

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ.

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΑΝΘΗΣ ΣΤΑΜΑΤΙΟΥ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλονιάς

Ιανουάριος 2022

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαο Κοψαχείλη, Αν. Καθηγητής
Αικατερίνη Παπαδάκη, Επ. Καθηγήτρια
Δρ. Ιλιάδα Λάππα

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων & Βιομηχανικών ζυμώσεων, του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ιονίου Πανεπιστημίου. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Αν. Καθηγητή Νικόλαο Κοψαχείλη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου του, αλλά και για το γεγονός που με επέλεξε να μελετήσω ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην επιστημονική συνεργάτιδα του εργαστηρίου Δρ. Ιλιάδα Λάππα για τη σημαντική βοήθειά της και τις συμβουλές της, την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής μελέτης, για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και για αυτά που με δίδαξε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ. Βασιλική Καχριμανίδου και την υποψήφια διδάκτορα Φανή Σερέτη, που με βοήθησαν να ενταχθώ στο χώρο του εργαστηρίου δίνοντάς μου την ευκαιρία να γνωρίσω ένα χώρο πρότυπο οργάνωσης, εργασίας και κυρίως συνεργασίας. Επίσης ευχαριστώ πολύ την Επ. Καθηγήτρια Αικατερίνη Παπαδάκη που ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής επέβλεψε και αξιολόγησε την παρούσα μελέτη. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ανθή Σταματίου,

Αργοστόλι 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τυρόγαλα αποτελεί ένα υποπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας, με σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, που σχετίζονται κυρίως με την υψηλή περιεκτικότητά του σε λακτόζη. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια διεργασία αξιοποίησης του τυρογάλακτος με σκοπό την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αρχικά έγινε παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων από το μύκητα *A. awamori* σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης με ειδικότερο στόχο να μελετηθεί η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης και πρωτεασών. Στη συνέχεια, τα ακατέργαστα ένζυμα εφαρμόστηκαν περαιτέρω για την υδρόλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος, αξιολογώντας την επίδραση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η πλήρης υδρόλυση της λακτόζης επιτεύχθηκε μετά από 36 ώρες υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας 15 U/mL ενζύμου σε θερμοκρασία 65°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις με τα παραγόμενα υδρολύματα να αποτελούν το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το στέλεχος *Acetobacter xylinum* με μέγιστη παραγωγή 7.0 g/L σε 10 ημέρες. Η παραγόμενη κυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως φορέας ακινητοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus plantarum*. Στη συνέχεια τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή ζυμούμενου γάλακτος (ξινόγαλα). Η αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης των στελεχών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μορφές κυτταρίνης (μεμβράνη ή ομογενοποιημένη) οι οποίες παρουσίασαν υψηλή αποτελεσματικότητα προσκόλλησης $> 10^8 \log \text{ cfu/g}$ κυτταρίνης και υψηλή ικανότητα ζύμωσης στο γάλα ($>85\%$). Επιπλέον, οι βιοκαταλύτες (ακινητοποιημένη καλλιέργεια σε βακτηριακή κυτταρίνη) που δημιουργήθηκαν και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του ξινογάλακτος, παρουσίασαν υψηλή βιωσιμότητα ($> 10^7 \log \text{ cfu/g}$) κατά τη διάρκεια αποθήκευσης 28 ημερών στους 4 °C, ενώ παρουσίασαν αποδεκτές οργανοληπτικές ιδιότητες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν την επιτυχή ανάπτυξη μιας νέας βιοδιεργασίας με σκοπό την αξιοποίηση του τυρογάλακτος στα πλαίσια της κυκλικής βιοοικονομίας.

ABSTRACT

Whey is a byproduct of the dairy industry with significant pollution effects mainly related to lactose. Although numerous approaches to lactose bio-processing and exploitation have been proposed, full utilization involves a limited range of end-products. In the present study, a process of bioconversion of whey that generates high added value products (raw enzymes, growth media, biopolymers) was developed. Initially, β -galactosidase enzymes and proteases were produced by *Aspergillus awamori* in solid state fermentations. The crude enzymes produced were further applied to the hydrolysis of whey lactose, evaluating the effect of hydrolysis time, temperature and initial enzyme concentration. Complete hydrolysis of lactose was obtained after 36 hours, using 15 U/mL of enzyme. Liquid fermentations were then performed with the hydrolysates produced as a growth medium for the production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with a 7.0 g/L maximum production after 10 days. Cellulose was then employed as a carrier for *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains. Microorganisms were used as starting cultures for the production of novel fermented milk. Strains' immobilization efficiency was determined using two different forms of bacterial cellulose that show high adhesion efficiency $> 10^8$ log cfu/g cellulose and high fermentation ability in milk ($> 85\%$). In addition, the biocatalysts used for sour milk production demonstrated high viability ($> 10^7$ log cfu/g) after 28 days of storage at 4 °C, as well as acceptable organoleptic properties. The results of the present study indicate the successful development of a new approach to the utilization of whey in the context of circular bioeconomy.

Πίνακας Περιεχομένων

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Τυρόγαλα.....	1
1.1.1 Χαρακτηριστικά και σύσταση τυρογάλακτος.....	1
1.1.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος.....	5
1.2 Παραγωγή μικροβιακών ενζύμων.....	9
1.2.1 β-γαλακτοσιδάση.....	10
1.2.1 <i>Aspergillus awamori</i>	14
1.3 Παραγωγή και εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης.....	15
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	15
1.3.2 Βιοσύνθεση.....	18
1.3.3 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης.....	20
1.4 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	23
1.4.1 Χαρακτηριστικά και λειτουργικές ιδιότητες.....	23
1.4.2 Γαλακτική ζύμωση και παραγωγή ζυμούμενου γάλατος.....	25
1.5 Η τεχνική της ακινητοποίησης.....	28
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1 Μικροβιακά στελέχη.....	29
2.2 Παραγωγή ενζύμων με ζύμωσης στερεάς κατάστασης.....	30
2.3 Υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος από μικροβιακή β-γαλακτοσιδάση.....	31
2.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από τον <i>Acetobacter xylinum</i>	32
2.5 Παραγωγή πρότυπου βιοκαταλύτη LAB.....	33
2.6 Εισαγωγή ακινητοποιημένων φορέων σε τρόφιμο για παραγωγή καινοτόμου προϊόντος.....	34
2.6.1 Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις.....	35
2.6.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	36
2.7 Αναλυτικές μέθοδοι.....	36
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
3.1 Χρήση ενζύμων και υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος.....	38

3.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	42
3.3 Παραγωγή και κινητικής ζύμωσης πρότυπου βιοκαταλύτη.....	48
3.4 Παραγωγή καινοτόμου προϊόντος.....	50
Συμπεράσματα.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Συστατικά τυρογάλακτος.....	1
Πίνακας 1.2: Πρωτεΐνες τυρογάλακτος.....	7
Πίνακας 1.3: Η β-γαλακτοσιδάση σε διάφορα στελέχη μικροοργανισμών.....	14
Πίνακας 1.4: Παραγωγή ενζύμων από τον <i>A.awamori</i>	15
Πίνακας 2.1: Υλικά θρεπτικού υποστρώματος (HS) για την ανάπτυξη του <i>A.xylinum</i>	30
Πίνακας 3.1: Πειραματικά σχήματα ζύμωσης τυρογάλακτος και υδρολυμάτων από το στέλεχος <i>A.xylinum</i>	43
Πίνακας 3.2: Ακίνητοποιημένος πληθυσμός LAB σε βακτηριακή κυτταρίνη..	49
Πίνακας 3.3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ζυμούμενου γάλακτος που δημιουργήθηκαν από τη χρήση ελεύθερων και.....	54
ακίνητοποιημένων κυττάρων κατά την αποθήκευση.....	54
Πίνακας 3.4: Οργανοληπτικός έλεγχος τυρογάλακτος.....	56

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 3.1: Επίδραση θερμοκρασίας στην υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος χρησιμοποιώντας ακατέργαστη β-γαλακτοσιδάση και πρωτεάσες.....	40
Γράφημα 3.2: Επίδραση θερμοκρασίας στην παραγωγή ελεύθερου αζώτου (FAN) από ακατέργαστες πρωτεάσες κατά την υδρόλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος.....	41
Γράφημα 3.3: Επίδραση διαφορετικής αρχικής ενζυμικής συγκέντρωσης της β-γαλακτοσιδάσης στην υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος.....	41
Γράφημα 3.4: Επίδραση διαφορετικής αρχικής ενζυματικής δραστηριότητας πρωτεασών για την παραγωγή ελεύθερου αζώτου (FAN) του τυρογάλακτος.....	42
Γράφημα 3.5: Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (BK) και κινητική κατανάλωση σακχάρων και FAN, κατά τη διάρκεια ζύμωσης του υδρολυμένου τυρογάλακτος από τον <i>A.xylinum</i>	45
Γράφημα 3.6: Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από υδρολυμένο και μη τυρόγαλα.....	46
Γράφημα 3.7: Κινητική ζύμωση τυρογάλακτος από ακινητοποιημένο στέλεχος <i>Lb. pentosus</i> B329 (A) και <i>Lb. plantarum</i> (B) σε βακτηριακή κυτταρίνη στους 37 °C.....	49
Γράφημα 3.8: Προφίλ οξίνισης γάλακτος με χρήση ελεύθερων και ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών των στελεχών <i>Lb. pentosus</i> B329 (A) και <i>Lb. plantarum</i> (B).....	51
Γράφημα 3.9: Πληθυσμός και βιωσιμότητα του <i>Lb. pentosus</i> B329 (A) και <i>Lb. plantarum</i> (B) σε ξινόγαλα που παράγεται χρησιμοποιώντας ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα κατά τη διάρκεια αποθήκευσης μετά τη ζύμωση για 28 ημέρες (4°C).....	53
Γράφημα 3.10: Συναίρεση (%) ξινογάλακτος κατά τη συντήρησή του στους 4°C για 28 ημέρες.....	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τυρόγαλα

1.1.1 Χαρακτηριστικά και σύσταση τυρογάλακτος

Τυρόγαλα, σύμφωνα με τον κανονισμό 625/30-3-1978 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ορίζεται ως *το υδαρές τμήμα του γάλακτος που λαμβάνεται μετά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος κατά την τυροκόμηση ή κατά την παραγωγή καζεΐνης με τη χρήση οξέων, πυτιάς ή και φυσικοχημικών μεθόδων*. Στην ουσία είναι το υπόλειμμα που παραμένει μετά την ανάκτηση του τυριού από την πήξη του γάλακτος συνήθως με πρωτεολυτικά ένζυμα. Το χρώμα του τυρογάλακτος είναι κίτρινο ή πράσινο, το οποίο ποικίλει ανάλογα με τον τύπο γάλακτος που χρησιμοποιείται. Παράγεται από όλα τα είδη γάλακτος, αλλά το αγελαδινό γάλα είναι το πιο συνηθισμένο. Σε ορισμένες περιοχές του κόσμου χρησιμοποιούνται επίσης αιγοπρόβατα αλλά και γάλα καμήλας στην παραγωγή τυριού και τυρογάλακτος (Bordevane-Juchreau et al. 2005; Smithers 2008). Ο τύπος και η σύνθεση του ορού γάλακτος εξαρτώνται κυρίως από τις τεχνικές επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται στην κατακρήμνιση της καζεΐνης του γάλακτος. Ο συνηθέστερος τύπος τυρογάλακτος προκύπτει από την πήξη της καζεΐνης από πυτιά. Η πήξη της καζεΐνης από πυτιά συμβαίνει περίπου σε συνθήκες pH 6.5, οπότε το τυρόγαλα που παράγεται κατά τη διάρκεια αυτής της ενζυμικής διεργασίας είναι το γλυκό τυρόγαλα. Το όξινο τυρόγαλα (pH <5) παράγεται όταν η πήξη της καζεΐνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη οργανικών οξέων (Jelen et al. 2003; Kosseva et al. 2009). Πιο συγκεκριμένα η όξινη πήξη συμβαίνει κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο τη καζεΐνης (pH=4,6), με αποτέλεσμα να συμμετέχουν περισσότερες πρωτεΐνες. Το όξινο τυρόγαλα έχει περιορισμένη χρήση λόγω της όξινης γεύσης και της υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι (Weetal et al. 1974; Kosikowski 1979; Mawson 1994). Η ποσότητα παραγόμενου τυρογάλακτος αφορά την ποσότητα τυροκομικής παραγωγής, η οποία βασίζεται και στον τύπο του γάλακτος. Συμπερασματικά, λαμβάνονται 9 λίτρα τυρογάλακτος για κάθε 1 κιλό παραγόμενου τυριού (Carvalho et al. 2013; Wang et al. 2018).

Πίνακας 1.1: Συστατικά τυρογάλακτος

Νερό	93 %
pH	6.32
Πυκνότητα	1029,2 kg/m ³
Ολικά στερεά	69,8 g/kg
Πρωτεΐνες	13 g/kg
Λίπη	0,3 g/kg
Λακτόζη	50,7 g/kg
Ασβέστιο	356 mg/kg
Φώσφορος	385 mg/kg
Μαγνήσιο	93 mg/kg
Κάλιο	1154 mg/kg
Νάτριο	434 mg/kg
Χλώριο	1246 mg/kg

(Πηγή: Mishra et al. 2000; Phlipopoulos et al. 2001)



Εικόνα 1.1: Τυρόγαλα

Τις τελευταίες δεκαετίες το τυρόγαλα θεωρείται το σημαντικότερο παραπροϊόν αλλά και απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας, που συνδέεται με σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους, λόγω του μεγάλου οργανικού φορτίου που οφείλεται κυρίως στην υψηλή συγκέντρωση λακτόζης. Αυτό συμβαίνει, διότι η λακτόζη έχει

υψηλές απαιτήσεις COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο) και BOD (βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο). Πιο συγκεκριμένα, το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) είναι περίπου 50-80 g/L και το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) κυμαίνεται στα 40-60 g/L (Chatzipaschali et al. 2012). Πιο αναλυτικά, σαν βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) ορίζεται ως η ποσότητα οξυγόνου που καταναλώνεται από τους αερόβιους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος για την βιο-οξείδωση ενός λίτρου αποβλήτου σε θερμοκρασία 20°C. Αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό δείκτη και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του επιπέδου ρύπανσης και πιο συγκεκριμένα του οργανικού ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων. Το οργανικό φορτίο των αποβλήτων, χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς σαν θρεπτικό υπόστρωμα. Όσο μεγαλύτερο είναι το BOD τόσο επιβαρυνμένο είναι το απόβλητο και τόσο μεγαλύτερο πρόβλημα θα δημιουργήσει η απόρριψη του στο περιβάλλον αν δεν έχει προηγηθεί η κατάλληλη επεξεργασία (Αθανασόπουλος 1979). Με τον όρο χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) ορίζεται ως η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη χημική οξείδωση των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε ένα δείγμα, σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Το COD είναι μια αρκετά σημαντική παράμετρος, η οποία ελέγχει τη ρύπανση κυρίως του νερού. Επίσης, με τον προσδιορισμό του COD να υπολογίσουμε και τις τιμές του BOD. Γεγονός που μας παρέχει τη δυνατότητα να ελέγξουμε το οργανικό φορτίο των δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τοξικές ουσίες και επομένως δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός του BOD. Οι μεγάλες τιμές COD και οι μικρές τιμές BOD, δείχνουν την παρουσία τοξικών ουσιών στα δείγματα.

Έχει παρατηρηθεί πως τα απόβλητα των τυροκομείων προκαλούν 5 έως 15 φορές (ανάλογα με τα συστατικά τους) μεγαλύτερη ρύπανση από τα αστικά απόβλητα (Ανυφαντάκης 2004). Όπως προαναφέρθηκε, το τυρόγαλα διαθέτει ένα ισχυρό ρυπαντικό οργανικό φορτίο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε λακτόζη. Έτσι, όταν απορρίπτεται σε ποτάμια, λίμνες και θάλασσες, χωρίς να έχει υποστεί κάποια επεξεργασία, μπορεί να καταστρέψει άμεσα ένα βιότοπο. Επιπλέον, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αζώτου και φωσφόρου στο τυρόγαλα μπορεί να προκληθούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως τοξικότητα στο πόσιμο νερό από την παρουσία νιτρικών, ευτροφισμός, αποξυγόνωση αποδεκτών λόγω νιτροποίησης αμμωνίας, τοξικότητα αμμωνίας στα ψάρια. Επειδή οι χημικές ουσίες που περιέχει το τυρόγαλα είναι μη βιοδιασπώμενες παραμένουν στο περιβάλλον για αρκετά μεγάλο

χρονικό διάστημα και τελικά καταλήγουν στους οργανισμούς, όπου λόγω του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης δημιουργεί προβλήματα τοξικότητας στους ανθρώπους. Ακόμα, οι μη βιοδιασπώμενες ουσίες δεν απομακρύνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, συσσωρεύονται στους ιστούς σε μεγάλες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να προκαλέσουν προβλήματα στην αναπαραγωγή, στο ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά και στη φυσική ανάπτυξη. Έπειτα, ένα άλλο συχνό φαινόμενο, το οποίο προκαλεί εξίσου σοβαρά προβλήματα είναι αυτό του ευτροφισμού. Το φαινόμενο αυτό συναντάται κυρίως σε υδάτινες περιοχές, όταν αυξάνονται τα νιτρικά και τα φωσφορικά άλατα σε αυτές, οπότε αυξάνονται και ανάλογα και οι οργανισμοί των οικοσυστημάτων αυτών. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι πως αυξάνεται η παραγωγικότητα του οικοσυστήματος πάνω από τα όρια, αλλά και πως παρατηρούνται αντίξοες συνθήκες, οι οποίες αποβλέπουν στο θάνατο των ανώτερων καταναλωτών. Επίσης το οργανικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνιακά ιόντα, τα οποία είναι άμεσα διαθέσιμα για νιτροποίηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων διαλυμένου οξυγόνου (Λοϊζίδου 2006). Προκειμένου λοιπόν, να αναπτυχθούν ολοκληρωμένες λύσεις για το πρόβλημα του τυρογάλακτος, θα πρέπει να αντιμετωπισθεί ως πόρος για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας ή ενέργειας μειώνοντας παράλληλα το υψηλό ρυπαντικό φορτίο.

1.1.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Αρχικά, το τυρόγαλα περιέχει περισσότερα από τα μισά από τα στερεά που υπάρχουν στο πλήρες γάλα, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Ακόμα συμπεριλαμβάνει και την μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης, υδατοδιαλυτών βιταμινών και ανόργανων συστατικών του γάλακτος. Για το λόγο αυτό το τυρόγαλα μπορεί να χαρακτηριστεί και ως πολύτιμο παραπροϊόν με πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων.

Το 1998 ξεκίνησε η πρώτη μονάδα επεξεργασίας τυρογάλακτος, ενώ σήμερα λειτουργούν τέσσερις μονάδες, οι οποίες επεξεργάζονται 1000 τόνους τυρογάλακτος ημερησίως (www.hellenicprotein.gr). Η παρουσία των θρεπτικών συστατικών του τυρογάλακτος (οργανικά και ανόργανα) θεωρείται ως πηγή για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων με υψηλή διατροφική αξία. Η ολοένα αυξανόμενη παγκόσμια

ζήτηση φυσικών συστατικών για την παρασκευή τροφίμων έχει κινήσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Στις μέρες μας, το τυρόγαλα είναι ένα από τα πιο δημοφιλή συμπληρώματα διατροφικής πρωτεΐνης.

Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος (Πίνακας 1.2) έχουν αναγνωριστεί τόσο για τις διάφορες λειτουργικές τους ιδιότητες, όσο και τη διατροφική τους αξία. Οι λειτουργικές τους ιδιότητες οφείλονται κυρίως στα φυσικά, χημικά και δομικά τους χαρακτηριστικά (Jovanović et al. 2005). Η θρεπτική τους αξία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη συγκέντρωση των απαραίτητων αμινοξέων (Baldasso et al. 2011). Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS για εφαρμογές σε τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, κατεψυγμένα προϊόντα και σκευάσματα παιδικών τροφών (Jayaprakash and Brueckner 1999; Morr and Foegeding 1990). Αξίζει να αναφερθεί πως το ενισχυμένο σκεύασμα με πρωτεΐνες τυρογάλακτος γνωστό ως as ready-to-drink beverages έχει ξεκινήσει από Συμβούλιο Εξαγωγών Γαλακτοκομικών των ΗΠΑ-USDEC, το οποίο περιέχει θρεπτικές πρωτεΐνες που στοχεύουν ιδιαίτερα στους αθλητές (Rittmanic 2006). Οι ερευνητές στην επιστήμη των τροφίμων αναζητούν τακτικά νέες μεθόδους για την ανάπτυξη ή μετατροπή των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος σε πιο λειτουργικά συστατικά.

Πίνακας 1.2: Πρωτεΐνες τυρογάλακτος

(Πηγή: Amiri and Valsaraj 2004; Kim et al. 2007; Krissansen 2007).

Πρωτεΐνες	Συγκέντρωση (w/w)	Μοριακή μάζα (kDa)	Ισοηλεκτρικό PH
Ανοσοσφαιρίνη	8.0	150-1000	5,5-8,3
Λευκοματίνη βοοειδών	5.0	66.0	5,13
Λακτοφερίνη	1.0	76,5	9,5-10
β-λακτοσφαιρίνη	40-50	18,3	5,35-5,49
α-λακτοσφαιρίνη	12-15	14.0	4,2-4,5
Γλυκομακροπεπτίδιο	12.0	6,8	4,3-4,6
Πρωτεόζη-Πεπτόνη	0,19	4-22	-
Λακτοϋπεροξειδάση	0,5	78,0	9,5

Η επεξεργασία του ορού γάλακτος πραγματοποιείται με δύο διαδικασίες μετατροπής του σε προϊόντα με μεγάλη προστιθέμενη αξία. Η πρώτη αναφέρεται στην άμεση επεξεργασία, δηλαδή την φυσική και την θερμική επεξεργασία, από την οποία παρασκευάζεται η σκόνη του τυρογάλακτος, απομονώνεται συμπυκνωμένη πρωτεΐνη, και λακτόζη. Η δεύτερη επεξεργασία αφορά τις βιοτεχνολογικές βιοδιεργασίες εκείνες όπου το τυρόγαλο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για διάφορες μικροβιακές και ενζυμικές διεργασίες για την ανάκτηση ή την παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων υψηλή προστιθέμενης αξίας. Τέτοια προϊόντα θεωρούνται τα οργανικά οξέα, ένζυμα, καροτενοειδή, βιοσυντηρικήτα, οι εξωπολυσακχαρίτες και τα βιοπλαστικά (Kosseva et al. 2009; Mollea et al. 2013; Panesar et al. 2013; Siso 1996). Αξίζει να αναφερθεί πως το 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυρογάλακτος μετατρέπεται σε προϊόντα διατροφής, τόσο σε σκόνη τυρογάλακτος, η οποία χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή, όσο και ως συστατικό των τροφίμων, όπως παγωτά, σάλτσες, προψημένα προϊόντα κλπ. Επίσης, ένα σημαντικό μέρος του τυρογάλακτος χρησιμοποιείται για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης. Τέτοια προϊόντα είναι το γαλακτικό οξύ, η αιθανόλη, το βιοαέριο, τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα, οι βιταμίνες κ. ά. (Guimarães et al. 2010). Αναντίρρητα, μελέτες έχουν δείξει πως οι διαδικασίες ζύμωσης μπορούν να μειώσουν την ποσότητα οργανικού φορτίου, δηλαδή την περιεκτικότητα σε λακτόζη, επιτρέποντας έτσι μία οικονομική, αλλά και μια εφικτή χρήση του τυρογάλακτος, ώστε να περιοριστούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Επιπρόσθετα, το τυρόγαλα έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες και ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών (π.χ. γένη *Kluyveromyces*, *Candida*, *Trichosporum*, *Torula*). Οι μικροοργανισμοί παράγουν βιομάζα υψηλής βιολογικής αξίας και με συγκέντρωση πρωτεΐνης που μπορεί να φτάσει το 80% επί του ξηρού βάρους της βιομάζας μετά από μόνο λίγες μέρες ζύμωσης. Η βιομάζα αυτή ονομάζεται μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Αγγελής 2007).

Η λακτόζη είναι από τους σημαντικότερους υδατάνθρακες του γάλακτος και είναι το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης του γάλακτος μεταφέρεται στο τυρόγαλα, όπου βρίσκεται σε συγκέντρωση 70%, με αποτέλεσμα όπως προαναφέρθηκε να του προσδίδει υψηλό οργανικό φορτίο. Συγκεκριμένα, ανήκει στην ομάδα των δισακχαριτών και αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β -1-4-γλυκοσιδικό δεσμό. Η λακτόζη υδρολύεται με το ένζυμο λακτάση (β -γαλακτοσιδάση) στα δύο μονομερή

1.2 Παραγωγή μικροβιακών ενζύμων

9

Οι ζυμώσεις υγρής (SmF) και στερεάς κατάστασης (SSF) είναι οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή μικροβιακών ενζύμων. Στην υγρή ζύμωση χρησιμοποιούνται υποστρώματα ελεύθερης ροής και τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης απελευθερώνονται στον ζωμό ζύμωσης. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη για την εξαγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από βακτήρια επειδή απαιτεί υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία για την ανάπτυξή τους. Η ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι κατάλληλη για τους μικροοργανισμούς με βέλτιστη ανάπτυξη σε υποστρώματα μικρότερης περιεκτικότητας σε υγρασία όπου και καταναλώνονται αργά αλλά συνεχώς. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει ανάγκη παροχής του υποστρώματος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύρια πλεονεκτήματα των SSF είναι ο εύκολος χειρισμός, η ανάκτηση υψηλότερης συγκέντρωσης προϊόντων και η παραγωγή λιγότερων λυμάτων. Η SSF θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την εμπορική παραγωγή ενζύμων, λόγω της οικονομικά αποδοτικότερης διαδικασίας παραγωγής (Yimer et al. 2018).

1.2.1 β-γαλακτοσιδάση

Βιομηχανικά, η β-γαλακτοσιδάση έχει πληθώρα εφαρμογών. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε άφθονη ποσότητα στη φύση και προέρχεται από διάφορες πηγές όπως φυτά, ζωικά όργανα και μικροοργανισμούς. Ωστόσο, συνήθως οι μικροβιακές πηγές παρουσιάζουν υψηλότερη παραγωγικότητα και κατά συνέπεια η χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους. Σήμερα, οι β-γαλακτοσιδάσες χρησιμοποιούνται εκτενώς τόσο στις βιομηχανίες τροφίμων όσο και στις φαρμακοβιομηχανίες, λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύσουν τη λακτόζη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αντιμετώπιση του προβλήματος της δυσανεξίας στη λακτόζη, γεγονός που επιτρέπει την παρασκευή, αλλά και κατ' επέκταση την κατανάλωση των γαλακτοκομικών προϊόντων (Panesar et al. 2006; Panesar et al. 2010). Επιπροσθέτως, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση τεχνολογικών δυσκολιών, οι οποίες σχετίζονται με την εφαρμογή της λακτόζης στη βιομηχανία τροφίμων όπως χαμηλή διαλυτότητα, εύκολη κρυστάλλωση, αλλά και έλλειψη γλυκύτητας (Panesar et al. 2006; Ghosh et al. 2017). Η λακτόζη είναι υγροσκοπική και προκαλεί κρυστάλλωση στα τρόφιμα. Ως εκ τούτου, οι β-γαλακτοσιδάσες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση της λακτόζης για την επίλυση της κρυστάλλωσης που σχετίζεται με τη λακτόζη σε κατεψυγμένα,

συμπυκνωμένα επιδόρπια. Ακόμα μία πολύ σημαντική εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης περιλαμβάνει τις επεξεργασίες των λυμάτων από γαλακτοβιομηχανίες, όπως είναι η απόρριψη του ορού γάλακτος, το οποίο όπως έχει προαναφερθεί προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα, λόγω της χαμηλής βιοαποικοδομησιμότητας της λακτόζης (Kosseva et al. 2009; Husain 2010; Sen et al. 2012).

Η επακόλουθη επεξεργασία αυτών των οργανικών αποβλήτων με β-γαλακτοσιδάση μπορεί να τα μετατρέψει σε άμεσα διαθέσιμα υποστρώματα για καλλιέργεια κυττάρων (Prashar et al. 2016). Επιπλέον, οι υψηλής λειτουργίας πρωτεΐνες ορού γάλακτος, όπως η λακταλβουμίνη, μπορούν να ανακτηθούν μέσω υπερδιήθησης και να υδρολυθούν περαιτέρω για να παραχθούν διάφορα φαρμακευτικά ενδιάμεσα (Domingues et al. 2005). Μια μελέτη που διεξήχθη το 2008 ανέφερε την παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από απόβλητα ορού γάλακτος και κουνουπιδιού. Η συμπλήρωση ορού γάλακτος με υπολείμματα κουνουπιδιού όχι μόνο αύξησε την παραγωγή ενζύμων, αλλά μείωσε επίσης τη συγκέντρωση λακτόζης που ευθύνεται για την αύξηση του BOD. Ως εκ τούτου, η μελέτη τους επιβεβαίωσε ότι και τα δύο αυτά υποπροϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την παραγωγή ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης σε εμπορική κλίμακα. Μια άλλη σημαντική εφαρμογή της β-γαλακτοσιδάσης είναι η υδρόλυση της λακτόζης που μετατρέπει τη λακτόζη ορού γάλακτος σε μια σειρά από κατάλληλα προϊόντα όπως τα γλυκά σιρόπια που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία και τη ζαχαροπλαστική.

Ανάμεσα σε πολλές διαθέσιμες μικροβιακές πηγές, τα οξυγαλακτικά βακτήρια προσελκύουν μεγάλο ενδιαφέρον, κυρίως λόγω του χαρακτηρισμού τους ως GRAS (Generally Recognized as Safe) (Vasiljevic et al. 2003; Schwab et al. 2011). Η β-γαλακτοσιδάση προέρχεται κυρίως από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και έχει βρεθεί πως είναι ένα φυσικό ένζυμο κατάλληλο για το γλυκό τυρόγαλα. Αν και χρησιμοποιούνται ήδη σε παραγωγή γαλακτικού οξέος σε μεγάλη κλίμακα το πλήρες δυναμικό τους στο ένζυμο, κυρίως β-γαλακτοσιδάση, η εμπορική παραγωγή δεν έχει ακόμη επιτευχθεί. Όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης που απασχολούν τη βιομηχανία τροφίμων αναγνωρίζονται ως GRAS (Sanchez-Puelles et al. 1992; Ladero et al. 2001).

Η επιλογή των πηγών εξαρτάται βασικά από τις απαιτούμενες συνθήκες αντίδρασης. Για παράδειγμα, οι βακτηριακές β-γαλακτοσιδάσες λειτουργούν με βέλτιστο pH μεταξύ 2.5-5.4 και χρησιμοποιούνται κυρίως για όξινη υδρόλυση ορού

γάλακτος. Αντίθετα, η β-γαλακτοσιδάση που προέρχονται από ζυμομύκητες παρουσιάζει μέγιστη δράση σε pH 6.0–7.0 που είναι πιο κατάλληλη για την υδρόλυση γάλακτος και γλυκού ορού γάλακτος (Saquib et al. 2017). Η β-γαλακτοσιδάση βρίσκεται τόσο σε βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες. Ωστόσο, σε εμπορική και βιομηχανική κλίμακα, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές β-γαλακτοσιδάσης είναι τα γένη των *Aspergillus spp.* και *Kluyveromyces spp.* (Zhou and Chen 2001). Οι μυκητιακές β-γαλακτοσιδάσες διαθέτουν βέλτιστο εύρος όξινου pH 2.5–5.4, καθιστώντας τις έτσι πιο αποτελεσματικές για την υδρόλυση της λακτόζης που βρίσκεται σε όξινες ουσίες όπως ο ορός γάλακτος. Οι μύκητες παράγουν πολύ σταθερά ένζυμα και ειδικότερα πολλά είδη του *Aspergillus spp.* είναι αποδεκτά ως «γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (GRAS) από τον FDA. Επιπλέον, οι β-γαλακτοσιδάσες από μύκητες αναφέρονται ότι είναι θερμοανθεκτικές και ως εκ τούτου, υδρολύουν περίπου το 75% της λακτόζης του ορού γάλακτος.

Ο *A. oryzae* παράγει εξωκυτταρική β-γαλακτοσιδάση που χρησιμοποιείται σε εμπορική κλίμακα. Το ένζυμο που προέρχεται από το *A. oryzae* αναφέρθηκε ότι είναι περισσότερο εφαρμόσιμο για τη χρήση ορού γάλακτος σε σύγκριση με την υδρόλυση λακτόζης, ενώ η β-γαλακτοσιδάση που προέρχεται από τον *A. niger* συνήθως εμπλέκεται στην απομάκρυνση των υπολειμμάτων γαλακτόζης από ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες που προέρχονται από φυτά, παρά στην υδρόλυση της λακτόζης (Kazemi et al. 2016). Αυτό έχει αποδειχθεί μέσω διαφορετικών ρυθμών έκφρασης σε πηγές άνθρακα, όπου η υψηλότερη έκφραση αυτού του γονιδίου *lacA* που κωδικοποιεί το ένζυμο έχει αναφερθεί για την αραβινόζη, την πηκτίνη και την ξυλόζη (Borglum and Sternberg 1972).

Η β-γαλακτοσιδάση από μικροβιακές πηγές παρουσιάζουν μεγάλη βιομηχανική σημασία κυρίως λόγω του εύχρηστου χειρισμού τους, της μεγαλύτερης καταλυτικής τους δραστηριότητας, αλλά και για την υψηλή απόδοση παραγωγής (Panesar et al. 2010). Ακόμη, είναι ένα από τα βιομηχανικά σημαντικά ένζυμα που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα διατροφικών εφαρμογών, επεξεργασίας τροφίμων και περιβαλλοντικών εφαρμογών. Περαιτέρω έρευνα σχετικά με αυτό το ένζυμο θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση των ζητημάτων που σχετίζονται με τα τρόφιμα και άλλες συναφείς βιομηχανίες. Από μελέτες έχουν αναφερθεί πως οι β-γαλακτοσιδάσες προέρχονται και από τα εξής στελέχη μικροοργανισμών, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3: Η β-γαλακτοσιδάση σε διάφορα στελέχη μικροοργανισμών.

<i>Aspergillus awamori</i>	Vidya et al. 2020
<i>Aspergillus oryzae</i>	Tanaka et al. 1975
<i>Aspergillus niger</i>	Panesar et al. 2006
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	Cardoso et al. 2017
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Schmidt et al. 1987
<i>Lactococcus lactis</i>	David et al. 1992
<i>Escherichia coli</i>	Huber 1983

1.2.1 *Aspergillus awamori*

Στη φύση οι νηματοειδείς μύκητες συμπεριλαμβανομένων των μελών του γένους *Aspergillus*, ανήκουν στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι μύκητες αυτοί είναι σε θέση να χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία άνθρακα και πηγές αζώτου εκκρίνοντας ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών ενζύμων στο περιβάλλον τους. Επίσης, λόγω της υψηλής ικανότητάς τους να εκκρίνουν ένζυμα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ομόλογων και ετερόλογων πρωτεϊνών. (Fowler et al. 1991; Van den Hondel et al. 1991; Verdoes et al. 1995). Τα είδη των *Aspergillus* καταλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα σε ζώα και σε φυτά, αλλά και χαρακτηρίζονται ως επιβλαβείς ή χρήσιμοι μικροοργανισμοί. Μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές σε διαφορετικά στάδια (Kozakiewicz 1989; Abarca et al. 2004; Samson et al. 2004). Ακόμα χρησιμοποιούνται συχνά στη βιομηχανία ζύμωσης για παραγωγή οργανικών οξέων, ενζύμων, βιταμινών και αντιβιοτικών. (Varga et al. 2000).

Ο *Aspergillus awamori* περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Nakazawa (1907) με βάση το στέλεχος IFO 4033, και λέγεται ότι είναι η πιο ευνοϊκή μούχλα για το koji της αλκοολικής ζύμωσης του *A. awamori*. Ο Μουρακάμι χαρακτήρισε τη σειρά *A. awamori* με μικρό και καφέ κονίδιο στην κεφαλή, με αφομοίωση νιτρικών και με υψηλή παραγωγή αμυλάσης (Murakami 1979). Ωστόσο, εκτός από την παραγωγή αμυλάσης παράγει και άλλα ένζυμα όπως αναφέρεται στον Πίνακα 1.4. Ο *A. awamori* έχει αναφερθεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία, και έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα

είδη ζυμώνσεων. Η κατάσταση του *A. awamori* έχει αναθεωρηθεί αρκετές φορές με διάφορα συνώνυμα π.χ. *A. pseudoniger* ή *A. pseudocitricus* (Mosseray 1934), *A. usamii* (Sakaguchi et al. 1951) και *A. niger* var. *awamori* (Al-Musallam 1980). Πιο πρόσφατα έχει χαρακτηριστεί ως συνώνυμο του *A. niger* από τους Samson et al. (2004).

Πίνακας 1.4: Παραγωγή ενζύμων από το μύκητα *A. awamori*

Πολυγαλακτουρονάση	Blandino et al. 2002; Diaz et al. 2012
Φωσφατάση	Koutinas et al. 2007
Γλυκοαμυλάση	Koutinas et al. 2007
Πρωτεάση	Koutinas et al. 2007
Πηκτινάση	Diaz et al. 2012
Γλυκανάσες	Espinheira et al. 2020
Ξυλανάση	Umsza-Guez et al. 2011; Diaz et al. 2012
Κυτταρινάση	Naher et al. 2021
Γλυκοσιδάση	Nishida et al. 2018

1.3 Παραγωγή και εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο οργανικό βιοπολυμερές στη φύση (Keshk 2014; Son et al. 2003). Αποτελεί βασικό συστατικό της φυτικής βιομάζας (PC), αλλά αντιπροσωπεύει και τα μικροβιακά εξωκυτταρικά πολυμερή. Η βακτηριακή κυτταρίνη (BC) ανήκει στην κατηγορία των προϊόντων του μεταβολισμού και λειτουργεί ως μια προστατευτική μεμβράνη, ενώ η φυτική κυτταρίνη (PC) έχει δομικό ρόλο. Η φυτική κυτταρίνη συνυπάρχει με τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παραχθεί εύκολα σε καθαρή μορφή. Η δυσκολία αυτή δημιουργεί την ανάγκη αναζήτησης νέων πηγών κυτταρίνης με υψηλότερη σταθερότητα (Lestari et al. 2014).

Οι δύο αυτές μορφές κυτταρίνης, αν και διαφορετικής προέλευσης, είναι ισομερείς ενώσεις, δηλαδή παρουσιάζουν τον ίδιο μοριακό τύπο, $(C_6H_{10}O_5)_n$. Ωστόσο, οι δύο

αυτές μορφές κυτταρίνης αυτές διαφέρουν τόσο ως προς τις φυσικές, όσο και ως προς τις χημικές τους ιδιότητες. Η βακτηριακή κυτταρίνη προτιμάται της φυτικής λόγω του υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού, της ικανότητας συγκράτησης νερού, της υψηλότερης συγκράτησης σε δυνάμεις εκφυλισμού, αλλά και λόγω του μεγαλύτερου δείκτη κρυσταλλικότητας. Επιπροσθέτως, τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης είναι 100 φορές πιο λεπτά από εκείνα της φυτικής, γεγονός που την καθιστούν ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, το οποίο επιτρέπει τη μεταφορά αντιβιοτικών ή και άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος λειτουργώντας έτσι και ως εμπόδιο σε εξωτερικές μολύνσεις (Okiyama et al. 1993).

Η σύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης μελετήθηκε κατά το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα. Οι έρευνες και οι μελέτες για τη σύνθεσή της, χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Acetobacter xylinum*, ξεκίνησαν από τους Hestrin et al. (1954), οι οποίοι απέδειξαν ότι το στέλεχος αυτό παράγει κυτταρίνη με τη βοήθεια της γλυκόζης, αλλά και του οξυγόνου. Μικροοργανισμοί όπως φύκη, μύκητες και βακτήρια έχει βρεθεί ότι είναι επίσης ικανοί να παράξουν κυτταρίνη (Chawla et al. 2009). Αρχικά, έχει μελετηθεί πως η κυτταρίνη, αν και σε μικρές ποσότητες, υπάρχει στα καφέ φύκη (*Phaeophyta*), στα κόκκινα φύκη (*Rhodophyta*), αλλά και στα χρυσά φύκη (*Chrysophyta*). Επίσης, η παρουσία της έχει αναφερθεί και σε μερικούς μύκητες με τη μορφή κυτταρικού τοιχώματος, αποτελούμενη από μονάδες D-γλυκάνης συνδεδεμένες με β -1 $\rightarrow$ 3 και β -1 $\rightarrow$ 6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η χιτίνη έχει αντικατασταθεί από κυτταρίνη και αντιπροσωπεύει το 15% της ξηρής μάζας του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον αναφέρεται η παραγωγή κυτταρίνης από τα Gram⁻ βακτήρια που ανήκουν στα γένη: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacte*, *Aerobacter*, *Sacrina*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Alcaligenes* (Jonas and Farah 1998).

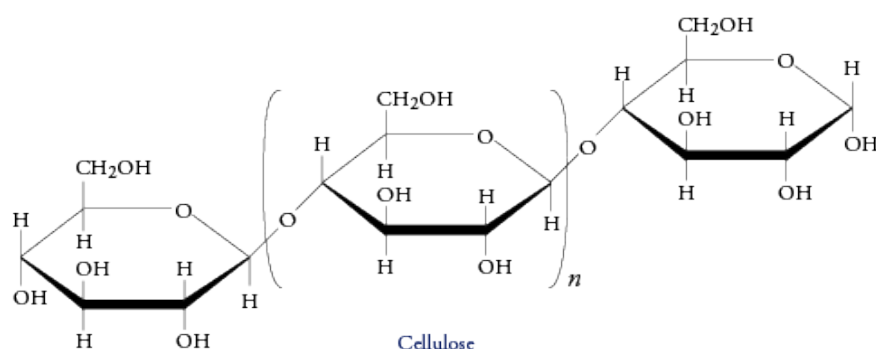
Έχει αποδειχθεί όμως ότι τα πιο αποδοτικά μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και πιο συγκεκριμένα τα στελέχη *A. xylinum*, *A. hansenii* και *A. pasteurianus* (Chawla et al. 2009).

Ωστόσο, το βακτήριο *A. xylinum* (ή *Gluconacetobacter xylinus*) έχει καθιερωθεί ως μικροοργανισμός πρότυπο για την σύνθεση της κυτταρίνης. Το στέλεχος αυτό είναι αρνητικό κατά Gram, ανήκει στα υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια και είναι ραβδόμορφο. Το βακτήριο αυτό έχει μια ασυνήθιστη αντοχή στο οξύ και μπορεί να επιβιώσει σε PH κάτω από 5 (Klemm et al. 2001). Παράγει κυτταρίνη σε τιμές pH 3-7

και σε θερμοκρασίες 25-30°C (Sheykhnazari et al. 2011). Χρησιμοποιούνται γλυκόζη, σουκρόζη και μαννιτόλη ως πηγές άνθρακα για τη σύνθεση της κυτταρίνης από το *A. xylinum* (Sheykhnazari et al. 2011). Τέλος, όπως προαναφέρθηκε το *A. xylinum* χρησιμοποιεί πηγές άνθρακα για τη παρασκευή της κυτταρίνης με απόδοση 50%.

1.3.2 Βιοσύνθεση

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, αποτελούμενο από μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα με β -1 $\rightarrow$ 4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1.3). Έρευνες έχουν δείξει πως είναι χημικά ίδια με την κυτταρίνη που απομονώνεται από τα φυτά, αλλά όπως προαναφέρθηκε τόσο η μακρομοριακή της δομή όσο και οι ιδιότητές της διαφέρουν. Οι αλυσίδες της βακτηριακής κυτταρίνης σχηματίζουν υποϊνίδια με πλάτος 1,5nm. Τα υποϊνίδια αυτά κρυσταλλώνονται σε μικροϊνίδια (Jonas and Farah, 1998) και έπειτα αυτά σε δέσμες και τελικά σε κορδέλες (Iguchi et al. 2000).



Εικόνα 1.3 Επαναλαμβανόμενη μονάδα κυτταρίνη.

Ωστόσο η μακροσκοπική μορφολογία της εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας (Watanabe et al. 1998a; Iguchi et al. 2000). Αρχικά, σε στατικές συνθήκες, τα βακτήρια συσσωρεύονται στην κυτταρική μεμβράνη η οποία σχηματίζεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού μέσω των μικροϊνιδίων, τα οποία δημιουργούν άλλα αποδιοργανωμένα επίπεδα σχηματίζοντας μια πυκνή πλεγματοειδή δομή και έχουν τόσο κάθετες, όσο και παράλληλες κατευθύνσεις. (Jonas and Farah 1998).

Αναφορικά με τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης υπάρχουν δύο τύποι οπερονίων συνθάσης κυτταρίνης στο βακτηριακό γονιδίωμα που κωδικοποιεί τις βακτηριακές πρωτεΐνες κυτταρίνης, ο τύπος I και ο τύπος II. Το οπερόνιο *bcsI* τύπου I περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα γονίδια όπως, *bcsAI*, *bcsBI*, *bcsCI* και *bcsDI*. Το οπερόνιο τύπου II πλαισιώνεται από βοηθητικά γονίδια (*cmcAx*, *cspAx* και *hglAx*), τα οποία ρυθμίζουν τη διεργασία της βιοσύνθεσης της κυτταρίνης συμπληρώνοντας το οπερόνιο *bcs* στον πολυμερισμό των αλυσίδων γλυκάνης, στη συσκευασία ινιδίων και στην κρυστάλλωση κυτταρίνης. Το οπερόνιο συνθάσης κυτταράσης τύπου II (*bcsII*) συνθέτει ακυλιωμένη κυτταρίνη λόγω της παρουσίας ενός γονιδίου ακυλοτρανσφεράσης εντός του οπερονίου (Umenda et al. 1999). Η έκφραση αυτών των οπερονίων είναι συστατική, ωστόσο κυμαίνεται ανάλογα με την ανάπτυξη και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτήριο *A. xylinum* συμβαίνει κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής του (Freitas et al. 2011) η οποία είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων η οποία αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων και από σύμπλοκα καταλυτικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά για τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης πραγματοποιούνται τα εξής δύο βήματα:

(i) Σχηματισμός β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και πολυμερισμός

Το ένζυμο συνθάση καταλύει τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης και πολυμερίζει την γλυκόζη σε β-(1→4) ομάδες γλυκάνης, τα μόρια τους συσσωματώνονται σε υποϊνίδια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποτελούν το προ-κυτταρικό πολυμερές. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως έχουν καταγραφεί δύο υποθέσεις σχετικά με την βιοσύνθεση της κυτταρίνης από το στέλεχος *A. xylinum*. Η πρώτη αναφέρεται στην απουσία λιπιδικού ενδιάμεσου κατά τον πολυμερισμό των β-(1→4) ομάδων γλυκάνης, ενώ στη δεύτερη υπόθεση παρουσιάζεται το λιπιδικό ενδιάμεσο.

(ii) Τη δημιουργία αλυσίδας της κυτταρίνης

Τα μόρια των υποϊνιδίων εξωθούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον σχηματίζοντας μικροϊνίδια διαμέτρου 2-4nm τα οποία είναι και η πρωταρχική μορφή της κυτταρίνης. Τα ινίδια κρυσταλλοποιούνται σε ταινίες κυτταρίνης, οι οποίες αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας έτσι ένα δισδιάστατο επίπεδο. Επιπροσθέτως, παράλληλα επίπεδα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals, με αποτέλεσμα να διαμορφωθεί ένα ζελατινώδες εναιώρημα στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας που ονομάζεται βακτηριακή κυτταρίνη (Breet 2000). Αυτή η διαδικασία κατά την οποία

σχηματίζονται αλυσίδες κυτταρίνης, περιγράφεται ως κυτταρικά κατευθυνόμενη. Αυτό συμβαίνει διότι, αν και πραγματοποιείται εξωκυτταρικά, ο αμοιβαίος προσανατολισμός και η σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης, ο σχηματισμός των ινιδίων και ταινιών κυτταρίνης διέπονται από την αρχική διάταξη των πόρων εξώθησης του κυττάρου.

1.3.3 Εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη αποτελεί πηγή διαιτητικών ινών και έχει ταυτοποιηθεί ως «Γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής» (GRAS), αλλά και έγινε δεκτή από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Ποτών (FDA) το 1992. Λόγω των μοναδικών της ιδιοτήτων, όπως η υψηλή καθαρότητα, η ικανότητα συγκράτησης νερού, ο υψηλός βαθμός κρυσταλλικότητας και η υψηλή πυκνότητα, την καθιστούν χρήσιμη σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς όπως: στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας, χάρτου, τροφίμων, φαρμάκων αλλά και στην επεξεργασία αποβλήτων.

Θεωρείται ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, γεγονός που την έχει καταστήσει ιδανική για την αποτελεσματική μεταφορά αντιβιοτικών και φαρμάκων και προϊόν πληθώρας μελετών. Ταυτόχρονα λειτουργεί ως εμπόδιο που αποτρέπει τη δημιουργία επιμολύνσεων. Επίσης, εξαιτίας της υψηλής της ικανότητας συγκράτησης νερού έχει την ικανότητα να διατηρεί την υγρασία στην πληγή, με αποτέλεσμα να μειωθεί ο πόνος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η εταιρία Biofill από την Βραζιλία δημιούργησε δύο προϊόντα κυτταρίνης, το Bioprocess και το Gengiflex (126) τα οποία έχουν εφαρμογή τόσο στον τομέα της χειρουργικής όσο και στα οδοντικά εμφυτεύματα. Ακόμα, έχει εφαρμοστεί και σε αρκετά σημαντικούς τομείς όπως οστικά μοσχεύματα, μηχανική ιστών, αλλά και αναγέννηση (Svensson et al. 2005; Puppi et al. 2010). Επιπροσθέτως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί λόγω της μορφοποίησής της σε διάφορα σχήματα, αλλά και τη διατήρηση των ιδιοτήτων της.

Μια πρωταρχική και πιο γνωστή εφαρμογή της είναι η χρήση της ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του γηγενούς επιδορπίου των Φιλιππίνων nata de coco (Εικόνα 1.4). Για την δημιουργία του γλυκού αυτού, χρησιμοποιούνται φύλλα από τζελ βακτηριακής κυτταρίνης πάχους 1cm, τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση με νερό καρύδας, έχουν κοπεί σε σχήμα κύβου και τέλος εμβαπτίζονται σε ζάχαρη. Ακόμα, χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως σταθεροποιητικός παράγοντας, αλλά και ως πηκτικό

μέσο για τη διατήρηση του ιξώδους των τροφίμων. Έπειτα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε φυτικές ίνες έχει εφαρμοστεί στα τρόφιμα ως παράγοντας μείωσης θερμίδων.

Επιπλέον, στις χρήσεις της μπορεί να συμπεριληφθεί και η ιδιότητα του πρόσθετου σε ποτά διαίτης στην Ιαπωνία από το 1922. Ένα τέτοιο ποτό είναι το Kombucha που έχει ως βάση του το τσάι. Πιθανές εφαρμογές της κυτταρίνης είναι η χρήση της ως σταθεροποιητικός και πηκτικός παράγοντας καθώς έχει βρεθεί να είχε θετική επίδραση κατά την προσθήκη της σε καρυκεύματα σε μορφή πάστας και σε παγωτά (Okiyama et al. 1993). Τα προϊόντα που περιέχουν βακτηριακή κυτταρίνη μπορούν να διατηρήσουν την υγρασία τους για τουλάχιστον ένα μήνα αποθήκευσης. Σε μελέτη που προστέθηκε κυτταρίνη σε προϊόν από γάλα σόγιας παρένθεση (Tofu) σε ποσοστό 0,2-0,3% η συνεκτικότητα του πηκτώματος αυξήθηκε σημαντικά, προσδίδοντας καλύτερη υφή και σταθερότητα στο προϊόν (Okiyama et al. 1993). Ακόμη η χρήση της ως ζελατινοποιητής και ως παράγοντας αναστολής σε σοκολατούχο ρόφημα, απέτρεψε την καθίζηση του κακάο, λόγω της ικανότητας του πλέγματος της βακτηριακής κυτταρίνης να συγκρατήσει το σωματίδιο του κακάου (Shi et al. 2014).

Στις μέρες μας, είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων, φυσικών πρόσθετων των τροφίμων με χαμηλά ή χωρίς λιπαρά, με σκοπό την μείωση της θερμιδικής τους αξίας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η προσθήκη 10% κυτταρίνης σε προϊόν κρέατος έδωσε παρόμοιες ιδιότητες, γεύση και διάρκεια ζωής, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως αντικαταστάτης του λίπους σε προϊόντα κρέατος και ως εξωτερικό περίβλημα στα λουκάνικα (Lin et al. 2004).

Κατά την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης, το μέσο καλλιέργειας αντιπροσωπεύει περίπου το 30% του συνολικού κόστους (Jozala et al. 2016). Επομένως, μια σημαντική και προκλητική πτυχή της διαδικασίας της ζύμωσης είναι ο προσδιορισμός ενός νέου οικονομικά αποδοτικού μέσου καλλιέργειας, ο οποίος μπορεί να διευκολύνει την παραγωγή υψηλής απόδοσης σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παραδοσιακά, η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γλυκερόλη ήταν προτιμώμενες πηγές άνθρακα για την παραγωγή κυτταρίνης (Chawla et al. 2009; Mohammadkazemia et al. 2015). Για να μειωθεί το κόστος βιοσύνθεσής της, πολλοί ερευνητές προτείνουν τώρα τη χρήση των ακόλουθων μέσων που περιλαμβάνουν διάφορα απορρίμματα: άχυρο σίτου (Chen et al. 2013), υδρόλυμα έλατου (Guo et al. 2013), εκχυλίσματα ζεστού νερού από ξύλο (wood hot water extracts) (Erbaş et al.

2015), αγροτοβιομηχανικά υπολείμματα ανανά (Algar et al. 2015), απόβλητα από τη γαλακτοβιομηχανία (Carreira et al. 2011; Suwanposri et al. 2014; Jozala et al. 2016) κ.α.



Εικόνα 1.4: Επιδόρπιο nata de coco

1.4 Οξυγαλακτικά βακτήρια

1.4.1 Χαρακτηριστικά και λειτουργικές ιδιότητες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων με μια σειρά κοινών μορφολογικών, μεταβολικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών, τα οποία είναι αρνητικά στη καταλάση, μη σπορογόνα, αναερόβια αλλά αεροανεκτικά (Axelsson 1993). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει κόκκους (*streptococcus*, *pediococcus*, *leuconostoc*) και ράβδους (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*), (Kandler 1986). Τα βακτήρια αυτά συναντώνται στην αναπνευστική, στην εντερική και τη γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων, και σε αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες της ομάδας B, αμινοξέα, ανόργανα συστατικά κ.α. (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Αρκετά στελέχη έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τα σάκχαρα, λακτόζη και γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή προϊόντων με κυριότερο το γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικά) ή γαλακτικό οξύ, CO₂, αιθανόλη ή/και οξικό οξύ (ετεροζυμωτικά) (Καμιναρίδης & Μοάτσου 2009).

Η διάκριση των οξυγαλακτικών βακτηρίων γίνεται ανάλογα με το μεταβολισμό των σακχάρων σε τρεις ομάδες:

- I. Τα είδη που μεταβολίζουν υποχρεωτικά ομοζυμωτικά τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ, ενώ δεν ζυμώνουν τις πεντόζες.
- II. Τα είδη που μεταβολίζουν τις εξόζες προαιρετικά ομοζυμωτικά, αλλά σε ανεπάρκεια γλυκόζης ακολουθούν ετεροζυμωτικό τύπο ζύμωσης και ζυμώνουν τις πεντόζες μέσω της οδού της φωσφοκετολάσης (6-PG/PK) προς γαλακτικό και οξικό οξύ, αιθανόλη και CO₂.
- III. Τα είδη που είναι υποχρεωτικά ετερωζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι που μεταβολίζουν τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO₂.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν ένα μακρόχρονο και ασφαλές ιστορικό εφαρμογής στα τρόφιμα (Caplice and Fitzgerald 1999). Όπως προαναφέρθηκε, οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο τελικό προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού τους, αλλά και για τη σύνθεση μεταβολιτών που επηρεάζουν ευεργετικά τις θρεπτικές, οργανοληπτικές και τεχνολογικές ιδιότητες των προϊόντων ζύμωσης. Για του λόγους αυτούς τα LAB έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί: ως καλλιέργειες εκκίνησης, ως προβιοτικά, αλλά και στην παραγωγή ενώσεων λόγω του ευπροσάρμοστου μεταβολισμού τους (Naeem et al. 2012; Emerenini et al. 2013; Ruiz Rodriguez et al. 2017a).

Ως προβιοτικά προσδιορίζουμε “ζωντανούς μικροοργανισμούς”, οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε επαρκείς ποσότητες επιδρούν θετικά στην υγεία του ξενιστή. Τα οφέλη από την κατανάλωσή του περιλαμβάνουν τη διέγερση της βλεννογόνου ανοσίας, τη μείωση παθολογικών αλλοιώσεων και αλληλεπίδραση με μεσολαβητές φλεγμονή μεταξύ άλλων (Salminen et al. 2005). Το γένος *Lactobacillus* είναι ένας κοινός μικροοργανισμός στη γαστρεντερική οδό (gastrointestinal tract, GIT) των θηλαστικών και είναι δυνητικά προβιοτικός οργανισμός που συμβάλλει στην υγεία του ξενιστή (Koskenniemi et al. 2009). Η πλειονότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Για να είναι κατάλληλο για προβιοτική χρήση ένα βακτηριακό στέλεχος πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: (i) Επιβίωση από τη διέλευσή του μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (GIT), (ii) Ανθεκτικότητά σε καταστάσεις GIT, όπου περιλαμβάνουν όξινο pH και χολικά άλατα (Lee et al. 2008). Το καλύτερο αποδεδειγμένο όφελος για την υγεία για πολλά προβιοτικά στελέχη είναι η μείωση της διάρροιας (Salminen et al. 2005). Άλλες ασθένειες του εντέρου μπορούν επίσης να μετριαστούν με προβιοτικά. Επιπλέον η χρήση προβιοτικών μπορεί να σχετίζεται με την ανακούφιση της δυσκοιλιότητας και της δυσανεξίας στη λακτόζη. Επιπροσθέτως, τα προβιοτικά

μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην αύξηση της άμυνας του ξενιστή και έτσι να μειώνουν τη συχνότητα ή τη διάρκεια μολύνσεων όπως το κοινό κρυολόγημα. Τέλος, έχει αποδειχθεί πως βοηθούν στη πρόληψη αλλεργικών διαταραχών (Baken et al. 2006).

1.4.2 Γαλακτική ζύμωση και παραγωγή ζυμούμενου γάλατος

Η γαλακτική ζύμωση είναι μια αναερόβια διεργασία κατά την οποία το γαλακτικό οξύ σχηματίζεται από το πυροσταφυλικό οξύ σαν συνέχεια της γλυκολυτικής πορείας. Κατά τη ζύμωση των εξοζών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ακολουθούνται δύο μεταβολικά μονοπάτια: η ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση και η ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατά την ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση μετατρέπουν τη μισή περίπου ποσότητα του σακχάρου σε γαλακτικό οξύ και την άλλη μισή σε CO₂, αιθανόλη και οξικό οξύ. Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται από την απουσία του ενζύμου αλδολάση, χρησιμοποιούν όμως τη μεταβολική οδό της φωσφοροκετολάσης που παράγει ακετυλοφωσφορικό οξύ και 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεϋδη. Το ακέτυλο-φωσφορικό οξύ, υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπονται σε αιθανόλη, αντίδραση η οποία αναγεννά NAD⁺ (Αγγελής 2007). Στα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν τα στελέχη των γενών *Lactobacillus*, *Leuconotoc* και *Carnobacterium* (Κοτζεκίδου - Ρούκα 2000).

Στην ομοζυμωτική οξυγαλακτική ζύμωση τα βακτήρια μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ. Το αποτέλεσμα είναι η πλήρης μετατροπή ενός μορίου σακχάρου σε δύο μόρια γαλακτικού οξέος. Χρησιμοποιούν το σύστημα PTS - γλυκόζης, κατά το οποίο το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ είναι ο δότης της φωσφορικής ομάδας. Με τη διαδικασία αυτή, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό και ο μεταβολισμός αναφέρεται ως ομογαλακτική ζύμωση. Στα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, ανήκουν στελέχη των γενών *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* και *Pediococcus* (Κοτζεκίδου - Ρούκα 2000).

Ζυμούμενα γάλατα είναι η συλλογική ονομασία προϊόντων όπως το γιαούρτι, το, το κεφίρ, το ξινόγαλα, το βουτυρόγαλα, η ξινόκρεμα (crème fraîche και sour cream), το κουμίσ (προϊόν με βάση το γάλα φοράδας). Η γενική ονομασία του γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση προέρχεται από το γεγονός ότι το γάλα εμβολιάζεται με

καλλιέργεια εκκίνησης που αντίστοιχα μετατρέπει μέρος της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Ανάλογα με τον τύπο των χρησιμοποιούμενων οξυγαλακτικών βακτηρίων, στη διαδικασία μετατροπής σχηματίζονται διοξείδιο του άνθρακα, οξικό οξύ, διακετύλιο, ακεταλδεΰδη και πολλές άλλες ουσίες, οι οποίες δίνουν στα προϊόντα τη χαρακτηριστική φρέσκια γεύση και άρωμα. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή του κεφίρ και του κουμίζ παράγουν επίσης αιθυλική αλκοόλη. Το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση είχε αρχική προέλευση από την Ανατολή και στη συνέχεια έγινε δημοφιλές στην Ανατολική και Κεντρική Ευρώπη. Το πρώτο παράδειγμα γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση προφανώς παρήχθη κατά λάθος από νομάδες. Αυτό το γάλα έγινε ξινό και πήζει υπό την επίδραση ορισμένων μικροοργανισμών. Η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ έχει συντηρητική δράση στο γάλα. Το χαμηλό pH του καλλιεργημένου γάλακτος αναστέλλει την ανάπτυξη αλλοιογόνων βακτηρίων και άλλων επιβλαβών μικροοργανισμών, παρατείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Στην παραγωγή γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση, πρέπει να δημιουργηθούν οι καλύτερες δυνατές συνθήκες ανάπτυξης για την καλλιέργεια εκκίνησης. Εκτός από τη γεύση και το άρωμα, η σωστή εμφάνιση και συνοχή είναι σημαντικά χαρακτηριστικά. Αυτά καθορίζονται από την επιλογή των παραμέτρων προεπεξεργασίας. Οι περιγραφές της διαδικασίας για άλλα προϊόντα επικεντρώνονται κυρίως στα στάδια παραγωγής που διαφέρουν από εκείνα της παραγωγής γιαουρτιού.

Το ξινόγαλα αποτελεί ένα προϊόν όμοιας σύνθεσης και παχύρρευστης υφής του γάλακτος το οποίο διαθέτει, έντονη αρωματική γεύση, υπόξινο χαρακτήρα (Ζερφυρίδης, 2001). Πιο συγκεκριμένα, το ξινόγαλα είναι ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας, διότι περιέχει ποικιλίες πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Ακόμα, περιλαμβάνει λακτόζη, πολλές βιταμίνες, διάφορα μέταλλα και μικρά ποσοστά λίπους. Το ξινόγαλα παρέχει πολύ σημαντική στήριξη στο στομάχι και συμβάλει στην απορρόφηση του στοιχείου του ασβεστίου από το έντερο (Καραουλάκης, 2005). Επιπλέον, παρέχει αντιμικροβιακή δράση, λόγω του υψηλού αριθμού βακτηρίων τα οποία επικεντρώνονται σε εντερικές λοιμώξεις. Επιπροσθέτως, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως συμβάλλει στην βελτίωση της κινητικότητας του εντέρου και αναδημιουργεί τη φυσική μικροχλωρίδα του. Τέλος, μπορεί να καταναλωθεί από άτομα τα οποία πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη (Ζερφυρίδης 1996).

1.5 Η τεχνική της ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση χρησιμοποιείται ευρέως για τη βελτίωση των διαδικασιών βιοκατάλυσης. Η ακινητοποίηση ορίζεται ως μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη φυσική ή χημική σταθεροποίηση των κυττάρων, ενζύμων, και άλλων ενώσεων, (π.χ. αντισώματα) σε κάποιο στερεό υπόστρωμα, ή μήτρα ή συγκρατούνται από κάποια μεμβράνη, προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητα/λειτουργικότητα τους και να διευκολυνθούν την επαναλαμβανόμενη ή συνεχιζόμενη χρήση τους (IUPAC 1997). Τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης περιλαμβάνουν τον εύκολο διαχωρισμό του βιοκαταλύτη από τα προϊόντα της διεργασίας, ο οποίος επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του συστήματος σε επαναλαμβανόμενες και συνεχείς διεργασίες, προστασία του προσαρτημένου βιοκαταλύτη από περιβαλλοντικές επιπτώσεις, υψηλότερες αποδόσεις και παραγωγικότητα λόγω της αυξημένη συγκέντρωση του βιοκαταλύτη, καθώς και καλύτερη σταθερότητα διεργασίας και αποθήκευσης. Επιπλέον, ακινητοποιημένα συστήματα βιοκαταλυτών έχουν χαμηλότερη ευαισθησία στις επιμολύνσεις (Jahnz et al. 2001; Jekel et al. 1998).

Με την πάροδο των χρόνων, πολλές τεχνικές ακινητοποίησης έχουν αναπτυχθεί. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και βασικές μέθοδοι είναι προσρόφηση ή η δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών σε στερεούς φορείς, η διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ βιοκαταλυτών και πολυμερών, η ενθυλάκωση από μεμβράνες και η παγίδευση σε πορώδεις μήτρες. Άλλοι τύποι αντιπροσωπεύουν συνδυασμούς αυτών των μεθόδων (Dolejš et al. 2014β).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιακά στελέχη

Για παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης και την μετέπειτα υδρόλυση του τυρογάλακτος χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *A. awamori* 2B.361U 2/1 το οποίο και παραχωρήθηκε από το Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων (Δρ. Α. Κουτίνας) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το στέλεχος διατηρούνταν στους 4 °C σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) πληρωμένους με 2% w/v άγαρ και 5% πίτυρο σίτου (Tsakona et al. 2014). Για την παρασκευή εμβολίου της ζύμωσης, ο μύκητας αναπτυσσόταν για 5 ημέρες στους 30 °C σε στερεό υπόστρωμα με σκοπό την δημιουργία σπορίων.

Το στέλεχος *A. xylinum* 15973 της εταιρίας DMS χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η προετοιμασία του εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε μέσο Hestrin–Schramm (HS) (Πίνακας 2.1) (Son et al. 2003). Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού αναπτυσσόταν στους 30 °C για 48 h υπό ανάδευση (180 rpm) (Paximada et al. 2016).

Για την παραγωγή του πρότυπου βιοκαταλύτη και την παραγωγή του ξινογάλατος χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα στελέχη *Lactobacillus pentosus* FMCC B329 και *Lactobacillus plantarum* LQC 820 (Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας και Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Πίνακας 2.1: Υλικά θρεπτικού υποστρώματος (HS) για την ανάπτυξη του *A. xylinum*.

Σύσταση	Περιεκτικότητα g/L
Γλυκόζη	20
Πεπτόνη	5
Εκχύλισμα ζύμης	5
Όξινο φωσφορικό νάτριο	2,7
Κιτρικό οξύ	1,15

2.2 Παραγωγή ενζύμων με ζύμωσης στερεάς κατάστασης

Τα πειράματα για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων πραγματοποιήθηκαν σε ζύμωσεις στερεάς κατάστασης (SSF) σε πίτουρο σίτου (WB). Το WB που χρησιμοποιήθηκε στη ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF) αποτελούνταν από 26% υδατάνθρακες, 14% πρωτεΐνες, 0,01% αλάτι και αγοράστηκε από μια τοπική αγορά. Πιο συγκεκριμένα, 5 g WB (ξηρό βάρος) ζυγίστηκαν και αποστειρώθηκαν σε φιάλες Erlenmeyer των 250 mL. Εναιωρήματα περίπου 2×10^6 σπορίων/mL παρασκευάστηκαν συλλέγοντας τα σπόρια των προκαλλιιεργειών των μυκήτων ηλικίας μετά από 5 ημέρες επώασης. Στη συνέχεια αποστειρωμένες φιάλες WB εμβολιάστηκαν με τα εναιωρήματα των προ-καλλιιεργειών και επωάστηκαν στους 28 °C υπό στατικές συνθήκες και η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε στις 79 h σε ποσοστό υγρασία 70% (Lappa et al. 2021).



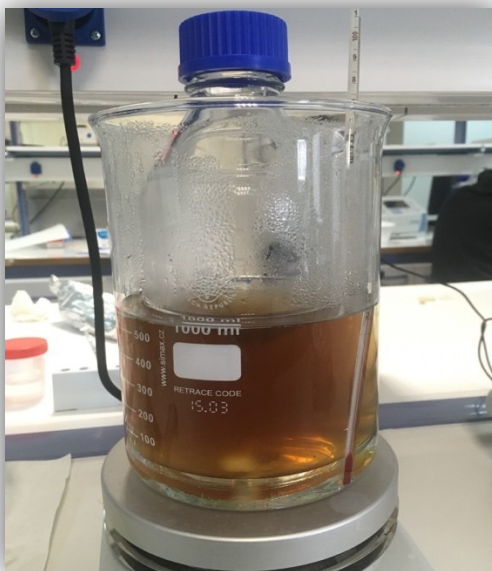
Εικόνα 2.2: Εμβολιασμένα πίτουρα με τον μύκητα *A. awamori*

2.3 Υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος από μικροβιακή β-γαλακτοσιδάση

Στο τέλος της διαδικασίας ζύμωσης, τα στερεά WB αναμίχθηκαν επιμελώς με αποπρωτεϊνωμένο ορό γάλακτος (1:10 w/v) στις 120 rpm για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (Nizamuddin et. al 2008). Ο αποπρωτεϊνωμένος ορός γάλακτος (περίπου 50 g/L λακτόζη) ήταν ευγενική χορηγία από την γαλακτοκομική βιοτεχνία «Γαλιατσάτος» (Κεφαλονιά, Ελλάδα).

Τα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα διηθήθηκαν μέσω στείρας γάζας και φυγοκεντρήθηκαν περαιτέρω στις 4000 rpm για 20 λεπτά. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην υδρολυτική ικανότητα των ενζύμων αξιολογήθηκε στους 40–70

°C για 60 ώρες. Η δοκιμασία υδρόλυσης της λακτόζης βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας ποικίλες αρχικές ενζυμικές ενεργότητες των 7, 5, 11 και 15 U/mL και τα πειράματα υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν σε 500 mL τελικό όγκο υπό ανάδευση. Μετά το τέλος της διεργασίας έγινε φυγοκέντρηση του υδρολυμένου τυρογάλακτος και το υπερκείμενο αποστειρώθηκε και διατηρήθηκε στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση του. Τα ποσοστά των υδρολυμένων σακχάρων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης καθώς η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) με την μέθοδο της νινυδρίνης (Lie 1973) (Ενότητα 2.7).

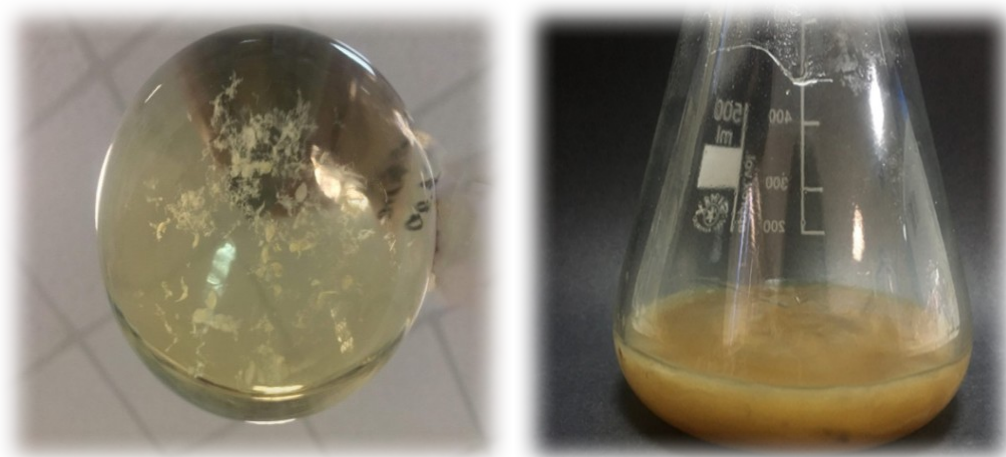


Εικόνα 2.3: Υδρόλυση τυρογάλακτος σε ελεγχόμενη θερμοκρασία

2.4 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από τον *Acetobacter xylinum*

Το τυρόγαλα που επεξεργάστηκε με τα παραγόμενα ακατέργαστα ένζυμα αξιολογήθηκε περαιτέρω ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από το είδος *A. xylinum*. Στο στάδιο αυτό της μελέτης πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες των 250 mL και ενεργό όγκο 50 mL υπό στατικές συνθήκες (pH 6.0) με αρχικό όγκο εμβολίου 10% v/v (Lappa et al. 2021). Τα σάκχαρα μαζί με την κατανάλωση FAN προσδιορίστηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι μεμβράνες της κυτταρίνης καθαρίστηκαν με 0,1% NaOH στους 80 °C για 30 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση των βακτηριακών κυττάρων και την απομάκρυνση των συστατικά

του υποστρώματος. Επιπλέον οι μεμβράνες πλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό μέχρι την εξισορρόπηση του pH. Περαιτέρω, ξηράνθηκαν στον αέρα στους 40 °C μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ο προσδιορισμός του ξηρού βάρους της παραγόμενης κυτταρίνης.



Εικόνα 2.4: Προκαλλιέργεια *A. xylinum* (A), παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη (B)

2.5 Παραγωγή πρότυπου βιοκαταλύτη LAB

Ως φορείς ακινητοποίησης στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε η κυτταρίνη σε δύο μορφές. Στην πρώτη επεξεργασία, η κυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε στην αρχική της μορφή, ως φιλμ, ενώ στη δεύτερη επεξεργασία τα φιλμ αναμίχθηκαν με νερό σε αναλογία 1:2 (w/v) και κόπηκαν σε μικρά κομμάτια (~1 mm) με τη βοήθεια ενός πολυκόφτη και η κυτταρίνη συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση (7.000 rpm, 10 λεπτά). Η κυτταρίνη αποστειρώθηκε για 15 λεπτά στους 121 °C πριν από τη χρήση. Η ακινητοποίηση των μικροοργανισμών στους φορείς πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο «προσρόφησης-επώασης» όπως περιγράφεται από τους Żywicka et al. (2019) and Lappa et al. (2021) ελαφρώς τροποποιημένη. Πιο αναλυτικά, 10 g κυτταρίνης προστέθηκαν σε αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα και το σύστημα αφέθηκε για 12 ώρες στους 37 °C με σκοπό την ακινητοποίηση των κυττάρων. Υγρές και λυοφιλωμένες οξυγαλακτικές καλλιέργειες στελεχών χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ικανότητας ακινητοποίησης των κυττάρων στην κυτταρίνη. Οι υγρές καλλιέργειες που διατηρήθηκαν στους -80 °C ανανεώθηκαν σε υπόστρωμα MRS με επώαση για 24 ώρες στους 30 °C πριν από τη χρήση, ενώ οι λυοφιλωμένες καλλιέργειες που

διατηρήθηκαν στους 4 °C προστέθηκαν απευθείας στο αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα. Μετά την ακινητοποίηση, οι αντίστοιχοι βιοκαταλύτες διαχωρίστηκαν από το υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες, ξεπλύθηκαν εις διπλούν δύο φορές σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με σκοπό την απομάκρυνση των ελαφρώς προσκολλημένων κυττάρων αλλά και του θρεπτικού υποστρώματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μικροβιολογικές αναλύσεις για να αξιολογηθεί η επιτυχής ακινητοποίηση των κυττάρων στους φορείς. Συγκεκριμένα, για την απαρίθμηση των κυττάρων LAB, 10 g από κάθε βιοκαταλύτη ομογενοποιήθηκαν με 90 mL διαλύματος Ringer και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις. Τα εναιωρήματα ενσωματώθηκαν σε τρυβλία MRS και ο αριθμός των πληθυσμών εκφράστηκε ως log cfu/g κυτταρίνη. Οι παραγόμενοι βιοκαταλύτες αποθηκεύτηκαν στους 4 °C σε αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα και αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την ζυμωτική τους ικανότητα αλλά και τη ζωτικότητα τους. Το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίστηκε ως εξής: $(\log \text{ cfu/g } \text{τελικό} / \log \text{ CFU } \text{αρχικό}) \times 100$. Για τη αξιολόγηση της ζυμωτικής ικανότητας των βιοκαταλυτών πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας σε τελικό όγκο 100 mL τυρόγαλακτος (~50 g/L λακτόζης). Για τον εμβολισμό του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε 5% (w/v) ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης.

2.6 Εισαγωγή ακινητοποιημένων φορέων σε τρόφιμο για παραγωγή καινοτόμου προϊόντος.

Για την παρασκευή του ξινογάλακτος χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιημένο και παστεριωμένο αγελαδινό γάλα εμπορίου (pH 6,8). Σε όλες τις υπό μελέτη περιπτώσεις των βιοκαταλυτών η αρχική καλλιέργεια προστέθηκε σε λυοφιλιωμένη μορφή. Η παραγωγή του ξινογάλακτος αξιολογήθηκε σε δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις. Στην πρώτη μεταχείριση ο βιοκαταλύτης αφαιρέθηκε με το τέλος της ζύμωσης (ολόκληρα φιλμ) ενώ στη δεύτερη περίπτωση μελετήθηκε η παραμονή του βιοκαταλύτη στο πηγμένο γάλα καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης του. Επιπρόσθετα παράχθηκε ξινόγαλα με ελεύθερα κύτταρα του εκάστοτε μικροοργανισμού για λόγους σύγκρισης. Στη συνέχεια, το ξινόγαλα ψύχθηκε στους 4 °C και όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 4 εβδομάδες (4 °C) με σκοπό τη μικροβιολογική, φυσικοχημική και οργανοληπτική αξιολόγηση των προϊόντων.



Εικόνα 2.5: Παραγωγή ξινογάλακτος σε γυάλινους περιέκτες

2.6.1 Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις

Η βιωσιμότητα του *Lb. pentosus* και *Lb. Plantarum* αξιολογήθηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (1, 7, 14, 21, 28 ημέρες). Η απαρίθμηση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (Ενότητα 2.5). Επιπλέον, αξιολογήθηκε η πιθανή ανάπτυξη αλλοιογόνου μικροχλωρίδας. Η ανίχνευση εντεροβακτηρίων έγινε σε υπόστρωμα VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) στους 37 °C για 24h, ενώ η παρουσία ζυμών και μυκήτων ελέγχθηκε σε υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) στους 30 °C για 72h.

Η τιμή του pH του γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση μετρήθηκε με ψηφιακό πεχάμετρο (HI 98100, Hanna, US). Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας 0,1 mol/L NaOH με δείκτη φαινολοφθαλεΐνη και εκφράστηκε ως γαλακτικό οξύ ανά 100 g ξινόγαλου. Η ιδιότητα της συναίρεσης προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Terrou et al. (2017). Συγκεκριμένα, 2g από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το ποσοστό συναίρεσης προσδιορίστηκε ως $(Ws \times 100) / Wg$, όπου Ws η μάζα του τυρογάλακτος που διαχωρίστηκε κατά τη φυγοκέντρωση και Wg η αρχική μάζα του ξινογάλακτος.

2.6.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση του παραγόμενου ξινογάλακτος πραγματοποιήθηκε τη 14η ημέρα αποθήκευσης από 10 μέλη-πάνελ του εργαστηρίου. Τυχαιοποιημένα δείγματα (~ 50 mL) αξιολογήθηκαν για το χρώμα, τη ξινή οσμή, τη

γεύση, τη απαλότητα και τη συνολική αποδοχή με βάση μια κοινή κλίμακα αρεσκείας εννέα σημείων που κυμαίνεται από 1-9 (1 = Δεν μου αρέσει και 9 = Μου αρέσει εξαιρετικά). Χρησιμοποιήθηκε επίσης εμπορικό προϊόν για λόγους σύγκρισης.



Εικόνα 2.6. Οργανοληπτική αξιολόγηση ξινογάλακτος

2.7 Αναλυτικές μέθοδοι

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων κατά τη διαδικασία των εκάστοτε ζυμώσεων και των υδρολύσεων ποσοτικοποιήθηκε με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC), με ανιχνευτή διάθλασης (HPLC-RI), με στήλη Aminex HPX-87H column (300 mm length x 7.8 mm internal diameter) και θερμοστατούμενο φούρνο στους 65 °C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν 10 mM H₂SO₄ με ρυθμό ροής 0.6 mL/min (Papadaki et al. 2018).

Η ενεργότητα των πρωτεασών αξιολογήθηκε με βάση την παραγωγή του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων (FAN) μετά από υδρόλυση 7,5 g/L καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,2 M (pH 6,0) στους 55 °C για 30 λεπτά. Μία μονάδα (U) πρωτεολυτικής δραστηριότητας ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μg FAN σε ένα λεπτό υπό τις παραπάνω συνθήκες (Kachrimanidou et al. 2013).

Η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίστηκε με φωτομετρικό προσδιορισμό της ορθο-νιτρο-φαίνυλο -β-d-γαλακτοπυρανοσίδης (ONPG) σύμφωνα με τους Raol et al. 2015) με μικρές τροποποιήσεις. Συνοπτικά, 0,1 mL ακατέργαστου εκχυλίσματος προστέθηκε σε 0,4 mL ONPG (3,0 mM) διαλυμένο σε ρυθμιστικό κιτρικού νατρίου

(50 mM, pH 5,0) και επωάστηκε της 50 °C για 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη Na_2CO_3 (0,1 M) και η απελευθέρωση ο-νιτροφαινόλης υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 420 nm. Η καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα Ο-νιτροφαινόλης υπό τις ίδιες συνθήκες. Μία μονάδα (U) β-γαλακτοσιδάσης ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την απελευθέρωση 1 μmol Ο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό σύμφωνα με τη μέτρηση απορρόφησης, υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

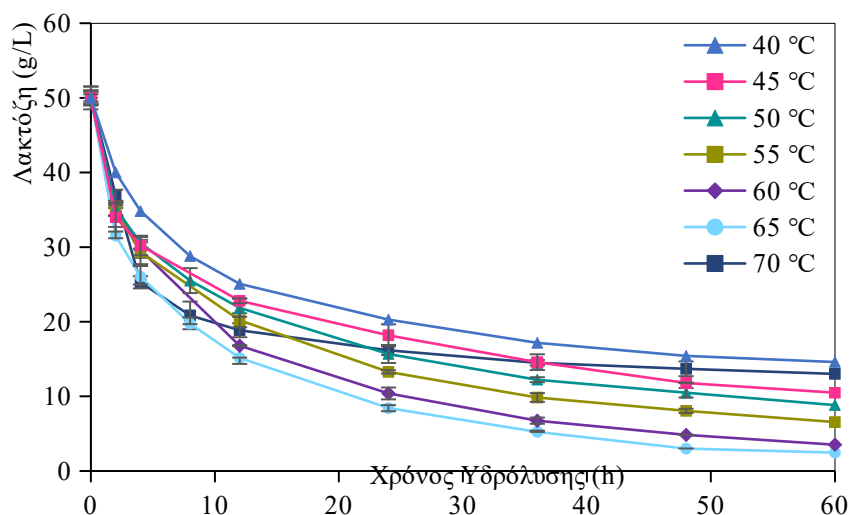
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Χρήση ενζύμων και υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος

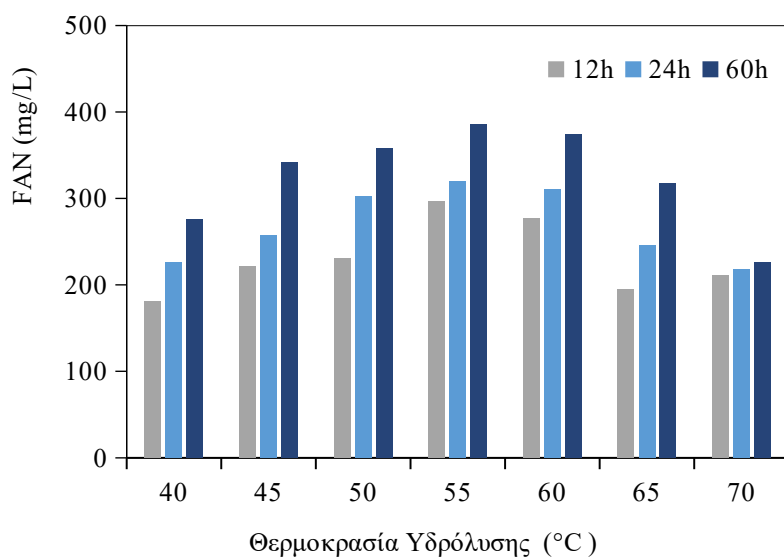
Στο πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης ερευνήθηκε ικανότητα παραγωγής ενζύμων από τον *A. awamori* και η μετέπειτα δραστικότητα όσον αφορά την λακτόζη του τυρογάλακτος. Με βάση προγενέστερα πειράματα οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής της β-γαλακτοσιδάσης είχαν προσδιοριστεί σε SSF με 70% αρχική υγρασία στις 79h και μέγιστη παραγωγή 148 U/g (Lappa et al. 2021). Γενικότερα, συνθήκες όπως θερμοκρασία μεταξύ 50 και 60°C και όξινες τιμές pH (3,5–4,5), έχουν αναφερθεί ως οι βέλτιστες ως προς τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης που προέρχεται από μύκητες (Cardoso et al. 2017; Silverio et al. 2018).

Στο **Γράφημα 3.1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών από τις υδρολύσεις του τυρογάλακτος σε διαφορετικές θερμοκρασίες υδρόλυσης (40-70 °C) αναφορικά με το χρόνο. Από τα δεδομένα που ελήφθησαν παρατηρείται πως η θερμοκρασία 60–65 °C ήταν η βέλτιστη θερμοκρασία ενεργότητας των ακατέργαστων ενζύμων που παρήχθησαν από το στέλεχος του *A. awamori*. Στο τελικό σημείο της διεργασίας η υδρόλυση ξεπέρασε το >90% της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης του τυρογάλακτος. Από την άλλη πλευρά, η βέλτιστη πρωτεολυτική ικανότητα η οποία παρατηρήθηκε στους 55 °C και έρχεται σε συμφωνία με προγενέστερη μελέτη των Tsakona et al. (2014). Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει το σημαντικό δυναμικό των ενζύμων, καθώς η θερμική σταθερότητα είναι επιτακτικής ανάγκης για διάφορες βιοδιεργασίες, αποτρέποντας διάφορες επιμολύνσεις (Turner et al. 2007; Rigoldi et al. 2018). Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2**, η παραγωγή FAN αυξήθηκε με την άνοδο της θερμοκρασίας έως τους 55 °C, ακολουθούμενη από μια σταδιακή μείωση όσο η θερμοκρασία αυξανόταν. Επιπλέον, τα αποτελέσματα που πήραμε δείχνουν ότι το ένζυμο είναι πιο προσιτό κατά τις πρώτες ώρες και συγκεκριμένα με υψηλότερο ρυθμός κατά τις πρώτες 12 ώρες υδρόλυσης, ακολουθούμενος από μειωμένο ρυθμό σε παρατεταμένο χρόνο υδρόλυσης. Αρκετές μελέτες συμπίπτουν με τέτοια ευρήματα όπου τα προϊόντα υδρόλυσης μείωσαν ή ακόμη και περιόρισαν την

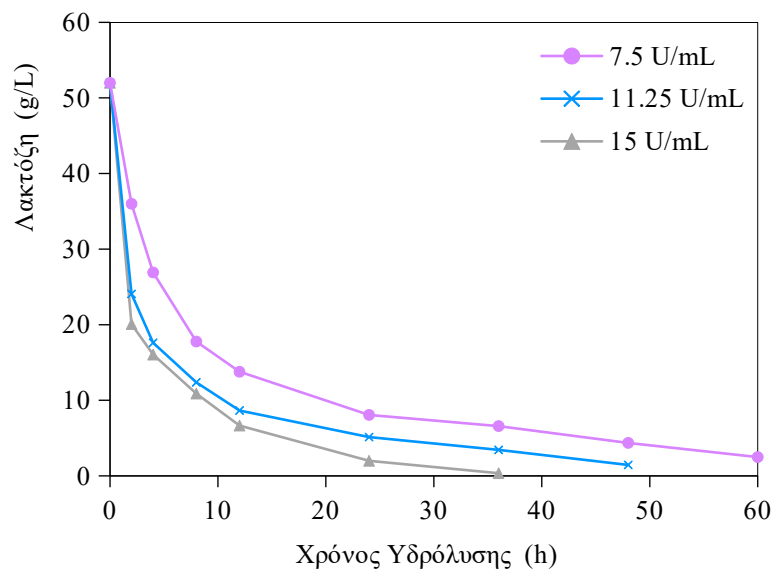
αντίδραση υδρόλυσης της λακτόζης (Ansari et al. 2012; Park et al. 2010; Gosling et al. 2010). Πράγματι, έχει διαπιστωθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτόζης, η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης είναι μειωμένη, καθώς θα μπορούσε να δράσει ως ανταγωνιστικός αναστολέας της β-γαλακτοσιδάσης (Ansari et al. 2010). Σε μια προσπάθεια περαιτέρω βελτιστοποίησης της υδρόλυσης του τυρογάλακτος, πραγματοποιήθηκαν της δοκιμές για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές αρχικές ενζυμικές δραστηριότητες 7,5, 11, 15 U/mL. Το **Γράφημα 3.3** παρουσιάζει το κινητικό προφίλ της υδρόλυσης της λακτόζης, ενώ το **Γράφημα 3.4** παρουσιάζει την παραγωγή FAN. Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν πως η χρήση 15 U/mL είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη υδρόλυση λακτόζης στις 36 ώρες με παράλληλη παραγωγή 583,13 mg/L FAN. Από την άλλη πλευρά, οι αρχικές ενζυμικές δραστηριότητες των 7,5 και 11 U/mL απέδωσαν το 87 και 93% της υδρόλυσης αντίστοιχα, στον ίδιο χρόνο, παρέχοντας λίγο χαμηλότερη δραστηριότητα. Παρόλο που ο βαθμός υδρόλυσης δείχνει να ακολουθούσε μια δοσο-εξαρτώμενη τάση, πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να δύνανται να αλλάξουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης, αν και η πλήρης υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σημαντικά νωρίτερα στις υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις του ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι υπό αυτές τις συνθήκες η παραγωγή FAN σχεδόν διπλασιάστηκε. Οι Rosolen et al. (2015) παρουσίασαν της παρόμοια επίπεδα δραστηριότητας στην υδρόλυση της λακτόζης από το μύκητα *A. oryzae*, ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις ενζύμων που χρησιμοποιούνται (3, 6 και 9 U/mL). Παρόμοιες μελέτες υποδηλώνουν ότι η υδρόλυση της λακτόζης τυρογάλακτος δεν είναι αυστηρά ανάλογη με τη συγκέντρωση του ενζύμου (Ghosh et al. 2017; Horner et al. 2011). Ωστόσο, η πλήρης υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σχεδόν στο μισό χρόνο, χρησιμοποιώντας 15 U/mL, σε σύγκριση με την περίπτωση των 7,5 U/mL.



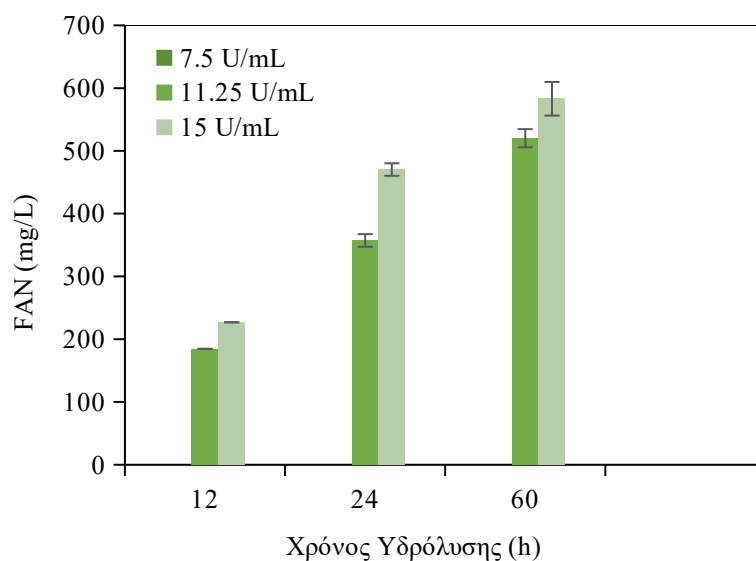
Γράφημα 3.1: Επίδραση της θερμοκρασίας στην υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος χρησιμοποιώντας ακατέργαστη β-γαλακτοσιδάση και πρωτεάσες.



Γράφημα 3.2: Επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή ελεύθερου αζώτου (FAN) από ακατέργαστες πρωτεάσες κατά την υδρόλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος.



Γράφημα 3.3: Επίδραση διαφορετικής αρχικής ενζυμικής συγκέντρωσης της β-γαλακτοσιδάσης στην υδρόλυση λακτόζης τυρογάλακτος.



Γράφημα 3.4: Επίδραση διαφορετικής αρχικής ενζυματικής δραστηριότητας πρωτεασών παραγωγή ελεύθερου αζώτου (FAN) του τυρογάλακτος.

3.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

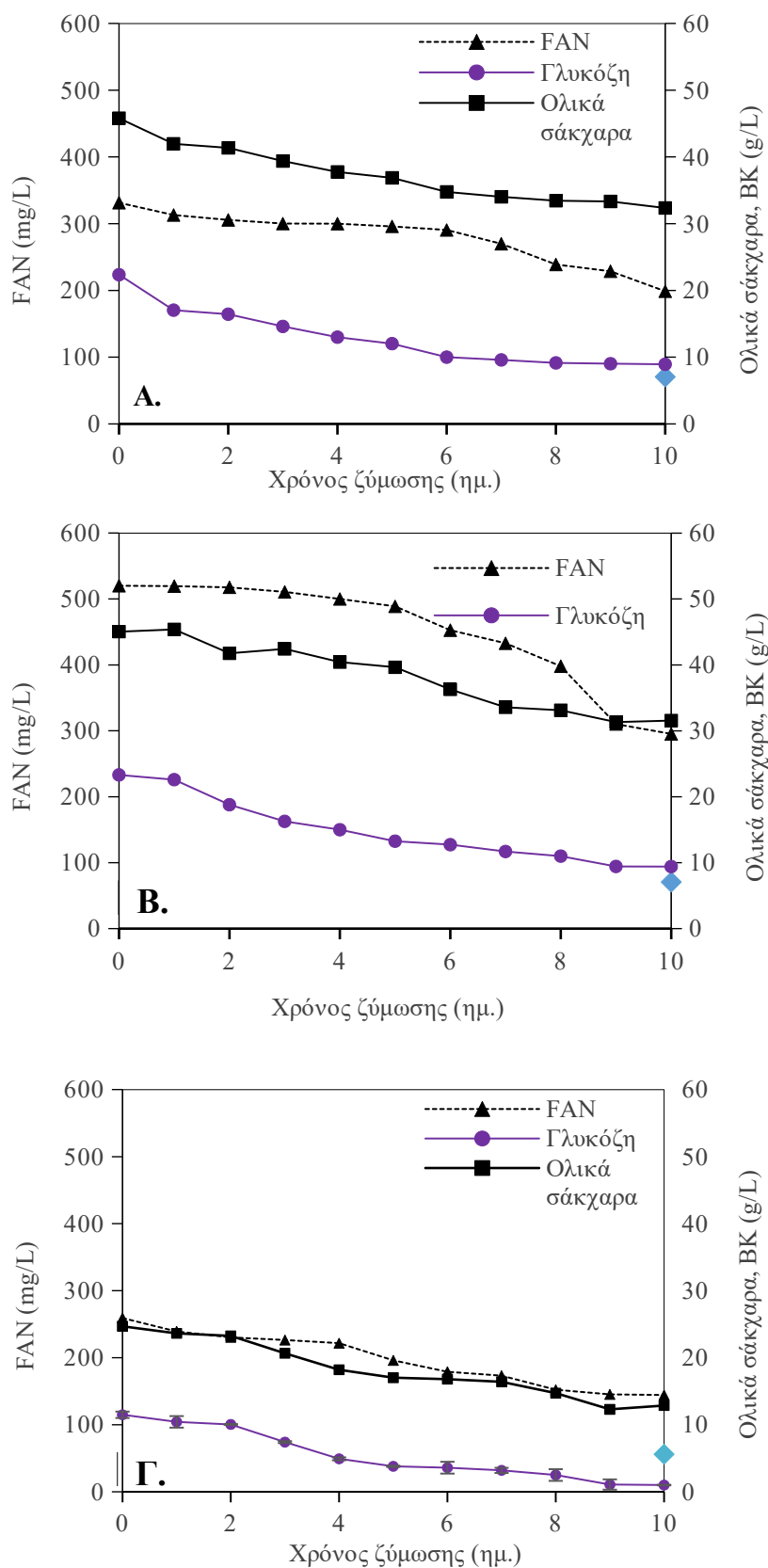
Το τυρόγαλα αποτελεί ένα ανανεώσιμο υπόστρωμα μηδενικού κόστους κατάλληλο για μικροβιακή ζύμωση, που απαιτεί ως επί το πλείστον ελάχιστη προ-επεξεργασία. Ωστόσο, συχνά η λακτόζη δεν υφίσταται ζύμωση από αρκετούς μικροοργανισμούς,

συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων οξικού οξέος. Προηγούμενες μελέτες έχουν της δείξει την επεξεργασία τυρογάλακτος μέσω της εφαρμογής μικροβιακής β-γαλακτοσιδάσης για τη δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Geiger et al. 2016; Sampaio et al. 2019). Όσον αφορά την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης, προηγούμενες αναφορές έδειξαν χαμηλή παραγωγή κυτταρίνης από τη χρήση τυρογάλακτος (μη υδρολυμένου), εμποδίζοντας έτσι την περαιτέρω εφαρμογή της. Ως εκ τούτου, η προ-επεξεργασία κρίνεται συχνά απαραίτητη έτσι ώστε να ξεπεραστούν τέτοιοι περιορισμοί. Εκτός αυτού, περιορισμένες μελέτες έχουν αξιολογήσει τη χρήση του τυρογάλακτος με σκοπό την παραγωγή κυτταρίνης (Semjonovs et al. 2017; Bekatorou et al. 2019). Με βάση προγενέστερες βιβλιογραφικές αναφορές, η παραγωγή της εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του μικροοργανισμού σε συνδυασμό σε μεγάλο βαθμό με το θρεπτικό υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί. Τα αποτελέσματα της τρέχουσας εργασίας επιβεβαίωσαν την ικανότητα του *A. xylinum* να αξιοποιεί το υδρόλυμα τυρογάλακτος σε τρία διαφορετικά σχήματα ζύμωσης. Συγκεκριμένα, όπως καταγράφονται και στον **Πίνακα 3.1**, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου και σακχάρου με βάση τα υδρόλύματα που προέκυψαν από τις διαφορετικές χρησιμοποιούμενες ενζυμικές συγκεντρώσεις (Ενότητας 3.1). Πιο αναλυτικά και με βάση το στο **Γράφημα 3.5A**, στο πρώτο σχήμα ζύμωσης που προήλθε από τα υδρόλύματα με τα 11,25 U/mL (υδρόλυμα A), παρατηρήθηκε η κατανάλωση 13,91 g/L γλυκόζης και 224,79 mg/L FAN με αποτέλεσμα την παραγωγή 7,05 g/L BC. Στη ζύμωση με το υδρόλυμα B, που προήλθε από τα υδρόλύματα με τα 7,5 U/mL, παρατηρήθηκε παρόμοια τάση όσον αφορά τον ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα κατανάλωση 13,41 g/L γλυκόζης και 132,64 mg/L FAN, οδήγησε σε 5,78 g/L παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (**Γράφημα 3.5B**).

Πίνακας 3.1: Πειραματικά σχήματα ζύμωσης τυρογάλακτος και υδρολυμάτων από το στέλεχος *A. xylinum*

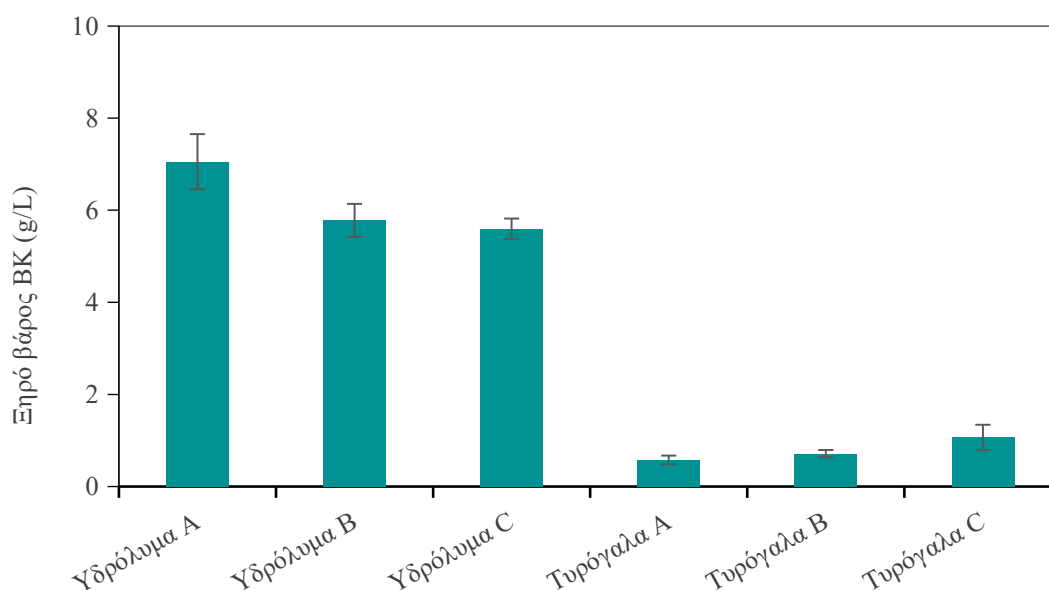
Υπόστρωμα Ζύμωσης	Αρχικά ολικά σάκχαρα (g/L)	Αρχική γλυκόζη (g/L)	Υπολειπόμενη γλυκόζη (g/L)	Αρχική FAN (mg/L)	Κατανάλωση FAN (mg/L)	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (g/L/d)	Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (g/L)
Υδρόλυμα Α	45,04	23,31	9,40	520,05	224,79	0,71	7,05
Υδρόλυμα Β	45,80	22,35	8,93	331,36	132,64	0,58	5,78
Υδρόλυμα C	24,68	11,48	1,00	259,25	114,94	0,56	5,59
Τυρόγαλα Α	50,00	2,51	0	56,00	19,49	0,06	0,58
Τυρόγαλα Β	24,45	1,28	0	22,98	22,98	0,07	0,71
Τυρόγαλα C	24,29	1,39	0	25,00	81,33	0,11	1,07

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι και στα δύο πειραματικά σχήματα σημαντική ποσότητα σακχάρων παρέμεινε αζύμωτη από τον *A. xylinum*. Ως εκ τούτου, εφαρμόστηκε και ένα τρίτο σχήμα αραιώνοντας το Υδρόλυμα Α σε αναλογία (1:1 τυρόγαλα:νερό) προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης σε περίπου 25 g/L συνολική περιεκτικότητα σακχάρων και 260 mg/L FAN (Υδρόλυμα C) όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.5Γ**. Στην πραγματικότητα, σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες, επιτεύχθηκε σχεδόν πλήρης κατανάλωση γλυκόζης μαζί με την κατανάλωση 114,94 mg/L FAN, επιτυγχάνοντας τελική συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης 5,59 g/L.



Γράφημα 3.5: Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (BK) και κινητική κατανάλωση σακχάρων και FAN, κατά τη διάρκεια ζύμωσης του υδρολυμένου τυρογάλακτος από τον *A. xylinum*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με αντίστοιχες μελέτες που περιγράφουν τη χρήση μονοσακχαριτών και δισακχαριτών ως πηγές άνθρακα για τη δημιουργία βακτηριακής κυτταρίνης από διάφορα στελέχη του είδους *Acetobacter spp.* (Semjonovs et al. 2017). Επιπλέον, οι Salari et al. (2019) αναφέρθηκαν πρόσφατα σε παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης 3,5 g/L εντός 14 ημερών από τη ζύμωση από το *Gluconacetobacter xylinum* PTCC 1734 σε στατικές καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας ένα ισομοριακό μείγμα γλυκόζης/γαλακτόζης από υδρολυμένο τυρόγαλα. Σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή κυτταρίνης με αύξηση της συγκέντρωσης FAN. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα παραγωγής κυτταρίνης από μη υδρολυμένο τυρόγαλα ήταν αρκετά κοντά σε αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Battad-Bernardo et al. 2004). Πιο συγκεκριμένα όπως παρουσιάζεται στο **Γράφημα 3.6** ο *A. xylinum* κατανάλωσε 19,49 mg/L FAN, παράγοντας 0,58 g/L κυτταρίνης σε μη υδρολυμένο τυρόγαλα (Τυρόγαλα Α).

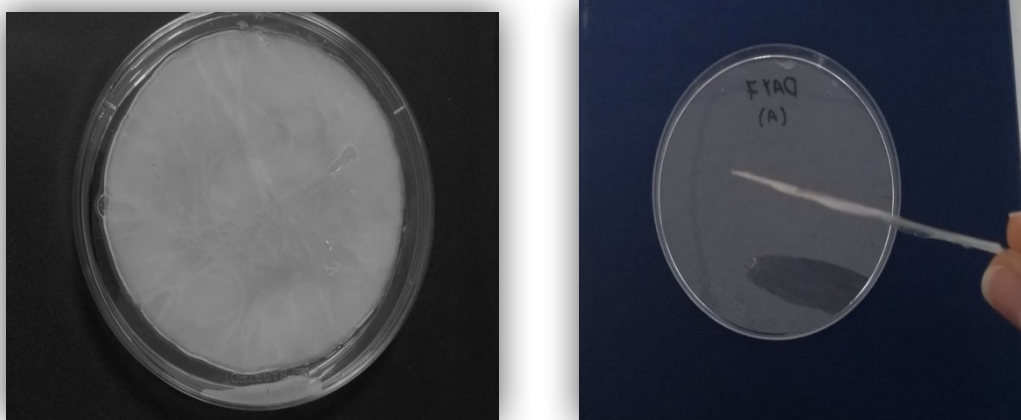


Γράφημα 3.6: Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από υδρολυμένο και μη τυρόγαλα.

Πρόσφατα, οι Kumar et al. (2021) ανέφεραν την παραγωγή 1,4 g/L κυτταρίνης υπό στατικές συνθήκες καλλιέργειας σε τυρόγαλα από το είδος *Acetobacter pasteurianus*. Ο σχηματισμός βακτηριακής κυτταρίνης σε αυτές τις περιπτώσεις συνήθως οφείλεται

στην παρουσία πολλών άλλων ενώσεων όπως κάποιες υπολειμματικές πηγές άνθρακα που μπορεί να προ-υπάρχουν από τα χρησιμοποιούμενα στα αρχικά εμβόλια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλότερη παραγωγή κυτταρίνης χρησιμοποιώντας αραιωμένο τυρόγαλα, κάτι που συμφωνεί με παρόμοιες μελέτες (Carreira et al. 2011). Συγκεκριμένα, ο *A. xylinum* παρήγαγε 0,71 g/L και 1,07 g/L π.χ., μετά από αραιώση του τυρογάλακτος (Τυρόγαλα Β) και εμπλουτισμού του με εκχύλισμα ζύμης ως επιπλέον πηγή αζώτου (Τυρόγαλα Γ). Γενικότερα, η λακτόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα αναφέρεται ως αδύναμο υπόστρωμα με την για την παραγωγή κυτταρίνης να φτάνει σε επίπεδα 0,04–0,07 g/L (Wang et al. 2019; Nguyen et al. 2008). Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τη χρήση μη υδρολυμένου τυρογάλακτος) είναι σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ενώ η παραγωγή της κυτταρίνης χρησιμοποιώντας τα προϊόντα υδρόλυσης του παρατηρήθηκε αισθητά υψηλότερη

Συνοψίζοντας θα λέγαμε πως στην παρούσα μελέτη, επιτεύχθηκε υψηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης χρησιμοποιώντας προϊόντα υδρόλυσης τυρογάλακτος σε σύγκριση ακόμη και με την παραγωγή κυτταρίνης χρησιμοποιώντας συμβατικό συνθετικό μέσο HS. Αυτά τα ευρήματα είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρα υποδεικνύοντας τη δυνατότητα για μια οικονομικά αποδοτική βιοδιεργασία.



Εικόνα 3.1: Παραγόμενα φιλμ βακτηριακής κυτταρίνης από υδρολυμένο τυρόγαλα.

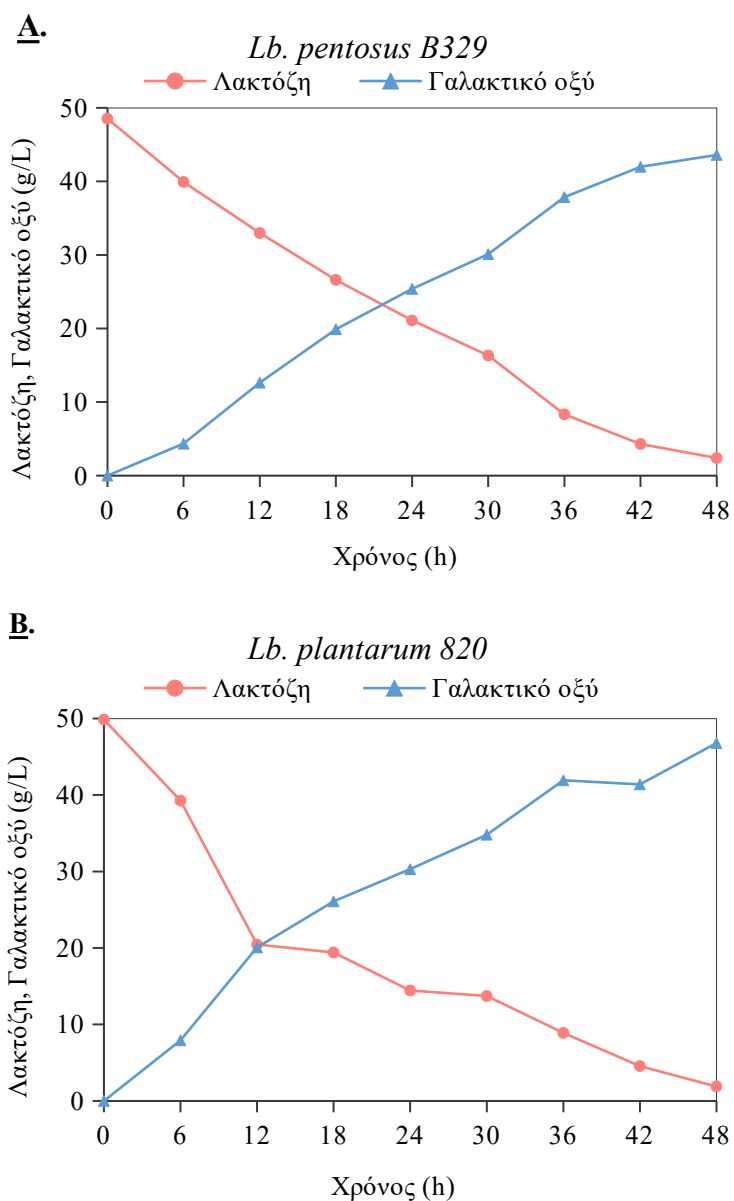
3.3 Παραγωγή και κινητικής ζύμωσης πρότυπου βιοκαταλύτη

Στη συνέχεια της μελέτης προσδιορίστηκε η ικανότητα ακινητοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη. Οι επιλεγμένες «έτοιμες προς χρήση» καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς στις αναπτυγμένες

μεμβράνες της κυτταρίνης. Και οι δύο μορφές που αναπτύχθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως κατάλληλοι φορείς για ακινητοποίηση των μικροοργανισμών αφού επικυρώθηκαν από τους αντίστοιχους καταμετρούμενους πληθυσμούς, σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.2**, όπου ο μέσος όρος των μικροβιακών πληθυσμών προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο 8.49 cfu/g κυτταρίνης. Αναφορικά με τις δύο διαφορετικές μορφές της κυτταρίνης που εξετάστηκαν τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές. Επιπλέον η χρήση λυοφιλιωμένων και μη στελεχών, έδωσε παρόμοια υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης. Η αποθήκευση των παραγόμενων βιοκαταλυτών έγινε στους 4 °C σε κλειστούς περιέκτες τυρογάλακτος. Η αξιολόγηση της ζυμωτικής ικανότητας των παραγόμενων βιοκαταλυτών κυτταρίνης έγινε επίσης σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ζύμωση της λακτόζης που κυμάνθηκε σε 95,2 % για το στέλεχος *Lb. pentosus* και αντίστοιχα 96,3% για *Lb. plantarum* (**Γράφημα 3.1A** και **3.1B**).

Πίνακας 3.2: Ακινητοποιημένος πληθυσμός LAB σε βακτηριακή κυτταρίνη.

Κύτταρα	Στελέχη	Υγρή Καλλιέργεια log cfu/g	Λυοφιλιωμένη καλλιέργεια log cfu/g
Ακινητοποίηση σε film BK	<i>Lb. pentosus</i> B329	8,80 ± 0,09	8,74 ± 0,06
Ακινητοποίηση σε blend BK	<i>Lb. pentosus</i> B329	8,33 ± 0,04	8,06 ± 0,03
Ακινητοποίηση σε film BK	<i>Lb. plantarum</i> 820	8,83 ± 0,05	8,58 ± 0,37
Ακινητοποίηση σε blend BK	<i>Lb. plantarum</i> 820	8,78 ± 0,28	8,43 ± 0,05

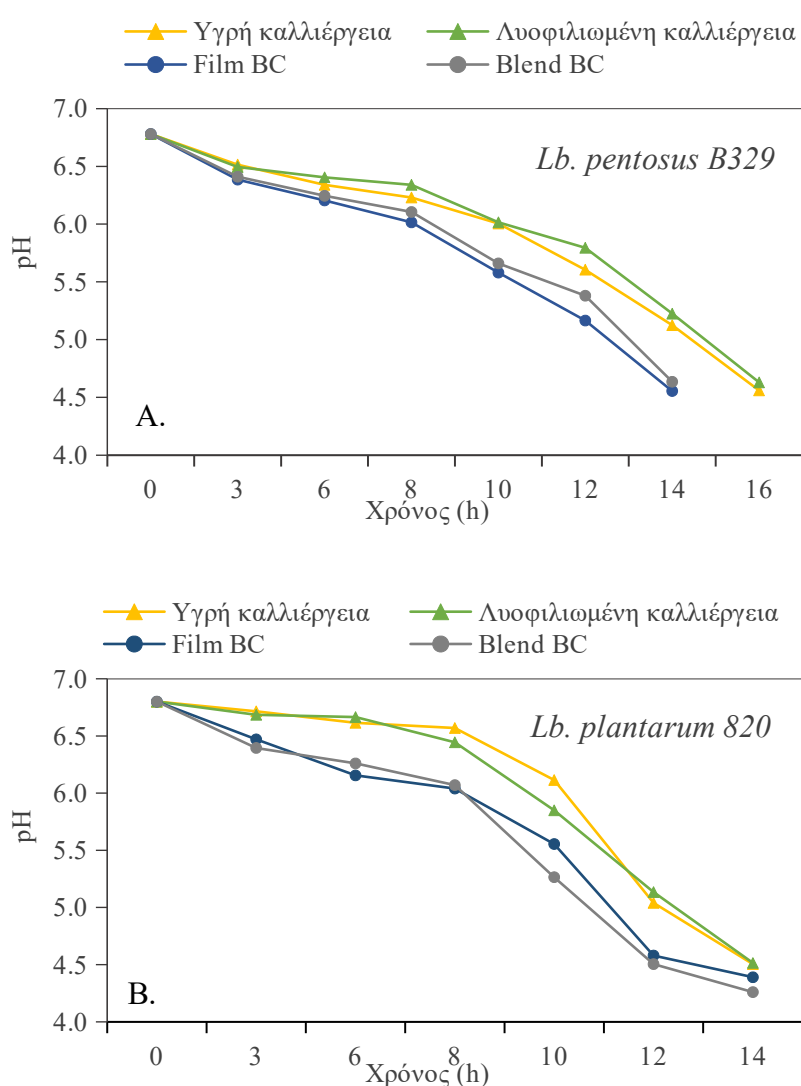


Γράφημα 3.7: Κινητική ζύμωση τυρογάλακτος από ακινητοποιημένο στελέχος *Lb. pentosus* B329 (A) και *Lb. plantarum* (B) σε βακτηριακή κυτταρίνη 37 °C.

3.4 Παραγωγή καινοτόμου προϊόντος

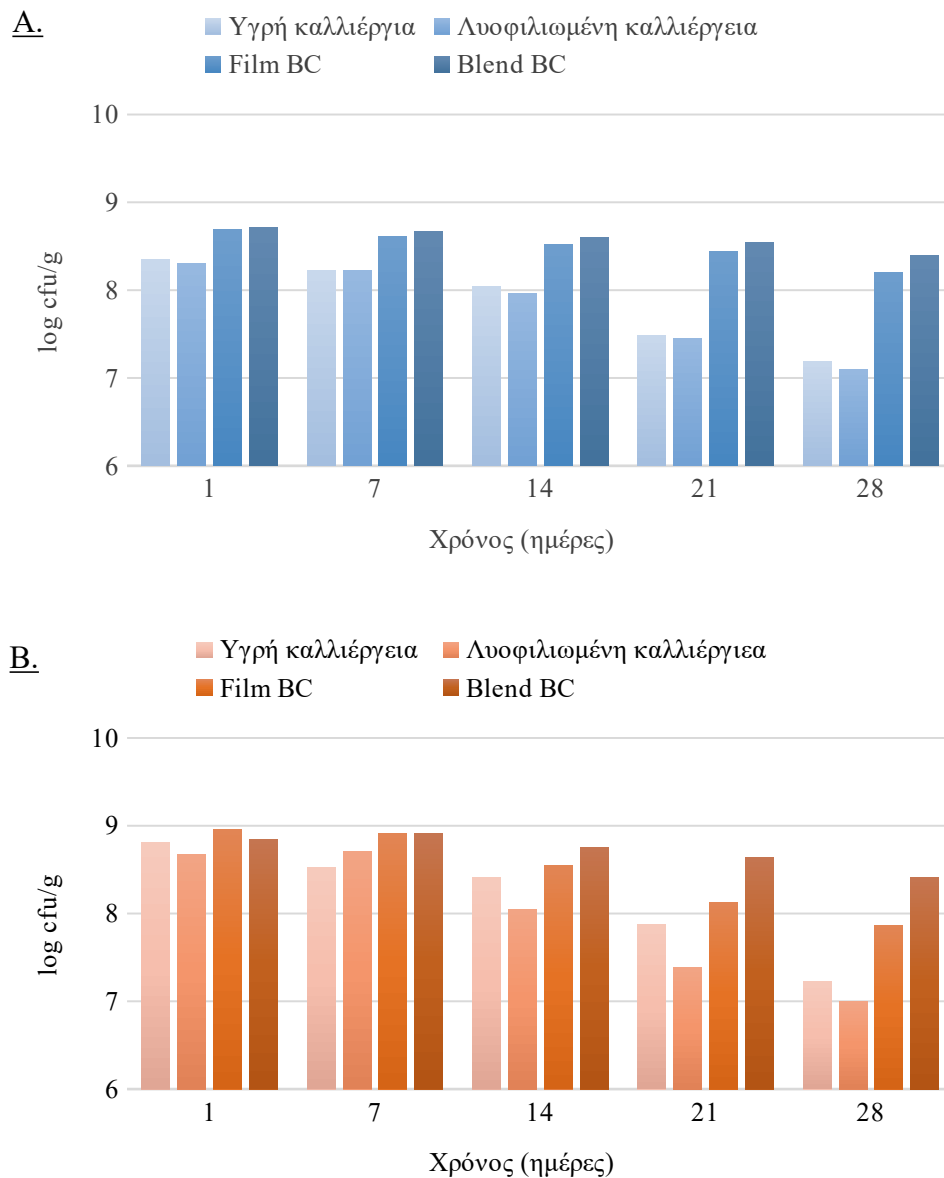
Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των έτοιμων προς χρήση βιοκαταλυτών αξιολογήθηκαν στην παραγωγή ζυμούμενου γάλατος. Το **Γράφημα 3.8** δείχνει την ικανότητα των ακινητοποιημένων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης. Η ζύμωση τους γάλακτος είτε από ελεύθερα είτε από ακινητοποιημένα στελέχη οδήγησε σε πτώση του pH σε τελικές τιμές 4,64 και 4,26 αντίστοιχα και στην

παραγωγή ξινογάλατος. Αναφορικά με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η ακινητοποίηση σε βακτηριακή κυτταρίνη ενίσχυσε την κινητική της οξίνισης του γάλακτος σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Ωστόσο, ο ρυθμός οξίνισης δεν επηρεάστηκε από τις διαφορετικές μορφές της βακτηριακής κυτταρίνης ή τα διαφορετικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιτυχής ενσωμάτωση των καλλιιεργειών στο ξινόγαλα προσδιορίστηκε κυρίως από την ικανότητα των κυττάρων να επιβιώνουν στις προκύπτουσες όξινες συνθήκες κατά την αποθήκευση του προϊόντος.



Γράφημα 3.8: Προφίλ οξίνισης γάλακτος με χρήση ελεύθερων και ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών των στελεχών *Lb. pentosus* B329 (A) και *Lb. plantarum* 820 (B).

Όπως αναπαριστάται στο **Γράφημα 3.9**, και οι δύο χρησιμοποιημένοι βιοκαταλύτες διατήρησαν υψηλή βιωσιμότητα $> 8 \log \text{ cfu/g}$ κατά την περίοδο αποθήκευσης 28 ημερών. Όσον αφορά τον βιοκαταλύτη που αφαιρέθηκε, και πάλι οι πληθυσμοί καταμετρήθηκαν από 8,2 και 7,8 cfu/g για το στέλεχος *Lb. pentosus* και *Lb. plantarum* αντίστοιχα. Στην περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων, οι πληθυσμοί παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότεροι ($\sim 7,0 \text{ cfu/g}$ σε σχέση με τα ακινητοποιημένα στελέχη. Είδη του γένους *Lactobacillus sp.* έχουν αναφερθεί ξανά ως προς τη χρήση τους για παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται στη μελέτη των Dimitrelou et al. (2019) για το στέλεχος *Lb. casei* όπου η ακινητοποίηση των κυττάρων σε κομμάτια μήλου έδωσε υψηλότερη δραστηριότητα ως προς την οξίνιση του γάλακτος σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Ωστόσο, η βιωσιμότητα είναι ο κύριος παράγοντας που θεωρείται ως η γενική προϋπόθεση και που καθορίζει την πραγματική βιομηχανική πρόκληση είναι η απαίτηση για τουλάχιστον $6 \log \text{ cfu/g}$ προβιοτικών και συμπληρωματικών καλλιεργειών στα τρόφιμα σύμφωνα με τον FDA των ΗΠΑ (Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών) (Terpou et al. 2019). Σε συμφωνία με τα αποτελεσματά μας, οι Terpou et al. (2017) παρατήρησαν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας του *Lb. casei* ακινητοποιημένο σε πίτουρο σιταριού.



Γράφημα 3.9: Πληθυσμός και βιωσιμότητα του *Lb. pentosus* B329 (A) και *Lb. plantarum* 820 (B) σε ξινόγαλα που παράγεται χρησιμοποιώντας ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα κατά τη διάρκεια αποθήκευσης μετά τη ζύμωση για 28 ημέρες (4 °C).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ζυμούμενου γάλατος που δημιουργήθηκαν από τη χρήση ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων κατά την αποθήκευση, συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.3**. Με βάση τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε πως η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αλλά και οι τιμές του pH επηρεάστηκαν από τον χρόνο

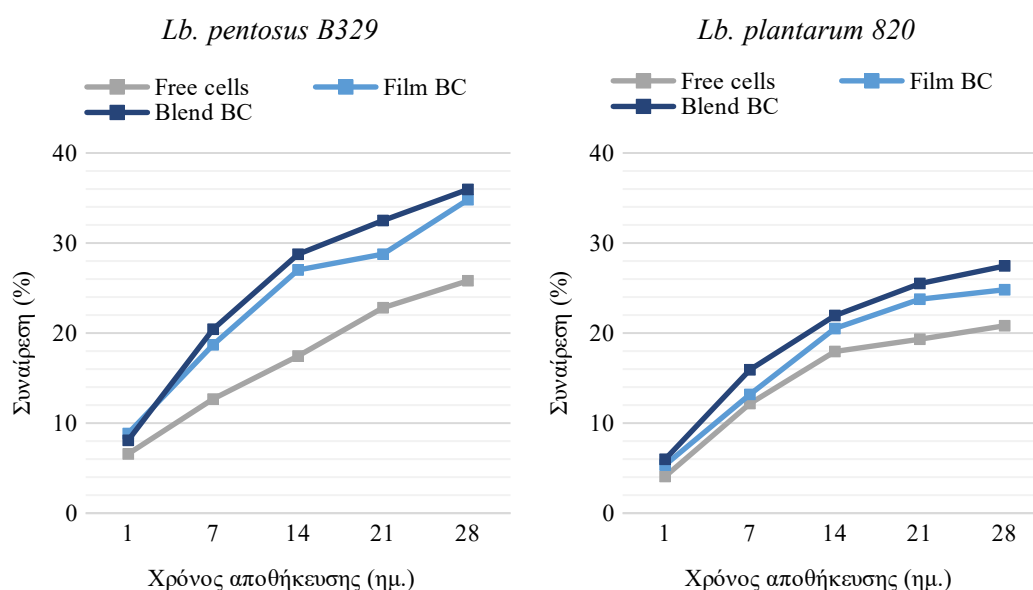
αποθήκευσης. Συγκεκριμένα οι τιμές του pH κυμάνθηκαν σε επίπεδα μεταξύ 4,50-3,73 όσον αφορά τα δείγματα του βιοκαταλύτη που αφαιρέθηκαν και 4,52-3,53 αναφορικά με την περίπτωση όπου ο βιοκαταλύτης παρέμεινε στο δείγμα καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και για το προφίλ της οξύτητας, ενώ καταδεικνύονται επίσης και διαφορές μεταξύ των δύο στελεχών. Όσον αφορά τη μελέτη της μικροβιολογικής σταθερότητας του ξινογάλακτος δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη εντεροβακτηρίων, μυκήτων και ζυμών σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις πιθανόν λόγω του υψηλού πληθυσμού των οξυγαλακτικών στελεχών αλλά και του χαμηλού pH των δειγμάτων.

Πίνακας 3.3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ζυμούμενου γάλατος που δημιουργήθηκαν από τη χρήση ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων κατά την αποθήκευση.

Χρόνος αποθήκευσης	Ελεύθερα κύτταρα		Φύμ BK		Blend BK	
	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<i>pH</i>						
1	4.50	4.40	4.50	4.40	4.52	4.22
7	4.46	4.12	4.45	4.06	4.44	3.82
14	4.44	4.07	4.39	3.95	4.41	3.75
21	4.35	3.94	4.31	3.86	4.37	3.56
28	4.31	3.90	4.30	3.73	4.23	3.53
<i>Τιτλοδοτούμενη οξύτητα</i>						
1	0.58	0.60	0.56	0.63	0.63	0.66
7	0.64	0.67	0.61	0.77	0.69	0.70
14	0.66	0.71	0.67	0.89	0.72	0.82
21	0.68	0.82	0.74	0.93	0.76	1.10
28	0.71	1.02	0.76	1.15	0.88	1.24

Η ιδιότητα της συναίρεσης του παραγόμενου ξινογάλατος απεικονίζεται στο **Γράφημα 3.10**. Παρατηρήθηκε πως ο χρόνος αποθήκευσης επηρέασε σημαντικά την αύξηση της συναίρεσης σε όλα τα δείγματα και επιπλέον προσδιορίστηκε πως η αύξηση αυτή πιθανόν να σχετίζεται με την πτώση του pH. Επιπλέον, υψηλότερες τιμές συναίρεσης εμφανίστηκαν στα δείγματα με τη χρήση των ακινητοποιημένων σε σύγκριση με τα ελεύθερα. Αυτό εξηγείται από την αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας του εναπομείναντος βιοκαταλύτη. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αποκλίσεις μεταξύ των δύο στελεχών που κυμαίνονται από 35,95-24,8% για τους βιοκαταλύτες και 25-20% για τις καλλιέργειες των ελεύθερων κυττάρων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση για όλα τα παραγόμενα ξινογάλατα σε σύγκριση με ένα προϊόν του εμπορίου όπου παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.4**. Γενικότερα, τα δείγματα που παρήχθησαν με το στέλεχος *Lb. pentosus* έλαβαν χαμηλότερες τιμές βαθμολογίας σε σύγκριση με την ομάδα των δειγμάτων του *Lb. plantarum*. Ειδικότερα, η αξιολόγηση έδειξε πως τα προϊόντα με τους βιοκαταλύτες που παρέμειναν στα προϊόντα έλαβαν υψηλότερη βαθμολογία σε σύγκριση με εκείνων που αφαιρέθηκαν. Τα δείγματα και για τα δύο στελέχη χαρακτηρίστηκαν από ευχάριστη υφή και γεύση όπως αναφέρθηκε σε παρόμοια μελέτη της βιβλιογραφίας (Terrou et al. 2017). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια πιο γλυκιά επίγευση γεγονός που εξηγεί τις χαμηλότερες τιμές βαθμολογίας αναφορικά με το κριτήριο της όξινης γεύσης. Όσον αφορά τη συνολική αποδοχή των προϊόντων, τα ξινογάλατα με το στέλεχος *Lb. plantarum* ήταν εκείνα που είχαν τη μεγαλύτερη αποδοχή όμοια με το εμπορικό προϊόν.



Γράφημα 3.10: Συναίρεση (%) ξινογάλακτος κατά τη συντήρησή του στους 4 °C για 28 ημέρες.

Πίνακας 3.4: Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων ξινογάλακτος

<i>Lb. pentosus</i> B329	Χρώμα	Οσμή	Γεύση	Εμφάνιση	Γενική αποδοχή
C1	8.5 ± 0.2	6.8 ± 0.4	6.3 ± 0.2	7.5 ± 0.4	6.8 ± 0.3
B1	7.2 ± 0.2	6.1 ± 0.4	5.9 ± 0.5	6.5 ± 0.2	6.0 ± 0.2
B2	6.8 ± 0.2	7.3 ± 0.3	7.1 ± 0.5	8.0 ± 0.2	6.5 ± 0.2
<i>Lb. plantarum</i> 820	Χρώμα	Οσμή	Γεύση	Εμφάνιση	Γενική αποδοχή
C1	8.9 ± 0.2	8.4 ± 0.5	8.0 ± 0.3	8.6 ± 0.4	8.4 ± 0.2
B1	8.9 ± 0.2	7.8 ± 0.4	7.2 ± 0.4	8.4 ± 0.5	7.8 ± 0.4
B2	8.9 ± 0.2	7.8 ± 0.5	7.5 ± 0.3	8.7 ± 0.3	8.2 ± 0.2
Εμπορικό δείγμα	8.6 ± 0.1	8.7 ± 0.2	8.7 ± 0.2	8.65 ± 0.1	8.8 ± 0.2

C1: ελεύθερα κύτταρα, B1: βιοκαταλύτης σε φιλμ ΒΚ που αφαιρέθηκε μετά τη ζύμωση, B2: βιοκαταλύτης στο blend ΒΚ που παρέμεινε στο προϊόν μετά τη ζύμωση

Συνοπτικά, όσον αφορά την ανάπτυξη προϊόντων, τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν πως η χρήση είτε ελεύθερων είτε ακινητοποιημένων κυττάρων των στελεχών *Lb. pentosus* και *Lb. plantarum* δεν είχαν κάποια αρνητική επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των δειγμάτων και επίσης καμία αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των προϊόντων. Συγκεκριμένα, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά επηρεάστηκαν από τον χρόνο αποθήκευσης, παρατηρήσεις που είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία αναφορικά με λυοφιλωμένα στελεχών του είδους *Lb. casei* (Dimitrellou et al. 2019). Η βακτηριακή κυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε ως εδωδίο συστατικό χωρίς να αλλοιωθούν οι οργανοληπτικές ιδιότητες του παραγόμενου ξινογάλακτος, όπως η γεύση ή το χρώμα. Το παραγόμενο ρόφημα χαρακτηρίστηκε από την παρουσία επιθυμητών αρωματικών πτητικών από νότες φρούτων που παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Συμπεράσματα

Ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας βιοδιεργασίας για την ολιστική αξιοποίηση των κλασμάτων του τυρογάλακτος και την δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή ανέπτυξε μια βιοδιεργασία δύο σταδίων για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων (β-γαλακτοσιδάσης και πρωτεασών) από τον μύκητα *A. awamori*, ακολουθούμενη από την ενζυμική υδρόλυση της λακτόζης του τυρογάλακτος. Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης αξιολογήθηκε σε διάφορες συνθήκες και το ληφθέν υδρόλυμα αξιολογήθηκε στη συνέχεια ως ένα ακατέργαστο πλούσιου σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα για τη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, ως περίπτωση μελέτης ενός προϊόντος ενδιάμεσης προστιθέμενης αξίας.

Ειδικότερα από την παρούσα μελέτη εξάχθηκαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Το τυρόγαλα υδρολύθηκε επιτυχώς με χρήση εξωκυτταρικών ακατέργαστων ενζύμων του μύκητα *A. awamori*.
- Οι 65°C χαρακτηρίστηκαν ως βέλτιστοι για την υδρόλυση της λακτόζης.
- Τα υδρόλύματα που παράχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης με χρήση του στελέχους *A. xylinum*.
- Οι μορφές κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα ακινητοποίησης.
- Η χρήση λυοφιλιωμένων και μη στελεχών έδωσε παρόμοια υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης.
- Το ζυμούμενο προϊόν από το στέλεχος *L. plantarum* 820 συγκέντρωσε τις υψηλότερες βαθμολογίες στον οργανοληπτικό έλεγχο.

Σήμερα, η παραγωγή βιομάζας με επιλεγμένα βακτήρια απαιτεί τη χρήση ανανεώσιμων και χαμηλού κόστους μέσων. Από την άλλη πλευρά, δεδομένων των πλεονεκτημάτων για την υγεία που σχετίζονται με τα προβιοτικά στελέχη, η ζήτηση για κατάλληλα υλικά και νέα συστήματα παράδοσης συνεχίζει να αυξάνεται. Στα πλαίσια αυτά, στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με δυνητικές προβιοτικές ιδιότητες ακινητοποιήθηκαν επιτυχώς στην παραγόμενη βακτηριακή κυτταρίνη ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παραγωγή ενός νέου καινοτόμου προϊόντος. Συμπερασματικά, η μελέτη διαμόρφωσε μια προσέγγιση που να συνδέει τα οφέλη των λειτουργικών καλλιεργειών LAB σε ένα εδωδίο φυσικό βιο-πολυμερές για την παραγωγή

καινοτόμων ζυμωμένων προϊόντων στα πλαίσια της βιωσιμότητας και της κυκλικής οικονομίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ξενόγλωσση

Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabanes FJ. (2004). Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 33e49.

Adrio JL., Demain AL. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*.;4(1):117-139.

Algar I, Fernandes SCM, Mondragon G, et al. (2015). Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. *J Appl Polym Sci*.; 132:41237

Al-Musallam A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* species. Ph. D. thesis. University of Utrecht, The Netherlands

Amiri M, Valsaraj KT. (2004). Effect of gas transfer on separation of whey protein with aphron flotation. *Sep Purif Technol*; 35:161-67

Ansari SA., Husain Q. (2010). Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *J. Mol. Catal. B Enzymatic* 63, 68–74

Ansari SA., Husain Q. (2012). Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. *Food Bioprod. Process.* 90, 351–359

Axelsson LT. (1993). Lactic acid bacteria: Classification and physiology, in: *Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1, eds Seppo Salminen and Atte von Wright, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-63.

Baken KA., Ezendam J., Gremmer ER., de Klerk A., Pennings JL., Matthee B., Peijnenburg AA., van Loveren H. (2006). Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food Microbiol.* 112:8–18

Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*; 278:381-86.

Bekatorou A., Plioni I., Sparou K., Maroutsiou R., Tsafrakidou P., Petsi T., Kordouli E. (2019). Bacterial cellulose production using the Corinthian currant finishing Side-Stream and Cheese Whey: Process Optimization and Textural Characterization. *Foods*, 8, 193

Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella SS., Cantero D., Webb C. (2002). Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state

fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 58(2):164-9.

Bordenave-Juchereau S, Almeida B, Piot JM, Sannier F. (2005). Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. *J Dairy Res*; 72:34-8.

Borglum G, Sternberg MZ. (1972). Properties of a fungal lactase. *J Food Sci* 37:619–623

Brett CT. (2000). Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall, *Intl. Rev. Cytol.* 199:161-199.

CapliceE. & Fitzgerald. GF. (1999). Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiolog*, 50.

Cardoso BB., Silvério, SCC., Abrunhosa L. Teixeira JA., Rodrigues LR. (2017). β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 257, 67–74.

Carreira P., Mendes JA., Trovatti E., Serafim LS., Freire CS., Silvestre AJ., Neto CP. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour. Technol.* 102, 7354–7360.

Carvalho F., Prazeres AR., Rivas J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ*, 445-446, 385–396.

Chatzipaschali AA., Stamatis AG. (2012). Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies*, 5, 3492–3525.

Chawla Prashant R., Ishwar B. Bajaj, Shrikant A. Survase and Rekha S. Singhal (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Application: *Food Technol. Biotechnol.* 47(2), 107-124.

Chen L, Hong F, Yang XX, Han SF. (2013). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresour Technol.* 135:464–468

David, S., Stevens, H., van Riel, M., Simons, G., de Vos,W. M. (1992). *Leuconostoc lactis* β -galactosidase is encoded by two overlapping genes. *J. Bacteriol.*, 174, 4475–4481

De Wit JN. (2001). Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products. European Whey Products Association, Brussels, Belgium.

Dimitrellou D., Salamoura C., Kontogianni A., Katsipi D., Kandyli P., Zakynthinos G., Varzakas T. (2019). Effect of milk type on the Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Probiotic Fermented Milk. *Microorganisms*, 274.

Dolejši Rebroš M., Rosenberg M. (2014b). Immobilisation of *Clostridium spp.* for production of solvents and organic acids. *Chem Pap* 68:1– 14.

Domingues L., Lima N., Teixeira JA. (2005). *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Process Biochem* 40:1151–1154

Emerenini, E., Afolabi, O., Okolie, P., and Akintokun, A. (2013). Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis. *Br. Microbiol. Res. J.* 3, 368–377.

Erbaş Kiziltas E., Kiziltas A., Gardner DJ. (2015). Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydr Polym.* 124:131–138.

Espinheira RP., Rocha VAL., Guimarães TM., et al. (2020). *Aspergillus awamori* endoglucanases promote faster lignocellulosic biomass liquefaction in high-solids enzymatic hydrolysis. Authorea.

Fowler T., and RM Berka. (1991). Gene expression systems for filamentous fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:691–697.

Freitas F., Alves V., D., Reis, M., A., M., (2011). Advantages in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388-398.

Geiger B., Nguyen HM., Wenig S., Nguyen HA., Lorenz C., Kittl R., Mathiesen G., Eijssink VGH., Haltrich D., Nguyen TH. (2016). From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochem. Eng. J.* 116, 45–53.

Ghosh BC., Prasad LN., Saha NP. (2017). Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1476–1483.

Guimarães PMR., Teixeira JA. & Domingues L. (2010). Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375-384.

Guo X, Cavka A, Jonsson LJ, Hong F. (2013). Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microb Cell Fact.*;12:93.

Horner TW., Dunn ML., Eggett DL., Ogden LV. (2011). β -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. *J. Dairy Sci.* 94, 3242–3249.

Huber RE, Gaunt MT (1983). Importance of hydroxyls at positions 3, 4, and 6 for binding to the galactose site of β -galactosidase (*Escherichia coli*). *Arch Biochem Biophys* 220:263–271.

Husain Q. (2010). β -Galactosidases and their potential applications: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 41–62.

Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. (2000). Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. *J Master Sci.* 35(2), 261-70.

IUPAC (1997). Compendium of chemical terminology (2nd ed., the BGold Book[^]). In: McNaught AD, Wilkinson A (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 764.

Jahnz U., Wittlich P., Prüsse U., Vorlop KD. (2001). New matrices and bioencapsulation processes. *Focus Biotechnol* 4:293–307

Jayaprakasha H., Brueckner H. (1999). Whey protein concentrate: A potential functional ingredient for food industry. *J Food Sci Technol*; 36:189-204.

Jekel M., Buhr A., Willke T., Vorlop KD. (1998). Immobilization of biocatalyst in LentiKats. *Chem Eng Technol* 21:275–278.

Jelen P., Roginski H., Fuquay J., Fox P. (2003). Whey processing: utilization and products. *Encyclopedia Dairy Sci*:2739-45.

- Jonas R., Farah LF. (1998).** Production and application of microbial cellulose, *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 101-106.
- Jovanović S., Barać ácej. (2005).** Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo.*;55:215-33.
- Jozala AF., de Lencastre-Novaes LC., Lopes AM., et al. (2016).** Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Appl Microbiol Biotechnol.*;100(5):2063–2072
- Kachrimanidou V., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S. Yanniotis S., Kookos I., Koutinas AA. (2013).** Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel production processes for the production of fermentation feedstock. *Waste Biomass Valorization* 4, 529–537.
- Kandler O., Weiss N. (1986).** Regular, Non-sporing Gram-positive Rods In: Bergey's annual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, (P.HA. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G.Holt eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, p.1208-1234.
- Kazemi S., Khayati G., Faezi-Ghasemi M. (2016).** b-Galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: optimization by orthogonal arrays design. *Iran Biomed J* 20:287–294.
- Keshk, SM. (2014).** Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4(2), pp. 1-10.
- Kim SB., Seo IS., Khan MA., Ki KS., Nam MS., Kim HS. (2007).** Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int Dairy J* 17:625-31.
- Klemm D., Schumann D., Udhardt U and Marsch S. (2001).** Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.*, 26 pp. 1561-1603.
- Kopsahelis N. (2019).** Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 11, 1591.
- Kosikowski FV. (1979).** Whey utilization and whey products. *J Dairy Sci.* 62:1149–60

- Koskenniemi K., Koponen J., Kankainen M., Savijoki K., Tynkkynen S., de Vos W.M., Kalkkinen N., Varmanen P. (2009).** Proteome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG using 2-D DIGE and mass spectrometry shows differential protein production in laboratory and industrial-type growth media. *J. Proteome. Res.* 4993–5007.
- Kosseva MR., Panesar PS., Kaur G., Kennedy JF. (2009).** Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int J Biol Macromol.* 45:437-47
- Koutinas AA., Arifeen N., Wang R., Webb C. (2007).** Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 61–72.
- Kozakiewicz Z. (1989).** *Aspergillus* species on stored products. *Mycology Papers* 161: 1e188.
- Krissansen GW. (2007).** Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J Am Coll Nutr.* 26:713S-23S.
- Ladero M., Santosa A., Garcí'a J.L., Garcí'a-Ochoa F. (2001).** Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: *Kinetic modeling, Enzyme and Microbial Technology* 29 181–193.
- Lappa IK., Kachrimanidou V., Papadaki A. Stamatiou A., Ladakis D., Eriotou E., Kopsahelis NA. (2021).** Comprehensive bioprocessing approach to foster cheese whey valorization: on-site β -galactosidase secretion for lactose hydrolysis and sequential bacterial cellulose production. *Fermentation*, 7(3):184
- Lee K., Lee HG., Pi K., Choi YJ. (2008).** Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 8:1624–1630.
- Lestari P., Elfrida, N., Suryani Y. (2014).** Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-waste. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7(1), 75-80.
- Lie S. (1973).** The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *J. Inst. Brew.* 79, 37–41.

- Lin K., W., Lin H., Y., (2004).** Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). *Journal of Food Science*, 69(3), 107-111.
- Mawson A.J. (1994).** Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour Technol* 47(3):195–203.
- Mishra S., Barik SK., Ayyappan S., Mohapatra BC. (2000).** Fish bioassay for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent. *Biores. Technol.* 72, 213-218.
- Mohammadkazemia F., Azinb M., Ashoric A. (2015).** Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydr Polym.* 117:518–523.
- Mollea C., Marmo L., Bosco F. (2013).** Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry; ISBN: 978-953-51-0911-2.
- Morr C., Foegeding E. (1990).** Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. *Food Technol*;44.
- Mosseray R. (1934).** Les *Aspergillus* de la section niger Thom et Church. *Cellule* 43: 203e285.
- Murakami H. (1979).** Classification system of the black *Aspergilli*. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (part 32). *Journal of the Brewing Society of Japan* 74: 849e853.
- Naeem M., Ilyas M., Haider, S., Baig S., and Saleem M. (2012).** Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pakistan J. Bot.* 44, 323–32.
- Naher L., Fatin SN., Sheikh MAH., Azeez LA., Siddiquee S., Zain NM., Karim SMR. (2021).** Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. *J Fungi* (Basel), 167(10), 868.
- Nguyen VT., Flanagan B., Gidley MJ. (2008).** Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Curr. Microbiol.* 57, 449.

Nizamuddin S., Sridevi A., Narasimha G. (2008). Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Afr. J. Biotech.* 7, 1096–1100.

Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S., (1993). Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Topics in Catalysis*, 6(6), 503-511.

Panesar PS, Kumari S, Panesar R. (2013). Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 33:345-64.

Panesar PS., Kumari S., Panesar R. (2010). Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries, *Enzyme Res.*

Panesar PS., Panesar R., Singh RS., Kenned JF., Kumar H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase, *J. Chem. Technol. Biot.* 81 530–543.

Papadaki A., Papapostolou H., Alexandri M., Kopsahelis N., Papanikolaou, S. de Castro AM., Freire DMG., Koutinas AA. (2018). Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 35960–35970.

Park AR. (2010). Oh, D.K. Effects of galactose and glucose on the hydrolysis reaction of a thermostable β -galactosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1427–1435.

Paximada P., Tsouko E., Kopsahelis N., Koutinas AA., Mandala, I. (2016). Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocoll.* 53, 225–232.

Pfeiler EA. & Klaenhamer TR. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15, pp.546-53.

Philippopoulos C. and Papadakis M. (2001). Current trends in whey processing and utilization in Greece. *Int. J. Dairy Technol.* (54)1, 14-19.

Prashar A., Jin Y., Mason B., Chae M., Bressler D.C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste

solution for the dairy industry. *J Dairy Sci* 99:1859–1867.

Puppi D., Chiellini F., Piras AM., Chiellini E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci.* 35(40, 403-40)

Rigoldi F., Donini S., Redaelli A., Parisini E., Gautieri. (2018). A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioeng.* 2, 011501–011501.

Rittmanic S. (2006).US whey proteins in ready-to-drink beverages. Applications Monograph Beverages. US Dairy Export Council, Arlington, VA.:1-8.

Ruiz Rodríguez L., Bleckwedel J., Eugenia Ortiz M., Pescuma M., and Mozzi F. (2017a). “Lactic acid bacteria,” in *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, eds C. Wittmann and J. C. Liao (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 395–451.

Sakaguchi K., Iizuka H., Yamazaki S., (1951). A study on black Aspergilli. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 24: 138e142

Salari M., Khiabani MS., Mokarram RR., Ghanbarzadeh B., Kafil. (2019). H.S. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. *Int. J. Biol. Macromol.*, 122, 280–288.

Salminen SJ., Gueimonde M., Isolauri E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *J. Nutr.* 135:1294–1298

Sampaio FC., de Faria JT. da Silva MF., de Souza Oliveira RP., Converti A. (2019). Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: A combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. *Environmen. Technol.* 2019, 1-9.

Samson RA., Houbraken JAMP., Kuijpers AFA, Frank JM., Frisvad JC., (2004). New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45e61.

Sanchez-Puelles JM., Sanz JM., Garcia JL., Garcia E. (1992). Immobilization and single step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J*

Biochem;203:153–9.

Saqib S., Akram A., Halim SA., Tassaduq R. (2017).Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech.*;7(1):79.

Schmidt BF., Adams RM., Requadt C., Power S., Mainzer SE. (1989). Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* β -galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 625–635.

Schwab C., Lee V., Sørensen KI., Gänzle MG. (2011).Production of galactooligosaccharides and heterooligosaccharides with disrupted cell extracts and whole cells of lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Int. Dairy J.* 21 748–754.

Semjonovs P., Ruklisha M., Paegle L., Saka M., Treimane R., Skute M., Rozenberga L., Vikele L., Sabovics M., Cleenwerck I. (2017).Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. *Appl. Microbiol. Biotechnol*101, 1003–1012.

Sen S., Ray L., Chattopadhyay P., (2012). Production, Purification, Immobilization, and Characterization of a Thermostable β -Galactosidase from *Aspergillus alliaceus*, *Appl. Biochem. Biotech.* 167, 1938–1953.

Sheykhnazari S., Tabarsa T., Ashorib A., Shakeric A. and Golalipourd M. (2011).Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture medium on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 86, pp. 1187-1191.

Shi Z., Zhang Y., Phillip G., O., Yang. (2014).Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539-545.

Silvério SC., Macedo EA., Teixeira JA., Rodrigues LR. (2018).New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresour. Technol.* 250, 131–139.

Siso M. (1996).The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* 57:1-11.

Son HJ., Kim HG., Kim KK., Kim, HS., YG. and Lee, SJ. (2003).Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under

shaking culture conditions. *Bioresource Technology*, 86 pp. 215-219.

Suwanposri A., Yukphan P., Yamada Y., Ochaikul D (2014).Optimisation of culture conditions for biocellulose production by *Komagataeibacter* sp PAP1 using soya bean whey. *Maejo Int J Sci Technol.*;8:1–14.

Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan DL., Btittberg M. (2005).Bacterial cellulose as a potential scaffold for issue engineering of cartilage, *Biomaterials*, 26(4), 419-31.

Tanaka Y., Kagamiishi A., Kiuchi A. and Horiuchi T. (1975).Purification and properties of b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, 77, 241–247.

Terpou A., Gialleli A-I., Bekatorou A., Dimitrellou D., Ganatsios V., Barouni E., Koutinas AA., Maria M. (2017).Sour milk production by wheat bran supported probiotic biocatalyst as starter culture. *Food and Bioprod Processing* 101, 184-192

Terpou A., Papadaki A., Lappa IK., Kachrimanidou V., Bosnea LA., Tsakona S., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Kookos IK., Koutinas AA. (2014).Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *J. Biotechnol.* 189, 36–45.

Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. (2007).Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Factories* 6, 9–9,.

Umeda Y., Hirano A., Ishibashi M., Akiyama H., Onizuka T., Ikeuchi M., Inoue Y. (1999).Cloning of cellulose synthase genes from *Acetobacter xylinum* JCM 7664: implication of a novel set of cellulose synthase genes. *DNA Res.*;6(2):109-15.

Umsza-Guez MA., Díaz AB., de Ory I., Blandino A., Gomes E., Caro I. (2011).Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Braz J Microbiol.*;42(4):1585-1597.

Van den Hondel, CAMJJ., PJ. Punt and RFM. Van Gorcom. (1991).Heterologous gene expression in filamentous fungi, p. 396–428. In J. W. Bennett and

L. L. Lasure (ed.), More gene manipulations in fungi. Academic Press, San Diego, Calif.

Varga J., Kevei F., Hamari Z., Toth B., Teren J, Croft JH, Kozakiewicz Z., (2000). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Samson RA, Pitt JI (eds), Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 397e411.

Vasiljevic T., Jelen P. (2003). Oligosaccharide production and proteolysis during lactose hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria, Lait 8 453–467.

Verdoes JC., PJ. Punt and CAMJJ. van den Hondel. (1995). Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:195–205.

Vidya CH., Kumar BS. Chinmayee CV., Singh SA. (2020). Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 885–895.

Wang Z. Lin S., Jin H., Gao S., Zhu Y., Jin J. (2018). Nanoparticle-templated nanofiltration membranes for ultrahigh performance desalination. *Nat. Commun.* 9, 2004.

Watanabe K., M. Tabuchi, Y. Morinaga, F. Yoshinaga. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose*, 5, 187-200.

Weetal HH., Havewala NB., Pitcher WH., Detar CC., Van WP., Yaverbaum S. (1974). The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol Bioeng*;16(3):295–313.

Yimer D., Tilahun A. (2018). Microbial biotechnology review in microbial enzyme production methods, assay techniques and protein separation and rifications. *J Nutr Health Food Eng.* 8(1):1-7.

Zhou QZK., Chen XD. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Eng J* 9:33–

Żywicka A., Wenelska K., Junka A. Chodaczek G., Szymczyk P. Fijałkowski K. (2019). Immobilization pattern of morphologically different microorganisms on bacterial cellulose membranes. *World J Microbiol Biotechnol* 35, 11.

2. Ελληνική

Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Αθανασόπουλος, Ε. Π. (1979) Βιολογικός καθαρισμός των αποβλήτων και Μαθηματική έκφραση του BOD, Χημικά Χρονικά Γενική Έκδοση, 44, 41-47

Ανυφαντάκης Ε. Μ. (2004). Τυροκομία. Δεύτερη Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ., (2009). Γαλακτοκομία, Εκδ. Έμβρυο, Σελ. 63-65,

Καμιναρίδης Στέλιος, Ακτύπης Αναστάσιος, «Μικροβιολογία Τροφίμων III». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Λοϊζίδου, Μ., (006). Μονάδα περιβαλλοντικής επιστήμης και τεχνολογίας Ε.Μ.Π.

3. Σύνδεσμοι

- www.hellenicprotein.gr