

ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΑΠΟ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ:

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΟΛΙΣΤΙΚΗΣ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του/της

ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2024

ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΑΠΟ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ:
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΟΛΙΣΤΙΚΗΣ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

ΚΟΨΑΧΕΙΛΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΚΑΧΡΙΜΑΝΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους όσους βοήθησαν στην υλοποίηση της εργαστηριακής μου μελέτης και στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Πρώτα και κύρια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή και επιβλέποντα της συγκεκριμένης εργασίας κ. Νικόλαο Κοψαχείλη για όλη τη βοήθειά του και την καθοδήγηση. Η ευκαιρία που μου έδωσε, η υποστήριξη και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε βήμα της έρευνάς μου ήταν σημαντική για την ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα αν εκφράσω την ειλικρινή και βαθιά μου ευγνωμοσύνη στην Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Καχριμανίδου, για την αμέριστη υποστήριξη, την αφοσίωση και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας. Η πολύτιμη εμπειρία της, η διάθεσή της να μοιραστεί τις γνώσεις της και η υπομονή της ήταν για μένα πηγή έμπνευσης και ενθάρρυνσης. Δεν ήταν μόνο ο επιστημονικός της ρόλος που συνέβαλε στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, αλλά και η ανθρώπινη προσέγγισή της. Η πίστη της στις δυνατότητές μου και η συνεχής στήριξή της σε στιγμές αβεβαιότητας με βοήθησαν να παραμείνω προσηλωμένη στους στόχους μου. Οι στιγμές συζήτησης όχι μόνο βελτίωσαν την εργασία μου, αλλά με ενδυνάμωσαν και ως άτομο. Αισθάνομαι απέραντα τυχερή που είχα την καθοδήγησή της σε αυτό το σημαντικό στάδιο της ακαδημαϊκής μου πορείας. Για όλα αυτά, και για πολλά άλλα που δεν μπορούν να εκφραστούν με λόγια, σας ευχαριστώ από καρδιάς.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Αλεξανδρή για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος αλλά και τη μεταδιδάκτορα Ιλιάδα Λάππα που πάντα ήταν εκεί για να προσφέρει τις γνώσεις και τη βοήθειά της.

Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές και το προσωπικό του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφεραν. Η συμβολή τους στο εργαστηριακό κομμάτι και η διάθεσή τους να μοιραστούν την εμπειρία τους ήταν ανεκτίμητη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε δύο αγαπημένες μου φίλες και συνεργάτιδες; Αγγελική και Βασιλική. Η αφοσίωσή σας, η ενέργειά σας και η αστείρευτη υποστήριξή σας σε κάθε στάδιο της πτυχιακής μας ήταν καθοριστικά για την επιτυχία μας. Μαζί

μοιραστήκαμε στιγμές κόπωσης, γέλιου, προκλήσεων και ικανοποίησης, και για όλα αυτά, είμαι ευγνώμων. Σας ευχαριστώ για το ότι σταθήκατε δίπλα μου σε αυτό το τόσο σημαντικό στάδιο της ζωής μας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, που μου έδωσε την ευκαιρία να μπορέσω να υλοποιήσω τα όνειρά μου και τα εφόδια να σταθώ στα πόδια μου.

Αυτή η πτυχιακή εργασία είναι αφιερωμένη σε όλους εσάς, που με στηρίζατε ακούραστα και με τόση αγάπη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολείται με τη μελέτη των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια και το σχεδιασμό μιας ολιστικής βιοδιεργασίας για την εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση του ορού γάλακτος ως χαμηλού κόστους υπόστρωμα ζύμωσης για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια (LAB) και η ακόλουθη εφαρμογή τους σε προϊόντα τροφίμων. Επικεντρώνεται στο σχεδιασμό μιας διεργασίας φιλικής προς το περιβάλλον που θα οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, με στόχο την ελαχιστοποίηση της παραγωγής αποβλήτων (zero waste). Αρχικά μελετήθηκε η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από γαλακτικά βακτήρια και η επίδραση του χρόνου προκαλλιέργειας. Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα στελέχη *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum* και *Lactiplantibacillus pentosus* με βάση πρότερες μελέτες για την ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών. Στη συνέχεια, ο ορός γάλακτος (ήτοι τυρόγαλα), ως παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας, χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για τη ζύμωση και την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών σε βιοαντιδραστήρες. Οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα και μελετήθηκαν για την παραγωγή ζυμώμενου γάλακτος σε διαφορετικές συνθήκες σε σύγκριση με βιοεπιφανειοδραστικές που προέρχονται από ζύμες (λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης, MEL). Επιπλέον, αξιολογήθηκε η επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων για νέες ζυμώσεις γάλακτος στις ίδιες παραμέτρους ώστε να εξεταστεί η αντοχή τους στην εφαρμογή σε προϊόντα τροφίμων.

Με βάση τα αποτελέσματα, ο χρόνος προκαλλιέργειας επέδρασε στην παραγωγή του ενζύμου, ενώ τα βέλτιστα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 0182 και *L. pentosus* FMCC E108. Στις ζυμώσεις διαλείποντος έργου και τα δύο στελέχη μείωσαν την επιφανειακή τάση στις πρώτες ώρες ζύμωσης καταναλώνοντας τη λακτόζη προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη και οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα αξιολογήθηκαν αναφορικά με τη σταθερότητα τους σε διαφορετικές τιμές pH, θερμοκρασίας και αλατότητας. Η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών επηρεάστηκε σημαντικά σε

τιμή pH >6 και σε θερμοκρασία > 121 °C. Όσον αφορά στην παραγωγή ζυμώμενου γάλακτος, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών από τα γαλακτικά βακτήρια (LAB-BS) επέδρασε θετικά στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού σε συνθήκες αποθήκευσης, υποδηλώνοντας τη συνεργιστική δράση ενώ η προσθήκη των MEL επέδρασε θετικά στο ποσοστό συνέρεσης. Τέλος, αποτελεί μείζονος σημασίας η επιτυχής επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων των γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή ζυμώμενου γάλακτος μετά την παραλαβή των βιοεπιφανειοδραστικών. Μάλιστα, ο σχεδιασμός της συγκεκριμένης πειραματικής οδού τονίζει την κυκλικότητα της βιοδιεργασίας και παρουσιάζει την πιθανή οικονομική βιωσιμότητα.

Συμπερασματικά, η χρήση ορού γάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια (LAB) μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κυκλική βιοοικονομία, μειώνοντας τα απόβλητα και ενισχύοντας την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας στη βιομηχανία τροφίμων. Τα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 0182 και *L. pentosus* FMCC E108 παρουσίασαν υψηλή απόδοση στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Η εφαρμογή τους στην παραγωγή ζυμώμενου γάλακτος βελτίωσε τη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση, ενώ η επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων δύναται να ενισχύσει την αειφορία και τη βιωσιμότητα της διεργασίας.

Λέξεις κλειδιά: ορός γάλακτος, τυρόγαλα, γαλακτικά βακτήρια, βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, αγροτο-βιομηχανικά απόβλητα, ζύμωση, βιοοικονομία.

ABSTRACT

The present thesis focuses on the study of biosurfactants produced by lactic acid bacteria and the design of a holistic bioprocess for their application in the food industry. The aim of this thesis is to valorize cheese whey as a low-cost fermentation substrate to produce biosurfactants by lactic acid bacteria (LAB) and the subsequent utilization in food products. The study targets the design of an environmentally friendly process that leads to the production of high-value products aiming to minimize waste generation (zero waste process). Initially, the study undertook the production of b-galactosidase from selected lactic acid bacteria and the effect of preculture time. More specifically, the strains *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactiplantibacillus pentosus* were selected based on previous studies regarding the ability to produce biosurfactants. Cheese whey, a by-product of cheese manufacture, was employed as fermentation feedstock to produce biosurfactants in bench top bioreactors. The produced biosurfactants were extracted from the cells and evaluated in the production of fermented milk and compared with yeast-derived biosurfactants (mannosylerythritol lipids, MEL). Moreover, the study evaluated the re-utilization of exhausted bacterial cells (after biosurfactants production) in fermented milk production.

The results indicated that preculture time had an effect on enzyme synthesis, whereas optimum b-galactosidase production was observed in the strains *L. fermentum* ACA-DC 0182 and *L. pentosus* FMCC E108. During batch cultures, both strains utilized lactose and reduced surface tension within the first hours, indicating biosurfactant production. The strain *L. fermentum* ACA-DC 0182 was selected for subsequent experiments, and the stability of extracted biosurfactants was evaluated under different conditions of pH, temperature and sodium chloride content. In the case that pH was higher than 6 and temperature was higher than 121 °C, biosurfactant stability was significantly influenced. The results on fermented milk production demonstrated that the addition of LAB-BS had a positive effect on the microbial population during cold storage, postulating the synergistic action of LAB biosurfactant, whereas MEL addition improved syneresis content. Finally, the successful utilization of exhausted bacterial cells (after biosurfactant extraction) in the production of fermented milk is of

paramount importance as it strongly demonstrates the circular profile of the proposed bioprocess and demonstrates the potential for enhanced economic feasibility.

In conclusion, the use of cheese whey as a low-cost substrate for the production of biosurfactants from lactic acid bacteria (LAB) can significantly contribute to the circular bioeconomy by reducing waste and enhancing the production of high-value-added products in the food industry. The strains *L. fermentum* ACA-DC 0182 and *L. pentosus* FMCC E108 demonstrated high efficiency in biosurfactant production. Their application in the production of fermented milk improved the preservation of microbial populations during storage, whereas the reutilization of exhausted cells could contribute in enhance process sustainability and economic viability.

Keywords: cheese whey, lactic acid bacteria, biosurfactants, agro-industrial waste, fermentation, bioeconomy.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	1
1.2 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΣΥΝΤΙΘΕΤΑΙ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	2
1.2.1 Οργανικά οξέα.....	2
1.2.2 Βακτηριοσίνη.....	3
1.2.3 Βιταμίνες.....	3
1.2.4 Εξωπολυσακχαρίτες.....	4
1.2.5 Γαμα-αμινοβουτυρικό οξύ	4
1.2.6 Γευστικές και αρωματικές ύλες.....	5
1.2.7 Αντιοξειδωτικές ουσίες	5
1.3 ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	6
1.3.1 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	6
1.3.2 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	6
1.3.3 <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	6
1.4 ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	7
1.4.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες.....	7
1.4.2 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες.....	8
1.5 ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	9
1.5.1 Γλυκολιπίδια.....	9
1.5.2 Ραμνολιπίδια.....	9
1.5.3 Σοφορολιπίδια	10
1.5.4 Τρεαλολιπίδια.....	10
1.5.5 Λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης.....	10
1.5.6 Λιποπετίδια και λιποπρωτεΐνες.....	10
1.5.7 Γλυκολιποπεπτίδια και γλυκοπεπτίδια.....	11
1.6 ΒΙΟΓΑΛΑΚΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ ΜΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ...11	
1.6.1 Φωσφολιπίδια.....	11
1.6.2 Πολυμερή βιοεπιφανειοδραστικά.....	11

1.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	11
1.7.1 Βιομηχανία τροφίμων.....	12
1.7.2 Βιομηχανία πετρελαίου και Γεωργικός τομέας.....	12
1.7.3 Βιομηχανία καλλυντικών.....	13
1.7.4 Βιομηχανία φαρμάκων.....	13
1.8 ΜΙΚΚΥΛΙΑΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	14
1.9 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	17
1.10 ΧΡΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ...20	
1.10.1 Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα και φυτικά υπολείμματα.....	20
1.10.2 Λίπη και έλαια.....	20
1.10.3 Υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων και ποτών.....	20
1.10.4 Απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας.....	20
1.11 ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	22
1.12 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ.....25	
1.12.1 Αξιοποίηση ορού γάλακτος: παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.....	25
1.12.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	25
1.12.3 Λακτόζη.....	26
1.12.4 Γαλακτικό οξύ.....	26
1.12.5 Προβιοτικά και πρεβιοτικά προϊόντα.....	27
1.12.6 Τρόφιμα και ποτά.....	28
1.12.7 Βιοπλαστικά.....	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	30
-----------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
------------------------	----

3.1 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ - ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	31
3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	31
3.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	32
3.4 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	33
3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ.....	34
3.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	35
3.7 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
3.7.1. Μέτρηση βιομάζας.....	36
3.7.2 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος και λακτόζης.....	36
3.7.3 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	37
3.8 ΚΑΤΙΟΥΣΑ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	38
3.9 ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛ.....	40
3.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ.....	40
3.11 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΜΩΜΕΝΟΥ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	42
3.12 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	43
3.13 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	44
3.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	45
4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	46
4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ (LAB-BS).....	50
4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΚΡΙΣΙΜΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΙΚΥΛΛΙΩΝ (CMC) ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	53
4.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΜΟΥΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>L. FERMENTUM</i> ACA-DC 0182.....	59
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

EIKONA 1: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. STEVE GSCHMEISSNER / SCIENCE PHOTO LIBRARY.....	1
EIKONA 2: Μεταβολίτες που παράγονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος και παραδείγματα εφαρμογής σε τρόφιμα. Τροποποιημένη εικόνα από: de Souza, Evandro L eite et al (2022).....	5
EIKONA 3: Ευεργετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την κατανάλωση βιολειτουργικών ζυμωμένων γαλακτοκομικών τροφίμων. Linares, Daniel M., et al (2017).....	7
EIKONA 4: Παρουσίαση αμφίφιλου μορίου. Susanna Laurén (2018).....	8
EIKONA 5: Οι επιφανειοδραστικές είναι ουσίες που μειώνουν τη επιφανειακή τάση. Αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος. Anne Helmenstine (2022).....	8
EIKONA 6: Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης βιοεπιφανειοδραστικού, επιφανειακής τάσης και σχηματισμού μικκυλίων. Προσαρμοσμένη εικόνα από Pacwa-Płociniczak, Magdalena, et al. (2011).....	14
EIKONA 7: Σχέση μεταξύ κυκλικής οικονομίας, βιοοικονομίας και κυκλικής βιοοικονομίας.....	18
EIKONA 8: Τα στάδια για τη διαχείριση και επεξεργασία απορριμμάτων τροφίμων	18
EIKONA 9: Λύματα γαλακτοβιομηχανίας. Προσαρμοσμένη εικόνα απο Ahmad, Talha, et al. (2019).....	21
EIKONA 10: Τομείς χρησιμοποίησης ορού γάλακτος. Προσαρμοσμένη εικόνα από Barba, F. J. (2021).....	24
EIKONA 11: Χαρακτηριστικά προβιοτικών και πρεβιοτικών.....	27
EIKONA 12: Προετοιμασία τυρογάλακτος, θέρμανση και αλλαγή pH.....	32
EIKONA 13: Απομονωμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος μετά από καθίζηση στο ισοηλεκτρικό σημείο και φυγοκέντρωση.....	32
EIKONA 14: Βιοαντιδραστήρας με όρο γάλακτος ως υπόστρωμα, μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης.....	34
EIKONA 15: Πειραματική διάταξη που δείχνει τον εξοπλισμό επιφανειακής τάσης (a), το δακτύλιο μέτρησης (b) και το δοχείο / vessel που τοποθετείται το δείγμα (c). Torres-Giner et al (2022).....	35
EIKONA 16: Διαδικασία δοκιμής νινυδρύνης για ποσοτική ανάλυση. Προσαρμοσμένη εικόνα απο MN Editors 2023.....	38
EIKONA 17: Δείγμα υπερκείμενου ζύμωσης τοποθετημένο σε μεμβράνη.....	39
EIKONA 18: Σχεδιάγραμμα πορείας λυοφιλίωσης ενός προϊόντος.....	39

EIKONA 19: Εικόνα εργαστηριακού λυοφιλοποιητή.....	39
EIKONA 20: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση σε υπόστρωμα ο-Νιτροφαινυλ-β-γαλακτοσιδάση (ONPG). Τροποποιημένη εικόνα απο Gupta, M., Pandey, H., & Sivakumar, S. (2017).....	42
EIKONA 21: Παραγωγή οξυγάλακτος με το στέλεχος <i>L. pentosus</i> E108 και την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών.....	43
EIKONA 22: ACA 182- Πλήρες και Αποβουτυρωμένο (Control-MEL-LAB-BS).....	61
EIKONA 23: Παραγωγή οξυγάλακτος με το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA 0182 και την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών (Day 0).....	62

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κύριοι τύποι μικροβιακών επιφανειοδραστικών ουσιών.....	15
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύνθεση υποστρώματος ζύμωσης.....	33
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα.....	33
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αποτελέσματα καταμέτρησης πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικές ώρες προκαλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS.....	45
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αλλαγές κατά την ψυχρή αποθήκευση ζυμωμένου γάλακτος που παρασκευάστηκε με το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182 σε πλήρες και ημιάπαχο αγελαδινό γάλα, καθώς και ζυμωμένου γάλακτος με ανακύκλωση κυττάρων, με ή χωρίς την προσθήκη γαλακτοβακίλλων και βιοεπιφανειοδραστικών του <i>Moesziomyces</i>	60

ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

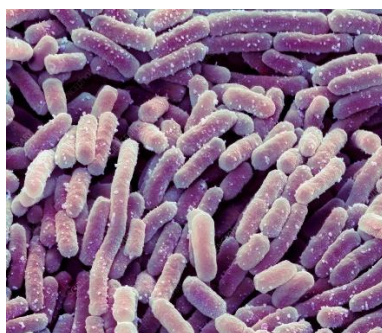
ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Πρότυπη καμπύλη ορθονιτροφαινόλης (oNP).....	41
ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τα στελέχη <i>L.fermentum</i> ACA-DC 0182, <i>L.fermentum</i> ACA-DC 0183, <i>L.plantarum</i> FMCC E10 και <i>L.pentosus</i> FMCC E108 μετά από 12 και 14 ώρες προκαλλιέργειας.....	47
ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Αποτελέσματα βιομάζας έπειτα από ξήρανση για τα στελέχη <i>L.fermentum</i> ACA-DC 0182, <i>L.fermentum</i> ACA-DC 0183, <i>L.plantarum</i> FMCC E10 και <i>L.pentosus</i> FMCC E108 μετά από 12 και 14 ώρες προκαλλιέργειας.....	48
ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τα στελέχη <i>L.fermentum</i> ACA-DC 0182 και <i>L. plantarum</i> FMCC E10 μετά από 12 και 14 ώρες σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, τη λακτόζη και τη γαλακτόζη.....	49
ΓΡΑΦΗΜΑ 5a: (●) Επιφανειακή τάση (ST), (■) Λακτόζη, (▲) Γαλακτικό οξύ (LA) και (◆) Ολικό ξηρό βάρος (TDW) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων χρησιμοποιώντας CWP με στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182.....	51
ΓΡΑΦΗΜΑ 5b: (●) Επιφανειακή τάση (ST), (■) Λακτόζη, (▲) Γαλακτικό οξύ (LA) και (◆) Ολικό ξηρό βάρος (TDW) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων χρησιμοποιώντας CWP με στέλεχος <i>L. pentosus</i> E108.....	52
ΓΡΑΦΗΜΑ 6: Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182.....	54
ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος <i>L. pentosus</i> E108.....	54
ΓΡΑΦΗΜΑ 8: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της τιμής του pH στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182.....	56
ΓΡΑΦΗΜΑ 9: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της θερμοκρασίας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182.....	57
ΓΡΑΦΗΜΑ 10: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της τιμής της αλατότητας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 0182.....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria – LAB) αποτελούνται από μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηριδίων με μορφολογία κόκκων ή ράβδων. Γενικά, τα συγκεκριμένα βακτήρια συγκροτούν μια οικογένεια με περισσότερα από 60 γένη, με πολλά από αυτά να ανιχνεύονται στα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, κ.λπ. Ως στελέχη ζυμώσεων παράγουν γαλακτικό οξύ που είναι το κύριο τελικό μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης των υδατανθράκων ως η κύρια πηγή άνθρακα. Επιπλέον έχουν ισχυρή αντοχή σε χαμηλές τιμές pH, είναι ικανά να υδρολύουν την πρωτεΐνη, έχουν την δυνατότητα να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες και να αναστέλλουν τη δράση άλλων βακτηρίων.



Εικόνα 1: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. STEVE GSCHMEISSNER / SCIENCE PHOTO LIBRARY.

Στον τομέα των τροφίμων υπάρχουν πολλές ουσίες οι οποίες συντίθενται από βακτήρια γαλακτικού οξέος και δημιουργούν καινοτόμες πτυχές στη βιομηχανία και τη βιοτεχνολογία τροφίμων.

Οι ικανότητες τους δεν περιορίζονται μόνο στο να αποικοδομήσουν τις κύριες θρεπτικές μακρομοριακές ουσίες, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες, αλλά και να δράσουν ενάντια σε κάποιες που είναι επιβλαβείς. Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση των μυκοτοξινών που μπορεί να υπάρξουν κατά τη συντήρηση ορισμένων προϊόντων δημητριακών. Ακόμα, μπορούν να αποσυνθέσουν επιβλαβή προϊόντα που παράγονται κατά τη ζύμωση της αλκοόλης και να διασπάσουν πληθώρα φυτικών οξέων που επηρεάζουν τη γεύση και είναι δύσκολα αφομοιώσιμα

από τον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, αν και τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, έπειτα από μελέτες, έχουν εμφανίσει ποικίλες επιδράσεις αποικοδόμησης ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους χρειάζεται ακόμα έρευνα (Duar, et al. 2017) (Das, et al. 2012).

1.2 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΣΥΝΤΙΘΕΤΑΙ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1.2.1. Οργανικά οξέα

Κατά το μεταβολισμό των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, κάποιες μεταβολικές διεργασίες όπως είναι και η ζύμωση του γαλακτικού οξέος έχουν τη δυνατότητα να παράξουν ποικίλα οργανικά οξέα. Το γαλακτικό οξύ μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε D-γαλακτικό οξύ και L-γαλακτικό οξύ ανάλογα με την οπτική περιστροφή του. Επίσης διακρίνονται ανάλογα και με τη μεταβολική οδό που ακολουθείται για να ζυμωθεί η εξόζη. Υπάρχουν τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (homofermenters), τα οποία αποικοδομούν τις εξόζες μέσω της γλυκόλυσης παράγοντας ως κύριο τελικό μεταβολικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Αντίστοιχα, τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (heterofermenters) χρησιμοποιούν τη μεταβολική οδό της φωσφορικής πεντόζης όπου οι εξόζες μετατρέπονται σε ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, CO₂ και αιθανόλης (Zuniga, et al. 1993) (Salovaara, et al. 2011).

Αναλύοντας τη διαδικασία ζύμωσης του καθαρού γαλακτικού οξέος, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για να παράγουν πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης και έπειτα παράγουν γαλακτικό οξύ λόγω της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Υπάρχουν πολλές έρευνες που προσπαθούν να βελτιώσουν την παραγωγή γαλακτικού οξέος όταν χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και κατά την επεξεργασία τους. Κάποιες από αυτές τις έρευνες εξετάζουν την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, όπως βιταμίνες του συμπλέγματος B, στα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση. Άλλες μελέτες χρησιμοποιούν απόβλητα από γαλακτοκομικές βιομηχανίες ως πρώτη ύλη, βοηθώντας έτσι στη μείωση του κόστους παραγωγής του γαλακτικού οξέος. Τα κύρια οξέα που παράγονται από αυτούς τους είδους τις ζυμώσεις εκτός από το γαλακτικό οξύ είναι το προπιονικό, 3-υδροξυπροπιονικό, μυρμηκικό και ηλεκτρικό. Τα οργανικά αυτά οξέα συνήθως είναι μέρος των γευστικών ουσιών των τροφίμων όπως είναι το κρασί, το ξύδι, το ψωμί και το τυρί.

1.2.2. Βακτηριοσίνη

Οι βακτηριοσίνες (Bacteriocins) είναι μια ετερογενής ομάδα βακτηριακών πρωτεϊνών ή πεπτιδίων που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια, συντίθενται στα ριβοσώματα και δρουν ενάντια σε διάφορες αλλοιώσεις τροφίμων οι οποίες προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια. Μπορούν να θεωρηθούν ως φυσικά συντηρητικά ή βιοσυντηρητικά ικανά να πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις. Για παράδειγμα, οι βακτηριοσίνες που προστίθενται στο νωπό γάλα μειώνουν την ανάπτυξη μικροβίων και αδρανοποιούν τα μεσόφιλα βακτήρια. Ακόμα, χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο οξίνισης στο γιαούρτι και επίσης αναστέλλουν το σχηματισμό αερίων από *Clostridium tyrobutyricum* σε ημίσκληρα τυριά. Επιπλέον, βρίσκει εφαρμογή και στα θαλασσινά καθώς προλαμβάνει την μόλυνσή τους από το στέλεχος *Listeria monocytogenes* με στόχο τη βελτίωση της διάρκειας ζωής τους. Λόγω αυτών των ικανοτήτων τους και της προστασίας που παρέχουν τον ανθρώπινο οργανισμό ορισμένες από αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως βακτηριοστατικά και συντηρητικά (Cleveland, et al. 2001) (Verma, et al. 2014).

1.2.3. Βιταμίνες

Γενικά, οι βιταμίνες είναι τα μακροθρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό των ζωντανών οργανισμών και ρυθμίζουν πληθώρα βιοχημικών αντιδράσεων ζωτικής σημασίας. Ωστόσο, ο ανθρώπινος οργανισμός είναι δε δύναται να συνθέσει όλες τις βιταμίνες που χρειάζεται, για τον λόγο αυτό συνίσταται να λαμβάνονται εξωγενώς. Στη βιομηχανία τροφίμων, οι βιταμίνες που συντίθενται κατά τη ζύμωση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος μπορούν να θεωρηθούν ως θρεπτικοί ενισχυτές για τα τρόφιμα. Αυτός ο εμπλουτισμός τροφίμων επεκτείνει τη χρήση βακτηρίων γαλακτικού οξέος στη σύνθεση τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση εμπλουτισμένα σε ορισμένες βιταμίνες. Μελέτες δείχνουν πως μπορούν να συνθέσουν μια ποικιλία βιταμινών όπως αυτές του συμπλέγματος Β, θειαμίνη (Β1), ριβοφλαβίνη (Β2), νιασίνη (Β3), πυριδοξίνη (Β6), παντοθενικό οξύ (Β5), φολικό οξύ (Β9), βιταμίνη C και πολλές άλλες. Τα συγκεκριμένα μόρια είναι υδατοδιαλυτά και έχουν βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών. Το βασικότερο πρόβλημα αυτών των βιταμινών είναι η ευαισθησία τους καθώς μπορούν εύκολα να καταστραφούν κατά το μαγείρεμα ή την επεξεργασία των τροφίμων. Ως εναλλακτική λύση χρησιμοποιούνται οι χημικά παραγόμενες βιταμίνες που συντίθεται κατά τη

ζύμωση βακτηρίων γαλακτικού οξέος, προσφέροντας στους καταναλωτές λειτουργικά τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας (Carozzi, et al. 2012).

1.2.4 Εξωπολυσακχαρίτες

Οι εξωπολυσακχαρίτες (extracellular polysaccharides, EPS) είναι μια κατηγορία πολυσακχαριτών με υψηλό μοριακό βάρος που αποτελούνται από μονοσακχαρίτες συνδεδεμένους με γλυκοσιδικούς δεσμούς, δημιουργώντας διαφορετικές δομές με ποικίλες βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες. Παρουσιάζονται συνδεδεμένοι στην κυτταρική επιφάνεια ή απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό μέσο. Μπορούν να παραχθούν εξωκυτταρικά από ένζυμα που εκκρίνονται από τα βακτήρια ή μπορούν να συντεθούν ενδοκυτταρικά αλλά να εκκρίνονται εξωκυτταρικά. Χωρίζονται σε ομοιοπολυσακχαρίτες (HoPS) όταν αποτελούνται από πανομοιότυπους πολυσακχαρίτες και ετεροπολυσακχαρίτες (HePS) όταν συνδέονται διαφορετικοί μονοσακχαρίτες. Η κατηγοριοποίησή τους αυτή καθορίζει και τις δράσεις τους. Οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από LAB συντίθενται εξωκυτταρικά και παράγουν μόνο HoPS και στη συνέχεια, οι πολυμερισμένες αυτές αλυσίδες απελευθερώνονται απευθείας στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Zhou, et al. 2019). Λαμβάνοντας υπόψη τους προστατευτικούς μηχανισμούς των μικροβιακών κυττάρων, όπως η προστασία από το αβιοτικό ή βιοτικό στρες, τον ανταγωνισμό, το pH και τη θερμοκρασία, οι εξωπολυσακχαρίτες έχουν ειδικές φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να έχουν δυνατότητες στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Επιπλέον, λόγω των δομικών ιδιοτήτων τους, όπως η γαλακτωματοποίηση, η υφή, η γλυκύτητα, η ζελατινοποίηση, η ικανότητα δέσμευσης νερού ή οι βιοδραστικές ιδιότητες, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εφαρμογή των EPS στη βιομηχανία τροφίμων (Jurášková, et al. 2022).

1.2.5 Γαμα-αμινοβουτυρικό οξύ

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (γ-aminobutyric acid, GABA) χαρακτηρίζεται ως ένα μη πρωτεϊνικό φυσικό αμινοξύ που συναντάται ευρέως στη φύση. Κατατάσσεται στους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές για το κεντρικό νευρικό σύστημα όπου τα επίπεδα συγκέντρωσής του σε αυτό να σχετίζονται με πολλές ασθένειες. Αρκετά βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να παράγουν GABA, μερικοί από αυτούς τους γαλακτοβάκιλλους είναι *L.brevis*, *L.paracasei*, *L.delbrueckii*, *L.buchneri*, *L.plantarum*, *L.helveticus*. Κατά τη διάρκεια ερευνών σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. γιαούρτι, γάλα σόγιας, τυρί), χρησιμοποιήσαν ως

εναρκτήρια καλλιέργεια γαλακτικά βακτήρια τα οποία κατά τη ζύμωση αυξάνουν την συγκέντρωση GABA στο τελικό προϊόν. Γίνεται αντιληπτό πως το GABA μπορεί να λειτουργήσει ως βιοενεργό συστατικό που προάγει την υγεία του καταναλωτή (Linares, et al. 2017) (Wang, et al. 2021).

1.2.6 Γευστικές και αρωματικές ύλες

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος παράγουν γευστικές ουσίες που περιλαμβάνουν οργανικά οξέα, αλκοόλες, κετόνες και εστέρες. Οι τρόποι με τους οποίους σχηματίζονται αυτές οι ουσίες είναι με βιοσύνθεση, ενζυματική δράση και οξειδωτική αποικοδόμηση. Κατά την ένταξή τους σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα βακτήρια είτε δρουν ως κυρίαρχα είτε συνεργάζονται με άλλα και παράγουν ακεταλδεΐδη, διακετύλιο και άλλες γευστικές και αρωματικές ουσίες μέσω βιοσύνθεσης και της ενζυματικής δράσης (Mukisa, et al. 2017).

1.2.7 Αντιοξειδωτικές ουσίες

Στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αντιοξειδωτικές ουσίες που είναι εξαιρετικά ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς βοηθούν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Αυτές οι ουσίες έχουν ιδιότητες που βρίσκουμε και σε άλλες ευεργετικές ενώσεις, όπως οι βιταμίνες και οι πολυσακχαρίτες. Ωστόσο οι καλλιέργειες εκκίνησης πρέπει να επιλέγονται σωστά σύμφωνα με όλες τις παραμέτρους τους ώστε να υπολογίζονται οι ιδανικές συνθήκες για τη σύνθεση βιοενεργών ενώσεων από τα γαλακτικά βακτήρια. Επομένως, κριτήρια όπως η βέλτιστη θερμοκρασία ώστε να υπάρξει βιωσιμότητα στα μικρόβια που καλλιεργούνται, η σύνθεση και η διάρκεια ζωής του τροφίμου καθορίζουν τη σωστή επιλογή στελεχών και το τελικό προϊόν (Wang, et al. 2021) (Linares, et al. 2017).



Εικόνα 2: Μεταβολίτες που παράγονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος και παραδείγματα εφαρμογής σε τρόφιμα. Τροποποιημένη εικόνα από: de Souza, Evandro L eite et al (2022).

1.3 ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1.3.1 *Limosilactobacillus fermentum*

Το *Limosilactobacillus fermentum* (προηγούμενη ονομασία *Lactobacillus fermentum*) είναι ένα βακτήριο ευρέως διαδεδομένο καθώς απομονώνεται από ποικίλα προϊόντα όπως φυτικά υλικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψωμί, λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση, το μητρικό γάλα και το σάλιο. Οι ευεργετικές του επιδράσεις, έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων προβιοτικών σκευασμάτων με πολλές εφαρμογές στον τομέα της υγείας. Σε *in vivo* δοκιμές που έγιναν, έδειξαν πως τα προβιοτικά προάγουν την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε η επίδραση ενός συγκεκριμένου στελέχους προβιοτικών για την πρόληψη της αλκοολικής στεατοηπατίτιδας σε πειραματόζωα. Επιπλέον, τα συμπληρώματα προβιοτικών προσφέρουν οφέλη ενάντια σε κοινές μολυσματικές ασθένειες όπως αυτές της άνω αναπνευστικής οδού και του γαστρεντερικού συστήματος. Ακόμα, έχουν σχετιστεί με μελέτες που υποστηρίζουν πως μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. (Naghmouchi, et al.2020).

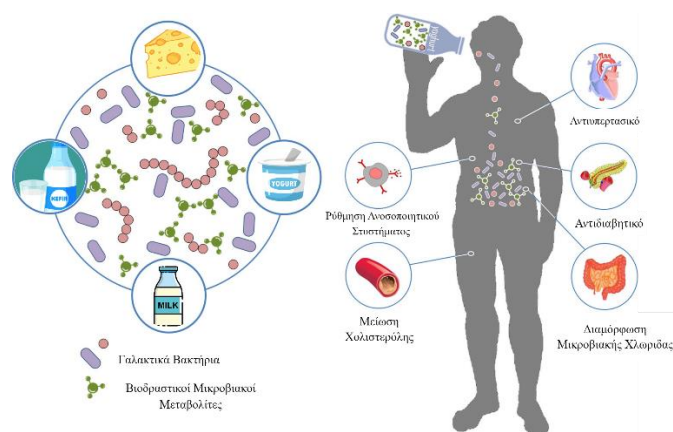
1.3.2 *Lactiplantibacillus plantarum*

Το *Lactiplantibacillus plantarum* (προηγούμενη ονομασία *Lactobacillus plantarum*) ως προβιοτικό διαθέτει ορισμένα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Αυτά περιλαμβάνουν την προστασία του οργανισμού και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, τη διατήρηση των επιπέδων της εντερικής μικροχλωρίδας και τη πρόληψή κακοήθων όγκων. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι πως μπορεί να προσαρμόζεται σε ποικίλα περιβάλλοντα και να επιβιώνει. Αυτές οι ικανότητες κεντρίζουν το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς μπορεί να βρει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως σε γαλακτοκομικά, κρέατα, λαχανικά και ποτά (Al-Tawaha, et al. 2018).

1.3.3 *Lactiplantibacillus pentosus*

Το *Lactiplantibacillus pentosus* (προηγούμενη ονομασία *Lactobacillus pentosus*) εντοπίζεται ευρέως σε παραδοσιακά τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, στις πράσινες ελιές και σε ένα είδος παραδοσιακού γιαουρτιού Kermanshah στην Ινδία (Motahari, et al. 2017). Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως καλλιέργεια εκκίνησης για

επιτραπέζιες ζυμωμένες ελιές, παραγωγή ψωμιών αμύγδαλου και κουμίσ. Λόγω των επιδράσεών τους στην προαγωγή της υγείας, όλο και περισσότερα στελέχη *L. pentosus* χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως προβιοτικά σε τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής. Έπειτα από μελέτες που διεξάχθηκαν σε υγιή βρέφη επιβεβαιώθηκε πως επιβιώνει σε εύρος θερμοκρασιών, pH και αλατότητας. Παρ' όλα αυτά είναι σημαντικό να ελέγχεται για την ασφάλειά του κάθε στέλεχος που απομονώνεται ώστε να προσδιορίζονται οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων (Moreno-Camacho, et al. 2019).

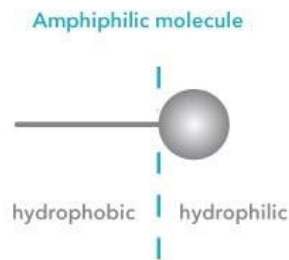


Εικόνα 3: Ευεργετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την κατανάλωση βιολεειτουργικών ζυμωμένων γαλακτοκομικών τροφίμων. Linares, Daniel M., et al (2017).

1.4 ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

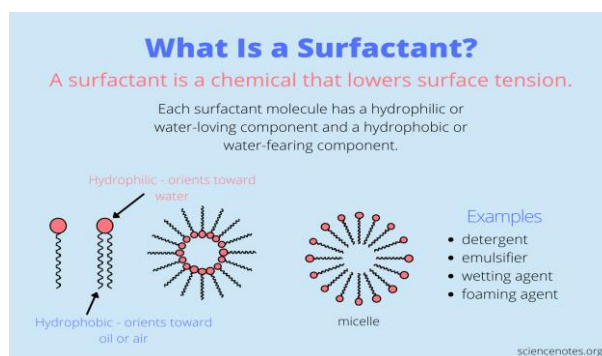
1.4.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Από τα τέλη του 1960 αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης κάποια καινοτόμα για την εποχή προϊόντα της χημικής βιομηχανίας, οι επιφανειοδραστικές ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, είναι ουσίες που εμφανίζουν επιφανειακή ή διεπιφανειακή δραστηριότητα και έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνονται στις διεπιφάνειες, μεταξύ στερεού-υγρού, υγρού-υγρού ή αέριου-υγρού, φάσεις οι οποίες δεν αναμιγνύονται. Τα μόρια συγκροτούνται από αμφιφιλικές ενώσεις, που έχουν την ικανότητα να απορροφούνται στη διεπιφάνεια και να μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια μεταξύ των δύο συστημάτων, αναγκάζουν τα μόρια με την υψηλότερη ενέργεια να έρθουν σε διεπαφή. Ωστόσο, υπάρχει διεπιφανειακό όριο μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων (Mulligan, et al .2005).



Εικόνα 4: Παρουσίαση αμφίφιλου μορίου. Susanna Laurén (2018).

Τα αμφίφιλα μόρια αποτελούνται από υδρόφοβα και υδρόφιλα μέρη, την κεφαλή και την ουρά. Η υδρόφοβη ουρά είναι συνήθως υδρογονάνθρακας, φθοράνθρακας ή σιλοξάνη. Η κατηγοριοποίησή τους γίνεται κυρίως με βάση την πολικότητα της κεφαλής, καθώς η σύσταση από τις ουρές είναι συχνά παρόμοια. Εάν η κεφαλή δεν έχει φορτίο τότε η επιφανειοδραστική ουσία στην οποία συμμετέχει χαρακτηρίζεται ως μη ιοντική, ενώ αν είναι φορτισμένη θετικά ή αρνητικά χαρακτηρίζεται ως κατιοντική ή ανιοντική αντίστοιχα. Υπάρχει και η περίπτωση η ουσία να αποτελείται και θετικές και αρνητικές ομάδες (Susanna, 2018). Κατά τη διεπαφή των δύο φάσεων το υδρόφοβο τμήμα συγκεντρώνεται στην επιφάνεια ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται προς το διάλυμα, δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα που ονομάζονται μικκύλια (Palmer, et al. 2018).



Εικόνα 5: Οι επιφανειοδραστικές είναι ουσίες που μειώνουν τη επιφανειακή τάση. Αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος. Anne Helmenstine (2022)

1.4.2 Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που έχουν μικροβιακή προέλευση ονομάζονται βιοεπιφανειοδραστικές. Συνήθως παράγονται από στελέχη ζυμών ή και από βακτήρια σε διάφορα υποστρώματα όπως είναι τα σάκχαρα, τα έλαια, τα αλκάνια και τα απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων. Οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι μια ευρύτερη ομάδα ουσιών η οποία χωρίζεται σε υποομάδες όπως τα γλυκολιπίδια, τα λιποπεπτίδια-

λιποπρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια κ.λπ. με τις περισσότερες από αυτές τις σωματιδιακές ενώσεις να είναι ανιοντικές ή ουδέτερες, ενώ κατιοντικές είναι αυτές που περιέχουν αμινομάδες (Mulligan, et al. 2005).

1.5 ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Τα χημικά συντιθέμενα τασιενεργά συνήθως ταξινομούνται σύμφωνα με το πως δίστανται στο νερό. Αντίθετα, οι μικροβιακά συντιθέμενες επιφανειοδραστικές ουσίες κατηγοριοποιούνται με βάση τη δομή, τον τρόπο δράσης, το μοριακό βάρος, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη μικροβιακή τους προέλευση (Campos, et al. 2013). Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες κατηγοριοποιούνται με βάση τη δομή τους στις εξής κατηγορίες: (i) γλυκολιπίδια, (ii) λιποπετίδια και λιποπρωτεΐνες, (iii) γλυκοπεπτίδια και γλυκολιποπεπτίδια και (iv) βιογαλακτωματοποιητές με ικανότητα βιοεπιφανειοδραστικού (φωσφολιπίδια και πολυμερή βιοεπιφανειοδραστικά).

1.5.1 Γλυκολιπίδια

Τα γλυκολιπίδια είναι τα πιο κοινά μικροβιακά βιοεπιφανειοδραστικά καθώς είναι και ευκολότερα διαθέσιμα. Πιο συγκεκριμένα, τα γλυκολιπίδια είναι μια ομάδα λιπιδίων η οποία ενώνεται με έναν υδατάνθρακα. Αποτελούνται από μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (Drakontis, et al. 2020). Μεταξύ αυτών τα πιο γνωστά είναι τα ραμνολιπίδια, τα λιπίδια τρεαλόζης (ή τρεαλολιπίδια) και τα σοφορολιπίδια (Moldes, et al.2021) (Vijayakumar, et al. 2015) (Kralova, et al .2009).

1.5.2 Ραμνολιπίδια

Τα ραμνολιπίδια είναι ένας τύπος γλυκολιπιδίων που κυριαρχούν στις μελέτες των βακτηριακών επιφανειοδραστικών καθώς έχουν αξιόλογες φυσικοχημικές ιδιότητες. Παράγονται κυρίως από *Pseudomonas* και αποτελούνται από ένα ή δύο μόρια ραμνόζης συνδεδεμένα με υδροξυ-οξέα. Το οξύ που συμμετέχει πιο συχνά σε αυτές τις ενώσεις είναι το β-υδροξυ-δεκανοϊκό οξύ. Σε αυτά τα μόρια η ραμνόζη αποτελεί το υδρόφιλο τμήμα του ενώ τα υδροξυ-οξέα το λιπόφιλο (Abdel-Mawgoud et al. 2010). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε κάθε ζύμωση καθώς μπορούν να παραχθούν διαφορετικοί τύποι ραμνολιπιδίων (Drakontis, et al. 2020) (Barbosa, et al.2023). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες ώστε να βρεθεί η χρυσή τομή μεταξύ, ικανής ποσότητας παραγωγής και του κόστους των διεργασιών που απαιτούνται (Drakontis, et al. 2020).

1.5.3 Σοφορολιπίδια

Τα σοφορολιπίδια ανήκουν και αυτά στα γλυκολιπίδια και παράγονται από μη παθογόνα είδη ζυμομυκήτων. Το πιο σύνηθες γένος από το οποίο παράγονται είναι το *Candida bombicola*. Όσον αφορά στη δομή, είναι διμερείς υδατάνθρακες σοφορόζης οι οποίοι συνδέονται με ένα υδροξυ λιπαρό οξύ μακράς αλύσου. Τεχνολογικά το κόστος παραγωγής τους είναι και σε αυτή την περίπτωση υψηλό συγκρινόμενο με κάποια χημικώς συντιθέμενα τασιενεργά και για το λόγο αυτό η παραγωγή τους είναι περιορισμένη (Drakontis, et al. 2020) (Rau, et al. 2001).

1.5.4 Τρεαλολιπίδια

Τα τρεαλολιπίδια αντιπροσωπεύουν μια ενθαρρυντική κατηγορία ενώσεων, λόγω των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους. Η τρεαλόζη (ή τρεχαλόζη) είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης στον οποίο δύο μονάδες γλυκόζης συνδέονται με έναν α-1-1-γλυκοσιδικό δεσμό. Έχουν ανακαλυφθεί τρεαλολιπίδια διαφόρων δομών ενώ κάποια από αυτά (Janeck, et al. 2018), έχουν εμφανίσει επιφανειοδραστικές ιδιότητες, διότι σε ορισμένες εφαρμογές μείωσαν την επιφανειακή τάση και αύξησαν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων ενώσεων (Kitamoto, et al 2002). Ωστόσο, μέχρι στιγμής υπάρχουν λίγες μελέτες που σχετίζονται με τη βιολογική τους δράση (Janeck, et al. 2018) (Franzetti, et al.2010).

1.5.5 Λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης

Τα λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης (mannosylerythritol lipids, MELs) ανήκουν στην κατηγορία των γλυκολιπιδίων και παράγονται από στελέχη ζυμών και μυκήτων (Morita, et al. 2015). Το βιοεπιφανειοδραστικό αυτό μόριο περιέχει 4-O-β-D-μαννοπυρανοσυλ-μεσο-ερυθριτόλη ως υδρόφιλη ομάδα και ένα λιπαρό οξύ ή/και μια ακετυλομάδα ως υδρόφοβο τμήμα (Arutchevi, et al. 2008) (de Andrade, et al. 2022).

1.5.6 Λιποπετίδια και λιποπρωτεΐνες

Αυτή η κατηγορία βιοεπιφανειοδραστικών γενικά αποτελείται από μεγάλο αριθμό κυκλικών λιποπεπτιδίων συνδεδεμένων σε ένα λιπαρό οξύ. Διαθέτουν αξιοσημείωτες επιφανειοδραστικές ιδιότητες καθώς μειώνουν την επιφανειακή τάση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Το πιο μελετημένο λιποπεπτίδιο είναι η σουρφακίνη (Surfactin) που παράγεται από το *B. subtilis* (Moldes, et al. 2021) σε αλατούχο διάλυμα εμπλουτισμένο με σίδηρο (iron enriched minimal salt-MSI) ή (Yeh,

et al. 2006) σε υπόστρωμα μελάσας με ορυκτά άλατα (Molasses mineral salts medium-MMSM) (Abdel-Mawgoud, et al. 2008).

1.5.7 Γλυκολιποπεπτίδια και γλυκοπεπτίδια

Τα πιο μελετημένα μικροβιακά βιοεπιφανειοδραστικά, γλυκολιποπεπτίδια και γλυκοπεπτίδια, παράγονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος όπως ο *Ligilactobacillus agilis*, ο *L. plantarum* και ο *Lacticaseibacillus paracasei*. Η συγκέντρωση των λιπιδίων στα εκχυλίσματα μικροβιακών βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την πηγή άνθρακα και τις συνθήκες ζύμωσης. Για παράδειγμα, το *L. paracasei* παράγει γλυκολιποπεπτίδια όταν χρησιμοποιείται η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, ενώ το ίδιο στέλεχος παράγει γλυκοπεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες όταν χρησιμοποιείται η λακτόζη. Αποδείχθηκε ότι η φύση της πηγής άνθρακα παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση πολυμερών μικροβιακών βιοεπιφανειοδραστικών (Moldes, et al.2021).

1.6 ΒΙΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ ΜΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1.6.1 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια κατατάσσονται στη συγκεκριμένη κατηγορία καθώς μπορούν να ληφθούν και από φυτικά και ζωικά κύτταρα. Αποτελούνται από μια γλυκερίνη, δύο λιπαρά οξέα, μια φωσφορική ομάδα και μια πολική ομάδα κεφαλής. Είναι τα δομικά και λειτουργικά συστατικά όλων των κυτταρικών μεμβρανών. Επί του παρόντος, τα φωσφολιπίδια που προέρχονται από τρόφιμα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορες πηγές, όπως φυτικά έλαια, κρόκος αυγού, τυρόγαλα, ψάρια και ηλιόσπορους (Sun, et al. 2018).

1.6.2 Πολυμερή βιοεπιφανειοδραστικά

Σε αυτή την κατηγορία τα πιο μελετημένα μικροβιακά βιοεπιφανειοδραστικά είναι οι πολυμερικοί γαλακτωματοποιητές οι οποίοι είναι ικανοί να μειώνουν την επιφανειακή τάση και παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς. Εφαρμόζονται στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών ως γαλακτωματοποιητές (Moldes, et al. 2021) (Raffa, et al. 2015).

1.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές λόγω των διαφορετικών δομών και κατ' επέκταση των ιδιοτήτων τους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά τις καθιστούν αρκετά ευέλικτες χημικές ενώσεις και μπορούν να

εφαρμοστούν σε βιομηχανίες τροφίμων, πετρελαίου, γεωργίας, καλλυντικών, φαρμάκων και άλλες (Campos, et al. 2013).

1.7.1 Βιομηχανία τροφίμων

Στη βιομηχανία τροφίμων, λόγω του ρόλου να μειώνουν την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση, δύνανται να εφαρμοστούν για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων, καθώς επίσης και σε άλλες λειτουργίες (Vijayakumar, et al. 2015). Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι αποτελεσματικά στη διάλυση των φυτικών ελαίων, στη σταθεροποίηση των λιπών κατά το μαγείρεμα και στη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ψωμιού. Έχουν μελετηθεί για χρήση σε συνταγές κέικ και μάφιν ως συστατικό για την αντικατάσταση του baking powder και των αυγών, σε μπισκότα για να αντικαταστήσουν τα συνθετικά πρόσθετα, και σε σάλτσες για σαλάτες ως γαλακτωματοποιητές. Στα τρόφιμα που περιέχουν άμυλο, έχει προταθεί η χρήση γαλακτωματοποιητών που προέρχονται από μικρόβια ώστε να μειωθεί η χρήση των χημικά παραγόμενων που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά ενώ ταυτόχρονα βελτιώνει τη ρεολογία των προϊόντων. Συνοψίζοντας, η προσθήκη των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στα τρόφιμα περιορίζει τη συσσώρευση σφαιριδίων λίπους, βελτιώνει την υφή και τη διάρκεια ζωής, τροποποιεί τις ρεολογικές ιδιότητες και ενισχύει τη σταθερότητα και την υφή των προϊόντων (Ribeiro, et al. 2020).

1.7.2 Βιομηχανία πετρελαίου και Γεωργικός τομέας

Τα βιοεπιφανειοδραστικά κατέχουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αποκατάστασης μολυσμένων περιοχών από πετρέλαιο. Τα προϊόντα αυτά όταν έρθουν σε επαφή με το νερό σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνειά του. Αυτό εμποδίζει την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του αέρα και του νερού και τη δίοδο του ηλιακού φωτός με αποτέλεσμα να διακόπτεται η διαδικασία αναπνοής και φωτοσύνθεσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι αποτελεσματικές και φιλικές προς το περιβάλλον καθώς έχουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή βιοαποδομησιμότητα. Ο πιο συνηθισμένος ρόλος τους είναι η ενίσχυση της διασποράς των ρύπων στην υδατική φάση και η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του υδρόφοβου υποστρώματος στους μικροοργανισμούς, με επακόλουθη απομάκρυνση των ρύπων μέσω της βιοαποικοδόμησης. Η βιομηχανία πετρελαίου αποτελεί την κύρια αγορά βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθώς η ευελιξία και η αποτελεσματικότητά τους τις καθιστούν πολύτιμες (Silva RDCFS, et al. 2014) (Campos, et al. 2013).

Δεδομένου ότι είναι φιλικά προς το περιβάλλον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως και σε τομείς όπως η γεωργία. Ενισχύουν τη βιοαποικοδόμηση των ρύπων, βελτιώνουν την ποιότητα του εδάφους καθώς δεν μολύνεται με χημικά και προωθούν την ανάπτυξη των φυτών καθώς έχουν και αντιμικροβιακή δράση. Είναι ικανά να αντικαταστήσουν τα συνθετικά φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα χωρίς να επιβαρύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα και γενικότερα το περιβάλλον (Sachdev, et al 2013).

1.7.3 Βιομηχανία καλλυντικών

Οι εξαιρετικές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τους κάνουν χρήσιμα συστατικά και στον τομέα των καλλυντικών. Η καθαριστική δράση, η διαβροχή, η γαλακτωματοποίηση, η διαλυτοποίηση, η διασπορά, το αφριστικό αποτέλεσμα, η χαμηλή τοξικότητα, η αντιερεθιστική δράση και οι ενυδατικές τους ικανότητες είναι από τα κύρια πλεονεκτήματά τους έναντι των συνθετικών. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βιοεπιφανειοδραστικά γλυκολιπίδια στα καλλυντικά είναι τα σοφορολιπίδια, τα ραμνολιπίδια και τα λιπίδια της μαννοσυλερυθριτόλης. Τα σοφορολιπίδια έχουν καλή συμβατότητα με το δέρμα και εξαιρετικές ενυδατικές ιδιότητες. Τα ραμνολιπίδια είναι καλοί γαλακτωματοποιητές και μπορούν να αντικαταστήσουν τα πετροχημικά τασιενεργά που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα καλλυντικά προϊόντα. Τα λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης χρησιμοποιούνται γενικά σε σκευάσματα περιποίησης δέρματος ως δραστικό συστατικό για την πρόληψη της γήρανσης του δέρματος. (Bhattacharya, et al. 2017) (Chowdhury, et al. 2019).

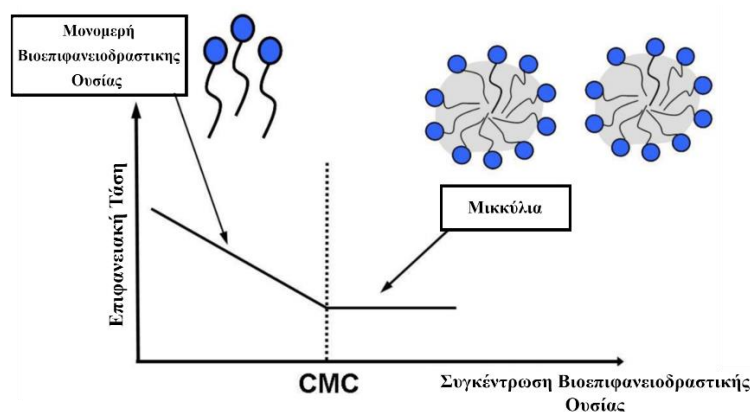
1.7.4 Βιομηχανία φαρμάκων

Η φαρμακοβιομηχανία είναι μια από τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες στον κόσμο. Οι ανθρώπινες ανάγκες θέτουν νέες προκλήσεις, αναζητούν θεραπείες με ευέλικτες και λιγότερο τοξικές ουσίες με στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπειών. Τα βιοεπιφανειοδραστικά μόρια έχουν δομική καινοτομία και λειτουργική ευελιξία, ιδιότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Ορισμένα εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις ενάντια σε ανθρώπινους παθογόνους μικροοργανισμούς (Manga, et al., 2021). Μερικές από τις εφαρμογές τους σε αυτόν τον τομέα είναι πως απελευθερώνουν γονίδια, φάρμακα, έχουν αντική και αντικαρκινική δράση. Έπειτα από μελέτες αναφέρθηκε πως τα γλυκολιπίδια και τα λιποπετίδια μπορούν να διασπάσουν την κυτταρική μεμβράνη καταστρέφοντας με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο, λειτουργία η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών

κυττάρων. Τέτοιες ιδιότητες βοηθούν στην ανάπτυξη εναλλακτικών θεραπειών για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών και λοιμώξεων (Sarubbo, et al. 2022).

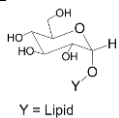
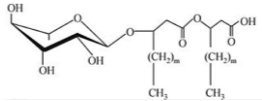
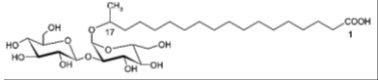
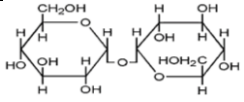
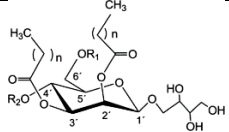
1.8 ΜΙΚΚΥΛΙΑΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

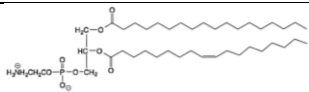
Η δραστηριότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτάται από τη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ένωσης μέχρι να επιτευχθεί η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (Critical Micelle Concentration-CMC). Σε συγκεντρώσεις πάνω από το CMC, τα μόρια βιοεπιφανειοδραστικών συνενώνονται για να σχηματίσουν μικκύλια, διπλές στοιβάδες και σφαιρικά συσσωματώματα. Ο σχηματισμός μικκυλίων επιτρέπει στα βιοεπιφανειοδραστικά να μειώνουν την επιφανειακή και τη διεπιφανειακή τάση ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των υδρόφοβων οργανικών ενώσεων. Η CMC χρησιμοποιείται στις μελέτες για τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας των επιφανειοδραστικών. Τα αποτελεσματικά βιοεπιφανειοδραστικά έχουν χαμηλότερο CMC, συνεπώς απαιτείται λιγότερη βιοεπιφανειοδραστική ουσία για τη μείωση της επιφανειακής τάσης, άρα δύναται να βελτιωθεί το κόστος παραγωγής (Pacwa-Płociniczak, et al. 2011).



Εικόνα 6: Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης βιοεπιφανειοδραστικού, επιφανειακής τάσης και σχηματισμού μικκυλίων. Προσαρμοσμένη εικόνα από Pacwa-Płociniczak, Magdalena, et al. (2011).

Πίνακας 1: Κύριοι τύποι μικροβιακών επιφανειοδραστικών ουσιών.

Βιοεπιφανειοδραστική Ουσία	Κύρια Προέλευση	Δομή	Εφαρμογές
Γλυκολιπίδια		 Y = Lipid	Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, απορρυπαντικών
Ραμνολιπίδια	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, απορρυπαντικών, φαρμάκων
Σοφορολιπίδια	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>		Βιομηχανία τροφίμων, πετρελαίου, καλλυντικών
Τρεαλολιπίδια	<i>Rhodococcus erithropolis</i> , <i>Arthobacter sp.</i>		Βιομηχανία τροφίμων, πετρελαίου, Βιοϊατρική
Λιπίδια μαννοσυλερυθριτόλης	<i>Candida antartica</i>		Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, φαρμάκων, γεωργίας
Λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες:	<i>Bacillus subtilis</i>		Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, φαρμάκων

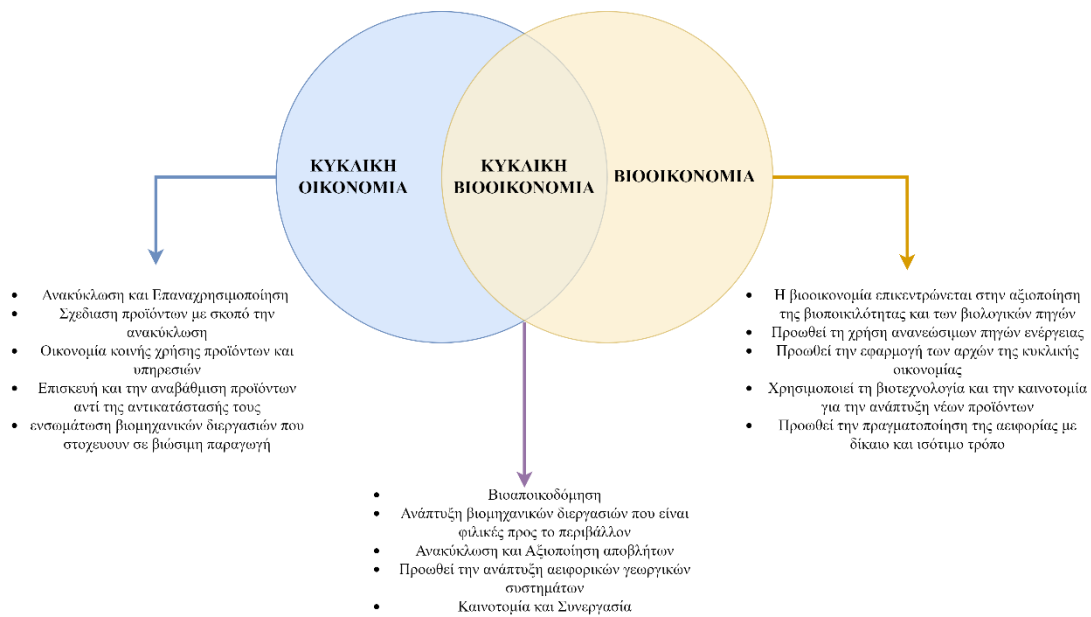
Γλυκολιποπεπτίδια και γλυκοπεπτίδια	<i>Lactobacillus agilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>		Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, απορρυπαντικών
Βιο-γαλακτωματοποιητές με επιφανειακή δραστηριότητα			
Φωσφολιπίδια			Βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών
Πολυμερή βιοεπιφανειδραστικά	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida tropicalis</i>		Βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων

1.9 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η επιστημονική έρευνα στον τομέα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έχει αναπτυχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ανοίγοντας νέες προοπτικές και δυνατότητες για εφαρμογή σε ποικίλους τομείς. Από τη βιοτεχνολογία και τη φαρμακευτική έως την περιβαλλοντική επιστήμη, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παρουσιάζουν πληθώρα δυνατοτήτων με πολλαπλά οφέλη μέσω της εφαρμογής πράσινων τεχνολογιών (Nitschke, et al 2007).

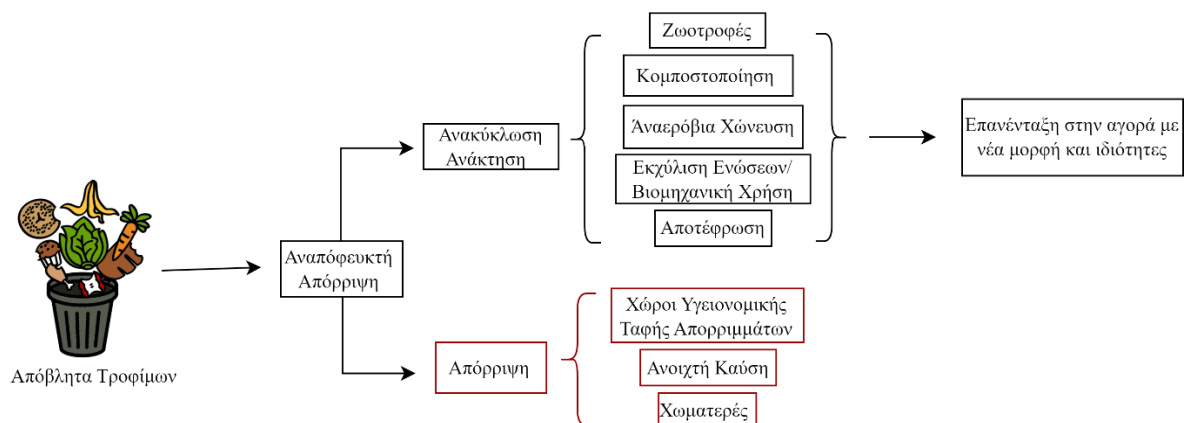
Η χρήση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών θεωρείται ελκυστική επιλογή λόγω της ευελιξίας, της βιοαποδομησιμότητας, και της περιβαλλοντικής αποδοχής τους. Ωστόσο, το υψηλό κόστος παραγωγής τους περιορίζει τη χρήση τους σε πολλές εφαρμογές. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι απαραίτητο να αξιολογηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας για να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή τους, να αξιολογηθεί η οικονομική χρήση νέων υποστρωμάτων (λ.χ. αυτά που προέρχονται από βιομηχανικά απόβλητα) και να αξιολογηθούν οι τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού για να γίνει η παραγωγή τους οικονομικά βιώσιμη (Bustamante, et al. 2012).

Προκειμένου να επιτευχθεί η βιώσιμη παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί η έννοια της κυκλικής οικονομίας. Η μετάβαση από μια γραμμική σε μια κυκλική οικονομία είναι μείζονος σημασίας καθώς οι σημερινές μας συνήθειες παραγωγής και κατανάλωσης τροφίμων δεν είναι βιώσιμες (Bigdeloo, et al. 2021). Το τρέχον οικονομικό σύστημα που ακολουθείται στο μεγαλύτερο ποσοστό των σημερινών κοινωνιών, είναι το γραμμικό οικονομικό μοντέλο «παράγεται-λαμβάνεται-καταναλώνεται-απορρίπτεται». Το σύστημα αυτό είναι αδύνατο να λειτουργήσει καθώς θέτει ως δεδομένο πως υπάρχει αφθονία πόρων και απεριόριστες εκτάσεις για απόρριψη αποβλήτων. Αντίθετα, η κυκλική οικονομία σημαίνει επαναχρησιμοποίηση, αναδόμηση και ανακύκλωση των υπαρχόντων υλικών και προϊόντων. Στόχος είναι αυτά που παλαιότερα θεωρούνταν απόβλητα, να χρησιμοποιούνται ως πόροι μέσα από διάφορες επεξεργασίες. Επιπλέον, η κυκλική οικονομία σε συνδυασμό με τη βιοοικονομία έχουν βασικό ρόλο στον τομέα των τροφίμων (Jurgilevich, et al. 2016). Η βιοοικονομία μπορεί να οριστεί ως η «παραγωγή ανανεώσιμων βιολογικών πόρων και η μετατροπή αυτών των πόρων και των ροών αποβλήτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, όπως τρόφιμα, ζωοτροφές, προϊόντα βιολογικής βάσης και βιοενέργεια» (CIERVO, et al. 2018) (Stegmann, et al. 2020).



Εικόνα 7: Σχέση μεταξύ κυκλικής οικονομίας, βιοοικονομίας και κυκλικής βιοοικονομίας.

Ένα σύστημα τροφίμων βασισμένο στην κυκλική οικονομία έχει ως βασικό στόχο τη μείωση της ποσότητας των απορριμμάτων που παράγει αλλά και την επαναχρησιμοποίηση αυτών μέσω νέων ροών παραγωγής πολλαπλών προϊόντων (Jurgilevich, et al. 2016). Η βιοοικονομία περιλαμβάνει μεταξύ άλλων, τη μετατροπή των ανανεώσιμων πόρων, όπως τα απόβλητα, σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως είναι τρόφιμα, ζωοτροφές, λιπάσματα και βιοενέργεια (Carus, et al. 2018).



Εικόνα 8: Τα στάδια για τη διαχείριση και επεξεργασία απορριμμάτων τροφίμων.

Μέσω αυτών των μοντέλων οι βιομηχανίες έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν την ποσότητα των παραγόμενων αποβλήτων και να επαναχρησιμοποιήσουν με

ποικίλους τρόπους τα θρεπτικά συστατικά αυτών. Στην περίπτωση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, η χρήση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής, καθώς η χρήση αυτών των αποβλήτων ως πηγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών μειώνει την ανάγκη για ακριβά χημικά προϊόντα. Δεύτερον, το κόστος διάθεσης των αποβλήτων μειώνεται, καθώς μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και να ενσωματωθούν εκ νέου στην παραγωγική διαδικασία. Με αυτόν τον τρόπο οι επιχειρήσεις συμβάλλουν στη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος και στην προώθηση της βιώσιμης ανάπτυξης (Nitschke, M., et al 2007).

Η ανάπτυξη βιώσιμων τεχνολογιών διαχείρισης τροφικών αποβλήτων αποτελεί ένα σημαντικό μέτρο για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που προκύπτουν από την αυξανόμενη διατροφική ζήτηση. Ο παγκόσμιος πληθυσμός αυξάνεται εκθετικά και αυτό σημαίνει αυξημένη ανάγκη για τρόφιμα. Ταυτόχρονα, η ανεπάρκεια πόρων, οι περιορισμένες γεωργικές εκτάσεις και οι περιβαλλοντικές προκλήσεις δημιουργούν πίεση στην παγκόσμια παραγωγή τροφίμων. Οι τροφικές απώλειες αποτελούν μια σημαντική πρόκληση, καθώς μεγάλο μέρος των τροφίμων που παράγονται σε παγκόσμιο επίπεδο καταλήγει ως απόβλητο, είτε λόγω κακής διαχείρισης είτε λόγω απώλειας κατά την παραγωγική αλυσίδα, από την παραγωγή έως την κατανάλωση. Η ανάπτυξη βιώσιμων τεχνολογιών διαχείρισης τροφικών αποβλήτων αποτελεί λύση για την αξιοποίηση αυτών των αποβλήτων με τρόπο που να είναι οικολογικά βιώσιμος και οικονομικά αποδοτικός. Μια τέτοια τεχνολογία επιτρέπει την ανακύκλωση, την ενεργειακή αξιοποίηση ή την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα τροφικά απόβλητα (Lee, et al.2020) (Ravindran, et al 2016).

Η οικονομική δραστηριότητα δεν μπορεί πλέον να αντιμετωπίζεται απομονωμένα από τις επιπτώσεις της στο περιβάλλον, ενώ η ενίσχυση της βιοοικονομίας μπορεί να προωθήσει τη δημιουργία καινοτόμων λύσεων που σέβονται τη φύση και τους φυσικούς πόρους. Η ενσωμάτωση των αρχών της κυκλικής οικονομίας στην οικονομική δραστηριότητα επιδιώκει τη μείωση των αποβλήτων και την ανακύκλωση των υλικών, προάγοντας τη βιώσιμη χρήση των πόρων και τη μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης. Μια ολιστική προσέγγιση που συνδυάζει την οικονομική ανάπτυξη με την προστασία του περιβάλλοντος και την προώθηση της βιοοικονομίας, μπορεί να συνδράμει σε ένα βιώσιμο μέλλον (Manga, et al.2021).

1.10 ΧΡΗΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ

Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η χρήση υποπροϊόντων ή υπολειμμάτων της βιομηχανίας τροφίμων ως υποστρώματα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθώς μπορεί να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Ειδικότερα, τα υποπροϊόντα ή απόβλητα της γεωργικής βιομηχανίας ενδείκνυνται καθώς συχνά περιέχουν υψηλά επίπεδα υδατανθράκων ή λιπιδίων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη και τη σύνθεση βιοεπιφανειοδραστικών. Στα απόβλητα αυτά ανήκουν τα λίπη και τα έλαια, συμπεριλαμβανομένων των ζωικών λιπών, υπολείμματα επεξεργασίας καφέ, διαφόρων καλλιεργειών, γάλακτος, επεξεργασίας φρούτων, τροφίμων και ποτών.

1.10.1 Αγροβιομηχανικά απόβλητα και φυτικά υπολείμματα

Προϊόντα όπως το πίτουρο, βλαστοί σιταριού, βλαστοί ρυζιού, ο φλοιός σόγιας, καλαμποκιού, ρυζιού και η μελάσα είναι κάποια από τα πιο αντιπροσωπευτικά πιθανά αγροτοβιομηχανικά απόβλητα. Περιέχουν υψηλή ποσότητα αμύλου, υδατανθράκων και λιπιδίων καθιστώντας τα μία πλούσια πηγή άνθρακα για μικροβιακή ανάπτυξη. Ειδικότερα, η μελάσα έχει κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς αποτελεί ένα φθινό υπόστρωμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

1.10.2 Λίπη και έλαια

Οι βιομηχανίες κρέατος και οι βιομηχανίες επεξεργασίας φυτικών ελαίων παράγουν σημαντικές ποσότητες ελαίου κατώτερης ποιότητας, ζωικού λίπους και λαρδί. Ωστόσο, η ζήτηση για τα ζωικά λίπη είναι κατώτερη από αυτή των φυτικών κάτι το οποίο αποτελεί μείζων πρόβλημα. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα υποστρώματα από ανανεώσιμες πηγές όπως γλυκόζη, μαγιά και άλλα.

1.10.3 Υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων και ποτών

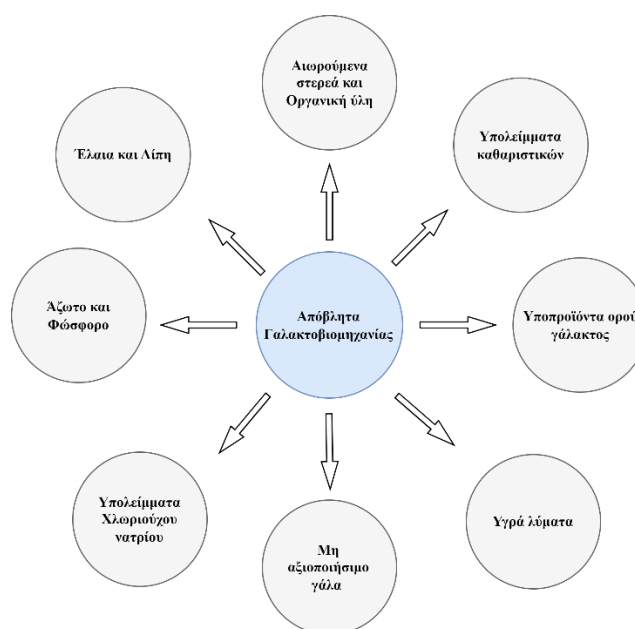
Εκτός από τα ελαιούχα απόβλητα υπάρχουν και στερεά υπολείμματα τα οποία μετά την επεξεργασία για την παραγωγή προϊόντων απορρίπτονται. Στα απόβλητα αυτά υπάρχουν υπολείμματα κόκκων καφέ, φλούδες διαφόρων ειδών πατάτας, σόγια και φλούδες από διάφορους σπόρους. Όλα αυτά αποτελούν χρήσιμη πρώτη ύλη καθώς έχουν υψηλή ποσότητα υδατανθράκων, σακχάρων και αμινοξέων ουσίες χρήσιμες για παραγωγή μικροβιακών προϊόντων (Banat, et al. 2014).

1.10.4 Απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας

Η γαλακτοβιομηχανία είναι ένα παράδειγμα της βιομηχανίας τροφίμων, η οποία είναι αναπτυγμένη σε όλο τον κόσμο καθώς παράγει μια ποικιλία προϊόντων

όπως γάλα, γάλα σε σκόνη, βούτυρο και τυρί. Κατά τη διαδικασία παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, δημιουργούνται διάφορα υποπροϊόντα και απορρίμματα, τόσο στερεά όσο και υγρά απόβλητα. Τα στερεά απόβλητα μπορεί να περιλαμβάνουν υπολείμματα γάλακτος, πρόβειου και αιγοπρόβειου τυριού, περιττά κομμάτια βουτύρου και κρέμας, καθώς και απόβλητα από τις διαδικασίες επεξεργασίας, όπως φίλτρα και μηχανικά απόβλητα. Τα υγρά απόβλητα περιλαμβάνουν υπολείμματα γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως περίσσεια γάλακτος, προϊόντα καθαρισμού και απολύμανσης.

Ωστόσο, η ταχεία βιομηχανική ανάπτυξη αύξησε την παραγωγικότητα, αλλά οδήγησε και σε αύξηση της απελευθέρωσης τοξικών ουσιών στη γη. Τέτοιες εκλύσεις μπορεί να οδηγήσουν σε περιβαλλοντική ζημιά και να αποτελέσουν σοβαρή απειλή για την υγεία των έμβιων όντων. Τα απόβλητα της γαλακτοβιομηχανίας αποτελούν πραγματική απειλή για το περιβάλλον λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανικό φορτίο. Το παρακάτω σχήμα (εικόνα 6) δείχνει τους συνηθέστερους τύπους λυμάτων που παράγονται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων (Ahmad, Talha, et al. 2019).



Εικόνα 9: Λύματα γαλακτοβιομηχανίας. Προσαρμοσμένη εικόνα απο Ahmad, Talha, et al. (2019).

Η εκμετάλλευση των αποβλήτων βιομηχανιών τροφίμων προσφέρει μια εναλλακτική λύση για την οικονομική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Εκτός από τη σύνθεση του υποστρώματος, η διαδικασία παραγωγής επιφανειοδραστικών ουσιών επηρεάζεται από παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, ο αερισμός, η ανάδευση, η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα κ.α. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων επηρεάζει και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, το κόστος επεξεργασίας και διάθεσης των αποβλήτων αποτελεί σημαντικό παράγοντα για μια βιομηχανία που επιδιώκει συνεχώς εναλλακτικές λύσεις για τη μείωση, επαναχρησιμοποίηση, ανακύκλωση και ανάκτηση των απορριμμάτων. Συνολικά, η έρευνα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών κατάλληλων για προϊόντα διατροφής στρέφεται σε μια νέα προοπτική εκμετάλλευσης εναλλακτικών πόρων, συμβάλλοντας έτσι στη βιώσιμη διαχείριση των πόρων και τη μείωση των αποβλήτων τροφίμων (Banat, et al. 2014).

1.11 ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

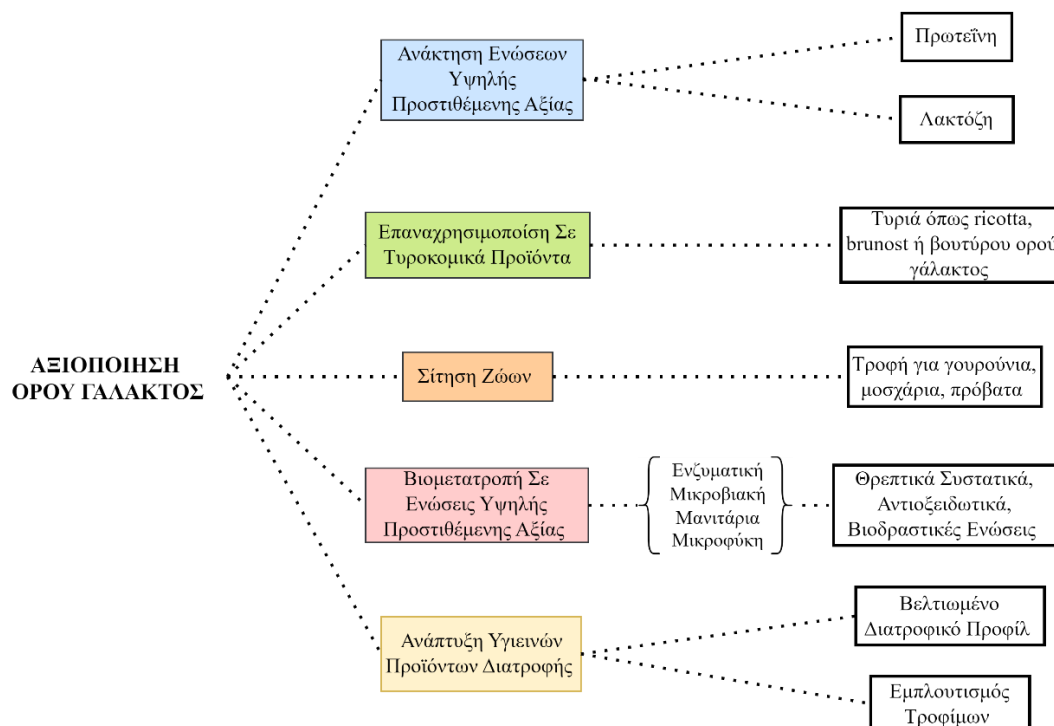
Ο ορός γάλακτος του τυριού ή Cheese whey (CW) είναι το υγρό ρεύμα που απομένει έπειτα από την παρασκευή τυριού ή την πήξη του γάλακτος αφού έχει διαχωριστεί το στερεό πήγμα, έχει γίνει καθίζηση και απομάκρυνση της καζεΐνης. Αντιπροσωπεύει το 85-95% του συνολικού όγκου του γάλακτος, ακόμα και μετά από αυτές τις επεξεργασίες διατηρεί το 55% των θρεπτικών ουσιών του γάλακτος. Κάποια θρεπτικά συστατικά από αυτά είναι η λακτόζη (4,5-5% w/v), οι διαλυτές πρωτεΐνες (0,6-0,8% w/v), τα λιπίδια (0,4-0,5% w/v) και τα άλατα (8-10% από το αποξηραμένο εκχύλισμα). Τα άλατα που περιέχονται είναι κυρίως NaCl, KCl και άλατα ασβεστίου όπως είναι τα φωσφορικά. Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι όξινο καθώς υπάρχουν ποσότητες γαλακτικού οξέος (0,05% w/v), κιτρικά οξέα και μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις όπως η ουρία και το ουρικό οξύ. Συνεπώς υπάρχει μεγάλη ποικιλία στερεών συστατικών, η αναλογία τους όμως καθορίζεται από τη σύσταση του γάλακτος και από τις διάφορες τεχνολογικές επεμβάσεις στις οποίες υπόκειται κατά την επεξεργασία του (Kachrimanidou, et al.2022).

Το τυρόγαλο μπορεί να διαχωριστεί σε δύο τύπους: γλυκό και όξινο ορό γάλακτος. Η διάκριση βασίζεται στη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους, το επίπεδο pH και την τεχνική επεξεργασίας που χρησιμοποιείται. Το γλυκό τυρόγαλο ή τυρόγαλο πυτιάς είναι ο τύπος τυρογάλακτος παράγεται με τη χρήση πυτιάς για την πήξη του γάλακτος. Έχει σχετικά υψηλό pH το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 5,9

και 6,6. Το γλυκό τυρόγαλο χαρακτηρίζεται από ομοιογενή και λεία υφή και χρησιμοποιείται συχνά στην παραγωγή ορισμένων τυριών. Το όξινο τυρόγαλο αντιπροσωπεύει τον τύπο τυρογάλακτος που παράγεται με την προσθήκη οξέων στο γάλα πριν από την παρασκευή της καζεΐνης. Η οξύτητα του όξινου τυρογάλακτος είναι χαμηλότερη, με τιμή pH που κυμαίνεται μεταξύ 4,3 και 4,6. Αυτή η χαμηλή τιμή pH οφείλεται στην οξίνιση του γάλακτος πριν από την παρασκευή του τυρογάλακτος. Το όξινο τυρόγαλο συνήθως χρησιμοποιείται στην παραγωγή ορισμένων παραδοσιακών τυριών (Pires, 2021).

Η ύπαρξη του τυρογάλακτος ξεκινάει από όταν προπαρασκευάστηκε το τυρί, τότε χρησιμοποιούνταν ως τροφή για ζώα, κυρίως χοίρων, καθώς οι ποσότητες ήταν μικρές και διαχειρίσιμες. Με το πέρασμα των χρόνων, η παραγωγή τυριού αυξήθηκε δημιουργώντας έτσι την ανάγκη διαχείρισης τεραστίων ποσοτήτων. Το πρόβλημα διογκώνεται ολοένα και περισσότερο καθώς το κόστος απόρριψης μεγαλώνει και η διάθεση του για ζωοτροφές περιορίζεται. Όλα αυτά οδηγούν στο γεγονός ότι κάποιες ποσότητες απορρίπτονται σε λίμνες, ποταμούς και θάλασσες. Το εγχείρημα αποδείχτηκε καταστροφικό διότι για την αποσύνθεση της οργανικής του ουσίας δεσμεύονται μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, στερώντας το από τους θαλάσσιους οργανισμούς. Πλέον έχουν τεθεί αυστηροί περιβαλλοντικοί κανονισμοί για τη διαχείριση των αποβλήτων και υποπροϊόντων τροφίμων στη γαλακτοβιομηχανία, καθώς υπολογίζεται ότι για κάθε 1 κιλό τυριού παράγονται περίπου 9-10 λίτρα ορού γάλακτος. Ωστόσο, η αξιοποίηση του τυρογάλακτος παρεμποδίζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες όπως το μεγάλο μικροβιακό του φορτίο, το οποίο εντείνει την αλλοίωση του αν δεν παστεριωθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η σύσταση του μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του γάλακτος από το οποίο προέρχεται αλλά γενικά περιέχει χαμηλό ποσοστό στερεών συστατικών περίπου 6,3-8,8 w/w, χαρακτηριστικό που αυξάνει το κόστος επεξεργασίας του (Pires, et al. 2021).

Η γαλακτοβιομηχανία χωρίζεται σε διάφορους τομείς που σχετίζονται με την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και πηγή τεραστίων ποσοτήτων αποβλήτων. Αυτά τα λύματα έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, ανάλογα με το προϊόν που λαμβάνεται (γιαούρτι, τυρί, βούτυρο, γάλα, παγωτό κ.λπ.). Επιπλέον, η διαχείριση των λυμάτων, το κλίμα, οι συνθήκες λειτουργίας και ο τύπος της επεξεργασίας μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά των λυμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων.



Εικόνα 10: Τομείς χρησιμοποίησης ορού γάλακτος. Προσαρμοσμένη εικόνα από Barba, F. J. (2021).

Έπειτα από έρευνες, κάποιοι από τους τρέχοντες τρόπους διαχείρισης του ορού γάλακτος είναι η βιολογική και φυσικοχημική επεξεργασία (Hausjell, et al. 2019). Όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα (Εικόνα 1.11) ο ορός γάλακτος μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί στο τυροκομείο για την παραγωγή άλλων φρέσκων προϊόντων όπως ricotta ή τυρί brunost και βούτυρο ορού γάλακτος. Επιπλέον, χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη διατροφή ζώων όπως οι χοίροι, αλλά επίσης επεξεργάζεται ειδικά για τη διατροφή μόσχων και προβάτων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί απευθείας ως συστατικό τροφίμων ή να συμπυκνωθεί σε σκόνη πρωτεΐνης. Υπό αυτή την έννοια, το 50% της παραγωγής ricotta χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη τροφίμων και προϊόντων ζωοτροφών, το μισό από τα οποία χρησιμοποιείται απευθείας σε υγρή μορφή, το 30% ως σκόνη ricotta το 15% ως λακτόζη και το υπόλοιπο ως συμπυκνωμένη πρωτεΐνη (Barba, 2021).

Γενικά, ο ορός γάλακτος παρουσιάζει το πλεονέκτημα πως μπορεί να αποτελέσει ένα θρεπτικό συμπλήρωμα ή υπόστρωμα ζύμωσης λόγω της ποσότητας λακτόζης που περιέχει, ειδικά για τους γαλακτοβάκιλλους, χωρίς να χρειάζεται πολλά στάδια επεξεργασίας σε σύγκριση με τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα (Kachrimanidou, et al.2022) (Siso, 1996) (Nascimento, et al. 2022).

1.12 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ

Γίνεται εύκολο αντιληπτό ότι, τα απόβλητα παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων αποτελούν μείζον πρόβλημα λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), περίπου το ένα τρίτο του βρώσιμου τμήματος των τροφίμων που παράγονται παγκοσμίως για ανθρώπινη κατανάλωση χάνεται ή σπαταλάται. Συνεπώς χρειάζονται νέες προσεγγίσεις για την αξιοποίηση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων τροφίμων.

Η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από τρόφιμα αποτελεί μια σημαντική προσέγγιση για την αξιοποίηση των προϊόντων της γεωργίας και της τροφικής βιομηχανίας μέσω της εφαρμογής διαφόρων τεχνολογικών, δημιουργικών και καινοτόμων διαδικασιών. Ένας τρόπος για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας είναι η δημιουργία προϊόντων με ειδικές ιδιότητες ή χαρακτηριστικά που τους δίνουν ιδιαίτερη αξία και επιθυμητές ιδιότητες για τον καταναλωτή. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει προϊόντα υγείας και ευεξίας, προϊόντα διατροφής με λειτουργικές ιδιότητες, προϊόντα βιολογικής γεωργίας, προϊόντα μεγάλης ποικιλίας και ποιότητας, και προϊόντα με γεωγραφικές ενδείξεις (Ravindran, et al 2016) (Galanakis, 2015).

1.12.1 Αξιοποίηση ορού γάλακτος: Παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από ορό γάλακτος αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική και καινοτόμο προσέγγιση για την αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος της γαλακτοβιομηχανίας. Όπως προαναφέρθηκε, ο ορός γάλακτος αποτελεί ένα ρεύμα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, λακτόζη, βιταμίνες και μέταλλα και μπορεί να μετατραπεί σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας με την κατάλληλη επεξεργασία και τεχνολογία. (Zandona, 2021).

1.12.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αποτελούν περίπου το 20% των συνολικών πρωτεϊνών που υπάρχουν στο γάλα και αντιπροσωπεύουν ένα από τα διατροφικά πιο πολύτιμα συστατικά του ορού γάλακτος. Ανάλογα με το είδος του ορού διαφέρουν και τα θρεπτικά συστατικά. Ο ξινός ορός γάλακτος, με $pH < 5$, περιέχει υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού οξέος, ασβεστίου και φωσφόρου. Ο γλυκός ορός γάλακτος με $pH = 6-7$, έχει υψηλά επίπεδα λακτόζης λίπους και πρωτεϊνών. Θεωρείται επίσης εξαιρετική πηγή

λειτουργικών πρωτεϊνών και πλούσια πηγή βιταμινών Β, μετάλλων (Ca, P, Na, K, Cl-, Fe, Cu, Zn και Mg) και λακτόζης. Λόγω των εξαιρετικών θρεπτικών και λειτουργικών ιδιοτήτων των στερεών που περιέχονται στον ορό, ένα σημαντικό μέρος του ορού γάλακτος υπόκειται σε μεταποίηση για την παραγωγή διάφορων προϊόντων. Κάποια από αυτά μπορεί να είναι σκόνες ορού γάλακτος, απιονισμένου ορού γάλακτος, απογαλακτισμένου ορού γάλακτος, συμπυκνώματος πρωτεΐνης ορού (WPC), απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) ή λακτόζη. Αυτές οι διαδικασίες αξιοποιούν πλήρως τις ιδιότητες του και οδηγούν στην παραγωγή ποικίλων προϊόντων με υψηλή διατροφική αξία και λειτουργικότητα. Ο ορός γάλακτος και τα συστατικά που μπορούν να ανακτηθούν, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως λειτουργικά συστατικά σε διαιτητικά προϊόντα και προϊόντα υγείας, ενώ οι βιοδραστικές πρωτεΐνες στη φαρμακευτική και στη διατροφική βιομηχανία (Zandona, 2021).

1.12.3 Λακτόζη

Η λακτόζη (4-O-β- d -galactopyranosyl-D d -γλυκόζη) είναι το κύριο συστατικό των στερεών του ορού γάλακτος (70-72% των συνολικών στερεών) και είναι επίσης μια πολύ σημαντική πηγή ενέργειας, καθιστώντας τον ορό γάλακτος μια πιθανή πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Αρχικά, η λακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διατροφή με βάση τα πολλά οφέλη, καθώς ευνοεί την εντερική απορρόφηση ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου και άλλων μετάλλων. Χρησιμοποιείται επίσης ως θρεπτική πηγή και υπόστρωμα για τα εντερικά βακτήρια για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και άλλων λιπαρών οξέων, δημιουργώντας έτσι μια ήπια όξινη αντίδραση στον εντερικό σωλήνα και αποτρέποντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό επιβλαβών βακτηρίων. Έχει επίσης μικρότερη επίδραση στα επίπεδα σακχάρου στο αίμα λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη (Zandona, 2021).

1.12.4 Γαλακτικό οξύ

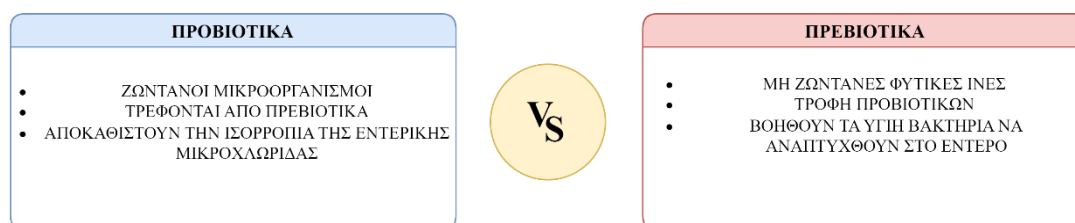
Το γαλακτικό οξύ (LA, 2-υδροξυπροπανοϊκό οξύ) και τα παράγωγά του έχουν χρησιμοποιηθεί από καιρό σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών, κλωστοϋφαντουργικών, δέρματος και χημικών, κυρίως ως συντηρητικά και οξινιστές. Η λακτόζη μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ μέσω ζύμωσης χρησιμοποιώντας βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες. Είναι προϊόν ζύμωσης μιας ευρείας ομάδας μικροοργανισμών, όπως τα στελέχη *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* κ.α. Ωστόσο, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος έχουν περιορισμένη ικανότητα να συνθέτουν αμινοξέα και βιταμίνες Β, επομένως η προσθήκη θρεπτικών

συστατικών είναι απαραίτητη γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, ειδικά σε βιομηχανική κλίμακα (Zandona, 2021).

1.12.5 Προβιοτικά και πρεβιοτικά προϊόντα

Τα προβιοτικά ορίζονται ως «*Ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν όφελος για την υγεία στον ξενιστή*» (Hotel, A. C. P., & Cordoba, 2001). Είναι κυρίως βακτήρια, που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του εντέρου μας όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες. Προάγουν την ισορροπία της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και συμβάλλουν στην καλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος. Οι πιο συνηθισμένες ομάδες προβιοτικών βακτηρίων που συμπεριλαμβάνονται στα συμπληρώματα και τα τρόφιμα είναι οι *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, καθώς είναι φιλικόι προς τον ανθρώπινο οργανισμό και έχουν υψηλή ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης στα σημεία δράσης. Τα προβιοτικά παρέχουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία του ξενιστή μέσω της βελτίωσης της εντερικής υγείας, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη βελτίωση της πέψης με αποτέλεσμα τη γενικότερη βελτίωση της υγείας (Terrou, et al. 2019) (Tripathi, et al. 2014).

Τα πρεβιοτικά ορίζονται ως «*ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς-ξενιστές και προσδίδει όφελος για την υγεία*» (Gibson, et al. 2017). Δεν είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί όπως τα προβιοτικά, αλλά αποτελούν το θρεπτικό υπόστρωμα για άλλα βακτήρια που υπάρχουν στο έντερο, όπως είναι και τα προβιοτικά. Βοηθούν στη διατήρηση ενός ισορροπημένου και υγιή πληθυσμού μικροοργανισμών στο γαστρεντερικό σύστημα, μειώνοντας την ανάπτυξη επιβλαβών στελεχών και προλαμβάνοντας πιθανές μολύνσεις (Guimarães, et al. 2020) (Davani-Davari, et al. 2019).



Εικόνα 11: Χαρακτηριστικά προβιοτικών και πρεβιοτικών.

1.12.6 Τρόφιμα και ποτά

Τα λειτουργικά τρόφιμα και ποτά ανήκουν σε μια από τις πιο φιλόδοξες και καινοτόμες κατηγορίες της βιομηχανίας τροφίμων, καθώς προσφέρουν οφέλη για την υγεία πέρα από τη βασική διατροφή. Συνήθως περιλαμβάνουν συστατικά που έχουν επιστημονικά αποδεδειγμένες λειτουργίες αναφορικά με την προώθηση της υγείας. Ο ορός γάλακτος και τα συστατικά του χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως λειτουργικά συστατικά σε διαιτητικά προϊόντα και προϊόντα υγείας. Ο ορός γάλακτος περιέχει πλούσια ποσότητα βιοδραστικών πρωτεϊνών, γνωστές για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία και την ενίσχυση της αντοχής του οργανισμού (Zandona, 2021).

1.12.7 Βιοπλαστικά

Η ανάγκη ώστε να αξιοποιηθούν στο έπακρο τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα και να αυξηθούν τα πιθανά έσοδα σε όλη την παραγωγική αλυσίδα έχει οδηγήσει τους ερευνητές να στραφούν σε νέες βιοτεχνολογικές μεθόδους. Η παραγωγή βιοπλαστικών με τη χρήση ορού γάλακτος ως υπόστρωμα έχει βρεθεί στο επίκεντρο αρκετών μελετών, διότι η λακτόζη που υπάρχει στο διήθημα μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε πολυδρόξαλκανοϊκά (PHAs) και πολυγαλακτικό οξύ (PLA) (Zandona, 2021). Τα βιοπλαστικά κατασκευάζονται εξ ολοκλήρου ή εν μέρει από ανανεώσιμες πηγές βιομάζας. Ορισμένα βιοπλαστικά είναι βιοδιασπώμενα ή ακόμα και κομποστοποιήσιμα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Είναι κατασκευασμένα από ανανεώσιμες πηγές, για το λόγο αυτό μπορούν να ανακυκλωθούν φυσικά με βιολογικές διεργασίες, περιορίζοντας έτσι τη χρήση ορυκτών καυσίμων και προστατεύοντας το περιβάλλον (Abd El-malek, et al. 2020). Τα βιοπλαστικά που παράγονται με αυτόν τον τρόπο μπορούν περαιτέρω να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες συσκευασίας, υλικών ψεκασμού, υλικών συσκευών, ηλεκτρονικών προϊόντων, γεωργικών προϊόντων, προϊόντων αυτοματισμού, χημικών μέσων και βιομηχανιών διαλυτών (Zandona. 2021).

Το πολυγαλακτικό οξύ (polylactic acid, PLA) είναι ένας βιοαποικοδομήσιμος πολυεστέρας που παράγεται από τη συμπίκνωση μονομερών γαλακτικού οξέος (lactic acid, LA). Αποτελεί ένα από τα υποσχόμενα "πράσινα" πλαστικά, καθώς πολλές ιδιότητες μοιάζουν με το πολυστυρένιο (PS) και το πολυπροπυλένιο (PP). Η χαμηλή τοξικότητα του καθιστά δυνατή τη χρήση του σε συσκευασίες τροφίμων, καθώς δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου. Επιπλέον, είναι βιοαποικοδομήσιμο, άρα δύναται να διασπαστεί φυσικά από βιολογικούς παράγοντες, όπως βακτήρια ενώ δεν επιβαρύνει το περιβάλλον. Η πολυμορφικότητα του PLA του επιτρέπει να

παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής και την ποιότητα των υλικών που χρησιμοποιούνται. Μπορεί να παρασκευαστεί σε διάφορες μορφές, όπως σε φύλλα, φιλμ, μπουκάλια, κλπ., καθιστώντας το κατάλληλο για διάφορες εφαρμογές (Zandona, 2021).

Τα πολυυδροξυαλκανοϊκά (PHAs) είναι βιοπολυεστέρες που συντίθενται από διαφορετικά βακτηριακά γένη μέσω ζύμωσης. Παράγονται από μικροοργανισμούς που ζυμώνουν διάφορα υποστρώματα, όπως σάκχαρα και λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές. Τα PHAs είναι πλήρως βιοδιασπώμενα, γεγονός που τα καθιστά φιλικά προς το περιβάλλον. Μπορούν να αποδομηθούν από μικροοργανισμούς στο έδαφος, το νερό και το θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον διεκδικούν ένα μεγάλο κομμάτι της αγοράς καθώς έχουν ιδιότητες παρόμοιες με πολλά συμβατικά πλαστικά, καθιστώντας τα κατάλληλα για μια ποικιλία εφαρμογών, όπως συσκευασίες, ιατρικές συσκευές, γεωργικά φιλμ και πολλά άλλα. Τα PHAs αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις, όπως το υψηλό κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τα συμβατικά πλαστικά, την ανάγκη για βελτίωση της απόδοσης και της βιοτεχνολογικής διαδικασίας, και τη δυσκολία στην ανάπτυξη εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας (Colombo, et al. 2016) (Tan, et al. 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη χρήση ορού γάλακτος ως υπόστρωμα ζύμωσης και την παραγωγή διαφόρων ειδών βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια (LAB). Ο στόχος ήταν να δημιουργηθεί μια διαδικασία φιλική προς το περιβάλλον και να επιφέρει υψηλή προστιθέμενη αξία στα παραγόμενα προϊόντα. Η πειραματική πορεία βασίστηκε σε προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του εργαστηρίου με στόχο το σχεδιασμό μιας ολιστικής διεργασίας η οποία θα χαρακτηρίζεται από μηδενικά απόβλητα (zero waste).

Στα πλαίσια του συγκεκριμένου πειράματος επιλέχθηκε το τυρόγαλο ως ένα χαμηλού κόστους θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας τροφίμων. Μέσω διεργασιών απομονώθηκε ο ορός ο οποίος αποτέλεσε και το κύριο υπόστρωμα για την έναρξη των ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρες. Η πορεία της ζύμωσης αξιολογήθηκε με διάφορες μεθόδους ώστε να κατανοηθούν και να ρυθμιστούν οι συνθήκες ζύμωσης ή και να βελτιστοποιηθούν. Έπειτα από την ολοκλήρωση της ζύμωσης ακολούθησε η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών, ώστε να απομονωθούν (crude extracts) και να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός αυτών των ουσιών ο οποίος γίνεται μεσώ μετρήσεων ώστε να κατανοηθεί ο τρόπος λειτουργίας τους και η αλληλεπίδραση τους με άλλους παράγοντες. Στο επόμενο στάδιο εφαρμόστηκε η κυκλική διαδικασία όπου τα κύτταρα LAB που απομονώθηκαν, μετά τη διαδικασία εκχύλισης βιολογικών υποπροϊόντων, χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ζυμώμενου οξυγάλακτος. Αυτό το βήμα έχει σκοπό την μελέτη και την απόδειξη πως υπάρχει δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των κυττάρων σε μια ολιστική και κυκλική διαδικασία λαμβάνοντας υπόψη όλα τα στάδια και τις αλληλεπιδράσεις στον κύκλο παραγωγής ξινόγαλου, από την πρώτη φάση της εκχύλισης βιολογικών υποπροϊόντων μέχρι την επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων LAB για την παραγωγή προϊόντων. Η προσέγγιση αυτή επιδιώκει τη βελτιστοποίηση της συνολικής διαδικασίας, τη συνεισφορά και την αλληλεπίδραση όλων των στοιχείων που εμπλέκονται σε αυτήν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ-ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Ο ορός γάλακτος ή τυρόγαλα, αποτέλεσε ευγενική παροχή της γαλακτοκομικής εταιρεία «Γαλιατσάτος» (Κεφαλονιά, Ελλάδα), και εφαρμόστηκε ως υπόστρωμα χαμηλού κόστους σε ζυμώσεις για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία απομάκρυνσης του κλάσματος της πρωτεΐνης (απο-πρωτεΐνωση) η οποία δύναται να αποτελέσει ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η μέθοδος για την κλασμάτωση της πρωτεΐνης περιγράφεται στη συνέχεια.

Το κλάσμα που παραλήφθηκε το οποίο είναι πλούσιο σε λακτόζη (~50 g/L αρχική συγκέντρωση), καλείται εφεξής απο-πρωτεϊνωμένο τυρόγαλο, ή cheese whey permeate (CWP). Στην πλειονότητα των πειραμάτων, το CWP αραιώθηκε για να ληφθεί αρχική συγκέντρωση λακτόζης περίπου 20 g/L, ρυθμίστηκε η τιμή pH και εν συνεχεία αποστειρώθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε πειράματα βιομετατροπής.

3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η επεξεργασία του τυρογάλακτος πραγματοποιήθηκε με βάση προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας και απαιτεί συγκεκριμένα στάδια θερμοκρασίας και τιμής pH. Ειδικότερα, συγκεκριμένη ποσότητα τυρογάλακτος τοποθετήθηκε προς θέρμανση σε ποτήρι ζέσεως, έως ότου η θερμοκρασία του να φτάσει στους 55-60°C, με ταυτόχρονη ανάδευση. Εν συνεχεία, ρυθμίστηκε η τιμή pH = 10 με την προσθήκη NaOH 5 N (3 minutes) και στη συνέχεια προστέθηκε HCl 5 M ώστε η τιμή pH = 3,5 και το διάλυμα αφέθηκε για 5 λεπτά. Στο τελευταίο στάδιο η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 4,7 και το διάλυμα τοποθετήθηκε προς αποστείρωση, στους 121 °C για 15 λεπτά. Ο στόχος της διεργασίας είναι να πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση και η καθίζηση όλων των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος.



Εικόνα 12: Προετοιμασία τυρογάλακτος, θέρμανση και αλλαγή pH.

Το διάλυμα τοποθετήθηκε προς αποστείρωση ώστε να πραγματοποιηθεί η καθίζηση των πρωτεϊνών. Για να διαχωριστεί ο ορός γάλακτος από τις πρωτεΐνες εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση στους 4°C και σε 4800 rpm για 15 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση των υπολειπόμενων στερεών. Έπειτα, λήφθηκε το CWP, εφαρμόστηκε αραίωση, ρυθμίστηκε εκ νέου η τιμή του pH ανάλογα με τη βέλτιστη τιμή των γαλακτικών βακτηρίων και το CWP τοποθετείται εκ νέου προς αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.



Εικόνα 13: Απομονωμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος μετά από καθίζηση στο ισοηλεκτρικό σημείο και φυγοκέντρηση.

3.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η προετοιμασία της προκαλλιέργειας έγινε πριν την έναρξη του εκάστοτε πειράματος, συνυπολογίζοντας τον τελικό ενεργό όγκο της ζύμωσης. Στα πειράματα της παρούσης εργασίας ο ενεργός όγκος ορίστηκε στο 70%. Η προκαλλιέργεια έγινε

σε κωνική φιάλη με υπόστρωμα de Man, Rogosa and Sharpe (MRS Broth), του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1. Το υπόστρωμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά και ακολούθησε ο εμβολιασμός με συγκεκριμένο στέλεχος.

Πίνακας 2: Σύνθεση υποστρώματος ζύμωσης.

Bacteriological peptone		10 g/L
Dextrose	C ₆ H ₁₂ O ₆	20 g/L
Dipotassium phosphate	K ₂ HPO ₄	2 g/L
Magnesium sulfate	MgSO ₄	0.2 g/L
Manganese sulfate	MnSO ₄	0.05 g/L
Beef extract		8 g/L
Sodium acetate	C ₂ H ₃ NaO ₂	5 g/L
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	1 g/L
Yeast extract		4 g/L
Ammonium citrate	C ₆ H ₁₁ NO ₇	2 g/L

Ο εμβολιασμός έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες και το στέλεχος παρέμεινε προς επώαση για 12 ώρες στους 37 °C. Τα στελέχη που μελετήθηκαν είναι τα: ACA 182, E10, E108 (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα.

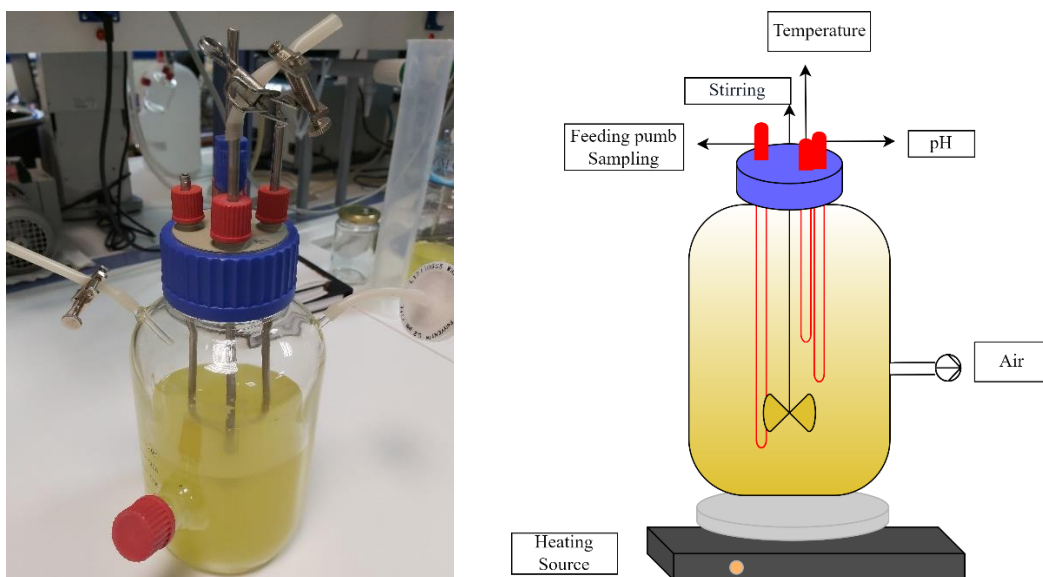
ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ACA-DC 0182	<i>L. fermentum</i>
FMCC B-324 (E10)	<i>L. plantarum</i>
FMCC B-329 (E108)	<i>L. pentosus</i>

3.4 ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Στην παρούσα εργασία οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρες συνολικού όγκου 2L ενώ η ποσότητα του εμβολίου ορίστηκε στο 10% του συνολικού όγκου. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 37°C και το pH ελεγχόταν με τη βοήθεια πεχαμέτρου (Electronic pH-meter) το οποίο συνδέεται στο βιοαντιδραστήρα (Εικόνα

3) και τη χρήση αποστειρωμένου διαλύματος βάσης (NaOH, 5M) ή οξέος (HCl 5M), ώστε να διατηρείται το pH μεταξύ 6-7 (ιδανικότερα 6,7-6,9) υπό συνεχή ανάδευση.

Μετά το πέρας της αποστείρωσης, ο βιοαντιδραστήρας αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συνδέεται το pH-μετρο, το θερμόμετρο και η ανάδευση. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 24 ώρες ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λήφθηκαν δείγματα υπό ασηπτικές συνθήκες για να καταγραφεί η πορεία της ζύμωσης. Το κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε προζυγισμένο erpendorf, για 7 min στις 3800 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό erpendorf και αποθηκεύτηκε στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες αναλύσεις. Το προζυγισμένο erpendorf μαζί με τη βιομάζα τοποθετήθηκε προς ξήρανση στους $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ έως την επίτευξη σταθερού βάρους, προκειμένου να προσδιοριστεί η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW). Τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας εκφράστηκαν σε g/L.

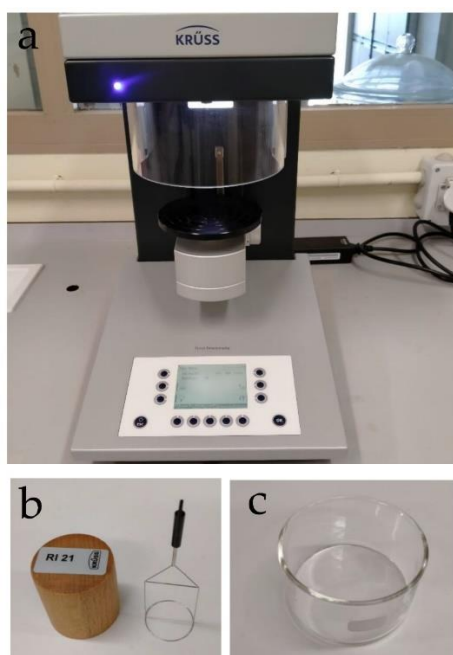


Εικόνα 14: Βιοαντιδραστήρας με όρο γάλακτος ως υπόστρωμα, μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης.

3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ

Οι εκχυλισμένες και ακατέργαστες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που ελήφθησαν μετά την καλλιέργεια στελεχών lactobacilli σε CWP χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Η επιφανειακή τάση υπολογίστηκε με τη μέθοδο Wilhelmy plate, στους 25°C , χρησιμοποιώντας тензиόμετρο (K20 Krüss Tensiometer,

KRÜSS GmbH, Germany) εξοπλισμένο με πλάκα πλατίνας 1,9 cm (wetted length: 40,20 mm). Το тенσιόμετρο βαθμονομήθηκε με απεσταγμένο νερό και η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών προσδιορίστηκε με βάση τη μείωση της επιφανειακής τάσης σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (απεσταγμένο νερό και ρυθμιστικό διάλυμα PBS). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ($n=3$) και τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τιμών (Kachrimanidou, et al. 2022).



Εικόνα 15: Πειραματική διάταξη που δείχνει τον εξοπλισμό επιφανειακής τάσης (a), το δακτύλιο μέτρησης (b) και το δοχείο / vessel που τοποθετείται το δείγμα (c). Torres-Giner et al (2022).

3.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε διαφορετικές συνθήκες αποτελεί μείζονος σημασίας παράμετρο η οποία σχετίζεται και με τις μετέπειτα εφαρμογές. Αρχικά, προσδιορίστηκε η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (critical micelle concentration, CMC), στην οποία μελετάται η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών σε διαφορετικές συνθήκες. Για τον προσδιορισμό της τιμής CMC, παρασκευάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από την εκάστοτε βιοεπιφανειοδραστική ουσία ώστε να μετρηθεί η επιφανειακή τάση και

κατασκευάστηκαν καμπύλες με τις οποίες προσδιορίστηκε για κάθε βιοεπιφανειοδραστική τη τιμή CMC.

Η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών σε διαφορετικές συνθήκες είναι σημαντική για τις μετέπειτα εφαρμογές. Για τη μελέτη σταθερότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες, διαλύματα από τις βιοεπιφανειοδραστικές τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στους 4°C, στους 50 °C, στους 75 °C και σε συνθήκες αποστείρωσης 121 °C για 15 λεπτά. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση της τιμής pH τα δείγματα ρυθμίστηκαν σε διαφορετικές τιμές pH 4, 6, 8, 10 με τη χρήση NaOH 1M και HCl 1M. Σε κάθε περίπτωση, μετρήθηκε ξανά η επιφανειακή τους τάση. Τέλος, μελετήθηκε η προσθήκη NaCl στα δείγματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ώστε να μελετηθεί η επίδραση της αλατότητας. Οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1, 5 και 9 g/L και τα δείγματα αφέθηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία μετρήθηκε η επιφανειακή τάση.

3.7 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.7.1. Μέτρηση βιομάζας

Κατά τη διάρκεια του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα (2 mL) εις διπλούν σε προζυγισμένα φιαλίδια τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της βιομάζας. Αφού φυγοκεντρήθηκαν 10 λεπτά στις 5200 rpm διαχωρίστηκε το υπερκείμενο, το οποίο και αποθηκεύτηκε σε προζυγισμένα erpendorf για επόμενες αναλύσεις. Στη συνέχεια, η βιομάζα προσδιορίστηκε βαρυμετρικά με ξήρανση του κυτταρικού ιζήματος μετά από φυγοκέντρωση στους 65°C μέχρι να ληφθεί ένα σταθερό βάρος με τη χρήση ζυγαριάς ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και εκφράστηκε σε Total Dry Weight (TDW, g/L) (Kachrimanidou, et al. 2022).

$$TDW = (BAPOΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΞΗΡΑΝΣΗ - ΑΠΟΒΑΡΟ) \times 2 \div 1000 \text{ (Εξίσωση 2)}$$

3.7.2 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος και λακτόζης

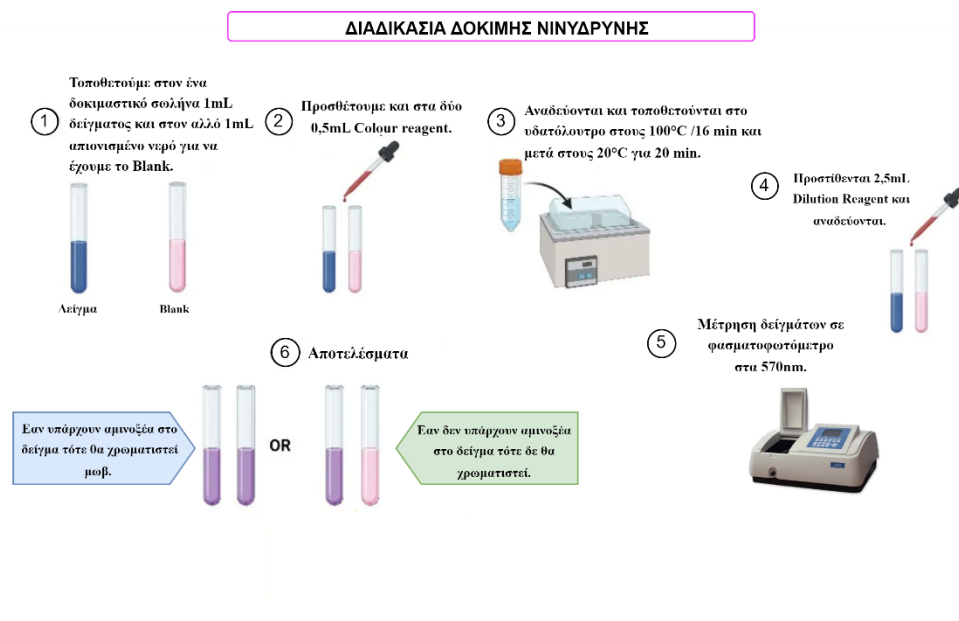
Η λακτόζη και το γαλακτικό οξύ προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, Agilent), εξοπλισμένη με στήλη ROA-οργανικού οξέος H⁺ (300 mm×7,8 mm, Phenomenex) συζευγμένη με διαφορικό διαθλασίμετρο (RID). Οι συνθήκες λειτουργίας ήταν οι εξής: όγκος δείγματος 10 µL, κινητή φάση 10 mM H₂SO₄: ρυθμός ροής 0,6 mL/min, θερμοκρασία στήλης 65 °C. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα της ζύμωσης τοποθετήθηκαν σε erpendorf των 2mL, φυγοκεντρήθηκαν ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα από το υπερκείμενο όπως

περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια αραιώθηκαν κατάλληλα και διηθήθηκαν (Whatman®, 0,2 µm) για τη διασφάλιση ορθών αποτελεσμάτων και την προστασία της στήλης.

3.7.3 Προσδιορισμός αζώτου ελευθέρων αμινομάδων (FAN)

Αρχή της μεθόδου: Είναι μια φωτομετρική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του ελεύθερου αζώτου των αμινοξέων. Η αντίδραση της νινυδρίνης με τα αμινοξέα οδηγεί στον σχηματισμό έντονα χρωματισμένων προϊόντων, τα οποία μπορούν να μετρηθούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (Lie, S.1973).

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση, αρχικά τοποθετείται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα ενώ παράλληλα, σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL απιονισμένου νερού ως blank (τυφλό δείγμα). Έπειτα, γίνεται η προσθήκη 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (Colour reagent) και οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 100°C για 16 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού τα δείγματα αφήνονται στους 20°C για 20 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 2,5 mL από το αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution Reagent) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύονται ξανά με συσκευή vortex (20 sec). Τέλος, ακολουθεί μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm, αφού προηγουμένως έχει γίνει μηδενισμός με το τυφλό δείγμα. Μετρείται και καταγράφεται η απορρόφηση και η συγκέντρωση των αμινοξέων προσδιορίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη η οποία έχει κατασκευαστεί με γνωστές συγκεντρώσεις διαλύματος γλυκίνης (0,5-2 mg/L)



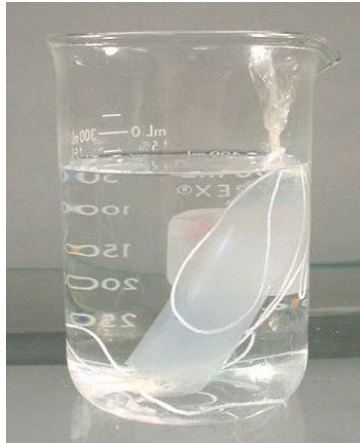
Εικόνα 16: Διαδικασία δοκιμής νινυδρύνης για ποσοτική ανάλυση. Προσαρμοσμένη εικόνα απο MN Editors 2023.

3.8 ΚΑΤΙΟΥΣΑ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

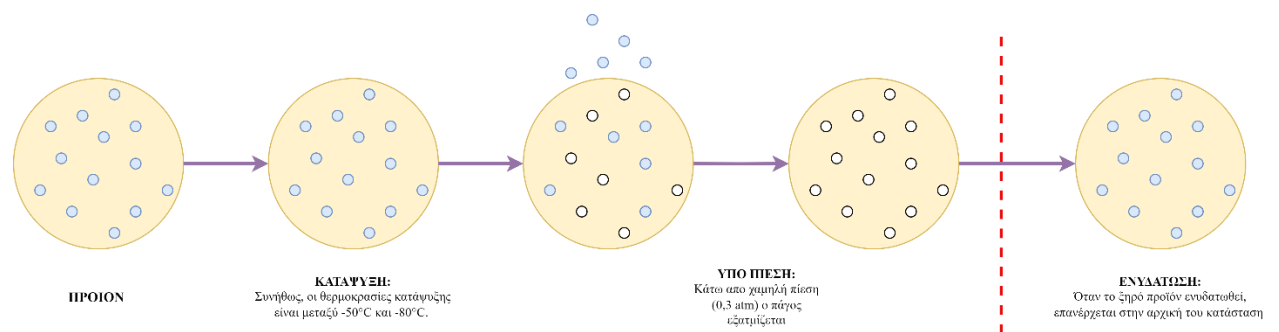
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συλλέχθηκαν δείγματα 50 mL σε προζυγισμένα falcon. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C και σε 4800 rpm για 15 λεπτά. Έπειτα διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από τα κύτταρα στα οποία και προστέθηκε απιονισμένο νερό προς έκπλυση, φυγοκεντρήθηκαν ξανά και το νερό αφαιρέθηκε. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε εις διπλούν ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα από το υπερκείμενο της ζύμωσης. Εν συνεχεία, στα κύτταρα προστέθηκε διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (Phosphate Buffered Saline) με pH 7,0 σε αναλογία 6:1 v/v. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ανάδευση για περίπου 12 ώρες ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση των επιφανειοδραστικών ουσιών από τα κύτταρα στο υπερκείμενο. Μετά το πέρας της ανάδευσης και εκχύλισης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για να διαχωριστεί το διάλυμα PBS από τα κύτταρα, το οποίο και αποτέλεσε το δείγμα προς ανάλυση (Kachrimanidou, et al. 2022).

Μετά το διαχωρισμό, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε μεμβράνη (0,22 μ m pore-size filter Millipore) (molecular weight Cellu-Sep® cutof 6-8 kDa) για περαιτέρω καθαρισμό. Έπειτα κάθε μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως το οποίο συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρις ότου η μεμβράνη να σκεπαστεί

πλήρως και τοποθετήθηκε στους 4°C για περίπου 12 ώρες. Τέλος, ακολούθησε μέτρηση της επιφανειακής τάσης και λυοφίλιωση του προϊόντος ώστε να παραληφθεί το τελικό προϊόν (Kachrimanidou, et al. 2022).



Εικόνα 17: Δείγμα υπερκείμενου ζύμωσης τοποθετημένο σε μεμβράνη.



Εικόνα 18: Σχεδιάγραμμα πορείας λυοφιλίωσης ενός προϊόντος.



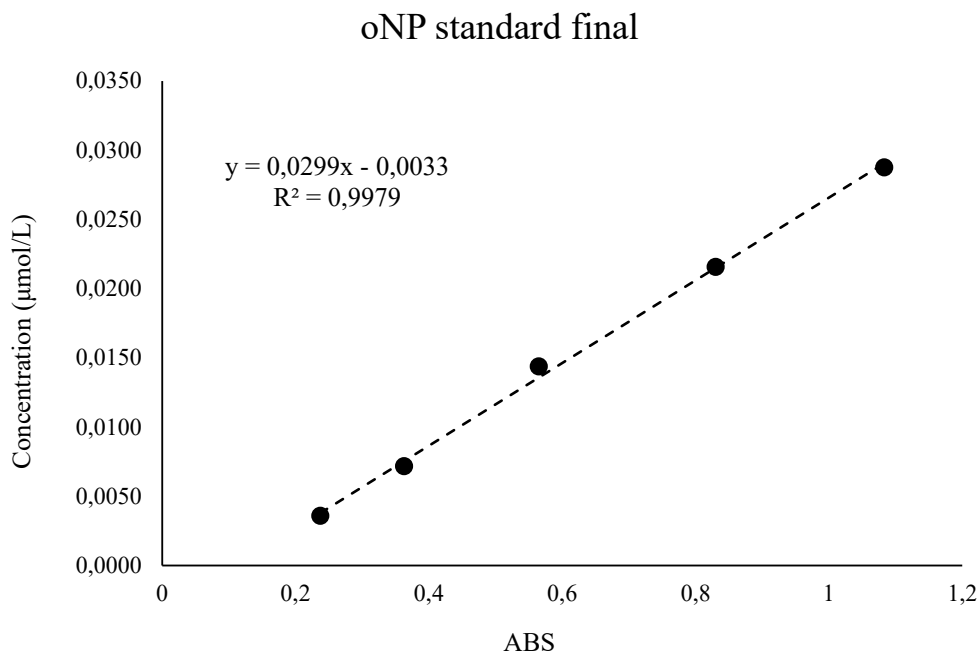
Εικόνα 19: Εικόνα εργαστηριακού λυοφιλοποιητή.

3.9 ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ MEL

Στην παρούσα μελέτη, και ειδικότερα στα πειράματα που αφορούν στην εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών χρησιμοποιήθηκαν και λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης (mannosylerythritol lipids, MEL) ως σύγκριση προς τις βιοεπιφανειοδραστικές των γαλακτικών βακτηρίων. Τα MEL παρήχθησαν από το στέλεχος *Moesziomyces antarcticus*, χρησιμοποιώντας τυρόγαλο ως θρεπτικό υπόστρωμα και προήλθαν μέσω συνεργασίας του εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων με το Πανεπιστήμιο της Λισαβώνας (Department of Bioengineering, Universidade de Lisboa). Η παραγωγή και η ανάλυση των συγκεκριμένων βιοεπιφανειοδραστικών πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα στη Λισαβόνα.

3.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

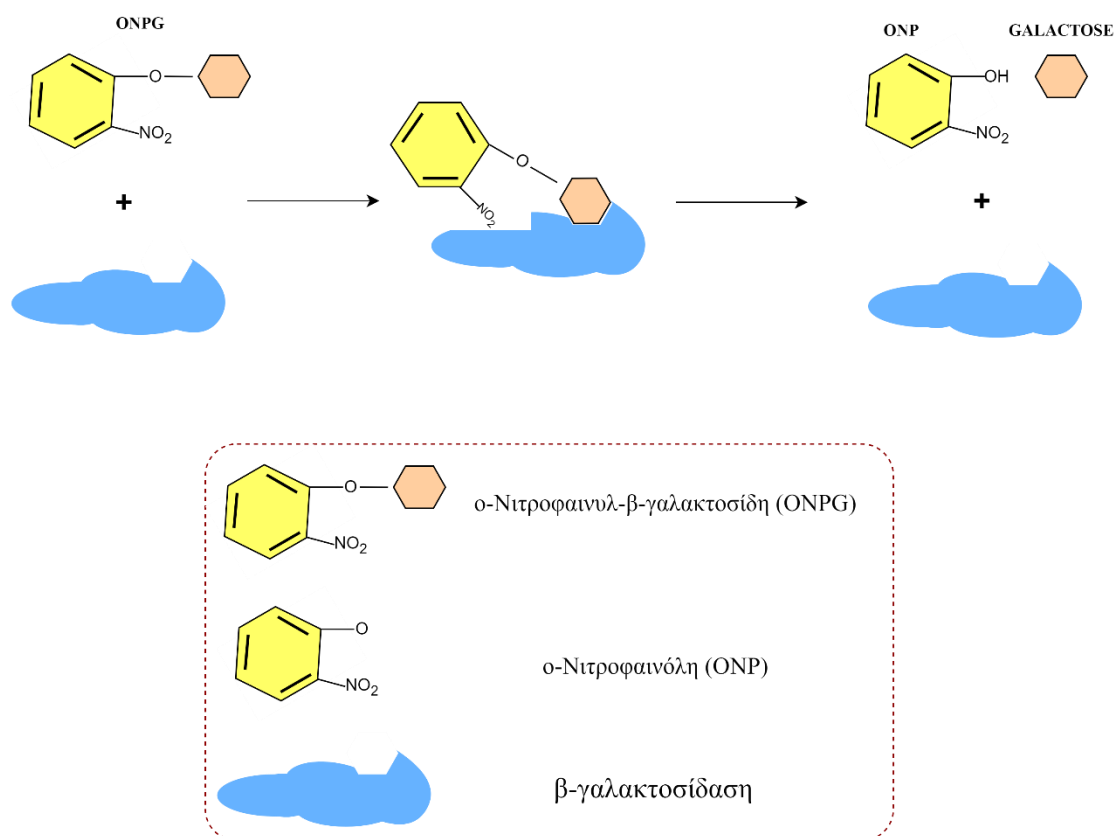
Στα στελέχη των γαλακτοβακίλλων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ζυμωμένου γάλακτος μετρήθηκε αρχικά η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης. Ειδικότερα, δείγματα συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε εκπλύθηκε δύο φορές με διάλυμα PBS και επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 6,8). Εν συνεχεία, το κυτταρικό ίζημα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (3 min), το διάλυμα που συλλέχθηκε φυγοκεντρήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η β-γαλακτοσιδάση μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους (Osman et al, 2012).



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη ο-νιτροφαινόλης (oNP)

Η συγκεκριμένη πρότυπη καμπύλη παρουσιάζει τη γραμμική σχέση μεταξύ της απορρόφησης (ABS) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (nm) και της συγκέντρωσης ($\mu\text{mol/L}$) της ο-νιτροφαινόλης (oNP) σε ένα διάλυμα.

Το μίγμα αντίδρασης αποτελείται από 250 μL διαλύματος 2-νιτροφαινυλ- β -D-γαλακτοπυρανοσίδης (20 mM) (o-NPG), 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (pH 6,8), 10 μL χλωριούχου μαγνησίου (MgCl_2) (50 mM) και 40 μL ακατέργαστου ενζύμου ώστε να γίνει η έναρξη της αντίδρασης. Η αντίδραση διεξήχθη στους 40 °C για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο και η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 500 μL ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 1 M), ακολουθούμενη από απευθείας μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm. Η μονάδα δραστηριότητας ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol ο-νιτροφαινόλης (oNP) σε ένα λεπτό που προσδιορίστηκε υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες (Osman et al, 2012).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση σε υπόστρωμα ο-Νιτροφαινυλ-β-γαλακτοσιδάση (ONPG). Τροποποιημένη εικόνα απο Gupta, M., Pandey, H., & Sivakumar, S. (2017).

3.11 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΜΩΜΕΝΟΥ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΟΣ

Διάφοροι τύποι εμπορικού ομογενοποιημένου και παστεριωμένου γάλακτος αγελάδας (πλήρες και ημιαποβουτυρωμένο) προμηθεύτηκαν από τοπική αγορά και χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ζυμωμένου γάλακτος. Σε όλα τα δείγματα η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ήταν 3,2–3,6%, το αρχικό pH ήταν $6,7 \pm 0,1$ και η περιεκτικότητα σε λιπαρά ήταν 3,7% και 1,5% για το αγελαδινό γάλα (ολόκληρο και ημιαποβουτυρωμένο αντίστοιχα) και 2,2% και 1,5% για το κατσικίσιο γάλα (ολόκληρο και ημιαποβουτυρωμένο) αντίστοιχα.

Εν συνεχεία, τα κύτταρα των γαλακτοβακίλλων που συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και εκπλύθηκαν με γάλα ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα υποστρώματος MRS πριν γίνει ο εμβολιασμός.

Η ζύμωση του ξινογάλακτος πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία τελικού όγκου 200 mL, χρησιμοποιώντας προκαλλιέργεια 10% (αρχική

συγκέντρωση κυττάρων LAB στην περιοχή από $10^8 - 10^9$ CFU mL⁻¹) στους 37 °C έως ότου το pH φτάσει <4,5. Τα βιοεπιφανειοδραστικά LAB (LAB-BS) και MEL προστέθηκαν ασηπτικά πριν από την έναρξη της διαδικασίας οξίνισης και προηγήθηκε του εμβολιασμού με την καλλιέργεια εκκίνησης στο καθορισμένο CMC. Για κάθε κατηγορία βιοεπιφανειοδραστικής ένωσης υπήρχε και διαφορετικό CMC. Όταν το ζυμωμένο γάλα έφτασε το επιθυμητό pH, ψύχθηκε ταχέως σε λουτρό νερού και αποθηκεύτηκε στους 4 °C έως και 3 εβδομάδες (Kachrimanidou, et al 2022).



Εικόνα 21: Παραγωγή οξυγάλακτος με το στέλεχος *L. pentosus* E108 και την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών.

3.12 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ποσότητας των γαλακτοβακίλλων σε κάθε στέλεχος. Η απαρίθμηση έγινε με την εφαρμογή των διαδοχικών αραιώσεων και την επίστρωση σε τρυβλία. Ειδικότερα, δέκα γραμμάρια δείγματος ομογενοποιήθηκαν με 90 mL διαλύματος Ringer και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις. Τα εναιωρήματα ενσωματώθηκαν σε τρυβλία με agar MRS και PDA (Potato Dextrose Agar) για να προσδιοριστούν οι μετρήσεις βιώσιμων κυττάρων μετά από επώαση στους 37°C για 48 και 72 ώρες αντίστοιχα. Ο αριθμός των πληθυσμών εκφράστηκε ως logCFU mL⁻¹ (Kachrimanidou, et al 2022).

3.13 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 0,1 mol L⁻¹ και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ ανά 100 g ζυμωμένου γάλακτος. Το ποσοστό συνέρεσης (% Syneresis) υπολογίστηκε με την εφαρμογή φυγοκέντρωσης. Εν συντομία, 5 g από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το ποσοστό συνέρεσης υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Syneresis (\%)} = \left(\frac{W_s}{W_g} \right) \times 100 \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

όπου W_s είναι το βάρος του υπερκειμένου μετά τη φυγοκέντρωση και W_g το συνολικό βάρος του δείγματος (Kachrimanidou et al. 2022).

3.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Microsoft Excel 2021 και οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση $\pm$ τυπική απόκλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων ασχολήθηκαν με τη μελέτη παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών από διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη επιλογής (screening) πενήντα (50) στελεχών βακτηρίων lactobacilli, και χρησιμοποιώντας διάφορες παραμέτρους, εκτιμήθηκε η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών σε συνθετικό υπόστρωμα και σε τυρόγαλο, ως ένα χαμηλού κόστους θρεπτικό μέσο. Από τη μελέτη αυτή, προέκυψε ότι η βέλτιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών προήλθε από τα στελέχη *L. fermentum* ACA 0182, *L. plantarum* (E10) και *L. pentosus* (E108) (Kachrimanidou V. et al. 2022).

Με βάση τα πρότερα αποτελέσματα, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η έρευνα επεκτάθηκε και επικεντρώθηκε σε διάφορες παραμέτρους που αφορούν στην περαιτέρω βελτιστοποίηση της ζύμωσης αλλά και τη μετέπειτα εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών. Σε πρώτο στάδιο διερευνήθηκε η επίδραση του χρόνου προκαλλιέργειας των επιλεγμένων στελεχών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε προκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (με πηγή άνθρακα γλυκόζη) και μετρήθηκε ο μικροβιακός πληθυσμός σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους με τη μέθοδο της επίστρωσης σε τριβλία.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα καταμέτρησης πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικές ώρες προκαλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

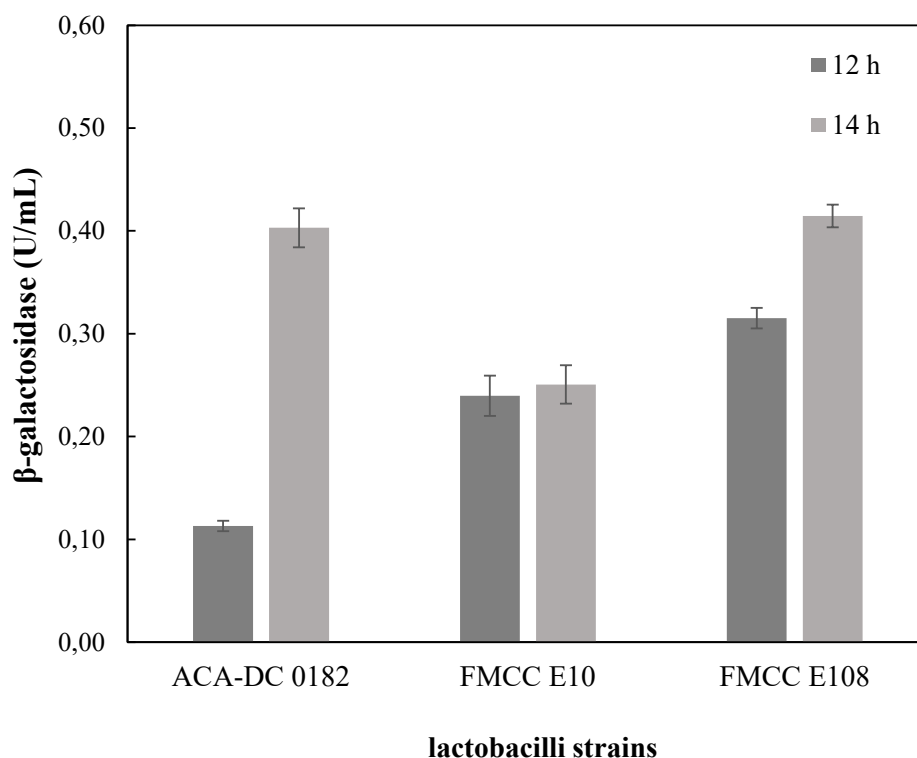
Στέλεχος	$\log_{10}\text{CFU/mL}$		
	12 h	14 h	16 h
ACA 0182	8,99±0,25	8,49±0,28	7,90±0,30
FMCC E10	9,17±0,18	9,05±0,18	8,96±0,27
FMCC E108	9,05±0,21	8,41±0,17	8,32±0,25

Όπως παρατηρείται και από τον Πίνακα 4, τα βέλτιστα αποτελέσματα για όλα τα στελέχη, επιτεύχθηκαν όταν ο χρόνος προκαλλιέργειας είναι 12 ώρες, ώστε να παραχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του εμβολίου, ενώ οι πληθυσμοί των γαλακτικών βακτηρίων κυμαίνονται σε παρόμοιο εύρος. Αντίστοιχα, και τα τρία στελέχη παρουσίασαν την ίδια πτωτική τάση στην πάροδο του χρόνου.

Παράλληλα, μείζονος σημασίας είναι και η παραγωγή ενζύμων και ειδικότερα, η παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, από τα επιλεγμένα στελέχη που παράγουν σημαντική ποσότητα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Η επιλογή του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης σχετίζεται τόσο με τη χρήση τυρογάλακτος στη διαδικασία της ζύμωσης με αγροτο-βιομηχανικά απόβλητα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών όσο και με τη μετέπειτα εφαρμογή σε προϊόντα οξυγάλακτος, καθώς και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται η λακτόζη ως υπόστρωμα. Επιπρόσθετα, κρίνεται σκόπιμο να τονιστεί ότι η εφαρμογή σε τρόφιμο της γαλακτοβιομηχανίας, θα ενισχύσει το σενάριο της κυκλικής βιοοικονομίας, καθώς οι βιοεπιφανειοδραστικές που θα παράγονται μέσω ζύμωσης σε τυρόγαλο θα εφαρμόζονται σε προϊόν της ίδιας βιομηχανίας τροφίμων.

4.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

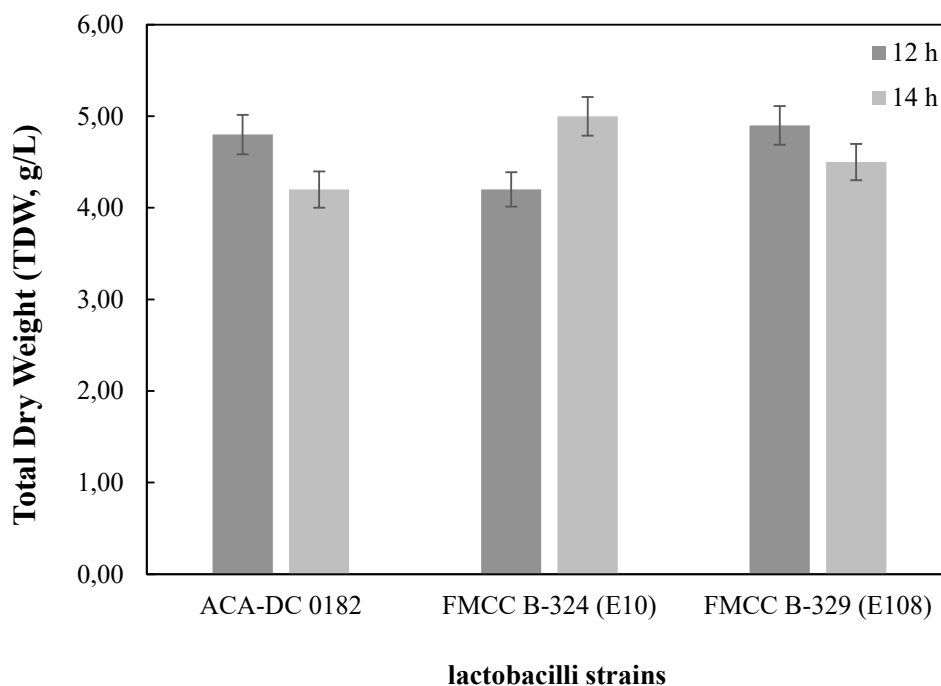
Εν συνεχεία, μετρήθηκε η παραγωγή ενζύμου καθώς και η βιομάζα (ή ολικό ξηρό βάρος, TDW) μετά από 12 και 14 ώρες προκαλλιέργειας, καθώς σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται πώς υπήρξε σημαντική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού στις 16 ώρες προκαλλιέργειας, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα.



Γράφημα 2: Παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τα στελέχη *L.fermentum* ACA-DC 0182, *L.plantarum* FMCC E10 και *L.pentosus* FMCC E108 μετά από 12 και 14 ώρες προκαλλιέργειας.

Όπως εύκολα διακρίνεται και από το γράφημα, η μεγαλύτερη παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης επιτεύχθηκε από το *L. fermentum* ACA-DC 0182 ακολουθούμενο από το στέλεχος FMCC E108, ενώ το στέλεχος FMCC E10 εμφανίζει πιο σταθερή παραγωγή του ενζύμου, χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των 12 και 14 ωρών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και τα τρία στελέχη παρουσιάζουν υψηλότερη παραγωγή ενζύμου στις 14 ώρες καλλιέργειας, όπου παρατηρείται μια μικρή πτώση στο μικροβιακό πληθυσμό (Πίνακας 4). Ειδικότερα, στο στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης σχεδόν τριπλασιάστηκε, ενώ για το στέλεχος FMCC E10 ο χρόνος προκαλλιέργειας δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή ενζύμου.

Επιπρόσθετα, μετρήθηκε και η βιομάζα (ολικό ξηρό βάρος) στις 12 και 14 ώρες της προκαλλιέργειας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο επόμενο Γράφημα.



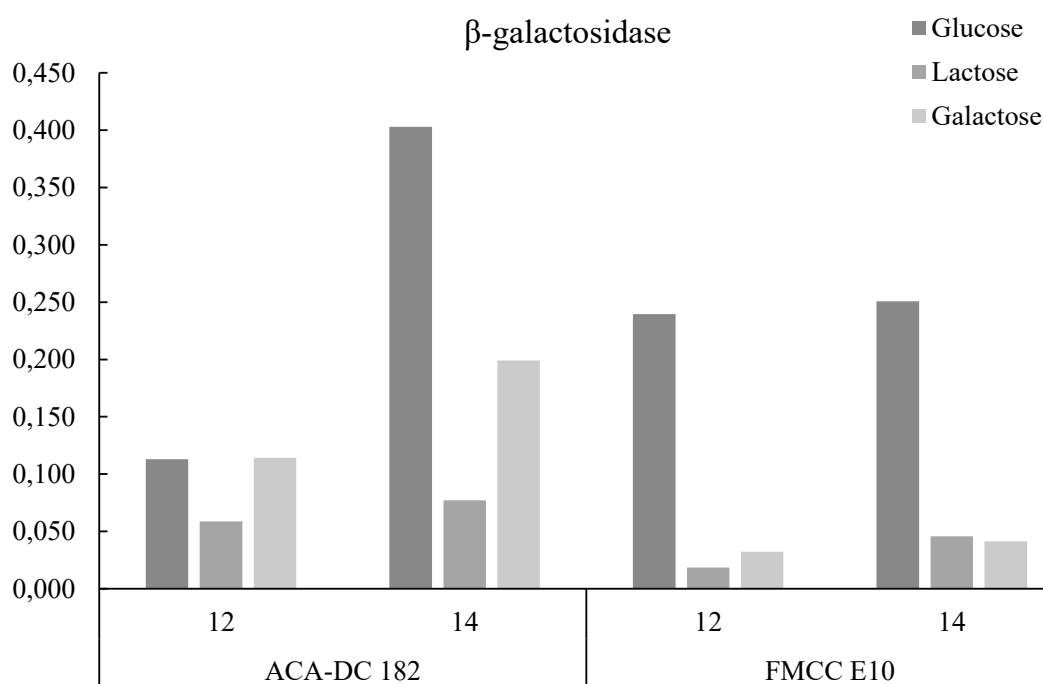
Γράφημα 3: Αποτελέσματα βιομάζας έπειτα από ξήρανση για τα στελέχη *L.fermentum* ACA-DC 0182, *L.plantarum* FMCC E10 και *L.pentosus* FMCC E108 μετά από 12 και 14 ώρες προκαλλιέργειας.

Στο παραπάνω γράφημα καταγράφονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της βιομάζας των στελεχών *L.fermentum* ACA-DC 0182, *L.plantarum* FMCC E10 και *L.pentosus* FMCC E108 μετά από 12 και 14 ώρες. Για το στέλεχος ACA 0182 παρατηρήθηκε πως στις 12 ώρες έχει υψηλή παραγωγή βιομάζας ενώ ταυτόχρονα τη μικρότερη παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τις 14 ώρες που παρατηρούνται υψηλές μετρήσεις και στις δύο παραμέτρους (Γράφημα 3). Το στέλεχος E10 στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσίασε τα υψηλότερα αποτελέσματα στις 14 ώρες ωστόσο η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης εμφανίζει μειωμένα αποτελέσματα και για τις δύο μετρήσεις (Γράφημα 3). Τέλος, για το στέλεχος E108 τη χρονική στιγμή στις 12 ώρες που εμφανίζει την υψηλότερη τιμή μέτρησης στερεών εμφανίζει μειωμένη παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης ενώ για τις 14 ώρες τα αποτελέσματα είναι αντίθετα (Γράφημα 3).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από τα **Γραφήματα 2 και 3** παρατηρείται πως υπάρχει μια αντίστροφη τάση μεταξύ του ενζύμου και της βιομάζας και για τα δυο χρονικά σημεία. Ειδικότερα, η παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης έχει υψηλότερες τιμές

στα σημεία όπου η βιομάζα μειώνεται. Σε αντίστοιχη μελέτη, διερευνήθηκε ο συσχετισμός της παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης κατά τη μικροβιακή αύξηση στα στελέχη *Bifidobacterium adolescentis* GO-12, MS-42 91-BIM, 94-BIM και *B. bifidum* No.1, LVA-3, 791 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η σύνθεση του ενζύμου ήταν υψηλότερη κατά την εκθετική φάση, το οποίο είναι αντίστροφο από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Διάφοροι παράγοντες όπως η τιμή pH, η θερμοκρασία και η πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα επηρεάζουν και σχετίζονται με την παραγωγή ενζύμου. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση λακτόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης, στην παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τα επιλεγμένα στελέχη διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία και την τιμή pH του θρεπτικού μέσου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης ήταν υψηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη σαν υπόστρωμα. Στο Γράφημα 4 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα που αφορούν τη χρήση γλυκόζης, λακτόζης και γαλακτόζης για τα δύο στελέχη.



Γράφημα 4: Παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 0182 και *L. plantarum* FMCC E10 μετά από 12 και 14 ώρες σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, τη λακτόζη και τη γαλακτόζη.

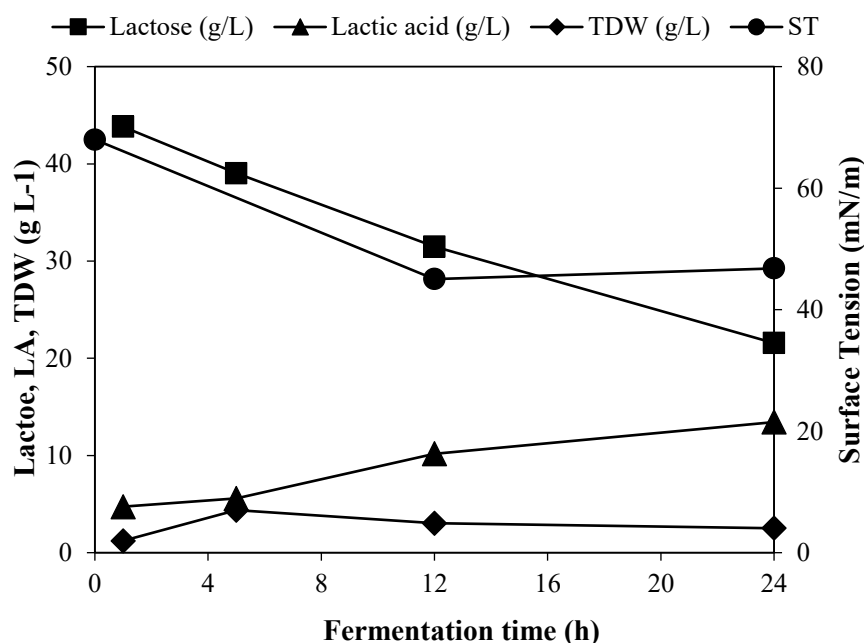
Σε μία παρόμοια μελέτη που έγινε για το στελέχος *L. fermentum*, τα αποτελέσματα έδειξαν πως καλύτερα αποτελέσματα για την ενζυμική δραστηριότητα είχε το υπόστρωμα της γαλακτόζης, μετά ακολούθησε η γλυκόζη και τέλος η λακτόζη (Mahadevaiah et al 2020). Οι Sriphannam et al (2012) απομόνωσαν και μελέτησαν διαφορετικά στελέχη από τα κόπρανα βρεφών που θήλαζαν. Επιλέχθηκε το στελέχος *L. fermentum* C33 και μελετήθηκε μεταξύ άλλων η επίδραση της πηγής άνθρακα στην παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης, χρησιμοποιώντας γλυκόζη, σορβιτόλη, γαλακτόζη, μαννόζη, κελλοβιόζη, λακτόζη και λακτιτόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η υψηλότερη παραγωγή διαφάνηκε στη λακτόζη, ενώ ο υψηλότερος μικροβιακός πληθυσμός στη μαλτόζη και στη γλυκόζη. Μάλιστα στις δυο τελευταίες περιπτώσεις, η παραγωγή ενζύμου ήταν σημαντικά χαμηλότερη (Sriphannam et al. 2012). Οι Kim & Rajagopal (2000) μελετήσανε την επίδραση της θερμοκρασίας, της τιμής pH, των σακχάρων στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης που απομονώθηκε από το υπερκείμενο του *Lactobacillus crispatus*. Η μέγιστη παραγωγή ενζύμου παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε MRS και γαλακτόζη ενώ η προσθήκη γλυκόζης παρεμπόδιζε την παραγωγή ενζύμου. Αντίστοιχα, η προσθήκη λακτόζης μαζί με τη γαλακτόζη, ανέστειλε την παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης.

Σε σύγκριση με τις τρέχουσες μελέτες, τα αποτελέσματα του γραφήματος διαφοροποιούνται με τα ευρήματα άλλων ερευνητών, υποδεικνύοντας ότι η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης εξαρτάται σημαντικά από το υπόστρωμα και το χρόνο καλλιέργειας. Οι διαφορές στη δραστηριότητα μπορεί να αποδοθούν σε διαφορές μεταξύ των στελεχών, ακόμα και όταν πρόκειται για παρόμοιο γένος και είδος, και τις συνθήκες καλλιέργειας.

4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ (LAB-BS)

Σε προηγούμενες μελέτες είχε γίνει η διαλογή των στελεχών με βασικό κριτήριο την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Kachrimanidou, V et al., 2021; Kachrimanidou, V et al. 2022). Οι καλλιέργειες έγιναν σε συνθετικά μέσα που περιέχουν γλυκόζη και στη συνέχεια σε ανανεώσιμο υπόστρωμα με αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλο (CWP) σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και τα αποτελέσματα αναφορικά με την παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης, για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 0182 και το *L. pentosus* E108 (FMCC B-329) για να μελετηθούν σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε

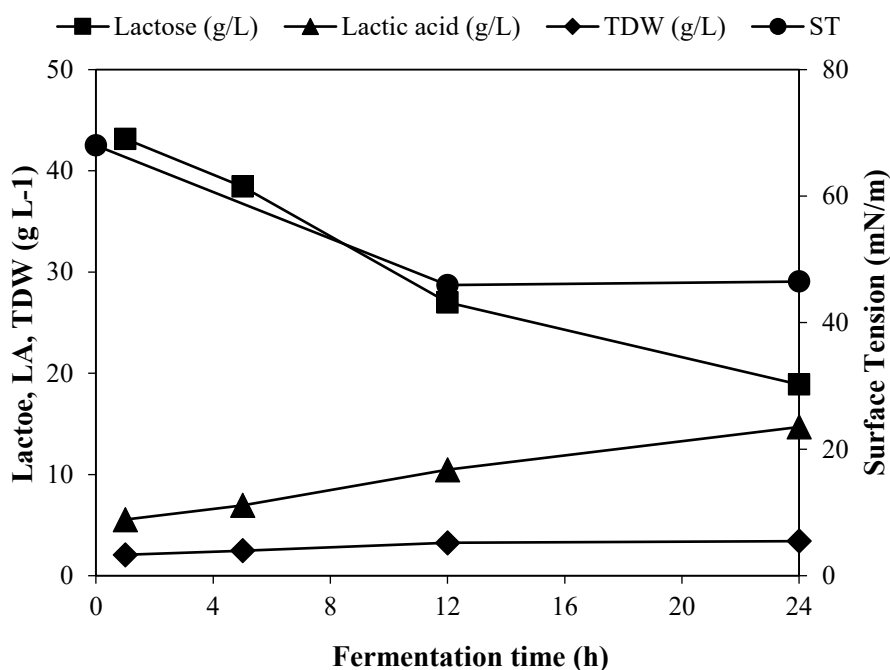
βιοαντιδραστήρες. Τα στελέχη επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης ενώ παράλληλα το στέλεχος *L. pentosus* E108 έχει χαρακτηριστεί και αναφορικά με τις προβιοτικές ιδιότητες σε *in vitro* δοκιμές γεγονός το οποίο προσφέρει τη βάση για επιπλέον μελέτη στα χαρακτηριστικά τους (Argyri et al. 2013).



Γράφημα 5a: (●) Επιφανειακή τάση (ST), (■) Λακτόζη, (▲) Γαλακτικό οξύ (LA) και (◆) Ολικό ξηρό βάρος (TDW) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων χρησιμοποιώντας CWP με το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.

Στο γράφημα 5a παρουσιάζεται η πορεία της ζύμωσης του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 0182 σε υπόστρωμα CWP. Η αρχική συγκέντρωση λακτόζης ξεκινά από ~44 g/L και μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης φτάνοντας στις 24 ώρες στα 22 g/L περίπου, συνεπώς το στέλεχος καταναλώνει τη λακτόζη που περιέχεται. Η επιφανειακή τάση στην έναρξη της ζύμωσης ήταν 68 mN/m, και στις 12 ώρες παρατηρείται μία σημαντική μείωση με τιμή περίπου στα 47 mN/m όπου και έμεινε σχετικά σταθερή μέχρι και τις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της επιφανειακής τάσης υποδεικνύουν μια μείωση της επιφανειακής τάσης ~21 mN/m, το οποίο δείχνει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Rodríguez et al. (2010), ένα στέλεχος χαρακτηρίζεται ως παραγωγός βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όταν επιφέρει μείωση της επιφανειακής τάσης >8 mN/m. Το γαλακτικό οξύ παρουσιάζει αύξηση κατά την πορεία της ζύμωσης φτάνοντας περίπου στα 13 g/L στις

24 ώρες. Τέλος, το ολικό ξηρό βάρος έχει μια σταδιακή αύξηση φτάνοντας στις 14 ώρες στα 2,5 g/L.



Γράφημα 5b: (●) Επιφανειακή τάση (ST), (■) Λακτόζη, (▲) Γαλακτικό οξύ (LA) και (◆) Ολικό ξηρό βάρος (TDW) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων χρησιμοποιώντας CWP με το στέλεχος *L. pentosus* E108.

Αντίστοιχα, στο Γράφημα 5b παρουσιάζεται η πορεία της ζύμωσης του στελέχους *L. pentosus* E108 σε υπόστρωμα CWP. Στο συγκεκριμένο, η αρχική συγκέντρωση της λακτόζης ξεκινά με ~43 g/L και μειώνεται κατά τη διάρκεια του πειράματος, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει πως και αυτό το στέλεχος καταναλώνει τη λακτόζη ενώ ταυτόχρονα παράγεται γαλακτικό οξύ. Τη χρονική στιγμή 0 η τιμή της επιφανειακής τάσης είναι 68 mN/m και κατά την πορεία της ζύμωσης μειώνεται κατά περίπου 22 mN/m έως τις 24 ώρες. Η τιμή του γαλακτικού οξέος στις 24 ώρες είναι περίπου 15 g/L. Τέλος το ολικό ξηρό βάρος παρουσιάζει σχετικά σταθερές τιμές στο συγκεκριμένο στέλεχος με αρχική τιμή στην 1 ώρα ζύμωσης 2 g/L και τελική τιμή στις 24 ώρες περίπου 3,4 g/L.

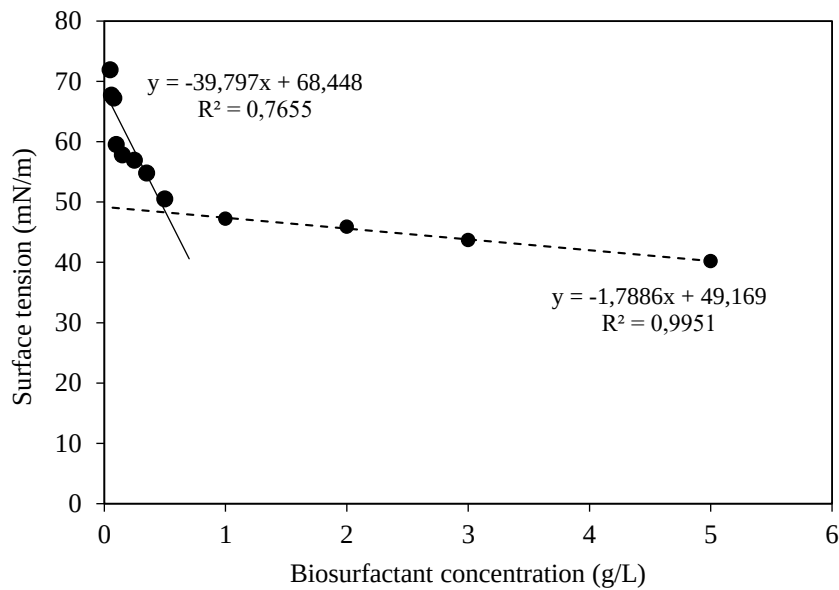
Η δυνατότητα των στελεχών *L. pentosus* και *L. fermentum* να καταναλώνουν λακτόζη και να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που συνδέονται με τα κύτταρα φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τη μείωση της επιφανειακής τάσης στις πρώτες ώρες

της ζύμωσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών λαμβάνει χώρα στην αρχική φάση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αξίζει να επισημανθεί η ανταγωνιστική σχέση που παρατηρείται μεταξύ της επιφανειακής τάσης και του γαλακτικού οξέος. Και στα δύο στελέχη όταν υπάρχει αύξηση του γαλακτικού οξέος η επιφανειακή τάση παραμένει σχετικά σταθερή, κάτι το οποίο δύναται να επηρεάζει τη σύνθεση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Συνεπώς σε επόμενο στάδιο βελτιστοποίησης της ζύμωσης, θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω ώστε να αυξηθεί η απόδοση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

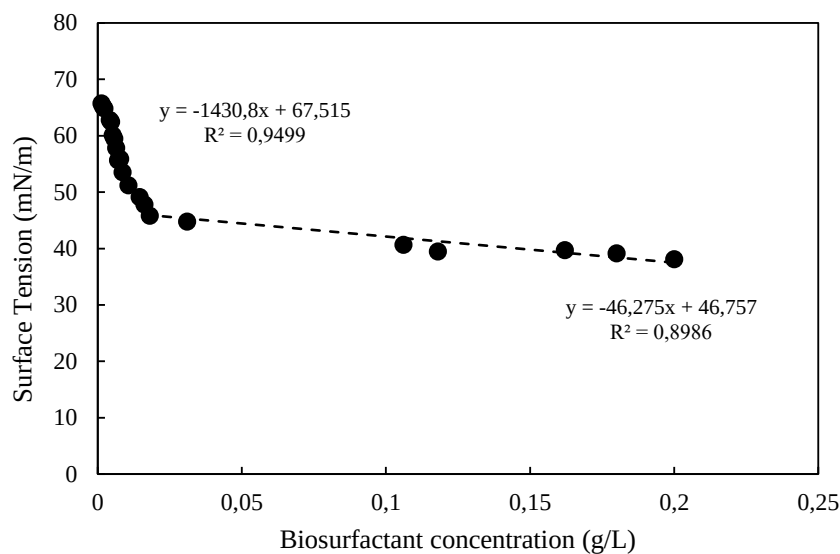
4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΚΡΙΣΙΜΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΙΚΥΛΛΙΩΝ (CMC) ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Επόμενο στάδιο της μελέτης που αφορά στην ανιούσα διεργασία (upstream processing) για την παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών, αποτέλεσε η παραλαβή και ο χαρακτηρισμός τους (downstream processing). Αφού ολοκληρώθηκε η λυοφιλίωση, γίνεται η παραλαβή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που εκχυλίστηκαν από τη βιομάζα. Από κάθε στέλεχος που μελετήθηκε, είναι καθοριστικό να μετρηθεί η κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (Critical Micelle Concentration, CMC) ώστε να αξιολογηθεί ο τελικός τους ρόλος σε μετέπειτα εφαρμογή. Για τη μέτρηση της CMC, παρασκευάστηκαν διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις βιοεπιφανειοδραστικών και μετρήθηκε η επιφανειακή τάση.

Όπως διακρίνεται και στο Γράφημα 6 και Γράφημα 7 η CMC που μετρήθηκε για τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες που παράχθηκαν από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 είναι 0,507 mg/mL ενώ για το στέλεχος *L. pentosus* E108 είναι 0,015 mg/mL. Η τιμή της CMC φαίνεται να επηρεάζεται από παράγοντες όπως το στέλεχος και το υπόστρωμα στο οποίο γίνεται η ζύμωση, τις συνθήκες ζύμωσης και τη χημική σύσταση των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Στη μελέτη των Morais et al. (2017) για τον καθορισμό του CMC των ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών που απομονώθηκαν από *L. jensenii* P_{6A} και *L. gasserii* P₆₅, οι τιμές CMC των βιοεπιφανειοδραστικών από τα P_{6A} και P₆₅ υπολογίστηκαν ως 7,1 και 8,58 mg/mL, αντίστοιχα. Συνεπώς, το στέλεχος και οι συνθήκες ζύμωσης φαίνεται ότι επηρεάζουν σημαντικά την τιμή CMC, καθώς επηρεάζεται πιθανώς και η δομή των παραγόμενων συστατικών.



Γράφημα 6: Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.



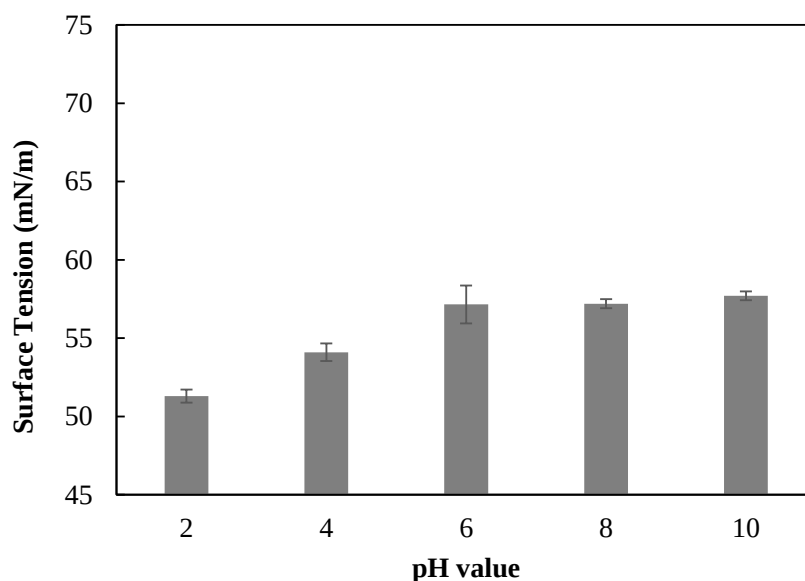
Γράφημα 7: Κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος *L. pentosus* E108.

Η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών συνδέεται στενά με την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων. Η ικανότητα μιας βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας να μπορεί να διατηρεί τις εκάστοτε ιδιότητές της υπό τις απαιτούμενες συνθήκες είναι καθοριστικής σημασίας. Η μελέτη για τη σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών έγινε στο στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 το οποίο και εξετάστηκε η

ανθεκτικότητα του σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4,60, 120°C), σε διαφορετικές τιμές pH (2,4,6,8,10) και διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (1,5,9 g/L NaCl).

Το Γράφημα 8 δείχνει την επίδραση της τιμής του pH στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182. Από την ανάλυση του γραφήματος παρατηρείται ότι σε τιμή pH 2, η επιφανειακή τάση είναι χαμηλή (~50 mN/m), υποδεικνύοντας καλή επιφανειοδραστική δράση. Καθώς το pH αυξάνεται στο 6 η επιφανειακή τάση αυξάνεται, φτάνοντας περίπου τα 55-57 mN/m, γεγονός που υποδηλώνει τη μείωση της επιφανειοδραστικής ικανότητας. Στις υψηλότερες τιμές pH (8 και 10), η επιφανειακή τάση παραμένει σχετικά σταθερή, περίπου στα 55 mN/m. Από τις μετρήσεις φαίνεται ότι η επιφανειακή δράση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών του *L. fermentum* είναι πιο αποτελεσματική σε όξινα περιβάλλοντα, ενώ σε ουδέτερες και αλκαλικές συνθήκες η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται.

Σε σχετικές μελέτες που έγιναν Sharma et al. (2015) έδειξαν πως σε pH 6-10 διατήρησε τη δραστηριότητά του με μια μικρή απόκλιση γύρω από 7. Σε άλλη περίπτωση μελέτης γαλακτοβακίλλων Morais et al., (2017) παρατηρήθηκε πως σε τιμές pH μεταξύ 2-10 διατηρείται η σταθερότητα. Επίσης, σύμφωνα με τη μελέτη των Tchakouani et al. (2024) η επιφανειακή τάση μειώθηκε ελαφρώς στο pH 6 και αυξήθηκε στο pH 8, ενώ παρέμεινε σταθερή μεταξύ των τιμών pH 4 και 8, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά. Επιπρόσθετα, σε τιμή pH 10, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα. Η ικανότητα γαλακτωματοποίησης αποτελεί μία ακόμα παράμετρο για την αξιολόγηση της σταθερότητας των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη, η σταθερότητα αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης η οποία μάλιστα αποτελεί και μία πιο αντικειμενική μέθοδο.



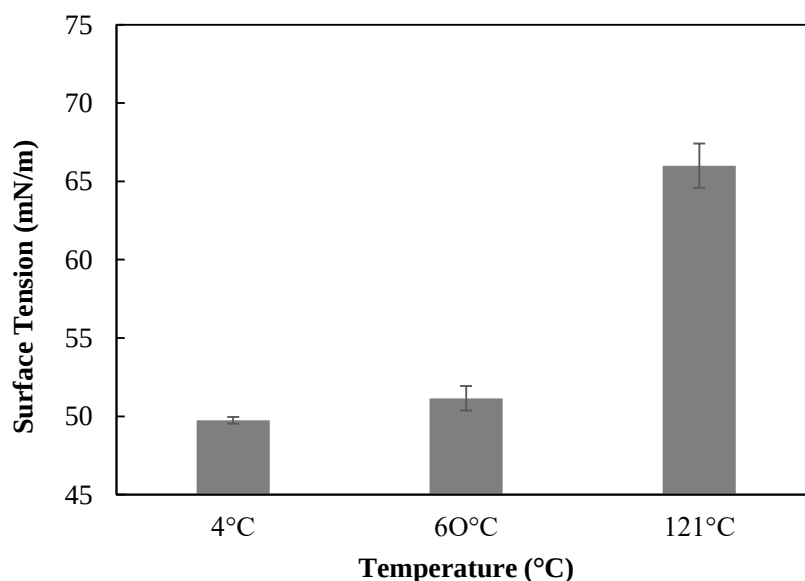
Γράφημα 8: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της τιμής του pH στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.

Το Γράφημα 9 δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182. Στη χαμηλή θερμοκρασία των 4°C, η επιφανειακή τάση είναι περίπου 50 mN/m, υποδεικνύοντας ότι διατηρείται η δράση της βιοεπιφανειοδραστικής. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 60°C, η επιφανειακή τάση αυξάνεται ελαφρώς, φτάνοντας περίπου τα 55 mN/m, γεγονός που δείχνει μια μικρή μείωση της επιφανειοδραστικής ικανότητας. Τέλος, στη θερμοκρασία των 121°C, η επιφανειακή τάση αυξάνεται σημαντικά, φτάνοντας περίπου τα 65-70 mN/m. Αυτό υποδηλώνει ότι σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες η επιφανειοδραστική δράση μειώνεται σημαντικά. Συνολικά, η επιφανειακή τάση αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που υποδεικνύει μείωση της αποτελεσματικότητας των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επιδράσει στη δομή (λ.χ. των πρωτεϊνών και των λιπιδίων) και να οδηγήσει στην αποσταθεροποίηση των μικυλλίων επηρεάζοντας τη σταθερότητα.

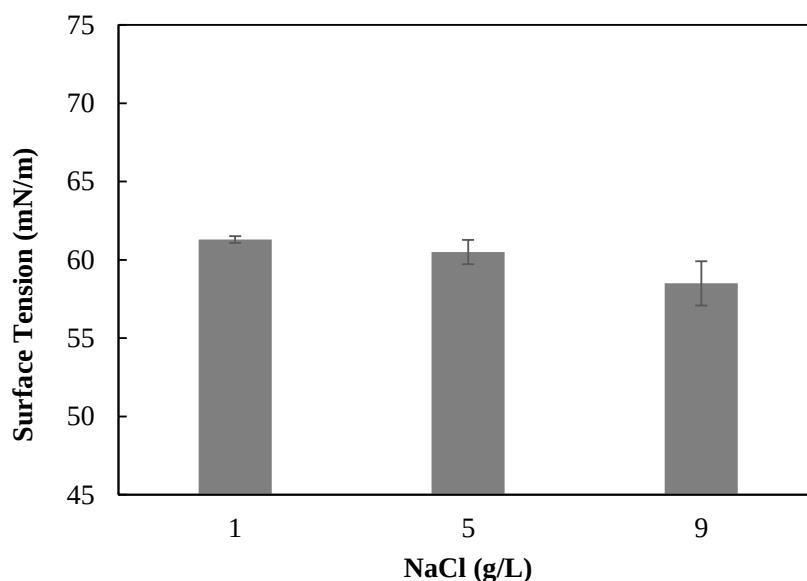
Η μελέτη των Tchakouani et al. (2024) αναφέρει ότι η επιφανειακή δραστηριότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα *L. brevis* S4 και *L. plantarum* S5 παρέμεινε σταθερή μετά από θερμική επεξεργασία στους 25 και 50°C

για 15 λεπτά, αλλά αυξήθηκε σημαντικά στους 100 και 121°C. Οι θερμικές επεξεργασίες στους 25 και 50°C για 15 λεπτά και η αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121°C για 15 λεπτά δεν έδειξαν σημαντική επίδραση στη γαλακτωματοποιητική δράση του *L. brevis* S4.

Αντίθετα, στο *L. plantarum* S5, η θερμική επεξεργασία στους 50 και 100°C μείωσε τη γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα, αλλά η αποστείρωση σε αυτόκαυστο την αύξησε σημαντικά. Συμπεραίνουν, πως αυτές οι αλλαγές πιθανώς οφείλονται σε δομικές μεταβολές που συμβαίνουν σε υψηλές θερμοκρασίες, βελτιώνοντας τις ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών. Στη μελέτη των Morais et al. (2017) παρατηρήθηκε ότι τα βιοεπιφανειοδραστικά που παράγονται από τα *L. jensenii* P_{6A} και *L. gasserii* P₆₅ παρέμειναν σταθερά μετά από επώαση για 60 λεπτά στους 100°C, χωρίς απώλεια δραστηριότητας.



Γράφημα 9: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της θερμοκρασίας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.



Γράφημα 10: Δοκιμή σταθερότητας για την επίδραση της τιμής της αλατότητας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.

Το Γράφημα 10 παρουσιάζει την επίδραση της αλατότητας (συγκέντρωση NaCl g/L) στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράχθηκαν από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182. Όπως παρατηρείται στη συγκέντρωση 1 g/L NaCl, η επιφανειακή τάση είναι λίγο πάνω από τα 60 mN/m. Αυξάνοντας την αλατότητα στα 5 g/L NaCl, η επιφανειακή τάση παραμένει περίπου στο ίδιο επίπεδο, με μια μικρή μείωση, ενώ στα 9 g/L NaCl, η επιφανειακή τάση μειώνεται περαιτέρω, πλησιάζοντας περίπου τα 58 mN/m. Αυτό υποδηλώνει ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl οδηγούν σε μείωση της επιφανειακής τάσης, κάτι που μπορεί να δείχνει μια πιθανή επίδραση της αλατότητας στη σταθερότητα ή την αποτελεσματικότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182.

4.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΜΟΥΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *L. FERMENTUM* ACA-DC 0182

Το τελικό στάδιο της παρούσας μελέτης ασχολήθηκε με την αξιολόγηση της εφαρμογής των βιοεπιφανειοδραστικών για την παραγωγή ζυμώμενου γάλακτος (fermented milk). Χρησιμοποιήθηκαν οι βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 (εφεξής LAB-BS) καθώς επίσης και επιφανειοδραστικές τύπου MEL, οι οποίες προήλθαν από ζύμωση στελέχους ζύμης σε τυρόγαλο (σε συνεργασία με πανεπιστημιακό φορέα από την Πορτογαλία). Για την παραγωγή του οξυγάλακτος χρησιμοποιήθηκε γάλα πλήρες λιπαρών καθώς και χαμηλών λιπαρών. Στους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στο μικροβιακό πληθυσμό, στο ποσοστό συνέρεσης και στην ολική τιτλοδοτούμενη οξύτητα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μετά το πέρας της οξίνισης και πριν την έναρξη της αποθήκευσης (Day 0) οι μικροβιακοί πληθυσμοί κυμαίνονται σε αντίστοιχα επίπεδα σε όλες τις περιπτώσεις που συμπεριλήφθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό. Ωστόσο, μετά από 20 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία 4°C, εύκολα παρατηρείται ότι η προσθήκη των LAB-BS επέδρασε θετικά στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού. Αντίστοιχα, η προσθήκη των MEL επέφερε μείωση στο μικροβιακό πληθυσμό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, παρά το γεγονός ότι στην περίπτωση των MEL παρουσιάστηκε το χαμηλότερο ποσοστό συνέρεσης. Το ποσοστό συνέρεσης ήταν υψηλότερο στην περίπτωση που προστέθηκαν LAB-BS, ανεξάρτητα από τον τύπο του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο, εύκολα παρατηρείται ότι το γάλα χαμηλών λιπαρών παρουσίασε υψηλότερα ποσοστά συνέρεσης σε σύγκριση με το γάλα πλήρες λιπαρών, το οποίο δικαιολογείται στην απουσία λίπους του γάλακτος.

Πίνακας 5: Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αλλαγές κατά την ψυχρή αποθήκευση ζυμωμένου γάλακτος που παρασκευάστηκε με το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 0182 σε πλήρες και ημιάπαχο αγελαδινό γάλα, καθώς και ζυμωμένου γάλακτος με ανακύκλωση κυττάρων, με ή χωρίς την προσθήκη γαλακτοβακίλλων και βιοεπιφανειοδραστικών του *Moesziomyces*.

Type of fermented milk		log ₁₀ CFU/mL		Syneresis (%) ^o		Titratable acidity (lactic acid/100 g fermented product)	
<i>Whole cow milk</i>	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	
Control	8.68 ± 0.21	9.28 ± 0.14	51.57 ± 0.48%	57.18 ± 1.36%	0.59 ± 0.04	0.72 ± 0.04	
LAB-BS	8.71 ± 0.18	9.58 ± 0.13	52.31 ± 0.90%	59.89 ± 1.16%	0.61 ± 0.03	0.79 ± 0.05	
MEL	8.69 ± 0.14	8.95 ± 0.14	48.47 ± 0.73%	55.35 ± 1.26%	0.55 ± 0.02	0.64 ± 0.03	
<i>Semi skimmed cow milk</i>	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	
Control	8.31 ± 0.09	8.60 ± 0.14	53.53 ± 1.95%	61.79± 1.72%	0.48 ± 0.04	0.61 ± 0.06	
LAB-BS	8.34 ± 0.11	8.69 ± 0.12	55.00 ± 1.27%	65.94 ± 1.68%	0.53 ± 0.05	0.66 ± 0.04	
MEL	8.28 ± 0.08	8.58 ± 0.14	51.90 ± 1.29%	58.13 ± 1.31%	0.46 ± 0.05	0.57 ± 0.03	
<i>Cell recycling</i>							
<i>whole cow milk</i>	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	Day 0	Day 20	
Control	8.02 ± 0.09	8.14 ± 0.14	34.75 ± 1.87%	42.01 ± 1.12%	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.04	
LAB-BS	8.07 ± 0.13	8.38 ± 0.13	36.32 ± 1.26%	43.12 ± 0.71%	0.34 ± 0.02	0.43 ± 0.02	
MEL	8.01 ± 0.13	8.09 ± 0.12	34.40 ± 1.04%	41.68 ± 1.34%	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	

Στο τελευταίο στάδιο της μελέτης, και με στόχο την ενίσχυση της κυκλικότητας της διεργασίας πραγματοποιήθηκε η ανακύκλωση κυττάρων των γαλακτικών βακτηρίων, από τα οποία είχαν εκχυλιστεί οι βιοεπιφανειοδραστικές. Στην περίπτωση αυτή, μετά την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από τα κύτταρα, τα κύτταρα ξηράνθηκαν μέσω της λυοφιλίωσης, και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως εναρκτήρια καλλιέργεια για την παραγωγή οξυγάλακτος (ως αντικατάσταση της προκαλλιέργειας, με γνώμονα το σχεδιασμό μιας διεργασίας χωρίς απόβλητα).

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί των γαλακτικών βακτηρίων ήταν χαμηλότεροι κατά την έναρξη της αποθήκευσης (ήτοι μετά το πέρας της οξίνισης), ωστόσο παρατηρήθηκε μία αύξηση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η προσθήκη των MEL οδήγησε στη χαμηλότερη συγκέντρωση μικροβιακού πληθυσμού, υποδεικνύοντας ένα μειονέκτημα για τον πληθυσμό των προβιοτικών βακτηρίων, δεδομένου ότι η παρατεταμένη αποθήκευση θα επιφέρει πρόσθετη μείωση στο πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων.

Παρά το γεγονός ότι η ανακύκλωση κυττάρων παρουσίασε χαμηλότερο μικροβιακό πληθυσμό σε σύγκριση με τα προηγούμενα πειράματα, καθώς και χαμηλότερη οξύτητα, αποτελεί μείζονος σημασίας το γεγονός ότι προτάθηκε μια εφαρμογή για την επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων. Μάλιστα, είναι πιθανό ότι ο συνδυασμός των LAB-BS με τα κύτταρα του συγκεκριμένου στελέχους από το οποίο προήλθαν να παρουσιάζει συνεργιστική επίδραση στη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού κατά την αποθήκευση.



Εικόνα 22: ACA 182- Πλήρες και Αποβουτυρωμένο (Control-MEL-LAB-BS).

Εν κατακλείδι, η καινοτομία έγκειται στο γεγονός ότι επί του παρόντος, δεν υφίσταται άλλη μελέτη κατά την οποία, τα βακτηριακά κύτταρα μετά την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών χρησιμοποιούνται εκ νέου. Μάλιστα, πρόσθετο πλεονέκτημα αποτελεί ότι μελετήθηκε εφαρμογή της βιομηχανίας τροφίμων, και ειδικότερα στην ίδια παραγωγική αλυσίδα από την οποία προήλθαν τα απόβλητα (ήτοι το τυρόγαλο). Συνεπώς η προτεινόμενη διεργασία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ανάδειξη της κυκλικής βιο-οικονομίας για τη βιομηχανία τροφίμων σε συνδυασμό με την παραγωγή τροφίμων με λειτουργικές ιδιότητες (λ.χ. προβιοτικά).



Εικόνα 23: Παραγωγή οξυγάλακτος με το στέλεχος *L. fermentum* ACA 0182 και την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών (Day 0).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιώντας το τυρόγαλο ως χαμηλού κόστους θρεπτικό υπόστρωμα και την εφαρμογή τους σε προϊόντα τροφίμων στα πλαίσια σχεδιασμού μιας ολιστικής βιοδιεργασίας. Με βάση τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας τεκμαίρονται τα εξής:

- Ο βέλτιστος χρόνος προκαλλιέργειας για όλα τα στελέχη είναι οι 12 ώρες, με έμφαση στα *L. fermentum* ACA-DC 0182 και *L. pentosus* E108 ενώ, παρουσίασαν σταδιακή μείωση στην παραγωγή βιομάζας μετά από 16 ώρες.
- Η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης ήταν υψηλότερη μετά από 14 ώρες, με το *L. fermentum* να παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα.
- Τα στελέχη παρουσίασαν αντίστροφη σχέση μεταξύ βιομάζας και ενζύμου, με την ενζυμική δραστηριότητα να αυξάνεται καθώς η βιομάζα μειώνεται.
- Τα στελέχη *L. fermentum* και *L. pentosus* έδειξαν ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου.
- Η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών επηρεάζεται από το pH, τη θερμοκρασία και την αλατότητα, με καλύτερη απόδοση σε όξινα περιβάλλοντα και χαμηλές θερμοκρασίες.
- Τα βιοεπιφανειοδραστικά βελτίωσαν τη διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού στο ζυμώμενο γάλα.
- Η προσθήκη MEL παρουσίασε βελτίωση στα ποσοστά συνέρεσης του οξυγάλακτος,
- Η επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων μετά την εκχύλιση των κυτταρικά συνδεδεμένων βιοεπιφανειοδραστικών παρουσίασε μια αειφόρα προοπτική για τη γαλακτοβιομηχανία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd El-malek, F., Khairy, H., Farag, A., & Omar, S. (2020). The sustainability of microbial bioplastics, production and applications. *International journal of biological macromolecules*, 157, 319-328.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020329317>
- Abdel-Mawgoud, Ahmad Mohammad, François Lépine, and Eric Déziel. "Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles." *Applied microbiology and biotechnology* 86 (2010): 1323-1336.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Abdel-Mawgoud, Ahmad Mohammad, Mohammad Mabrouk Aboulwafa, and Nadia Abdel-Haleem Hassouna. "Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150 (2008): 289-303.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-008-8153-z>
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., ur Rahman, U., Soares, B. C., Souza, S. L., ... & Cruz, A. G. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 361-372.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418309208>
- Al-Tawaha, Rahman, and Chen Meng. "Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review." *Adv. Environ. Biol* 12 (2018): 16-27. https://www.researchgate.net/profile/Abdel-Rahman-Al-Tawaha/publication/323918051_Potential_benefits_of_Lactobacillus_plantarum_as_probiotic_and_its_advantages_in_human_health_and_industrial_applications_A_review/links/5abf6776aca27222c75840a5/Potential-benefits-of-Lactobacillus-plantarum-as-probiotic-and-its-advantages-in-human-health-and-industrial-applications-A-review.pdf
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2), 282-291.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002298>

Arutchelvi, J. I., Bhaduri, S., Uppara, P. V., & Doble, M. (2008). Mannosylerythritol lipids: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1559-1570. <https://academic.oup.com/jimb/article/35/12/1559/5993805>

Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5, 697. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00697/full>

Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5, 697. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00697/full>

Barba, Francisco J. "An integrated approach for the valorization of cheese whey." *Foods* 10.3 (2021): 564. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/564>

Barbosa, Jhonatas Rodrigues, et al. "Characterization and screening of biosurfactants from microorganisms with a wide application in food industries." *Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector*. Academic Press, 2023. 449-458. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128242834000101>

Bhattacharya, Bireswar, Tarun Kanti Ghosh, and Nilimanka Das. "Application of bio-surfactants in cosmetics and pharmaceutical industry." *Sch. Acad. J. Pharm* 6.7 (2017): 320-329. https://www.researchgate.net/profile/Bireswar-Bhattacharya/publication/359932157_Application_of_Bio-Surfactants_in_Cosmetics_and_Pharmaceutical_Industry/links/62573313709c5c2adb786afa/Application-of-Bio-Surfactants-in-Cosmetics-and-Pharmaceutical-Industry.pdf

Bigdeloo, M., Teymourian, T., Kowsari, E., Ramakrishna, S., & Ehsani, A. (2021). Sustainability and circular economy of food wastes: Waste reduction strategies, higher recycling methods, and improved valorization. *Materials Circular Economy*, 3, 1-9. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42824-021-00017-3>

Bustamante, Mariela, Nelson Duran, and M. C. Diez. "Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review." *Journal of soil science and plant*

nutrition 12.4 (2012): 667-687. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-95162012000400004&script=sci_arttext&tlng=en

Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108. <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.1796>

Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P., & Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1383-1394. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4440-2>

Carus, Michael, and Lara Dammer. "The circular bioeconomy—concepts, opportunities, and limitations." *Industrial biotechnology* 14.2 (2018): 83-91. <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ind.2018.29121.mca?journalCode=ind>

Chowdhury, S., Rakshit, A., Acharjee, A., & Saha, B. (2019). Novel amphiphiles and their applications for different purposes with special emphasis on polymeric surfactants. *ChemistrySelect*, 4(23), 6978-6995. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/slct.201901160>

Ciervo, Margherita. "Innovating for sustainable growth. A bioeconomy for Europe. Un punto di vista geografico-economico critico." *Gnosis. Rivista Italiana di Intelligence*. Vol. 3. Agenzia Informazioni e Sicurezza Interna, 2018. 222-233. <https://fair.unifg.it/handle/11369/389936>

Colombo, B., Sciarria, T. P., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource technology*, 218, 692-699. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416309889>

Das, Deeplina, and Arun Goyal. "Lactic acid bacteria in food industry." *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology* (2012): 757-772. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-2214-9_33

Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Berenjian A, Ghasemi Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and

Clinical Applications. Foods. 2019 Mar 9;8(3):92.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463098/>

de Andrade, C. J., Coelho, A. L., Feuser, P. E., de Andrade, L. M., Carciofi, B. A., & de Oliveira, D. (2022). Mannosylerythritol lipids: production, downstream processing, and potential applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 77, 102769.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166922001033>

Drakontis, Constantina Eleni, and Samiul Amin. "Biosurfactants: Formulations, properties, and applications." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 48 (2020): 77-90.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029420300297#bbib6>

Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., ... & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp_1), S27-S48.
https://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp_1/S27/3902999

Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J., & Banat, I. M. (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 617-627.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.200900162>

Galanakis, Charis M., ed. *Food waste recovery: processing technologies and industrial techniques*. Academic Press, 2015.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412000532>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502. <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.75>

Guildner, L. A., Johnson, D. P., & Jones, F. E. (1976). Vapor Pressure of Water at Its Triple Point. *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and chemistry*, 80A(3), 505-521.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293355/>

- Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., Graça, J. S., Esmerino, E. A., ... & Cruz, A. G. (2020). Impact of probiotics and prebiotics on food texture. *Current Opinion in Food Science*, 33, 38-44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799319301316#sec0020>
- Hausjell, J., Miltner, M., Herzig, C., Limbeck, A., Saracevic, Z., Saracevic, E., ... & Spadiut, O. (2019). Valorisation of cheese whey as substrate and inducer for recombinant protein production in *E. coli* HMS174 (DE3). *Bioresource Technology Reports*, 8, 100340. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X19302300>
- Hotel, Amerian Córdoba Park, and A. Cordoba. "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria." *Prevention* 5.1 (2001): 1-10. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- ISO, ISO. "6060: 1989-Water Quality–Determination of the Chemical Oxygen Demand." <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6060:ed-2:v1:en:sec:10>.
- Janek, T., Krasowska, A., Czyżnikowska, Ż., & Łukaszewicz, M. (2018). Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: an experimental and computational approach. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2441. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02441/full>
- Jin, X., Streett, D. A., Dunlap, C. A., & Lyn, M. E. (2008). Application of hydrophilic–lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 46(2), 226-233. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408000674>
- Jurášková, Dominika, Susana C. Ribeiro, and Celia CG Silva. "Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties." *Foods* 11.2 (2022): 156. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/2/156>
- Jurgilevich, A., Birge, T., Kentala-Lehtonen, J., Korhonen-Kurki, K., Pietikäinen, J., Saikku, L., & Schösler, H. (2016). Transition towards circular economy in the food system. *Sustainability*, 8(1), 69. <https://www.mdpi.com/2071-1050/8/1/69>
- Kachrimanidou, V., Alimpoumpa, D., Papadaki, A., Lappa, I., Alexopoulos, K., & Kopsahelis, N. (2022). Cheese whey utilization for biosurfactant production:

Evaluation of bioprocessing strategies using novel *Lactobacillus* strains. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(10), 4621-4635. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-022-02767-9>

Kachrimanidou, V., Alimpoumpa, D., Papadaki, A., Lappa, I., Alexopoulos, K., & Kopsahelis, N. (2022). Cheese whey utilization for biosurfactant production: Evaluation of bioprocessing strategies using novel *Lactobacillus* strains. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(10), 4621-4635. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-022-02767-9>

Kachrimanidou, V., Papadaki, A., Lappa, I. *et al.* Biosurfactant Production from *Lactobacilli*: an Insight on the Interpretation of Prevailing Assessment Methods. *Appl Biochem Biotechnol* **194**, 882–900 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03686-7>

Kachrimanidou, V., Papadaki, A., Lappa, I., Papastergiou, S., Kleisiari, D., & Kopsahelis, N. (2022). Biosurfactant production from *lactobacilli*: an insight on the interpretation of prevailing assessment methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03686-7>

Kachrimanidou, V.; Alexandri, M.; Nascimento, M.F.; Alimpoumpa, D.; Torres Faria, N.; Papadaki, A.; Castelo Ferreira, F.; Kopsahelis, N. *Lactobacilli* and *Moesziomyces* Biosurfactants: Toward a Closed-Loop Approach for the Dairy Industry. *Fermentation* 2022, 8, 517. <https://www.mdpi.com/2311-5637/8/10/517#B32-fermentation-08-00517>

Kim, J.-W., & Rajagopal, S. N. (2000). Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica*, 45(1), 29–34. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02817446>

Kitamoto, Dai, Hiroko Isoda, and Tadaatsu Nakahara. "Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants—from energy-saving materials to gene delivery carriers—." *Journal of bioscience and bioengineering* 94.3 (2002): 187-201. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16233292/>

Kralova, I., & Sjöblom, J. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), (2009): 1363–1383. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690902735561>

Lee, J. K., Patel, S. K. S., Sung, B. H., & Kalia, V. C. (2020). Biomolecules from municipal and food industry wastes: an overview. *Bioresource technology*, 298, 122346. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419315767>

Lie, S. "The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen." *Journal of the Institute of Brewing* 79.1 (1973): 37-41. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>

Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., & Stanton, C. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Frontiers in microbiology*, 8, 846. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00846/full>

Mahadevaiah, S., Basavaiah, R., Parida, M., & Batra, H. V. (2020). Optimal production of β -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides (GOS). *J Pure Appl Microbiol*, 14(4), 2769-2780. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/81920802/43244-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/81920802/43244-libre.pdf?1646814832=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DOptimal_Production_of__Galactosidase_fr.pdf&Expires=1713463141&Signature=VuMyJQxsZF~XJMkmE8ACI92pIi3o8RZCFSKcfNIIkz5V~c8YFEHtxVdWqc9Me~p2hwa0GIkuOeAT~bKkQq6a~DhDVCOFhykTGZgalApK8wgx3Qo9DWxm4vpkMk7CWY7sXmZb8mtK7hIzL8IAXfTLBfp5rTZUFGPIJntOgN943S-yhPNfKMnG6Qk0GlvqGRI8eWWaQPCM5mt1UPAuffoJel0i~EhAX80YKsVBNhYlKdAlvDcXV8i3TkYc7c3k0iHN7i~AdSXFDS6Whkk3WY3SzK-MSW3PatmauaDoWC~2sEVvfonMRStJeuCnhi~RDIZZMJJoYHQxsGJI6dB-LqgeAg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

[libre.pdf?1646814832=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DOptimal_Production_of__Galactosidase_fr.pdf&Expires=1713463141&Signature=VuMyJQxsZF~XJMkmE8ACI92pIi3o8RZCFSKcfNIIkz5V~c8YFEHtxVdWqc9Me~p2hwa0GIkuOeAT~bKkQq6a~DhDVCOFhykTGZgalApK8wgx3Qo9DWxm4vpkMk7CWY7sXmZb8mtK7hIzL8IAXfTLBfp5rTZUFGPIJntOgN943S-yhPNfKMnG6Qk0GlvqGRI8eWWaQPCM5mt1UPAuffoJel0i~EhAX80YKsVBNhYlKdAlvDcXV8i3TkYc7c3k0iHN7i~AdSXFDS6Whkk3WY3SzK-MSW3PatmauaDoWC~2sEVvfonMRStJeuCnhi~RDIZZMJJoYHQxsGJI6dB-LqgeAg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/81920802/43244-libre.pdf?1646814832=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DOptimal_Production_of__Galactosidase_fr.pdf&Expires=1713463141&Signature=VuMyJQxsZF~XJMkmE8ACI92pIi3o8RZCFSKcfNIIkz5V~c8YFEHtxVdWqc9Me~p2hwa0GIkuOeAT~bKkQq6a~DhDVCOFhykTGZgalApK8wgx3Qo9DWxm4vpkMk7CWY7sXmZb8mtK7hIzL8IAXfTLBfp5rTZUFGPIJntOgN943S-yhPNfKMnG6Qk0GlvqGRI8eWWaQPCM5mt1UPAuffoJel0i~EhAX80YKsVBNhYlKdAlvDcXV8i3TkYc7c3k0iHN7i~AdSXFDS6Whkk3WY3SzK-MSW3PatmauaDoWC~2sEVvfonMRStJeuCnhi~RDIZZMJJoYHQxsGJI6dB-LqgeAg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

Manga, E. B., Celik, P. A., Cabuk, A., & Banat, I. M. (2021). Biosurfactants: Opportunities for the development of a sustainable future. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 56, 101514. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029421000984#sec6>

Manga, E. B., Celik, P. A., Cabuk, A., & Banat, I. M. (2021). Biosurfactants: Opportunities for the development of a sustainable future. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 56, 101514. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029421000984#sec6>

Moldes AB, Rodríguez-López L, Rincón-Fontán M, López-Prieto A, Vecino X, Cruz JM. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(5):2371. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2371>

Moldes, A.B.; Rodríguez-López, L.; Rincón-Fontán, M.; López-Prieto, A.; Vecino, X.; Cruz, J.M. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2371. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2371>

Moldes, A.B.; Rodríguez-López, L.; Rincón-Fontán, M.; López-Prieto, A.; Vecino, X.; Cruz, J.M. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2371. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2371>

Moldes, Ana B., et al. "Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview." *International Journal of Molecular Sciences* 22.5 (2021): 2371. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2371>

Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., ... & Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P 6A and *Lactobacillus gasseri* P 65. *Microbial cell factories*, 16, 1-15. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-017-0769-7#citeas>

Morais, I.M.C., Cordeiro, A.L., Teixeira, G.S. et al. Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65 . *Microb Cell Fact* 16, 155 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0769-7>

Moreno-Camacho, C. A., Montoya-Torres, J. R., Jaegler, A., & Gondran, N. (2019). Sustainability metrics for real case applications of the supply chain network design problem: A systematic literature review. *Journal of cleaner production*, 231, 600-618. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652619318141>

Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2015). Mannosylerythritol lipids: production and applications. *Journal of Oleo Science*, 64(2), 133-141. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25748373/>

- Mukisa, I. M., Byaruhanga, Y. B., Muyanja, C. M., Langsrud, T., & Narvhus, J. A. (2017). Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from Obushera, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food science & nutrition*, 5(3), 702-712. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5448335/>
- Mulligan, Catherine N. "Environmental applications for biosurfactants." *Environmental pollution* 133.2 (2005): 183-198. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749104002702>
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B. S., & Drider, D. (2020). *Lactobacillus fermentum*: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(20), 3387-3399. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31729242/>
- NASCIMENTO, Miguel Figueiredo, et al. *Moesziomyces* spp. cultivation using cheese whey: new yeast extract-free media, β -galactosidase biosynthesis and mannosylerythritol lipids production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022, 1-14. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-022-02837-y>
- NITSCHKE, Marcia; COSTA, SGVAO. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18.5: 252-259. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224407000362#sec2>
- Nowak D, Jakubczyk E. The Freeze-Drying of Foods-The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods*. 2020;9(10):1488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7603155/>
- Osman, A., Tzortzis, G., Rastall, R. A., & Charalampopoulos, D. (2012). BbgIV Is an Important *Bifidobacterium* β -Galactosidase for the Synthesis of Prebiotic Galactooligosaccharides at High Temperatures. *Journal of Agricultural and Food* <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf204719w>
- Osorio-González, C. S., Gómez-Falcon, N., Brar, S. K., & Ramírez, A. A. (2022). Cheese whey as a potential feedstock for producing renewable biofuels: A review. *Energies*, 15(18), 6828. <https://www.mdpi.com/1996-1073/15/18/6828>
- Pacwa-Płociniczak, Magdalena, Grażyna A. Płaza, Zofia Piotrowska-Seget, and Swaranjit Singh Cameotra. 2011. "Environmental Applications of Biosurfactants:

Recent Advances" *International Journal of Molecular Sciences* 12, no. 1: 633-654.
<https://www.mdpi.com/1422-0067/12/1/633>

Palmer, Matthew, and Hazel Hatley. "The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review." *Water research* 147 (2018): 60-72. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135418307541>

Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods*, 10(5), 1067. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/5/1067>

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 2012, 110: 48-68. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712002769#bib115>

Raffa, P., Wever, D. A. Z., Picchioni, F., & Broekhuis, A. A. (2015). Polymeric surfactants: synthesis, properties, and links to applications. *Chemical reviews*, 115(16), 8504-8563. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr500129h>

Ranjith, HM Premlal, and U. Wijewardene. "Lipid emulsifiers and surfactants in dairy and bakery products." *Modifying lipids for use in food* (2006): 393-428. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063181590>

Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R., Wray, V., & Lang, S. (2001). Sophorolipids: a source for novel compounds. *Industrial Crops and Products*, 13(2), 85-92. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669000000558>

Ravindran, Rajeev, and Amit K. Jaiswal. "Exploitation of food industry waste for high-value products." *Trends in biotechnology* 34.1 (2016): 58-69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779915002267#fig0010>

Ravindran, Rajeev, and Amit K. Jaiswal. "Exploitation of food industry waste for high-value products." *Trends in biotechnology* 34.1 (2016): 58-69. [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(15\)00226-7](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(15)00226-7)

Ribeiro, Beatriz Galdino, Jenyffer M. Campos Guerra, and Leonie Asfora Sarubbo. "Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8 (2020): 434. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00434/full>

Rodríguez, N., Salgado, J. M., Cortés, S., & Domínguez, J. M. (2010). Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 226–233. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02882.x>

S. Vijayakumar and V. Saravanan,. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10 (2015): 181-192. <https://scialert.net/fulltext/?doi=jm.2015.181.192>

Sachdev, Dhara P., and Swaranjit S. Cameotra. "Biosurfactants in agriculture." *Applied microbiology and biotechnology* 97 (2013): 1005-1016. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4641-8>

Salovaara, Hannu, and Michael Gänzle. "Lactic acid bacteria in cereal-based products." *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* 2 (2011): 227. https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=tFjsAuo5WocC&oi=fnd&pg=PA227&dq=PRODUCTS+MADE+FROM+LACTIC+ACID+BACTERIA&ots=QW-BuEyIBI&sig=hav3xpiBM7Wjy1pIywglM2z0Pvg&redir_esc=y#v=onepage&q=PRODUCTS%20MADE%20FROM%20LACTIC%20ACID%20BACTERIA&f=false

Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., ... & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X22000468>

Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Procha, S., & Lal, S. (2015). Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus*, 4, 1-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320184/>

Shukla, Soham. "Freeze drying process: A review." *International journal of pharmaceutical sciences and research* 2.12 (2011): 3061. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d282c74d09f5e6f0c007eb8cb6239e4f960358d3>

Silva RDCFS, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(7):12523-12542. <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/7/12523>

- Siso, MI González. "The biotechnological utilization of cheese whey: a review." *Bioresource technology* 57.1 (1996): 1-11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852496000363>
- Sriphannam, W., Lumyong, S., Niumsap, P., Ashida, H., Yamamoto, K., & Khanongnuch, C. (2012). A selected probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* CM33 isolated from breast-fed infants as a potential source of β -galactosidase for prebiotic oligosaccharide synthesis. *The Journal of Microbiology*, 50, 119-126. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-012-1108-7>
- Stegmann, Paul, Marc Londo, and Martin Junginger. "The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters." *Resources, Conservation & Recycling: X* 6 (2020): 100029. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590289X1930026X#bib0195>
- SUN, Na, et al. Advance in food-derived phospholipids: Sources, molecular species and structure as well as their biological activities. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 80: 199-211. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417302972>
- Susanna Laurén "What are surfactants and how do they work? " *Biolin Scientific* (2018). <https://www.biolinscientific.com/blog/what-are-surfactants-and-how-do-they-work>
- Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., ... & Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706>
- Tchakouani, Galvany Franck Yamagueu, et al. "Antibacterial activity of bioemulsifiers/biosurfactants produced by *Levilactobacillus brevis* S4 and *Lactiplantibacillus plantarum* S5 and their utilization to enhance the stability of cold emulsions of milk chocolate drinks." *Food Science & Nutrition* 12.1 (2024): 141-153. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10804106/#fsn33740-bib-0039>
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591#B7-nutrients-11-01591>

Tripathi, Manjul K., and Saroj Kumar Giri. "Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage." *Journal of functional foods* 9 (2014): 225-241. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001716#bib0215>

Verma, A. K., Banerjee, R., Dwivedi, H. P., & Juneja, V. K. (2014). BACTERIOCINS | Potential in Food Preservation. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 180–186. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012384730000029X>

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005608>

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. *Res J Microbiol*, 2015, 10.5: 181-192. <https://gyansanchay.csjmu.ac.in/wp-content/uploads/2023/06/Biosurfactants.pdf>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., ... & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 612285. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.612285/full>

Yeh, Mao-Sung, Yu-Hong Wei, and Jo-Shu Chang. "Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*." *Process Biochemistry* 41.8 (2006): 1799-1805. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511306001255>

Zandona, Elizabeta, Marijana Blažić, and Anet Režek Jambrak. "Whey utilization: Sustainable uses and environmental approach." *Food Technology and Biotechnology* 59.2 (2021): 147-161. <https://hrcak.srce.hr/260644>

Zheng, Y., Zheng, M., Ma, Z., Xin, B., Guo, R., & Xu, X. (2015). Sugar fatty acid esters. In *Polar lipids* (pp. 215-243). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781630670443500121>

Zhou, Yang, Yanhua Cui, and Xiaojun Qu. "Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review." *Carbohydrate polymers* 207 (2019): 317-332. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718314267?via%3Dihub>

Zuniga, M., I. Pardo, and S. Ferrer. "An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria." *International journal of food microbiology* 18.1 (1993): 37-42.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160593900052>