το διαχωρισμό τους από το ζυμό ζύμωσης στον οποίο παράγονται. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, μεταξύ των οποίων:

Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος του βιοεπιφανειοδραστικού παράγοντα, ο μικροοργανισμός που τον παράγει, οι συνθήκες ζύμωσης και η προβλεπόμενη εφαρμογή. Όπως προαναφέρθηκε, σε κάθε δειγματοληψία πρώτο βήμα ήταν ο διαχωρισμός του υγρού από τα κύτταρα μέσω φυγοκέντρωσης (6450 g, 15 min, Rotina 420R, Hettich, Germany). Ακολούθησε προσθήκη αφιονισμένου νερού (H₂O), ανάδευση και ξανά διαχωρισμός μέσω φυγοκέντρωσης για τον καθαρισμό των κυττάρων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για δύο φορές και τα κύτταρα βυθίστηκαν σε

ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH 7,0 . Η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών πραγματοποιήθηκε για 12 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κυττάρων και το υποκείμενο φιλτραρίστηκε 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 5 : Μεμβράνες διαπίδυσης .

3.8 Μέτρηση ολικού ξηρού βάρους.

Η μέτρηση του ολικού ξηρού βάρους (ή βιομάζα) σχετίζεται με την αξιολόγηση της μικροβιακής ανάπτυξης κατά τη διεργασία της ζύμωσης. Η διαδικασία μέτρησης αρχίζει με την παραλαβή δειγμάτων κατά τις 4, 24 και 72 ώρες της ζύμωσης. Από κάθε δείγμα παίρνονται δύο επαναλήψεις των 2 mL, συνολικά 4 mL. Αυτά τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα Eppendorf των 2 mL. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται σε φυγόκεντρο (Nuve NF 048) για 10 λεπτά σε ταχύτητα 5200 στροφών. Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται για να απομακρυνθούν τα κύτταρα από το υγρό της ζύμωσης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό (dH₂O) για να απομακρυνθούν υπολείμματα του θρεπτικού υποστρώματος. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα που ενδέχεται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, το νερό απομακρύνεται και τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα κλίβανο στους 65°C για 24 ώρες, μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε υγρασία από τα δείγματα και να επιτευχθεί σταθερό βάρος. Τέλος, τα δείγματα ζυγίστηκαν ένα προς ένα σε ζυγό ακριβείας. Η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους εκφράζεται συνήθως σε γραμμάρια ανά λίτρο (g/L) και υπολογίζεται ως μέσος όρος από τις δύο μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3.9 Μέτρηση υπολειπόμενων σακχάρων και παραγωγής γαλακτικού οξέος.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήσαμε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απορρόφησης (HPLC) για τον προσδιορισμό της κατανάλωσης των σακχάρων και της παραγωγής γαλακτικού οξέος κατά τη διεργασία της ζύμωσης.

Αρχικά, πήραμε το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση στα χρονικά σημεία των 6, 24 και 72 ωρών ζύμωσης. Τα δείγματα αυτά αραιώνονται κατάλληλα και φιλτράρονται με ένα ειδικό φίλτρο Whatman 0,2 μm και τοποθετούνται σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια (vials) που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση. Για την ανάλυση, χρησιμοποιείται μια στήλη ROA-organic acid H^+ (300 μήκος x 7.8 mm εσωτερική διάμετρος, Phenomenex) συνδεδεμένη με έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer). Η ροή της κινητής φάσης είναι 0,6 mL/min, ενώ η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους 65°C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται οξύ θειικό (H_2SO_4) 10 mM. Μέσω της HPLC αναλύονται τα σάκχαρα και το γαλακτικό οξύ που παράγονται κατά τη ζύμωση. Η μέθοδος βασίζεται στη χωριστική ικανότητα της στήλης ROA-organic acid H^+ για την παραχώρηση και αναγωγή ιόντων ανάλογα με τον τύπο και την ποσότητα των συστατικών που αναλύονται. Ο ανιχνευτής δείκτης διάθλασης επιτρέπει τον μέτρηση των αλλαγών στην απορρόφηση του φωτός κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Με αυτόν τον τρόπο, μπορείτε να προσδιορίσετε την ποσότητα των σακχάρων και την παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

3.10 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια.

Η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη πραγματοποιήθηκε με συγκεκριμένες αναλύσεις. Οι μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τόσο στο υπερκείμενο της ζύμωσης, δηλαδή το υγρό που προέκυψε από τη ζύμωση, όσο και στα εκχυλίσματα που προήλθαν από την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

3.10.1 Μέτρηση επιφανειακής τάσης.

Η μέθοδος του πλακιδίου Wilhelmy plate είναι μια κοινή τεχνική για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης ενός υγρού. Σε αυτήν τη μέθοδο, χρησιμοποιείται ένα πλακίδιο που είναι επικαλυμμένο με μια επιφανειακή στρώση που αλληλοεπιδρά με το υγρό. Κατά τη μέτρηση, το πλακίδιο υγραίνεται και ακουμπά στο υγρό. Η ένταση (δύναμη) που ασκείται για να αποκολλήσει το πλακίδιο από το υγρό σχετίζεται με την επιφανειακή τάση του υγρού.

Στην περίπτωση της παρούσας μελέτης, η μέτρηση της επιφανειακής τάσης έγινε με ένα τενσιόμετρο τύπου K20 Krüss tensiometer της εταιρείας KRÜSS. Το πλακίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν από πλατίνα μήκους

1,9 εκατοστών και είχε μήκος 40,20 χιλιοστά. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) σε έναν όγκο 20 mL. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε δείγμα.

Σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιόταν ένας όγκος 20ml . Αφού τοποθετούταν στο πλακίδιο τοποθετούταν στη γιάλνη αυξομειούμενη βάση . Έπειτα αποστηρώνοντας το εκκρεμές πριν από κάθε χρήση τοποθετούταν στην κατάλληλη θέση και σε απόλυτη ηρεμία λαμβάναμε την μέτρηση.

Η μείωση της επιφανειακής τάσης συνήθως υποδηλώνει την παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο υγρό, καθώς αυτές οι ουσίες μπορούν να μειώσουν τη δύναμη που απαιτείται για να αποκολληθεί το πλακίδιο από την επιφάνεια.

3.10.2 Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E24 %) .

Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (E24) είναι ένας τρόπος να μετρήσουμε την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει την ικανότητα ενός δείγματος να δημιουργήσει μια σταθερή διασπορά μεταξύ δύο ασυμμετρικών φάσεων, όπως το νερό και το λάδι, που σχηματίζει ένα γαλάκτωμα. Στην πειραματική διαδικασία που περιγράφετε, ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (E24) προσδιορίζεται ως εξής:

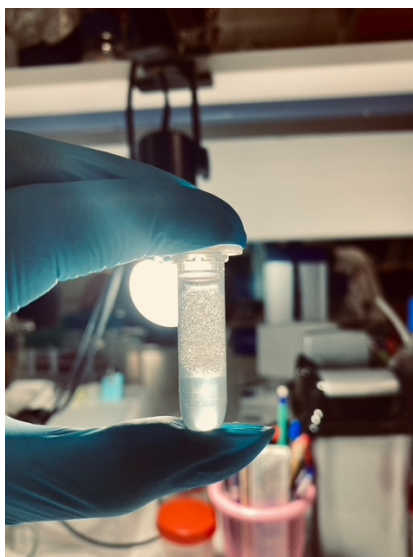
Αρχικά οπιοθετήθηκε 1 mL του δείγματος σε erpedorf μαζί με 1 mL παραφινέλαιο στον ίδιο erpedorf. Στη συνέχεια αναδεύτηκε έντονα το δείγμα με χρήση ενός vortex στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό με στόχο την καλύτερη ανάμειξη του δείγματος με το παραφινέλαιο. Το δείγμα αφέθηκε σε συνθήκες ηρεμίας για 24 ώρες.

Τέλος μετρήθηκε το ύψος του γαλακτώματος (Hemulsion), δηλαδή το ύψος του στρώματος που έχει σχηματιστεί ανάμεσα στο νερό και το λάδι.

Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (E24) υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση:

$$E24 = (Hemulsion / H_{total\ height\ of\ liquid}) \times 100\%$$

Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (E24) εκφράζει το ποσοστό του συνολικού ύψους του μίγματος που αποτελείται από το γαλάκτωμα που σχηματίζεται από το δείγμα. Έτσι, όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης γαλακτωματοποίησης, τόσο περισσότερη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών υπάρχει στο δείγμα.



Εικόνα 6 : Γαλάκτωμα στελέχους F16.

3.10.3 Μέθοδος μετατόπισης ελαίου.

Αυτή η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει έναν απλό τρόπο μέτρησης της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο δείγμα με τη χρήση ενός δακτυλίου που σχηματίζεται γύρω από το εισαχθέν δείγμα στο λάδι.

Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα :

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα μεγάλα τρυβλία petri και προστέθηκαν 50 mL απιονισμένου νερού σε κάθε τρύβλιο. Προστέθηκαν 50 μ L λάδιού σε κάθε τρύβλιο. Το λάδι θα σχηματίσει μια κηλίδα στην επιφάνεια του νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μ L από το δείγμα στο κέντρο της κηλίδας που έχει σχηματιστεί από το λάδι. Αυτό το δείγμα πιθανόν να περιέχει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Αφέθηκε το δείγμα και την κηλίδα να διασταυρωθούν και να αλληλεπιδράσουν. Τέλος μετρήθηκε η διάμετρος του δακτυλίου που προκύπτει γύρω από το δείγμα και καταγράψτε την τιμή.

Η διάμετρος του δακτυλίου σχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο δείγμα. Μεγαλύτερη διάμετρος υποδηλώνει μεγαλύτερη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Η ακρίβεια και η αξιοπιστία αυτής της μεθόδου μπορεί να εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η προετοιμασία του δείγματος και οι συνθήκες διάχυσης στο διάστημα αναμονής. Επίσης, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να απαιτεί μια σύγκριση με δείγματα αναφοράς ή μετρήσεις από γνωστές πηγές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

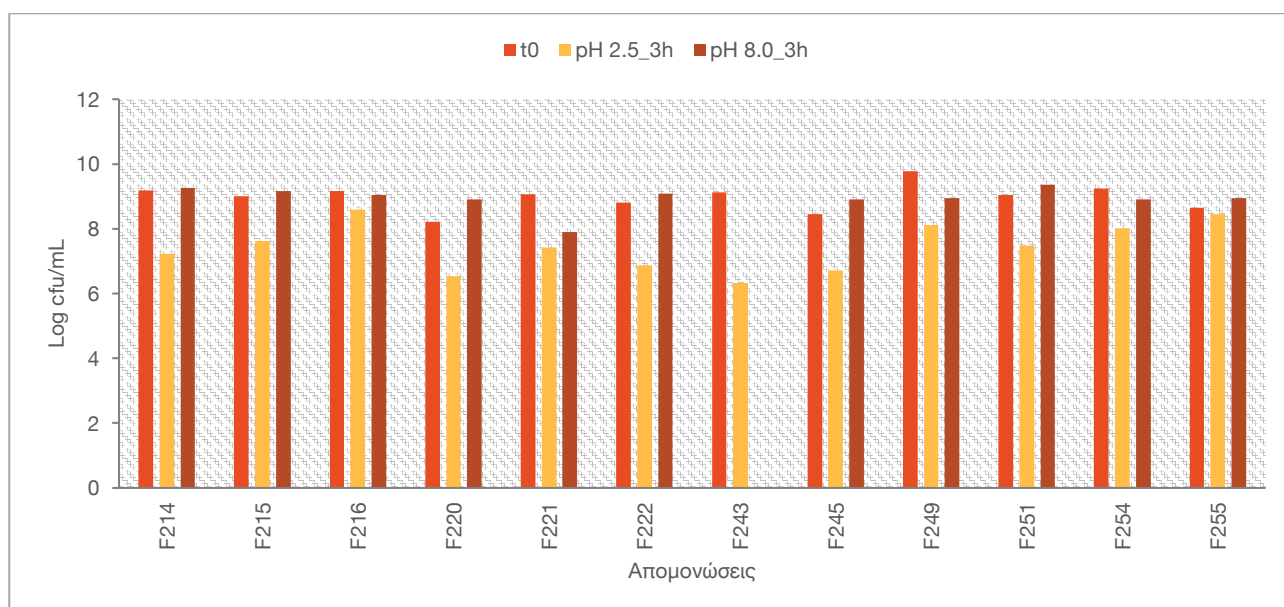
4.1 Μελέτη προβιοτικού δυναμικού στελεχών

4.1.1 Αντοχή σε οξέα και χολικά άλατα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια ποικίλη ομάδα μικροοργανισμών που βρίσκονται συνήθως σε διάφορα τρόφιμα και είναι σημαντικά για τη συμβολή τους στη γεύση, την υφή και τη συντήρηση αυτών των τροφίμων. Η απομόνωση και ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους είναι ένα σημαντικό βήμα για τη μελέτη της ποικιλομορφίας και της λειτουργικότητας αυτών των μικροοργανισμών. Στελέχη που παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε οξέα και χολικά άλατα προτιμώνται συχνά για χρήση ως προβιοτικά, καθώς είναι σε θέση να επιβιώσουν κατά τη διέλευση από τον γαστρεντερικό σωλήνα και να ασκήσουν τις ευεργετικές τους επιδράσεις στον ξενιστή.

Συνολικά στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν 17 στελέχη που απομονώθηκαν από το δείγμα του λευκού τυριού που συλλέξαμε. Από αυτά τα 12 έδειξαν αντοχή σε χαμηλό pH και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το **Γράφημα 3.1** παρουσιάζει την αντοχή των 12 στελεχών σε χαμηλό pH, που προσομοιάζει το pH του στομάχου και σε υψηλό pH παρουσία χολικών αλάτων (περιβάλλον εντέρου). Ο προκαταρκτικός αυτός έλεγχος έδειξε για τις 12 απομονώσεις βιώσιμους πληθυσμούς $> 6 \log \text{ cfu/mL}$ μετά από 3 ώρες επώασης σε pH 2,5. Οι πληθυσμοί κυμάνθηκαν από 6,32-8,59 $\log \text{ cfu/mL}$. Εξαίρεση αποτέλεσε η απομόνωση F243 όπου έδειξε απώλεια βιωσιμότητας μεγαλύτερη από 2 $\log \text{ cfu/mL}$ και αποκλείστηκε για περαιτέρω μελέτη. Αντίθετα η πλειονότητα των απομονώσεων εμφάνισε μεγάλη αντοχή στο υψηλό pH παρουσία χολικών αλάτων με πληθυσμούς να κυμαίνονται παρόμοιους με τους αρχικούς (to) και συγκεκριμένα από 7,9-9,26 $\log \text{ cfu/mL}$.

Όπως σημειώνεται και στη βιβλιογραφία, οι διαφορές στην αντοχή σε χαμηλό pH μεταξύ διαφορετικών ειδών και στελεχών του γένους *Lactobacillus* sp. είναι σύνηθες φαινόμενο. Αλλά ως είδη γενικά, είναι συχνά ανθεκτικά σε όξινα περιβάλλοντα τροφίμων (Mc. Donald, L., et al. 1989 , Cebeci, A., et al. 2003, Pennacchia C., et al. 2004)



Γράφημα 1: Πληθυσμός των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών μετά από 3 ώρες σε pH 2.5 και 8.0 παρουσία χολικών αλάτων.

4.1.2 Αιμολυτική δράση

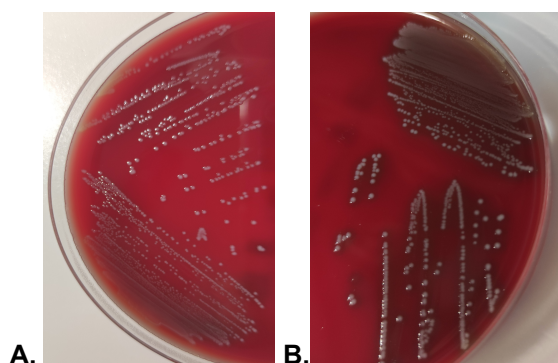
Η αιμολυτική δραστηριότητα είναι η ικανότητα κάποιων μικροοργανισμών να προκαλούν βλάβη στα ερυθρά αιμοσφαίρια, οδηγώντας στην απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης και άλλων κυτταρικών περιεχομένων στο περιβάλλον. Η αιμολυτική αυτή δράση χαρακτηρίζεται ως άλφα, βήτα ή γάμμα ανάλογα με το βαθμό αιμόλυσης. Α-αιμόλυση: Σε αυτόν τον τύπο αιμόλυσης, ο μικροοργανισμός παράγει πρασινωπό αποχρωματισμό του άγαρ γύρω από τις αποικίες λόγω της μερικής διάσπασης της αιμοσφαιρίνης. Β-αιμόλυση: Σε αυτόν τον τύπο αιμόλυσης, ο μικροοργανισμός προκαλεί πλήρη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα μια διαυγή ζώνη γύρω από τις αποικίες στο υπόστρωμα του αιματούχου άγαρ. Γ-αιμόλυση: Σε αυτόν τον τύπο αιμόλυσης, ο μικροοργανισμός δεν παράγει καμία αιμολυτική δραστηριότητα και δεν υπάρχει καμία αλλαγή στην εμφάνιση ανάπτυξης των αποικιών. Η αιμόλυση είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών και πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά για τον προσδιορισμό του παθογόνου δυναμικού του.

Η απουσία αιμόλυσης θεωρείται προαπαιτούμενο για να χαρακτηριστεί ένα οξυγαλακτικό βακτήριο ως προβιοτικό και θεωρείται προϋπόθεση ασφαλείας για την επιλογή ενός προβιοτικού στελέχους (FAO/WHO, 2002). Στη συγκεκριμένη μελέτη όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.1** παρατηρήθηκε πως τα 5 από τα 12 στελέχη δεν εμφάνισαν αιμολυτική δράση και χαρακτηρίστηκαν ως ασφαλή με βάση τη συγκεκριμένη ιδιότητα. Συνεπώς τα F214, F216, F220, F222, F254 τα χρησιμοποιήσαμε για περεταίρω μελέτη. Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν παρουσίασε β- αιμολυτική δραστηριότητα. Τα περισσότερα στελέχη ήταν α-

αιμολυτικά (δηλαδή υπήρχε αιμολυτική δράση), ενώ πέντε στελέχη παρουσίασαν γ-αιμόλυση. Πρόκειται για τα στελέχη F214, F216, F220, F222, F254 . Παρόμοιες παρατηρήσεις σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έγιναν για όλα τα στελέχη των ειδών *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus* spp. και *Lb. casei* που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία παρουσίασαν γ-αιμόλυση εκτός από λίγα που παρουσίασαν α-αιμόλυση (Maragkoudakis et al., 2006).

Πίνακας 5: Αιμολυτική δράση των υπό εξέταση βακτηριακών στελεχών

Βακτηριακά στελέχη	α – Haemolysis	γ – Haemolysis
F214		—
F215	—	
F216		—
F220		—
F221	—	
F222		—
F245	—	
F249	—	
F251	—	
F254		—
F255	—	



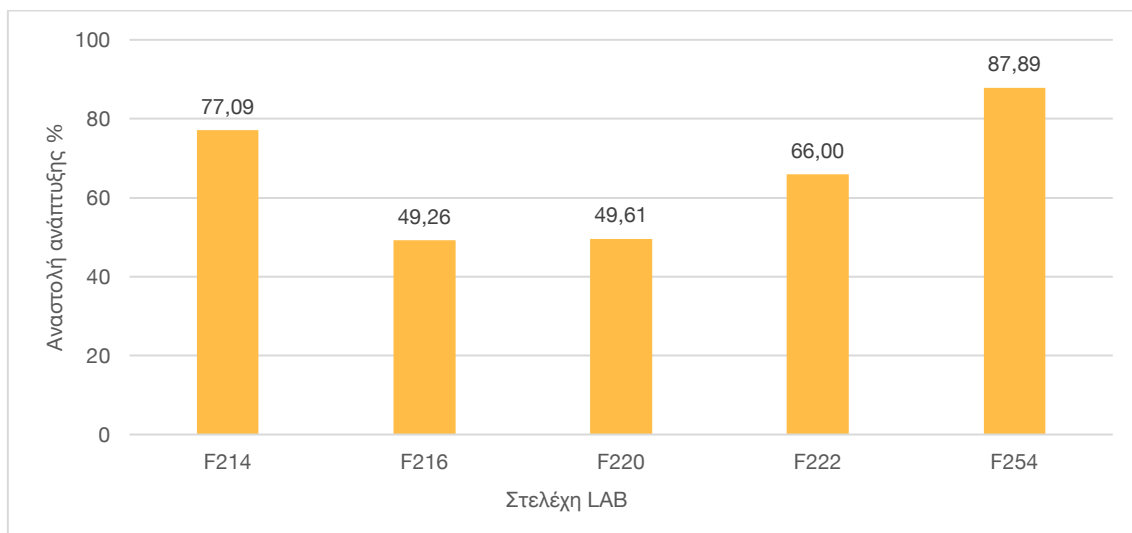
Εικόνα 7: Τρυβλίο petri με blood agar που απεικονίζει Α) γ-αιμολυτική δράση και Β) α-αιμολυτική.

4.1.3 Αντιμικροβιακή ικανότητα απομονωθέντων οξυγαλακτικών στελεχών

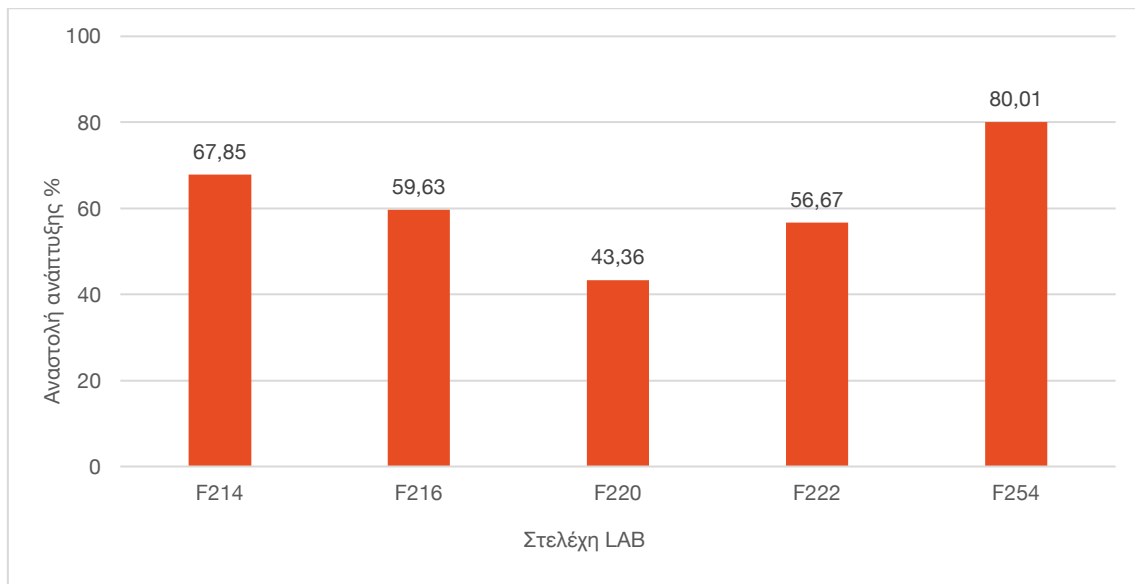
Η αντιβακτηριακή δράση των 5 επιλεγμένων στελεχών δοκιμάστηκε έναντι 4 κοινών παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα τρόφιμα. Από το **Γράφημα 3.2** μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής: την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα την εμφανίζει το στέλεχος F254. Πιο συγκεκριμένα το F254 εμφανίζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι του βακτηρίου *L. monocytogenes* με 87,89% και είναι και η

μεγαλύτερη τιμή που εμφανίστηκε έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Γράφημα 3Α). Αντίθετα η μικρότερη δράση παρατηρείται έναντι στο *P. aeruginosa* με ποσοστό 65,26% (Γράφημα 3Δ). Την αμέσως επόμενη ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα εμφανίζει το στέλεχος F214 κυρίως έναντι του *S. epidermitis* με ποσοστό αναστολής ανάπτυξης 78,33% (Γράφημα 3Γ). Αντιθέτως την μικρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα αναφορικά με τα συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια την παρουσιάζει το στέλεχος F220, εμφανίζοντας την μεγαλύτερη δράση έναντι του *L. monocytogenes* και τη μικρότερη έναντι του *P. aeruginosa* με ποσοστό 21,55% (Γράφημα 3Δ). Αυτό είναι και το μικρότερο ποσοστό αντιμικροβιακής ικανότητας που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας. Τα στελέχη F216 και F222 παρουσίασαν μια μέτρια αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι των *L. monocytogenes*, *S. aureus* και *S. epidermitis* με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 49,61% - 59,63% (Γράφημα 3Α,Β,Γ). Τα δύο αυτά στελέχη εμφανίζουν από τις μικρότερες δράσεις όσον αφορά στο *P. aeruginosa* με μικρότερη αναστολή ανάπτυξης να προέρχεται από το στέλεχος F216 με ποσοστό 29,18% (Γράφημα 3Δ).

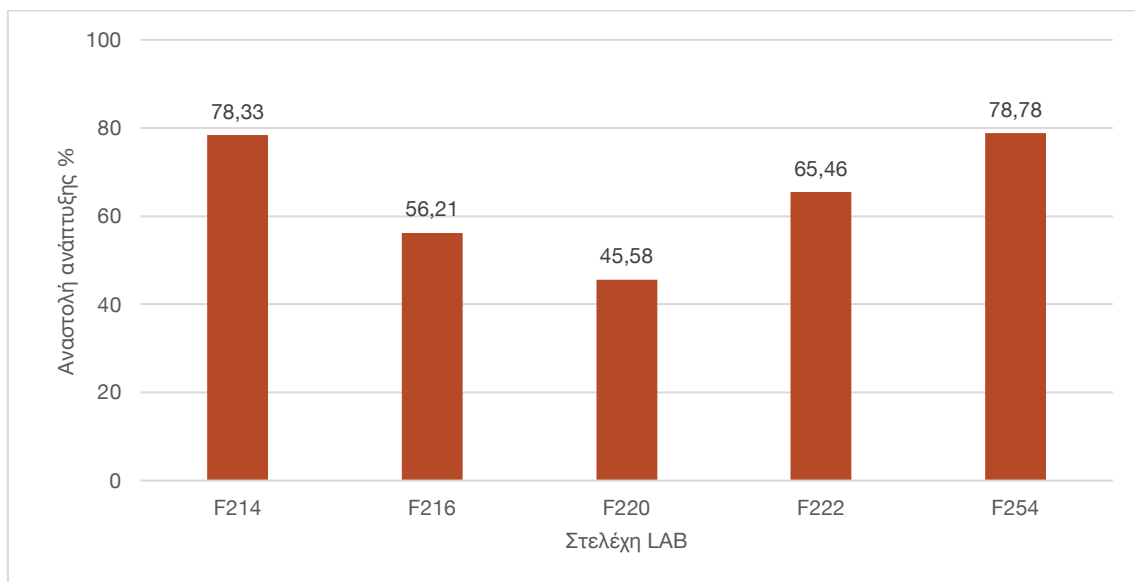
A.



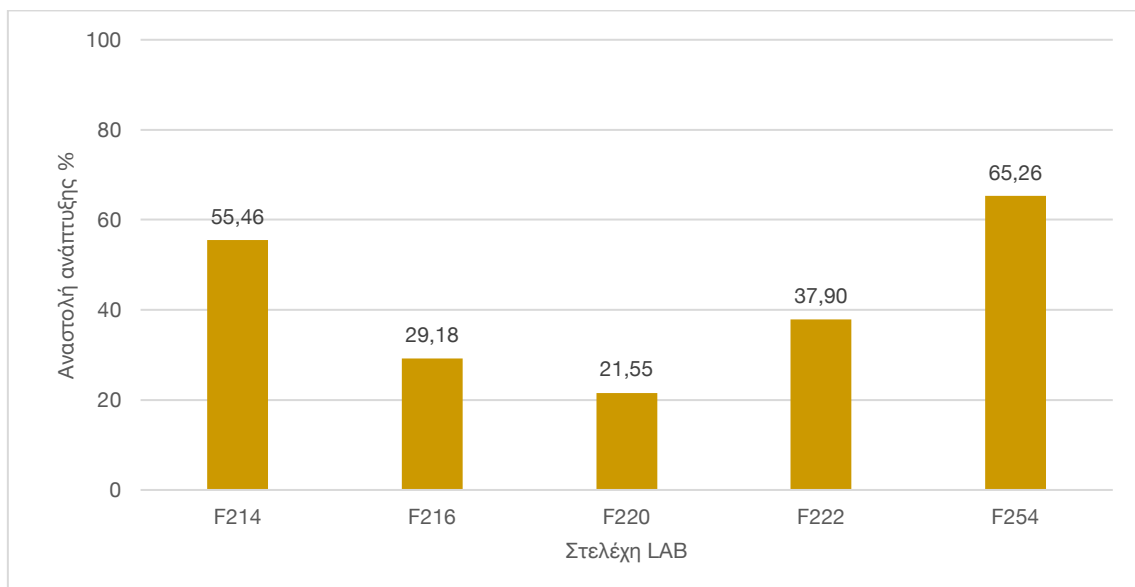
B.



Γ.



Δ.



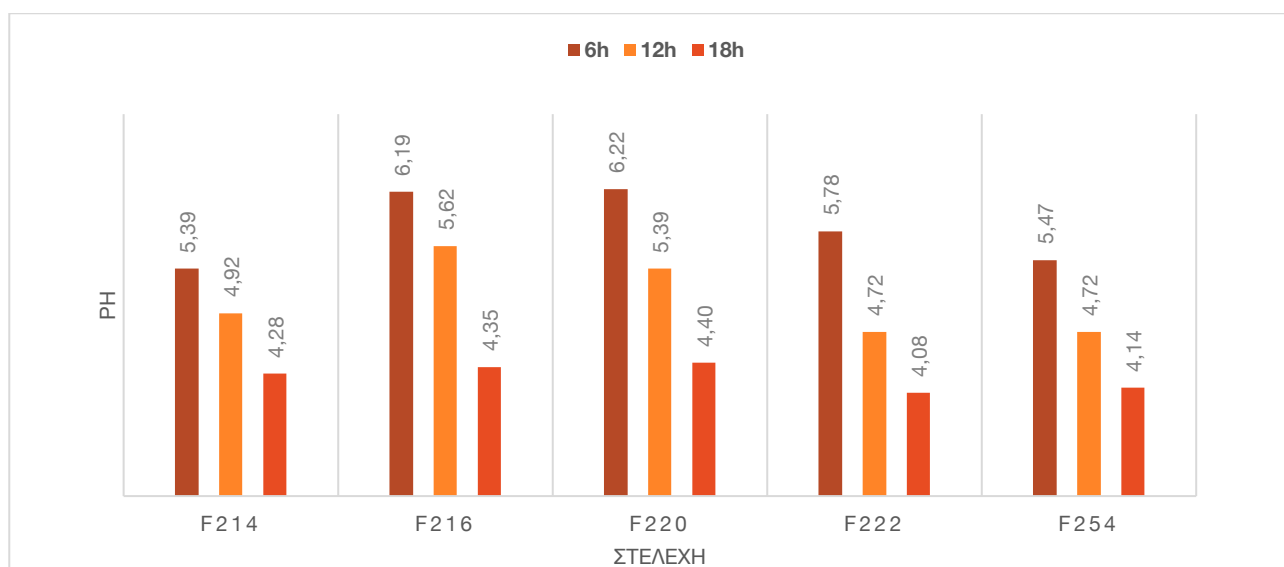
Γράφημα 2 : Αντιμικροβιακή δράση των στελεχών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών Α) *Listeria monocytogenes* Β) *Staphylococcus aureus*, Γ) *Staphylococcus epidermitis*, Δ) *Pseudomonas aeruginosa*

4.2 Οξεοπαραγωγική ικανότητα σε γάλα.

Η δοκιμασία οξίνισης του γάλακτος είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή δοκιμή για την αξιολόγηση της ικανότητας των LAB να ζυμώνουν τη λακτόζη που υπάρχει στο γάλα και να παράγουν γαλακτικό οξύ. Η δοκιμή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ρυθμού οξίνισης, της ποσότητας του παραγόμενου οξέος και του χρόνου που χρειάζονται οι LAB για να φτάσουν σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο pH. Η δοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των ρυθμών οξίνισης διαφορετικών στελεχών LAB ή για την παρακολούθηση της δραστηριότητας των LAB κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης.

Στο Γράφημα 3 βλέπουμε το δυναμικό ζύμωσης των 5 υπό μελέτη στελεχών σε αποβουτυρωμένο γάλα σε τρεις διαφορετικούς χρόνους. Σε γενικές γραμμές διαφαίνεται πως οι τιμές pH του γάλακτος επηρεάστηκαν κατά μεγαλύτερο βαθμό από το χρόνο της ζύμωσης. Η πλειονότητα των στελεχών εμφάνισε μια μέση δυναμική οξίνιση εντός των πρώτων 6 ωρών. Πιο αναλυτικά στις πρώτες έξι ώρες παρατηρούμε πως την μεγαλύτερη μείωση του pH την είχε το στέλεχος F214 με το pH να είναι 5,39. Στις πρώτες 6 ώρες παρατηρούμε πως τη μικρότερη πτώση pH την είχαν οι απομονώσεις των στελεχών F216 και F220 που παρουσίασαν παρόμοιο pH 6,19 και 6,22 αντίστοιχα. Οι επόμενες μετρήσεις λήφθηκαν από τις καλλιέργειες στις 12 ώρες. Παρατηρούμε πως το στέλεχος F214 έχει την μεγαλύτερη αύξηση ως προς την οξίνιση του γάλακτος ενώ βλέπουμε επίσης πως στα στελέχη F222 και F254 λάβαμε ίδια τιμή pH 4,72. Παρόλα αυτά φαίνεται πως από τα δύο αυτά στελέχη την μεγαλύτερη οξίνιση προκάλεσε το F222 αφού η τιμή pH έπεσε από 5,78 στο 4,72. Κατά την τελευταία δειγματοληψία στις 18 ώρες παρατηρούμε πως από τις πέντε απομονώσεις το χαμηλότερο pH εμφανίζεται από το στέλεχος F222 με τιμή 4,08.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη μεταβολική δραστηριότητα των LAB, την ικανότητα των LAB να επιβιώνουν σε όξινα περιβάλλοντα και τα πιθανά οφέλη των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων για την υγεία. Η μείωση του pH λόγω της παραγωγής οξέω (κυρίως γαλακτικού) από τα γαλακτικά βακτήρια επιδρά θετικά στην ποιότητα και τη σταθερότητα των προϊόντων. Επίσης, το χαμηλό pH βοηθά στη διατήρηση των προϊόντων, καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι σημαντικά για την παραγωγή ζημούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων.



Γράφημα 3: Οξεοπαραγωγική ικανότητα των βακτηριακών στελεχών σε skim milk

4.3 Μελέτη γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

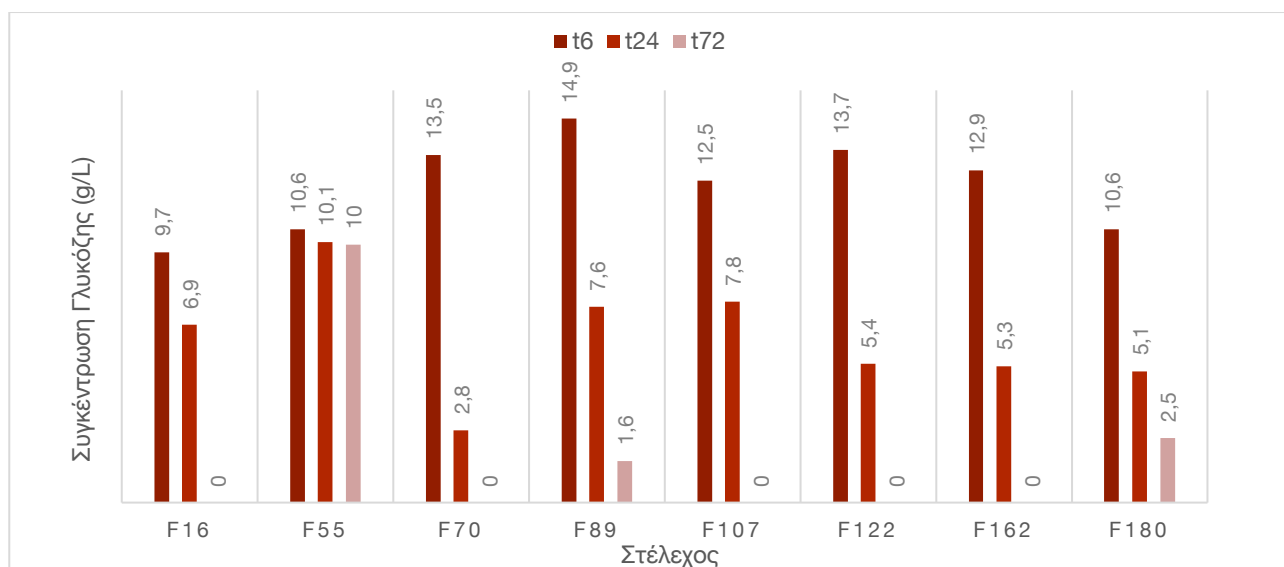
Με στόχο την εύρεση γαλακτικών βακτηριών τα οποία να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης αλλά και σε υπόστρωμα τυρογάλακτος για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μέτρηση κατανάλωσης της γλυκόζης καθώς και μέτρηση παραγωγής γαλακτικού οξέος. Αναφορικά με την ικανότητα των στελεχών να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μετρήθηκε η επιφανειακή τάση τόσο στα υπερκείμενα της ζύμωσης καθώς και στα εκχυλίσματα rbs σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές και στο υπόστρωμα τυρογάλακτος αλλά και στο συνθετικό υπόστρωμα M2 έτσι ώστε να διαπιστωθεί τόσο η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται συνδεδεμένες με το κύτταρο όσο και η παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών. Επιπλέον καταγράφηκε η ικανότητα παραγωγής γαλακτώματος καθώς και η μετατόπιση ελαίου λόγω της ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα δείγματα που προέκυψαν από τις ζυμώσεις. Τέλος μελετήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το *L. Fermentum* F70 σε βιοαντιδραστήρες και η επίδραση του υποστρώματος καθώς οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης λακτόζης καθώς και θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

4.3.1 Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθετικό υπόστρωμα

Η μικροβιακή ανάπτυξη και η πιθανή παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών μελετήθηκαν για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα (M2) με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Στα Γραφήματα 4

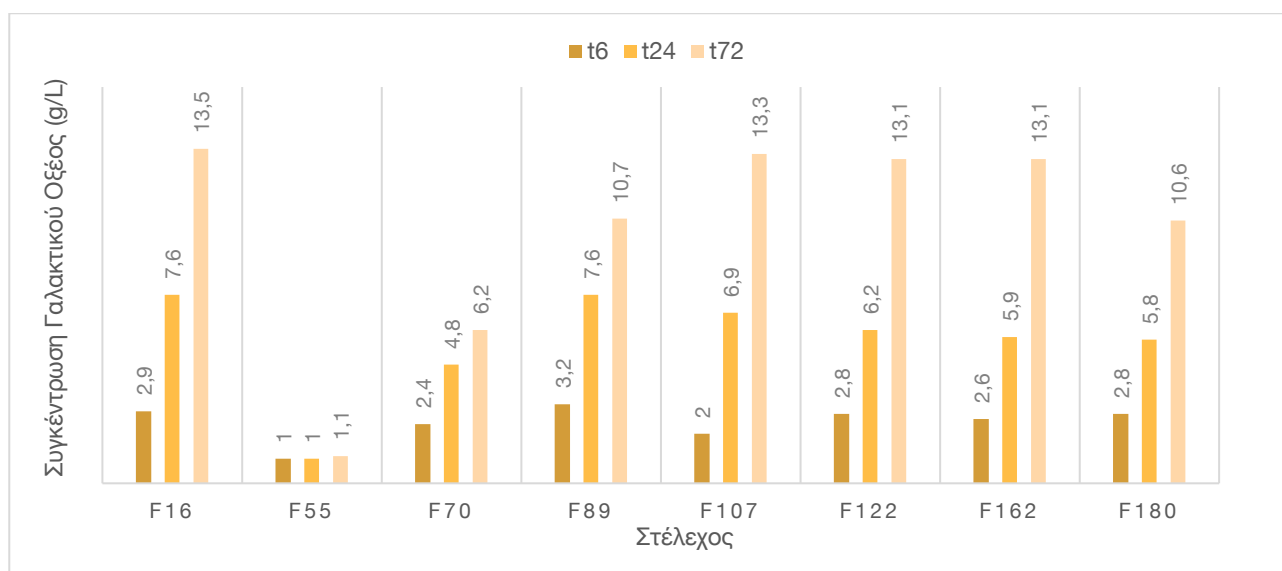
και 5 παρουσιάζεται η συγκέντρωση γλυκόζης που απέμεινε στο υπόστρωμα από τα 20g/L που υπήρχαν αρχικά και η παραγωγή γαλακτικού οξέος αντίστοιχα.

Όπως παρατηρείται τις πρώτες 6 ώρες την μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης σημειώθηκε από τα στελέχη F16 με 10.3 g/L και τα F180 και F55 το οποίο στη συνέχεια δεν συνέχισε να αναπτύσσεται και να καταναλώνει σάκχαρο με κατανάλωση 9.4 g/L. Στις 24 ώρες βλέπουμε πως με εξαίρεση το F55 όλα τα υπόλοιπα στελέχη έχουν καταναλώσει το μεγαλύτερο ποσοστό των σακχάρων, καθώς περιέχονται από 2.8 g/L έως 7.8 g/L γλυκόζης η οποία μέχρι τις 72 ώρες καταναλώθηκε από όλα τα στελέχη εκτός από το F89 και F180 (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Συγκέντρωση γλυκόζης στα υπερκείμενα καλλιέργειας μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.

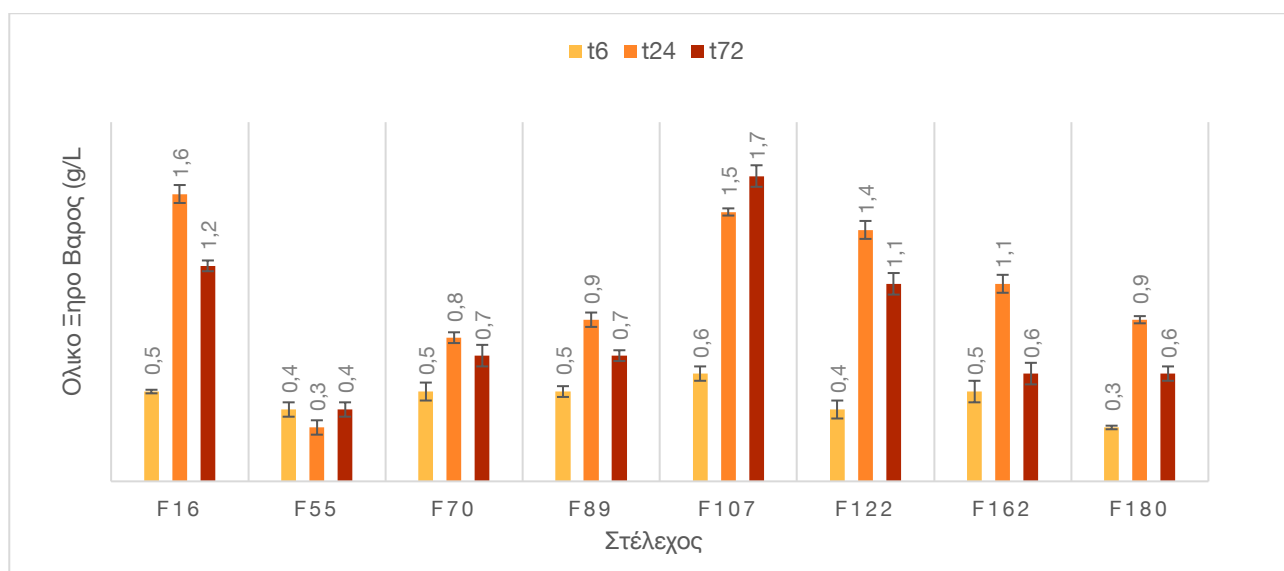
Σχετικά με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, τα στελέχη F16, F107, F122 F162, φανηκί να παράγουν όμοιες συγκεντρώσεις από 13.1-13.5 g/L μετά από 72 ώρες ζύμωσης ενώ τα στελέχη F89 και F180 είχαν και αυτά μεταξύ τους όμοια αποτελέσματα με 10.7 g/L και 10.6 g/L γαλακτικού οξέος. Το στέλεχος με την χαμηλότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος ήταν το F70 με 6.2 g/L ενώ η απουσία γαλακτικού οξέως από τη ζύμωση με το γαλακτικό οξύ για το στέλεχος F55 αποτελεί μια ακόμη ένδειξη πως η ζύμωση δεν προχώρησε. Γραφημα 5.



Γράφημα 5 : Παραγωγή γαλακτικού οξέος στα υπερκείμενα καλλιέργειας μετά από 6,24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης

4.3.2 Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες

Το Γράφημα 6, δείχνει την παραγωγή βιομάζας μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό μέσο M2. Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό βιομάζας τις πρώτες 6 ώρες το έχει το στέλεχος F107 με 0.6 g/L, ενώ η αυξημένη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε και στις επόμενες με 1.5g/L, και 1,7g/L αντίστοιχα για τις 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις 6 και 72 ώρες ζύμωσης, παρόλα αυτά στις 24 ώρες τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από το στέλεχος F16 με 1.6 g/L, εντάσσοντας το στέλεχος στα 3 καλύτερα αναφορικά με την παραγωγή βιομάζας μαζί με το F107 και F122., Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας σε ορισμένες περιπτώσεις σχετίζεται με την υψηλότερη κατανάλωση γλυκόζης. Βλέπουμε πως σε $t = 24$ το μεγαλύτερο ποσοστό βιομάζας την έχουν τα στελέχη F16 F107 και F122 με 1.6 g/L, 1,5 g/L και 1.4 g/L αντίστοιχα. Τα στελέχη αυτά στις 72 ώρες είχαν καταναλώσει πλήρως τη γλυκόζη του υποστρώματος. Παρόλα αυτά η κατανάλωση της γλυκόζης δεν φαίνεται να συνάδει με την παραγωγή βιομάζας καθώς στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 72 ώρες φάνηκε πως για τα περισσότερα στελέχη η παραγωγή της βιομάζας μειώθηκε πιθανώς λόγω αύξησης γαλακτικού οξέος και απουσίας θρεπτικών συστατικών. Σε όλες τις περιπτώσεις σχετικά με τη διάρκεια της ζύμωσης φαίνεται ότι τις πρώτες 6 ώρες έχει παραχθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της τελικής συγκέντρωσης (Gudina et.al, 2011; Klotz et al., 2017)



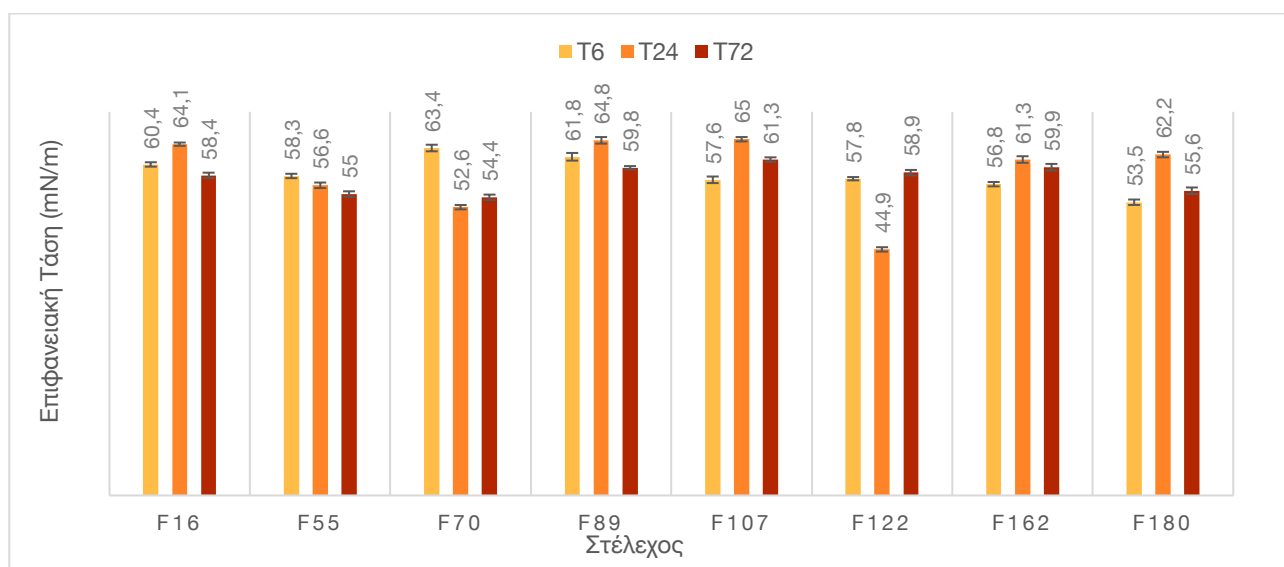
Γράφημα 6: Ολικό ξηρό βάρος (TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης ως θρεπτικό υπόστρωμα

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

Ακολουθεί η μέτρηση της επιφανειακής τάσης για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα επιλεγμένα στελέχη, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα το συνθετικό μέσο M2. Ο έλεγχος για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών προσδιορίστηκε με μέτρηση της επιφανειακής τάσης στο υπερκείμενο υγρό. Αντίστοιχα, για τις συνδεδεμένες με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, που είναι πάνω στα βακτηριακά κύτταρα, προσδιορίστηκε με μέτρηση της επιφανειακής τάσης, κατόπιν εκχύλισης που πραγματοποιήθηκε για την παραλαβή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

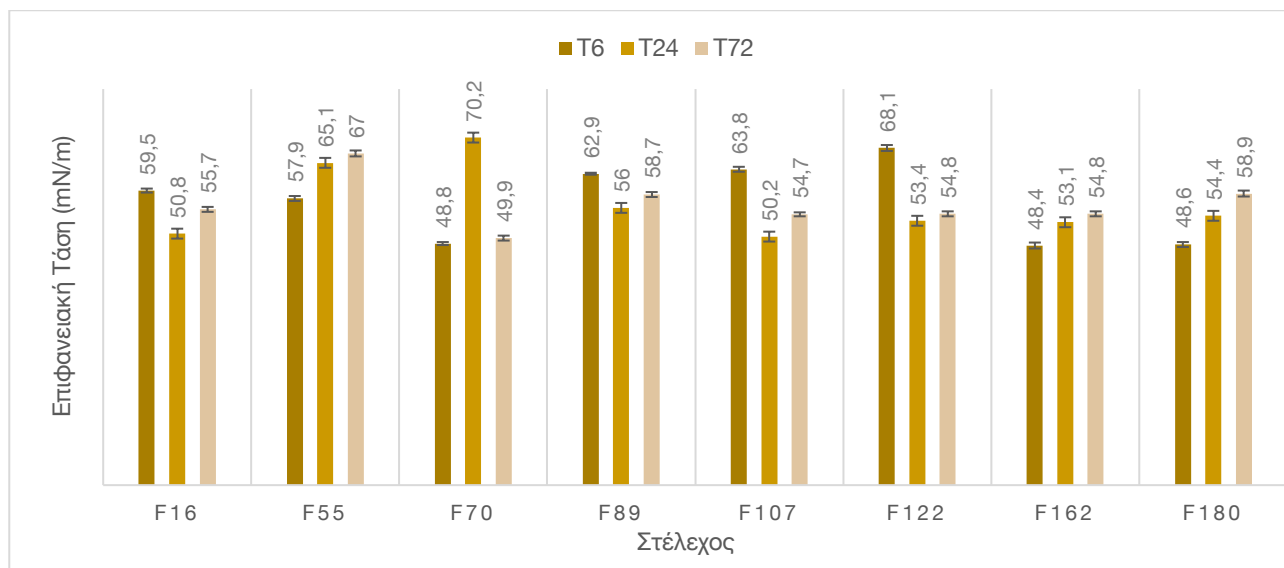
Όπως φαίνεται στο Γράφημα 7, η μέτρηση της επιφανειακής τάσης διαφοροποιείται στις διαφορετικές στιγμές της ζύμωσης. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης στο υπερκείμενο της ζύμωσης αποτελεί μια προταρχική διαδικασία για την ικανότητα των στελεχών να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Αναφορικά με το υπερκείμενο της ζύμωσης η επιφανειακή τάση από την έναρξη της ζύμωσης είναι χαμηλότερη από 65 mN/m λόγω της ύπαρξης φιαφόρων συστατικών στο υπόστρωμα. Παρόλα αυτά η περεταίρω μείωση στην επιφανειακή τάση είναι ενδεικτικής της ύπαρξης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης περισσότερο από 8 mN/m, τα περισσότερα από τα στελέχη φάνηκε πως δύνανται να

παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε κάποια στιγμή της ζύμωσης. Αυτή η διαφοροποίηση ενδέχεται να συνδέεται με το ρόλο της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα κύτταρα. Στις πρώτες 6 ώρες παρατηρούμε πως δεν είχαμε μεγάλη πτώση επιφανειακής τάσης. Το στέλεχος F180 εμφάνισε τη μεγαλύτερη πτώση στα 53,5 mN/m. Η χαμηλότερη τιμή στην επιφανειακή τάση παρουσιάστηκε από το στέλεχος F122 στις 24 ώρες ζύμωσης με 44,9 mN/m. Το στέλεχος F70 φάνηκε πως δύναται να παράξει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, εμφανίζοντας τα καλύτερα αποτελέσματα μειώνοντας την επιφανειακή τάση από τα 63.4 mN/m που ήταν στις 6 ώρες ζύμωσης, στα 52.6 mN/m και 54.4 mN/m στις 24 και 72 ώρες αντίστοιχα.



Γράφημα 7: Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα της ζύμωσης μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα M2

Στο Γράφημα 8 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της επιφανειακής τάσης που πραγματοποιήθηκαν μετά την εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται συνδεδεμένες με το κύτταρο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Αυτές οι μετρήσεις διενεργήθηκαν μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης στο συνθετικό υπόστρωμα M2. Παρατηρείται πως στις πρώτες 6 ώρες υπήρξε παρόμοια μείωση στα στελέχη F162, F180, F70 με τιμές επιφανειακής τάσης 48,4 mN/m, 48,6 mN/m και 48,8 mN/m. Για τα 2 πρώτα στελέχη μάλιστα παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση στην επιφανειακή τάση η οποία στις 72 ώρες έφτασε τα 54.8 mN/m και 58.9 mN/m αντίστοιχα. Για το στέλεχος F70 παρατηρήθηκε αύξηση της επιφανειακής τάσης στις 24 ώρες ζύμωσης η οποία και πάλι μειώθηκε στις 72 ώρες, ενώ ενδιαφέρον προκύπτει και από το στέλεχος F122 το οποίο προκάλεσε μείωση στα 53,4 και 54.8 mN/m. Τέλος στις πρώτες 6 ώρες μείωση παρατηρήθηκε και από το στέλεχος F55 στα 57.9 mN/m η οποία στη συνέχεια έφτασε στα 67 mN/m, το οποίο συνάδει με την έως τώρα πορεία τη ζύμωσης και ενδέχεται να παραπέμπει στην προσπάθεια του στελέχους να παράξει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες για να μπορέσει να προσλάβει θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος.

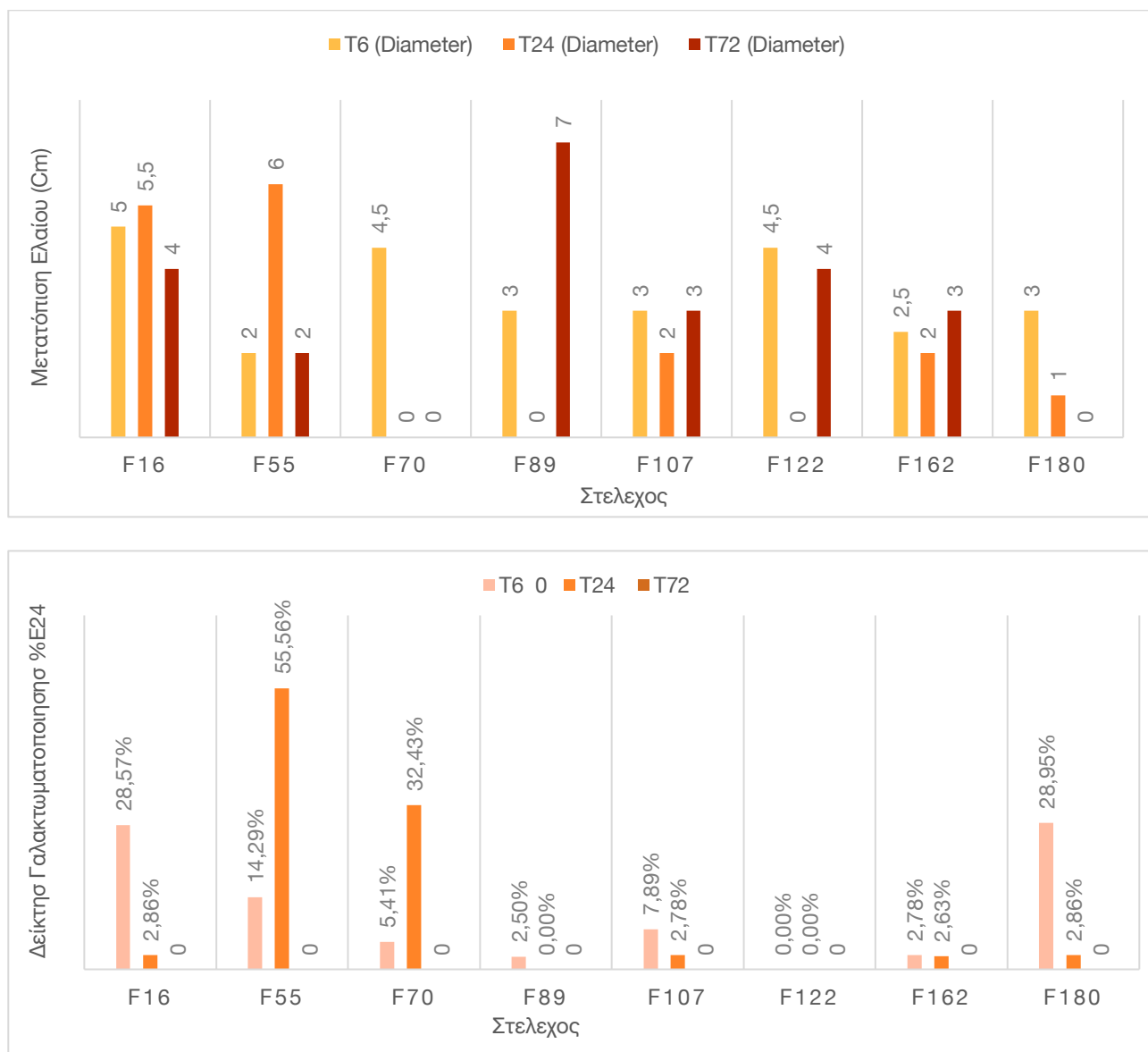


Γράφημα 8 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα κυτταρων στις 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα M2.

4.3.4 Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα

Η μέθοδος της μετατόπισης ελαίου είναι μια ακόμα τεχνική που χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Παρόλα αυτά, αυτή η μέθοδος μόνη της δεν μπορεί να δώσει ακριβή απάντηση στο ερώτημα αν ένα στέλεχος μπορεί να παράγει τις επιθυμητές βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε επαρκή ποσότητα. Το Γράφημα 9 παρουσιάζει τη μέτρηση της μετατόπισης ελαίου από τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται εκτός των κυττάρων, στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης, κατά τις 6, 24 και 72 ώρες. Για τις πρώτες 6 ώρες βλέπουμε πως τη μεγαλύτερη μετατόπιση ελαίου την είχε το στέλεχος F16 με διάμετρο 5 εκατοστά. Επίσης βλέπουμε πως τα στελέχη F70, F162 εμφανίζουν ίδια μετατόπιση 2,5 εκατοστών. Στις 24 ώρες που λάβαμε τις επόμενες μετρήσεις παρατηρούμε πως δεν υπήρξε καμία μετατόπιση στα στελέχη F70, F89 και F122 . Στις 72 ώρες το στέλεχος F89 εμφάνισε την μεγαλύτερη μετατόπιση που λάβαμε με 7 εκατοστά ενώ τα στελέχη F70, F180 εμφάνισαν μηδέν εκατοστά. Ακόμη, θεωρήθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που δημιουργούν γαλακτώματα καθώς είναι πιθανό οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, λόγω της δομής τους, να δημιουργούν γαλακτώματα και να μη μειώνουν απαραίτητα την επιφανειακή τάση (Rosenberg et al.,1999). Στην προκειμένη περίπτωση, τα καλύτερα αποτελέσματα προήλθαν από τα στελέχη F16, F55, F70 και F180

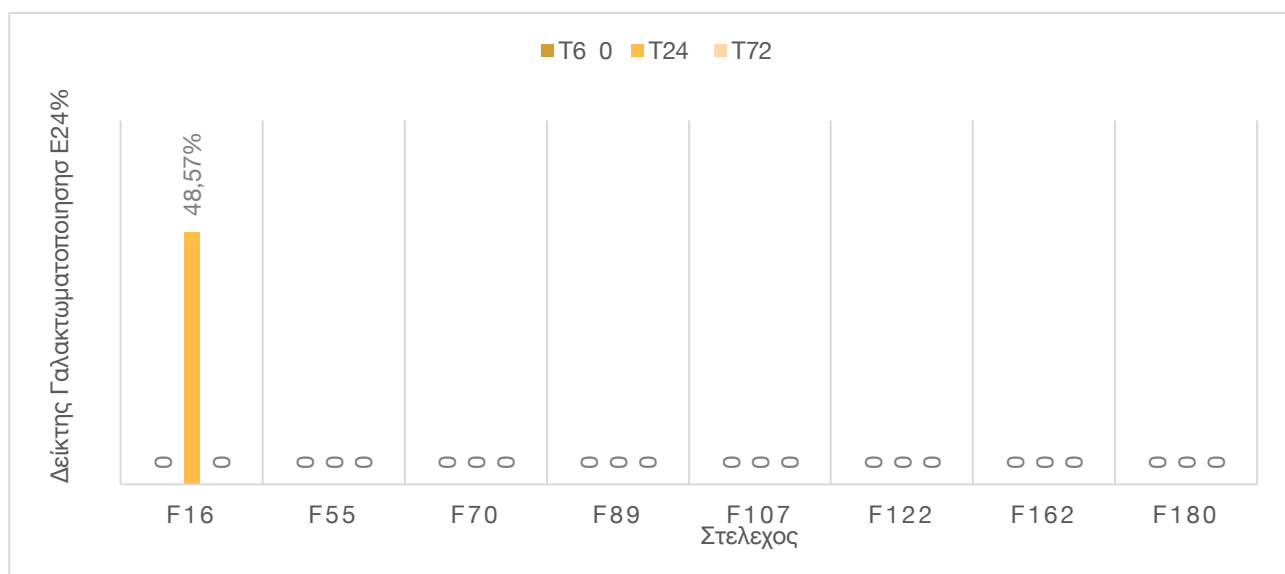
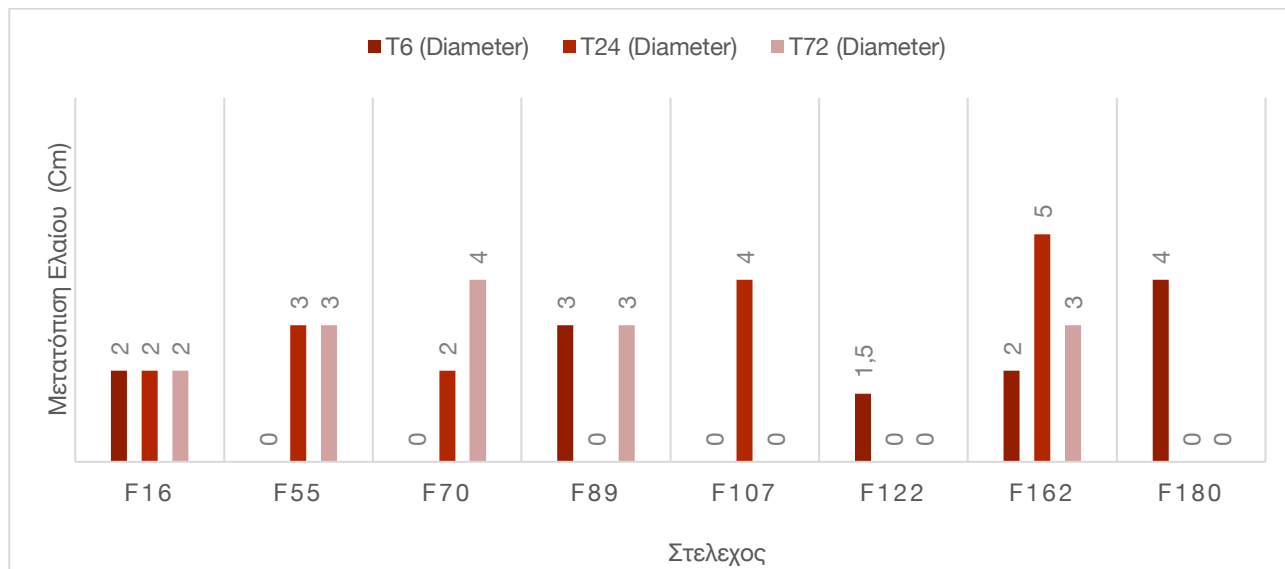
με το δείκτη γαλακτωματοποίησης να είναι 28%, 54%, 32% και 28% αντίστοιχα για κάθε στέλεχος σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης.



Γραφήμα 9:Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω), στα υπερκείμενα της ζύμωσης μετά από 6, 24 και 72 ώρες σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης M2.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες αναλύσεις και για τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών που είναι συνδεδεμένες με τα κύτταρα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Όπως φαίνεται στα γραφήματα και πάλι η μετατόπιση ελαίου διαφοροποιείται σε κάθε χρόνο της ζύμωσης για το κάθε στέλεχος παρόλα αυτά η μετατόπιση της σταγόνας λαδιού που προκαλούν τα δείγματα είναι ενδεικτική και στις περισσότερες περιπτώσεις επιβεβαιώνει την ύπαρξη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα δείγματα. Αναφορικά, με τη δημιουργία γαλακτωμάτων (δεξιά), δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο στέλεχος που να παράγει

βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, οι οποίες να είναι συνδεδεμένες με το κύτταρο και να μπορούν να δημιουργούν γαλακτώματα. Μονιαδική εξαίρεση οι βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν στις 24 ώρες ζύμωσης και παρουσίασαν δείκτη γαλακτωματοποίησης 49%.



Γράφημα 10: Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω) στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα M2

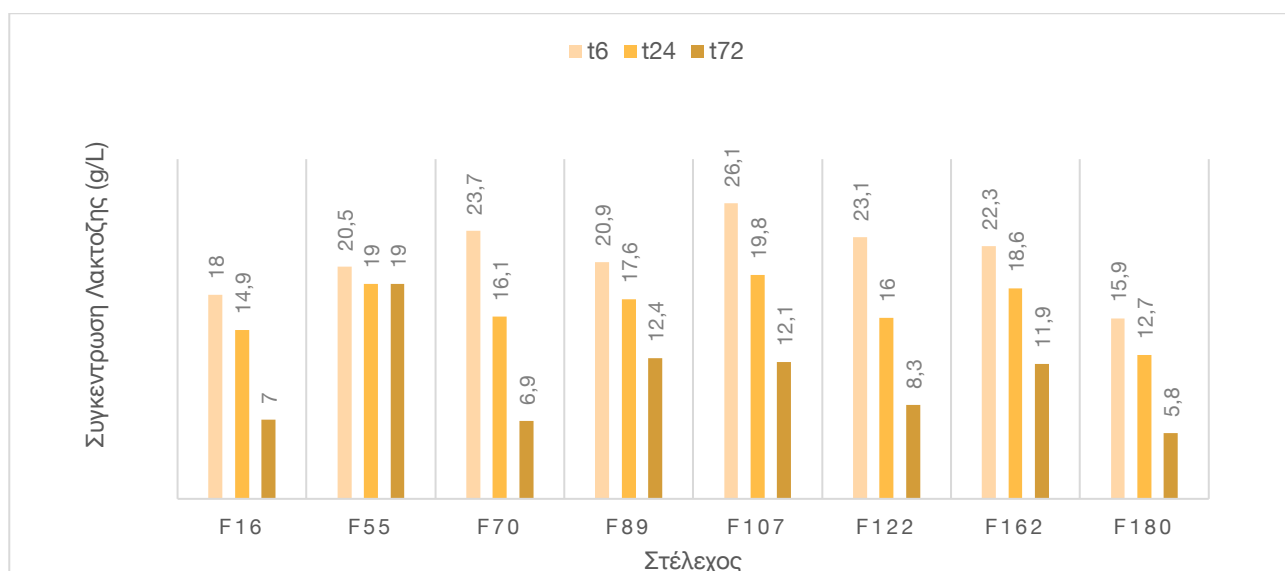
4.4 Μελέτη γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος. Το τυρόγαλα χρησιμοποιήθηκε για δύο βασικούς λόγους. Αρχικά, για να αξιοποιηθεί η λακτόζη που περιέχει ως θρεπτικό υλικό. Ταυτόχρονα, το τυρόγαλα αξιολογήθηκε ως μια οικονομική πρώτη ύλη για μικροβιακές ζυμώσεις. Η διαδικασία αυτή είχε δύο κύριους στόχους. Από τη μια πλευρά, είχε σκοπό να μειώσει το κόστος παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και από την άλλη, να αξιοποιήσει αποτελεσματικότερα τα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων στο πλαίσιο της βιο-οικονομίας ώστε να μην επιβαρύνουν το περιβάλλον μετά την απόρριψή τους.

Στο τυρόγαλα όπως πραγματοποιήθηκε και στο M2, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την κατανάλωση λακτόζης και την παραγωγή βιομάζας και γαλακτικού οξέος μετά από 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της επιφανειακής τάσης και της μετατόπισης ελαίου για να ελεγχθεί η παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο υπερκείμενο της ζύμωσης, χρησιμοποιώντας τόσο τον χρόνο των 6, 24 και 72 ωρών για την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών. Επιπλέον, μετρήθηκαν επίσης οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται συνδεδεμένες στα βακτηριακά κύτταρα, με ανάλυση των εκχυλισμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

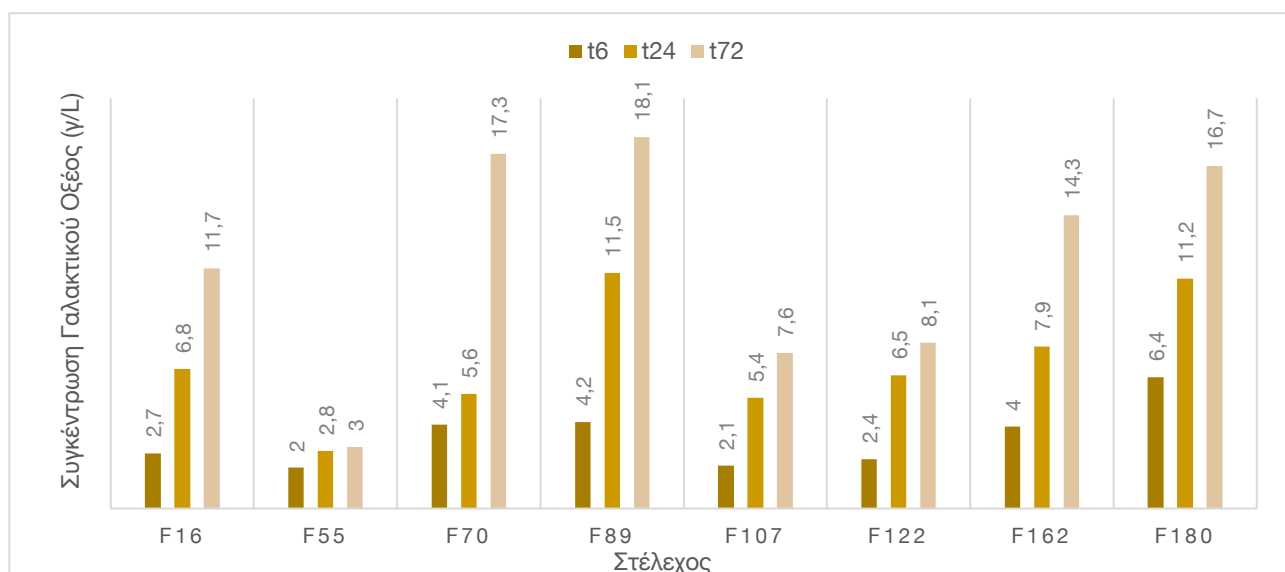
4.4.1 Κατανάλωση λακτόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε υπόστρωμα τυρογάλακτος

Από το Γράφημα 11 προκύπτει ότι στο σύνολό τους τα στελέχη κατανάλωσαν σε μικρότερο βαθμό τη λακτόζη συγκριτικά με τη γλυκόζη. Η παρατήρηση αυτή ενδέχεται να συνδέεται με την ύπαρξη επιπλέον οργανικού αζώτου στο συνθετικό υπόστρωμα το οποίο συνάδει και με την αύξηση της βιομάζας. Τα στελέχη με την καλύτερη κατανάλωση λακτόζης φάνηκε να είναι τα F16, F70 και F180 καθώς στο τέλος της ζύμωσης είχε παραμείνει η μικρότερη ποσότητα λακτόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη (7, 6.9 και 5.8 g/L αντίστοιχα), ενώ στα υπόλοιπα στελέχη η τελική συγκέντρωση της λακτόζης που δεν καταναλώθηκε ήταν από 8,3 έως 12.4 g/L. Ακόμη, βλέπουμε πως και στην περίπτωση της λακτόζης του τυρογάλακτος το στέλεχος F55 δεν κατανάλωσε τη λακτόζη σε διάστημα 72 ωρών.



Γράφημα 11 : Κατανάλωσης λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια σε 6, 24, 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

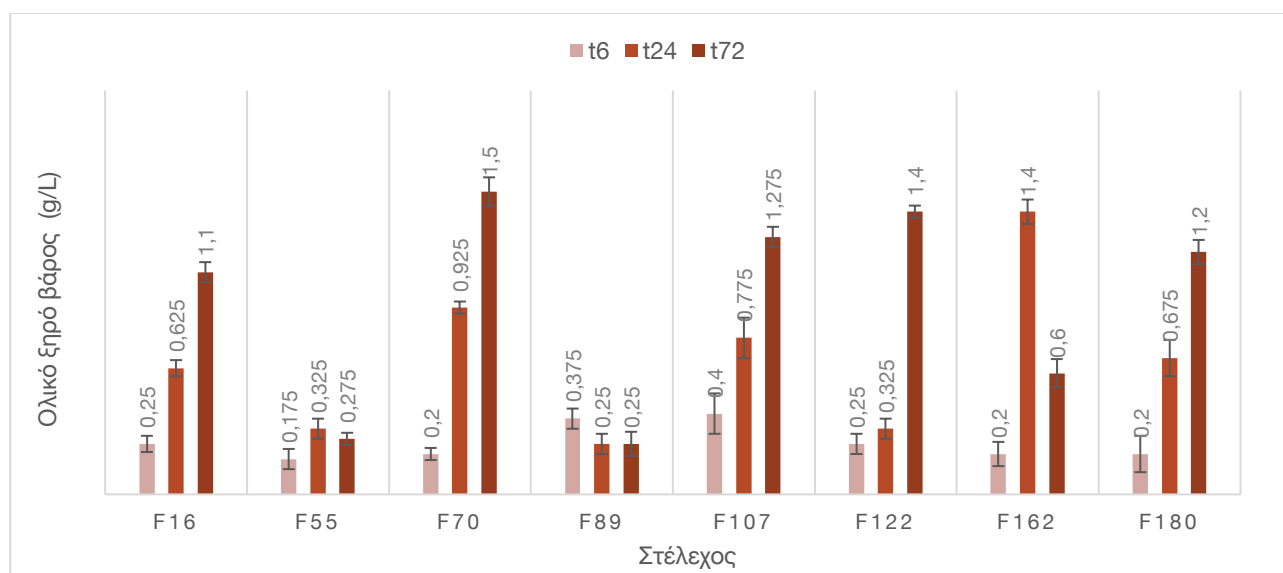
Αναφορικά με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, Τα στελέχη F89 και F180 εμφάνισαν παρόμοια παραγωγή γαλακτικού οξέος που ανέρχεται στα 11,5 g/L και 11,2 g/L αντίστοιχα. Έπειτα πήραμε αποτελέσματα από την HPLC στις 72 ώρες. Παρατηρούμε πως την παραγωγή γαλακτικού οξέος την είχε το στέλεχος F89, με παραγωγή γαλακτικού οξέος στα 18,1 g/L. Επιπλέον το στέλεχος F70 παρήγαγε γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 17,3 g/L και βλέπουμε πως το στέλεχος F122 έχει στην χρονική στιγμή 72 ωρών έχει παράξει 8,1 g/L όπου μαζί με το στέλεχος F107 που παρήγαγε 7.6 g/L είχαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε γαλακτικό οξύ στο τέλος της ζύμωσης Γράφημα 12.



Γράφημα 12 : Παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια σε 6, 24, 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος

4.4.2 Παράγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες

Το 16^ο γράφημα αφορά την παραγωγή βιομάζας σε 6, 24, 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος. Στις πρώτες έξι ώρες βλέπουμε μικρή ανάπτυξη βιομάζας. Συγκρίνοντας τη βιομάζα που λάβαμε στις 6 ώρες ζήμωσης με θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης εδώ βλέπουμε πολύ μικρότερη παραγωγή στη ζύμωση με το τυρόγαλα. Στις πρώτες 6 ώρες την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας την λαμβάνουμε από το στέλεχος F89 με 0,375 g/L. Στην συνέχεια της ζύμωσης στη χρονική στιγμή 24 ωρών βλέπουμε το F162 να έχει παράξει 1,4 g/L και αμέσως μετά και το στέλεχος F70 0,925 g/L. Στις 72 ώρες που πήραμε το τελευταίο δείγμα το στέλεχος που εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή βιομάζας ήτα το F107 με 1,2 g/L.



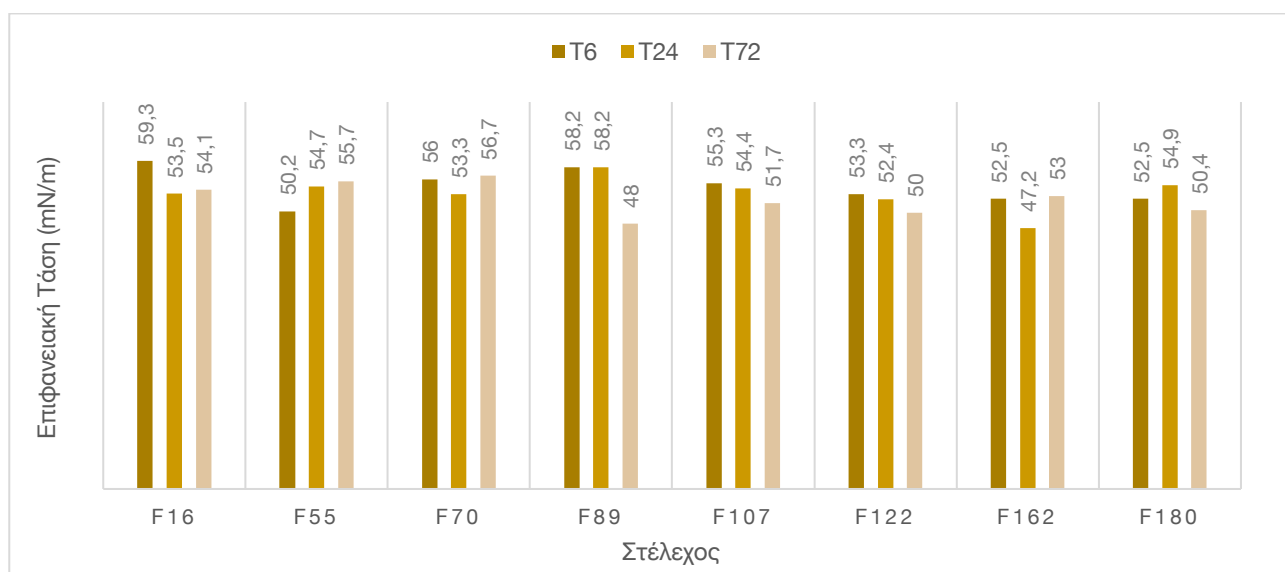
Γράφημα 13: Ολικό ξηρό βάρος (TDW) μετά από 6, 24 και 72 ώρες θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

4.4.3 Αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μέσω της μέτρησης της επιφανειακής τάσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Στη συνέχεια, διερευνάται η μέτρηση της επιφανειακής τάσης και αξιολογείται η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών χρησιμοποιώντας ορό γάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα. Όπως και στο μέσο M2, οι εξωκυτταρικά παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές μετρήθηκαν στο υπερκείμενο ζύμωσης και οι βιοεπιφανειοδραστικές που είναι συνδεδεμένες στη βιομάζα, μετρήθηκαν στο κχύλισμα PBS που προέκυψε από τη διαδικασία της εκχύλισης.

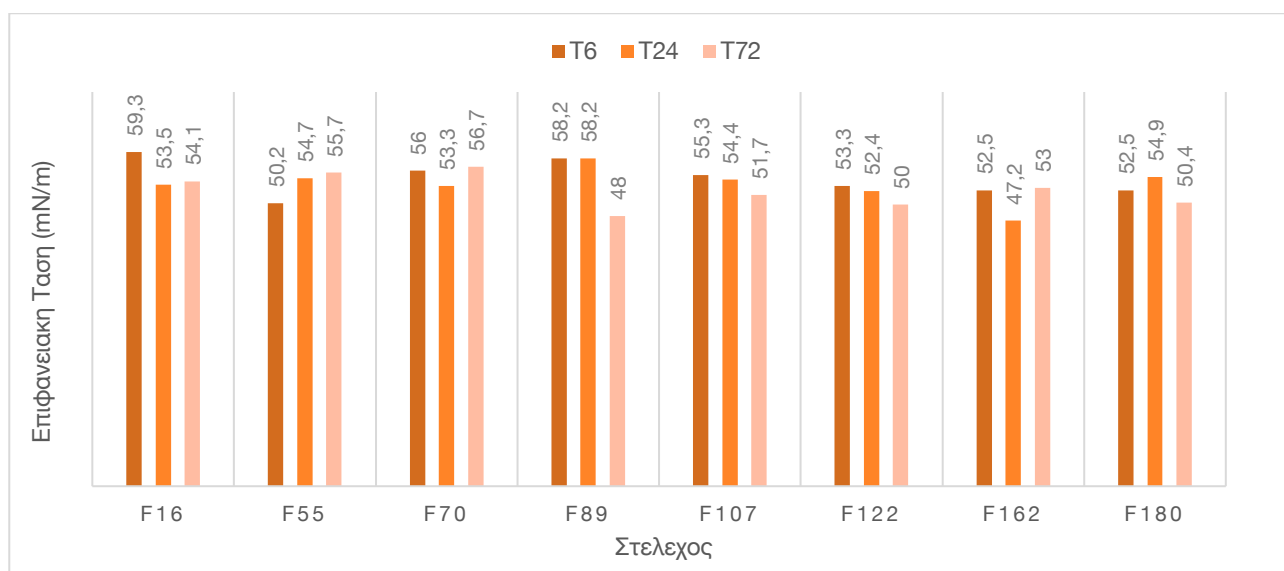
Στο Γραφημα 14, εμφανίζεται η μέτρηση της επιφανειακής τάσης του εξωκυτταρικά παραγόμενου βιοεπιφανειοδραστικού στο υπερκείμενο ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση, την επιφανειακή τάση στο υπερκείμενο μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης.

Στις πρώτες 6 ώρες το εύρος τιμών επιφανειακής τάσης κυμαίνεται από 50,2 mN/m που είναι η χαμηλότερη τιμή που λάβαμε από το στέλεχος F55 έως 59,3 mN/m από το στέλεχος F16. Στις 24 ώρες δεν παρατηρούμε κάποια εντυπωσιακή μείωση επιφανειακής τάσης. Την χαμηλότερη τιμή τη λάβαμε από το στέλεχος F162 με τιμή 47,2 mN/m στις 24 ώρες ζύμωσης. Τα υπόλοιπα στελέχη είχαν μία πολύ μικρή μείωση της επιφανειακής τάσης. Στις 72 ώρες παρατηρούμε πως η επιφανειακή τάση του στελέχους F162 έχει αυξηθεί στο 53 mN/m., όπως και στο στέλεχος F70 που έφτασε στα 56,7 mN/m. Το στέλεχος F89 εμφάνισε την χαμηλότερη επιφανειακή τάση σε αυτή τη χρονική στιγμή με ST = 48 mN/m.



Γράφημα 14 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα υπερκείμενα της ζύμωσης στις 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Μία ακόμη μελέτη της βιβλιογραφίας υποδηλώνει το θεμελιώδη ρόλο της συμπερίληψης του τυρογάλακτος ως υπόστρωμα ζύμωσης (CWP) για τη παραγωγή βιοεπιφανειακών από *Lactobacilli*. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η επιφανειακή τάση είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος στη σύνθεση βιοεπιφανιοδραστικών ουσιών . (V. Kachrimanidou 2021). Οι βιοεπιφανιοδραστικές ουσίες βοηθούν στη μείωση της επιφανειακής τάσης και της διεπιφανειακής τάσης δύο μη αναμίξιμων διαλυμάτων (Sharma et al. 2015).



Γράφημα 15 : Μέτρηση της επιφανειακής τάσης στα εκχυλίσματα rbs στις 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

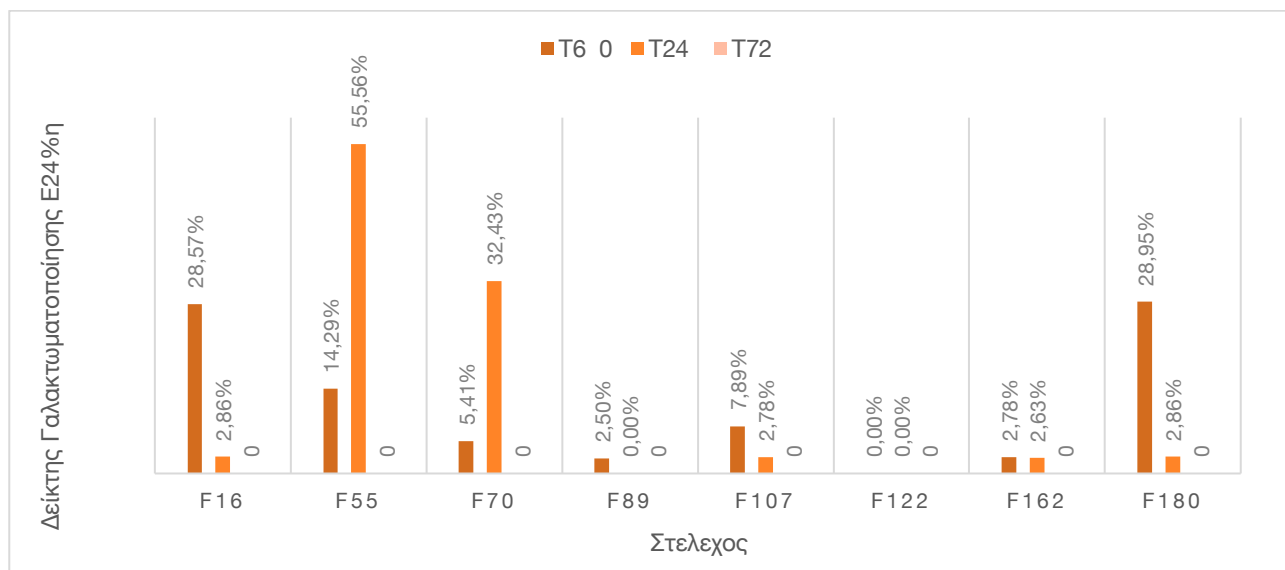
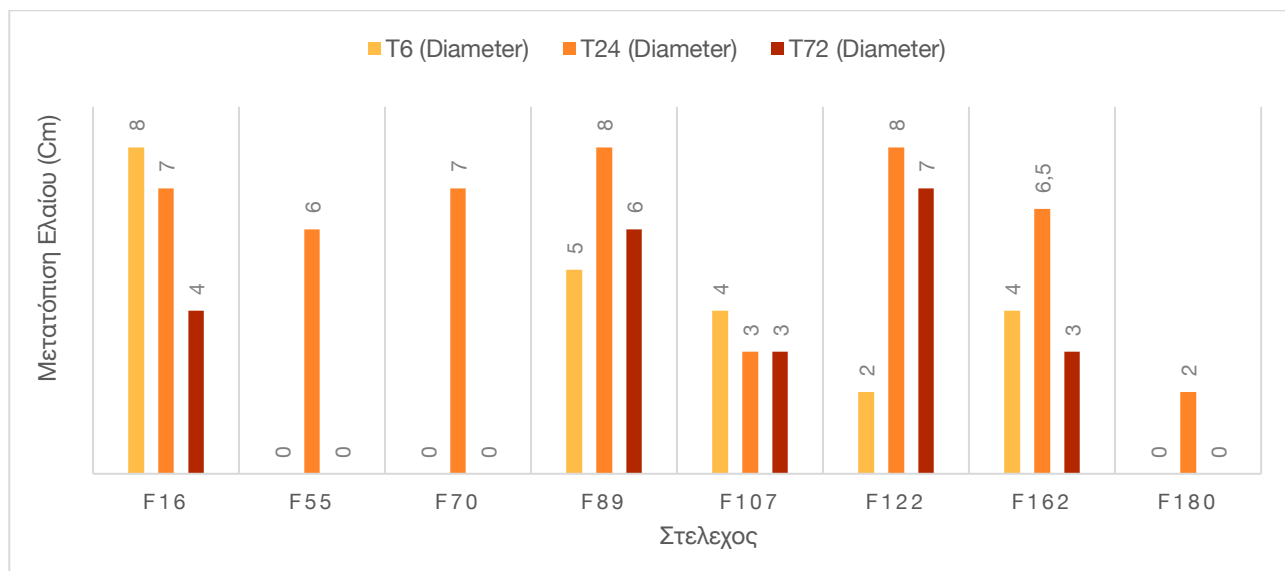
Το παραπάνω σχήμα παρουσιάζει τις μετρήσεις επιφανειακής τάσης των βιοεπιφανειοδραστικών που λαμβάνονται με εκχύλιση κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα άλατος PBS μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Η μεγαλύτερη μείωση που εμφανίζεται στις πρώτες 6 ώρες είναι από το στέλεχος F55 με τιμή 50.2 mN/m και αμέσως μετά είναι τα στελέχη F162 και F180 με ST = 52,5 mN/m. Στη συνέχεια η επόμενη μέτρηση που λάβαμε ήταν στις 24 ώρες ζύμωσης. Στις 24 ώρες ζύμωσης με θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος είδαμε μείωση της επιφανειακής τάσης από το στέλεχος F162 στα 47.2 mN/m . ακόμα τα στελέχη F122, F162 μείωσα πολύ την επιφανειακή τάση και λάβαμε μετρήσεις 39,93 mN/m και 39,08 mN/m αντίστοιχα. Στην επόμενη μέτρηση που λάβαμε παρατηρήσαμε πως όλα τα στελέχη είχαν μεγαλύτερη τιμή επιφανειακής τάσης από ότι στις 24 ώρες . Τη χαμηλότερη τιμή εμφάνισε το στέλεχος F16 με τιμή 50 mN/m. Αντιθέτως το στέλεχος F55 σημείωσε αύξηση επιφανειακής τάσης με τιμή 55,7 mN/m.

4.4.4 Μετατόπιση ελαίου (oil displacement test) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα υπερκείμενα και στα εκχυλίσματα PBS σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα

Το Γράφημα 16 δείχνει τη μετατόπιση του ελαίου από εξωκυτταρικά παραγόμενο βιοεπιφανειοδραστικό στο υπερκείμενο ζύμωσης μετά από φυγοκέντρηση και μετά από 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης. Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε πως τα στελέχη F55, F70, F180 εμφάνισαν μετατόπιση ελαίου μόνο στις 24 ώρες με τιμές 6 εκατοστά, 7 εκατοστά και διάμετρο 2 εκατοστών αντίστοιχα.στις 6 και στις 72 ώρες τα στελέχη αυτά δεν εμφάνισαν καθόλου μετατόπιση. Βλέπουμε πως το στέλεχος F16 εμφάνισε διάμετρο μετατόπισης 8 εκατοστών στις πρώτες 6 ώρες αλλά σταδιακά στις 6 και 72 ώρες η μετατόπιση μειώνεται. Αυτό σημαίνει πως σταδιακά η λειτουργία των επιφανειοδραστικών καταστρέφεται. Στις 24 ώρες ζύμωσης την μεγαλύτερη διάμετρο την

λαμβάνουμε από τα στελέχη F89 και F122 που είναι ίση με 8 εκατοστά. Ενώ στις 72 ώρες ζύμωσης η υψηλότερη μέτρηση που λάβαμε ήταν από το στέλεχος F122 με τιμή 7 εκατοστών.

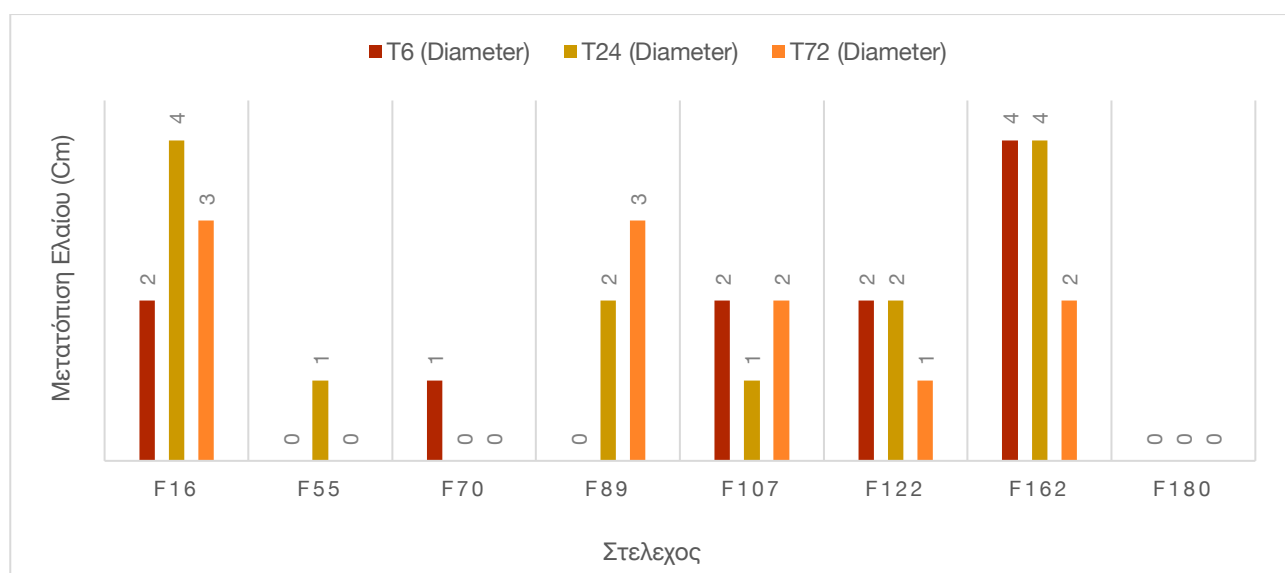
Αναφορικά με τα στελέχη και την γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα παρουσιάζεται πως στις 72 ώρες κανένα από τα 8 δεν εμφάνισε κάποιο γαλάκτωμα. Στις πρώτες 6 ώρες της ζύμωσης παρόμοια γαλακτώματα εμφάνισαν τα στελέχη F16, F180 με τιμές 0,285% και 28.9% αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα στελέχη παρουσίασαν πολύ μικρή έως και μηδαμινή εμφάνιση γαλακτώματος. Στις 24 ώρες ζύμωσης που λάβαμε το επόμενο δείγμα την υψηλότερη τιμή δημιουργίας γαλακτώματος την λάβαμε από το F55 με 55% και αμέσως μετά από το στέλεχος F70 με 32%. Τα στελέχη F16, F107, F162, F180 εμφάνισαν ένα πολύ μικρό γαλάκτωμα στις 24 ώρες ζύμωσης, ενώ τα F89 και F122 εμφάνισαν μηδενική γαλακτωματοποιητική ικανότητα.

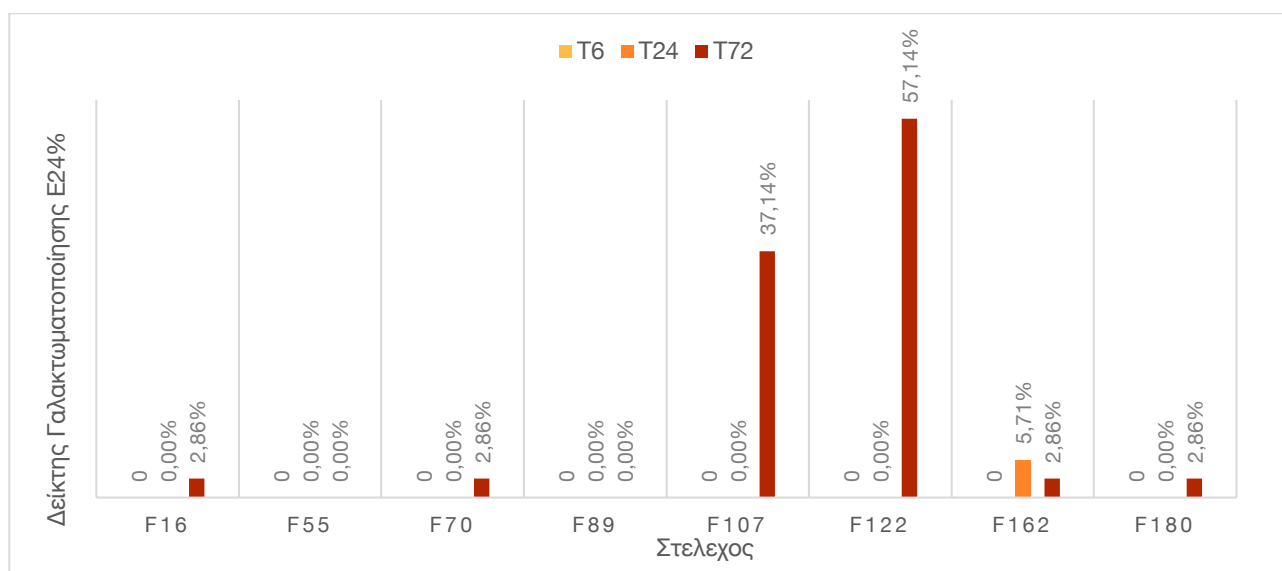


Γράφημα 16 : Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (κάτω) στα υπερκείμενα σε 6, 24 και 72 ώρες σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Τα δεδομένα στο Γραφημα 17 μας δείχνουν πως το στέλεχος F180 σε καμία χρονική στιγμή δεν εμφάνισε καμία μετατόπιση ελαίου. Τα στελέχη F55, F70 εμφάνισαν το καθένα μόνο σε μία χρονική στιγμή. Το F55 μόνο στις 24 ώρες με διάμετρο 1 εκατοστό και το F70 μόνο στις 6 ώρες με διάμετρο 1 εκατοστό. Στις πρώτες 6 ώρες η μεγαλύτερη μετατόπιση εμφανίστηκε από το στέλεχος F162 με τιμή 4 εκατοστά που και στις 24 ώρες ζύμωσης λάβαμε την ίδια μέτρηση διαμέτρου. Το στέλεχος F89 στις 6 ώρες εμφάνισε μηδενική μετατόπιση ενώ με την πάροδο του χρόνου αυξανόταν. Στις 24 ώρες λάβαμε διάμετρο 2 εκατοστών και στις 72 ώρες λάβαμε διάμετρο 3 εκατοστών. Αν συγκρίνουμε το 23^ο διάγραμμα με το 24^ο θα παρατηρήσουμε πως στις μετρήσεις στα υπερκείμενα της ζύμωσης σε 6, 24 και 72 ώρες λάβαμε μεγαλύτερες μετατοπίσεις από ότι στις μετρήσεις από ότι στα εκχυλίσματα rbs στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

Παρατηρούμε πως τα γαλακτώματα που δημιουργήθηκαν από εκχύλισμα rbs συγκριτικά με αυτά που λάβαμε από τις μετρήσεις του προηγούμενου γραφήματος ήταν πολύ λιγότερα. Όλες οι μετρήσεις που λάβαμε από όλα τα στελέχη στις πρώτες 6 ώρες ήταν μηδενικές. Στη συνέχεια στις 24 ώρες το μοναδικό γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε ήταν από το στέλεχος F162 0,05%. Τέλος στις 72 ώρες το στέλεχος F122 εμφάνισε τη μεγαλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα με 0,571% και αμέσως μετά το στέλεχος F107 με τιμή 0,371%. Για ακόμη μια φορά τα υπόλοιπα στελέχη εμφάνισαν πολύ μικρή έως και μηδενική πιθανότητα γαλακτώματος και στις 72 ώρες ζύμωσης.





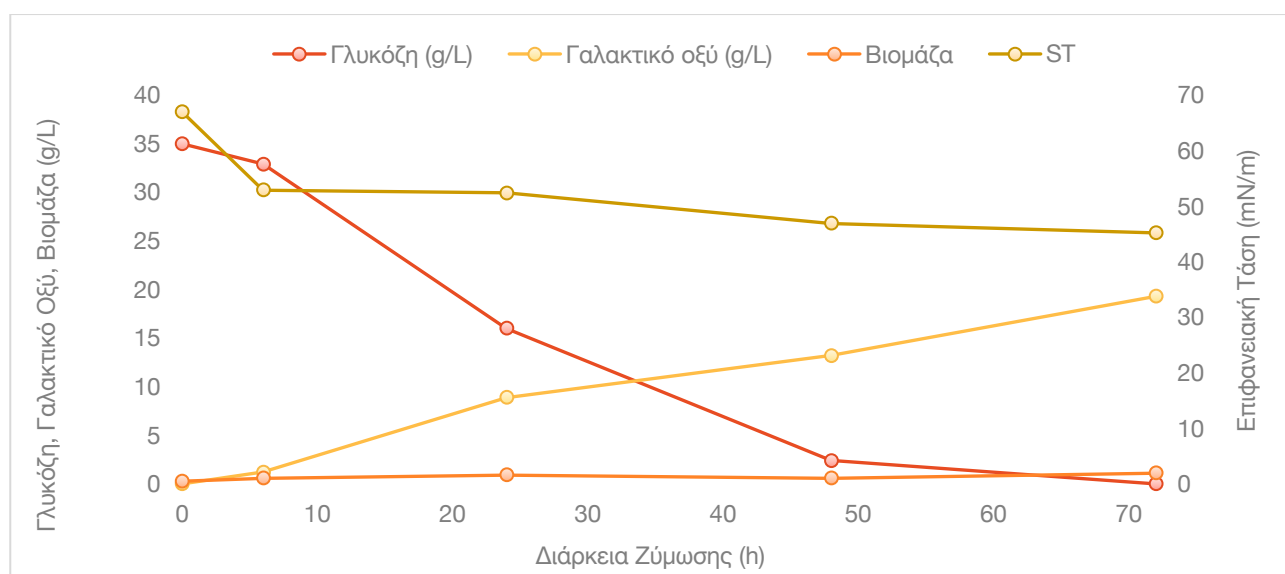
Γράφημα 17: Μετατόπιση ελαίου (επάνω) και μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης στα εκχυλίσματα rbs σε 6, 24 και 72 ώρες ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Παρατηρούμε πως τα γαλακτώματα που δημιουργήθηκαν από εκχύλισμα rbs συγκριτικά με αυτά που λάβαμε από τις μετρήσεις του προηγούμενου γραφήματος ήταν πολύ λιγότερα. Όλες οι μετρήσεις που λάβαμε από όλα τα στελέχη στις πρώτες 6 ώρες ήταν μηδενικές. Στη συνέχεια στις 24 ώρες το μοναδικό γαλάκτωμα που δημιουργήθηκε ήταν από το στέλεχος F162 0,05%. Τέλος στις 72 ώρες το στέλεχος F122 εμφάνισε τη μεγαλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα με 0,571% και αμέσως μετά το στέλεχος F107 με τιμή 0,371%. Για ακόμη μια φορά τα υπόλοιπα στελέχη εμφάνισαν πολύ μικρή έως και μηδενική πιθανότητα γαλακτώματος και στις 72 ώρες ζύμωσης.

4.5 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος *L. Fermentum* F70

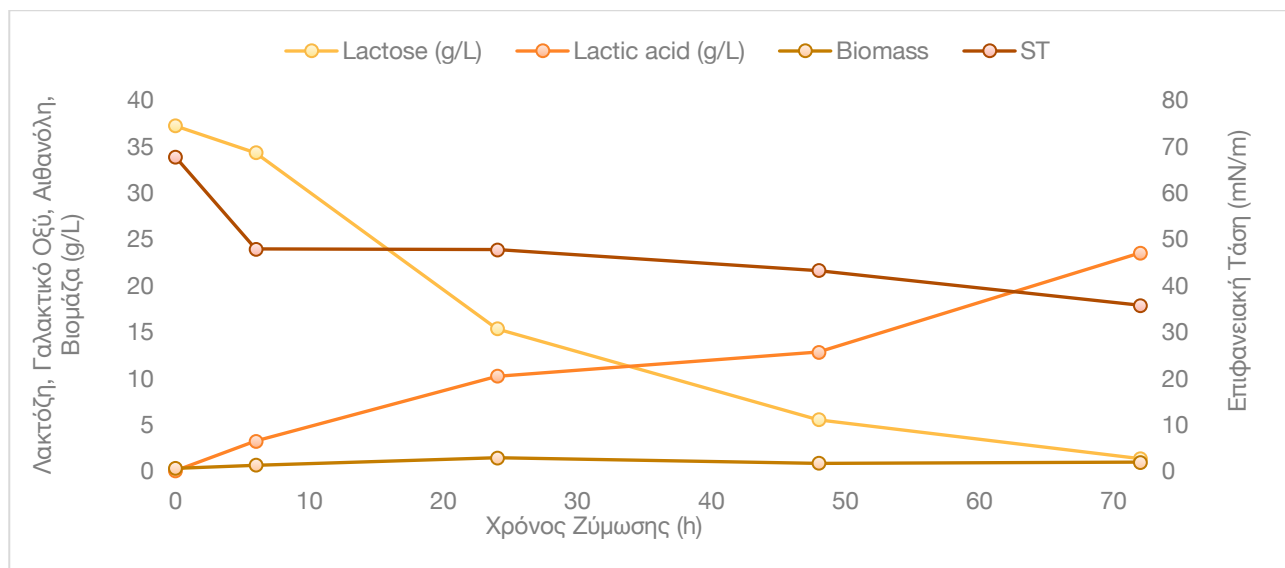
Στη συνέχεια μελετήθηκε το στέλεχος *L. Fermentum* F70 που απομονώθηκε από λευκό τυρί κεφαλονιάς και στη δοκιμή για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που προηγήθηκε απέδωσε ενθαρυντικά αποτελέσματα τόσο ως προς τη μείωση της επιφανειακής τάσης όσο και προς την αξιοποίηση του υποστρώματος του τυρογάλακτος. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης, σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης και σε τυρόγαλο. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 72 ώρες και λάβαμε δείγματα στις χρονικές στιγμές 0, 6, 24, 48 και 72 ώρες. Μετά τη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των συνδεδεμένων με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στα παρακάτω Γραφήματα 18,19,20.

Στο Γράφημα 18 παρουσιάζεται η ζύμωση του στελέχους σε συνθετικό υπόστρωμα με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Βλέπουμε πως υπάρχει σχεδόν πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης στο τέλος της ζύμωσης και η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ξεκινάει περίπου στις 6 ώρες ζύμωσης. Στις 72 ώρες ζύμωσης έχουμε την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ήταν 19,3 g/L. Αναφορικά με τις τιμές της βιομάζας βλέπουμε πως έχουμε στις 72 ώρες 1,1 g/L. Τέλος μετρήσαμε την επιφανειακή τάση στην αρχή της ζύμωσης, στη χρονική στιγμή μηδέν και το αποτέλεσμα ήταν 67 mN/m. Βλέπουμε πως με την πάροδο του χρόνου η επιφανειακή τάση μειώθηκε αισθητά στα 45,2 mN/m που αυτό μας δείχνει την παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

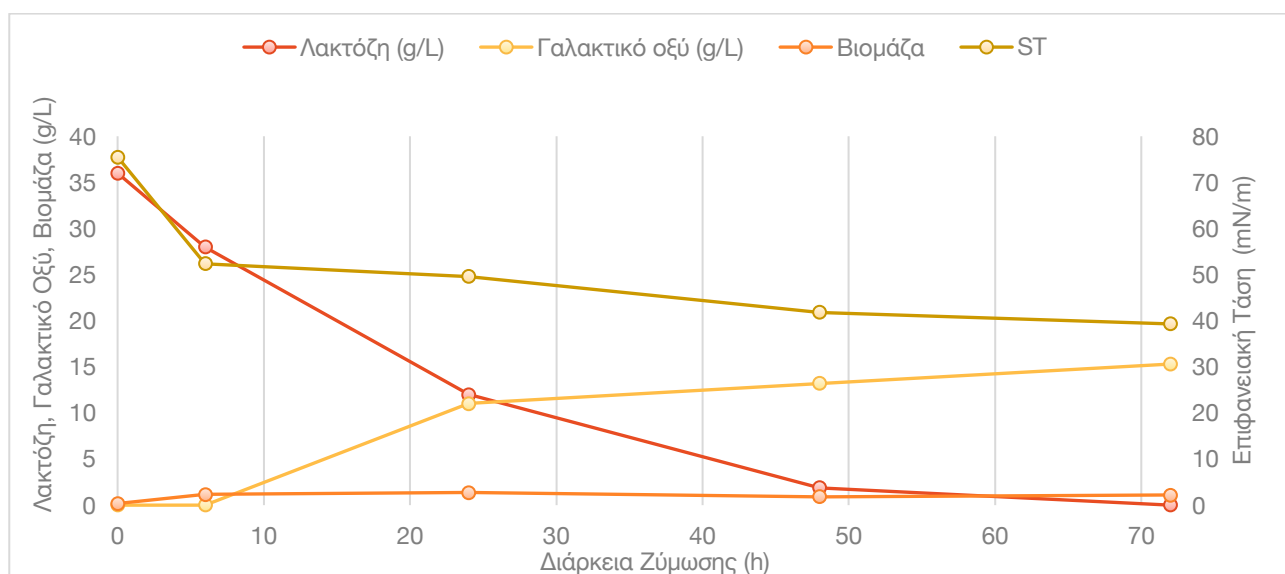


Γράφημα 18 :Κινητική ανάπτυξης του στελέχους *L. Fermentum* F70 σε συνθετικό υπόστρωμα με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα

Στο Γράφημα 19 παρουσιάζεται η ζύμωση του στελέχους F70 *L. Fermentum* σε συνθετικό υπόστρωμα με λακτόζη. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε πλήρη κατανάλωση της λακτόζης και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ανέρχεται στα 23,5 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης. Η παραγωγή της βιομάζας είναι χαμηλότερη από ότι στο προηγούμενο υπόστρωμα και η τιμή της στις 72 ώρες ζύμωση είναι 0,925 g/L. Τέλος η μέτρηση της επιφανειακής τάσης στις 72 ώρες ήταν 35,2 mN/m μία τιμή ακόμα πιο χαμηλή και από την μέτρηση που λάβαμε από το υπόστρωμα της γλυκόζης.



Γράφημα 19: Κινητική ανάπτυξης του στελέχους *L. Fermentum* F70 σε συνθετικό υπόστρωμα με λακτόζη ως πηγή άνθρακα



Γράφημα 20: Κινητική ανάπτυξης του στελέχους *L. Fermentum* F70 σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος.

Τέλος πραγματοποιήθηκε ζύμωση του στελέχους F70 *L. Fermentum* σε θρεπτικό υπόστρωμα τυρογάλακτος. Παρατηρούμε αντίστοιχη κατανάλωση της λακτόζης του τυρογάλακτος με την κατανάλωση που είδαμε στο συνθετικό υπόστρωμα. Χαμηλότερη ήτα η παραγωγή γαλακτικού οξέος 15.3 g/L. Και σε αυτή την ζύμωση παρατηρούμε παρόμοια παραγωγή βιομάζας 1.1 g/L λίγο μεγαλύτερη από ότι στη ζύμωση με το συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης. Στο τυρόγαλα η μέτρηση επιφανειακής τάσης είναι αντίστοιχη αυτής στη ζύμωση με το συνθετικό λακτόζης 39,3 mN/m (μεγαλύτερη κατά 3,6).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των τριών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν προκύπτει ο πίνακας 5 όπου παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης, η παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή του τελικού ακατέργαστου προϊόντος των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ακόμη ο Πίνακας 6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την επιφανειακή τάση, καθώς η μείωση αυτής αποδεικνύει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όπως τη μέγιστη μείωση που παρατηρήθηκε και το χρόνο που σημειώθηκε, καθώς και την τιμή και τη χρονική στιγμή όπου σημειώθηκε η χαμηλότερη τιμή στην επιφανειακή τάση. Όπως βλέπουμε η μεγαλύτερη μείωση στην επιφανειακή τάση σημειώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις στις πρώτες 6 ώρες της ζύμωσης. Ακόμη σε όλες τις ζυμώσεις έχουμε πλήρη κατανάλωση των σακχάρων (36-38 g/L) του υποστρώματος, παρόλα αυτά στις ζυμώσεις που η λακτόζη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα (συνθετικό και τυρόγαλα), βλέπουμε ότι οι τιμές της επιφανειακής τάσης ήταν χαμηλότερες (35.7 και 39.3 αντίστοιχα για το συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης και το τυρόγαλα). Γενικότερα η χρήση του τυρογάλακτος έναντι του συνθετικού υποστρώματος της λακτόζης δεν φάνηκε να επηρεάζει τη ζύμωση καθώς παράλληλα με όσα προαναφέρθηκαν σχετικά με την κατανάλωση και την επιφανειακή τάση, βλέπουμε ότι παρατηρούνται όμοια αποτελέσματα και ως προς την συγκέντρωση του προϊόντος των ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο τέλος της ζύμωσης (0.27-0.36 g/L). Οι Rodrigues et al. (2006) μελετώντας την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε συνθετικό υπόστρωμα από γαλακτικά βακτήρια παρατήρησαν και εκείνοι τη μείωση της επιφανειακής τάσης στις πρώτες ώρες της ζύμωσης κάτι που αντιτίθεται με προγενέστερες μελέτες των (Valreads et al., 1999) οι οποίοι στηρίζουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών κατά τη στάσιμη φάση της ζύμωσης. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφορικά με τον χρόνο που εμφανίστηκε η μέγιστη μείωση στην επιφανειακή τάση αλλά και με το χρόνο που παράγονται και τις τελικές συγκεντρώσεις βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είχαν και οι (Kachrimanidou et al., 2022) μελετώντας διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους *L. Fermentum* F70 σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα

Υπόστρωμα	Sconsumed (g/L)	TDW (g/l)	BS Final (g/L)
Γλυκόζη (Σ)	36	1.1	0.27
Λακτόζη (Σ)	38	0.9	0.35

Τυρόγαλα	36.8	1.1	0.36
----------	------	-----	------

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους *L. Fermentum* F70 σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα

Υπόστρωμα	St Reduction (mN/m)	t St Reduction	ST min (mN/m)	t St min
Γλυκόζη (Σ)	14.1	6	45.2	72
Λακτόζη (Σ)	19.9	6	35.7	72
Τυρόγαλα	23.1	6	39.3	72

Όπου:

Sconsumed: Συγκέντρωση σακχάρων που καταναλώθηκαν

TDW: Συγκέντρωση βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης

BS : Συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών στο τέλος της ζύμωσης

St Reduction: Μέγιστη μείωση επιφανειακής τάσης

T St Reduction: Χρονική στιγμή που σημειώθηκε η μέγιστη μείωση στην επιφανειακή τάση

ST min: Χαμηλότερη τιμή επιφανειακής τάσης

T St min: Χρονική στιγμή που σημειώθηκε η χαμηλότερη τιμή στην επιφανειακή τάση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη που παρουσιάζεται στην παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζει τα αποτελέσματα από τη μελέτη διαφορετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία έχουν απομονωθεί από παραδοσιακό λευκό τυρί Κεφαλονιάς. Ορισμένα από τα στελέχη αυτά μελετήθηκαν ως προς το προβιοτικό τους δυναμικό μέσα από διάφορες δοκιμές στις οποίες υποβλήθηκαν όπως η δοκιμή της αιμόλυσης, η αντοχή των στελεχών αυτών σε οξέα και χολικά άλατα αλλά και η αντιμικροβιακή ικανότητα. Οι δοκιμές αυτές είναι ενδεικτικές για τον χαρακτηρισμό προβιοτικών στελεχών τα οποία ενδιαφέρουν τόσο τη βιομηχανία τροφίμων αλλά και τη βιομηχανία φαρμάκων. Τα στελέχη που ξεχώρισα αφορούν τα F214, F216, F220, F222, F254. Τα αποτελέσματα ως προς αυτά αξιολογήθηκαν ως ιδιαίτερα υποσχόμενα για εκτεταμένη μελλοντική έρευνα με την οποία θα τα πρέπει να συνεκτιμηθούν, με απότερο σκοπό τον χαρακτηρισμό τους ως προβιοτικά αλλά και τη χρήση τους ως εναρκτηρίες καλλιέργειες στη βιομηχανία τροφίμων.

Στη συνέχεια ορισμένα από τα στελέχη τα οποία απομονώθηκαν επιλέχθηκαν για να μελετηθεί η ικανότητά τους να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μέσα από διαφορετικές τεχνικές screening που προτείνονται από τη βιβλιογραφία, όπως η μέτρηση της επιφανειακής τάσης και η μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρυντικά καθώς φάνηκε ότι τα περισσότερα στελέχη με καλύτερα τα F16, F70, F122 και F162 δύνανται να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες τόσο σε υποστρώματα συνθετικά με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη όσο και σε υπόστρωμα τυρογάλακτος. Αυτό ήταν εμφανές βάσει της μείωσης της επιφανειακής τάσης της οποίας μετρήθηκε τόσο στα υπερκείμενα της ζύμωσης αλλά και στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένα από τα στελέχη τα οποία απέδωσαν ενθαρυντικά αποτελέσματα το *L. fermentum* F70 και μελετήθηκε η ανάπτυξη του και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε βιοαντιδραστήρες. Οι ζυμώσεις διέφεραν ως προς το υπόστρωμα καθώς στην πρώτη περίπτωση το υπόστρωμα ήταν συνθετικό με τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, το δεύτερο συνθετικό με πηγή άνθρακα τη λακτόζη και τέλος τυρόγαλα στο οποίο δεν πραγματοποιήθηκε καμία προσθήκη αζώτου. Τα αποτελέσματα και στις 3 περιπτώσεις ήταν όμοια, καθώς φάνηκε ότι το τυρόγαλα θα μπορούσε κάλλιστα να αξιοποιηθεί για το σκοπό αυτό και να αντικαταστήσει τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων. Τα σάκχαρα που υπήρχαν στο υπόστρωμα καταναλώθηκαν πλήρως και στις 3 περιπτώσεις (36-38 g/L). Η μέγιστη μείωση στην επιφανειακή τάση σημειώθηκε και στις 3 περιπτώσεις στις 6 πρώτες ώρες ζύμωσης ενώ

η χαμηλότερη τιμή της επιφανειακής τάσης σημειώθηκε στη ζύμωση με το συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης (35,7 mN/m) και 0.35 g/L συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Παρόλα αυτά η ζύμωση με τη λακτόζη του τυρογάλακτος ακολούθησε με 39.3 mN/m χαμηλότερη τιμή στην επιφανειακή τάση και όμοια συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (0.36 g/L). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν πολύ καλύτερα σε σχέση με τη ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης όπου η επιφανειακή τάση ήταν 45.2 mN/m και η παραγωγή ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών 0.27 g/L.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων. 2012. Γενικός Οδηγός για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις. Αθήνα. https://www.efet.gr/files/F18554_F29633_Odigos%20HACCP%20Galaktokomika_Fin al.pdf
- Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων -2η Έκδοση
- και η ενίσχυση της ανταγωνιστικότητάς τους στην ελληνική και διεθνή αγορά». Φεστιβάλ Ελληνικού Γάλακτος και Τυριού. Πειραιάς.(πίνακας τυρόγαλου)
- Καμιναρίδης, Σ., 2007. Αξιοποίηση τυρογάλακτος. Συνέδριο «Η προστασία της ελληνικής παραγωγής γαλακτοκομικών και τυροκομικών προϊόντων
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2015/2283. (n.d.). ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2015/2283 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25ης Νοεμβρίου 2015 σχετικά με τα νέα τρόφιμα, την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου και την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ)
- Κεχαγιάς Χρήστος, Τσάκαλη Ευσταθία 2017
- ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ (Ι. ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ), J., ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ (Μ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ), Μ., ΔΡΟΣΙΝΟΣ (Ε.Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ), Ε. Η. (2003). "Bacteriocins of lactic acid bacteria and their application on food as biopreservatives (II)." 69-77
- ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ (Ι. ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ), J., ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ (Μ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ), Μ., & ΔΡΟΣΙΝΟΣ (Ε. Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ), Ε. (2018). "Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action (I)." Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 335
- Σβάρνας, Χ. (2012). Παραγωγή και αξιοποίηση υποπροϊόντων αιγοπρόβειου γάλακτος στο νομό Ιωαννίνων.
- Χαρίτου, Γ. (2018). Ορός γάλακτος και οι χρήσεις του στη βιομηχανία τροφίμων.

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdul, J., Salman, S. and Kadhemy, M. F. H. (2014). Effect of PVA, PVA/ biosurfactant on some pathogenic bacteria in glass and plastic plates. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3:301–309.

- Adams, M. R., & Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* Volume 23, Issue 3 p. 287-292
- aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology,” *Biotechnology Advances*, vol.24, no. 6, pp. 604–620, 2006.
- Baltz, R. H., Miao, V., & Wrigley, S. K. (2005). Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Natural Product Reports*, 22(6), 717–741.
- Bonmatin, J-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N., Tapparo, A. (Year: 2015). Environmental Fate and Exposure: Neonicotinoids and Fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(1), 35-67.
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1097–1108.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., & Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 87–100.
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007, May). Crude Petroleum-Oil Biodegradation Efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339-1345.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997, March). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- Eisenstein, B. I. (2004). Lipopeptides, focusing on daptomycin, for the treatment of gram-positive infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 13(9), 1159–1169.
- Eurostat 2020. Agriculture, forestry and fishery statistics. 2020 Edition
- FAO, F. and A. O. of the U. N., & WHO, W. H. O. (Eds.). (2006). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization.
- Fijan, S. (2014, May 5). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-4767.
- Fuller, R. (1991). Probiotics in Human Medicine: A Review. *Gut*, 32(4), 439-442.

- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (Year: 2014). Probiotics History. In Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health Meeting, held in Rome, Italy on September 13-15, 2014
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., ... Kim, N. (2012, July). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and Prebiotics, October 2011. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 468-481.
- Health Canada. (2009). Accepted claims about the nature of probiotic microorganisms in food. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php
- Hill, C., Ross, P. (2002). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*.
- <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Isolauri, E. (2004). Manipulation of the gut microbiota: probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.
- J. D. Van Hamme, A. Singh, and O. P. Ward, "Physiological
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010, April). Application of Probiotics in Food Products—Challenges and New Approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
- Jarak, M., Abdelli, F., Laadhar, R., Lami, R., Stien, D., Aifa, S., & Mnif, S. (2017). "Evaluation of biofilm-forming ability of bacterial strains isolated from the roof of an old house." *Journal of General and Applied Microbiology*. 186-194
- Jelen, P. (December 2002). Whey Processing | Utilization and Products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 2739-2745).
- Kachrimanidou, V., Ioannidou, S.M., Ladakis, D., Papapostolou, H., Kopsahelis, N., Koutinas, A.A., & Kookos, I.K. (2021). Techno-economic evaluation and life-cycle assessment of poly(3-hydroxybutyrate) production within a biorefinery concept using sunflower-based biodiesel industry by-products. *Bioresource Technology*, 326, 124711.
- Kachrimanidou, V., Papadaki, A., Lappa, I., Papastergiou, S., Kleisiari, D., & Kopsahelis, N. (2021). Biosurfactant Production from Lactobacilli: an Insight on the Interpretation of Prevailing Assessment Methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19.
- Kachrimanidou, V., Alimpoumpa, D., Papadaki, A., Lappa, I., Alexopoulos, K., & Kopsahelis, N.

- (2022). Cheese whey utilization for biosurfactant production: Evaluation of bioprocessing strategies using novel *Lactobacillus* strains. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(10), 4621-4635.
- Kageyama, M. (1975). "Bacteriocins and bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*."
 - Kaur, H. P., Prasad, B., & Kaur, S. (2015). A review on applications of biosurfactants produced from unconventional inexpensive wastes in food and agriculture Industry. *World J Pharm Res*, 4, 827-42.
 - Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 2013, 481651.
 - Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347.
 - Lee, H. S., Cho, Y. H., Park, S. O., Kye, S. H., Kim, B. H., Hahm, T. S., ..., & Kim, C. I. (2006). Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S31–S37.
 - Lee, S., Lee, J., Jin, Y-I., Jeong, J-C., Chang, Y.H., Lee, Y., Jeong, Y., Kim, M. (2017). Probiotic Characteristics of *Bacillus* Strains Isolated from Korean Traditional Soy Sauce. p518-524.
 - Lucke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat.105-115
 - McFarland, L.V. (2015, May 15). From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S85-S90. doi: 10.1093/cid/civ054.
 - Mokoena, M. (2017). "Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis, and Applications against Uropathogens: A Mini-Review."
 - Morales, A., Chin, J. L., & Ramsey, E. W. (2001). Mycobacterial cell wall extract for treatment of carcinoma in situ of the bladder. *Journal of Urology*, 166(5), 1633–1638.
 - Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed research international*, 2018.
 - Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198.
 - Neu, T. R., & Poralla, K. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(5), 521–525.
 - Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252–259.

- Norton, S., Huhtinen, E., Conaty, S., Hope, K., Campbell, B., Tegel, M., ..., & Cullen, B. (2012). A large point-source outbreak of *Salmonella typhimurium* linked to chicken, pork and salad rolls from a Vietnamese bakery in Sydney. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 3(2), 16–23.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease bio-control. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.
- P. Singh and S. S. Cameotra, "Potential applications of micro-bial surfactants in biomedical sciences," *Trends in Biotechnol-ogy*, vol. 22, no. 3, pp. 142–146, 2004.
- Pereira, G. V. de M., Coelho, B. de O., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018, December). How to Select a Probiotic? A Review and Update of Methods and Criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553–563.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 110, 48-68.
- Rahman, P.K.S.M., & Edward, G. (2008). Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants - Review. *Biotechnology* 7(2), 360-370.
DOI: 10.3923/biotech.2008.360.370.
- Reid, G. (2017, April). The Development of Probiotics for Women's Health. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(4), 269-277.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 434.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010, February). Non-dairy Probiotic Products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11.
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 135-142.
- Rodrigues, Lígia R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C., & Oliveira, R. (2006). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,
- Ryan, M. P. (September 2016). The Biotechnological Potential of Whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(3), 479-498.

- Sagalowicz, L. and Leser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Curr. Opin. Colloid In.* 15:61–72.
- 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.
- Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Procha, S., & Lal, S. (2015). Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springer Plus*, 4(1), 1–14.
- Sharma, D., Sharma, P. K., & Malik, A. (2011a). Prevalence and antimicrobial susceptibility of drug resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk of dairy cattle. *International Research Journal of Microbiology*, 2(11), 466–470.
- Sharma, Deepansh, Baljeet Singh Saharan, & Shailly Kapil..(2016) .Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. Singh, A. K., & Cameotra, S. S. (2013). Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10), 7367–7376.
- Soomro, A.H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). "Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review."
- Stevens, K. A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer, 1991. Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, pp. 3613- 3615.
- Stiles, M.E. (1996). "Biopreservation by Lactic Acid Bacteria." *Antonie Leeuwenhoek Journal*. 331-345
- Stiles, M.E., & Holzapfel, W.H. (1997). "Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy." *International Journal of Food Microbiology*. 1-29
- Stiles, M.E., & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., & Maguin, E. (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuwenhoek*. 187-216
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E. J., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2017). Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 55, 40-49.

