

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ
LACTOBACILLUS:ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΒΑΡΕΛΑ ΓΕΩΡΓΙΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Αύγουστος 2022

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ LACTOBACILLUS:ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ
pH

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Κοψαχείλης Νικόλαος

Καχριμανίδου Βασιλική

Παπαδάκη Αικατερίνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία μελετά, την αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με στελέχη *Lactobacillus* καθώς και την επίδραση τους σε διαφορετικές τιμές pH. Μελετήθηκαν 10 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων σε τιμές pH 4, 5 και 6.8. Αξιοσημείωτη ήταν η αξιοποίηση αποβλήτων, ως υποστρώματα, όπως το τυρόγαλα και το λάδι καφέ, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατάλληλα και ασφαλή για κατανάλωση. Χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μέθοδοι που συνδέονται με την δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, όπως δείκτης γαλακτωματοποίησης, παραγωγή ολικού ξηρού βάρους και μέτρηση επιφανειακής τάσης. Τέλος, ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή ικανότητα κάποιων στελεχών, έναντι τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, αλλά όχι αντιμικροβιακή ικανότητα.

ABSTRACT

The aim of the present study was to utilize cheese whey permeate (CWP) as fermentation feedstock to produce biosurfactants using *Lactobacillus* strains and to assess the effect of pH value during fermentation on metabolites synthesis. Ten different *Lactobacillus* strains were selected and incubated in three different pH values: 4, 5, 6.8. The emulsification index and surface tension were studied for biosurfactant production along with total dry weight and lactic acid as parameters to evaluate microbial growth. Oil extracted from spent coffee grounds was also used as an inducer for biosurfactant synthesis together with CWP, deriving from agro-industrial waste and by-product streams. Likewise, the antimicrobial activity of the obtained biosurfactants was tested against four food borne pathogens. Results indicated that the production of biosurfactants was dependent on the strain used in the case of pH 5 and 6.8, as evidence by the emulsification index and surface tension reduction. On the other hand, during fermentation in pH 4, lactobacilli proliferation was inhibited. However, the extracts did not indicate any antimicrobial activity against the pathogens employed in the present study.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες	14
1.1.1 Δομή και ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών-Πράσινη Χημεία	14
1.1.2 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών	16
1.1.3 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών	18
1.1.4 Βιοεπιφανειοδραστικές στα τρόφιμα	19
1.1.5 Κόστος βιοεπιφανειοδραστικών	21
1.1.6 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών με τη χρήση ελαίων	22
1.2 Γαλακτικά βακτήρια	24
1.2.1 Γαλακτικά βακτήρια και αντιμικροβιακή ιδιότητα	25
1.2.2 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ως αντιμικροβιακά από στελέχη Lactobacillus	27
1.2.3 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από στελέχη Lactobacillus και ανανεώσιμες πηγές	30
1.3 Τυρόγαλα	30
1.3.1 Σύσταση του τυρόγαλου	31
1.3.2 Περιβαλλοντική ρύπανση	31
1.3.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος	32
1.3.4 Ποτά με βάση τον ορό γάλακτος	32
1.3.5 Ξίδι με ορό γάλακτος	33
1.3.6 Αξιοποίηση τυρογάλακτος για την ανάπτυξη βιοδιεργασιών	34

1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση των γαλακτικών βακτηρίων:	
Επίδραση pH	35
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	37

II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Πίνακας Περιεχομένων	5
Κατάλογος Πινάκων	8
Κατάλογος Γραφημάτων	9
Κατάλογος Εικόνων	12
Συντομογραφίες	13

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Μικροβιακά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων	38
2.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών του τυρογάλακτος (deproteinization)	39
2.3 Καλλιέργειες γαλακτικών βακτηρίων	39
2.4 Εμβολιασμός καλλιέργειας	39
2.5 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Lactose, g/l)	40
2.6 Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total dry weight, g/L)	40
2.7 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και δείκτης γαλακτωματοποίησης (E24,%)	41
2.9 Τεστ αντιμικροβιακής δράσης	43
2.10 Επίδραση της προσθήκης ελαίου σε φωτόμετρο μικροπλακών	43
2.11 Μέτρηση επιφανειακής τάσης	43

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Επίδραση του pH στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ασυνεχείς ζυμώσεις.	45
3.2 Μελέτη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε δύο διαφορετικές τιμές pH 5 και 6.8	58
3.2.1 Μελέτη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών μέσω της αξιολόγησης της επιφανειακής τάσης	58
3.2.2 Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight) και κατανάλωση λακτόζης	61
3.2.3 Αξιολόγηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης E24 (%)	64
3.3 Αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.	65
3.4 Αξιολόγηση της προσθήκης ελαίου καφέ για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.	68

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
-----------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74
--------------	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 1.1.2: Αναφορά βιοεπιφανειοδραστικών που προέρχονται από LAB	17
Πίνακας 1.2.1: Στελέχη LAB και ιδιότητες αντιμικροβιακής δράσης (Sharma et al., 2016)	26
Πίνακας 1.2.2: Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από στελέχη <i>Lactobacillus</i> : Αντιμικροβιακές ιδιότητες (Sharma et al., 2016a)	29
Πίνακας 2.1: Πίνακας στελεχών γαλακτικών βακτηρίων γένους <i>Lactobacillus</i>	38
Πίνακας 2.2: Πίνακας θρεπτικών συστατικών και συγκεντρώσεων που περιέχονται στο PBS.	42
Πίνακας 3.1: Επίδραση pH επιλεγμένων στελεχών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 3.1: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 182.	48
Γράφημα 3.2: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 731.	49
Γράφημα 3.3: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 4052.	50
Γράφημα 3.4: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 276.	51
Γράφημα 3.5: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους CECT 278.	52
Γράφημα 3.6: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους CECT 4023.	53
Γράφημα 3.7: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους LQC 753.	54
Γράφημα 3.8: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους LQC 752.	55
Γράφημα 3.9: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του	

στελέχους LQC 854.	56
Γράφημα 3.10: Δείκτης γαλακτωματοποίησης $E_{24}(\%)$ των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους E108.	57
Γράφημα 3.11: Μείωση της επιφανειακής τάσης των βιοεπιφανειοδραστικών από εκχύλιση μετά από 42h ζύμωσης σε συνθήκες: ■ :pH 5, T 37°C ■ :pH 6.8, T 37°C.	59
Γράφημα 3.12: Μείωση της επιφανειακής τάσης των βιοεπιφανειοδραστικών από εκχύλιση μετά από 62h ζύμωσης σε συνθήκες: ■ :pH 5, T 37°C ■ :pH 6.8, T 37°C.	59
Γράφημα 4.13: Παραγωγή ολικού ξηρού (TDW) των στελεχών σε pH 5 (α) και pH 6.8 (β) μετά από 42 (■) και 62h (■) ζύμωσης.	61
Γράφημα 3.14: Κατανάλωση λακτόζης (Lactose consumption) των στελεχών σε pH 5 (α) και pH 6.8 (β) μετά από 42 (■) και 62h (■) ζύμωσης.	63
Γράφημα 3.15: Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης ($E_{24}\%$) σε διαφορετικές τιμές pH μετά από 62h ζύμωσης ■ :pH 5, T 37°C ■ :pH 6.8, T 37°C.	64
Γράφημα 3.16: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L ελαίου καφέ με θρεπτικό υπόστρωμα τυρόγαλο και προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου, μετά από ανάπτυξη σε φωτόμετρο μικροπλακών για 24h.	69
Γράφημα 3.17: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους E108 σε αρχική συγκέντρωση 20g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (□: λακτόζη, □: γαλακτικό οξύ, □: ολικό ξηρό βάρος, □: $E_{24}\%$).	70
Γράφημα 3.18: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε αρχική συγκέντρωση 20g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (□: λακτόζη, □: γαλακτικό οξύ, □: ολικό ξηρό βάρος, □: $E_{24}\%$).	70
Γράφημα 3.19: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 182 σε αρχική συγκέντρωση 20g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (□: λακτόζη, □: γαλακτικό οξύ, □: ολικό ξηρό βάρος, □: $E_{24}\%$).	71
Γράφημα 3.20: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 276 σε αρχική συγκέντρωση 20g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (□: λακτόζη, □: γαλακτικό οξύ, □: ολικό ξηρό βάρος, □: $E_{24}\%$).	71

Γράφημα 3.21: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 731 σε αρχική συγκέντρωση 20g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (□: λακτόζη, □: γαλακτικό οξύ, □: ολικό ξηρό βάρος, □: E₂₄%).

72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Σελίδα
Εικόνα 1: Γενική δομή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.	15
Εικόνα 2: Παραγωγή διάφορων συστατικών με αντιμικροβιακή δράση από τα κύτταρα των βακτηρίων του γένους <i>Lactobacillus</i> (Satpute et al., 2016).	25
Εικόνα 3: Τρόπος δράσης των βιοεπιφανειοδραστικών (Sharma et al., 2016a).	28
Εικόνα 4: Επίδραση της τιμής pH στη μικροβιακή αύξηση, την κατανάλωση λακτόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε εύρος τιμών 4-7 (Fu & Mathews, 1999).	36
Εικόνα 5: Παρουσία και απουσία γαλακτώματος κατά τη μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης E_{24} .	42
Εικόνα 6: Μέτρηση επιφανειακής τάσης με το Wilhelmy plate.	44
Εικόνα 7: Αντιμικροβιακή δράση εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών και προσδεδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell-bound), έναντι τριών παθογόνων στελεχών	66
Εικόνα 8: Αντιμικροβιακή δράση προσδεδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell-bound), έναντι τριών παθογόνων στελεχών.	67
Εικόνα 9: Αντιμικροβιακή δράση εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών, έναντι δύο παθογόνων στελεχών.	67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BOD	Biochemical Oxygen Demand
HPLC	High Performance Liquid Chromatography ,
GRAS	Generally Recognized
COD	Chemical Oxygen Demand
AAB	Acetic Acid Bacteria
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/World Health Organization
FDA	Food and Drug Administration
PBS	Phosphate Buffered Saline
TSB	Tryptic Soy Br
LAB	Lactic Acid Bacteria

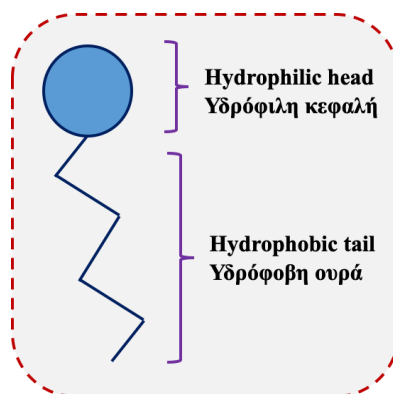
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι διφασικές, που αποτελούνται από μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά. Παρουσιάζουν έντονες γαλακτωματοποιητικές και επιφανειακές δραστηριότητες. Αξιοσημείωτη είναι η χαμηλή τους τοξικότητα, η υψηλή βιοαποδομησιμότητα καθώς και αποτελεσματικότητα σε ακραίες συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Rodrigues and Teixeira, 2008). Σύμφωνα με έρευνα, οι βιοεπιφανειοδραστικές φαίνεται να είναι σταθερές σε ένα εύρος pH 6-10, έχοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στο pH 7. Επιπλέον στη συγκεκριμένη έρευνα η επιφανειακή δραστηριότητα δεν μειώθηκε μετά από 120 ώρες στους 60 °C επώασης (Gudiña, 2009). Οι σύνθετες επιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται με χημική σύνθεση ενώ οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από μικροβιακά στελέχη, κυρίως από βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas sp.* ή *Bacillus sp.* Το πρόβλημα που παρουσιάζεται από τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες του γένους *Pseudomonas*, έγκειται στο γεγονός ότι τα στελέχη αυτά είναι κατά κύριο λόγο παθογόνα, συνεπώς παρεμποδίζονται οι εφαρμογές που αφορούν στη βιομηχανία τροφίμων.

1.1.1 Δομή και ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών-Πράσινη Χημεία

Πρόκειται για αμφίφιλα μόρια καθώς διαθέτουν μια κεφαλή η οποία είναι υδρόφιλη και μια ουρά λιπόφιλη. Παράγονται από μικροοργανισμούς και έχουν την ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση (αέριο-υγρό ή υγρό-υγρό). Επιπλέον, το υδρόφιλο μέρος μπορεί να είναι ένα σάκχαρο ή αμινοξύ και το υδρόφοβο κορεσμένος ή ακόρεστος υδρογονάνθρακας ή λιπαρό οξύ (Nitschke και Costa, 2007).



Εικόνα 1: Γενική δομή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Οι ιδιότητές τους ποικίλουν καθώς πρόκειται για ουσίες με σταθερότητα λόγω της δομής που δημιουργείται όταν η κεφαλή βρίσκεται στο νερό και η ουρά στο λάδι. Για το λόγο αυτό είναι κατάλληλα για το σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων. Επιπροσθέτως, διαθέτουν ποικιλόμορφη δομή και διακρίνονται για τις βιολογικές τους δραστηριότητες, καθιστώντας τα χρήσιμα, για εφαρμογή στην επιστήμη της ιατρικής, της επεξεργασίας τροφίμων και του βιολογικού καθαρισμού του περιβάλλοντος. Αξιοσημείωτη είναι η βιοσυμβατότητα τους όπως και η βιοαποικοδομησιμότητα, δηλαδή η ιδιότητα να διασπώνται στο περιβάλλον. Ακόμη, πρόκειται για ουσίες σταθερές κάτω από ακραίες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αλατότητας με χαμηλή τοξικότητα. Για παράδειγμα, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι συνήθως σταθερές σε ένα εύρος pH 6-10, έχοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στο pH 7. Ειδικότερα σε προηγούμενη έρευνα, η επιφανειακή δραστηριότητα δε μειώθηκε μετά από 120 ώρες στους 60 °C επώασης (Gudiña, 2009).

Αναμφίβολα, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχουν τραβήξει, οι βιοεπιφανειοδραστικές μικροβιακής προέλευσης. Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες δύνανται να αντικαταστήσουν τις σύνθετες επιφανειοδραστικές ουσίες σε κλάδους όπως, βιομηχανίες απορρυπαντικών, γαλακτωματοποιητές, διαλυτοποιητές και παράγοντες διαβροχής. Επίσης, η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί από ανανεώσιμες πρώτες ύλες ή γεωργικά απόβλητα καθιστώντας τις καινοτόμες, με ρόλο μείζονος σημασίας την χαμηλή τοξικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα, οι οποίες είναι σύμφωνες με την «πράσινη» χημεία (Mulligan et. al. 2014). Αξίζει να αναφερθεί και η εξίσου σημαντική στροφή των καταναλωτών προς τα «πράσινα» προϊόντα, τρόπο ζωής και το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον απέναντι στα βιώσιμα προϊόντα που παράγονται με βιοτεχνολογικό τρόπο ειδικότερα στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας.

1.1.2 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών

Οι κύριες κατηγορίες των βιοεπιφανειοδραστικών περιλαμβάνουν τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια, τα λιπαρά οξέα, τα λιποπεπτίδια/λιποπρωτεΐνες, τα πολυμερή επιφανειοδραστικά και τα επιφανειοδραστικά σωματίδια. Η φύση των βιοεπιφανειοδραστικών και η παραγωγή των μικροοργανισμών καθορίζουν, τα ακόλουθα πρότυπα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τη ζύμωση: α) ανάπτυξη που σχετίζεται με την παραγωγή, β) παραγωγή κάτω από περιοριστικές συνθήκες ανάπτυξης, γ) παραγωγή με ανάπαυση/μη ανάπτυξη κυττάρων και δ) παραγωγή που σχετίζεται με αύξηση. Εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών και της ανάπτυξης, το υπόστρωμα χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των βιοεπιφανειοδραστικών αλλά και για την παραγωγή τους παράλληλα. Κατά κύριο λόγο, οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι μεταβολίτες που παράγονται είτε από υδρογονάνθρακες είτε από υδατάνθρακες. Οι πηγές άνθρακα, οι πηγές αζώτου, οι αυξητικοί παράγοντες και τα ανόργανα άλατα επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων και τη συσσώρευση των μεταβολικών προϊόντων. Λόγω των πολλών παραμέτρων που εμπλέκονται είναι δύσκολο να αναζητηθούν οι κύριοι παράγοντες και να επιτευχθεί βελτιστοποίηση για τις βιοτεχνολογικές διεργασίες. Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών συχνά επηρεάζεται μέσω των επιδράσεων τους στην κυτταρική ανάπτυξη και την κυτταρική δραστηριότητα, από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνθήκες ανάπτυξης όπως το pH, τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Όλοι οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν χρειάζονται πηγή άνθρακα, υδρογόνου, αζώτου, οξυγόνου και σε μικρότερο βαθμό θείου και φωσφόρου. Τα υλικά αυτά διατίθενται σε πολλές μορφές και η επιλογή των πρώτων υλών παίζει καθοριστικό ρόλο για το συνολική οικονομία της διαδικασίας. Τα εμπορικά θρεπτικά υποστρώματα έχουν υψηλό κόστος και κατ' επέκταση αυξάνουν το κόστος παραγωγής της διεργασίας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ανανεώσιμες πηγές ως θρεπτικά μέσα χαμηλού κόστους στις βιοτεχνολογικές διεργασίες. Αντίστοιχα, για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, είναι σημαντική η πηγή άνθρακα, και για το λόγο αυτό έχουν μελετηθεί διάφορες πηγές υδρογονανθράκων, υδατανθράκων και φυτικών ελαίων. Κάποιοι οργανισμοί χρειάζονται υδρογονάνθρακες για να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, ενώ κάποια άλλα υδατάνθρακες, είτε ως ξεχωριστό υπόστρωμα είτε σε συνδυασμό (Rodrigues και Teixeira, 2008).

Πίνακας 1.1.2: Αναφορά βιοεπιφανειοδραστικών που προέρχονται από LAB.

No.	LAB strain	Substrate used	Study
1.	<i>Lactobacillus spp.</i>	MRS broth	Velraeds et al. (1996)
2.	<i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14	MRS broth	Heinemann et al. (2000)
3.	<i>Lactococcus lactis</i> 53	MRS broth	Rodrigues et al. (2004)
4.	<i>Lactobacillus casei</i> CECT 525, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 288, <i>Lactobacillus pentosus</i> CECT 4023 and <i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> CECT 25600	MRS broth	Rodrigues et al. (2006a, b)
5.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Grape marc	Rivera et al. (2007)
6.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Hemicellulosic hydrolysate	Moldes et al. (2007)
7.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS broth	Walencka et al. (2008)
8.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Vine-trimming waste	Portilla et al. (2008)
9.	<i>Lactococcus lactis</i>	MRS broth	Saravanakumari and Mani (2010)
10.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS broth	Gudiña et al. (2010a, b)
11.	<i>Lactococcus lactis</i>	MRS broth	Rodríguez et al. (2010)
12.	<i>Lactococcus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i> A20	MRS broth	Gudiña et al. (2010a, b)
13.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sbusp. <i>delbrueckii</i>	MRS broth	Fracchia et al. (2010)
14.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Peanut oil cake	Thavasi et al. (2011a)
15.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS broth	Tahmourespour and Kermanshahi (2011)
16.	<i>Lactobacillus fermentii</i> and <i>Lactobacillus</i>	MRS broth	Brzozowski et al.

	<i>rhamnosus</i>		(2011)
17.	<i>Lactobacillus spp.</i>	MRS broth	Kermanshahi and Peymanfar (2012)
18.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS broth	Sauvageau et al. (2012)
19.	<i>Lactobacillus reuteri</i>	MRS broth	Salehi et al. (2014)
20.	<i>Lactobacillus spp.</i>	MRS broth	Augustin and Tene Hippolyte (2012)
21.	<i>Lactobacillus pentosus</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i> co-culture	Hydrolysates of trimming waste	Rodríguez-Pazo et al. (2013)
22.	<i>Lactobacillus spp.</i>	MRS broth	Gomaa et al. (2013)
23.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Hemicellulosic sugars	Vecino et al. (2013)
24.	<i>Lactobacillus plantarum</i> CFR2194	MRS broth	Madhu and Prapulla (2014)
25.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Hemicellulose sugars	Vecino et al. (2014a)
26.	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Corn steep liquor	Vecino et al. (2014b)
27.	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS broth	Ceresa et al. (2015)
28.	<i>Lactobacillus jensenii</i> and <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRS broth	Sambanthamoorthy et al. (2014)

1.1.3 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναφερθεί αρκετοί μικροοργανισμοί οι οποίοι παράγουν πολλούς και διαφορετικούς τύπους βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Οι πιθανές εφαρμογές ποικίλουν, και περιλαμβάνουν τη βελτιωμένη απόληψη ελαίου (enhanced oil recovery), τα λιπαντικά γεώτρησης αργού πετρελαίου, επιφανειοδραστικές που βοηθούν στη βιοθεραπεία (bioremediation) των ρύπων που είναι αδιάλυτοι στο νερό, στις βιομηχανίες υγειονομικής περίθαλψης και επεξεργασίας τροφίμων. Επιπλέον, έχει σημειωθεί ανάπτυξη στη χρήση των

βιοεπιφανειοδραστικών και σε άλλους τομείς, όπως στη σύνθεση καλλυντικών και σαπουνιών. Την τελευταία δεκαετία, έχουν συνοψιστεί οι πιθανοί ρόλοι των βιοεπιφανειοδραστικών από διάφορες μελέτες ανασκόπησης. Η καλύτερη δυνατή αξιοποίηση των βιοεπιφανειοδραστικών είναι στη βιομηχανία πετρελαίου, αλλά και η πιο συνήθης, τόσο για την παραγωγή του πετρελαίου όσο και για την ενσωμάτωση στο σχηματισμό του. Άλλες εφαρμογές, οι οποίες σχετίζονται με τις βιομηχανίες πετρελαίου αφορούν είτε τη διασπορά είτε την βιοαποκατάσταση των πετρελαιοκηλίδων, τόσο στην ενδοχώρα όσο και στη θάλασσα. Επιπλέον, αφορούν στη βελτιωμένη απόληψη πετρελαίου και την απομάκρυνση/κινητοποίηση της λάσπης του πετρελαίου από τις δεξαμενές αποθήκευσης. Ακόμα μερικές ενδιαφέρουσες χρήσεις των βιοεπιφανειοδραστικών είναι ο πολυμερισμός των γαλακτωμάτων στα χρώματα, στις επιστρώσεις χαρτιού και στις βιομηχανίες των υφασμάτων. Επιπροσθέτως, οι βιοεπιφανειοδραστικές ποικίλουν όσον αφορά τις ιδιότητες τους και κατά συνέπεια τις τελικές εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων, ως γαλακτωματοποιητές, αφριστικοί παράγοντες, διαλυτοποιητές, αντισυγκολλητικοί και αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως θα περιγραφούν στη συνέχεια. Επίσης, έχουν αναφερθεί και ισχυρές αντιμικροβιακές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένων των αντιμυκητιακών, αντιβακτηριακών, αντιμυκοπλασματικών και αντικών δραστηριοτήτων. Η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στην ιατρική βασίζεται στις αντισυγκολλητικές ιδιότητες (antiadhesive properites) ενάντια στα παθογόνα, καθιστώντας τα χρήσιμα για την θεραπεία πολλών ασθενειών, αλλά και ως θεραπευτικοί και προβιοτικοί παράγοντες. Ως αντισυγκολλητικοί παράγοντες εφαρμόζονται και στα ιατρικά υλικά, μειώνοντας έτσι τις νοσοκομειακές λοιμώξεις και τη χρήση συνθετικών φαρμάκων και χημικών. Τέλος, για την καταπολέμηση των λοιμώξεων του ουρογεννητικού συστήματος και της πνευμονικής ανοσοθεραπείας μέσω της ενσωμάτωσης των βιοεπιφανειοδραστικών στα προβιοτικά. Ωστόσο, πιθανώς λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής τους, εξαγωγής και έλλειψης πληροφοριών σχετικά με την τοξικότητα τους στο ανθρώπινο σύστημα, είναι περιορισμένη η χρήση τους στον ιατρικό τομέα.

1.1.4 Βιοεπιφανειοδραστικές στα τρόφιμα

Η εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών στα τρόφιμα πραγματοποιείται με δύο τρόπους, είτε ως πρόσθετα/συστατικά είτε για την χρήση ως καθαριστικά για την επεξεργασία των επιφανειών που ακουμπούν τα τρόφιμα. Άλλο ένα πλεονέκτημα τους, είναι οι

αντιμικροβιακές ιδιότητες καθώς και η ιδιότητα να αναστέλλουν τη δημιουργία βιο-υμενίων (μεμβρανών) από τα παθογόνα στελέχη που αναπτύσσονται στα τρόφιμα.

- ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΑ

Κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα μαζί με την αύξηση της βιομηχανοποίησης των τροφίμων επέρχεται και η χρήση των πρόσθετων τροφίμων. (Branen και Haggerty 2002) Προστίθενται σκοπίμως ώστε, να πετύχουν ένα τεχνολογικό αποτέλεσμα, όπως η τροποποίηση του χρώματος, της υφής και της γεύσης αλλά και ως γαλακτωματοποιητές, σταθεροποιητές, συντηρητικά με αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες κ.α. Τα βιολογικά πρόσθετα είναι πρώτα στην προτίμηση των καταναλωτών με τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες να τραβούν την προσοχή για άλλη μια φορά.

- ΩΣ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ-ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Αρχικά, για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες διακρίνονται οι βιοεπιφανειοδραστικές ιουρίνη, βακυλομυκίνη και fengicin. Ως καθαριστικά για τα φρούτα και λαχανικά δρουν τα ραμνολιπίδια (Meng και Zhang 2012) ενώ, οι ουσίες που παράγονται από τα στελέχη *Lactobacillus jenjensenii* και *Lactobacillus rhamnosus* φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη των στελεχών *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικά στη μεθικυλλίνη (Samantha Moorthy et al, 2014). Επίσης, χαμηλότερη τοξικότητα παρατηρείται στα σοφορολιπίδια που παράγονται από ζυμομύκητες όπως για παράδειγμα τα στελέχη *Candida apicola* και *Candida bombicola* από την surfactin ή άλλες βιοεπιφανειοδραστικές (Hirata et al 2009). Τέλος, τα σοφορολιπίδια διακρίνονται και για την χρήση τους ως καθαριστικά φρούτων και λαχανικών λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης (Pierce και Heilman, 1998).

- ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα αντιοξειδωτικά είναι συστατικά που αποτρέπουν την οξείδωση άλλων βιολογικών μορίων. Σε μια χημική αντίδραση οξείδωσης, δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες οι οποίες εντέλει επιφέρουν την καταστροφή των κυττάρων. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) δημιουργούνται στο δέρμα και στους ιστούς και η επιζήμια δράση τους αναστέλλεται από τα αντιοξειδωτικά. Ο κυτταρικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός συχνά δε δύνανται να ανταγωνιστεί το μεταβολικό στρες και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι μικροβιακές επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν επίσης παρουσιάσει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Για παράδειγμα, βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από τα στελέχη *Pseudomonas hubeiensis* και *Bacillus subtilis* RW - 1 έχουν μελετηθεί αναφορικά με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και προτάθηκαν ως εναλλακτική για τα φυσικά αντιοξειδωτικά (Takahashi et al. 2012 and Yalcin and Ergene 2010). Τεκμαίρεται, ότι η

αντιοξειδωτική ικανότητα από διάφορα συστατικά φυσικής προέλευσης αποτελεί μείζονος σημασίας ειδικά στον τομέα των τροφίμων ως πιθανή εφαρμογή σαν πρόσθετα τροφίμων για να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

- **ΩΣ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ**

Οι επιφανειοδραστικές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα χαμηλού μοριακού βάρους όπου ανήκουν τα μονογλυκερίδια, οι λεκιθίνες, τα γλυκολιπίδια, τα λιπαρά οξέα και οι λιπαρές αλκοόλες, τα οποία λόγω της αμφίφιλης δομής τους κατά τη γαλακτωματοποίηση μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τις επιφανειοδραστικές μεγάλου μοριακού βάρους που συμμετέχουν στο σχηματισμό και την σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων παρόλο δεν έχουν μεγάλη επιφανειακή δραστηριότητα. Σε αυτά ανήκουν οι πρωτεΐνες όπως η ζελατίνη, η καζεΐνη, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος και πολυσακχαρίτες σαν το αλγινικό άλας, η πρωτεΐνη Αραβικού κόμμεος, η ξανθάνη η δεξτράνη, το άμυλο και τα παράγωγα της κυτταρίνης (Stauffer, 2005, Kralova και Sjoblom, 2009). Οι γαλακτωματοποιητές, έχουν ρόλο μείζονος σημασίας που αφορά όχι μόνο στη διαλυτοποίηση και τη διασπορά αλλά και την σταθερότητα, την υφή και την εμφάνιση των τροφίμων (McClements, 2016). Αρχικός σκοπός των γαλακτωματοποιητών είναι η δημιουργία σταθερού γαλακτώματος και η ομοιόμορφη συσσωμάτωση των φάσεων με την βοήθεια των επιφανειακών και βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Τα βιοεπιφανειοδραστικά παρόλο που δεν έχουν ερευνηθεί αρκετά, φαίνεται να υπερέχουν σε σχέση με τα συνθετικά ως πρόσθετα τροφίμων. Σε σχετική έρευνα, αποδείχθηκε ότι βελτιώνεται η υφή και ελαττώνονται τα μικρόβια μετά από αποθήκευση 8 ημερών σε σκευάσματα μπισκότων που περιείχαν 0,1 % *Bacillus subtilis* είχαν πιο καλή υφή στη ζύμη.

1.1.5 Κόστος βιοεπιφανειοδραστικών

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που παρεμποδίζει τη βιομηχανική παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών είναι το κόστος παραγωγής τους. Αυτό οφείλεται κυρίως στο κόστος εκχύλισης, στο κόστος του θρεπτικού υποστρώματος καθώς επίσης και στις χαμηλές αποδόσεις που συνήθως παρατηρούνται κατά τη διαδικασία παραγωγής. Για το λόγο αυτό, οι προσπάθειες της επιστημονικής και βιομηχανικής κοινότητας κατευθύνονται στη χρήση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους (π.χ. τα αγροτο-βιομηχανικά απόβλητα) και στη βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης, σε συνδυασμό με την εφαρμογή καινοτόμων και αποτελεσματικών μεθόδων για την ανάκτηση, και τη χρήση ανασυνδυασμένων ή/και μεταλλαγμένων στελεχών που θα παρουσιάζουν υψηλές αποδόσεις. Ο παράγοντας που

επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, όπως άλλωστε και σε κάθε βιοτεχνολογική διεργασία, είναι το κόστος της πρώτης ύλης, το οποίο μπορεί να αντιστοιχεί από 10-30% από το ολικό κόστος παραγωγής (Miller et al., 1986; Hofvendahl et al., 2000). Συνεπώς η επιτυχία και η βιωσιμότητα μιας βιοτεχνολογικής διεργασίας εξαρτάται από την ανάπτυξη οικονομικών διεργασιών παραγωγής που παρουσιάζουν ταυτόχρονα υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα. Για το λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμη η χρησιμοποίηση χαμηλού κόστους πρώτων υλών ως θρεπτικά υποστρώματα για τις μικροβιακές ζυμώσεις.

Το πλεονέκτημα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών είναι ότι συνιστούν μια ομάδα συστατικών μείζονος σημασίας και χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας. Επίσης, είναι σημαντικό το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια τείνει να αυξάνει η ζήτηση τους στην παγκόσμια αγορά. Οι τελικές εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών επηρεάζονται από τις λειτουργικές και δομικές μονάδες αλλά και την καθαρότητα μετά την ανάκτηση. Για παράδειγμα, όταν η τελική εφαρμογή είναι τρόφιμο, χρειάζεται υψηλή καθαρότητα, η οποία συνεπάγεται και υψηλότερο κόστος, το οποίο ωστόσο δύναται να αντισταθμιστεί όταν το προϊόν είναι υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Ειδικά όσον αφορά στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, έχει μελετηθεί η αξιοποίηση φυτικών ελαίων, αποβλήτων ελαίων, αμυλούχων υποστρωμάτων, τυρογάλακτος και αποβλήτων από διεργασίες απόσταξης (Rodrigues and Teixeira 2006; Moldes et al., 2007; Rivera et al., 2007). Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η χρήση αυτών των υποστρωμάτων πρέπει να συνοδεύεται και από βελτιστοποίηση και μελέτη των παραγόντων που σχετίζονται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (π.χ. pH και θερμοκρασία κατά τη ζύμωση, πηγή αζώτου, πηγή άνθρακα και ο λόγος άνθρακα προς άζωτο, αρχική συγκέντρωσης σακχάρου κ.ο.κ.). Στο επόμενο κομμάτι θα πραγματοποιηθεί μια σύντομη αναφορά στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών μέσω της χρήσης διαφόρων ελαίων και στην επόμενη ενότητα θα πραγματοποιηθεί εκτενής αναφορά των προηγούμενων μελετών που αφορούν στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

1.1.6 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών με τη χρήση ελαίων

Η παγκόσμια παραγωγή ελαίων και λιπών ανά έτος υπολογίζεται σε 2,5-3 εκατομμύρια τόνους, ενώ περίπου το 75% είναι φυτικής προέλευσης. Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει τη χρήση φυτικών ελαίων όπως το κραμβέλαιο, το έλαιο Babassu, το έλαιο Canola και το αραβοσιτέλαιο, για τη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ως αποτελεσματικές και φθηνές πρώτες ύλες. Παρομοίως, άλλα φυτικά έλαια όπως το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο έχουν

χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ραμνολιπιδίων, σοφορολιπιδίων και λιπιδίων μαννοσυλερυθριτόλης από διάφορους μικροοργανισμούς. Ακόμη, πέρα από τα φυτικά έλαια, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες, απόβλητα έλαια από διυλιστήρια φυτικών ελαίων καθώς και της βιομηχανίας τροφίμων (π.χ. τηγανόλαδα). Επιπρόσθετα, διάφορα βιομηχανικά απόβλητα έλαια, όπως ξύγκι (tallow), λαρδί, απόβλητα της σαπωνοποιίας και ελεύθερα λιπαρά οξέα ενδέχεται να επηρεάσουν θετικά τη μικροβιακή ανάπτυξη και την παραγωγή μεταβολιτών ανάλογα με τη σύσταση που περιέχουν σε λιπαρά οξέα. Πλεονέκτημα αυτών αποτελεί το γεγονός ότι βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες και είναι άμεσα διαθέσιμα ανά τον κόσμο, σε αντίθεση με άλλες πρώτες ύλες που μπορεί να εντοπίζονται σε συγκεκριμένα μέρη και είναι διαθέσιμες εποχικά. Με την πάροδο των ετών και την επιτακτική ανάγκη να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα των αποβλήτων, τα έλαια αυτά έχουν αποκτήσει ενδιαφέρον σε βιοτεχνολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Κατά κύριο λόγο, τα έλαια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών είναι βρώσιμα και υψηλού κόστους, ενώ υπάρχει μια ποικιλία φυτικών ελαίων τα οποία δεν συνίσταται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Μερικά από αυτά είναι το έλαιο *jatropha*, το έλαιο *mesua*, το καστορέλαιο, το έλαιο *ramtil* και το έλαιο *jojoba*, τα οποία διατίθενται σε πολύ χαμηλότερες τιμές. Η ενσωμάτωση αυτών των ελαίων και αποβλήτων ελαίων χαμηλότερου κόστους στη βιομηχανική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών είναι δυνατόν να επιφέρει σημαντική μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής (Rodrigues L.R. και Teixeira J.A., 2008).

Ο Vollbrecht και οι συνεργάτες του ανέφεραν τη χρήση οικιακών φυτικών ελαίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *Tsukamurella spec.* DSM 44370. Εξετάστηκαν διάφορα έλαια, ωστόσο τα καλύτερα αποτελέσματα προήλθαν από αυτά που ήταν πλούσια σε ελαϊκό οξύ και το κραμβέλαιο. Ο χαρακτηρισμός των βιοεπιφανειοδραστικών έδειξε μείωση της επιφανειακής τάσης του νερού σε τιμές 37-49 mN/m για τα διαφορετικά γλυκολιπίδια που παρήχθησαν υπό αυτές τις συνθήκες. Τα παραγόμενα γλυκολιπίδια από αυτή τη μελέτη έδειξαν ανάλογες ιδιότητες με τις επιφανειοδραστικές ουσίες του εμπορίου. Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε 5% έλαιο *babacu* και 1% γλυκόζη στο υπόστρωμα, σε ζύμωση με το στέλεχος *Candida lipolytica*, όπου φάνηκε ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παρήχθησαν ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Sarrubo et al., 2007). Ακόμη, τα απόβλητα από την παραγωγή ελαιολάδου, (olive oil mill waste) χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα με τα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και *Bacillus subtilis* για την παραγωγή ραμνολιπιδίων και surfactin αντίστοιχα (Ramirez et al.,

2015). σημαντικές μελέτες έχουν επίσης πραγματοποιηθεί και με τη χρήση αποβλήτων ελαίων που απομένουν από τη θερμική επεξεργασία κατά την προετοιμασία φαγητού, ονομαζόμενα κοινώς «τηγανόλαδα». Το απόβλητο αυτό αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα περιβαλλοντικής μόλυνσης και γίνονται προσπάθειες για την περαιτέρω αξιοποίηση του σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Rodrigues L.R. και Teixeira J.A., 2008).

1.2 Γαλακτικά βακτήρια

Πρόκειται για «φιλικά» βακτήρια, τα οποία κατά κύριο λόγο μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ ή οξικό. Υπάρχει συσχέτιση με τις ζυμώσεις των τροφών και των ζωοτροφών όπως του γιαουρτιού, του κεφίρ κλπ. και συνδέονται με τις βλεννογόνες επιφάνειες ανθρώπων και ζώων που είναι υγιείς (Ouwehand 2002, El Aidy 2015). Τα γαλακτικά βακτήρια και συγκεκριμένα τα είδη *Lactobacillus*, χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση τροφίμων όπως παραδοσιακά ασιατικών προϊόντων που είναι φτιαγμένα από ρύζι, λαχανικά ή γάλα (Mariya Azan et al., 2017).

Όσα από τα γαλακτικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή, δηλαδή Generally Recognized As Safe (GRAS) μπορούν να εφαρμοστούν στα τρόφιμα και στον τομέα της υγείας. Επιπλέον, αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα γενών και έναν σπουδαίο αριθμό διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Όσα είδη ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* βρίσκονται στην ανθρώπινη και ζωική εντερική χλωρίδα, (Douillard, 2014) αποτρέποντας την παρουσία σηψιογόνων και παθογόνων βακτηρίων και κάποια άλλα εντοπίζονται στο δέρμα έχοντας ρόλο προστατευτικό. Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί πρόοδος στην αναγνώριση του ρόλου των γαλακτικών καθώς, λαμβάνουν δράση στην καταπολέμηση των αποικιών των παθογόνων και βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης των γαστρεντερικών οδών (Ghosh, 2014). Κάποιοι γαλακτοβάκιλλοι προκειμένου να προστατεύσουν παράγουν ενώσεις όπως: γαλακτικό οξύ, βακτηριοσίνες, υδρογονοπυροξείδια και βιοεπιφανειοδραστικά, που ανακόπτουν την ανάπτυξη των πιθανών παθογόνων (Agboola, 2014) και παρουσιάζουν συχνά αντιμικροβιακή δράση. Γενικότερα τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, είτε για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων με έμφαση στα γαλακτοκομικά, ως προβιοτικά, είτε για την παραγωγή γαλακτικού οξέος το οποίο στη συνέχεια πολυμερίζεται και παράγεται το πολυγαλακτικό οξύ, είτε ακόμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

1.2.1 Γαλακτικά βακτήρια και αντιμικροβιακή ιδιότητα

Τα γαλακτικά βακτήρια δρουν ως συντηρητικά κατά την παρασκευή και επακόλουθη αποθήκευση των ζυμούμενων τροφίμων και αυτό οφείλεται κυρίως στις όξινες συνθήκες που δημιουργούνται στα τρόφιμα κατά την ανάπτυξή τους. Αυτό κατά κύριο λόγο συμβαίνει μέσω της ζυμωτικής μετατροπής των υδρογονανθράκων σε οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ) με ταυτόχρονη μείωση του pH του τροφίμου, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που οδηγεί σε αυξημένη διάρκεια ζωής και ασφάλεια του τελικού προϊόντος. Η συνολική ανασταλτική δράση των γαλακτικών βακτηρίων, οφείλεται σε πιο σύνθετα ανταγωνιστικά συστήματα που παράγονται από καλλιέργειες εκκίνησης σύμφωνα με έρευνες των τελευταίων δεκαετιών. Εξαιρουμένου του γαλακτικού και οξικού οξέος, τα γαλακτικά βακτήρια είναι ικανά να παράγουν και να εκκρίνουν ανασταλτικές ουσίες, οι οποίες είναι ανταγωνιστικές σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών και έτσι μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στη συντηρητική τους δράση (L. Vuyst, 1994). Οι παραγόμενες ποσότητες, είναι κατά πολύ μικρότερες από το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ και περιλαμβάνουν μυρμηκικό οξύ, ελεύθερα λιπαρά οξέα, αμμωνία, αιθανόλη, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διακετύλιο, ακετοΐνη, 2,3- βουτανοδιόλη, ακεταλδεύδη, βενζοϊκό, βακτηριολυτικά ένζυμα, βακτηριοσίνες και αντιβιοτικά καθώς και αρκετές λιγότερο καλά καθορισμένες ή εντελώς άγνωστες ανασταλτικές ουσίες (Klaenhammer, 1998 · Daeschel, 1989 · Lind-grey και Dobrogosz, 1990, Schillinger, 1990 · Piard και Desmazeaud, 1991-1992 · Vandenbergh, 1993). Ορισμένες ουσίες εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση, έναντι πολλών τροφικών αλλοιώσεων και παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται στα τρόφιμα όπως ψυχοτροφικοί γαλακτοβάκιλλοι και λευκονοστατικά, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* κλπ.



Εικόνα 2: Παραγωγή διαφόρων συστατικών με αντιμικροβιακή δράση από τα κύτταρα των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* (Satpute et al., 2016).

Πίνακας 1.2.1: Στελέχη LAB και ιδιότητες αντιμικροβιακής δράσης (Sharma et al., 2016).

No.	LAB Strain	Source of strain	Application	Study
1.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	Antiadhesive activity against <i>Staphylococcus aureus</i>	Walencka et al. (2008)
2.	<i>Lactococcus lactis</i>	Curd sample	Antibacterial activity against the multidrug resistant pathogens	Sarvanakumari and Mani (2010)
3.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Portuguese dairy industry	Antimicrobial and antiadhesive properties	Gudiña et al. (2010)
4.	<i>Lactococcus paracasei subsp. Paracasei A20</i>	Portuguese dairy industry	Antimicrobial and Antiadhesive properties	Gudiña et al. (2010)
5.	<i>Lactobacillus pentosus</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i> co-culture	CECT 4023 CECT 221	Production and antimicrobial activity	Rodriguez-Pazo et al. (2013)
6.	<i>Lactobacillus spp.</i>	Egyptian dairy product	Antimicrobial activity	Gomaa (2013)
7.	<i>Lactobacillus plantarum</i> CFR2194	Kanjika (rice based ayurvedic	Antimicrobial and Antiadhesive activity	Madhu and Prapulla (2014)

		fermented product)		
8.	<i>Lactobacillus jensenii</i> and <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	American type culture collection (ATCC)	Biofilm dispersal and antimicrobial	Sambanthamoorthy et al. (2014)

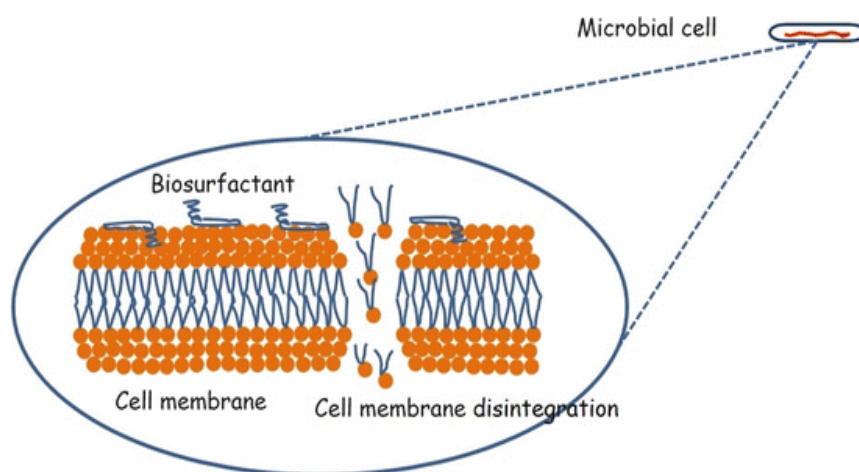
1.2.2 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ως αντιμικροβιακά από στελέχη *Lactobacillus*

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια σημαντική αύξηση για την εύρεση καινοτόμων αντιμικροβιακών ουσιών (εναλλακτικά ονομάζονται αντιμικροβιακοί παράγοντες) η οποία προέρχεται από την αυξανόμενη αντοχή των κλινικά παθογόνων στελεχών. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εντάσσονται στην κατηγορία αυτή συνεπώς διάφορες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη αυτών ενάντια σε παθογόνα στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσιαστικά διαρρηγνύουν την κυτοπλασματική μεμβράνη οδηγώντας στην κυτταρική λύση, τη διαρροή των μεταβολιτών και τη διάρρηξη διαφόρων πρωτεϊνικών σχηματισμών, μεταβάλλοντας εν τέλει σημαντικές λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης (Tahmourespour et al., 2011).

Η έκθεση των βιοεπιφανειοδραστικών στα κύτταρα προκαλεί διαταραχή στη διαπερατότητα της μεμβράνης του πλάσματος, λόγω της αλλαγής του περιεχομένου των λιπαρών οξέων. Πραγματοποιείται μια αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοεπιφανειοδραστικών και των λιπιδίων, με αποτέλεσμα την αναστολή του ενζύμου που περιορίζεται στη μεμβράνη και την εκροή ενδοκυτταρικών κυτταροπλασματικών συστατικών. Οι Cameotra και Makkar (2004) σε μια άλλη έρευνα παρατήρησαν ότι το αντιμικροβιακό εισέβαλε στη δομή της μεμβράνης του πλάσματος, ενώ αλληλεπιδρούσε με φωσφολιπίδια και άλλες πρωτεΐνες της μεμβράνης. Η αντιμετώπιση των κυττάρων *S. aureus* με τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες συνέβαλε στη μείωση της περιεκτικότητας σε λιπίδια και στη διάσπαση των πρωτεϊνών που υπάρχουν στη μεμβράνη του πλάσματος. Το παραπάνω φαινόμενο παρουσιάζει ιδιότητες αύξησης της μεμβρανικής πρωτεΐνης, ξεκινώντας τις διαμορφωτικές αλλαγές των μορίων των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Sharma et al., 2016).

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί στην αντιμικροβιακή δράση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα στελέχη *Lactobacillus*. Οι βιοεπιφανειοδραστικές από το στέλεχος *L. helveticus* βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικές ενάντια σε πληθώρα

παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών, τόσο Gram(+) όσο και Gram(-), καθώς και έναντι σε ζύμες. Ειδικότερα, σχεδόν ολοκληρωτική παρεμπόδιση σε συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικής μεταξύ 1.56-25 mg/mL παρουσιάστηκε για τα στελέχη *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση η βιοεπιφανειοδραστική ήταν αποτελεσματική ενάντια και στα στελέχη *E. coli* (90.4%), *P. aeruginosa* (75.6%), *Salmonella typhi* (78.6%), *Shigella flexneri* (70.2%), *Staphylococcus aureus* (92.5%), *Staphylococcus epidermidis* (98.4%), *Listeria monocytogenes* (99.5%), *Listeria innocua* (99.7%) and *Bacillus cereus* (99%) (Sharma et al., 2016b). Αντίστοιχα, αντιμικροβιακή δράση έναντι σε βακτηριακά παθογόνα στελέχη και στελέχη ζυμών έχουν παρουσιάσει οι βιοεπιφανειοδραστικές από τα στελέχη *L. lactis* 53, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 and *Lactobacillus paracasei* (Gudina et al., 2009; Rodrigues et al., 2006; Servin, 2004).



Εικόνα 3: Τρόπος δράσης Βιοεπιφανειοδραστικών (Sharma et al., 2016a).

Πλέον, είναι αναγνωρισμένα για τις αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακά και τα αντιικά σύμπλοκα τους πολλά βιοεπιφανειοδραστικά (Inés και Dhouha, 2015). Τα βιοεπιφανειοδραστικά διαθέτουν αντιμικροβιακό δυναμικό και λόγω αυτού καθίστανται κατάλληλα σύμπλοκα για εφαρμογές που αντιμετωπίζουν πολλές ασθένειες και δρουν ως θεραπευτικοί παράγοντες (Πίνακας 2.2) (Sharma et al., 2016a). Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παρήχθησαν από τους *S. thermophiles*, σύμφωνα με τους Rodrigues et al. (2006), σε συγκέντρωση 2,5 g/L αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Candida tropicalis*. Επιπλέον, σπουδαίες ιδιότητες έναντι, των *E. coli*, *S. agalactiae* και *S. pyogenes* με συγκέντρωση 25 mg/L, εμφάνισαν τα ακατέργαστα βιοεπιφανειοδραστικά (Gudiña et al., 2010). Όσον αφορά τους gram θετικούς και gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, φαίνεται να αντιμετωπίζονται

από το βιοεπιφανειοδραστικό που προέρχεται από από το *Lactobacillus paracasei* A20, σε διάφορες συγκεντρώσεις από 3,12 mg/L έως 50 mg/L (Sharma et al., 2016b). Σε νοπό γάλα απομονώθηκε το βιοεπιφανειοδραστικό που προέρχεται από το *Lactobacillus casei* MRTL3, το οποίο εμφάνισε αντιμικροβιακές ιδιότητες σε αρκετά παθογόνα όπως: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* και *Pseudomonas aeruginosa* (Sharma και Saharan, 2014).

Πίνακας 1.2.2: Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από στελέχη *Lactobacillus*: Αντιμικροβιακές ιδιότητες (Sharma et al., 2016a).

No.	Strain	Antimicrobial activity	References
1.	<i>Lactobacillus casei</i>	Antimicrobial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , and <i>Micrococcus roseus</i>	Gol-ek et al. (2009)
2.	<i>Lactococcus lactis</i>	Antimicrobial activity of biosurfactant (Xylolipids) against the multidrug resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>E. coli</i>	Sarvanakumari and Mani (2010)
3.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Growth inhibition of <i>E. coli</i> , <i>S. agalactiae</i> , and <i>S. pyogenes</i> with a concentration of 25 mg/ml	Gudiña et al. (2010)
4.	<i>Lactobacillus paracasei</i> A20	Antimicrobial activity against various gram-positive and gram-negative microorganisms at various concentration ranging from 3.12 mg/ml to 50 mg/ml	Gudiña et al. (2010)
5.	<i>Lactobacillus casei</i> MRTL3	Antimicrobial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11770, <i>Listeria monocytogenes</i> MTCC 657, and <i>L. innocua</i> ATCC 33090, <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199, <i>Salmonella typhi</i> MTCC 733	Sharma and Saharan (2014)

1.2.3 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από στελέχη *Lactobacillus* και ανανεώσιμες πηγές

Με απώτερο στόχο τη μείωση του κόστους παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, διάφορες ανανεώσιμες πηγές, και ειδικότερα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα έχουν μελετηθεί αναφορικά με την αξιοποίηση τους ως θρεπτικά υποστρώματα σε μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ενδεικτικά, οι Vecino et al. (2017) χρησιμοποίησαν λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα μετά από κλάδεμα αμπέλου ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, μετά από υδρόλυση, για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος *L. paracasei* και ειδικότερα γλυκολιπεπτιδίων (Vecino et al., 2017). Αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε και η οινολάσπη, από τη διαδικασία της οиноποίησης, σε συνδυασμό με corn steep liquor και εκχύλισμα ζύμης με το στέλεχος *L. pentosus* για την παραγωγή 4.8 mg/L βιοεπιφανειοδραστικών (Portilla-Rivera et al, 2007a; Portilla-Rivera et al, 2007b). Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλο και το στέλεχος *L. pentosus* CECT-4023 (Rodrigues et al., 2006) ενώ η καλλιέργεια του στελέχους *L. agilis* CCUG31450 σε τυρόγαλο οδήγησε στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε μορφή γλυκοπρωτεΐνης (Gudina et al., 2015). Ειδικότερα το τυρόγαλο και η καλλιέργεια του στελέχους *L. pentosus* απέδωσαν σημαντικά αποτελέσματα αναφορικά με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, όπως συνοψίζονται και σε βιβλιογραφικές μελέτες ανασκόπησης (Satpute et al., 2016; Sharma et al., 2016a) γεγονός που αποτέλεσε αφορμή και για την παρούσα μελέτη.

1.3 Τυρόγαλα

Τυρόγαλα ή ορός ή ορόγαλα, είναι το ρευστό μέρος του γάλακτος που λαμβάνεται ή χρησιμοποιώντας οξέα, πυτιά ή έπειτα απο τον τεμαχισμό του τυροπήγματος ή με την χρήση φυσικοχημικών μεθόδων κατα τη διάρκεια της παραγωγής καζεύνης (Δρ. Καμιναρίδης). Είναι απόβλητο και αποτελεί το 85-95 % του όγκου του γάλακτος με περιεχόμενα θρεπτικά συστατικά στο 55 % (Καραδήμα, 2009).

1.3.1 Σύσταση του τυρόγαλου

Η αναλογία των συστατικών ποικίλει ανάλογα με την προέλευση του γάλακτος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί και του τυριού που θα παρασκευαστεί. Κατά κύριο λόγο παρατηρούνται 6-8 % στερεά συστατικά, με το πρόβειο να υπερέχει σε σχέση με το αγελαδινό (Μάντης, 1993). Κατά την θέρμανση παρατηρείται αύξηση των διαλυτών αλάτων, των υδατοδιαλυτών βιταμινών και μικροποσοτήτων λίπους. Το γαλακτικό οξύ, το κιτρικό οξύ, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις σαν την ουρία, το ουρικό οξύ και βιταμίνες του συμπλόκου Β υπάρχουν σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Καραδήμα, 2009). Σπάνιες ήταν οι περιπτώσεις κάποιων βαρέων μετάλλων σε μηδαμινές ποσότητες σε τυρόγαλο που είχε αναμιχθεί με νερά πλυσίματος ή ήταν σε μορφή σκόνης (Καραδήμα, 2009). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών στερεών το καταλαμβάνει η λακτόζη 70-72 %, ακολουθούν τα μέταλλα με ποσοστό 12-15 % και τέλος οι οροπρωτεΐνες του γάλακτος με 8-10 % (Jelen, 2002).

1.3.2 Περιβαλλοντική ρύπανση

Αξιοσημείωτο είναι, το πρόβλημα διαχείρισης του τυρόγαλου καθώς για κάθε ένα κιλό τυριού, παράγονται εννέα κιλά τυρογάλακτος (Καραδήμα, 2009). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση ετησίως παράγονται 50.000.000 m³, (Kosseva, 2009) ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο 120.000.000 τόνοι. (Peters, 2006). Λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου του, όταν ρίπτονται στο περιβάλλον (σε ρέματα ή δίκτυο αστικών αποβλήτων), χωρίς να τους έχουν υποστεί περαιτέρω επεξεργασία το πρόβλημα της ρύπανσης αυξάνεται. Όταν η επεξεργασία του τυρόγαλου πραγματοποιείται σε συμβατικές αερόβιες εγκαταστάσεις έχει παρατηρηθεί πρόβλημα στη λειτουργία καθώς και υψηλότερο κόστος (Μεταξάτος, Σταματάκης, 1999). Η ρύπανση που επιφέρει στο περιβάλλον έχει μεγάλο BOD (20.000), που είναι 50 φορές μεγαλύτερο από αυτό των αστικών λυμάτων (Μεταξάτος, Σταματάκης, 1999).

Κάποιοι μικροοργανισμοί, παρατηρείται να έχουν καλές συνθήκες ανάπτυξης στο απόβλητο τυρόγαλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την οξείδωση της λακτόζης και των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται σε βάρος του διαλυμένου οξυγόνου, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της ζωής της χλωρίδας και της πανίδας του νερού. Επιπλέον, δημιουργείται έντονη δυσοσμία και εκτενής ρύπανση των αποδεκτών (Μεταξάτος, Σταματάκης, 1999). Η απόρριψή του στο περιβάλλον προκαλεί ρύπανση ενώ παράλληλα χάνονται και κάποιες θρεπτικές ουσίες που περιέχονται στο τυρόγαλο όπως πρωτεΐνες, λακτόζη κλπ. ενώ, θα ήταν δυνατή η χρήση τους σε βιομηχανίες τροφίμων, ως ζωοτροφές κλπ. (Μεταξάτος, Σταματάκης, 1999).

1.3.3 Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Η λακτόζη αποτελεί το κύριο συστατικό του τυρογάλαου και συντελεί στην υψηλή περιεκτικότητα σε BOD (Biochemical Oxygen Demand) και COD (Chemical Oxygen Demand). Λόγω αυτού, το τυρόγαλο όπως ειπώθηκε και παραπάνω, είναι ρυπογόνο και η απόρριψή του αποτελεί πρόβλημα για τον γαλακτοκομικό τομέα. Ωστόσο, τα καθιστά χρήσιμα για την παραγωγή διαφόρων ενώσεων η περιεκτικότητά του σε λιπίδια, πρωτεΐνες και μέταλλα. Για την βιοαποκατάσταση του τυρογάλαου απαιτούνται μικροβιακές διαδικασίες και παρέχεται μια επισκόπηση των κύριων προϊόντων που προέρχονται από αυτό. Καινοτόμες ιδέες αποτελούν, η χρήση του στην παραγωγή ποτών που βοηθούν στην υγεία, ορού γάλακτος, ξυδιού και βιοπολυμερών που μπορούν να προστεθούν σε διάφορα τμήματα τροφίμων αλλά και στη βιομηχανία φαρμάκων (Jessica L. Sebastián-Nicolás, 2019).

1.3.4 Ποτά με βάση τον ορό γάλακτος

Μια από τις πιο ελκυστικές χρήσεις του τυρογάλαου και της πρωτεΐνης του, είναι η προσθήκη τους σε ποτά με ή χωρίς μικροβιακή μετατροπή. Άλλωστε η βιομηχανία των ποτών με βάση τον ορό γάλακτος χρονολογείται έως το 1970 και μέχρι σήμερα διατίθενται μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Μερικά από αυτά είναι, ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση ή και χωρίς ζύμωση, ποτά για αθλητές με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αλλά και ποτα που συμβάλλουν στην διατροφή (Chavan κ.α. 2015, Skryplonek και Jasińska 2017). Σύμφωνα με έρευνα έως το 2025 η αγορά των ποτών που είναι κατάλληλα για κατανάλωση και περιέχουν ορό γάλακτος αναμένεται να φτάσει τα 17,67\$ δισεκατομμύρια, διότι η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος είναι πλέον η καλύτερη πηγή πρωτεΐνης (www.globenewswire.com). Επιπροσθέτως, ένα ακόμα καινοτόμο προϊόν είναι το Ελβετικής καταγωγής αναψυκτικό “Rivella”, ένα αφρώδες ποτό εμπλουτισμένο με ορό γάλακτος που έχει κατακτήσει τη δεύτερη θέση μετά την coca cola και επεκτείνεται και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Η παραγωγή των ποτών με ορό γάλακτος γίνεται με απλές τεχνολογίες και χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών και πεπτιδίων με πολλές βιολογικές και προωθητικές λειτουργίες υγείας (π.χ. αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, ανοσορρυθμιστικές, καρδιοπροστατευτικές και υποτασικές δραστηριότητες) (Patel 2015). Από την άλλη πλευρά, πολλές φορές θεωρούνται ως μη ελκυστικά, επειδή η αναλογία λακτόζης-γλυκόζης, επίπεδο οξύτητας και περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα, πολλές φορές

μπορεί να οδηγήσει σε γλυκές/γαλακτοκομικές και αλμυρές/ξινές γεύσεις με μειωμένη γευστικότητα. Τα προϊόντα αυτά είναι πολύ ευπαθή εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης λακτόζης. Προκειμένου να ξεπεραστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα, διάφορες τεχνολογικές λύσεις έχουν αναπτυχθεί, όπως η ρύθμιση του pH, η συμπλήρωση γεύσης και η μικροβιακή ζύμωση (T. Zotta et al., 2020).

1.3.5 Ξίδι με ορό γάλακτος

Μια πολύτιμη επιλογή για την ανακύκλωση του ορού γάλακτος είναι η μετατροπή του σε ξίδι με ορό γάλακτος σε παραδοσιακά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Πρόκειται για τη βιομετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη από ζύμωση λακτόζης η οποία αργότερα θα μετατραπεί σε οξικό οξύ από την AAB (Acetic Acid Bacteria) (Parrondo κ.λ.π. 2009). Το FAO/WHO ορίζει ως ξίδι οποιοδήποτε υγρό, κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση το οποίο προέρχεται αποκλειστικά από τη διαδικασία της διπλής ζύμωσης αλκοολικού και οξικού από υγρά ή άλλα προϊόντα γεωργικής προέλευσης (Joint FAO/WHO Food Standards Programme 1998). Σύμφωνα με το FDA των Ηνωμένων Πολιτειών τα προϊόντα ξιδιού απαιτείται να έχουν ως ελάχιστη ποσότητα οξύτητα 4g ανά 100g. Επιπλέον το FDA έχει καθιερώσει τους « Οδηγούς Πολιτικής Συμμόρφωσης » καθώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πρότυπα για τον προσδιορισμό τους, οπότε ο Οργανισμός ακολουθεί το παραπάνω σχετικά με την επισήμανση των ξιδιών όπως : μηλίτης, κρασί, βύνη, ζάχαρη, αλκοόλη και μειγμάτων ξιδιών (FDA 2007). Αντίθετα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχουν συγκεκριμένα περιφερειακά πρότυπα ανάλογα την χώρα που παράγει και πουλάει στην εθνική περιοχή. Επίσης, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ένα ελάχιστο όριο 5% (w/v) και μέγιστο όριο 0,5% (v/v) για την οξύτητα και την αιθανόλη αντίστοιχα, όταν η ακατέργαστη ύλη για τη ζύμωση του οξικού οξέος δεν είναι κρασί. Τα πιο γνωστά ξίδια είναι από μηλίτη ή κρασί παρόλα αυτά μπορούν να παραχθούν και από άλλα μη συμβατικά, με πηγές σακχάρων όπως πλούσιο σε λακτόζη τυρόγαλο. Στην Ελβετία υπάρχει παραγωγή ξιδιών από τυρόγαλα και τα παραγωγά του αλλά είναι ελάχιστα γνωστά.

Ο Parrondo και λοιποί (2003) παρήγαγε ξίδι με περιεκτικότητα σε οξικό οξύ 5-6% (v/v) με διαδοχική ζύμωση του *K. marxianus* και του *Acetobacter pasteurianus*. Το στέλεχος *K. marxianus* παρήγαγε υγρό ορού γάλακτος με τελική συγκέντρωση αιθανόλης περίπου 55 g/l εντός 48 ωρών σε βέλτιστη θερμοκρασία 30°C διότι χρησιμοποίησε διηθημένο ορό γάλακτος

με 135 g/l λακτόζης. Επιπροσθέτως, ο *A. pasteurianus* μετέτρεψε την αιθανόλη σε οξικό οξύ σε 4 ημέρες με απόδοση περίπου 84%. Ομοίως, τα στελέχη *K. marxianus* ζύμωσαν τριπλάσιο συμπυκνωμένο ορό γάλακτος, που παράγει υγρό ορού γάλακτος και περιέχει 8% αιθανόλη. (Tamura 2000) Το προκύπτον ξίδι από ορό γάλακτος περιέχει 5,2% οξικό οξύ και παρουσίασε αμυδρή μυρωδιά αγελαδινού γάλακτος αλλά και μια ήπια όξινη γεύση, αφού αραιώθηκε 2 φορές πριν από την οξείδωση της αιθανόλης σε οξικό οξύ από τον *A. pasteurianus* IFO 14814. Το ξίδι αυτό έχει προταθεί ως σταθερό συστατικό στην δίαιτα των αγελάδων παραγωγής γάλακτος (Lustrato και λοιποί 2013). Διαδοχική ζύμωση του *K. marxianus* και *A. acetii* οδήγησαν σε μέση κατανάλωση λακτόζης 56%, απόδοση αιθανόλης 6,7 g/l ανά ημέρα και παραγωγή οξικού οξέος 4,35 g/l ανά ημέρα. Όσον αφορά τις κατάλληλες πρώτες ύλες για το σχεδιασμό καινοτόμων βιοεπεξεργασιών που διεξάγονται από επιλεγμένες ζύμες και στελέχη AAB για παραγωγή ξιδιών προστιθέμενης αξίας είναι ο ορός γάλακτος και τα παράγωγα του.

1.3.6 Αξιοποίηση τυρογάλακτος για την ανάπτυξη βιοδιεργασιών

Η ολοκληρωμένη ανάπτυξη βιοδιεργασιών έχει ως στόχο την ανάπτυξη μιας ολιστικής προσέγγισης για την αξιοποίηση του τυρογάλακτος και τη μείωση της απόρριψης στο περιβάλλον. Ο απώτερος σκοπός έγκειται στην ενσωμάτωση αυτών των βιοδιεργασιών σε βιοδυλιστήρια για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της βιο-οικονομίας. Όπως προαναφέρθηκε, το τυρόγαλο περιέχει σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης αλλά και λακτόζης. Συνήθως, οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν και αξιοποιούν ξεχωριστά είτε το κλάσμα της πρωτεΐνης, είτε το κλάσμα της λακτόζης (Lappa et al., 2019).

Η αυξανόμενη ανάγκη για φυσικά συστατικά στη βιομηχανία τροφίμων έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον στις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος, οι οποίες παρουσιάζουν φυσικοχημικές ιδιότητες που συντελούν στη βελτίωση της υφής και της ποιότητας όταν εφαρμόζονται σε τρόφιμα (Cinelli et al., 2014). Ειδικότερα, το κλάσμα της πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιφανειοδραστικό συστατικό, ως βελτιωτικό της υφής, ως παράγοντας αφρισμού ή πηκτικός παράγοντας, ως πυκνωτικό μέσο και ως γαλακτωματοποιητής (Khalifa et al., 2018; Andoyo et al., 2018)

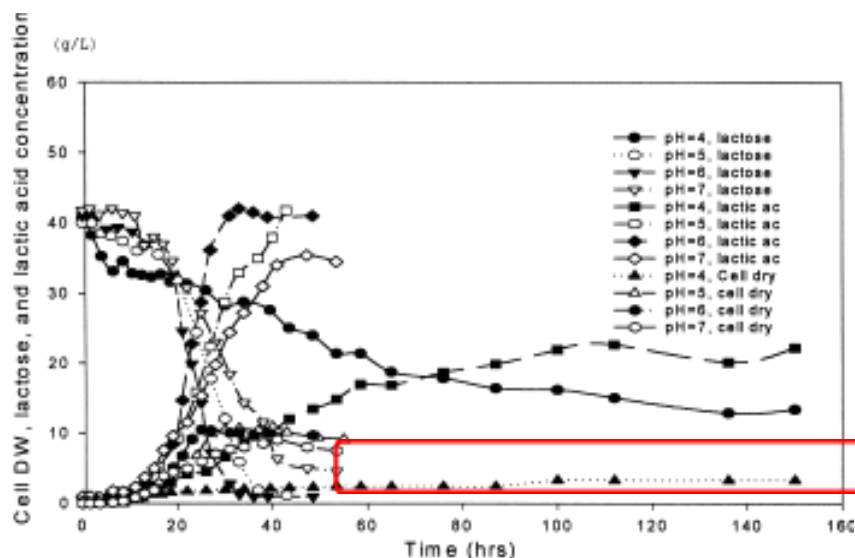
Αντίστοιχα, μείζονος σημασίας αποτελεί και η αξιοποίηση του κλάσματος της λακτόζης. η οποία κυρίως χρησιμοποιείται σε μικροβιακές ζυμώσεις ή ως υπόστρωμα σε ενζυμικές αντιδράσεις. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος, η αιθανόλη, τα μικροβιακά λιπίδια, η

μικροβιακή βιομάζα, οι πολυ-υδροξυαλκανοϊκοί εστέρες, τα ένζυμα και οι ενδοπολυσακχαρίτες αποτελούν μερικά από τα πιο συχνά μελετώμενα προϊόντα σε μικροβιακές βιομετατροπές χρησιμοποιώντας τη λακτόζη ως πηγή άνθρακα (Larra et al., 2019). Ωστόσο, η έρευνα επικεντρώνεται στην προσπάθεια για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε τρόφιμα και να αποφέρουν ίσως και οφέλη στην υγεία, ώστε να βρεθούν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και στη φαρμακοβιομηχανία. Για παράδειγμα, διάφορες μελέτες εξετάζουν την παραγωγή γαλακτο-ολιγοσακχαριτών μέσω ενζυμικών αντιδράσεων της β-γαλακτοσιδάσης με τη λακτόζη ως υπόστρωμα. Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες αποτελούν συστατικά με πρεβιοτικές ιδιότητες που αποφέρουν θετικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία μέσω της μετατροπής της εντερικής μικροχλωρίδας (Moreno et al., 2017). Οι μικροβιακά παραγόμενες χρωστικές αποτελούν μια ακόμα καινοτόμα προσέγγιση για την παραγωγή συστατικών με υψηλή προστιθέμενη αξία, όπως για παράδειγμα τα καροτενοειδή που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμών (π.χ. *Rhodospiridium* sp, *Rhodotorula* sp, *Phaffia rhodozyma*). Επίσης, η λακτόζη έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, η οποία είναι ένας πολυσακχαρίτης παραγόμενος από βακτήρια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές στα τρόφιμα βελτιώνοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Azeredo et al., 2019). Αντίστοιχα λοιπόν, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα της λακτόζης του τυρογάλακτος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών ως καινοτόμα προϊόντα που δύνανται να υπεισέλθουν και να εξεταστούν ως συστατικά στη βιομηχανία τροφίμων.

1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση των γαλακτικών βακτηρίων: Επίδραση pH

Όπως προαναφέρθηκε η καλλιέργεια των γαλακτικών βακτηρίων είναι πολύ χρήσιμη για τη βιομηχανία των τροφίμων, και στις προηγούμενες ενότητες αναπτύχθηκαν οι διάφορες εφαρμογές των βακτηρίων *Lactobacillus*. Ωστόσο, οι συνθήκες ζύμωσης, και ειδικότερα η θερμοκρασία, η τιμή pH, ο τύπος του θρεπτικού υποστρώματος, και το οξυγόνο είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη των lactobacilli (Oh et al., 1995). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα περισσότερα βακτήρια, αντίστοιχα και τα γαλακτικά, όταν βρεθούν σε συνθήκες χαμηλού στρες, τότε αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής ώστε να αντισταθούν σε μια επερχόμενη έκθεση σε υψηλότερες συνθήκες στρες (Silva et al., 2005).

Η ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι μια διεργασία στην οποία το παραγόμενο προϊόν δρα παρεμποδιστικά στη μικροβιακή αύξηση, καθώς επικρατούν όξινες συνθήκες. Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια προσαρμόζονται και παρουσιάζουν αντοχή στις υψηλές συγκεντρώσεις οξέος, ώστε να συνεχιστεί η ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέος (Fu and Mathews, 1999). Οι Fu and Mathews, (1999) μελέτησαν την επίδραση του γαλακτικού οξέος στην κυτταρική ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum* και την κατανάλωση υποστρώματος, σε διαφορετικές τιμές pH, τόσο σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, καθώς τα γαλακτικά βακτήρια είναι προαιρετικά αναερόβια, χρησιμοποιώντας εμπορική λακτόζη και λακτόζη από τυρόγαλα. Η βέλτιστη τιμή pH βρέθηκε στο εύρος 5-6, ενώ στην τιμή 4 η ανάπτυξη παρεμποδίστηκε (Εικόνα 4, κόκκινο πλαίσιο), και αντίστοιχα μειώθηκε σημαντικά η κατανάλωση της λακτόζης.



Εικόνα 4: Επίδραση της τιμή pH στη μικροβιακή αύξηση, την κατανάλωση λακτόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε εύρος τιμών 4-7 (Fu and Mathews, 1999)

Σε μια άλλη εργασία, μελετήθηκαν διαφορετικά στελέχη LAB, ανάμεσα σε αυτά και τα στελέχη *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus* και *L. paracasei*, όπου εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της τιμής pH στην ανάπτυξη και την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Adamberg et al., 2003). Το στέλεχος *L. paracasei* E1H3 βρέθηκε να εμφανίζει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις χαμηλές τιμές pH. Στη μελέτη των Yang et al. (2018) μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής τιμής pH στην αύξηση και την παραγωγή βακτηριοσίνης. Διαφορετικές τιμές pH εξετάστηκαν, ήτοι 4.5, 5.5, 6.2, 7.4 και 8.5, και τα αποτελέσματα έδειξαν τη στατιστικά σημαντική επίδραση της αρχικής τιμής

pH. Συνεπώς, αυτές οι προηγούμενες μελέτες αποτέλεσαν ένα έναυσμα για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης αναφορικά με την επίδραση της τιμής pH κατά τη μικροβιακή αύξηση και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από επιλεγμένα στελέχη *Lactobacillus*.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης αφορά στην αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, ειδικότερα το τυρόγαλο, ως θρεπτικό υπόστρωμα χαμηλού κόστους, για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με τη χρήση γαλακτικών βακτηρίων. Με στόχο τη μελέτης της ανάπτυξης και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης, μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής τιμής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καθώς επίσης και η επίδραση της προσθήκης ελαίου από τα απόβλητα καφέ, ως παράγοντας που θα υποκινήσει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Επίσης, στις βέλτιστες συνθήκες, οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές εξετάστηκαν αναφορικά και με την πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση.

Τα σημαντικά στοιχεία της παρούσας μελέτης είναι η καινοτομία όσον αφορά στη χρήση του τυρογάλακτος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χρησιμοποιώντας μη-παθογόνα γαλακτικά βακτήρια, παρέχοντας τη δυνατότητα να εξεταστούν περαιτέρω για το σχεδιασμό σε πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, παράγοντας προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιακά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων

Τα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή του πειράματος ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και προέρχονται από 4 διαφορετικές συλλογές με τα ακρωνύμια: **LQC**, **CECT**, **ACA-DC** και **FMCC**.

Αναλυτικότερα:

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

CECT: Spanish Type Culture Collection, University de Valencia

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

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

Πίνακας 2.1: Πίνακας στελεχών γαλακτικών βακτηρίων γένους *Lactobacillus*

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΛΛΟΓΗ	ΣΤΕΛΕΧΗ
<i>Lb. coryniformis</i>	LQC	752
<i>Lb. coryniformis</i>	LQC	753
<i>Lb. sakei</i>	LQC	854
<i>Lb. fermentum</i>	ACA-DC	182
<i>Lb. plantarum</i>	ACA-DC	276
<i>Lb. plantarum</i>	ACA-DC	731
<i>Lb. plantarum</i>	ACA-DC	4052
<i>Lb. rhamnosus</i>	CECT	278
<i>Lb. pentosus</i>	CECT	4023
<i>Lb. pentosus</i>	FMCC	E108

Οι συνθήκες στις οποίες θα αναπτυχθούν τα παραπάνω γαλακτικά βακτήρια είναι σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C και pH 4, 5, 6.8 και 6.8 με προσθήκη ελαίου καφέ.

2.2 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών του τυρογάλακτος (deproteinization)

Για την προετοιμασία του τυρογάλακτος, αρχικά ρυθμίζουμε το pH του τυρογάλακτος στην τιμή pH 4,2 με 5N H₂SO₄ για να γίνει στο ισοηλεκτρικό σημείο η κατακρήμνιση. (Sharma et al., 2014, Vera et al. 2018). Αμέσως μετά, τοποθετείται σε μπουκάλες Duran και αποστειρώνεται στους 121°C για περίπου 15-20 λεπτά, ώστε η πρωτεΐνη να καθιζάνει και στη συνέχεια τοποθετούνται σε συνθήκες ψύξης για να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός (3 έως 8°C, για 12-16 h). Το επόμενο βήμα είναι η διήθηση, για να απομακρυνθεί το κλάσμα της πρωτεΐνης που έχει καθιζάνει και να διαυγάσει το κλάσμα που περιέχει τη λακτόζη. Η περιεχόμενη λακτόζη αρχικά είναι 50 g/L και με τη μέθοδο της αραιώσης, αφού ογκομετρηθεί, αραιώνουμε ώστε να έχουμε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνουμε ξανά πριν χρησιμοποιηθεί στις ζυμώσεις στους 121°C για 15-20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό με τα γαλακτικά βακτήρια, ρυθμίζεται το pH, με αποστειρωμένο οξύ (5 N H₂SO₄) ή βάση (5M NaOH), ανάλογα με την εκάστοτε αρχική τιμή του πειράματος και μοιράζεται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (50 ml).

2.3 Καλλιέργειες γαλακτικών βακτηρίων

Αρχικά, από τα γαλακτικά βακτήρια στα cryovials που είναι στους -80°C γίνεται συχνή ανανέωση σε τρυβλία με MRS agar μέσω της μεθόδου streaking και στη συνέχεια επωάζονται στους 37°C για 24 ώρες. Έπειτα, αποθηκεύουμε τα 10 στελέχη σε cryovials στους -20°C στα οποία περιέχονται 0,8 mL γλυκερόλης και 0,8 mL προκαλλιέργειας. Για τις καλλιέργειες των γαλακτικών βακτηρίων, από τα τελευταία παίρνουμε 0,2 mL, με πιπέτα σταθερού όγκου, από το καθένα και εμβολιάζουμε τους σωλήνες με 10 mL MRS οι οποίοι θα τοποθετηθούν για επώαση στους 37°C ή 30°C (ανάλογα με το στέλεχος) για 8-10 ώρες. Αυτή η διαδικασία αποτελεί το πρώτο βήμα πριν την έναρξη του πειράματος.

2.4 Εμβολιασμός καλλιέργειας

Αρχικά το τυρόγαλο μοιράζεται με αποστειρωμένο ογκομετρικό κύλινδρο σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, αφαιρούμε 1 mL από την MRS προκαλλιέργεια κάθε γαλακτικού βακτηρίου. Το δείγμα, μπαίνει σε eppendorf των 2 mL και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 5.200 στροφές. Με την πιπέτα αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, ώστε τα κύτταρα να παραμείνουν στον πυθμένα. Στο eppendorf με τα κύτταρα

προστίθενται 2 mL από τις κωνικές με το τυρόγαλο και χρησιμοποιούμε το vortex για τη διάλυση των κυττάρων. Από το κάθε erppendorf βάζουμε στην αντίστοιχη κωνική 1 mL και έπειτα στην επώαση στους 37°C που αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων.

Το κάθε πείραμα διαρκούσε 120 ώρες και λαμβάνεται 4 mL δείγμα κάθε 24 ώρες σε δύο erppendorf των 2 mL, ενώ κάθε 3-5 ώρες ελεγχόταν το pH και γινόταν προσαρμογή ανάλογα με την εκάστοτε τιμή που είχε οριστεί στην αρχή του πειράματος. Τα δείγματα διατηρούνται στην κατάψυξη στους -20°C για τη διεξαγωγή των παρακάτω αναλύσεων.

Στο πείραμα με το λάδι του καφέ προσθέτουμε στις κωνικές που έχει μοιραστεί το τυρόγαλο 1 mL λάδι καφέ αφού πρώτα έχουμε πάρει τα 2 mL για τη διάλυση των κυττάρων των γαλακτικών. Το pH κυμαίνεται από 7.4 ± 0.2 και θερμοκρασία 25°C.

2.5 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Lactose, g/l)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid chromatography, HPLC) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της λακτόζης. Αρχικά από τα δείγματα χρησιμοποιείται το υπερκείμενο στο οποίο θα γίνει αραιώση 1:10 με 10mM H₂SO₄, δηλαδή 200 μ L δείγματος και 1800 μ L H₂SO₄. Το κάθε νέο δείγμα τοποθετείται σε vials αφού πρώτα φιλτραριστεί με φίλτρο Whatman 0,2 μ M. Η ανάλυση γίνεται, σε HPLC-Shimadzu υψηλής απόδοσης με στήλη ROA-organic acid H⁺ (300 μήκος x 7.8mm εσωτερική διάμετρο, Phenomenex), η οποία είναι συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer) και ροή 0,6 ml/min κάτω από συγκεκριμένη πίεση και θερμοκρασία φούρνου στους 65°C.

2.6 Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total dry weight, g/L)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η βιομάζα και να προσδιοριστεί η βακτηριακή ανάπτυξη. Παίρνουμε δείγμα, το οποίο τοποθετείται σε erppendorf, κατά τη διάρκεια του πειράματος ανά 24 ώρες όπως έχει προαναφερθεί και φυγοκεντρούμε 2 mL σε φυγόκεντρο Nuve NF 048 για 10 λεπτά στις 5200 στροφές. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε καθαρό erppendorf ώστε να χρησιμοποιηθεί στις υπόλοιπες αναλύσεις ενώ τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της βιομάζας αλλά και για τον προσδιορισμό των βιοεπιφανειοδραστικών όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια. Στη συνέχεια ζυγίζουμε τα γυάλινα φιαλίδια σε ζυγό ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία και καταγράφουμε τη μέτρηση. Τα

κύτταρα ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αφού διαλυθούν στο vortex τα μεταγγίζουμε με προσοχή στα γυάλινα φιαλίδια, τα οποία θα τοποθετηθούν σε κλίβανο στους 65°C για 24 ώρες ώστε να επιτευχθεί η ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους. Εν συνεχεία, ζυγίζονται ξανά τα φιαλίδια, όταν φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπολογίζεται η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους η οποία βασίζεται στη διαφορά βάρους και εκφράζεται σε γραμμάρια ανά λίτρα. Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιείται και για τη μέτρηση του τυρόγαλου στο σημείο 0, πριν δηλαδή τοποθετηθεί μέσα η καλλιέργεια.

2.7 Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών και δείκτης γαλακτωματοποίησης (E₂₄,%)

Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα γαλακτικά βακτήρια μπορεί να είναι είτε εξωκυτταρική, είτε να παράγονται προσδεδεμένες στα κύτταρα (cell bound). Η πλειονότητα των προηγούμενων μελετών αναφέρεται στις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που είναι προσδεδεμένες στα κύτταρα, ωστόσο στην παρούσα μελετήθηκαν και οι δύο περιπτώσεις μέσω της αξιολόγησης του δείκτη γαλακτωματοποίησης (Emulsification index, E₂₄, %) και της μετατόπισης ελαίου. Οι δύο αυτές προαναφερθείσες μέθοδοι αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για την αξιολόγηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, μετά τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ένα ακόμα πείραμα όπου και μετρήθηκε η επιφανειακή τάση αντίστοιχα και για τις δύο περιπτώσεις.

α. Εξωκυτταρικές

Από τα 2 mL δείγματος θα χρειαστεί 1,5 mL από το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την φυγοκέντρωση και 1,5 mL παραφινέλαιο. Τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα, πρώτα το παραφινέλαιο και μετά το υπερκείμενο και αναδεύονται στο vortex για 1 min το καθένα. Έπειτα, τοποθετούνται στο σκοτάδι για 24 ώρες και μετριέται το συνολικό ύψος και το ύψος του γαλακτώματος που έχει δημιουργηθεί στις 24, 48 και 72 ώρες ώστε να δούμε εάν διατηρείται. Για τον υπολογισμό όπου Hemulsion το ύψος του γαλακτώματος και H_{total high of liquid} το συνολικό ύψος και E₂₄, E₄₈, E₇₂ ο δείκτης για κάθε ώρα αντίστοιχα.

Τύπος: $E_{24} = (\text{Height of emulsion layer} / \text{Total height}) * 100$



Εικόνα 5: Παρουσία και απουσία γαλακτώματος κατά τη μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης E_{24}

β. Προσδεμένες κυτταρικά (cell-bound)

Σκοπός αυτή τη φορά είναι ο έλεγχος για τα κύτταρα οπότε θα χρειαστεί ένα παραπάνω στάδιο, αυτό της εκχύλισης. Αρχικά, με 1 mL νερού ξεπλένουμε τα κύτταρα μέσα στο erpendorf και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 5200 στροφές. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με πιπέτα σταθερού όγκου και ακολουθεί προσθήκη 1 mL διαλύματος PBS (πίνακας 5.3). Αφού διαλυθούν τα κύτταρα με το vortex μεταγγίζεται το περιεχόμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα. Επόμενα βήματα είναι η προσθήκη 4 mL PBS στο σωλήνα και η τοποθέτηση τους στο ψυγείο υπό ανάδευση για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, με πιπέτα σταθερού όγκου βάζουμε 2 mL σε erpendorf και αφού γίνει η φυγοκέντρωση κρατάμε το υπερκείμενο το οποίο θα φιλτραριστεί και 2 mL από αυτό θα ξανά τοποθετηθούν σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 2 mL παραφινέλαιο. Τέλος, τοποθετούνται στο σκοτάδι για 24 ώρες και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέτρησης με τις εξωκυτταρικές.

Πίνακας 2.2: Πίνακας θρεπτικών συστατικών και συγκεντρώσεων που περιέχονται στο PBS

Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,24
NaCl	8

2.9 Τεστ αντιμικροβιακής δράσης

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, τα 2 mL δείγματος φυγοκεντρώνονται και κρατάμε το υπερκείμενο ενώ στη βιομάζα προστίθενται 1 mL PBS και για 24 ώρες τοποθετείται στο ψυγείο υπό ανάδευση. Εν συνεχεία, ξανά φυγοκεντρείται το δείγμα που βρίσκεται στο ψυγείο και κρατάμε το υπερκείμενο που προκύπτει για τα αντιμικροβιακά. Οι παθογόνοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι εξής: *Salmonella euntentidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

Σε τρυβλία petri που περιέχουν TSB υπόστρωμα υπό στείρες συνθήκες γίνονται 4 τρύπες και αφού χωριστεί σε τέσσερα τμήματα με μια μπατονέτα απλώνουμε τους παθογόνους μικροοργανισμούς, με προσοχή ώστε να μην μολύνουμε το εσωτερικό της κάθε τρύπας. Μέσα σε αυτές θα τοποθετηθούν 50 μ L υπερκειμένου και 50 μ L εκχυλίσματος αντίστοιχα για κάθε γαλακτικό. Τέλος, θα τοποθετηθούν στην επώαση για τουλάχιστον 24 ώρες και θα ελεγχθούν στις 24 και 48 ώρες.

2.10 Επίδραση της προσθήκης ελαίου σε φωτόμετρο μικροπλακών

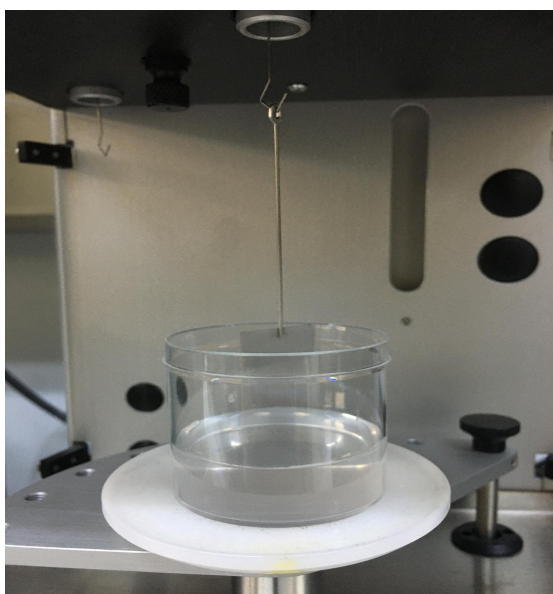
Τα πειράματα σε φωτόμετρο μικροπλακών (microplate reader) πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση της προσθήκης ελαίου καφέ στη μικροβιακή ανάπτυξη σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L. Στην περίπτωση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο microplate, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση (optical density, OD) σε μήκος κύματος $\lambda=620$ nm και υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης μ (h^{-1}).

2.11 Μέτρηση επιφανειακής τάσης

Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης πραγματοποιήθηκε με το τενσιόμετρο K20 (Krüss tensiometer, KRÜSS GmbH, Germany) με τη μέθοδο του πλακιδίου Wilhelmy plate (1.9 cm platinum plate, wetted length: 40.20 mm). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της έντασης που χρειάζεται ώστε να επιτευχθεί αποκόλληση του πλακιδίου από την επιφάνεια ή τη διεπιφάνεια. Η παρουσία βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, φαίνεται στη μείωση της επιφανειακής τάσης, ενώ η μέτρηση της είναι αρκετά ακριβής και γρήγορη. Επιπλέον,

φαίνεται στη μείωση της επιφανειακής τάσης συγκρίνοντας με την επιφανειακή τάση του νερού ή του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως η φύση του υγρού, ο περιβάλλοντας χώρος και η θερμοκρασία (Μιχαλεντζάκη Δ., 2012).

Η επιφανειακή τάση μετρήθηκε με τενσιόμετρο σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), που είχε ισοσταθμιστεί με απιονισμένο νερό. Πριν από κάθε μέτρηση το πλακίδιο απολυμαίνεται και αποστειρώνεται με φλόγιστρο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία με ακετόνη ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης. Η μέτρηση του δείγματος (~20 mL), αφού τοποθετηθεί σε ειδικό δοχείο πραγματοποιείται με δύο επαναλήψεις και η μέτρηση του μέσου όρου τους εκφράζει το αποτέλεσμα.



Εικόνα 6: Μέτρηση επιφανειακής τάσης με το Wilhelmy plate.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση του pH στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ασυνεχείς ζυμώσεις.

Για τον έλεγχο της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, επιλέχθηκαν 10 γαλακτικά στελέχη και μελετήθηκε η συμπεριφορά τους σε διαφορετικές τιμές pH. Οι τιμές, οι οποίες μελετήθηκαν είναι 4, 5 και 6.8 σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ως ένδειξη για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ήταν ο δείκτης γαλακτωματοποίησης και εν συνεχεία η μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Επίσης αξιολογήθηκε η κατανάλωση λακτόζης, η παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες 250 mL, ενώ ως θρεπτικό μέσω χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλο χωρίς κάποια περαιτέρω προσθήκη θρεπτικών συστατικών ή πηγών αζώτου. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε 24 h και παράλληλα κάθε 4h-6h γινόταν έλεγχος-ρύθμιση του pH, μέσω αποστειρωμένου οξέος (5M NaCl) ή βάσης (5M NaOH), αναλόγως την επιθυμητή τιμή. Τα αποτελέσματα των αρχικών πειραμάτων παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 4.1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Επίδραση pH επιλεγμένων στελεχών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

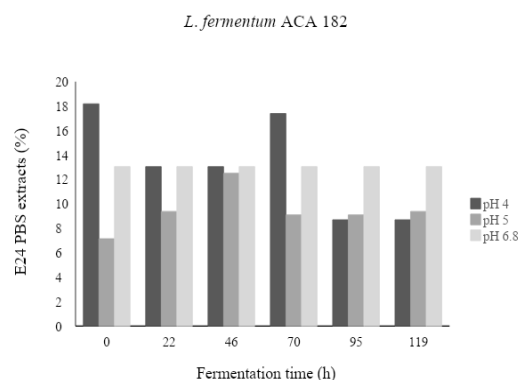
	Strain	T _f (h)	Lactose (g/L)	Lactic acid (g/L)	TDW (g/L)	E ₂₄ PBS extracts (%)	E ₂₄ supernatants (%)
pH 4	ACA 182	95	5.44	2.13	0.55	8.70	17.39
	ACA 276	95	5.63	4.53	0.60	13.04	21.74
	ACA 731	95	4.39	5.29	0.85	8.70	21.74
	ACA 4052	95	3.86	0.35	0.35	13.64	17.39
	CECT 278	95	8.51	8.03	2.95	13.64	18.18
	CECT 4023	70	2.31	1.87	0.25	13.50	15.00
	LQC 752	119	3.95	3.58	0.80	13.64	17.39
	LQC 753	119	1.50	1.26	0.85	13.64	21.74
	LQC 854	95	1.70	0.00	0.15	11.00	27.27
	FMCC E108	95	4.52	4.61	0.90	13.64	25.00
pH 5	ACA 182	119	15.84	2.54	2.65	9.38	19.23
	ACA 276	95	14.65	4.53	0.30	9.38	21.74
	ACA 731	70	2.21	4.69	0.55	9.38	15.38
	ACA 4052	95	11.73	3.07	0.30	12.50	19.23
	CECT 278	95	17.22	7.56	4.60	9.38	23.08
	CECT 4023	119	2.15	1.60	0.60	17.39	30.43
	LQC 752	95	10.12	2.16	0.25	9.09	13.04
	LQC 753	95	10.40	1.80	6.95	9.00	66.67
	LQC 854	119	15.78	0.00	4.05	13.04	39.13
	FMCC E108	46	10.15	2.05	0.10	9.09	48.00
pH 6.8	ACA 182	95	6.04	1.79	1.10	13.04	21.74
	ACA 276	119	15.51	8.22	0.70	10.87	39.13
	ACA 731	119	15.33	12.81	1.85	13.04	30.43
	ACA 4052	119	13.72	11.76	3.15	13.04	39.13
	CECT 278	70	14.28	9.00	2.00	19.05	26.09
	CECT 4023	46	9.16	0.00	0.90	13.04	34.78
	LQC 752	95	2.33	2.05	1.15	13.64	21.74
	LQC 753	95	2.35	0.73	0.80	16.67	21.74
	LQC 854	95	7.71	2.55	0.25	13.04	26.09
	FMCC E108	70	5.85	2.19	0.50	18.18	21.74

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι τιμές ανάλογα με το μέγιστο συντελεστή γαλακτωματοποίησης που επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και αντιστοιχεί στο σημείο ζύμωσης T_f . Για το συγκεκριμένο χρονικό σημείο της ζύμωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα οι τιμές για την παραγωγή βιομάζας (TDW, g/L), γαλακτικού οξέος (Lactic acid, g/L) και την κατανάλωση λακτόζης (Lactose, g/L). Ο δείκτης γαλακτωματοποίησης παρουσιάζεται για τις βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται εξωκυτταρικά όσο και για τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τα κύτταρα.

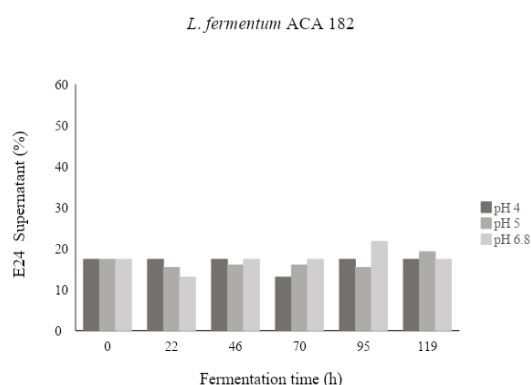
Διαφαίνεται λοιπόν, ότι τα στελέχη ευνοούνται περισσότερο σε pH 5 και 6.8 αντιθέτως, σε pH 4 εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές. Το μοναδικό στέλεχος που δύναται να αναπτύσσεται σε pH 4 είναι το CECT 278. Ειδικότερα, στις 95 ώρες, κατανάλωσε 8,51 g/L λακτόζης και παρήγαγε 8,03 g/L γαλακτικού οξέος. Η πλειονότητα των υπόλοιπων στελεχών κατανάλωσε περί τα 5 g/L λακτόζης, από τα 20 g/L αρχική λακτόζη, παράγοντας κυρίως γαλακτικό οξύ. Όσον αφορά στην τιμή pH 5, τα στελέχη που κατανάλωσαν μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης είναι κατά φθίνοντα αριθμό τα CECT 278 στις 95 ώρες, με κατανάλωση 17,22 g/L ακολουθεί το ACA 182 στις 119 ώρες με 15,84 g/L και τέλος το LQC 854 στις 119 ώρες με 15,78 g/L. Στα δύο από τα τρία προαναφερθέντα στελέχη, παρατηρείται και υψηλή παραγωγή ολικού ξηρού βάρους, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Εξαίρεση αποτελεί το ACA 182 που παρήγαγε μόνο 2,65 g/L, ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα ολικού ξηρού βάρους φαίνεται να παράχθηκε από το LQC 753 στις 95 ώρες αγγίζοντας τα 6,95 g/L. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό γαλακτωματοποίησης του LQC 753 που ξεπερνά το 65% αλλά και του στελέχους E108 που αγγίζει σχεδόν το 50%.

Στο pH 6.8 δεν παρατηρούνται υψηλά ποσοστά στην παραγωγή ολικού ξηρού βάρους, με υψηλότερη τιμή 3,15 g/L του ACA 4052 στις 119 ώρες. Επιπλέον περισσότερη λακτόζη κατανάλωσαν τα ACA 276, ACA 731 και CECT 278, με υψηλότερη τιμή του πρώτου 15,51 g/L, ενώ το ACA 731 μετέτρεψε τα 15,33 g/L σε 12,81 g/L γαλακτικού οξέος. Το pH 6.8 υπερέχει στο δείκτη γαλακτωματοποίησης σε σχέση με τα υπόλοιπα pH. Οι τιμές κυμαίνονται 10,87 g/L του ACA 276 έως 19,05 g/L του CECT 278, αλλά και στη γαλακτωματοποίηση εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών οι τιμές είναι υψηλές. Τα στελέχη στο pH 6.8 εμφάνισαν υψηλότερη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σύμφωνα με το δείκτη γαλακτωματοποίησης. Δεδομένου ότι δεν υπήρξε ακριβής συσχέτιση του δείκτη γαλακτωματοποίησης με την τιμή pH και το χρόνο ζύμωσης, τα επόμενα

διαγράμματα παρουσιάζουν πιο αναλυτικά για κάθε στέλεχος, το δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στις διαφορετικές τιμές pH. Σε κάθε περίπτωση που παρουσιάζεται το διάγραμμα (α) αντιστοιχεί στα εκχυλίσματα PBS, τα οποία αντιστοιχούν στις βιοεπιφανειοδραστικές που ενδέχεται να παράγονται προσδεδεμένες στο κυτταρικό τοίχωμα ενώ το διάγραμμα (β) στο δείκτη E_{24} από το υπερκείμενο υγρό.



(α)

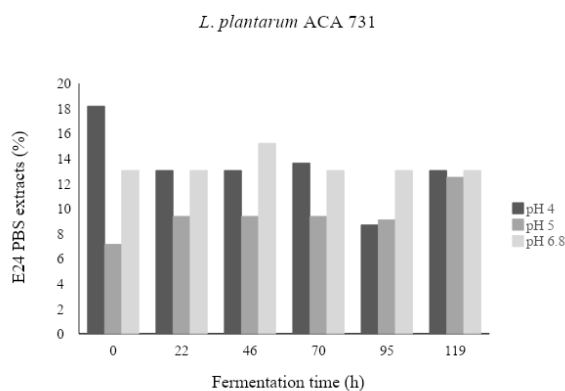


(β)

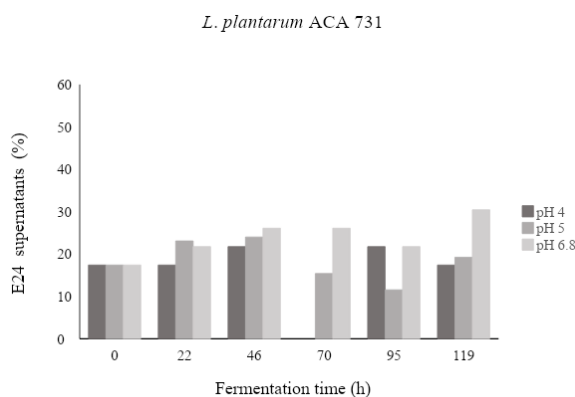
Γράφημα 3.1: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 182.

Παρατηρώντας τη συμπεριφορά του *L. fermentum* στις συγκεκριμένες συνθήκες είναι εμφανές ότι στη γαλακτωματοποίηση των εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 17-20%, ενώ στο διάγραμμα των εκχυλισμάτων υψηλότερη τιμή είναι του pH 4 στις 0 ώρες. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του στελέχους *L.*

fermentum CRL 722, αναφέρθηκε ότι η ανάπτυξη του ήταν πιο αργή σε pH 4.5 σε αντίθεση με άλλα pH όπως το pH 5, 5.5 και 6 (LeBlanc et al., 2004). Παρομοίως, βρέθηκε ότι σε pH 4.5 τα στελέχη *L. mesenteroides* L.124 και L.442 εμφάνισαν πολύ χαμηλή δραστηριότητα, στην τελική βιομάζα και βακτηριοσίνη, ενώ το βέλτιστο pH για την ανάπτυξή τους ήταν μεταξύ 6.0-6.5. Τέλος, προτάθηκε καταστολή της ανάπτυξης LAB σε pH<5.0 (Mataragas et al., 2003).



(α)

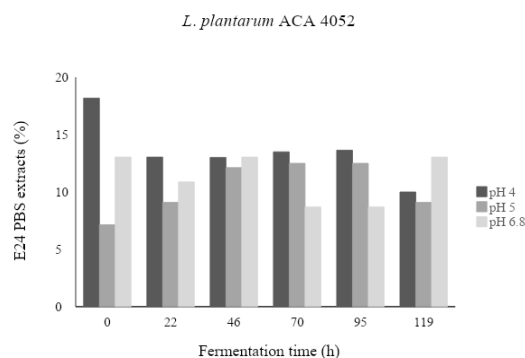


(β)

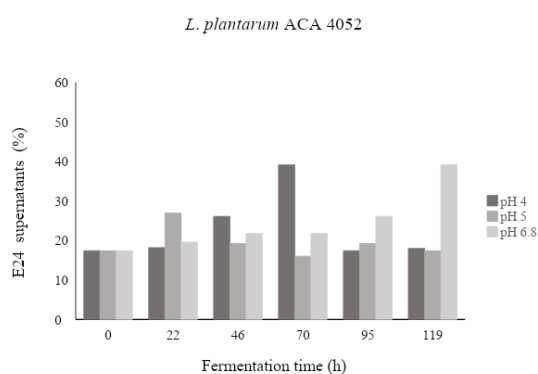
Γράφημα 3.2: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E₂₄ (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 731.

Στο διάγραμμα του δείκτη γαλακτωματοποίησης του στελέχους ACA 731 διακρίνεται μικρή διαφορά μεταξύ των τιμών του pH 4 & 6.8 κοντά στο 13-14 %, με μέγιστη στο pH 4 στις 0 ώρες. Από την άλλη πλευρά οι τιμές του pH 5 είναι χαμηλότερες και αυξάνονται σταδιακά. Σε μελέτη των Bobillo & Marshall το 1992, παρατηρήθηκε ότι

το *L.plantarum* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται στις διάφορες περιβαλλοντικές αλλαγές, μεταβάλλοντας τις μεταβολικές του οδούς. Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *L.plantarum* ευνοείται περισσότερο σε pH 5-6 (Fu & Mathews, 1999). Παρόλα αυτά, στο συγκεκριμένο στέλεχος φαίνεται να ισχύει μόνο για τις εξωκυτταρικές βιοεπιφανειοδραστικές. Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε στέλεχος αντιδρά διαφορετικά στις διάφορες συνθήκες.



(α)

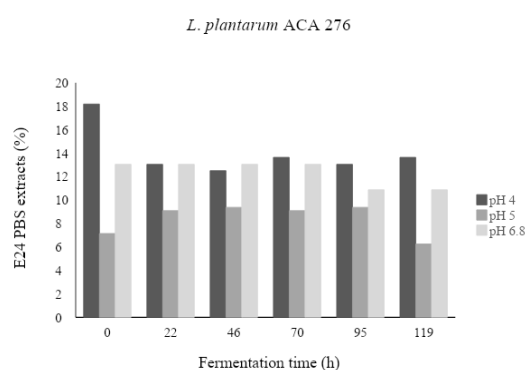


(β)

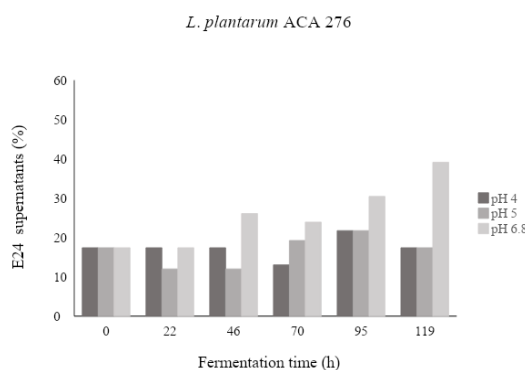
Γράφημα 3.3: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 4052.

Στο στέλεχος ACA 4052 παρατηρούμε εξίσου υψηλές τιμές στο pH 4, με υψηλότερη στα εκχυλίσματα στις 0 ώρες και στις εξωκυτταρικές βιοεπιφανειοδραστικές στις 70 ώρες αγγίζοντας το 40%. Το ACA 4052 αντιστοιχεί στο *L. plantarum*, το οποίο είναι από τα πιο χρησιμοποιούμενα βακτήρια όσον αφορά στη μετατροπή λακτόζης σε

γαλακτικό οξύ, διότι παρουσιάζει γρήγορο ρυθμό μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ, ενώ παράλληλα μπορεί να αφομοιώνει και άλλα θρεπτικά συστατικά όπως η πρωτεΐνη στον ορό γάλακτος. Γι' αυτό το λόγο, στην παραγωγή προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση αρκετά συχνά χρησιμοποιείται το συγκεκριμένο στέλεχος ως καλλιέργεια εκκίνησης (Fu & Mathews, 1999).



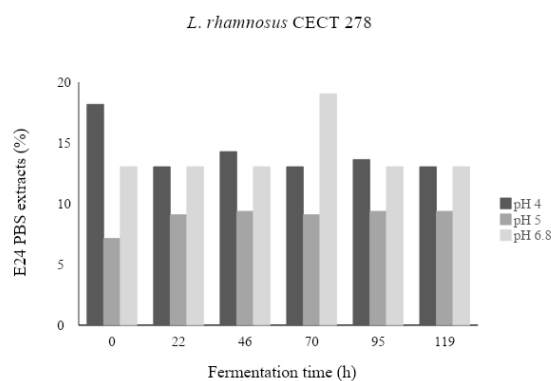
(α)



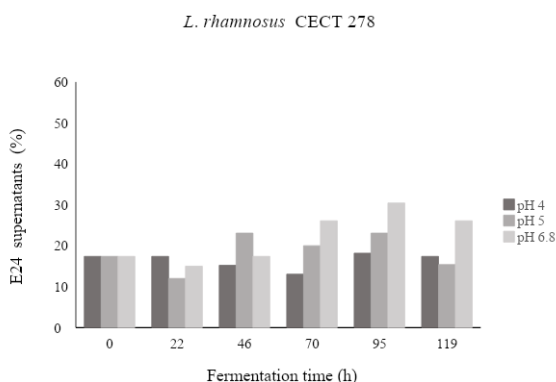
(β)

Γράφημα 3.4: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους ACA 276.

Όσον αφορά στο στέλεχος ACA 276 σε pH 4 & 6.8 οι τιμές των εκχυλισμάτων κυμαίνονται μεταξύ 13-14%, ενώ ακόμα μια φορά η υψηλότερη τιμή εντοπίζεται στις 0 ώρες του pH 4 (18%). Από την άλλη πλευρά οι τιμές του pH 5 δεν ξεπερνούν το 10%. Στις εξωκυτταρικές βιοεπιφανειοδραστικές ευνοείται περισσότερο από το pH 6.8, όπου παρουσιάζει σταδιακή αύξηση με μέγιστη τιμή στις 119 ώρες.



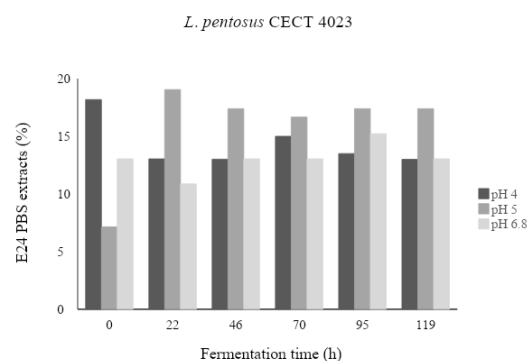
(α)



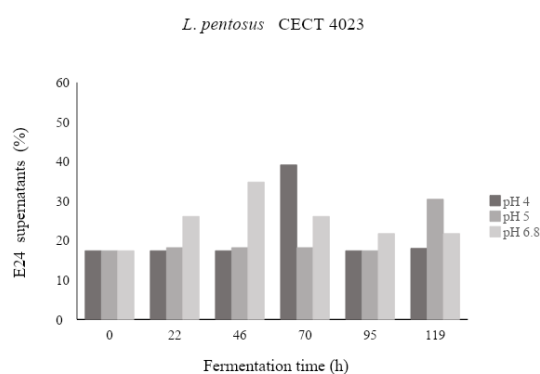
(β)

Γράφημα 3.5: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους CECT 278.

Παραπάνω, στο πρώτο διάγραμμα εντοπίζεται το υψηλότερο γαλάκτωμα που εντοπίστηκε στο συγκεκριμένο πείραμα σε pH 6.8 στις 70 ώρες, ενώ παράλληλα αρκετά υψηλή ήταν και η τιμή του pH 4 στις 0 ώρες. Από την άλλη πλευρά, στο διάγραμμα των εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών αρχικά οι τιμές ήταν χαμηλές για όλα τα pH, αλλά αργότερα αυξήθηκαν σταδιακά σε κάποια.



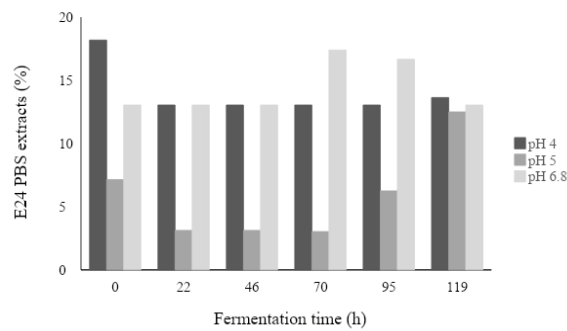
(α)



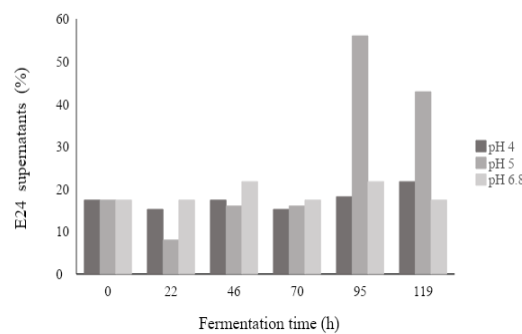
(β)

Γράφημα 3.6: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E₂₄ (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους CECT 4023.

Το CECT 4023 στο διάγραμμα των εκχυλισμάτων παρατηρούνται σημαντικά υψηλές τιμές κυρίως στο pH 5 το οποίο παρόλο που στις 0 ώρες έχει την χαμηλότερη τιμή, από τις 22 έως τις 119 ώρες έχουν δημιουργήσει ένα υψηλό ποσοστό γαλακτώματος κοντά στο 18-20%. Όσον αφορά στα γαλακτώματα των pH 4 και 6.8, κυμαίνονται κατά μέσο όρο στο 12-14%. Στο δεύτερο διάγραμμα, η υψηλότερη τιμή είναι αυτή του pH 4 στις 70 ώρες και σε pH 5 το γαλάκτωμα αυξάνεται γύρω στο 30% στις 119 ώρες και έπειτα παρατηρείται απότομη πτώση.



(α)



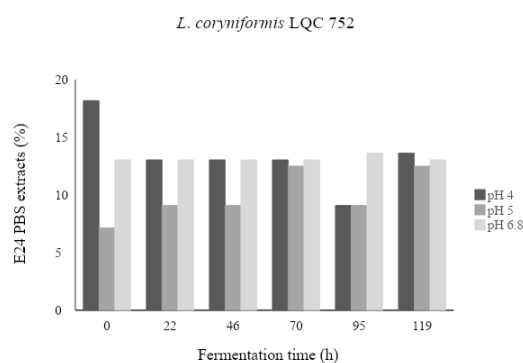
(β)

Γράφημα 3.7: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E₂₄ (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους LQC 753.

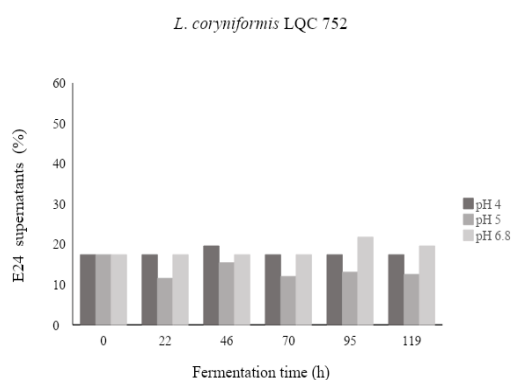
Στο διάγραμμα των εκχυλισμάτων του στελέχους LQC 753 οι τιμές των γαλακτωμάτων που αφορούν το pH 5 είναι πολύ χαμηλές σε σχέση με τα υπόλοιπα pH, που σημαίνει ότι είτε οι συνθήκες είτε κάποιος άλλος παράγοντας τα εμπόδισαν να αναπτυχθούν. Από την άλλη πλευρά, στο δίπλα διάγραμμα παρατηρείται η υψηλότερη τιμή γαλακτώματος που αγγίζει σχεδόν το 60% παρόλο που μέχρι τις 95 ώρες διατηρεί αρκετά χαμηλές τιμές.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν, ότι ρόλο μείζονος σημασίας για την παραγωγή βακτηριοσύνης παίζουν τόσο το pH όσο και το μέσο καλλιέργειας. Επιπλέον, παράλληλα με την ανάπτυξη του LAB στο MRS παρατηρείται δραματική πτώση του pH από ότι σε BHI, όπως επίσης και μεγαλύτερη ποσότητα βακτηριοσύνης. Οι

βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή βακτηριοσύνης των LAB που αναπτύχθηκαν σε MRS ήταν σε pH 6.2 και 37°C (Yang et al., 2018).



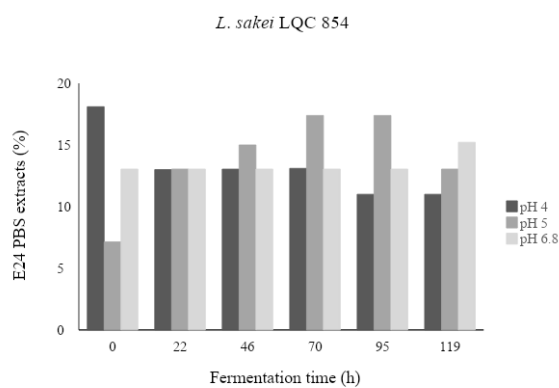
(α)



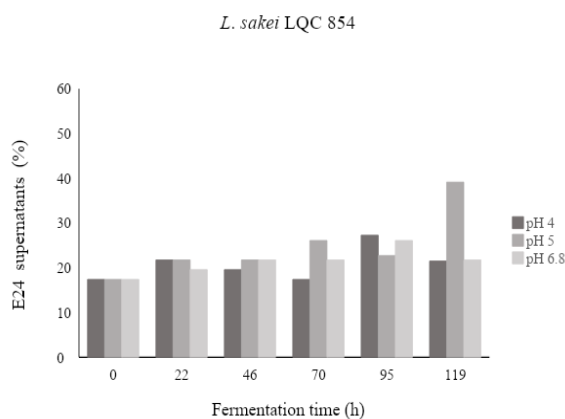
(β)

Γράφημα 3.8: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους LQC 752.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούνται μικρές αποκλίσεις στα γαλακτώματα μεταξύ των ωρών και των pH. Στο pH 5 ενδεχομένως είναι το λιγότερο ευνοϊκό για το στέλεχος LQC 752. Η υψηλότερη τιμή στο διάγραμμα των εκχυλισμάτων είναι εμφανώς αυτή σε pH 4 στις 0 ώρες που αγγίζει το 18% και στο διάγραμμα των εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών σε pH 6.8 στις 95 ώρες που ξεπερνά το 20%.



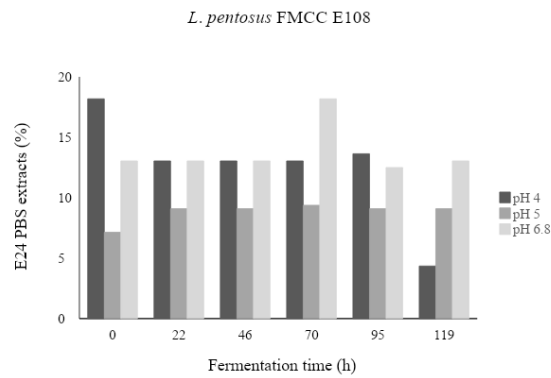
(α)



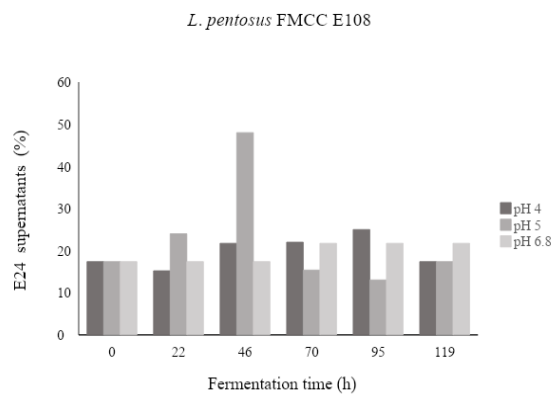
(β)

Γράφημα 3.9: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E_{24} (%) των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους LQC 854.

Στο στέλεχος LQC 854 παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση των τιμών των εξωκυτταρικών στα δείγματα των 70, 95 και 119 ωρών, με αυτή σε pH 5 να ξεχωρίζει. Σταθερά παραμένουν στα εκχυλίσματα τα γαλακτώματα σε pH 4 και 6.8 στις 22, 46 και 70 ώρες και η υψηλότερη τιμή εμφανίζεται σε pH 4 στις 0 ώρες.



(α)



(β)

Γράφημα 3.10: Δείκτης γαλακτωματοποίησης E₂₄ (%) των εκχυλίσμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών (α) και εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών (β) του στελέχους FMCC E108.

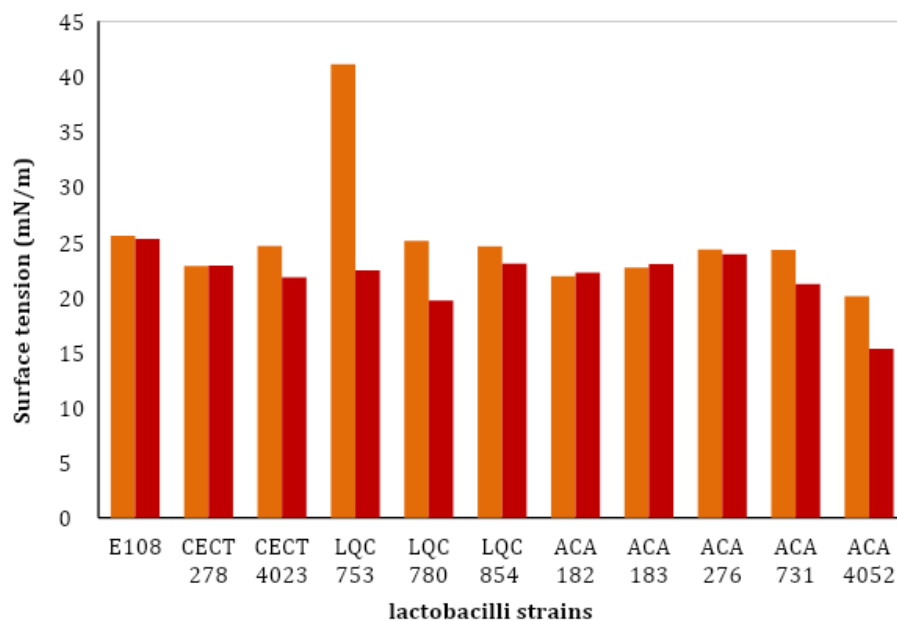
Τέλος, αναφορικά με τα εκχυλίσματα του στελέχους E108, στο pH 4 παρατηρείται σταθερό γαλάκτωμα από τις 22 έως και τις 95 ώρες, ενώ στο pH 6.8 οι τιμές των γαλακτωμάτων είναι σχεδόν ίδιες με εξαίρεση τις 70 ώρες. Από την άλλη πλευρά στο διάγραμμα των εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών παρατηρούνται χαμηλές τιμές με μοναδική εξαίρεση το γαλάκτωμα σε pH 5 στις 46 ώρες. Ενδιαφέρον προκαλεί η μείωση της παραγωγής του L-γαλακτικού σε αντίθεση με τα επίπεδα του D-γαλακτικού, τα οποία αυξάνονται καθώς το pH μειώνεται.

3.2 Μελέτη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε δύο διαφορετικές τιμές pH 5 και 6.8

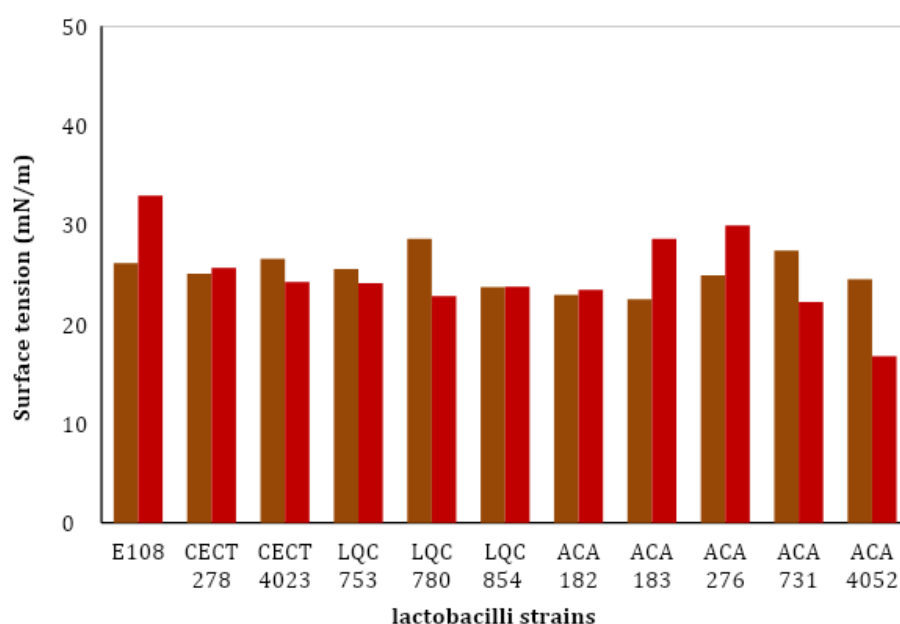
Τα προηγούμενα πειράματα που περιγράφηκαν στην ενότητα 4.1 πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές τιμές pH και αξιολογήθηκε ο δείκτης γαλακτωματοποίησης για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, ως μια μέθοδο γρήγορη και αρκετά αξιόπιστη. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι τιμές που παρατηρήθηκαν ήταν αρκετά χαμηλές, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη, κατά την οποία στο τυρόγαλο προστέθηκαν εξωτερικές πηγές θρεπτικών συστατικών, ώστε να μην υπάρχει παρεμπόδιση από την έλλειψη κάποιου συστατικού. Συνεπώς, στον επόμενο πειραματικό σχεδιασμό, συμπεριλήφθηκαν δύο τιμές pH (ήτοι 5 και 6.8) και αξιολογήθηκε η μέτρηση της επιφανειακής τάσης με τενσιόμετρο, η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους και η κατανάλωση λακτόζης. Τα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μετά από 42 και 62 h ζύμωσης.

3.2.1 Μελέτη της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών μέσω της αξιολόγησης της επιφανειακής τάσης

Όπως προαναφέρθηκε, η μέτρηση της επιφανειακής τάσης αποτελεί μια πιο αξιόπιστη μέθοδο αναφορικά με το δείκτη γαλακτωματοποίησης ή τη μετατόπιση ελαίου που συχνά εφαρμόζονται στη βιβλιογραφία. Στα επόμενα παρουσιάζεται η μείωση της επιφανειακής τάσης από τις βιοεπιφανειοδραστικές που προήλθαν από εκχύλιση των κυττάρων σε σύγκριση με το διάλυμα PBS, για τις 42 (Διάγραμμα 4.11) και 62 h ζύμωσης (Διάγραμμα 4.12).



Γράφημα 3.11: Μείωση της επιφανειακής τάσης των βιοεπιφανειοδραστικών από εκχύλιση μετά από 42h ζύμωσης σε συνθήκες: ■:pH 5, T:37°C; ■:pH 6.8, T:37°C;



Γράφημα 3.12: Μείωση της επιφανειακής τάσης των βιοεπιφανειοδραστικών από εκχύλιση μετά από 62h ζύμωσης σε συνθήκες: ■:pH 5, T:37°C; ■:pH 6.8, T:37°C;

Η μείωση της επιφανειακής τάσης σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε αφαιρώντας τη μετρούμενη επιφανειακή τάση από την επιφανειακή τάση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS (72 mN/m). Αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,

ένα στέλεχος δύναται να χαρακτηριστεί ως παραγωγός βιοεπιφανειοδραστικών όταν επιφέρει μείωση της επιφανειακής τάσης >8 mN/m (Gudina et al., 2011; Rodrigues et al., 2006a). Εύκολα παρατηρείται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η μείωση είναι μεγαλύτερη από 20 mN/m, γεγονός που επιβεβαιώνει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από την πλειονότητα των στελεχών. Σημαντική μείωση από το PBS παρατηρείται για το στέλεχος LQC 753 σε pH 5 (41 mN/m) και για το στέλεχος LQC 780 (28,6 mN/m). Αντίστοιχα, στην περίπτωση του pH:6,8 σημαντική μείωση παρουσιάζει το στέλεχος E108 (32,9 mN/m) μετά από 62 h, καθώς και τα στελέχη ACA DC 183 και ACA DC 276 (28,6 και 39 mN/m αντίστοιχα).

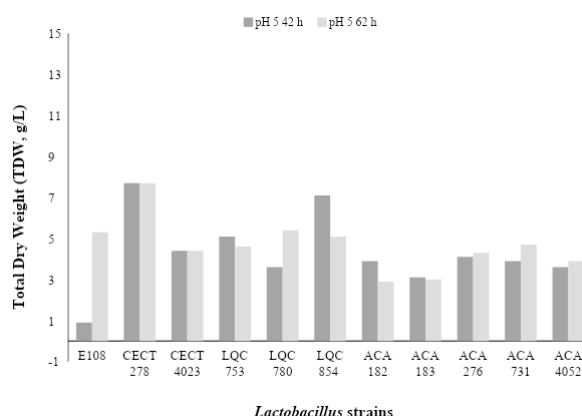
Προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν αναφέρει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών από γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιώντας το τυρόγαλο ως θρεπτικό υπόστρωμα. Το τυρόγαλο αποτελεί ένα αρκετά πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα καθώς περιέχει λακτόζη, αμινοξέα και βιταμίνες (Rodrigues L.R. and Teixeira J.A., 2008). Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες παρατηρείται η προσθήκη επιπλέον θρεπτικών συστατικών όπως το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη (Sharma et al., 2014; Rodrigues et al., 2006 a,b). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Sharma et al., (2016b) το προβιοτικό στέλεχος *L. helveticus* MRTL 91 παρουσίασε μείωση της επιφανειακής τάσης από 72 σε 39,5 mN/m χρησιμοποιώντας τυρόγαλο και εκχύλισμα ζύμης. Οι Rodrigues et al., (2006b) ανέφεραν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *L. lactis* 53 χρησιμοποιώντας, μεταξύ άλλων υποστρωμάτων, τυρόγαλο με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης ή/και πεπτόνης, χωρίς να εστιάζουν στη μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Σε μια παρόμοια μελέτη, οι Rodrigues et al., (2006a), μελέτησαν τα στελέχη *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. coryniformis* αποκλειστικά το τυρόγαλο ως θρεπτικό υπόστρωμα και ανέφεραν σημαντική μείωση της επιφανειακής τάσης, από βιοεπιφανειοδραστικές που παράγονται συνδεδεμένες στα μικροβιακά κύτταρα, με τα βέλτιστα αποτελέσματα να αναφέρονται με το στέλεχος *L. pentosus*. Για την περίπτωση αυτή, η ελάχιστη τιμή μείωσης της επιφανειακής τάσης παρουσιάστηκε στη φάση σταθερής ανάπτυξης, των μικροβιακών κυττάρων και ήταν 45 mN/m, ενώ η συνολική μείωση της επιφανειακής τάσης ξεπέρασε τα 8 mN/m (Velraeds et al., 1996), οπότε και το στέλεχος χαρακτηρίζεται ως παραγωγός βιοεπιφανειοδραστικών.

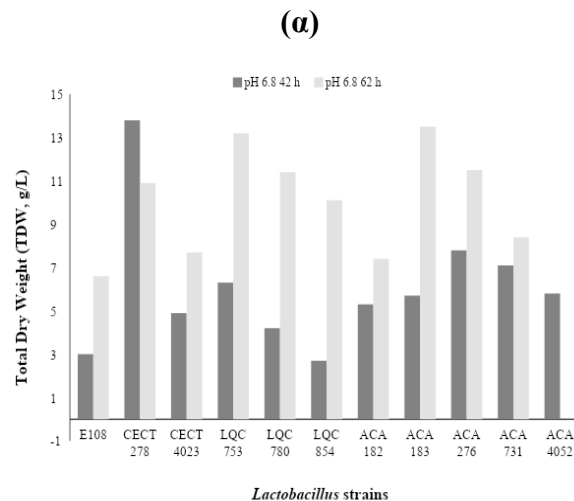
3.2.2 Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight) και κατανάλωση λακτόζης

Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα γαλακτικά βακτήρια μπορεί να πραγματοποιείται είτε κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (early exponential phase) είτε κατά τη στατική φάση (stationary phase) σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας (Rodrigues et al., 2006a; Velraeds et al., 1996). Επιπρόσθετα, όπως έχει αναφερθεί οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορεί να παράγονται είτε στο εξωκυττάριο υγρό (υπερκείμενο) είτε να είναι προσδεσμένες στα βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους των κυττάρων (δηλαδή της βιομάζας) προκειμένου να συσχετιστεί με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών συστατικών.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους έπειτα από 42 και 62 h ζύμωσης σε pH 5 και 6.8. Παρατηρούνται αρκετά μεγάλες διαφορές τιμών τόσο μεταξύ των δύο pH όσο και μεταξύ των δύο χρονικών σημείων στο pH 6.8. Στο στέλεχος CECT 278 παρατηρείται η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας σε pH 5 και σε pH 6.8 στις 42 ώρες. Επιπλέον, στην πλειοψηφία των στελεχών έχουν υψηλότερη βιομάζα στις 62 ώρες.

Σε προηγούμενη έρευνα διάφορων στελεχών, βρέθηκε ότι η ανάπτυξη τους σχετίζεται με την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ κατανάλωσης λακτόζης, παραγωγής βιομάζας και μείωση της επιφανειακής τάσης της καλλιέργειας. Επιπλέον, προηγούμενες αναφορές στη βιβλιογραφία τονίζουν την εξάρτηση της βιομάζας και της παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών με τη σύσταση του μέσου. Για παράδειγμα οι πηγές άνθρακα και αζώτου έχουν πρωταρχικό ρόλο στη σύνθεση των βιοεπιφανειοδραστικών (Gudina et al., 2011).



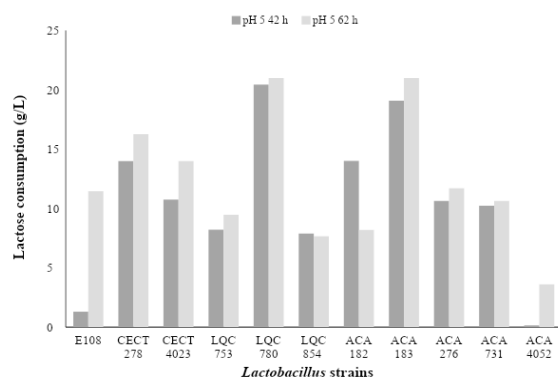


(β)

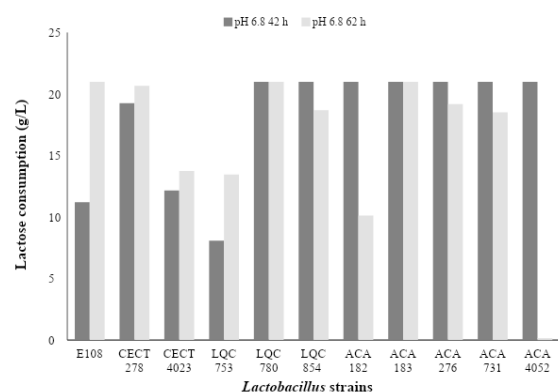
Γράφημα 3.13: Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (TDW) των στελεχών σε pH 5 (α) και pH 6.8 (β) μετά από 42 (■) και 62 h (▒) ζύμωσης

Συγκρίνοντας τα Διαγράμματα 4.11 και 4.12 που απεικονίζουν τη μείωση της επιφανειακής τάσης με το Διάγραμμα 4.13 (παραγωγή βιομάζας) παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη μείωση στην επιφανειακή τάση δε συνάδει απαραίτητα με τη μέγιστη μείωση στην επιφανειακή τάση, άρα και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Για παράδειγμα, το στέλεχος LQC 753, παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση στις 42 h ζύμωσης, σε τιμή pH 5 (41 mN/m), ωστόσο η βιομάζα ήταν χαμηλότερη από άλλα στελέχη (~5 g/L) και δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στις 62 h, όπου ωστόσο η επιφανειακή τάση διαφοροποιείται. Από την άλλη πλευρά, το στέλεχος FMCC E108, παρουσίασε σημαντική μείωση στην επιφανειακή τάση μετά από 62 h (32,9 mN/m) σε pH 6.8, η οποία συμβαδίζει με την αύξηση της βιομάζας. Παρατηρείται λοιπόν μια διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών και ένας συσχετισμός επιλεκτικότητας σε επίπεδο είδους, το οποίο υποδεικνύει ότι ο βέλτιστος σχεδιασμός της διεργασίας πρέπει να πραγματοποιείται ανάλογα με το στέλεχος που θα χρησιμοποιηθεί.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η κατανάλωση λακτόζης για κάθε χρονικό σημείο σε όλα τα στελέχη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα. Η κατανάλωση της λακτόζης αποτελεί σημαντικό κριτήριο κυρίως για τη χρησιμοποίηση και την αποδοτικότητα του τυρογάλακτος ως θρεπτικό μέσο ζύμωσης.



(α)



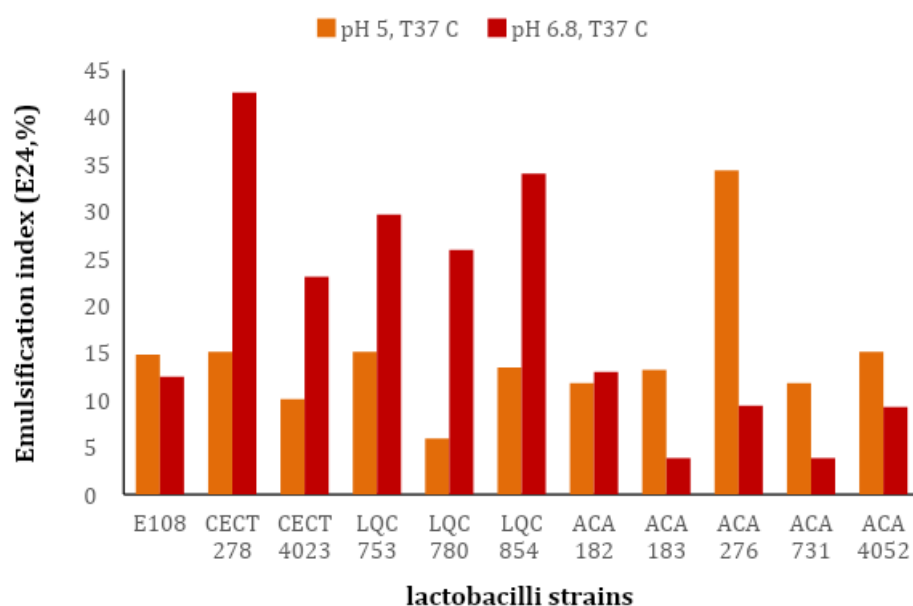
(β)

Γράφημα 3.14: Κατανάλωση λακτόζης (Lactose consumption) των στελεχών σε pH 5 (α) και pH 6.8 (β) μετά από 42 (■) και 62 h (▒) ζύμωσης

Από τα Διαγράμματα εύκολα παρατηρείται ότι η ρύθμιση της τιμής pH στο 6.8 ευνόησε την κατανάλωση λακτόζης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πειράματα σε pH 5. Αντίστοιχα και στην περίπτωση αυτή, η κατανάλωση λακτόζης δε συνεπάγεται τη μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, με ειδικότερο παράδειγμα τα στελέχη της συλλογής ACA-DC, όπου σε pH 6.8 κατανάλωσαν πλήρως τη λακτόζη, ωστόσο δεν παρουσίασαν τη μέγιστη μείωση στην επιφανειακή. Σε αντίθεση, το LQC 753 που παρήγαγε βιοεπιφανειοδραστικές σε pH 5, δεν κατανάλωσε πλήρως τη λακτόζη, ενώ το LQC 780 που παρουσιάζει μεγαλύτερη κατανάλωση, δεν επιφέρει τόσο υψηλή μείωση στην επιφανειακή. Συγκρίνοντας ωστόσο στα Διαγράμματα 4.13 (ολικό ξηρό βάρος) και 4.14 (κατανάλωση λακτόζης) φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των στελεχών ACA-DC στράφηκε προς την παραγωγή βιομάζας.

3.2.3 Αξιολόγηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης E_{24} (%)

Στο τελικό σημείο της ζύμωσης μελετήθηκε και η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των βιοεπιφανειοδραστικών που εκχυλίστηκαν με διάλυμα PBS μετά από 62 h ζύμωσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.15).



Γράφημα 3.15: Μέτρηση του δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24} ,%) σε διαφορετικές τιμές pH μετά από 62 h ζύμωσης ■:pH 5, T:37°C; ■:pH 6.8, T:37°C.

Αντίστοιχα και στην περίπτωση αυτή παρατηρείται μια διαφορετική συμπεριφορά των στελεχών ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Για παράδειγμα, τα στελέχη της συλλογής FMCC E108 και ACA-DC παρουσίασαν υψηλότερη γαλακτωματοποίηση σε pH 5, ενώ τα στελέχη CECT και LQC εμφανίζουν μεγαλύτερο δείκτη E_{24} σε τιμή pH 6.8. Η παρατήρηση αυτή συμβάλει στην υπόθεση ότι ο σχεδιασμός της διεργασίας συνίσταται ανάλογα με το στέλεχος αλλά και την τελική εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών.

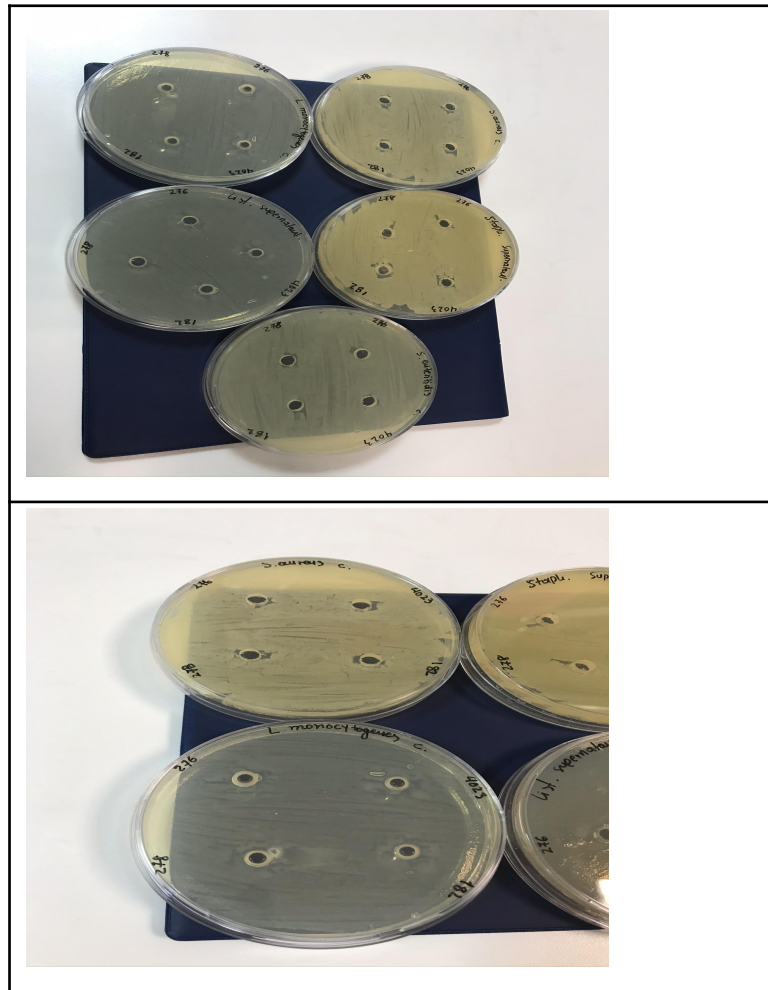
3.3 Αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Η βακτηριοσίνη, οι βιοεπιφανειοδραστικές, τα οργανικά οξέα, το διακετύλιο, και το υπεροξείδιο του οξυγόνου αποτελούν μεταξύ άλλων ουσίες που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη πιθανών παθογόνων. Επιπλέον, οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες τα καθιστούν κατάλληλα για την καταπολέμηση πολλών παθογόνων (Sharma et al., 2016). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των βιοεπιφανειοδραστικών δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, ωστόσο ενδέχεται να οφείλεται στην προσκόλληση των επιφανειοδραστικών στις κυτταρικές επιφάνειες, οδηγώντας στη μείωση της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης και εν συνεχεία στην κατάρρευση αυτής και του κυτταρικού κύκλου (Ines and Dhouha, 2015).

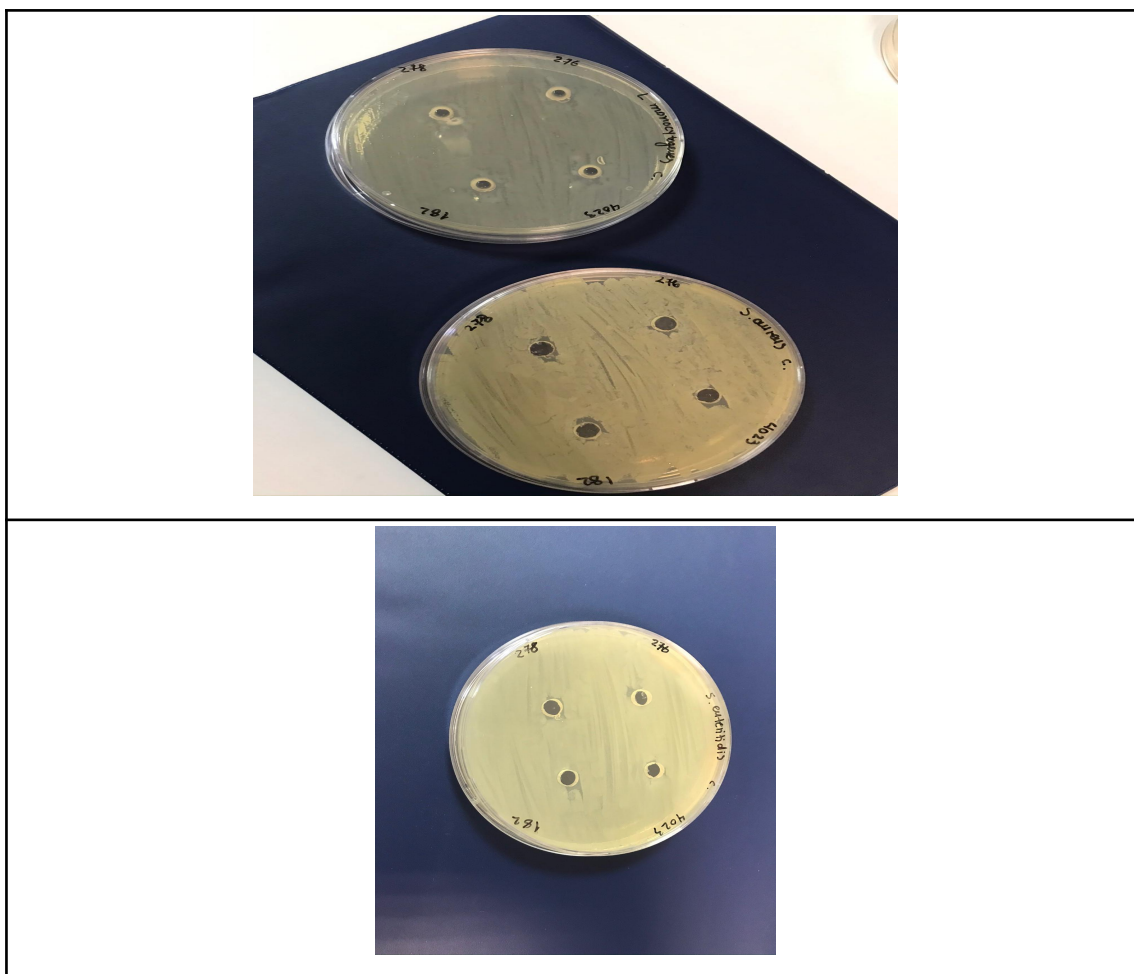
Με βάση αυτά, επόμενο στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της πιθανής αντιμικροβιακής ικανότητας των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια. Πληθώρα μελετών της βιβλιογραφίας έχουν παρουσιάσει την αντιμικροβιακή δράση των βιοεπιφανειοδραστικών έναντι παθογόνων στελεχών. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί μείζονος σημασίας για τη μετέπειτα εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Για παράδειγμα, οι Gudiña, Teixeira, & Rodrigues, (2010) ανέφεραν την παρεμπόδιση των βιοεπιφανειοδραστικών του στελέχους *L. paracasei* έναντι στα παθογόνα *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, ενώ οι ουσίες του *L. paracasei* A20 παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων Gram (+) και Gram (-) στελεχών σε ένα εύρος αρχικών συγκεντρώσεων βιοεπιφανειοδραστικής. Στην ερευνητική μελέτη των Golek et al. (2009) αναφέρθηκε δράση του *L. casei* στα στελέχη *S. aureus*, *B. subtilis* και *Micrococcus roseus*, ενώ οι Madhu and Praupulla (2014) αξιολόγησαν το *L. plantarum* CFR 2194 όσον αφορά στην αντιμικροβιακή δράση σε διαφορετικά τροφιμογενή παθογόνα (Golek, Bednarski, Brzozowski, & Dziuba, 2009; Madhu & Praupulla, 2014).

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων των βιοεπιφανειοδραστικών και των εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών έναντι παθογόνων. Τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν το CECT 278, CECT 4023, ACA 182 και ACA 276, ενώ τα παθογόνα που

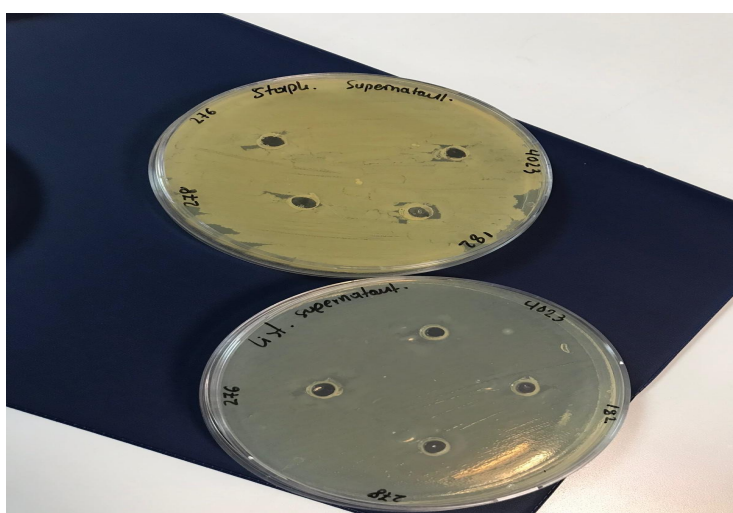
χρησιμοποιήθηκαν ήταν *Listeria monocytogenes* (FMCC B124), *Salmonella enteritidis* (FMCC B286) και *Staphylococcus aureus* (FMCC B134).



Εικόνα 7: Αντιμικροβιακή δράση εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών και προσδεσμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell-bound), έναντι τριών παθογόνων στελεχών.



Εικόνα 8: Αντιμικροβιακή δράση προσδεδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών (cell-bound), έναντι τριών παθογόνων στελεχών.



Εικόνα 9: Αντιμικροβιακή δράση εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών, έναντι δύο παθογόνων στελεχών.

Σύμφωνα και με τις εικόνες φαίνεται ότι τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν υψηλή αντοχή στις υπό μελέτη βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που εφαρμόστηκαν, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή απουσία αντιμικροβιακής δράσης των συγκεκριμένων δομών στις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ή μπορεί και να οφείλεται και στη χαμηλή συγκέντρωση της παραγόμενης βιοεπιφανειοδραστικής. Συνεπώς, είναι σκόπιμο σε μελλοντική μελέτη να αξιολογηθούν κι άλλα παθογόνα στελέχη αλλά και να γίνει προσπάθεια για υψηλότερη συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικής, δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα δείγματα προήλθαν από ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες.

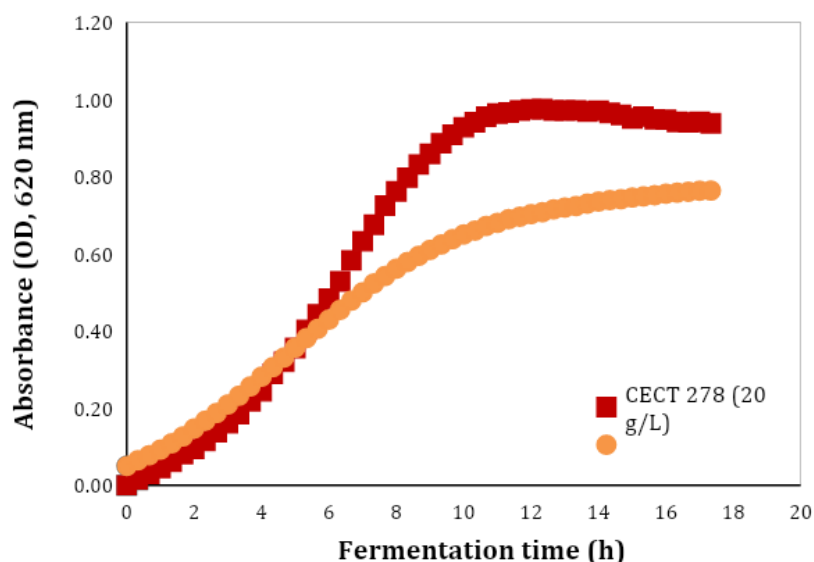
3.4 Αξιολόγηση της προσθήκης ελαίου καφέ για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί αρκετά η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από ανανεώσιμες πηγές, ως εναλλακτική των συνθετικών, λόγω της χαμηλής τοξικότητας τους, της οικολογικής αποδοχής και της υψηλής ικανότητας βιοδιάσπασης. Επιπλέον, τα βιοεπιφανειοδραστικά παρουσιάζουν συχνά υψηλή μείωση στην επιφανειακή τάση, χαμηλή συγκέντρωση μικκυλίου και είναι συνήθως αρκετά αποτελεσματικά σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και αλατότητας. Το 1949 έγινε η πρώτη αναφορά στα ραμνολιπίδια χρησιμοποιώντας τον *Pseudomonas aeruginosa* ως στέλεχος παραγωγής και έπειτα αναφέρθηκαν κι άλλα βακτήρια (Lan, et al., 2015).

Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί για την παραγωγή επιφανειοδραστικών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα έλαια φυτικής προέλευσης όπως το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο. Άλλη έρευνα έδειξε ότι 36 μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών σε υγρή καλλιέργεια βυθού (submerged fermentation) με 2% απόβλητα από ηλιέλαιο ή ελαιόλαδο, τα περισσότερα στελέχη *Pseudomonas* εμφάνισαν ικανοποιητική αύξηση μετά από 72 ώρες, ενώ βέλτιστο αποδείχθηκε το υπόστρωμα του ελαιολάδου για την παραγωγή των κυττάρων ενώ η επιφανειακή τάση παρουσίασε πτώση κάτω από 35 mN/m (Rodrigues L.R. και Teixeira J.A., 2008). Οι Lan et al., 2015 χρησιμοποίησαν απόβλητα μαγειρικά έλαια και ένα απομονωμένο βακτήριο, *Pseudomonas* SWP-4, για την παραγωγή ραμνολιπιδίων. Το στέλεχος SWP-4 είχε υψηλή απόδοση, ένα αναφορικά με τη

σταθερότητα τους, τα ραμνολιπίδια εμφάνισαν αποτελεσματικότητα ακόμα και σε pH μεταξύ 4-10 και αλατότητα χαμηλότερη από 8%.

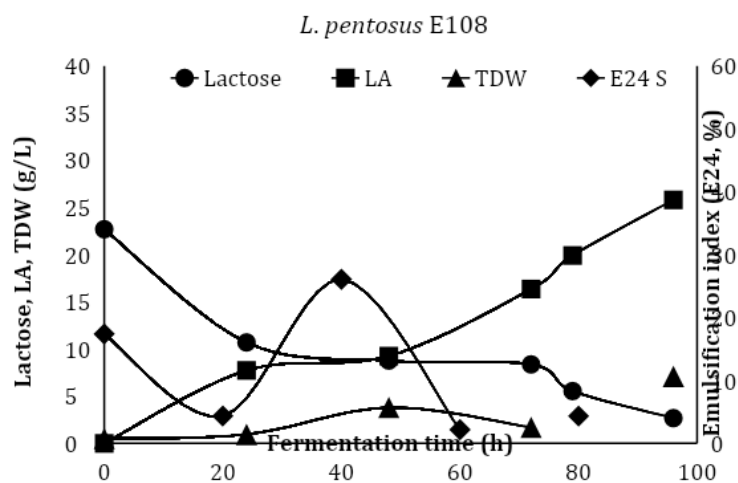
Στην παρούσα μελέτη, σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε σε φωτόμετρο μικροπλακών η προσθήκη ελαίου σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (ήτοι 20 και 40 g/L) και αξιολογήθηκε η μικροβιακή ανάπτυξη. Ενδεικτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.16.



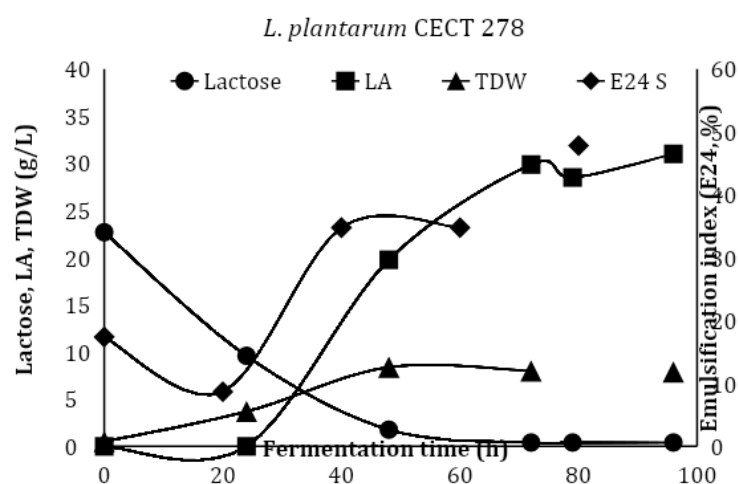
Γράφημα 3.16: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L ελαίου καφέ με θρεπτικό υπόστρωμα τυρόγαλο και προσθήκη οργανικής πηγής αζώτου, μετά από ανάπτυξη σε φωτόμετρο μικροπλακών για 24h.

Από τα αρχικά στελέχη που μελετήθηκαν, το στέλεχος CECT 278 εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα στην καμπύλη ανάπτυξης και στις δύο αρχικές συγκεντρώσεις. Τα υπόλοιπα στελέχη παρουσίασαν παρεμπόδιση από την υψηλή αρχική συγκέντρωση ελαίου, και για το λόγο αυτό τα πειράματα στις κωνικές φιάλες πραγματοποιήθηκαν με 20 g/L αρχική προσθήκη ελαίου καφέ, χρησιμοποιώντας τα στελέχη E108, CECT 278, ACA 182, ACA 276 και ACA 731, με βάση και τα αποτελέσματα από τα προηγούμενα πειράματα.

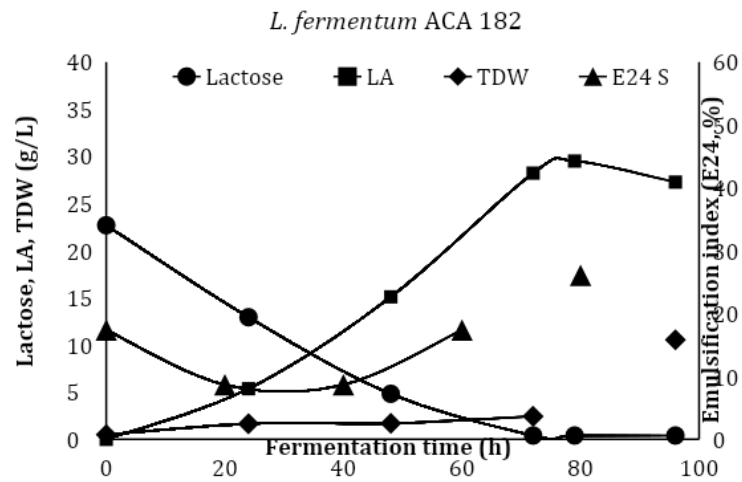
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κινητικές για τα προαναφερθέντα στελέχη και παρουσιάζεται η κατανάλωση λακτόζης, η παραγωγή βιομάζας και γαλακτικού οξέος καθώς και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.



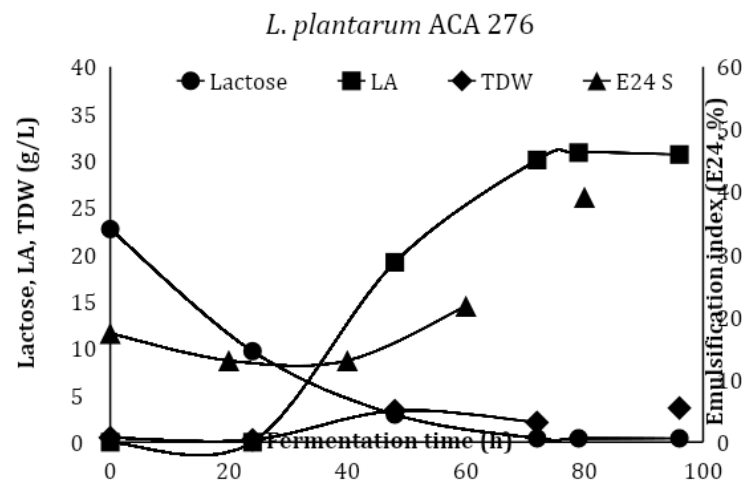
Γράφημα 3.17: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους E108 σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (▲: λακτόζη, ●: γαλακτικό οξύ, ◆: ολικό ξηρό βάρος, ◆: E₂₄, %)



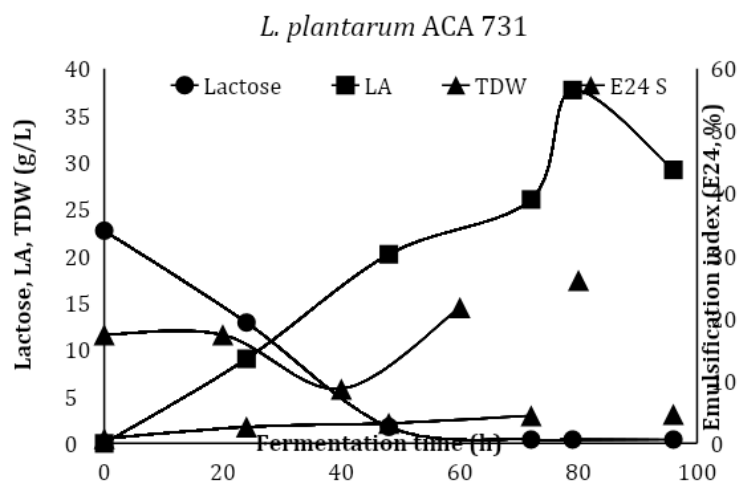
Γράφημα 3.18: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (▲: λακτόζη, ●: γαλακτικό οξύ, ◆: ολικό ξηρό βάρος, ◆: E₂₄, %)



Γράφημα 3.19: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 182 σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (+: λακτόζη, ●: γαλακτικό οξύ, ? :ολικό ξηρό βάρος, ⊕: E₂₄,%)



Γράφημα 3.20: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 276 σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (+: λακτόζη, ●: γαλακτικό οξύ, ? :ολικό ξηρό βάρος, ⊕: E₂₄,%)



Γράφημα 3.21: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους ACA 731 σε αρχική συγκέντρωση 20 g/L ελαίου καφέ σε ασυνεχή καλλιέργεια (⊕: λακτόζη, ●: γαλακτικό οξύ, ▲: ολικό ξηρό βάρος, ⊕: E₂₄, %)

Σύμφωνα και με τα διαγράμματα μπορεί να παρατηρηθεί ότι όλα τα στελέχη καταναλώνουν επιτυχώς τη λακτόζη, συνεπώς η προσθήκη του ελαίου δεν επιδρά στη μικροβιακή ανάπτυξη. Σημαντική είναι επίσης η παραγωγή γαλακτικού οξέος σε όλα τα πειράματα. Ωστόσο συγκρίνοντας τα ανωτέρω πειράματα με τα πειράματα που έγιναν χωρίς την προσθήκη ελαίου για τις αντίστοιχες ώρες ζύμωσης, ο δείκτης γαλακτωματοποίησης είναι σε αντίστοιχο εύρος για όλα τα στελέχη, τόσο για τις εξωκυττάριες βιοεπιφανειοδραστικές όσο και για τα εκχυλίσματα PBS. Άρα, η προσθήκη ελαίου δε φάνηκε να βελτιώνει σημαντικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Για παράδειγμα, για το στέλεχος CECT 278, στις 42h ζύμωσης χωρίς προσθήκη ελαίου, το E₂₄ ήταν 41% και 42% στις εξωκυττάριες και στα εκχυλίσματα, αντίστοιχα, ενώ με την προσθήκη ελαίου οι αντίστοιχες τιμές είναι 35% και 15%, η οποία μάλιστα είναι αρκετά χαμηλότερη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην αξιολόγηση της επίδρασης της τιμής pH κατά την ανάπτυξη συγκεκριμένων γαλακτικών βακτηρίων και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, σε τιμή pH 4 η ανάπτυξη παρατηρήθηκε χαμηλότερη και αντίστοιχα και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όπως φάνηκε από το δείκτη γαλακτωματοποίησης (E_{24}). Αντίστοιχα, σε τιμές pH 5 και pH 6,8 η επίδραση διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου. Η μεγαλύτερη τιμή για το E_{24} παρουσιάστηκε κυρίως μετά από 24 ώρες ζύμωσης σε pH 5, ενώ σε pH 6.8 η αύξηση παρατηρείται μετά τις 48 ή 72 ώρες. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης έδειξε ότι όλα τα στελέχη παρουσίασαν ικανοποιητική μείωση, γεγονός που υποδεικνύει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Ωστόσο, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες δε φάνηκε να παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι στα παθογόνα που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, γεγονός που υποδεικνύει την αξιολόγηση περαιτέρω παθογόνων βακτηρίων. Ακόμη, η προσθήκη ελαίου δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών όπως φάνηκε από το δείκτη E_{24} .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Adamberg, K.; Kask, S.; Laht, T.M.; Paalme, T. (2003) The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 171-183.
2. Andoyo, R.; Dianti Lestari, V.; Mardawati, E.; Nurhadi, B. (2018) Fractal Dimension Analysis of Texture Formation of Whey Protein-Based Foods. *Int. J. Food Sci.*, 2018.
3. Azeredo, H.M.C., Barud, H., Farinas, C.S., Vasconcellos, V.M., Claro, A.M. (2019), February 18). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. Frontiers Media S.A.
4. Cinelli, P.; Schmid, M.; Bugnicourt, E.; Wildner, J.; Bazzichi, A.; Anguillesi, I.; Lazzeri, A. (2014) Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polym. Degrad. Stab.* 108, 151-157.
5. Fu, W.; Mathews, A.P. (1999) Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *BioChem. Eng. J.* 3, 163-170.
6. Golek, P., Bednarski, W., Brzozowski, B., & Dziuba, B. (2009). The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology*, 59(1), 119-126 <https://doi.org/10.1007/BF03175608>
7. Gudina, E.J., Fernandes, E.C., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2015. Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Adv.*, 5, 909–960.
8. Hiding, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. 2010. Isolation and functional characterisation of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and surfaces B: Biosurfaces*, 76(1), 298-304 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.008>
9. Gudina, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2011. Biosurfactant-Producing *Lactobacilli*: Screening, Production Profiles and Effect of Medium Composition.*****

10. Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B. 2000, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (1), *Enzyme Microb. Technol.*, 26:87–107
11. Ines, M., Dhouha, G., 2015 Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* 71, 100-112.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
12. Jessica, L. Sebastián-Nicolás, Luis, G. Gonzáles-Olivares, Gabriela, A., Vázquez-Rodríguez, Carlos, A., Lucho-Constantino, Araceli Castañeda-Ovando, 2019. Valorisation of whey using a biorefinery, 10.1002/bbb.2100
13. Khalifa, I.; Nie, R.; Ge, Z.; Li, K.; Li, C. (2018) Understanding the shielding effects of whey protein on mulberry anthocyanins: Insights from multispectral and molecular modelling investigations. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 116-124.
14. Madhu, A. N., & Prapulla, S.G., (2014). Evaluation and functional characterisation of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4),1777-1789.<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0649-5>
15. Miller, T. and Churchill, B. 1986, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington DC., pp. 127–140
16. Moldes, A.B., Torrado, A.M., Barral, M.T. and Dominguez, J.M. 2007, Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*, *J. Agr Food Chem.*, 55:4481-4486
17. Moreno, F.J.; Corzo, N.; Montilla, A.; Villamiel, M.; Olano, A. (2017). Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 50–55.
18. Oh, S.; Rheem, S.; Sim, J.; Kim, S.; Baek, Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 3809-3814.
19. Portilla-Rivera, O.M., Moldes, A.B., Torrado, A.M., Dominguez, J.M., 2007 α . Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Proc. Biochem.*, 42, 1010–1020.
20. Portilla-Rivera, O.M., Moldes, M.A.B., Torrado Agrasar, A.M., Dominguez Gonzalez, J.M., 2007 β . Biosurfactants from grape marc: stability study. *J. Biotechnol.*, 131S, S136.

21. Ramírez, M.I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Alameda, J.E., García Román, G.M., Banat, I.M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour Technol.* 2015 Dec;198:231-6.
22. Rivera, O.M.P., Moldes, A.B., Torrado, A.M. and Dominguez, J.M. 2007, Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochem.* 42:1010-1020
23. Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochem. Eng. J.*, 28, 109–116.
24. Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. 2006, Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem. Eng. J.*, 32:135-142
25. Rodrigues L.R., Teixeira J.A, 2008, Biosurfactants production from cheese whey. 978-81-7895-359-5, 81-104.
26. Sarrubo, L.A., Farias, C.B.B. and Campos-Takaki, G.M. 2007, Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 54:68-73
27. Satpute, S.K.; Kulkarni, G.R.; Banpurkar, A.G.; Banat, I.M.; Mone, N.S.; Patil, R.H.; Cameotra, S.S. Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.* 2016, 56, 1140–1158, doi:10.1002/jobm.201600143.
28. Sharma, D., Saharan, B.S. (2016b). Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Reports* 11:27-35.
29. Sharma, D.; Saharan, B.S.; Kapil, S. (2016a) Biosurfactants of Probiotic Lactic Acid Bacteria;; ISBN 9783319262130.
30. Silva, J.; Carvalho, A.S.; Ferreira, R.; Vitorino, R.; Amado, F.; Domingues, P.; Teixeira, P.; Gibbs, P.A. (2005) Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *J. Appl. Microbiol.* 98, 775-782.
31. Tahmourespour, A., Salehi,R., Kermanshahi, R.K., Eslami, G. (2011) The anti-biofouling effect of *Lactobacillus fermentum*-derived biosurfactant against *Streptococcus mutans*, *Biofouling* 27, 385-392.

32. Yang, E.; Fan, L.; Yan, J.; Jiang, Y.; Doucette, C.; Fillmore, S.; Walker, B. (2018) Influence of culture media , pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. AMB Express.
33. Βαρθαλάμης Γ., (2017). Αξιοποίηση τυρογάλακτος-απόβλητο τυροκομίας
34. Μεταξάδης Π., Σταματάκης Κ., (1999). Εφαρμογή των διεργασιών διαχωρισμού με μεμβράνες στην επεξεργασία νερού, υγρών, αποβλήτων και βιομηχανικών προϊόντων.
35. Μιχαλεντζάκη Γ. Δήμητρα (2012) Δυναμική επιφανειακή τάση και διασταλτική ιξωδοελαστικότητα υδατικών διαλυμάτων SDS