

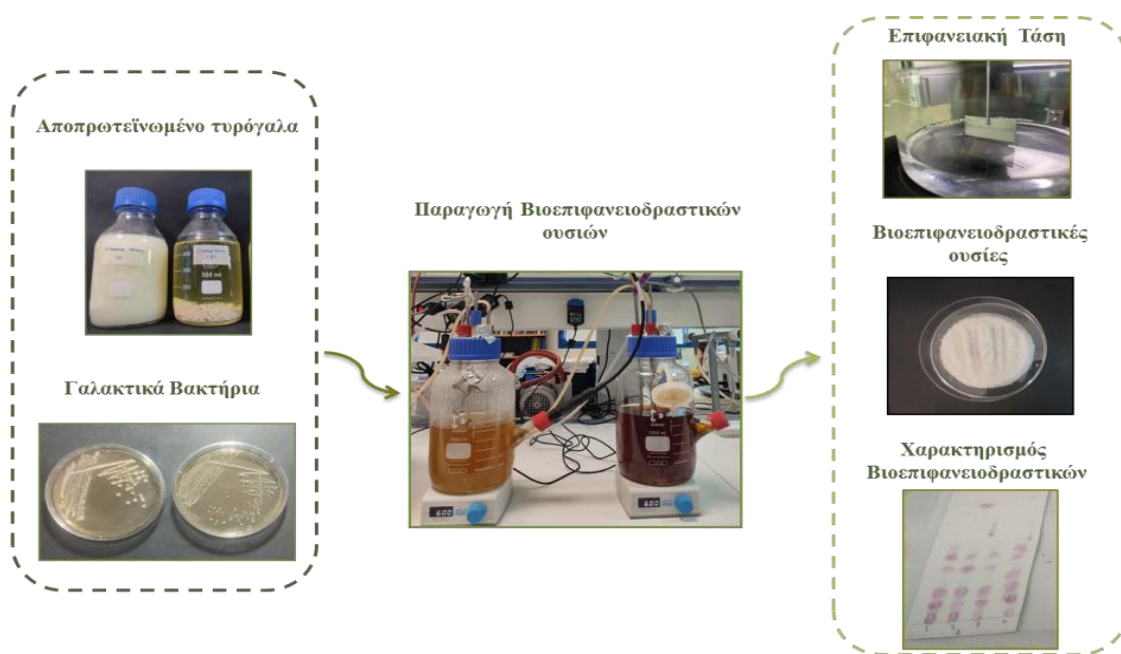


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια μέσω της αξιοποίησης παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων



Δήμητρα Β. Αλιμπούμπα

Επιβλέπων καθηγητής:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια
μέσω της αξιοποίησης παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων

“Biosurfactant production by lactic acid bacteria via the utilization of
by-products of the food industry”

Δήμητρα Β. Αλιπούμπα

Εξεταστική επιτροπή:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής, ΓΠΑ

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, ΓΠΑ

Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια μέσω της αξιοποίησης παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων

*ΠΜΣ Επεξεργασία Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων- Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-Οικονομίας
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (ή μικροβιακά παραγόμενων επιφανειοδραστικών) ουσιών αποτελεί καινοτόμο πεδίο της βιοτεχνολογίας με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθότι οι ουσίες αυτές διαθέτουν αντίστοιχα χαρακτηριστικά με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά παραγόμενα ανάλογά τους, ενώ επιπρόσθετα υπερτερούν έναντι αυτών (κυρίως) όσον αφορά τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο (π.χ. μικρότερη τοξικότητα, βιοδιάσπαση κ.α.). Ταυτόχρονα, οι βιοεπιφανειοδραστικές δύνανται να παραχθούν μέσω της αξιοποίησης πληθώρας βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων, και ως εκ τούτου η παραγωγή τους μέσω ζύμωσης εντάσσεται πλήρως στις τρέχουσες διεθνείς στρατηγικές και κατευθύνσεις (κυκλική οικονομία, βιο-οικονομία).

Η παρούσα έρευνα εστιάζει στη μελέτη παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από γαλακτικά βακτήρια. Στόχος ήταν, η μελέτη της ικανότητας διαφορετικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων να αναπτύσσονται και να παράγουν επιφανειοδραστικές ουσίες, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το κύριο υγρό παραπροϊόν των τυροκομείων, το τυρόγαλα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν τη ζύμωση, όπως η σύστασή του υποστρώματος, η επίδραση του εμβολίου και της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων στο μέσο της ζύμωσης, τόσο ως προς την ανάπτυξη των στελεχών όσο και ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση αερόβιων συνθηκών στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών αλλά και η ανακύκλωση υποστρώματος. Οι ζυμώσεις αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών, βιομάζας και γαλακτικού οξέος, την κατανάλωση λακτόζης και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), και την μείωση της επιφανειακής τάσης που προκαλεί η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης του τυρογάλακτος εμπλουτισμένο ή μη, με οργανικές πηγές αζώτου, στην αύξηση 13 στελεχών γαλακτικών βακτηρίων. Από τους διαφορετικούς συνδυασμούς και συγκεντρώσεις οργανικών πηγών αζώτου, επιλέχθηκε ο συνδυασμός εκείνος (Medium B: 5 g/L πεπτόνη, 3 g/L εκχύλισμα ζύμης) με τον οποίο επιτυγχάνεται υψηλός ρυθμός αύξησης, χωρίς ταυτόχρονα να απαιτείται η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων εμπορικών πηγών αζώτου. Ομοίως διερευνήθηκε η προσθήκη μεταλλικών αλάτων στο υπόστρωμα και η επίδρασή τους στην μικροβιακή αύξηση. Τα στελέχη *Lacticaseibacillus rhamnosus* CECT 278 και *Limosilactobacillus fermentum* ACA-DC 183 επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου σε τυρόγαλα εμπλουτισμένο με Medium B αλλά και σε αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα χωρίς προσθήκη πηγών αζώτου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν την θετική επίδραση του εκχυλίσματος ζύμης και της πεπτόνης στην παραγωγή βιομάζας για τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183 (2,3 και 1,3 g/L, αντίστοιχα) αλλά και στη παραγωγή

βιοεπιφανειοδραστικών, με την επιφανειακή τάση να μειώνεται κατά 30,6 και 32,8 mN/m, αντίστοιχα κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικυλίων (CMC) για το στέλεχος CECT 278 υπολογίστηκε στα 3,7 g/L ενώ για το ACA-DC 183 ήταν 0,56 g/L. Στις ζυμώσεις που ακολούθησαν με το στέλεχος ACA-DC 183 φάνηκε πως αυτές με αρχική συγκέντρωση 40 g/L λακτόζης και 10% εμβόλιο είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα, τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Στις ζυμώσεις αυτές η επιφανειακή τάση μειώθηκε κατά 19,6 και 26,1 mN/m, αντίστοιχα, ενώ η κατανάλωση της λακτόζης ήταν αρκετά η υψηλότερη σε σχέση με τις άλλες συνθήκες που μελετήθηκαν (44,5% και 31,0% ποσοστό κατανάλωσης, αντίστοιχα). Ως προς τον συνδυασμό της μεγαλύτερης παραγωγής ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών (0,364 g/L), της μείωσης της επιφανειακής τάσης (28,9 mN/m), αλλά και του συντελεστή απόδοσης βιοεπιφανειοδραστικών (0,053 g/g), αυτός προέκυψε κατά την πρώτη παρτίδα ζύμωσης του ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος. Η τελική συγκέντρωση του προϊόντος ήταν η υψηλότερη που επιτεύχθηκε σε αυτή τη μελέτη φτάνοντας στα 0,76 g/L, μετά από τρεις ανακυκλώσεις υποστρώματος. Κατά τις δοκιμές σταθερότητας, οι βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν διατήρησαν την ικανότητά τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση μετά την θερμοκρασιακή τους έκθεσή μέχρι και 75°C, ενώ σταθερές παρέμειναν σε όλο το εύρος των τιμών pH και μέχρι συγκέντρωσης άλατος 5 g/L. Το τελικό προϊόν χαρακτηρίστηκε ως γλυκολιποπρωτεΐνη, σύσταση η οποία επιβεβαιώθηκε και μέσω ανάλυσης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Από τη συγκριτική μελέτη των 13 γαλακτικών βακτηρίων, το στέλεχος ACA-DC 183 παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών), και ως εκ τούτου κρίθηκε πως μπορεί να αξιοποιηθεί στα πλαίσια μελλοντικής μελέτης, τόσο για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών, όσο και για την ανάδειξη πιθανών εφαρμογών των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών σε τρόφιμα.

Επιστημονική περιοχή: Βιοδιεργασίες

Λέξεις κλειδιά: Βιοεπιφανειοδραστικές, τυρόγαλα, ζύμωση, βιοαντιδραστήρες, γαλακτικά βακτήρια

Biosurfactant production by lactic acid bacteria via the utilization of by-products of the food industry

*Msc Food Processing, Preservation and Biotechnological Processes – Bio-economy Products Development
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Process Engineering*

ABSTRACT

Biosurfactant production (or microbially produced surfactants) constitutes a novel biotechnological field that has attracted the scientific interest mainly because these substances have similar characteristics to their widely used counterparts. Additionally, they are superior against the synthetic ones in terms of environmental impact (e.g. lower toxicity, biodegradability etc). At the same time biosurfactants can be produced through the utilization of a plethora of industrial wastes and by-products which are in line with the current world's strategies and directives (circular economy, bio economy). This study investigated biosurfactants' production via fermentation using lactic acid bacteria. The aim of this work was to examine the ability of various lactic acid bacteria to grow and produce biosurfactants, utilizing cheese whey, the main by-product stream from cheese making industries. For this purpose, various parameters affecting the fermentation were evaluated such as substrate composition, the volume of the preculture and initial sugar concentration in terms of bacterial growth and biosurfactant production. In addition, growth and biosurfactants production was also evaluated under aerobic, as well as substrate recycling in order to reduce the amount of remaining lactose. The effect of each parameter was assessed via crude biosurfactants, biomass and lactic acid production, lactose and free amino nitrogen (FAN) consumption as well as their correlation with surface tension reduction, induced by the presence of biosurfactants. To this end, cheese whey composition was initially elucidated and then the substrate was enriched with various organic nitrogen sources. The effect of substrate supplementation on microbial growth was studied for 13 lactobacilli. From the different combinations and concentrations of organic nitrogen sources, the combination (Medium B: 5g/L peptone, 3 g/L yeast extract) achieving a high growth rate with the minimum addition of commercial nitrogen sources was selected. The addition of minerals and metal ions in substrate and their effect on microbial growth was also investigated. *Lactocaseibacillus rhamnosus* CECT 278 and *Limosilactobacillus fermentum* ACA-DC 183 were the strains selected for further study in bioreactor fermentations in batch mode using both de-proteinized cheese whey supplemented with Medium B and de-proteinized cheese whey without supplementation. Fermentation results showed the positive effect of yeast extract and peptone on biomass (2.3 and 1.3 g/L, respectively) and biosurfactants production, with surface tension values of 41.4 and 39.2 (mN/m), respectively. The critical micelle concentration (CMC) for strain CECT 278 was estimated at 3.7 g/L while for ACA-DC 183 was equal to 0.56 g/L. Fermentations with strain ACA-DC 183 indicated that 40 g/L of initial lactose and 10% pre-culture led to the highest surface tension reduction and lactose consumption under both aerobic and anaerobic conditions. More specifically, surface tension was reduced about 19.6 and 26.1 mN/m, respectively, while lactose consumption was higher compared to the previous experiments (consumption rate of 44.5% and 31.0%, respectively). Substrate recycling resulted in the highest final product concentration (0.36 g/L) during the first batch and the maximum

surface tension reduction (28.9 mN/m) with strain ACA-DC 183. A product yield of 0.05 g/g of consumed lactose was obtained using this fermentation strategy. After three substrate recycling batches, the final product concentration was the highest achieved in this study reaching a value equal to 0.76 g/L. Stability tests indicated that the obtained crude biosurfactants were stable until a temperature of 75°C and under different pH values (4, 6, 8 and 10) and at less than 5 g/L NaCl concentration. The obtained biosurfactants were composed of carbohydrates, lipids and proteins, therefore characterized as a glycolipoprotein. This composition was also confirmed by Thin Layer Chromatography. This comparative study of 13 lactic acid bacteria showed that the most promising results were obtained from strain ACA-DC183 (in terms of biosurfactant production). Consequently, ACA- DC 183 presents a huge potential of biosurfactant production after process optimization which will also lead to new applications for the development of novel foods.

Scientific area: Bioconversions

Keywords: Biosurfactants, cheese whey, fermentation, bioreactors, lactic acid bacteria

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίηση της πειραματικής μου μελέτης στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Απόστολο Κουτίνα, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια του προγράμματος των μεταπτυχιακών μου σπουδών, για την προτροπή του να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα αλλά και την τιμή να παρακολουθήσει και να αξιολογήσει την εργασία μου. Ακόμη, ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Θεοφανία Τσιρώνη για τα εφόδια που μου προσέφεραν μέσα από τις ενδιαφέρουσες διαλέξεις τους κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, αλλά και για την τιμή να παρευρίσκονται στην παρουσίαση και την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Αμέτρητα ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Κοψαχείλη. Οι συμβουλές, η στήριξη και η καθοδήγησή του αποτέλεσαν και αποτελούν ένα από τα βασικότερα θεμέλια της μέχρι τώρα πορείας μου, καθώς συμβάλει στην εξέλιξή μου με τον σωστότερο τρόπο και προς κάθε κατεύθυνση.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Δρ. Βασιλική Καχριμανίδου, για την καθοδήγηση, την εμπύχωση και τις συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων. Η βοήθειά της ήταν καθοριστική ώστε να μάθω να λειτουργώ και να σκέφτομαι μέσα στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη Παπαδάκη για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου πρόσφερε απλόχερα όποτε και αν τις χρειάστηκα δίνοντας μου τη σωστή κατεύθυνση, αλλά και τη μεταδιδάκτορα Δρ. Ιλιάδα Λάππα που ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να μου προσφέρει τις γνώσεις της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τις υποψήφιες διδάκτορες Αικατερίνη Νάτσια και Φανή Σερέτη για την συνεργασία, την ανταλλαγή απόψεων και γνώσεων, την άριστη εργαστηριακή συνύπαρξη και φυσικά για τη φιλία τους.

Ως μικρή ένδειξη ευγνωμοσύνης και αναγνώρισης των κόπων και του έργου τους, να ευχαριστήσω τους γονείς μου Βασίλειο και Αικατερίνη και την αδερφή μου Μαρία που το ενδιαφέρον, η αγάπη και η στήριξή τους, αποτελούν το βασικότερο εφόδιο για να προχωράω και να προοδεύω στη ζωή μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Θάνο για την αγάπη, τη χαρά και την αισιοδοξία που γεμίζει την κάθε μου μέρα στηρίζοντας κάθε μου επιλογή.

Δήμητρα Β. Αλιμπούμπα

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
2.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες	3
2.2. Παραγωγή και ρόλος βιοεπιφανειοδραστικών στο κύτταρο.....	4
2.3. Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών.....	5
2.4. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά μέσα ζύμωσης.....	8
2.4.1. Τυρόγαλα.....	8
2.4.2. Ελαιούχα υποστρώματα.....	10
2.4.3. Αγροτοβιομηχανικά και αμυλούχα υποστρώματα.....	11
2.4.4. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα.....	11
2.4.5. Συνθετικά υποστρώματα.....	11
2.5. Ταξινόμηση βιοεπιφανειοδραστικών.....	12
2.5.1. Γλυκολιπίδια.....	13
2.5.1.1 Ραμνολιπίδια.....	13
2.5.1.2 Λιπίδια τρεχαλόζης (τρεχαλολιπίδια).....	13
2.5.1.3 Σοφορολιπίδια	13
2.5.1.4 Λιπίδια μαννόζης- ερυθριτόλης.....	14
2.5.2. Λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες.....	15
2.5.3. Λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια.....	16
2.5.4. Πολυμερείς βιοεπιφανειοδραστικές.....	16
2.6. Ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων στην βιοτεχνολογία.....	17
2.6.1. Γαλακτικά βακτήρια	17
2.6.2. Γαλακτική ζύμωση	17
2.6.3. Προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης	18
2.7. Συνθετικές επιφανειοδραστικές και βιοεπιφανειοδραστικές	19
2.8. Εφαρμογές.....	20
2.8.1. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στα τρόφιμα	20
2.8.1.1. Σύνθετα αρτύματα (Salad dressings)	21
2.8.1.2. Ψωμιά και αρτοποιήματα	21
2.8.1.3. Παγωτά	22
2.8.1.4. Αντιοξειδωτικά.....	22
2.8.1.5. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στη φαρμακευτική και την υγεία.....	23
2.8.2. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στο περιβάλλον	23

2.9. Μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών.....	24
3. ΣΚΟΠΟΣ.....	25
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
4.1. Βιολογικό Υλικό.....	26
4.2. Προετοιμασία τυρογάλακτος ως υπόστρωμα ζύμωσης.....	27
4.3. Προσδιορισμός ειδικού ρυθμού αύξησης γαλακτικών βακτηρίων.....	28
4.4. Ζυμώσεις με στελέχη του γένους <i>Lactobacilli</i>	29
4.5. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών.....	29
4.6. Μέτρηση Επιφανειακής τάσης.....	30
4.7. Προσδιορισμός κρίσιμης συγκέντρωσης σχηματισμού μικκυλίων και δοκιμές σταθερότητας βιοεπιφανειοδραστικών.....	31
4.8. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	31
4.8.1. Προσδιορισμός σύστασης τυρογάλακτος.....	31
4.8.2. Μέτρηση Βιομάζας.....	32
4.8.3. Προσδιορισμός Σακχάρων και Γαλακτικού Οξέος.....	33
4.8.4. Προσδιορισμός Αζώτου Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN).....	33
4.8.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	34
4.8.6. Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων.....	35
4.8.7. Προσδιορισμός λίπους.....	36
4.8.8. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC).....	36
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
5.1. Μελέτη επίδρασης οργανικών πηγών αζώτου στον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ, h^{-1}) γαλακτικών βακτηρίων.....	38
5.2. Μελέτη επίδρασης μεταλλικών αλάτων και ιχνοστοιχείων στον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ, h^{-1}) γαλακτικών βακτηρίων.....	45
5.3. Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα.....	49
5.4. Προσδιορισμός της κρίσιμης συγκέντρωσης σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για τις παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από τα στελέχη <i>L. rhamnosus</i> CECT 278 και <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183.....	56
5.5. Μελέτη επίδρασης της προκαλλιέργειας, της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης και των συνθηκών αερισμού στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183.....	57
5.6. Ζύμωση με ανακύκλωση υποστρώματος του στελέχους <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183 προς παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.....	60
5.7. Δοκιμή σταθερότητας βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.....	63
5.8. Χαρακτηρισμός παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών.....	65
5.8.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).....	65
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
7.1. Ελληνική βιβλιογραφία	72
7.2. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	72

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Είδη βιοεπιφανειοδραστικών από διάφορους μικροοργανισμούς (Rodrigues, Teixeira, 2006)	12
Πίνακας 2 Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος τις επίδρασης οργανικών πηγών αζώτου, μετάλλων και ιχνοστοιχείων στη μικροβιακή τους αύξηση και την κατανάλωση λακτόζης.....	26
Πίνακας 3 Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με το φωτόμετρο μικροπλακών (microplate).....	28
Πίνακας 4 Σύσταση τυρογάλακτος πριν (CW) και μετά την αποπρωτεΐνωση και σύγκριση με τη βιβλιογραφία.....	32
Πίνακας 5 Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης μ_{max} (h ⁻¹) σε όλα τα στελέχη για τις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (CW).....	42
Πίνακας 6 Κατανάλωση λακτόζης σε (g/L) από το κάθε υπό εξέταση στέλεχος μετά την επώασή του σε διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου έπειτα από 24 h	43
Πίνακας 7 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{G.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, για το στέλεχος <i>L. rhamnosus</i> CECT 278 με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L.....	52
Πίνακας 8 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος <i>L. rhamnosus</i> CECT 278 σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L.....	52
Πίνακας 9 Επίδραση εμπλουτισμένου τυρογάλακτος στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{G.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας, σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, με το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA 183 (αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L).....	55
Πίνακας 10 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA 183 σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L.....	55
Πίνακας 11 Επίδραση διαφορετικών στρατηγικών ζύμωσης στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{G.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες με το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183 χρησιμοποιώντας τυρόγαλα εμπλουτισμένο με Μπ ως θρεπτικό υπόστρωμα.	58
Πίνακας 12 Επίδραση διαφορετικών στρατηγικών ζύμωσης ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, γαλακτικού οξέος και την κατανάλωση της λακτόζης κατά τη διάρκεια ζυμώσεων διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου με το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183 χρησιμοποιώντας τυρόγαλα εμπλουτισμένο με Μπ ως το μόνο θρεπτικό υπόστρωμα.....	58
Πίνακας 13 Συντελεστές απόδοσης βιομάζας, βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, γαλακτικού οξέος και τελικού προϊόντος κατά τη ζύμωση του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	62
Πίνακας 14 Επιφανειακή τάση, καταναλωθείσα λακτόζη και παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη ζύμωση του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	63

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων	34
Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού πρωτεϊνών.....	35
Γράφημα 3 Κινητική αύξησης των στελεχών CECT 278 (α), CECT 4023 (β) και FMCC E108 (γ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος	39
Γράφημα 4 Κινητική αύξησης των στελεχών LQC 854 (α), LQC 752 (β) και LQC 753 (γ) και LQC 780 (δ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος	40
Γράφημα 5 Κινητική αύξησης των στελεχών, ACA-DC 182 (α), ACA-DC 183 (β), ACA-DC 270 (γ), ACA-DC 276 (δ), ACA-DC 731 (ε) και ACA-DC 4052 (στ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος	41
Γράφημα 6 Παραγωγή γαλακτικού οξέος (g/L) μετά από 24 h επώασης χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου και χωρίς προσθήκη εξωγενούς πηγής αζώτου σε υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (CW).	44
Γράφημα 7 Κινητική αύξησης των στελεχών CECT 278 (α) και ACA-DC 183 (β) μετά την προσθήκη στο τυρόγαλο διαφορετικών μεταλλικών αλάτων και συνδυασμό αυτών.	46
Γράφημα 8 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών CECT 278 (α), CECT 4023 (β) και E108 (γ) σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλο (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών.	47
Γράφημα 9 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών ACA-DC 182 (α), ACA-DC 183 (β), ACA-DC 270 (γ), ACA-DC 271 (δ), ACA-DC 276 (ε), ACA-DC 731 (στ) σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλο (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών.	48
Γράφημα 10 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών LQC 752 (α), LQC 753 (β), LQC 854, LQC 780 σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλο (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών	49
Γράφημα 11 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με ασβέστιο και οργανικές πηγές αζώτου (Medium B) (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).....	50
Γράφημα 12 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με ασβέστιο (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).....	51
Γράφημα 13 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους ACA-DC 183 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με μαγγάνιο και οργανικές πηγές αζώτου (Medium B) (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).	53
Γράφημα 14 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους ACA-DC 183 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με μαγγάνιο (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).....	54
Γράφημα 15 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος <i>L. Rhamnosus</i> CECT278	56
Γράφημα 16 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος <i>L.fermentum</i> ACA- DC 183.	57
Γράφημα 17 Ζύμωση του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).....	61
Γράφημα 18 Κατανάλωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) κατά τη ζύμωση του στελέχους <i>L.fermentum</i> ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	62

Γράφημα 19 Επίδραση θερμοκρασίας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183	64
Γράφημα 20 Επίδραση τις τιμές pH στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183	64
Γράφημα 21 Επίδραση της συγκέντρωσης άλατος στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος <i>L. fermentum</i> ACA-DC 183.	65

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Κατανομή αμφίφιλων μορίων βιοεπιφανειοδραστικών μεταξύ υδρόφιλης και υδρόφοβης φάσης	4
Εικόνα 2 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC)	7
Εικόνα 3 Βασικά είδη βιοεπιφανειοδραστικών (γλυκολιπίδια) (Ribeiro, 2020)	15
Εικόνα 4 Βασικές βιοεπιφανειοδραστικές (λιποπεπτιδια και λιποπρωτεΐνες), (Ribeiro, 2020)	16
Εικόνα 5 Γραμμική διασπορά στελεχών γαλακτικών βακτηρίων	26
Εικόνα 6 Τυρόγαλα πριν και μετά την διαδικασία της αποπρωτεΐνωσης.....	27
Εικόνα 7 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες.....	29
Εικόνα 8 Εκχύλιση συνδεδεμένων με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικών σε PBS, καθαρισμός με μεμβράνες διαπίδησης και παραλαβή τελικού προϊόντος μετά τη λυοφιλίωση	30
Εικόνα 9 Μέτρηση επιφανειακής τάσης με τη μέθοδο Wilhelmy plate	31
Εικόνα 10 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_3$ 20% (65:25:5). Εμφάνιση χρωματογραφήματος α) σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου και β) με ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 20% και θέρμανση της πλάκας στους 100°C	66
Εικόνα 11 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (25:15:4:2). Εμφάνιση χρωματογραφήματος με ψεκασμό με νινυδρίνη και θέρμανση της πλάκας στους 100°C	67
Εικόνα 12 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (25:15:4:2). Εμφάνιση χρωματογραφήματος με ψεκασμό με θειϊκή φαινόλη	68

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διύλιση του πετρελαίου ξεκίνησε να εφαρμόζεται στη δεκαετία του 1860 και οδήγησε στη δημιουργία σύγχρονων μονάδων διύλισης, δίνοντας στους ανθρώπους τεράστιες δυνατότητες μέσω της παραγωγής καυσίμων και άλλων αγαθών. Το πετρέλαιο αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων που αξιοποιούνται σε διάφορες εφαρμογές όπως καύσιμα και πλαστικά, αλλά και προϊόντα μεγαλύτερης αξίας που αφορούν βιομηχανίες παραγωγής φαρμάκων, αρωμάτων, απορρυπαντικών και καλλυντικών.

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις και η μείωση των αποθεμάτων πετρελαίου (μεταξύ άλλων) έχουν τα τελευταία χρόνια οδηγήσει στη θέσπιση κανονισμών και πολιτικών προς την κατεύθυνση της δημιουργίας νέων και αειφόρων βιομηχανιών, οι οποίες θα στοχεύουν στην παραγωγή ενέργειας, χημικών και διαφόρων προϊόντων προστιθέμενης αξίας από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Στα πλαίσια αυτά, το ενδιαφέρον της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας έχει σε μεγάλο βαθμό στραφεί στην αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων, στα πλαίσια ανάπτυξης ολοκληρωμένων βιοδιυλιστηρίων, για την παραλαβή κλασμάτων που θα αξιοποιηθούν σε μικροβιακές ζυμώσεις και βιομετατροπές (εκμετάλλευση μικροοργανισμών και ενζύμων για παραγωγή προϊόντων). Είναι σαφές πως η εφαρμογή νέων ή/και η αντικατάσταση υπάρχουσών τεχνολογιών δύναται να προκύψει μέσα από έρευνα, βελτιστοποίηση και αξιολόγηση της εκάστοτε διεργασίας. Η αξιολόγηση αυτή θα πρέπει (μεταξύ άλλων) να περιλαμβάνει τα τελικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, το κόστος παραγωγής αλλά και τις τελικές αποδόσεις (Koutinas et al., 2014).

Τα παραπάνω στοιχεία αποτέλεσαν τη βάση για την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών αποτελεί ένα ιδιαίτερα καινοτόμο τομέα της βιοτεχνολογίας και στοχεύει στην αντικατάσταση των χημικώς παραγόμενων (συνθετικών) επιφανειοδραστικών. Οι συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται από μη ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (πετρέλαιο) (Rodrigues & Teixeira, 2006) και βρίσκουν πλήθος εφαρμογών ως συστατικά απορρυπαντικών ρούχων και καθαριστικών, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Οι αυξανόμενες απαιτήσεις για παραγωγή επιφανειοδραστικών από τις βιομηχανίες τις τελευταίες δεκαετίες, οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης βιοδιεργασιών για την παραγωγή βιοτεχνολογικής προέλευσης βιοεπιφανειοδραστικών, οι οποίες φέρουν πλήθος πλεονεκτημάτων. Σε σχέση με τις συνθετικές, οι βιοεπιφανειοδραστικές έχουν την ικανότητα να βιοαποικοδομούνται μετά την απόρριψη του προϊόντος, έχουν χαμηλή τοξικότητα και δύνανται να διατηρούν τις ιδιότητές τους ακόμη και μετά την έκθεσή τους σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, και συγκέντρωσης αλάτων. Η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της αξιοποίησης διαφόρων αποβλήτων (πχ: τυρόγαλα), αποτρέποντας περαιτέρω περιβαλλοντική επιβάρυνση από ενδεχόμενη απόρριψη τους σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα. Η χρήση κατάλληλων στελεχών και η αντιμετώπιση προβλημάτων όπως οι χαμηλές παραγωγικότητες και το αυξημένο κόστος παραγωγής μπορούν να οδηγήσουν στη χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών και στην αξιοποίηση των ιδιοτήτων τους σε διάφορους τομείς βιομηχανιών τροφίμων, φαρμάκων καλλυντικών κ.α. (Banat, 2012).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών

χρησιμοποιώντας GRAS στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και τυρόγαλα ως υπόστρωμα.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

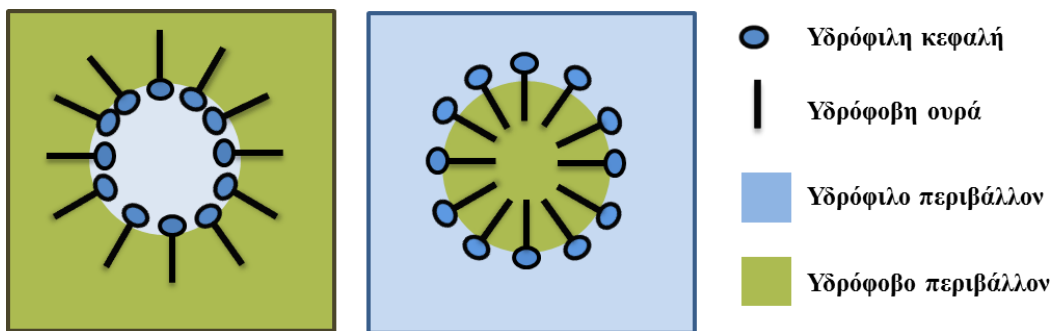
2.1. Βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές είναι ουσίες παραγόμενες από μικροοργανισμούς (ζύμες, μύκητες, βακτήρια), αποτελούνται από ένα πολικό (υδρόφιλο) και ένα μη πολικό (υδρόφοβο) τμήμα, έτσι παρουσία αυτών, μη αναμίξιμα συστατικά, διαφορετικής πολικότητας μπορούν να ενωθούν και να αποτελέσουν ομοιογενές μίγμα.

Σε σχέση με τις χημικώς παραγόμενες επιφανειοδραστικές, οι βιοεπιφανειοδραστικές φαίνεται να υπερτερούν σημαντικά μιας και είναι μόρια χαμηλής τοξικότητας και βιοαποικοδομήσιμες. Επιπλέον, είναι ανθεκτικές σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος διότι διατηρούν τις ιδιότητες τους σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, σε διάφορες τιμές pH αλλά και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (Sharma, 2016).

Η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έχει μελετηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp. Δεδομένου, όμως, ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι παθογόνοι η εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών τους είναι σαφώς περιορισμένη. Η χρήση γαλακτικών βακτηρίων που έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognised as Safe), πλεονεκτεί έναντι της χρήσης βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, αφού οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από αυτά τα γένη δύνανται να βρουν εφαρμογή και στη βιομηχανία των τροφίμων. Επιπλέον, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι εν λόγω ζυμώσεις με γαλακτικά βακτήρια μπορούν να έχουν σαν υλικά εκκίνησης φθηνά ελαιούχα, σακχαρούχα ακόμα και λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων. Με τον τρόπο αυτό όχι μόνον απόβλητα θα αξιοποιηθούν και δεν θα αποτελέσουν παράγοντες επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, αλλά ταυτόχρονα, το κόστος παραγωγής που προκύπτει από την αγορά πρώτων υλών μειώνεται σημαντικά (Ribeiro, 2020).

Ο χαρακτηρισμός των βιοεπιφανειοδραστικών βασίζεται στη βιοχημική τους σύσταση. Το υδρόφοβο μέρος τους αποτελείται συνήθως από κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και υδροξυ-λιπαρά οξέα με 8-12 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα. Αντίστοιχα το υδρόφιλο τμήμα τους μπορεί να αποτελείται από υδατάνθρακες (ολιγο-, μονο-, και πολυσακχαρίτες), υδροξύλια, καρβοξύλια, πεπτίδια και πρωτεΐνες. Ανάλογα με την αναλογία των βιοεπιφανειοδραστικών σε λίπος, πρωτεΐνες, πεπτίδια και σάκχαρα, προκύπτει αντίστοιχα και ο χαρακτηρισμός τους. Μια βιοεπιφανειοδραστική μπορεί να χαρακτηριστεί ως λιποπεπτίδιο, πολυσακχαρίτης, λιποπρωτεΐνη, γλυκολιπίδιο, λιποπολυσακχαρίτης και άλλα, με τα δύο τελευταία να αποτελούν τα πιο συνήθη παραγόμενα μόρια (Rahman, Gakre, 2008).



Εικόνα 1 Κατανομή αμφίφιλων μορίων βιοεπιφανειοδραστικών μεταξύ υδρόφιλης και υδρόφοβης φάσης

2.2. Παραγωγή και ρόλος βιοεπιφανειοδραστικών στο κύτταρο

Ο τρόπος παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών εξαρτάται, από τη βιοχημική τους σύσταση, το στέλεχος αλλά και το υποστρώμα στο οποίο επιτελείται η ζύμωση. Η παραγωγή τους μπορεί να συνδέεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη, όπου παρατηρείται συσχετισμός ανάμεσα στην παραγωγή, την κυτταρική αύξηση και την κατανάλωση του υποστρώματος. Ακόμη η παραγωγή τους μπορεί να σχετίζεται με τον περιορισμό κάποιου παράγοντα της αύξησης, καθώς επίσης και με κύτταρα τα οποία δεν βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης (Desai, 1993).

Στελέχη που αναφέρονται πως έχουν μελετηθεί αρκετά ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, ανήκουν στην κατηγορία των βακτηρίων και ειδικότερα στα γένη *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, και *Arthrobacter sp.* Πλέον αρκετές αναφορές περιλαμβάνουν τη χρήση γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή αυτών των ουσιών όπως *Lactobacillus fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* και *Propionibacterium freudenreichii* (Hajfarajollah, 2018). Ανάλογα με το στέλεχος μπορούν να παραχθούν σε υποστρώματα υδρογονανθράκων, φυτικών ελαίων, υδατανθράκων ή σε συνδυασμό αυτών. Όπως σε κάθε ζύμωση, το είδος του μικροοργανισμού, η πηγή άνθρακα, αζώτου και άλλων θρεπτικών συστατικών αλλά και άλλες παράμετροι όπως ο αερισμός, το pH, η θερμοκρασία και η ανάδευση, είναι καθοριστικής σημασίας γεγονός που καθιστά τη βελτιστοποίηση της διεργασίας αρκετά δύσκολη (Li, 2002). Οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές σε θρεπτικά συστατικά, άνθρακα και άζωτο μπορεί να καλυφθεί από διάφορες πρώτες ύλες, ακόμη και απόβλητα. Η επιλογή του υποστρώματος πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή καθώς υπάρχουν μικροοργανισμοί που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές μόνο κατά την ανάπτυξή τους σε συγκεκριμένα υποστρώματα (Rodrigues, 2006).

Ο ρόλος των βιοεπιφανειοδραστικών στο κύτταρο δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Φαίνεται πως η παραγωγή τους διευκολύνει τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στο εσωτερικό του κυττάρου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Οι βιοεπιφανειοδραστικές μέσω της ιδιότητας της γαλακτωματοποίησης που διαθέτουν καταφέρνουν να μειώσουν τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ υδρόφοβων και υδρόφιλων μορίων διευκολύνοντας έτσι την κατανάλωση του υποστρώματος από τους μικροοργανισμούς (Toren et al., 2002; Sharma et al., 2016) Επιπλέον

μέσω των βιοεπιφανειοδραστικών ρυθμίζονται διάφορες ιδιότητες των μεμβρανών στα κύτταρα όπως η πρόσφυση των κυττάρων σε άλλες επιφάνειες του περιβάλλοντός τους, μιας ιδιότητας ιδιαίτερα σημαντικής για την επιβίωση του μικροοργανισμού (Rosenberg and Ron, 1999).

2.3. Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών

α) Επιφανειακή τάση

Στα ρευστά συστήματα η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων που τα απαρτίζουν πραγματοποιείται μέσω των δυνάμεων που αναπτύσσονται. Για παράδειγμα μέσω δεσμών υδρογόνου κάθε μόριο νερού μπορεί να συνδεθεί με άλλα τέσσερα μόρια, δύο για το κάθε οξυγόνο. Η επιφανειακή τάση, αποτελεί μια ιδιότητα της ζύλης που αφορά την επιφάνεια των υγρών. Τα μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των υγρών δέχονται δυνάμεις μόνο από τον κύριο όγκο του νερού (δυνάμεις με κατεύθυνση προς τα κάτω), ενώ δεν δέχονται καμία δύναμη από την αέρα που βρίσκεται από επάνω. Αποτέλεσμα αυτού είναι να έλκονται μόνο από μόρια που βρίσκονται δίπλα και κάτω από αυτά. Επειδή ο ρόλος των δεσμών είναι η μείωση της ενέργειας των συστημάτων, είναι επόμενο τα μόρια στην επιφάνεια των υγρών που δεν αναπτύσσουν δεσμούς προς κάθε κατεύθυνση να είναι σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση από τα μόρια στο εσωτερικό του υγρού. Η επιπλέον ενέργεια στη μονάδα της επιφάνειας ονομάζεται επιφανειακή τάση (Ριτζούλης, 2011). Μια βιοεπιφανειοδραστική ουσία χαρακτηρίζεται από την ικανότητα της να μειώνει την επιφανειακή τάση του υγρού στο οποίο βρίσκεται. Υπάρχουν βιοεπιφανειοδραστικές ιδιαίτερης αποτελεσματικότητας που μπορούν να μειώσουν την επιφανειακή τάση του νερού από 72,0 σε 35,0 mN/m (Mulligan, 2005). Για να θεωρηθεί αποτελεσματική μια βιοεπιφανειοδραστική ουσία, η ελάχιστη μείωση που προκαλεί στην επιφανειακή τάση θα πρέπει να είναι 8 mN/m (Sharma, 2016).

β) Σταθερότητα σε διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, συνθήκες αλατότητας)

Η ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών να διατηρούν τη σταθερότητά τους σε διάφορες συνθήκες τις καθιστούν κατάλληλες προς χρήση σε διάφορες εφαρμογές (Sharma et al., 2015). Η αντοχή τους για παράδειγμα σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, τιμές pH αλλά και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος, επιτρέπει την προσθήκη τους σε τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, διάφορες σάλτσες, παγωτά και μπισκότα. Παρόλο που τα τρόφιμα αυτά στη συνέχεια θα τύχουν διαφορετικής θερμικής επεξεργασίας, και συντήρησης (παστερίωση, κατάψυξη, κ.ά), οι βιοεπιφανειοδραστικές θα συνεχίσουν να εξασφαλίζουν σε αυτά τις επιθυμητές οργανοληπτικές τους ιδιότητες π.χ. γαλακτωματοποίηση και βελτιωμένη υφή. Αντίστοιχα με τα τρόφιμα σε αυτή την πολύ βασική τους ιδιότητα βασίζεται και η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών σε άλλες εφαρμογές, που σχετίζονται με το περιβάλλον, τη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων (Sharma, 2014). Η επίδραση της κάθε συνθήκης και κατά συνέπεια η ανθεκτικότητά τους, βασίζεται στη διατήρηση της ικανότητάς τους να δημιουργούν γαλακτώματα και να μειώνουν την επιφανειακή τάση των υγρών μετά την έκθεσή τους στις συνθήκες αυτές

(Sharma et al., 2015).

γ) Γαλακτωματοποίηση

Βασική ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών είναι να δημιουργούν γαλακτώματα μέσω της μείωσης της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης μεταξύ των ρευστών. Τα γαλακτώματα είναι μίγματα από δύο ή περισσότερα υγρά συστατικά τα οποία συνήθως δεν αναμιγνύονται και αποτελούν βασική υποομάδα μιας μεγάλης κατηγορίας διαφασικών συστημάτων που ονομάζονται κολλοειδή (Sharma, 2016). Οι βιοεπιφανειοδραστικές που εμφανίζουν αυτή την ιδιότητα χαρακτηρίζονται και ως γαλακτωματοποιητές και συνήθως πρόκειται για μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σύγκριση με τις βιοεπιφανειοδραστικές που σχετίζονται μόνο με τη μείωση της επιφανειακής τάσης (Cirigliano and Carman, 1985). Όπως όλες οι βιοεπιφανειοδραστικές, οι γαλακτωματοποιητές βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων ενώ πιθανό είναι να απαντώνται ως εξωκυτταρικοί μεταβολίτες π.χ. εξωπολυσακχαρίτες. (Neu, Karl, 1990).

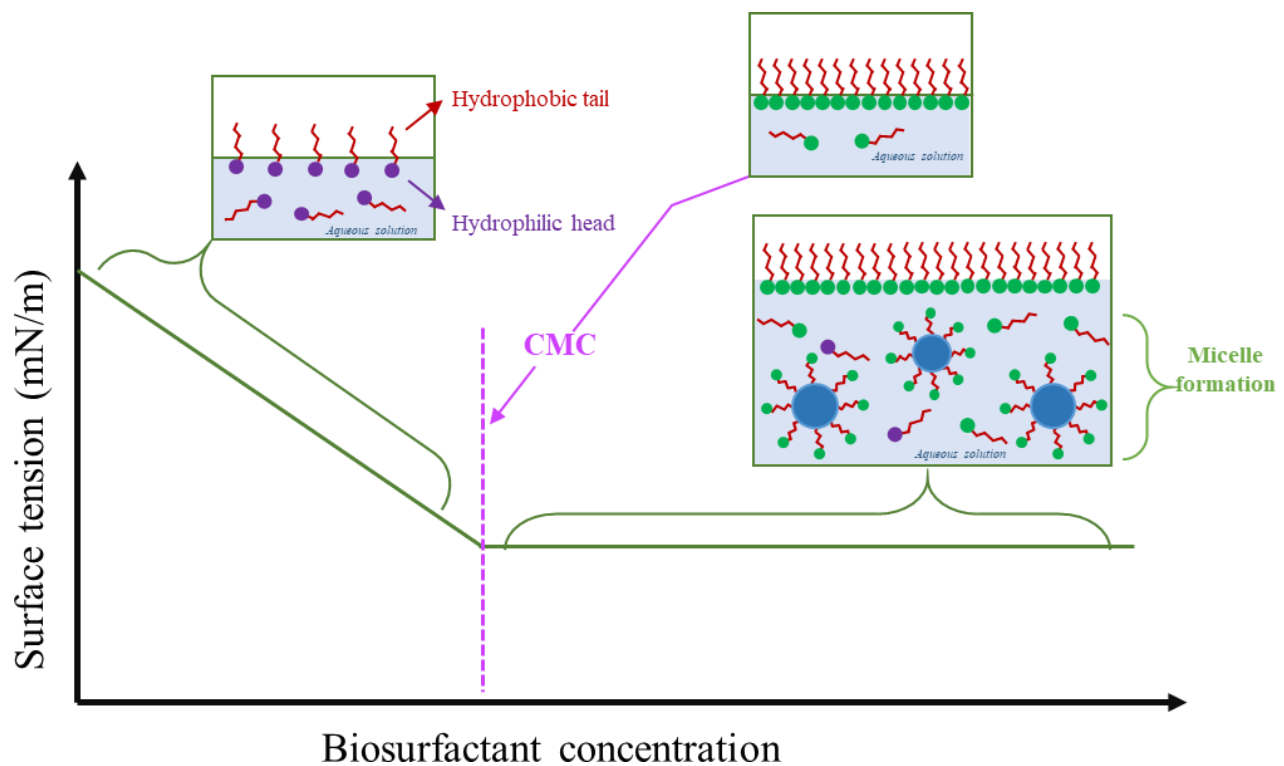
Η ιδιότητα της γαλακτωματοποίησης σε συνδυασμό με τη σταθερότητά τους σε διαφορετικές συνθήκες καθιστούν τις βιοεπιφανειοδραστικές κατάλληλες προς χρήση σε πλήθος εφαρμογών που σχετίζονται τόσο με τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών αλλά και το περιβάλλον (Saharan et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, βιοεπιφανειοδραστικές που προέρχονται από GRAS στελέχη γαλακτικών βακτηρίων μπορούν να προστεθούν σε τρόφιμα στα οποία μέσω της γαλακτωματοποίησης προσφέρουν τελικά προϊόντα με καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (υφή, σύσταση), καθώς επίσης αυξάνουν τον χρόνο συντήρησης αμυλούχων και άλλων προϊόντων π.χ. μπισκότα, μαγιονέζα, γαλακτοκομικά προϊόντα και παγωτά (Nitschke and Costa, 2007).

δ) Χαμηλή Τοξικότητα

Μία ακόμα ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που τις καθιστά ανώτερες σε σχέση με τις χημικά παραγόμενες είναι η χαμηλή τους τοξικότητα, αναφερόμενη κυρίως στην ικανότητα να προκαλούν μόνιμη βλάβη στα ανθρώπινα κύτταρα. Στη μελέτη τους, οι Stipcevic et al. (2005) έδειξαν ότι ο βαθμός τοξικότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών μικροβιακής προέλευσης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη δοσολογία. Πολλές μελέτες αναφέρουν ωστόσο ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες όπως σοφορολιπίδια, ραμνολιπίδια, λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης, και σουρφακτίνη έχουν χαμηλή τοξικότητα στα ζωικά κύτταρα σε σχέση με τις χημικώς παραγόμενες επιφανειοδραστικές (Adu et al., 2020). Η αύξηση της χρήσης των βιοεπιφανειοδραστικών στα καλλυντικά αποτελεί επίσης απόρροια της χαμηλής τοξικότητας και της απουσίας εμφάνισης αλλεργιών και ερεθισμών στο δέρμα (Drakontis et al., 2020).

ε) Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC)

Ως κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) ορίζεται η συγκέντρωση πέραν της οποίας οποιαδήποτε αύξηση στην συγκέντρωση των βιοεπιφανειοδραστικών δεν επιφέρει επιπλέον μεταβολή στην επιφανειακή του τάση του διαλύματος. Η κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων είναι διαφορετική για κάθε βιοεπιφανειοδραστική. Εξαρτάται από τη χημική δομή των παραγόμενων μορίων και τα συσσωματώματα που αυτά δημιουργούν αυτόματα στο σύστημα που βρίσκονται. Η τιμή της CMC εξαρτάται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που απαρτίζουν τα συσσωματώματα, την πολικότητα, το ιοντικό φορτίο και την θερμοκρασία του διαλύτη και καθορίζει την αποτελεσματικότητα μιας βιοεπιφανειοδραστικής. Με την εύρεση αυτής της συγκέντρωσης μπορεί να προσδιοριστεί και η κατάλληλη συγκέντρωση βιοεπιφανειοδραστικών που πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε μια εφαρμογή.



Εικόνα 2 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC)

στ) Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η αντιμικροβιακή δράση των βιοεπιφανειοδραστικών εξαρτάται από τη δομή τους, τη συγκέντρωσή τους και τα υπό μελέτη βακτήρια (Lydon, 2017). Για παράδειγμα οι Nashida et al. (2018) έδειξαν ότι η αντιμικροβιακή δράση των λιπιδίων μαννόζης και ερυθριτόλης (MELs) εξαρτάται από το μέγεθος την ανθρακικής αλυσίδας και πιο συγκεκριμένα αναφέρουν πως αυτά με αλυσίδα από 8 έως 10 άνθρακες εμφάνιζαν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.

Αντίστοιχα, η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων ειδών βιοεπιφανειοδραστικών μελετάται τελευταία εκτενώς στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα τα παραγόμενα γλυκολιπίδια, ραμνολιπίδια και σοφορολιπίδια από

στελέχη όπως το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* και η ζύμη *Candida apicola* φαίνεται να εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες σε θετικά και αρνητικά κατά Gram στελέχη όπως *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* και *S. faecalis*, αλλά και σε στελέχη που σχετίζονται με στοματικές παθήσεις όπως ο *S. mutans*. Σχετικά με τα σοφορολιπίδια, φαίνεται να είναι αρκετά πιο ισχυρά έναντι σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπως τα *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, και *Streptococcus mutans* σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως τα *Proteus mirabilis*, *E. coli*, και *Salmonella enterica* διότι για την αντιμετώπισή τους απαιτείται 4 φορές μικρότερη συγκέντρωση (Shu, 2021). Βιοεπιφανειοδραστικές που προέρχονται από γαλακτικά βακτήρια έχουν μελετηθεί σχετικά λιγότερο. Τέτοια παραδείγματα είναι η αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζουν οι συνδεδεμένες με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικές από το στέλεχος *Lactobacillus agilis* σε στελέχη *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *S. agalactiae* σε συγκεντρώσεις 5 mg/mL. Άλλες μελέτες αφορούν την αντιμικροβιακή δράση που προκύπτει από βιοεπιφανειοδραστικές των στελεχών *L. jensenii* και *L. rhamnosus* οι οποίες φάνηκαν αρκετά αποτελεσματικές (μέχρι και 100%) όταν αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 50 mg/mL έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία παρουσιάζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά, μεταξύ των οποίων και το βακτήριο *E. coli*, (Sambanthamoorthy, 2014).

2.4. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά μέσα ζύμωσης

Το κόστος για την παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογικής προέλευσης, όπως είναι οι βιοεπιφανειοδραστικές, εξαρτάται από τρεις βασικούς παράγοντες, που είναι το κόστος για την προμήθεια πρώτων υλών, το κόστος που απαιτείται για την ανάκτηση του προϊόντος (downstream) και τους συντελεστές απόδοσης των πρώτων υλών σε προϊόν. Μάλιστα στις περισσότερες βιοτεχνολογικές διεργασίες το κόστος για την αγορά πρώτων υλών καταλαμβάνει το 10- 30% του συνολικού κόστους παραγωγής. Για τη μείωση αυτού του κόστους εφαρμόζονται σε παγκόσμια κλίμακα κάποιες κοινές πρακτικές. Οι πρακτικές αυτές σχετίζονται με τη βελτιστοποίηση της διεργασίας, την ανάκτηση και τον καθαρισμό του προϊόντος, την επιλογή γενετικά τροποποιημένων στελεχών που προσφέρουν μεγαλύτερες παραγωγικότητες και τη χρήση αποβλήτων ως υποστρώματα ανάπτυξης, όπως το τυρόγαλα, ή η μελάσα, που περιέχουν τις απαραίτητες πηγές άνθρακα, αζώτου και άλλων θρεπτικών συστατικών (Mukherjee et al., 2006; Rodrigues, 2006).

2.4.1. Τυρόγαλα

Το τυρόγαλα αποτελεί το κύριο υγρό απόβλητο που προκύπτει από τη διαδικασία της τυροκόμησης. Το απόβλητο αυτό είναι υγρό και έχει υποκίτρινο χρώμα το οποίο οφείλεται στην βιταμίνη ριβοφλαβίνη (B2) που υπάρχει σε αυτό (De Wit, 2001). Σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης, (625/30-3-1978), τυρόγαλα ονομάζεται το προϊόν που λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς και/ή φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης (Ανυφαντάκης, 2004). Βασικοί παράγοντες για την ποιότητα και τη σύσταση του τυρογάλακτος αποτελούν τόσο το ζώο από το οποίο προήλθε το γάλα (αγελαδινό, πρόβειο, βουβαλίσιο, κατσικίσιο) όσο και η διατροφή, η ηλικία, το στάδιο γαλακτοπαραγωγής και η κατάσταση της υγείας του ζώου

(De Wit, 2001). Όσον αφορά στη σύσταση του τυρογάλακτος, αυτή διαφέρει και εξαρτάται τόσο από το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, όσο και από τον τύπο του τυριού από το οποίο προέρχεται. Σε γενικές γραμμές, το κύριο συστατικό του τυρογάλακτος είναι η λακτόζη (4,50-5,30% w/v), ακολουθούμενη από πρωτεΐνες (0,80-1,50% w/v) και λίπος (0,2-1,3% w/v). Επιπλέον, το τυρόγαλα εμπεριέχει και ανόργανα άλατα (κυρίως ασβέστιο και φώσφορο) σε ποσοστό 0,50-0,60% (w/v), αλλά και μικρές ποσότητες γαλακτικού οξέος (0,11-0,14% w/v) (Ανυφαντάκης, 2004).

Από τους 158,2 εκατ. τόνους γάλακτος που παρήχθησαν στην Ευρώπη το 2019, το 93,5% χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, τα 2/3 εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τυριών και βουτύρου (Eurostat, 2020). Για κάθε 1 kg τυριού που παράγεται, προκύπτουν περίπου 9 kg τυρογάλακτος, αναλογία που εξαρτάται από το είδος του τυρογάλακτος, την γεωγραφική περιοχή και τη διεργασία από την οποία προήλθε (παραγωγή φρέσκων τυριών, μαλακών, ημίσκληρων, σκόνη γάλακτος, συμπυκνώματα πρωτεϊνών κ.ά). Οι αλλαγές που προέκυψαν στον κλάδο της κτηνοτροφίας και η ανάπτυξη μεγάλων βιομηχανιών παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τυρογάλακτος, οι οποίες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σίτιση των χοίρων όπως τα παλαιότερα χρόνια. Τα νέα αυτά δεδομένα δημιούργησαν άλλες ανάγκες που έχουν να κάνουν με τη διάθεση του τυρογάλακτος. Η μεταφορά του έγινε οικονομικά ασύμφορη μιας και οι τεράστιες ποσότητες αυξάνουν το κόστος μεταφοράς του αποβλήτου και αυτό οδήγησε σε απόρριψη του τυρογάλακτος στο υδάτινο οικοσύστημα (Ανυφαντάκης, 2004). Το υψηλό οργανικό φορτίο του τυρογάλακτος το καθιστά απόβλητο υψηλού ρυπαντικού φορτίου μιας και η συγκέντρωση του σε BOD₅ (ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για τη βιολογική οξείδωση του τυρογάλακτος σε διάστημα 5 ημερών) είναι 50.000- 80.000 mg/L ενώ αντίστοιχα η συγκέντρωσή του σε COD (ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση του τυρογάλακτος) είναι 40.000- 60.000 mg/ L. Υπολογίζεται ότι η παραγόμενη ποσότητα τυρογάλακτος παγκοσμίως για το 2016 ήταν 200 εκ. τόνοι, ποσότητα η οποία φαίνεται να αυξάνεται κατά 3% κάθε χρόνο τα τελευταία 20 χρόνια (Larra et al., 2019). Η απόρριψη λοιπόν, ενός τέτοιου αποβλήτου στο περιβάλλον και μάλιστα σε τέτοιες ποσότητες έχει ιδιαίτερα αρνητικές επιπτώσεις όπως ο ευτροφισμός, η αύξηση της τοξικότητας, ο θάνατος ψαριών λόγω έλλειψης οξυγόνου και η αλλοίωση της βιοποικιλότητας (Prazeres et al., 2012).

Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος εμφανίζει αρκετές δυσκολίες, δεδομένου ότι το μικροβιακό του φορτίο το καθιστά αρκετά ευπαθές σε περίπτωση που δεν παστεριωθεί αμέσως μετά την παραγωγή του. Η σύστασή του, όπως προαναφέρθηκε, είναι ευμετάβλητη και δεν περιέχει αρκετά στερεά συστατικά γεγονός που αυξάνει το κόστος επεξεργασίας του (Ανυφαντάκης, 2004). Παρά τις δυσκολίες αυτές, η περαιτέρω αξιοποίηση του έχει κεντρίσει ιδιαίτερα το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια αφού συνδυάζει την απορρύπανση ενός αποβλήτου, με ταυτόχρονη αξιοποίηση όλων των συστατικών του προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Εφαρμόζοντας την κατάλληλη ενζυμική, χημική και μικροβιακή μέθοδο, ή συνδυασμό αυτών, η λακτόζη, οι πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα συστατικά του τυρογάλακτος μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλής προστιθέμενης αξίας τελικά προϊόντα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτούσια ή να προστεθούν σε άλλα. Υπάρχουν

αρκετές σχετιζόμενες με τις μικροβιακές ζυμώσεις μελέτες, όπου τα στελέχη αξιοποιούν τη λακτόζη του τυρογάλακτος προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης, μικροβιακού λίπους, (Papanikolaou, 2011) ενδο-πολυσακχαριτών (Banaszewska, 2014; Pescuma, 2015) κ.ά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει και για νεότερες διεργασίες οι οποίες δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως μέχρι στιγμής, αλλά μελετώνται και εξελίσσονται διαρκώς. Τέτοιες διεργασίες περιλαμβάνουν την αξιοποίηση της λακτόζης του τυρογάλακτος προς παραγωγή πρεβιοτικών ολιγοσακχαριτών, εστέρων λιπαρών οξέων, βιοχρωστικών, φαρμακευτικών μανιταριών και βιοεπιφανειοδραστικών αλλά και την αξιοποίηση της πρωτεΐνης για παραγωγή προϊόντων, όπως εδώδιμες μεμβράνες (Larra et al, 2019).

Η χρήση αυτούσιου του τυρογάλακτος για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών προϋποθέτει τη χρήση μικροοργανισμών που καταναλώνουν τη λακτόζη και τα δύο ισόμερη σάκχαρα που προκύπτουν από την υδρόλυσή της (γλυκόζη, γαλακτόζη). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με χρήση γαλακτικών βακτηρίων από τους Rodrigues et al. (2006), σχετικά με τη βελτιστοποίηση του υποστρώματος δείχνουν πως η χρήση της λακτόζης αντί της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στη ζύμωση έχει σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερες παραγωγικότητες βιοεπιφανειοδραστικών. Τα γαλακτικά βακτήρια για να καταναλώσουν τη λακτόζη χρησιμοποιούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και άλλων μεταβολιτών (διακετύλιο, βακτηριοσίνες), μεταξύ των οποίων και συνδεδεμένες με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικές. Οι συγκεντρώσεις των βιοεπιφανειοδραστικών αυτών μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την ακριβή σύσταση του τυρογάλακτος ή τον εμπλουτισμό τον οποίο ενδεχομένως θα υποστεί.

2.4.2. Ελαιούχα υποστρώματα

Η χρήση ελαιούχων υποστρωμάτων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών έχει μελετηθεί αρκετά για την παραγωγή ραμνολιπιδίων, σοφορολιπιδίων και λιπιδίων μαννόζης-ερυθριτόλης. Πρόκειται για έλαια φυτικής προέλευσης όπως το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο και το καλαμποκέλαιο τα οποία προέρχονται από την επεξεργασία των αντίστοιχων καρπών. Τα υποστρώματα αυτά είναι απόβλητα λάδια που προέρχονται από δυλιστήρια, τη βιομηχανία τροφίμων, τη βιομηχανία παραγωγής σαπώνων κ.ά. Τα ελαιούχα υποστρώματα είναι αρκετά αποτελεσματικά για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών με την ανάπτυξη σε αυτά διάφορων μικροοργανισμών (Kaur, 2015). Τα έλαια που έχουν αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται είναι συχνά φυτικά έλαια τα οποία συμμετέχουν και στη διατροφή του ανθρώπου. Αυτόπέρα από το ηθικό πρόβλημα που προκαλεί (χρήση εδώδιμων λιπαρών υλών ως υποστρώματα και όχι ως τρόφιμα) προκαλεί και σοβαρή αύξηση στο κόστος παραγωγής. Η λύση σε αυτό είναι η χρήση ελαίων τα οποία δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, όπως είναι το καστορέλαιο, το λάδι jojoba και το λάδι jatropa ή ακόμα πιο χρήσιμη θα ήταν η ανάπτυξη και η εξέλιξη τεχνολογιών στις οποίες θα χρησιμοποιούνται απόβλητα λιπαρών υλών, όπως λάδια που έχουν χρησιμοποιηθεί για τηγάνισμα σε βιομηχανικό ή οικιακό επίπεδο. Με την εφαρμογή τέτοιας στρατηγικής επιτυγχάνεται μείωση του κόστους παραγωγής (λόγω κόστους πρώτων υλών) και ταυτόχρονη απαλλαγή του περιβάλλοντος από τέτοιου είδους απόβλητα που θα είχαν γι' αυτό δυσμενείς συνέπειες (Mukherjee, 2006).

2.4.3. Αγροτοβιομηχανικά και αμυλούχα υποστρώματα

Άλλα απόβλητα τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν υπόστρωμα για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών προέρχονται από διάφορες βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων. Τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν από την επεξεργασία πατάτας και άλλων πρώτων υλών που είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, όπως η κασάβα έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το βακτήριο *Bacillus subtilis* (Mukherjee et al., 2006). Ακόμη, η μελάσα που προέρχεται από τη βιομηχανία παραγωγής ζάχαρης, εκτός από υδατάνθρακες (σακχαρόζη), περιέχει και άλλα μέταλλα και βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού που θα επιτελέσει τη ζύμωση. Ο καθαρισμός της μελάσας γίνεται με χημικές διεργασίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από πλήθος μικροοργανισμών για διάφορες ζυμώσεις μεταξύ των οποίων και γαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (Mouafo et al., 2018). Τέλος, άλλα αμυλούχα απόβλητα που δύνανται να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα, προκύπτουν από μονάδες παραγωγής τροφίμων, όπως μίγματα νερού και υδατανθράκων που απομένουν από την επεξεργασία του ρυζιού, των δημητριακών και άλλων αμυλούχων σπόρων όπως το καλαμπόκι, όμως η χρήση τους για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών χρήζει περαιτέρω έρευνας (Mukherjee et al., 2006).

2.4.4. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα

Τα απόβλητα που προκύπτουν από το κλάδεμα των καλλιεργειών π.χ. αμπελιών (ξερά φύλλα, μικρά κλαδιά), καταλήγουν να καίγονται από τους καλλιεργητές, με αποτέλεσμα την εκπομπή αέριων ρύπων, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, οι οποίοι συνδέονται με το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Τα απόβλητα αυτά είναι πλούσια σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη που τα καθιστούν κατάλληλα ώστε να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα για διάφορες ζυμώσεις. Για την διάσπαση των ημικυτταρινών και την ανάκτηση των σακχάρων της (ξυλόζη, γλυκόζη) το λιγνοκυτταρινούχο απόβλητο υφίσταται συνήθως όξινη υδρόλυση. Τα υδρολύματα αυτά έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών και άλλων προϊόντων, όπως το γαλακτικό οξύ (Bustos et al., 2005; Vecino et al., 2015).

2.4.5. Συνθετικά υποστρώματα

Εκτός από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συνθετικά υποστρώματα. Η πρακτική αυτή, δεν ενδείκνυται σε περίπτωση που σκοπός της διεργασίας είναι η παραγωγή προϊόντων με το χαμηλότερο δυνατό κόστος παραγωγής και ταυτόχρονη αξιοποίηση οποιουδήποτε αποβλήτου. Ανάλογα τον μικροοργανισμό και τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά μπορεί να γίνει η αντίστοιχη επιλογή συνθετικού υποστρώματος. Για παράδειγμα η ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Μάλιστα, ζυμώσεις των *L. paracasei ssp.* και *L.*

paracasei A20 που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το υπόστρωμα είχανσαν αποτέλεσμα τη μείωση της επιφανειακής τάσης κατά 6,4 και 22 mN/m, αντίστοιχα. Η χρήσησυνθετικών υποστρωμάτων μπορεί να είναι αναγκαία κατά τη διεξαγωγή ζυμώσεων με στόχο τη βελτιστοποίηση της ζύμωσης καθώς μπορεί να μελετηθεί η επίδραση οποιουδήποτε συστατικού στημικροβιακή ανάπτυξη και την παραγωγή ή τη σύσταση του τελικού προϊόντος. Χαρακτηριστικά, για τις ζυμώσεις που προαναφέρθηκαν φάνηκε πως ο εμπλουτισμός του μέσου ζύμωσης με εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), ενίσχυσε την ανάπτυξη της βιομάζας, ενώ η προσθήκη πεπτόνης την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (Rodrigues, 2006).

2.5. Ταξινόμηση βιοεπιφανειοδραστικών

Η ταξινόμηση των βιοεπιφανειοδραστικών γίνεται με βάση τη μικροβιακή τους προέλευση, την χημική τους σύσταση και το μοριακό τους βάρος. Σύμφωνα με το τελευταίο κριτήριο, προκύπτουν βιοεπιφανειοδραστικές μεγάλου μοριακού βάρους, όπως σουρφακτίνες και πολυμερή, και μικρού μοριακού βάρους, όπως είναι τα γλυκολιπίδια. Η βασική τους δομή περιλαμβάνει τουλάχιστον από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο άκρο και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αμφίφιλη συμπεριφορά τους. Το υδρόφιλο άκρο των βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να αποτελείται από φώσφορο, υδατάνθρακες, μονο-, ολιγο-, ή πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, καρβοξύλια ή υδροξυλομάδες. Αντίστοιχα στο υδρόφοβο τμήμα τους μπορεί να βρίσκονται κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες ή ύδροξυ λιπαράοξέα με 8-18 άτομα άνθρακα. Όταν η ταξινόμηση των βιοεπιφανειοδραστικών βασίζεται στην βιοχημική τους σύσταση, τότε προκύπτουν υποομάδες που χαρακτηρίζονται ως λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες, πολυμερή, λιπίδια και γλυκολιπίδια. Τα γλυκολιπίδια αποτελούν τα περισσότερα μελετημένα και πιο συνήθη μόρια (Sharma, 2016).

Πίνακας 1 Είδη βιοεπιφανειοδραστικών από διάφορους μικροοργανισμούς (Rodrigues, Teixeira, 2006)

Είδος βιοεπιφανειοδραστικών	Μικροοργανισμός
Ραμνολιπίδια	<i>Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidea</i>
Σοφορολιπίδια	<i>Candida lipolytica, Torulopsis bombicola</i>
Φωσφολιπίδια	<i>Acinetobacter, Thiobacillus thiooxidans</i>
Λιπίδια τρεχαλόζης	<i>Arthrobacter paraffineus, Rhodococcus erythropolis</i>
Λιπίδια μαννόζης και ερυθριτόλης	<i>Candida antarctica</i>
Λιποπεπτίδια	<i>Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens</i>

2.5.1. Γλυκολιπίδια

Η σύσταση αυτής της κατηγορίας είναι η περισσότερο μελετημένη. Τα γλυκολιπίδια συντίθενται από υδατάνθρακες κυρίως μονο- ή ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι συνδέονται με υδροξυ λιπαρά οξέα ή λιπαρά οξέαμακράς ανθρακικής αλυσίδας ενωμένα με εστερικό ή αιθερικό δεσμό, και αποτελούν βιοεπιφανειοδραστικές με έντονη επίδραση στην επιφανειακή τάση. Τα σάκχαρα του υδρόφιλου τμήματος των γλυκολιπιδίων μπορούν να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, μαννόζη, ερυθριτόλη, ραμνόζη κ.ά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ραμνολιπίδια, τα σοφορολιπίδια, λιπίδια τρεχαλόζης (τρεχαλολιπίδια) και λιπίδια μαννόζης ερυθριτόλης (Williams, 2017).

2.5.1.1 Ραμνολιπίδια

Το δομικό σάκχαρο των ραμνολιπιδίων είναι η ραμνόζη. Για το σχηματισμό τους, ένα ή δύο μόρια α-L ραμνόζης συνδέονται με ένα ή δύο υδροξυ λιπαρά οξέα που περιέχουν 8-16 άτομα άνθρακα. Σταραμνολιπίδια, η ραμνόζη συνδέεται με το β-υδροξυ δεκανοϊκό οξύ μέσω γλυκοσιδικού δεσμού ο οποίος βρίσκεται μεταξύ του υδροξυλίου του λιπαρού οξέος και του αναγωγικού άκρου της ραμνόζης (Saharan, 2011). Οι Jarvis και Johnson, το 1949, αναφέρουν για πρώτη φορά την παραγωγή ραμνολιπιδίων από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Στελέχη του βακτηρίου *Burkholderia* έχουν επίσης αναφερθεί για την παραγωγή ραμνολιπιδίων που έχουν στο υδρόφοβο τμήμα τους ένα υδροξυ δεκατετρανοϊκό οξύ (Anda, 2006). Το αντίστοιχο τμήμα στα ραμνολιπίδια από το στέλεχος *B. plantarii* είναι αρκετά ιδιαίτερο και αποτελείται από τρία υδροξυ λιπαρά οξέα (Hormann, 2010).

2.5.1.2 Λιπίδια τρεχαλόζης (τρεχαλολιπίδια)

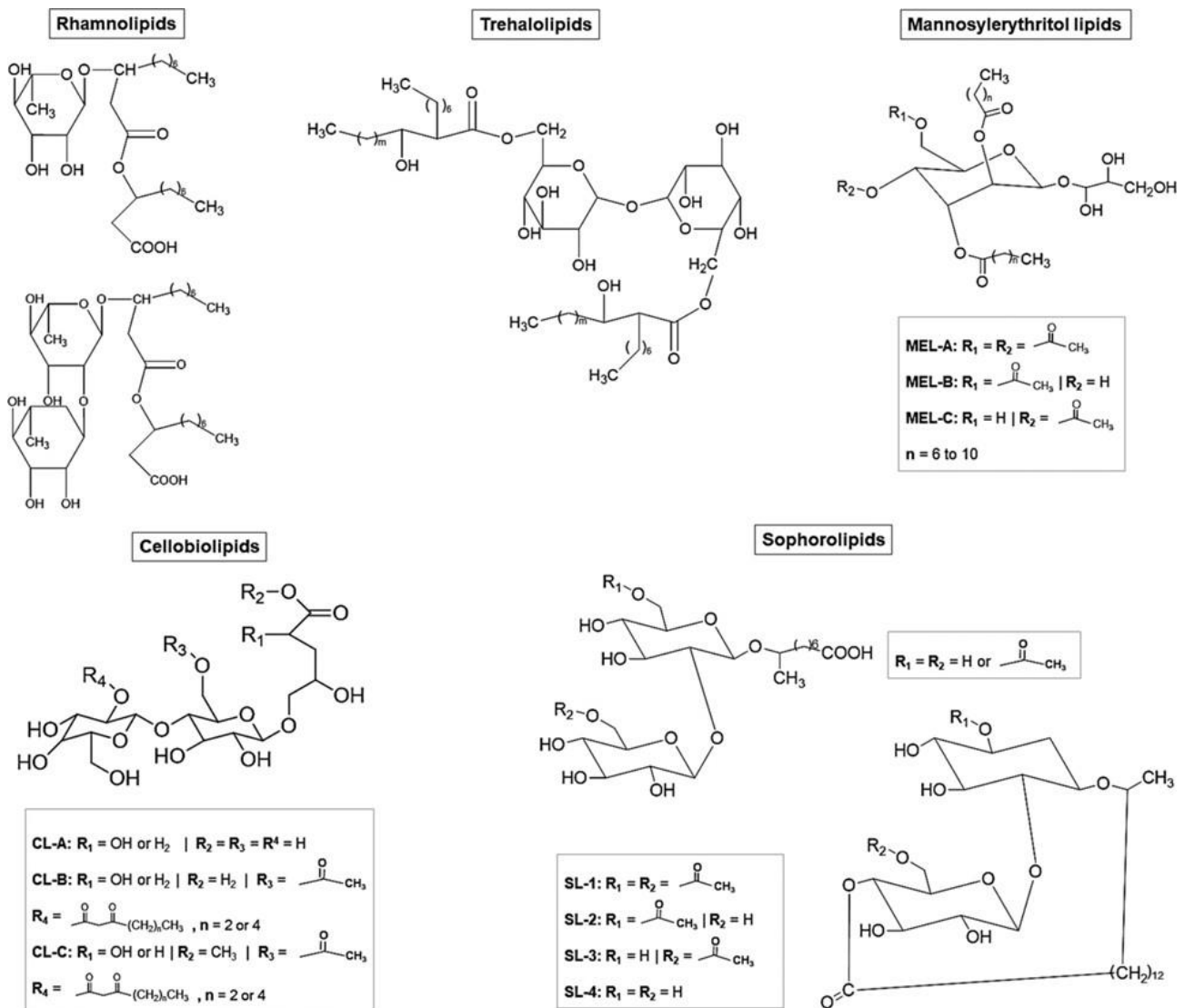
Η τρεχαλόζη είναι ένα είδος μη αναγωγικού σακχάρου, αποτελούμενο από δύο μονομερή γλυκόζης, συνδεδεμένα με α,α-1,1- γλυκοσιδικό δεσμό. Παράγονται από διάφορα στελέχη μικροοργανισμών των ειδών *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., και *Rhodococcus* sp. Για παράδειγμα το βακτήριο *R. erythropolis* έχει βρεθεί πως παράγει συνδεδεμένες με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως λιπίδια τρεχαλόζης. Το ενδιαφέρον σχετικά με την παράγωγή αυτού του είδους των βιοεπιφανειοδραστικών αυξάνεται διαρκώς λόγω τις ιδιότητάς τους να μειώνουν την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση συμβάλλοντας στη διαλυτοποίηση μη αναμίξιμων συστατικών (Sharma, 2021).

2.5.1.3 Σοφορολιπίδια

Αυτό το είδος βιοεπιφανειοδραστικών, παράγεται από μη παθογόνα στελέχη ζυμών. Πρώτη αναφορά στα σοφορολιπίδια και τη δράση τους ως επιφανειοδραστικούς παράγοντες, έγινε από τους Gorin et al., το 1961. Το υδρόφιλο τμήμα των γλυκολιπιδίων αυτών, αποτελείται από το δισακχαρίτη σοφορόζη, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με ένα υδροξύ λιπαρό οξύ μακράς ανθρακικής αλυσίδας. Για τους μικροοργανισμούς που τα παράγουν, φαίνεται πως τα σοφορολιπίδια χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας και ως παράγοντες αντίστασης στην προσβολή από άλλους μικροοργανισμούς. Η αυξανόμενη ανησυχία γύρω από περιβαλλοντικά ζητήματα σε συνδυασμό με τις ιδιότητες των σοφορολιπιδίων, τα καθιστούν κατάλληλη επιλογή για διάφορες εφαρμογές. Τα σοφορολιπίδια είναι βιοαποικοδομήσιμα, χαμηλής τοξικότητας μόρια και διατηρούν τις ιδιότητές τους κατά την έκθεσή τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρόλο που προκαλούν μείωση στην επιφανειακή τάση, δεν μπορούν να δημιουργήσουν γαλακτώματα και η χρήση τους περιορίζεται στην φαρμακευτική (αντιβιοτικά, αντιμυκητιακά σκευάσματα) και την κοσμετολογία (Sharma, 2016).

2.5.1.4 Λιπίδια μαννόζης-ερυθριτόλης

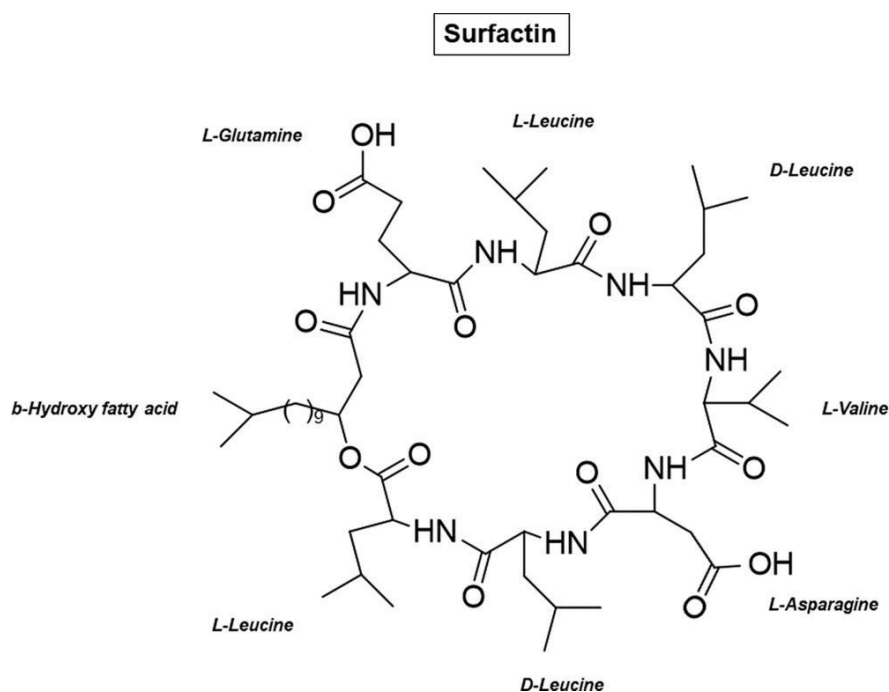
Πρόκειται για βιοεπιφανειοδραστικές που περιέχουν στο υδρόφιλο τμήμα τους μαννόζη και ερυθριτόλη και στο υδρόφοβο τμήμα τους ένα λιπαρό οξύ ή μια ακετυλομάδα. Η παραγωγή των γλυκολιπιδίων αυτών δεν συνδέεται με τη κυτταρική αύξηση και μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την στατική φάση. Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την παραγωγή τους είναι του είδους *Ustilago* sp. και *Pseudozyma* sp. αλλά και το στέλεχος *Schizonella melanogramma*. Στους μικροοργανισμούς αυτούς, τα λιπίδια μαννόζης-ερυθριτόλης λειτουργούν ως αποθήκη ενέργειας. Η μείωση που επιφέρουν στην επιφανειακή τάση του νερού είναι αρκετά σημαντική μιας και η τιμή της φτάνει κάτω από 30 mN/m. Τέλος, παρόλο που οι ιδιότητές τους θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε διάφορες τεχνολογίες, μένει ακόμα να βρεθούν οι κατάλληλες μέθοδοι ώστε να αυξηθεί η παραγωγικότητά τους και να μειωθεί το κόστος παραγωγής τους (Arutchelvi, 2008).



Εικόνα 3 Βασικά είδη βιοεπιφανειοδραστικών (γλυκολιπίδια) (Ribeiro, 2020)

2.5.2. Λιποπεπτίδια και λιποπρωτεΐνες

Οι βιοεπιφανειοδραστικές αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από μεγάλο αριθμό πεπτιδίων συνδεδεμένα με λιπαρό οξύ. Είναι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες και παράγονται στο υγρό της ζύμωσης από στελέχη των βακτηρίων *Bacillus* sp. και *Lactobacillus* sp., αλλά και από ορισμένους ακτινομύκητες. Οι σουρφακτίνες από το βακτήριο *B. subtilis* αποτελούν το χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας και συντίθενται από 7 αμινοξέα L και D διάταξης και λιπαρό οξύ με 13-15 άτομα άνθρακα. Έχουν την ικανότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση από τα 72,8 στα 27,9 mN/m, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ ενδιαφέρον προκαλεί η αντιβακτηριακή, αντική και αντιμυκητιακή δράση τους (Phulprato, 2020).



Εικόνα 4 Βασικές βιοεπιφανειοδραστικές (λιποπεπτιδία και λιποπρωτεΐνες), (Ribeiro, 2020)

2.5.3. Λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια

Πολλά είναι τα στελέχη ζυμών, βακτηρίων και μυκήτων που δύνανται να αναπτυχθούν σε υδρόφοβα υποστρώματα όπως τα αλκάνια, παράγοντας μεγάλες ποσότητες λιπαρών οξέων, και φωσφολιπιδίων με σκοπό την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Σε περιβάλλοντα όπου αναπτύσσονται μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν υδρόφοβα υποστρώματα, όπως οι υδρόγονάνθρακες, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των φωσφολιπιδίων που δομούν τις κυτταρικές μεμβράνες (Hatha, 2007). Στελέχη που παράγουν αυτού του είδους βιοεπιφανειοδραστικές ανήκουν στα είδη *Acinetobacter* sp. και *Aspergillus* sp. (Sharma, 2016).

2.5.4. Πολυμερείς βιοεπιφανειοδραστικές

Υπάρχουν αρκετά πολυμερή που παράγονται από μικροοργανισμούς και έχουν επιφανειοδραστική δράση. Μερικά από αυτά είναι η λιποζάνη, η εμουλσάνη και άλλα σύμπλοκα πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών (Vijayakumar, 2015). Παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *A. calcoaceticus*, ένας καλά μελετημένος μικροοργανισμός που παράγει πολυμερή ετεροπολυσακχαριτών που συνδέονται με λιπαρά οξέα μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Άλλο παράδειγμα είναι η παραγωγή ενός σύνθετου πολυμερούς με 83% υδατάνθρακες και 17% πρωτεΐνες από τη ζύμη *Yarrowia lipolytica* αλλά και άλλα πολυμερή που χαρακτηρίζονται ως μανοπρωτεΐνες και μπορούν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές τροφίμων, λόγω της ιδιότητας της γαλακτωματοποίησης που εμφανίζουν (Sharma, 2016).

2.6. Ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων στην βιοτεχνολογία

2.6.1. Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι μια κατηγορία βακτηρίων που πληρούν αρκετές από τις προϋποθέσεις ώστε να κεντρίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις μέρες μας. Αναφορικά, η μείωση των αποθεμάτων πετρελαίου και η αναγκαιότητα μείωσης της περιβαλλοντικής ρύπανσης οδήγησαν στην εύρεση εναλλακτικών τρόπων κάλυψης των αναγκών σε χημικά προϊόντα, με τη χρήση μικροοργανισμών. Επιπλέον η αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων είναι ένας αρκετά σημαντικός παράγοντας ο οποίος πρέπει να βρίσκεται στο επίκεντρο για την προστασία του περιβάλλοντος. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω παραμέτρων οδηγεί στη διεξαγωγή ζυμώσεων χρησιμοποιώντας αγροτοβιομηχανικά απόβλητα ως υποστρώματα για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών διαφόρων μικροοργανισμών. Παράλληλα, λαμβάνεται υπ' όψη η παραγωγή προϊόντων και μάλιστα, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των προϊόντων που προκύπτουν από μια ζύμωση τόσο μεγαλύτερο ενδιαφέρον κατέχει (Qui, 2018). Η ζύμωση των γαλακτικών βακτηρίων είναι αντικείμενο μελέτης το οποίο συνδυάζει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα απόβλητα και σαν αποτέλεσμα αυτής προκύπτουν περισσότερα από ένα προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές που σχετίζονται με το περιβάλλον, την υγεία και τα τρόφιμα (Αγγελής, 2007).

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι προαιρετικά αναερόβια, ως προς τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο, και ανήκουν στην ομάδα των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Είναι ραβδόμορφα ή έχουν τη μορφή κόκκων, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα οξέα, και είναι αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής τους βρίσκεται μεταξύ των 30 °C και 40 °C και βασικό τους χαρακτηριστικό είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος ως κύριο προϊόν του μεταβολισμού των υδατανθράκων (Salveti, 2018). Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια κατατάσσονται στη συνομοταξία *Firmicutes*, και στην τάξη *Lactobacillales*. Η τάξη των *Lactobacillales* περιλαμβάνει έξι οικογένειες: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* και *Streptococcaceae*, πάνω από 30 γένη και περισσότερα από 300 είδη, αριθμός που συνεχίζει να αυξάνεται. Το γένος *Bifidobacterium* (οικογένεια *Bifidobacteriaceae*) περιλαμβάνεται επίσης στην ομάδα LAB, αν και ανήκει στο γένος *Actinobacteria*. Τα βακτήρια αυτά απαντώνται σε αρκετά συστήματα που είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, ενώ πλείστες είναι οι αναφορές για απομονώσεις τέτοιων στελεχών από τη γαστρεντερική και κοιλιακή κοιλότητα ανθρώπων, το έδαφος, ζυμούμενα τρόφιμα, κομπόστ κ.ά. (Rodriguez, 2019). Τέλος, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) έχουν αναγνωρίσει πολλά είδη γαλακτικών βακτηρίων αλλά και προϊόντα του μεταβολισμού τους, ως ασφαλή προς κατανάλωση (GRAS Generally Recognised as Safe) (Russo, 2017).

2.6.2. Γαλακτική ζύμωση

Η γαλακτική ζύμωση αποτελεί μια διεργασία αυξημένου οικονομικού ενδιαφέροντος. Διεξάγεται από Gram θετικά βακτήρια που κυρίως δεν συνθέτουν την καταλάση. Ανάλογα με τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των σακχάρων του υποστρώματος, ορίζεται η αντίστοιχη ζύμωση ως ετεροζυμωτική ή ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση. Κατά την πρώτη τα γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν τη μισή περίπου ποσότητα σακχάρου που καταναλώνουν σε γαλακτικό οξύ και άλλη μισή μετατρέπεται σε CO₂, οξικό οξύ και αιθανόλη. Τα βακτήρια αυτά, στα οποία δεν παρίσταται το ένζυμο αλδολάση, χρησιμοποιούν τη μεταβολική οδό της φωσφοροακετολάσης, η οποία παράγει ακετυλο-P οξύ και 3- P γλυκεριναλδεΐδη. Απουσία οξυγόνου το ακετυλο-P οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη μέσω αντίδρασης που αναγεννά NAD⁺. Κατά την αντίδραση αυτή, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί παράγουν ATP. Αντίστοιχα η 3- P γλυκεριναλδεΐδη μέσω της καταβολικής οδού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ, από το οποίο μέσω της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης παράγεται το γαλακτικό οξύ. Στη ζύμωση των ομοζυμωτικών βακτηρίων τα σάκχαρα μετατρέπονται σχεδόν εξ' ολοκλήρου σε γαλακτικό οξύ (80-98%). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν διαθέτουν το ένζυμο φωσφορακετολάση και έτσι μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης παράγεται μόνο το γαλακτικό οξύ. Η ζύμωση αυτή είναι αρκετά διαδεδομένη και σε αυτήν βασίζονται διάφορες εφαρμογές/τεχνολογίες για την παραγωγή φυτικών, ζωικών και γαλακτοκομικών προϊόντων, (βρώσιμες ελιές, αλλαντικά, γιαούρτι), γαλακτικού οξέος κ.ά (Αγγελής, 2007).

2.6.3. Προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης

Τα γαλακτικά βακτήρια συμμετέχουν τόσο σε ζυμώσεις στερεής όσο και σε υγρής κατάστασης. Περισσότερο όμως, έχουν μελετηθεί και εφαρμοστεί βιομηχανικά οι ζυμώσεις υγρής κατάστασης. Οι ζυμώσεις αυτές στοχεύουν στην παραγωγή εξωκυτταρικών μεταβολιτών όπως το γαλακτικό οξύ, οι βακτηριοσίνες και η αιθανόλη. Ακόμη, ζυμώσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν, για την παραγωγή βιομάζας με προβιοτική δράση αλλά και για την παραγωγή μεταβολιτών που βρίσκονται συνδεδεμένοι με τη βιομάζα, όπως οι βιοεπιφανειοδραστικές. Τα προϊόντα αυτά ανακτώνται και καθαρίζονται είτε από το υπερκείμενο της ζύμωσης, είτε από τη βιομάζα μετά την εφαρμογή κατάλληλων φυσικοχημικών μεθόδων (Pinu, 2017).

Βασικό προϊόν της γαλακτικής ζύμωσης, είναι το γαλακτικό οξύ. Αποτελεί υδατοδιαλυτή οργανική ένωση, λευκού χρώματος, με μοριακό τύπο C₃H₆O₃. Είναι χειρόμορφο, αποτελείται δηλαδή από δύο εναντιομερή που ονομάζονται L και D γαλακτικό οξύ ή και ως ισομοριακό μείγμα των δύο αυτών εναντιομερών ως LDγαλακτικό οξύ. Μπορεί να παραχθεί χημικά ή βιοτεχνολογικά που είναι και ο πιο διαδεδομένος τρόπος παγκοσμίως. Η παραγωγή του είναι αρκετά εύκολη και γίνεται με συνεχείς, ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες και ασυνεχείς- κλειστού τύπου ζυμώσεις. Αρκετό ενδιαφέρον έχει η παραγωγή του γαλακτικού οξέος σε συνδυασμό με την αύξηση της βιομάζας για την παραγωγή προβιοτικών στελεχών αλλά και ταυτόχρονα με άλλους μεταβολίτες (Gomez, 2020).

Ορισμένα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από την προβιοτική τους ικανότητα. Με τον όρο αυτό εννοούνται ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν βρεθούν σε συγκεκριμένη ποσότητα σε ένα περιβάλλον

επιφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή τους σύμφωνα με τον FAO/WHO (Hill, 2014). Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον για την παραγωγή τέτοιων στελεχών είναι διαρκώς αυξανόμενο. Τα προβιοτικά εισάγονται σε τρόφιμα ως πρόσθετα για να προσφέρουν οφέλη στην υγεία των καταναλωτών, όπως η διατήρηση υγιούς εντερικής μικροχλωρίδας, η μείωση στα επίπεδα της κακής χοληστερόλης και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού (Tudó, 2019). Ακόμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτούσια ή ως πρόσθετα σε φαρμακευτικά σκευάσματα ή σαν συμπληρώματα διατροφής. Τα προβιοτικά στελέχη, παράγουν αντιμικροβιακής δράσης μεταβολίτες όπως οι βακτηριοσίνες, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και οργανικά οξέα. Επιπλέον είναι αρκετά χρήσιμα για την αντιμετώπιση ή την πρόληψη γαστρεντερολογικής, δερματικής και γυναικολογικής φύσης παθήσεων (Lolou, 2019; Tudó, 2019). Τα περισσότερα προβιοτικά στελέχη που είναι διαθέσιμα στην αγορά ανήκουν στα γένη *Lactobacilli*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, και *Bifidobacterium* ενώ μελετώνται και άλλα στελέχη από άλλα γένη βακτηρίων ως προς αυτήν τους την ιδιότητα (Fiocco, 2019). Η προβιοτική δράση μελετάται μέσω διαφόρων δοκιμών, όπως η αντοχή τους σε χαμηλές τιμές pH, η αντίσταση παρουσία χολικών αλάτων, η ανταγωνιστική τους δράση έναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς, και άλλα (Ruiz, 2014). Ιδιαίτερα σημαντική όμως, είναι η ανάλυση του γονιδιώματός τους και η ταυτοποίησή του μέσω μοριακών τεχνικών (Moraes, 2012).

Τα προϊόντα της γαλακτικής ζύμωσης όπως αναφέρθηκε είναι αρκετά και σε πλήθος και σε χρησιμότητα. Οι βακτηριοσίνες για παράδειγμα, είναι μικρά πεπτίδια, χαμηλού μοριακού βάρους αποτελούμενα από 20-60 αμινοξέα με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι κυρίως σε Gram θετικά βακτήρια. Οι ουσίες αυτές μπορούν να αναστείλουν τη δράση ανταγωνιστικών παθογόνων μικροοργανισμών, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό σε διαδικασίες όπου τα στελέχη που τις παράγουν χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κάποιας βιοτεχνολογικής διεργασίας. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών των ανταγωνιστών, ενώ εμπορικές εφαρμογές είναι διαθέσιμες μόνο για τη νισίνη και την πεδιοσίνη, ως πρόσθετα τροφίμων. Άλλα προϊόντα που παράγονται σε διάφορα στάδια της ζύμωσης ορισμένων στελεχών, μπορεί να είναι κάποιοι εξωπολυσακχαρίτες οι οποίοι δύνανται να αξιοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές ως βελτιωτικά υφής. Ακόμη, προϊόν μπορούν να αποτελέσουν και τα λιποτειχοϊκά οξέα στο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων και να προσδώσουν την αντιμικροβιακή τους δράση σε εφαρμογές τροφίμων και φαρμάκων (Gomez, 2020).

2.7. Συνθετικές επιφανειοδραστικές και βιοεπιφανειοδραστικές

Ο τρόπος λειτουργίας των συνθετικών ή χημικών επιφανειοδραστικών και των βιοεπιφανειοδραστικών είναι παρόμοιος μιας και στη βασική δομή και των δύο περιλαμβάνεται ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα. Στην περίπτωση των χημικών επιφανειοδραστικών το υδρόφοβο τμήμα είναι συνήθως κάποια υδρογονανθρακική αλυσίδα, ενώ σε αυτή των βιοεπιφανειοδραστικών είναι συνήθως αλυσίδες λιπαρών οξέων (Singh, 2007). Οι χημικές επιφανειοδραστικές αποτελούν πετροχημικά παράγωγα ενώ οι βιοεπιφανειοδραστικές παράγονται από μεταβολικές διεργασίες των μικροοργανισμών (Saharan, 2011). Η χρήση τους εξαρτάται από την εφαρμογή στην οποία πρόκειται να αξιοποιηθούν. Οι βιοεπιφανειοδραστικές πλεονεκτούν αρκετά διότι η προέλευσή τους επιτρέπει

εν δυνάμει την εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Επιπλέον είναι βιοαποικοδομήσιμες, χαμηλής τοξικότητας και έχουν την ικανότητα να παραμένουν λειτουργικές ακόμη και μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας και συγκέντρωσης άλατος. Τέλος, η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών μπορεί να συνδυαστεί με την αξιοποίηση διαφόρων αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων και της γεωργίας μειώνοντας ταυτόχρονα το κόστος παραγωγής τους και την επιβάρυνση του περιβάλλοντος από αυτά (Akbari, 2018). Τα μειονεκτήματα που έχουν έναντι των χημικών επιφανειοδραστικών άπτονται της διαθεσιμότητάς του και του κόστους αγοράς και παραγωγής. Οι δύο αυτοί παράγοντες χρήζουν περισσότερης μελέτης και προσοχής ώστε να επιτευχθούν μεγαλύτερες παραγωγικότητες και μείωση του κόστους.

2.8. Εφαρμογές

Πολλές από τις ιδιότητες που εμφανίζουν οι βιοεπιφανειοδραστικές τους προσδίδουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους σε μεγάλο πλήθος εφαρμογών. Η γαλακτωματοποίηση, η χαμηλή τοξικότητα, η δυνατότητα βιοαποικοδόμησής τους, η σταθερότητα σε διαφορετικές συνθήκες είναι βασικές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών αλλά και σε άλλες εφαρμογές που σχετίζονται με το περιβάλλον όπως η ανάκτηση υδρογονανθράκων από το χερσαίο και υδάτινο οικοσύστημα (Sharma et al., 2015; Marchant and Banat, 2012; Van Hamme et al., 2006). Σημαντικότερες από τις εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών μπορούν να θεωρηθούν η αντιμικροβιακή τους δράση αλλά και εφαρμογές τους που σχετίζεται με την ιδιότητά τους να παρεμποδίζουν την πρόσφυση των κυττάρων στις επιφάνειες. Αρκετό ενδιαφέρον όμως, όπως αναφέρεται παρακάτω, εμφανίζουν και οι εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα και την παραγωγή νέων βελτιωμένων προϊόντων.

2.8.1. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στα τρόφιμα

Για την παραγωγή ενός προϊόντος από τις βιομηχανίες τροφίμων είναι απαραίτητο να πληρούνται βασικές προϋποθέσεις, μεταξύ των οποίων το προϊόν αυτό να είναι αποδεκτό από τον καταναλωτή και ασφαλές για την υγεία του (García, 2020). Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών για τρόφιμα που αποτελούνται από φυσικά συστατικά, έχει ενισχύσει στις μέρες μας την ανάγκη εύρεσης νέων συστατικών φυτικής προέλευσης, όπως το αραβικό κόμμι, η λεκιθίνη σόγιας και το κόμμι χαρουπιού ή κόμμι γκουάρ (Hasenhuettl, 1997). Τα συστατικά αυτά χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές τροφίμων λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων που προσφέρουν, όπως η δημιουργία γαλακτωμάτων και η σταθεροποίηση αυτών. Τα συστατικά αυτά ενδέχεται να χάσουν αυτές τους τις ιδιότητες σε περιπτώσεις όπου το τρόφιμο εκτεθεί σε θερμική επεξεργασία με ακτινοβολία ή μικροκύματα. Συνεπώς, η εύρεση νέων συστατικών όπως οι βιοεπιφανειοδραστικές που δύνανται να προσδώσουν βελτιωμένες ιδιότητες ως παράγοντες γαλακτωματοποίησης, σταθεροποίησης, αλλά και ως αντιοξειδωτικοί ή ακόμα και αντιμικροβιακοί παράγοντες στα τρόφιμα κρίνεται αναγκαία (Faustino, 2019).

Στα τρόφιμα, που αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια, χρησιμοποιούνται συχνά

πρόσθετα συστατικά, κυρίως γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές. Ως εκ τούτου, οι βιοεπιφανειοδραστικές δύνανται να έχουν αρκετές εφαρμογές στον κλάδο των τροφίμων δεδομένης της ικανότητάς της γαλακτωματοποίησης. Οι βιοεπιφανειοδραστικές καταφέρνουν να ενώσουν μη αναμίξιμα συστατικά διασπείροντας ένα υγρό μέσα σε ένα άλλο υγρό, δημιουργώντας ομοιογενές σύστημα που θα παραμείνει σταθερό με το πέρασμα μεγάλων χρονικών περιόδων, ακόμη και ετών (Ριτζούλης, 2011), χωρίς να επηρεάζονται από περιβαλλοντικές αλλαγές. Αν και οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να αποτελέσουν μια εναλλακτική πρόταση γαλακτωματοποιητών η έρευνα και οι εφαρμογές σχετικά με αυτή τους την ιδιότητα είναι αρκετά περιορισμένη. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα στα οποία μελετάται προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών.

2.8.1.1. Σύνθετα αρτύματα (Salad dressings)

Πρόκειται για προϊόντα που θυμίζουν σάλτσες και συνοδεύουν διάφορα φαγητά και συνήθως σαλάτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μαγιονέζα και διάφοροι τύποι αυτής, αφού είναι από τα βασικά προϊόντα αυτού του είδους που μπορούν να συνδεθούν με τη γαλακτωματοποίηση. Σε έρευνες που έχουν γίνει αναφέρεται η χρήση βιοεπιφανειοδραστικών από τη ζύμη *C. utilis*, η βιοχημική σύσταση των οποίων αποτελείται από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπος ως πρόσθετο συστατικό για την παραγωγή μαγιονέζας σε συγκέντρωση 0,7% (Campos, 2019). Η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών που δύνανται να παραμένουν σταθερές σε διάφορες τιμές pH και σε διάφορες θερμοκρασίες στα προϊόντα αυτά έχει ως στόχο την βελτίωση της υφής και τη διασφάλιση της δομής τους. Με αυτό τον τρόπο τα προϊόντα θα παραμένουν αυτούσια, κατάλληλα και αποδεκτά από τους καταναλωτές για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα που παραμένουν διαθέσιμα, πριν αλλά και μετά την αγορά τους.

2.8.1.2. Ψωμιά και αρτοποιήματα

Παρατηρείται μια τάση προς την παραγωγή διάφορων προϊόντων με βάση τα σιτηρά, όπως μπισκότα, κέικ, διάφοροι τύποι ψωμιού και άλλα αρτοσκευάσματα, οι συνταγές των οποίων παρεκκλίνουν από τις κλασικές και γνωστές ως τώρα συνταγές. Με τον τρόπο αυτόν οι εταιρείες έχοντας στη διάθεσή τους προϊόντα υψηλότερου διατροφικού ενδιαφέροντος καταφέρνουν να προσελκύσουν καταναλωτές διαφορετικών απαιτήσεων και διατροφικών αναγκών. Η έρευνα και εν συνεχεία οι εταιρείες έχουν κατευθυνθεί προς την παραγωγή προϊόντων χωρίς γλουτένη, πλούσια σε διαιτητικές ίνες, λιγότερα λιπαρά, μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνη κ. ά. Κινούμενοι σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιούνται μελέτες σχετικά με την αντικατάσταση των έως τώρα χρησιμοποιούμενων πρόσθετων με βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες οι οποίες θα βελτιώσουν και τις ρεολογικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Έρευνες την τελευταία δεκαετία αναφέρουν πως με τη χρήση βιοεπιφανειοδραστικών (ραμνολιπιδίων) παρατηρήθηκε βελτίωση ως προς τη γεύση, την υφή και τον όγκο των αρτοσκευασμάτων στα οποία αυτά είχαν προστεθεί. Η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών από το βακτήριο *B. subtilis* σε ψωμί φάνηκε να βελτιώνει τόσο

την υφή του τελικού προϊόντος όσο και την ευαισθησία που παρουσιάζει σε μικροβιακές παρεμβάσεις. Ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και από την προσθήκη των ουσιών αυτών σε μαλακά μπισκότα (soft cookies) από αλεύρι σίτου και σουσάμι, σε σύγκριση με την προστιθέμενη ως τώρα γλυκερόλη. Σε πειράματα όπου περιγράφεται η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών λιποπεπτιδικής δομής από το βακτήριο *Nesterenkonia* sp. σε ατομικά κέικ (muffins) είχαν σαν αποτέλεσμα τα κέικ να είναι πιο αφράτα και μαλακά. Σε αντίστοιχες εφαρμογές, η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *C. bombicola* URM 3718 με σκοπό την αντικατάσταση φυτικών λιπών, όχι μόνο είχε σαν αποτέλεσμα προϊόντα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αλλά λόγω της σταθερότητας των βιοεπιφανειοδραστικών σε υψηλές θερμοκρασίες, διατηρήθηκε και η αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρου του κρόκου αυγού με βιοεπιφανειοδραστικές (γλυκολιπίδια) από τη ζύμη *S. cerevisiae* URM 6670 σε ζύμη μπισκότων, δεν προκάλεσε διαφορά στη σύσταση του τελικού μπισκότου, προσφέροντας στον καταναλωτή ωφέλιμα για τον οργανισμό λιπαρά οξέα (Ribeiro, 2020).

2.8.1.3. Παγωτά

Αντίστοιχα με τις παραπάνω εφαρμογές, η προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε παγωτά στοχεύει στη βελτίωση της σύστασης και της υφής του τελικού προϊόντος. Η έρευνα γύρω από αυτό το θέμα βασίζεται στην ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών να διατηρούν τις φυσικές ιδιότητες των τροφίμων (Kieliszek, 2017). Ακόμη, η ικανότητά τους να δημιουργούν γαλακτώματα και να διασπείρουν λιπαρές ύλες σε ένα σύστημα είναι αρκετά χρήσιμη ως προς την τελική γεύση και υφή. Βιοεπιφανειοδραστικές χαμηλού μοριακού βάρους, μελετώνται ώστε να αξιοποιηθούν ως σταθεροποιητές γαλακτωμάτων οι οποίες θα αποτρέψουν το διαχωρισμό των δύο φάσεων (Zhu, 2019).

2.8.1.4. Αντιοξειδωτικά

Η αντιοξειδωτική δράση των βιοεπιφανειοδραστικών έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία των τροφίμων. Η δράση τους αυτή είναι πιθανό να συνδέεται και με τη σύστασή τους στις περιπτώσεις που τα μόρια αυτά αποτελούνται από ακόρεστα λιπαρά οξέα (Kiran, 2017). Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον οργανισμό, οι οποίες συμβάλουν στην πρόσληψη σοβαρών ασθενειών όπως οικαρδιαγγειακές παθήσεις και άλλα εκφυλιστικά νοσήματα. Ταυτόχρονα, πέρα από τα οφέλη για την υγεία των καταναλωτών, τα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στα τρόφιμα παρατείνουν το χρόνο ζωής τους, αποτρέποντας οξειδωτικές αντιδράσεις. Η τάση των καταναλωτών να στρέφονται προς την κατανάλωση τροφίμων που ωφελούν τον οργανισμό, ευνοεί την έρευνα για την παραγωγή τέτοιων προϊόντων και στη συνέχεια την πώλησή τους (Amirigi, 2020). Η αντιοξειδωτική δράση των ουσιών μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους και βάσει αυτών των αποτελεσμάτων να προσαρμοστεί η αντίστοιχη εφαρμογή (Ribeiro, 2020). Ενδιαφέρον προκαλούν τα αποτελέσματα από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από βακτήρια του γένους *Lactobacillus*. Ως προς τη δέσμευση ελεύθερων ριζών φάνηκε πως παρουσιάζουν περίπου 75%

αποτελεσματικότητα σε συγκέντρωση 5 mg/ mL (Merghni, 2017).

2.8.1.5. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στη φαρμακευτική και την υγεία

Οι μελέτες για την εύρεση νέων μορίων, αντιμικροβιακής δράσης φαίνεται να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα λόγω της αυξανόμενης αντίστασης των παθογόνων έναντι στα αντιβιοτικά. Είναι λοιπόν αναγκαίο να μελετηθεί και να αξιοποιηθεί κατάλληλα η αντιμικροβιακή επίδραση διαφόρων μεταβολιτών μικροβιακής προέλευσης, όπως οι βιοεπιφανειοδραστικές, στη δομή και κατά συνέπεια στη δράση παθογόνων μικροοργανισμών. Οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να αποτελέσουν συστατικά φαρμάκων για την αντιμετώπιση αρκετών παθογόνων λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους και να αποτελέσουν υποκατάστατα των συμβατικών αντιβιοτικών. Ακόμη, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών μπορούν να αξιοποιηθούν στη μαζική εστίαση, όπως εφαρμογή σε επιφάνειες ή αντικείμενα των βιομηχανιών τροφίμων, νοσοκομείων για την πρόληψη επιμολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, που θα μπορούσαν να έχουν αρνητικές συνέπειες για τη βιομηχανία και την υγεία, αντίστοιχα (Sharma, 2021).

Αν και οι μελέτες σχετικά με τις θεραπευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών πληθαίνουν διαρκώς, οι μελέτες σχετικά με την αξιοποίησή τους μέσα από εφαρμογές είναι αρκετά περιορισμένη. Υπάρχουν στελέχη όπως ο *B. polymyxa* και ο *Streptomyces roseosporus* που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές λιποπεπτιδικής δομής με αντιβιοτική δράση, όπως η δαπτομυκίνη και η σουρφακτάνη. Τα μόρια αυτά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση ασθενειών και μολύνσεων. Άλλες μελέτες αφορούν την αντιμυκητιακή δράση των βιοεπιφανειοδραστικών τόσο για την αντιμετώπιση μυκητιάσεων στους ανθρώπους αλλά και στα φυτά. Μάλιστα αναφέρεται και η δυνατότητα χρήσης τους για αντικατάσταση αγροτοχημικών φαρμάκων π.χ. γλυκολιπίδια από το στέλεχος *P. aeruginosa* μπορούν να αντιμετωπίσουν την προσβολή των ντοματών από το μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Στους τομείς αυτούς οι βιοεπιφανειοδραστικές βρίσκουν και άλλες εφαρμογές μιας και μπορούν να αξιοποιηθούν οι ιδιότητές τους ως γαλακτωματοποιητές, σταθεροποιητές, αφριστικοί παράγοντες κ.α. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η δυνατότητα βελτίωσης νέων και υπάρχουσών θεραπειών, διότι οι βιοεπιφανειοδραστικές δημιουργώντας μικρογαλακτώματα διευκολύνουν τη χορήγηση φαρμάκων που προορίζονται για δερματική, οφθαλμική, ενδοφλέβια και άλλες χρήσεις.

Κλείνοντας αξίζει να αναφερθεί η χρήση βιοεπιφανειοδραστικών λιποπεπτιδικής δομής ως ανοσολογικοί παράγοντες σε εμβόλια, ενισχύοντας την παραγωγή αντισωμάτων όπως και στην κοσμετολογία ως συστατικά σε σαμπουάν, κρέμες ενυδάτωσης και αντιγήρανσης, οδοντόκρεμες και προϊόντα καθαρισμού προσώπου (Sarma, 2021).

2.8.2. Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών στο περιβάλλον

Η έντονη βιομηχανική δραστηριότητα οδηγεί σε απόθεση μεγάλων ποσοτήτων, οργανικών και ανόργανων αποβλήτων. Με την εφαρμογή βιοεπιφανειοδραστικών επιτυγχάνεται η απορρύπανση περιοχών από οργανικές ενώσεις, όπως είναι οι υδρογονάνθρακες. Λόγω της ιδιότητας των βιοεπιφανειοδραστικών να δημιουργούν γαλακτώματα οι ενώσεις αυτές διαλυτοποιούνται και απομακρύνονται. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιοεπιφανειοδραστικών και των μικροβιακών κυττάρων με υδρογονάνθρακες, βασίζονται σε μηχανισμούς που αναπτύσσουν μεταξύ τους όπως η γαλακτωματοποίηση και η πρόσφυση.

Οι βιοεπιφανειοδραστικές μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα υδρογονανθρακικών υποστρωμάτων για τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε αυτά. Αν και οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν είναι απαραίτητα και παραγωγοί βιοεπιφανειοδραστικών, έχει φανεί πως με την προσθήκη βιοεπιφανειοδραστικών σε διεργασίες απορρύπανσης του περιβάλλοντος με μικροοργανισμούς παρουσιάστηκαν καλύτερα αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα οι θαλάσσιες πετρελαιοκηλίδες αντιμετωπίζονται κάνοντας χρήση συνθετικών επιφανειοδραστικών. Η εφαρμογή αυτή δίνει την αφορμή για περαιτέρω έρευνα, ώστε σταδιακά να γίνει αντικατάστασή τους από βιοεπιφανειοδραστικές (Banat, 2010).

2.9. Μελλοντική χρήση βιοεπιφανειοδραστικών

Συνοψίζοντας τις μελέτες για τις εφαρμογές και την εξέλιξη τεχνολογιών στις οποίες μελετάται η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών, προκύπτουν αρκετά πεδία εφαρμογής. Με τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής διεργασίας και την εύρεση των κατάλληλων στελεχών για την εκάστοτε εφαρμογή, θα μπορέσουν να αντιμετωπιστούν προβλήματα τα οποία σήμερα εμποδίζουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών σε μεγάλη κλίμακα και εν συνεχεία την βιομηχανική τους χρήση.

Αρκετά σημαντική είναι η αξιοποίηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων ορισμένων βιοεπιφανειοδραστικών για την αντιμετώπιση παθογόνων και αλλοιογόνων στελεχών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και απολυμαντικά. Έτσι μπορούν να προστεθούν τόσο σε φαρμακευτικά σκευάσματα, όσο και σε προϊόντα απολύμανσης και καθαρισμού επιφανειών σε μονάδες υγείας και παραγωγής τροφίμων. Η ικανότητά τους να δημιουργούν γαλακτώματα και αφρούς και η σταθερότητα που σημειώνουν μπορούν να φανούν ιδιαίτερα ωφέλιμες. Οι βιοεπιφανειοδραστικές μελλοντικά θα δύνανται να αντικαταστήσουν διάφορα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα ή ακόμη και καλλυντικά βελτιώνοντας τις έως τώρα τεχνολογίες. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και πρεβιοτική δράση που φαίνεται πως εμφανίζουν ορισμένες βιοεπιφανειοδραστικές και πρέπει να μελετηθούν ώστε να αξιοποιηθούν αντίστοιχα (Sharma, 2016).

3. ΣΚΟΠΟΣ

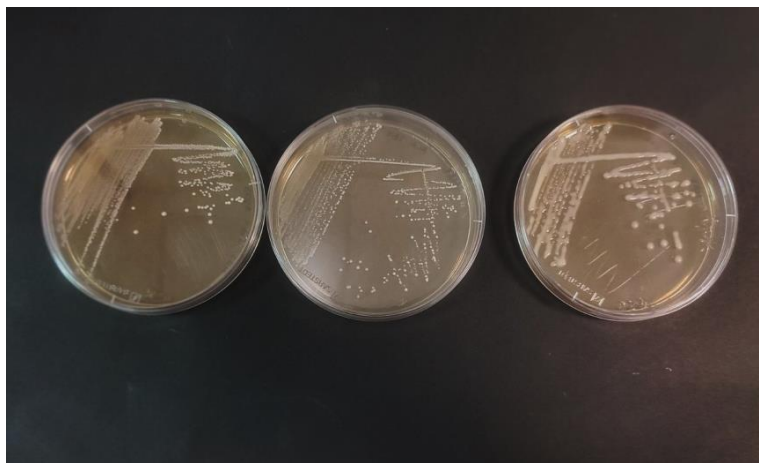
Η παρούσα πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της παραγωγής επιφανειοδραστικών από επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, με τυρόγαλα ως υπόστρωμα ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στα παρακάτω:

- Στη χρήση γαλακτικών βακτηρίων (GRAS) για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών
- Στην αξιοποίηση υγρών αποβλήτων της τυροκομίας (τυρόγαλα), ως εναλλακτικό, ευτελέξυπόστρωμα για την βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών
- Στη μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμού του τυρογάλακτος με οργανικές πηγές αζώτου στη μικροβιακή αύξηση γαλακτικών βακτηρίων
- Στη μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμού του τυρογάλακτος με μεταλλικά άλατα και χημικά στοιχεία στη μικροβιακή αύξηση γαλακτικών βακτηρίων
- Στη διεξαγωγή ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου
- Στη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών στρατηγικών ζύμωσης στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (συγκέντρωση και χρόνος επώασης εμβολίου, αρχική συγκέντρωση λακτόζης, αερισμός, ανακύκλωση υποστρώματος)
- Στον προσδιορισμό της χημικής σύστασης των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών
- Στον προσδιορισμό του κρίσιμου σημείου σχηματισμού μικκυλίων των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών
- Στη μελέτη της σταθερότητας των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών υπό διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση αλάτων)

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Βιολογικό Υλικό

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής, προέρχονται από τις παρακάτω συλλογές: Spanish Type Culture Collection, Πανεπιστήμιο Βαλένθια, Ισπανία, (CECT), καθώς επίσης και από τα εργαστήρια Γαλακτοκομίας (ACA-DC), Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων (LQC) και Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη φυλάσσονται σε cryovials των 2 mL στους -80 °C σε θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco™, USA), εμπλουτισμένο με γλυκερόλη το οποίο είχε υποστεί αποστείρωση (121°C, 20 λεπτά), σε αναλογία 1:1. Η καθαρότητα των καλλιιεργειών εξεταζόταν πριν από κάθε χρήση με τη μεθοδογραμμικής διασποράς (streaking).



Εικόνα 5 Γραμμική διασπορά στελεχών γαλακτικών βακτηρίων

Πίνακας 2 Στελέχη γαλακτικών βακτηρίων στα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος τις επίδρασης οργανικών πηγών αζώτου, μετάλλων και ιχνοστοιχείων στη μικροβιακή τους αύξηση και την κατανάλωση λακτόζης

Κωδικός στελέχους	Στέλεχος
ACA-DC 0182	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
ACA-DC 0183	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
ACA-DC 0270	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
ACA-DC 0276	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
ACA-DC 0731	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
ACA-DC 4052	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
LQC 752	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
LQC 753	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>

LQC 854	<i>Latilactobacillus sakei</i>
LQC 780	<i>Latilactobacillus sakei</i>
FMCC B-329 (E108)	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
CECT 278	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
CECT 4023	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>

*τα στελέχη πλέον αναφέρονται με την ανανεωμένη ταξινόμηση του γένους *Lactobacillus*

4.2. Προετοιμασία τυρογάλακτος ως υπόστρωμα ζύμωσης

Το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στα πειράματα αυτής της εργασίας είναι ευγενική χορηγία του Τυροκομείου Γαλιατσάτος στην Κεφαλονιά και προέρχεται μετά και την παραγωγή μυζήθρας. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, το τυρόγαλα υποβλήθηκε σε θέρμανση στους 55-60 °C σε ποτήριαζέσεως 2 L. Καθώς βρισκόταν υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα, το pH του ρυθμίστηκε για 3 λεπτά σε pH 10 και για 5 λεπτά σε pH 3,5 χρησιμοποιώντας διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH 5M) και υδροχλωρικού οξέος (HCl 5 M), αντίστοιχα. Η τελική τιμή του pH ρυθμίστηκε στο 4,7 (NaOH 5 M), όπου είναι και το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος και προστέθηκε ZnSO₄ στην απαιτούμενη ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωση Zn στο τυρόγαλα να είναι 10 mM. Το τυρόγαλα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε μπουκάλια Duran και αποστειρώθηκε (121 °C, 20 λεπτά) (Murphy, 1988; Grufferty, 1987). Με αυτόν τον τρόπο επετεύχθη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Για την τελική απομάκρυνση των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος και αφού αφέθηκε για 12 ώρες στους 4 °C ώστε οι πρωτεΐνες να καθιζάνουν περισσότερο, το τυρόγαλα φυγοκεντρήθηκε στις 4,200 g για 20 λεπτά στους 4 °C (Rotina 420R, Hettich Zentrifugen). Στο τελευταίο στάδιο το τυρόγαλα διηθήθηκε με ηθμό και τη βοήθεια αντλίας κενού.



Εικόνα 6 Τυρόγαλα πριν και μετά την διαδικασία της αποπρωτεΐνωσης

4.3. Προσδιορισμός ειδικού ρυθμού αύξησης γαλακτικών βακτηρίων

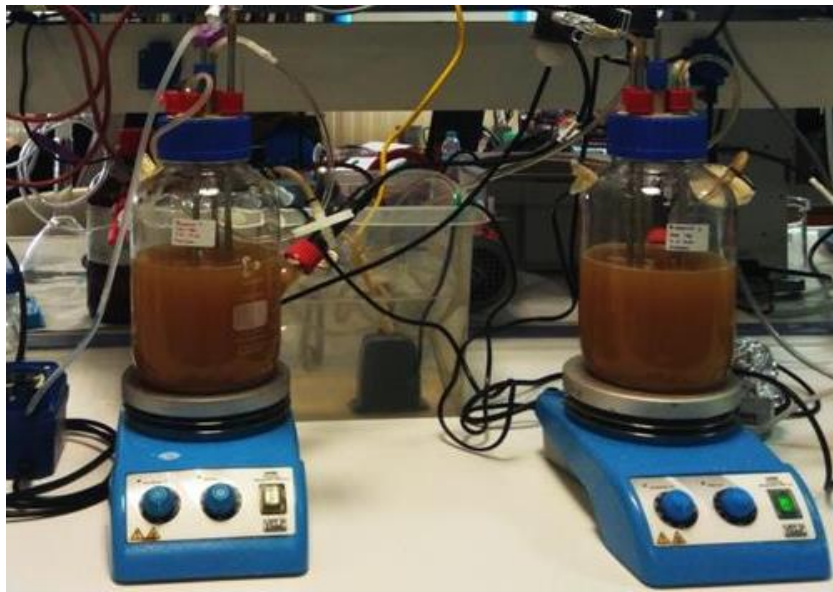
Για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων πηγών οργανικού αζώτου, αλάτων και ιχνοστοιχείων στη μικροβιακή αύξηση των στελεχών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε φωτόμετρο μικροπλακών (96-well microtiter plate system; EPOCH2 Microplate reader, BioTek, USA). Η επιλογή των θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε βάσει προγενέστερων μελετών (Gudiña, Teixeira, & Rodrigues, 2011; Rodrigues et al., 2006) και η σύστασή τους παρατίθεται στον πίνακα που ακολουθεί. Ακόμη στον πίνακα αναφέρεται και η σύσταση του εμπλουτισμένου τυρογάλακτος με τα άλατα και ιχνοστοιχεία ή/και συνδυασμός αυτών (π.χ. Ca, Mg, Mn κ.ο.κ). Και στις δύο περιπτώσεις τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, με το εμβόλιο να αποτελεί το 10% του όγκου κάθε κελιού. Η διαδικασία της λήψης αποτελεσμάτων διήρκησε 24 ώρες. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν. Συγκεκριμένα, κάθε 20 λεπτά πραγματοποιούταν ανακίνησητων πλακών, μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος στα 620 nm και στη συνέχεια υπολογισμός του ειδικού ρυθμού αύξησης.

Πίνακας 3 Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με το φωτόμετρο μικροπλακών (microplate)

Συντομογραφίας υποστρώματος	Σύσταση	Βιβλιογραφική Αναφορά
Medium D	10 g/L πεπτόνη, 8 g L ⁻¹ εκχύλισμα κρέατος, 4 g L ⁻¹ εκχύλισμα ζύμης	(Gudiña et al., 2011)
Medium F	10 g/L πεπτόνη, 4 g/L εκχύλισμα ζύμης; 5,3 g/L 25% αμμωνία	
Medium B	5 g/L πεπτόνη, 3 g/L εκχύλισμα ζύμης	(Rodrigues et al., 2006)
Πεπτόνη	10 g/L	
Εκχύλισμα ζύμης	4 g/L	
Εκχύλισμα κρέατος	8 g/L	
AUA	7 g/L KH ₂ PO ₄ , 2,5 g/L Na ₂ HPO ₄ , 1,5 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,15 g/L FeCl ₃ ·6H ₂ O, 0,02 g/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,06 g/L MnSO ₄ ·H ₂ O, 0,15 g/L CaCl ₂ ·2H ₂ O	(Tsakona et al., 2014)
M18	0,4 g/L KH ₂ PO ₄ , 1,6 g/L K ₂ HPO ₄ , 0,15 g/L NaCl, 0,1 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,02 g/L CaCl ₂ , και διαλύματα ιχνοστοιχείων (mg/100 mL): 0,5 mg CuSO ₄ ·5H ₂ O, 1 mg H ₃ BO ₃ , 1,0 mg MnSO ₄ ·5H ₂ O, 0,7 mg ZnSO ₄	(Mouafo, Mbawala, & Ndjouenkeu, 2018)

4.4. Ζυμώσεις με στελέχη του γένους *Lactobacilli*

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρες όγκου 2 L (Duran). Οι ζυμώσεις είχαν ενεργό όγκο 1,5 L και βάσει αυτού υπολογίστηκε και η ποσότητα του εμβολίου έτσι ώστε να αντιστοιχεί στο 5 ή στο 10% του συνολικού όγκου ανά περίπτωση. Η θερμοκρασία της ζύμωσης ρυθμίστηκε μέσω θερμοστοιχείων στους 37 °C. Το pH ρυθμίστηκε με διάλυμα NaOH (5M) μεταξύ 6,7- 6,9 με χρήση περισταλτικής αντλίας, συνδεδεμένης με συσκευή ελέγχου (Controler, SC200, HACH, USA) ενώ ανάδευση του υγρού ζύμωσης έγινε με μαγνητικό αναδευτήρα στα 600 rpm. Στην περίπτωση της ζύμωσης με ανακύκλωση υποστρώματος, το τυρόγαλα χρησιμοποιήθηκε σε τρεις επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις με νέα προκαλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός του τυρογάλακτος έλαβε χώρα όπως στις προηγούμενες ζυμώσεις διαλείποντος και μετά το πέρας των τεσσάρων πρώτων ωρών, τα κύτταρα παρελήφθησαν ασηπτικά και το υπόστρωμα εμβολιάστηκε εκ νέου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Μετά την ανάκτηση των κυττάρων από κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών όπως περιγράφεται στην Ενότητα 3.5. Η δειγματοληψία σε κάθε περίπτωση γινόταν μέσω του δειγματολήπτη ανά τακτά χρονικά διαστήματα για να ελέγχεται η πορεία της ζύμωσης.

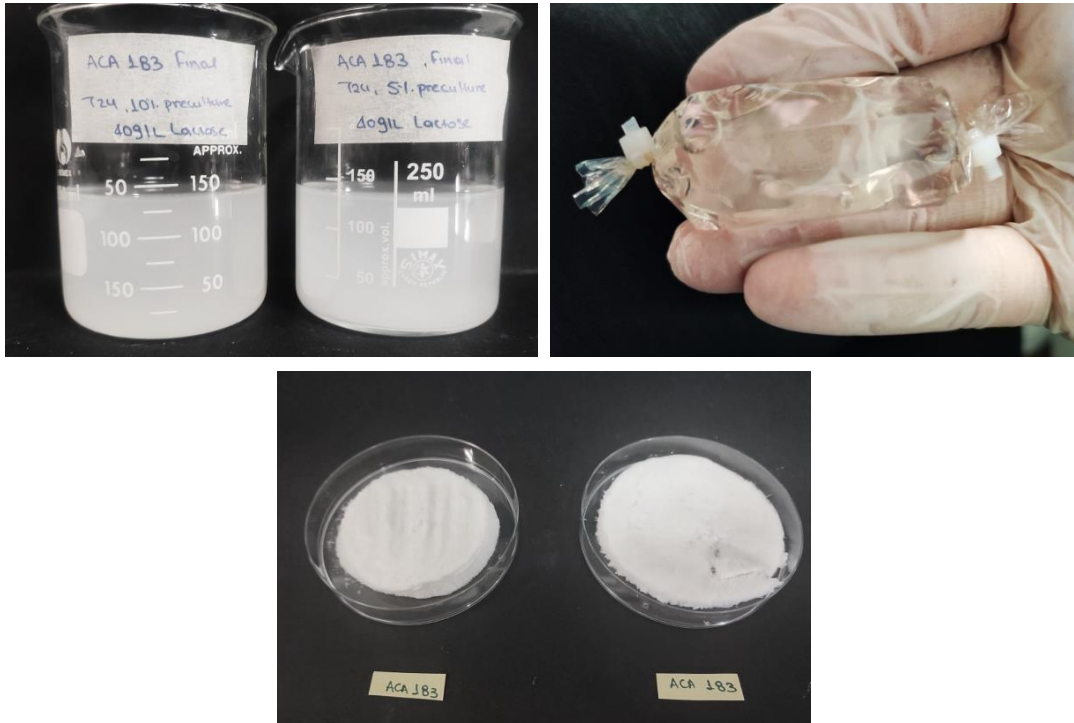


Εικόνα 7 Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες

4.5. Εκχύλιση βιοεπιφανειοδραστικών

Με το πέρας της ζύμωσης, τα δείγματα που λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια αυτής (50 mL) φυγοκεντρήθηκαν (6450 g, 15 min, Rotina 420R, Hettich, Germany) και στα κύτταρα προστέθηκε ίσος όγκος νερού, αναδεύτηκαν και στη συνέχεια το νερό απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δεύτερη φορά και στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pH 7,0. Η αναλογία

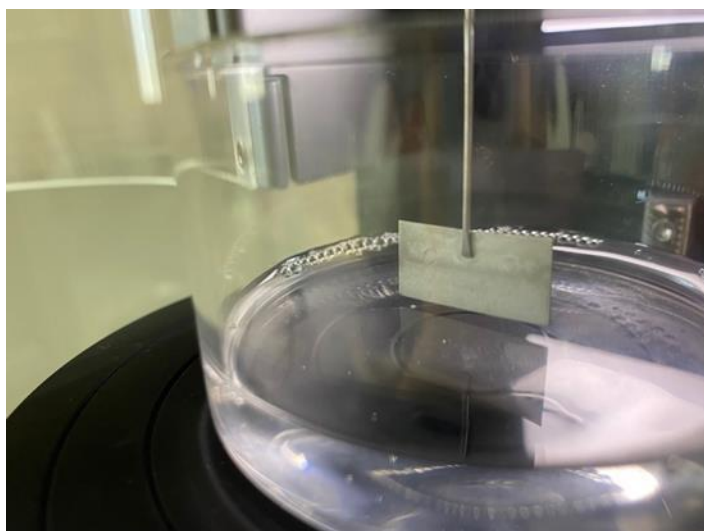
δείγματος; PBS ήταν 6:1 (v/v). Τα δείγματα έμειναν στους 4 °C για 12 ώρες υπό ανάδευση ώστε οι βιοεπιφανειοδραστικές να εκχυλιστούν από τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα και το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε φιλτράρισμα (0,22 μm pore-size filter, Millipore) και καθαρισμό μέσω μεμβρανών διαπίδυσης (Cellu-Sep® molecular weight cut-off 6-8 kDa). Ακολούθησε μέτρηση της επιφανειακής τάσης και ξήρανση με λυοφιλίωση για την παραλαβή του τελικού προϊόντος.



Εικόνα 8 Εκχύλιση συνδεδεμένων με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικών σε PBS, καθαρισμός με μεμβράνες διαπίδυσης και παραλαβή τελικού προϊόντος μετά τη λυοφιλίωση

4.6. Μέτρηση Επιφανειακής τάσης

Η επιφανειακή τάση μετρήθηκε στα υπερκείμενα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών και αφού ολοκληρώθηκε και το στάδιο του καθαρισμού με μεμβράνες διαπίδυσης. Η μέτρηση έγινε με μηχανήμα μέτρησης επιφανειακής τάσης, που φέρει πλάκα πλατίνας 1,9 εκ, και τη μέθοδο Wilhelmy plate (K20 Krüss tensiometer, KRÜSS GmbH, Germany). Το μήκος βύθισης της πλάκαζήταν τα 40,20 mm και τα δείγματα βρίσκονταν στους 25°C (Mouafo et al., 2018). Η βαθμονόμηση του μηχανήματος έγινε με μέτρηση της επιφανειακής τάσης απιονισμένου νερού και ο προσδιορισμός της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών βασίστηκε στη σύγκριση της επιφανειακής τάσης των δειγμάτων με αυτή του απιονισμένου νερού και του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (n=3) και τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τους.



Εικόνα 9 Μέτρηση επιφανειακής τάσης με τη μέθοδο Wilhelmy plate

4.7. Προσδιορισμός κρίσιμης συγκέντρωσης σχηματισμού μικκυλίων και δοκιμές σταθερότητας βιοεπιφανειοδραστικών

Για να εξακριβωθεί μια βασική ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών, αυτή της σταθερότητας και αφού πρώτα βρέθηκε η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC), παρασκευάστηκαν διαλύματα βιοεπιφανειοδραστικών (προϊόν μετά τη λυοφιλίωση) με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Έτσι σε 50 mL απιονισμένο νερό προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα βιοεπιφανειοδραστικών ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα στη συγκέντρωση του CMC. Τα διαλύματα μοιράστηκαν σε φιαλίδια Falcon των 15 mL και ένα φιαλίδιο από κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για την δοκιμή της κάθε παραμέτρου. Για να μελετηθείτο θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο οι βιοεπιφανειοδραστικές παραμένουν λειτουργικές, ένα φιαλίδιο από κάθε συγκέντρωση τοποθετήθηκε για 1 ώρα στους 4, τους 50 και τους 75 °C αλλά και σε συνθήκες αποστείρωσης (121 °C, 15 λεπτά), και μετρήθηκε η επιφανειακή τάση. Αντίστοιχα, για τον έλεγχο σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στις τιμές 4, 6, 8 και 10 με NaOH 1M και HCl 1M και για τη σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών σε συγκεντρώσεις NaCl, προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις NaCl 1, 5 και 9 g/L. Μια ώρα μετά την εφαρμογή των διαφορετικών συνθηκών, και αφού τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία 25 °C μετρήθηκε η επιφανειακή τους τάση.

4.8. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.8.1. Προσδιορισμός σύστασης τυρογάλακτος

Για τη διεξαγωγή των ζυμώσεων κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί η σύσταση του τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ώστε να υπολογιστούν σημαντικοί παράγοντες για τις ζυμώσεις όπως η αρχική συγκέντρωση σακχάρων και αζώτου. Ο προσδιορισμός της λακτόζης και κατά συνέπεια της αρχικής συγκέντρωσης

σακχάρων της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Ακολούθησε προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.6.3. Επιπλέον εφαρμόζοντας αναλυτικά πρωτόκολλα από τον AOAC το τυρόγαλα αναλύθηκε ως προς τη σύστασή του σε λίπος (AOAC 989.05), ολικά στερεά (AOAC 925.23), τέφρα (AOAC 942.05) και ολικό άζωτο (AOAC 991.20). Ομοίως με τα ολικά στερεά προσδιορίστηκαν και τα διαλυτά στερεά, μέτρηση του pH, της πυκνότητας καθώς και μέτρηση του ανόργανου φωσφόρου φωτομετρικά. Οι αναλύσεις έγιναν για το αρχικό όσο το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα.

Πίνακας 4 Σύσταση τυρογάλακτος πριν (CW) και μετά την αποπρωτεϊνώση και σύγκριση με τη βιβλιογραφία

Συστατικά (% w/v)	CW	CW (αποπρωτεϊνωμένο)	Ανυφαντάκης, 2004
Πρωτεΐνη	0,80	0,10	0,80-1,50
Λίπος	1,20	0,50	0,20-1,30
Λακτόζη	4,80	4,60	4,50-5,30
Ολικά στερεά	5,90	5,80	6,00-8,00
Τέφρα	0,60	0,50	0,50-0,70
Διαλυτά στερεά	5,90	5,70	-
FAN	0,020	0,016	-
Ανόργανος φώσφορος (IP)	0,036	0,020	0,043
pH	5,8	5,6	-
Πυκνότητα (g/mL)	1,01	1,01	-

4.8.2. Μέτρηση Βιομάζας

Η συλλογή της βιομάζας έγινε με φυγοκέντρηση (10 λεπτά /5200 στροφές) (Nuve NF 048). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εκτός από το δείγμα των 50 mL που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών λαμβάνονταν και 2 δείγματα των 2 mL τα οποία φυγοκεντρούνταν, το υπερκείμενο φυλασσόταν για άλλες αναλύσεις και η βιομάζα μετά από διπλή έκπλυση τοποθετούταν σε προζυγισμένα φιαλίδια. Στη συνέχεια οι βιομάζες τοποθετούταν σε θάλαμο ξήρανσης στους 65 °C μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος τους. Τέλος το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας με 4 δεκαδικά και αφού αφαιρέθηκε το απόβαρο έγινε η

αναγωγή της βιομάζας σε g/L.

$$\text{TDW} = (\text{Βάρος μετά την ξήρανση} - \text{Απόβαρο}) * 2/1000$$

4.8.3. Προσδιορισμός Σακχάρων και Γαλακτικού Οξέος

Η ποσότητα της αρχικής αλλά και της εναπομένουσας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λακτόζης, και του παραγόμενου γαλακτικού οξέος μετρήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC, Agilent). Χρησιμοποιήθηκαν 4 mL δείγματος, τα οποία τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια erpendorf των 2 mL και φυγοκεντρήθηκαν ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο από τη βιομάζα. Η ανάλυση γινόταν στο υπερκείμενο των δειγμάτων που λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Για την ανάλυση χρειάστηκαν 10μL κατάλληλα αραιωμένου και φιλτραρισμένου (Whatman®, 0,2 μm) δείγματος και κινητή φάση H₂SO₄ 10 mM. Το μηχάνημα φέρει στήλη χρωματογραφίας ROA- organic acid H⁺ (300mm × 7,8 mm, Phenomenex), και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Η ροή ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/λεπτό και η θερμοκρασία της στήλης στους 65 °C.

4.8.4. Προσδιορισμός Αζώτου Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN)

Αρχή της μεθόδου: Η φωτομετρική αυτή μέθοδος πραγματοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ελεύθερου αζώτου των αμινοξέων και των πεπτιδίων μέσω της αντίδρασης της νινυδρίνης (Lie, 1973).

Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήριο χρώσης (Colour Reagent): Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου χρώσης, 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο (Na₂HPO₄·2H₂O), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) διαλύθηκαν σε 1 L απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,6 και 6,8 και αποθηκεύεται στους 4 °C σε σκούρο μπουκάλι. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πρέπει να ελέγχεται η τιμή του pH και να διορθώνεται κατάλληλα χρησιμοποιώντας KH₂PO₄.

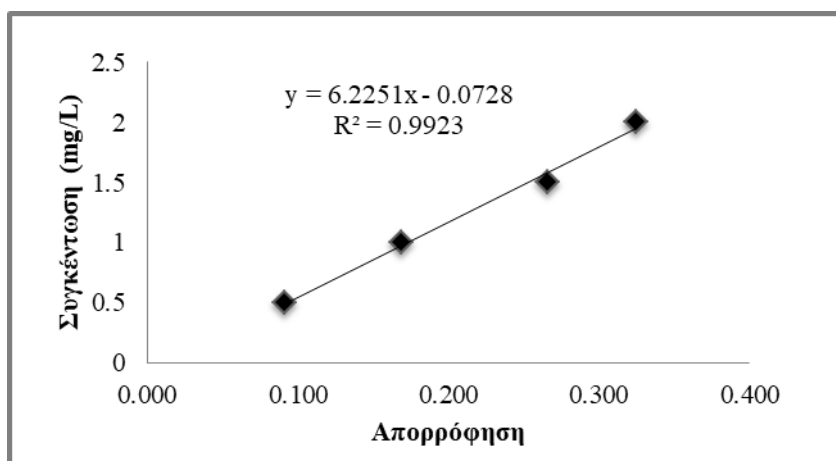
Αντιδραστήριο Αραίωσης (Dilution Reagent): 2 g ιωδικού καλίου (KIO₃) διαλύονται σε 616 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια 348 mL 100% καθαρής αιθανόλης προστίθενται ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο 1L.

Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution): Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος 0,1072 g γλυκίνης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένο νερό και αποθηκεύεται στους 4 °C.

Εξαγωγή Πρότυπης Καμπύλης: 1 mL αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης διαλύεται σε 99 mL απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση FAN 2 mg/L. Το διάλυμα αυτό αραιώθηκε κατάλληλα ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 5, 1, 1,5 και 2 mg/L. Στη συνέχεια ακολούθησε αντίστοιχα η εφαρμογή της μεθόδου όπως περιγράφεται παρακάτω.

Εφαρμογή της μεθόδου: 1 mL δείγματος το οποίο έχει αραιωθεί κατάλληλα τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Τα δείγματα πωματίστηκαν, αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 λεπτά. Με το πέρασμα των 16 λεπτών τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 20 °C για 20 λεπτά για να ψυχθούν. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL από το αντιδραστήριο αραιώσης και ακολούθησε ανάδευση του κάθε δείγματος για 20 δευτερόλεπτα. Παράλληλα με τα δείγματα παρασκευάστηκε και το τυφλό (blank) δείγμα με 1 mL απιονισμένου νερού αντί για δείγμα. Τέλος τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση τους σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm (Helios Omega UV/Vis, ThermoScientific, USA).

Για μεγαλύτερη ακρίβεια η μέτρηση κάθε δείγματος επαναλαμβάνεται. Η συγκέντρωσή τους σε FAN (y) υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη εξίσωση ($y = 6,2251x - 0,0728$, $R^2 = 0,9923$) που προέκυψε κατά τη φωτομέτρηση των διαλυμάτων γλυκίνης. Οι απορροφήσεις αντικατέστησαν την τιμή του (x) στην εξίσωση.



Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

4.8.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου: Η φωτομετρική αυτή μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με το χαλκό, σε αλκαλικό περιβάλλον, παράγοντας κατιόντα χαλκού (Cu^+) τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu δίνοντας μπλε χρώμα.

Παρασκευή Σύνθετου αντιδραστηρίου - Προετοιμασία αποθεματικών διαλυμάτων:

1) Διάλυμα 2% (w/v) Na_2CO_3 : Σε ογκομετρική φιάλη 100 mL τοποθετείται μια ποσότητα διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH , 0,1 M) και 2 g ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα. Μόλις ομογενοποιηθεί το διάλυμα, ο μαγνήτης αφαιρείται από τη φιάλη και συμπληρώνεται NaOH 0,1M μέχρι τελικού όγκου 100 mL.

2) Διάλυμα 1% (w/v) CuSO_4 : Σε ογκομετρική φιάλη 100 mL τοποθετείται μια ποσότητα απιονισμένου νερού και στη συνέχεια 1 g θειικού χαλκού CuSO_4 . Μετά την ομογενοποίηση, συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την

ένδειξη.

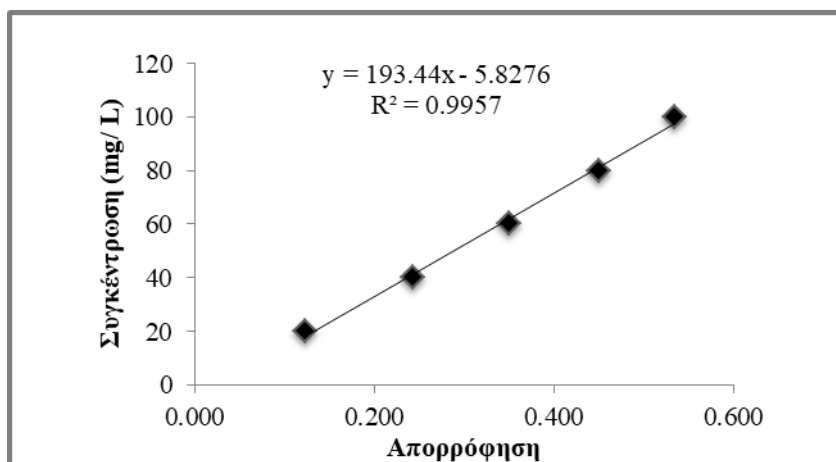
3) Διάλυμα 2% (w/v) $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$: Αντίστοιχα με το προηγούμενο διάλυμα, 2 g τρυγικού καλιονατρίου διαλύονται σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια συμπληρώνεται απιονισμένο νερό μέχρι την ένδειξη.

Συνδυάζοντας τα τρία παραπάνω διαλύματα προκύπτει το τελικό σύνθετο αντιδραστήριο σε αναλογία 100:1:1 αντίστοιχα, ακριβώς πριν την εφαρμογή της μεθόδου.

Προετοιμασία αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu 1N: Το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu 2N αραιώνεται σε αναλογία 1:1 με απιονισμένο νερό πριν τη χρήση του και φυλάσσεται σε σκούρο μπουκάλι.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 1 mL από το σύνθετο αντιδραστήριο. Ακολουθεί πωματισμός των δοκιμαστικών σωλήνων, ανάδευση και τοποθέτησή τους σε σημείο όπου δεν διαπερνά το φως για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μ L από το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu 1N και μετά από ανάδευση τα δείγματα τοποθετούνται και πάλι σε σκοτεινό σημείο για 30 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο. Παράλληλα με τα δείγματα παρασκευάζεται και τυφλό δείγμα με το οποίο θα συγκριθούν οι απορροφήσεις των δειγμάτων. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν εις διπλούν.

Εξαγωγή Πρότυπης Καμπύλης: Πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης BSA (Bovine serum albumin) συγκέντρωσης 200 mg/mL αραιώθηκε ώστε να προκύψουν συγκεντρώσεις 0, 20, 40, 60, 80, και 100 mg/L, στη συνέχεια εφαρμόστηκε η παραπάνω μέθοδος και προέκυψε η εξίσωση ($y = 193,44x - 5,8276$, $R^2 = 0,9957$).



Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού πρωτεϊνών

4.8.6. Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων

Αρχή της μεθόδου: Ο προσδιορισμός ολικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο θειικού οξέος- φαινόλης (Dubois,

1956). Η μέθοδος βασίζεται στην υδρόλυση των δισακχαριτών, ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες με πυκνό θειικό οξύ. Στη συνέχεια τα παράγωγα αυτών των αντιδράσεων αντιδρούν με τη φαινόλη σχηματίζοντας σύμπλοκα κίτρινου-χρυσού χρώματος. Πρόκειται για μια απλή και γρήγορη μέθοδο αλλά με σταθερά και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Παρασκευή διαλύματος φαινόλης 5% (w/v): Στην απαγωγό εστία του εργαστηρίου, 5 g φαινόλης τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με μια ποσότητα απιονισμένου νερού και αναδεύονται. Ο όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στα 100 mL και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σκούρο μπουκάλι.

Εφαρμογή της μεθόδου: 1 mL αραιωμένου δείγματος τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 1 mL διαλύματος φαινόλης 5%. Ακολούθησε πωματισμός και ανάδευση των δειγμάτων. Μετά από αυτό 5 mL πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄ 96-97%) προστέθηκαν γρήγορα και προσεκτικά με γυάλινο σιφόνιο στο κέντρο του δοκιμαστικού σωλήνα. Τα δείγματα μαζί με το τυφλό δείγμα πωματίστηκαν, αναδεύτηκαν προσεκτικά και αφέθηκαν για 30 λεπτά να κρυώσουν. Ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 490 nm σε κυψελίδες. Τα δείγματα και οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν. Όλη η διαδικασία μέχρι και τη φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στον απαγωγό με ιδιαίτερη προσοχή.

Εξαγωγή Πρότυπης Καμπύλης: Για την πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκόζης 100 mg/L και από αυτό έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 50, 40, 30, 20, 10 και 5 mg/L. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου όπως περιγράφηκε παραπάνω και προέκυψε η εξίσωση ($y = 82,928x + 3,3943$, $R^2 = 0,9984$)

4.8.7. Προσδιορισμός λίπους

Η εκχύλιση για τον προσδιορισμό του λίπους στο τελικό προϊόν της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο βασισμένο στις προϋπάρχουσες μεθοδολογίες (Folch, 1957; Patel, 2015). Πιο αναλυτικά, 0,5 g ξηρού προϊόντος επαναδιαλύθηκε σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS και στη συνέχεια αναμειχθηκε με 20 mL χλωροφόρμιο: μεθανόλη (2:1, v/v) και παρέμεινε στο σκοτάδι για 4 ώρες. Έπειτα, το δείγμα φιλτραρίστηκε και φυγοκεντρήθηκε (6450 x g, 8 λεπτά). Το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε υπό κενό και ακολούθως με φίλτρο (pore size 0.45 μm, Whatman). Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL 0,072% MgCl₂·6 H₂O και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (6450 x g, 5 λεπτά). Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξεπλύθηκε τρεις φορές με 1 mL 2 N KCl/ μεθανόλη (4:1, v/v) για να επιτευχθεί η μέγιστη καθαρότητα του δείγματος. Τέλος, η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες και το λίπος παραλήφθηκε μέσω εξάτμισης. Τα ολικά λιπίδια προσδιορίστηκαν βαρυμετρικά και εκφράστηκαν ως g/g ξηρού προϊόντος.

4.8.8. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Στα δείγματα ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών που προέκυψαν από τις ζυμώσεις, εφαρμόστηκε και

η μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας η οποία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω:

Προετοιμασία συστήματος διαλυτών κινητής φάσης:

Αναμίχθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες διαλυτών (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, αμμωνία 20%, οξικό οξύ και νερό), ώστε να προκύψουν τα παρακάτω συστήματα διαλυτών που αποτέλεσαν την κινητή φάση της μεθόδου:

α) CHCl_3 : CH_3OH : NH_3 20% (65:25:5)

β) CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O (25:15:4:2)

Προετοιμασία αντιδραστηρίων ψεκασμού

α) **Διάλυμα νινυδρίνης:** 0,2 g νινυδρίνης προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και στη συνέχεια προστέθηκε ακετόνη μέχρι τη χαραγή και ακολούθησε ανάδευση σε σκιερό μέρος.

β) **Διάλυμα H_2SO_4 20%:** Σε ογκομετρική φιάλη τοποθετούνται 70 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 20 mL H_2SO_4 (98%) με γυάλινο σιφώνιο. Το διάλυμα αφήθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη νερού μέχρι τη χαραγή και ανάδευση.

γ) **Διάλυμα θειικής φαινόλης:** 3 g φαινόλης τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL η οποία περιέχει 95 mL αιθανόλης (97%) και στη συνέχεια προστίθενται 5 mL H_2SO_4 (98%) με γυάλινο σιφώνιο

δ) Προσθήκη κρυστάλλων ιωδίου σε θάλαμο TLC

Διεξαγωγή της μεθόδου: Σε πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με διοξείδιο του πυριτίου (Kieselgel 60 F₂₅₄, Sigma-Aldrich, Canada) τοποθετούνται 5 μg δείγματος σε ύψος 1 cm από τη βάση της πλάκας και με απόσταση σε 1 cm από τα εκατέρωθεν δείγματα. Στη συνέχεια οι πλάκες τοποθετούνται με τη βοήθεια λαβίδας στους θαλάμους όπου βρίσκεται η κινητή φάση και αφήνονται μέχρι αυτή να φτάσει 1 cm κάτω από το υψηλότερο σημείο της πλάκας. Στη συνέχεια τα δείγματα αφαιρούνται με τον ίδιο τρόπο και μόλις στεγνώσουν ακολουθεί ο ψεκασμός με τα κατάλληλα αντιδραστήρια και τοποθέτηση της πλάκας στον θάλαμο ιωδίου αντίστοιχα. Ακολουθεί θέρμανση των πλακών που δέχτηκαν ψεκασμό στους 100 °C για 20-30 λεπτά μέχρι να εμφανιστούν κηλίδες.

Στην περίπτωση των κρυστάλλων ιωδίου η πλάκα αφαιρείται μόλις εμφανιστούν κηλίδες. Η παρασκευή των διαλυμάτων κινητής φάσης, ψεκασμού αλλά και η διεξαγωγή της μεθόδου πραγματοποιείται στην απαγωγό.

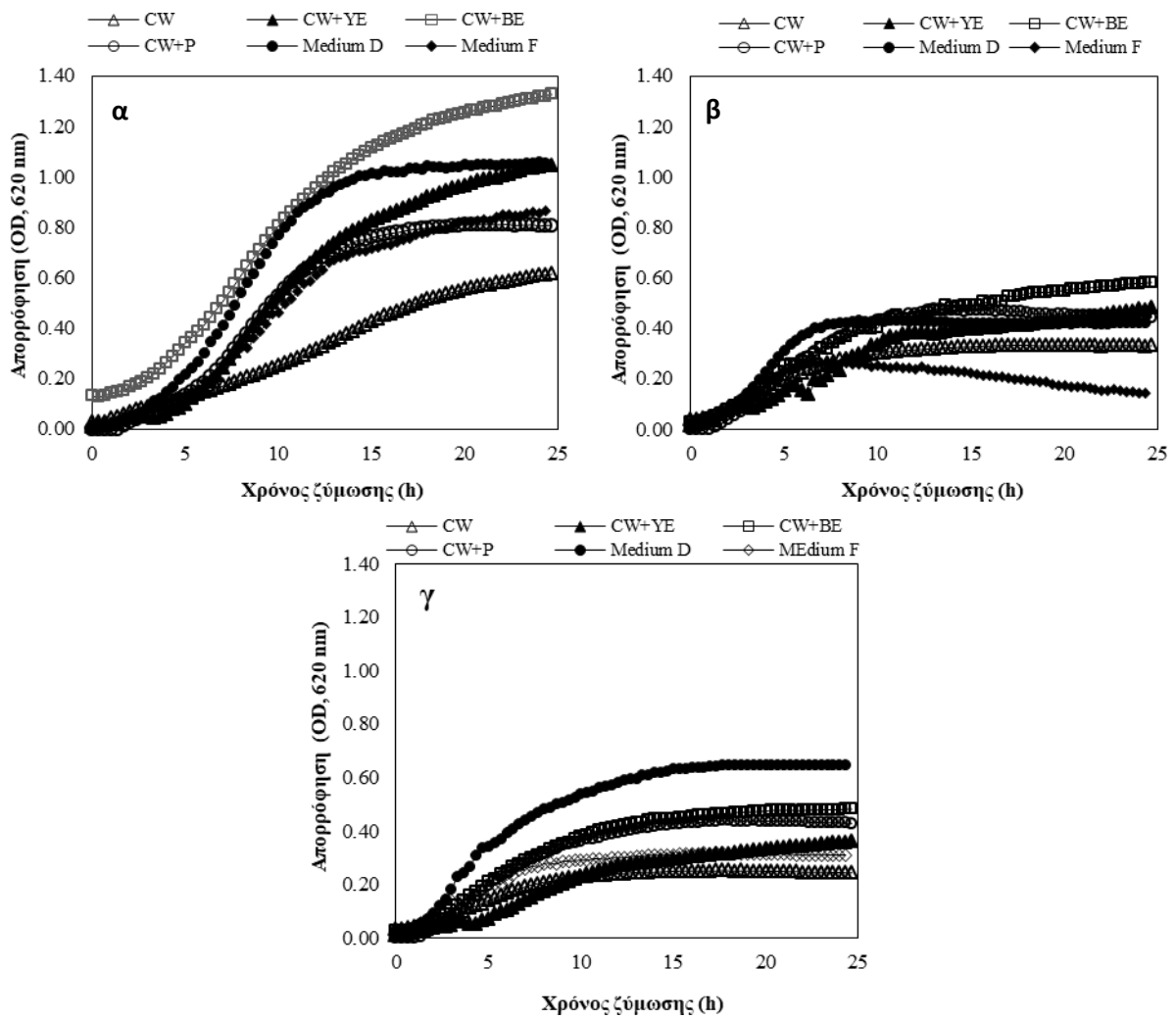
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Μελέτη επίδρασης οργανικών πηγών αζώτου στον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ , h^{-1}) γαλακτικών βακτηρίων

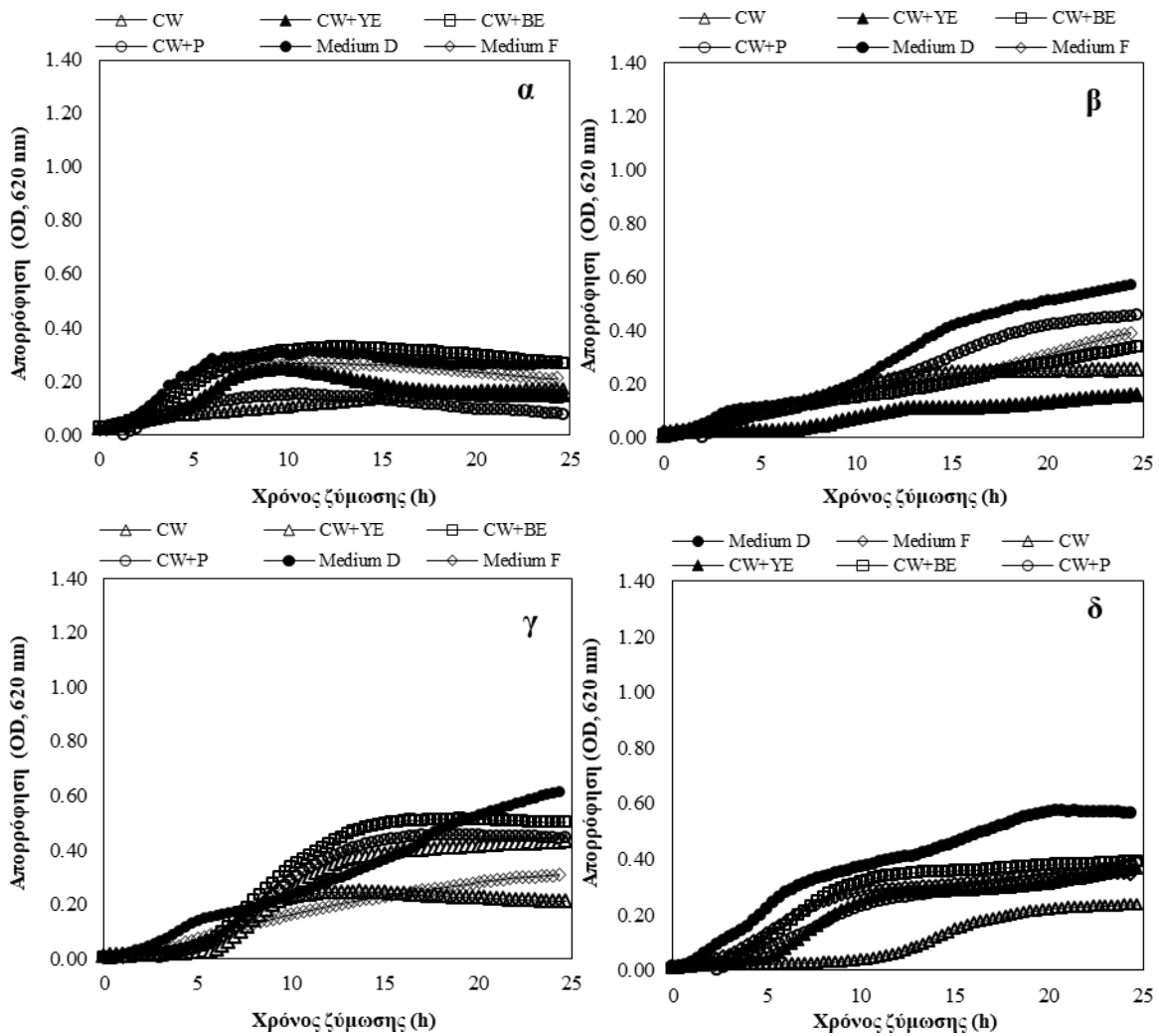
Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία, την τιμή του pH, τον αερισμό και το διαλυτό οξυγόνο αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την πορεία της ζύμωσης. Η κυτταρική αύξηση και η παραγωγή μεταβολιτών εξαρτώνται άμεσα από τις παραπάνω συνθήκες. Για τη βέλτιστη ανάπτυξή τους, τα γαλακτικά βακτήρια έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις σε αζωτούχες ενώσεις όπως αμινοξέα και πεπτίδια καθώς επίσης και σε άλλα ανόργανα συστατικά, όπως μέταλλα και ιχνοστοιχεία (Gudiña et al., 2011). Στη συγκεκριμένη μελέτη, επιλέχθηκε ως υπόστρωμα το τυρόγαλα, ένα χαμηλού κόστους υπόστρωμα ζύμωσης που υπάρχει σε αφθονία στην Ελλάδα και προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς του σε λακτόζη (40-60 g/L) (Lappa et al., 2019).

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 13 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία δύνανται να παράξουν βιοεπιφανειοδραστικές, όπως αποδείχτηκε σε προηγούμενη μελέτη (Kachrimanidou et al., 2021). Για την εύρεση της ιδανικότερης σύστασης του υποστρώματος, για το κάθε στέλεχος που τέθηκε προς μελέτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε φωτόμετρο μικροπλακών. Για το κάθε στέλεχος προσδιορίστηκε η κατανάλωση της λακτόζης μετά από 24 ώρες επώασης αλλά και η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Σε κάθε μια από τις περιπτώσεις το τυρόγαλα δέχτηκε τον κατάλληλο εμπλουτισμό ώστε να μελετηθεί η επίδραση διαφορετικών πηγών αζώτου.

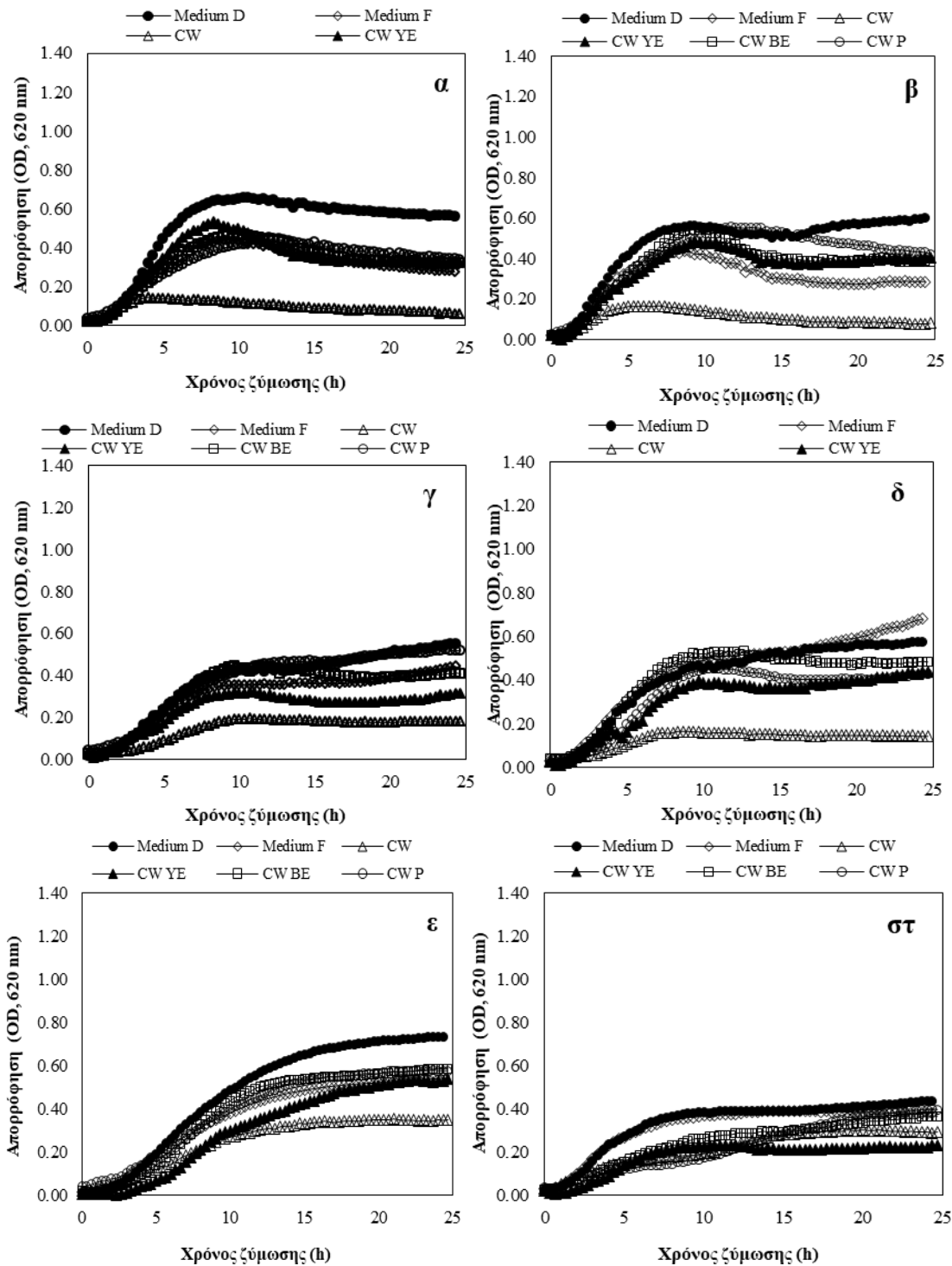
Σε πρώτο στάδιο, κατά το οποίο μελετήθηκε η επίδραση της πηγής του αζώτου, το τυρόγαλα μετά την αποπρωτεΐωσή του (CWP) αραιώθηκε μέχρι τελικής συγκέντρωσης της λακτόζης περίπου στα 20 g/L. Ακολούθησε προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης, πεπτόνης, εκχυλίσματος κρέατος καθώς και δύο θρεπτικά υποστρώματα τα οποία προήλθαν από το συνδυασμό αυτών ή/και ανόργανης πηγής. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε επίσης τυρόγαλα χωρίς προσθήκη επιπλέον πηγών αζώτου ως υπόστρωμα αναφοράς. Στα παρακάτω Γραφήματα (3-5) απεικονίζεται η καμπύλη της μικροβιακής αύξησης για κάθε στέλεχος ξεχωριστά παρουσία των διαφορετικών πηγών αζώτου.



Γράφημα 3 Κινητική αύξησης των στελεχών CECT 278 (α), CECT 4023 (β) και FMCC E108 (γ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος



Γράφημα 4 Κινητική αύξησης των στελεχών LQC 854 (α), LQC 752 (β) και LQC 753 (γ) και LQC 780 (δ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος



Γράφημα 5 Κινητική αύξησης των στελεχών, ACA-DC 182 (α), ACA-DC 183 (β), ACA-DC 270 (γ), ACA-DC 276 (δ), ACA-DC 731 (ε) και ACA-DC 4052 (στ) στις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα τυρογάλακτος

Ιδιαίτερα σημαντική για την μικροβιακή ανάπτυξη φαίνεται να είναι η προσθήκη οργανικών πηγών αζώτου. Από τα Γραφήματα (3-5), συμπεραίνεται πως το κάθε στέλεχος έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε άζωτο. Ο εμπλουτισμός του τυρογάλακτος με Medium D απέδωσε υψηλότερες τιμές οπτικής πυκνότητας (OD), άρα και

ειδικού ρυθμού αύξησης μ (h^{-1}), σε έναν αρκετά σημαντικό αριθμό στελεχών (FMCC E108, CECT 278, LQC 753, LQC 780, LQC 854, ACA-DC 182, ACA-DC 183, ACA-DC 270, ACA-DC 276).

Ακόμη, οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί αύξησης μ_{max} για τα στελέχη CECT 4023 ($\mu_{max}= 0,174$), LQC 752 ($\mu_{max}= 0,065$), ACA-DC 4052 ($\mu_{max}= 0,086$), και ACA-DC 731 ($\mu_{max}= 0,082$), παρατηρήθηκαν όταν το υπόστρωμα ενισχύθηκε με εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη και Medium F αντίστοιχα. Στον Πίνακα 5 παρατίθενται οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί αύξησης για κάθε στέλεχος όπως προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα

Πίνακας 5 Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης μ_{max} (h^{-1}) σε όλα τα στελέχη για τις διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου σε υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (CW)

Στέλεχος	CW	CW+Εκχύλισμα ζύμης	CW+Εκχύλισμα κρέατος	CW+Πεπτόνη	CW+Medium D	CW+Medium F
FMCC E108	0,039	0,05	0,067	0,071	0,142	0,075
CECT 278	0,043	0,099	0,110	0,099	0,144	0,120
CECT 4023	0,053	0,174	0,100	0,080	0,091	0,123
LQC 752	0,029	0,023	0,032	0,065	0,051	0,034
LQC 753	0,061	0,070	0,081	0,065	0,086	0,034
LQC 780	0,033	0,054	0,055	0,055	0,073	0,047
LQC 854	0,023	0,052	0,050	0,072	0,094	0,066
ACA-DC182	0,060	0,110	0,120	0,070	0,166	0,143
ACA-DC183	0,060	0,110	0,110	0,100	0,140	0,116
ACA-DC270	0,040	0,070	0,090	0,080	0,103	0,057
ACA-DC276	0,030	0,130	0,120	0,110	0,135	0,088
ACA-DC731	0,050	0,080	0,080	0,060	0,072	0,082
ACA-DC4052	0,040	0,060	0,080	0,040	0,082	0,086

Με το πέρας της επώασης των στελεχών στο φωτόμετρο μικροπλακών ακολούθησε συλλογή των δειγμάτων και ανάλυσή τους ως προς την κατανάλωση της λακτόζης του τυρογάλακτος και την παραγωγή

γαλακτικού οξέος. Τα αποτελέσματα της κατανάλωσης της λακτόζης μετά από 24 h ζύμωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 καθώς και στο Γράφημα 6.

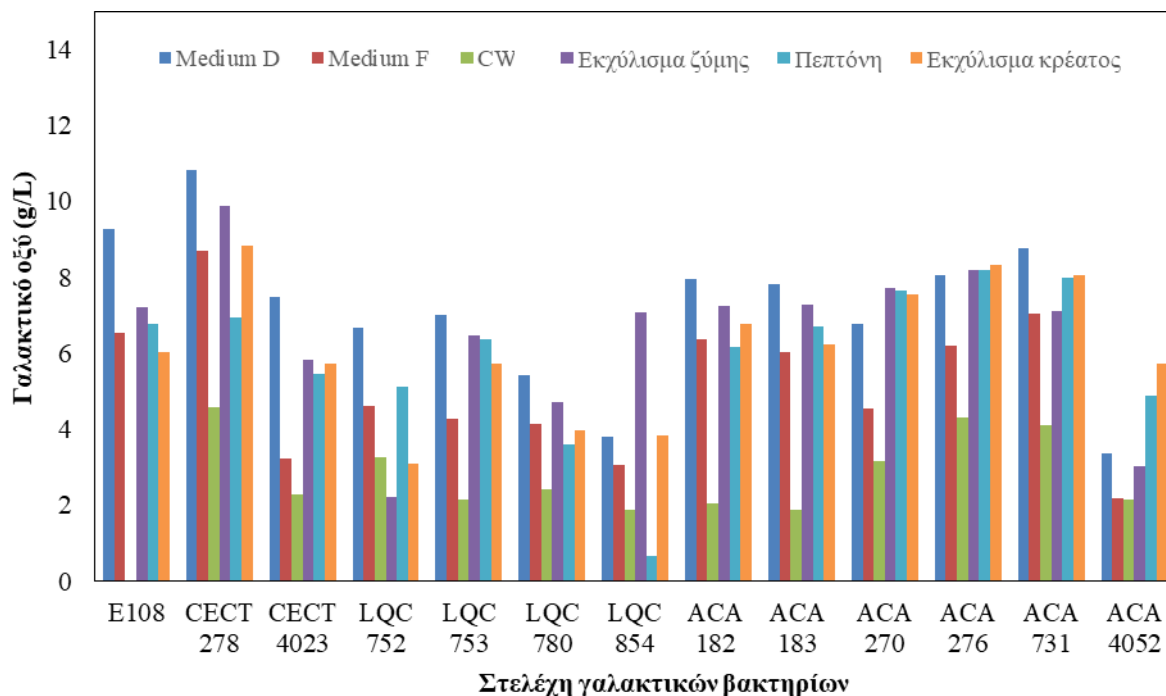
Πίνακας 6 Κατανάλωση λακτόζης σε (g/L) από το κάθε υπό εξέταση στέλεχος μετά την επώασή του σε διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου έπειτα από 24 h

Στέλεχος	CW	CW+ Εκχύλισμα ζύμης	CW+ Εκχύλισμα κρέατος	CW+Πεπτόνη	CW+Medium D	CW+Medium F
FMCC E108	9,57	13,56	15,79	14,09	10,18	10,81
CECT 278	10,72	15,66	16,33	13,69	12,77	11,03
CECT 4023	9,74	14,21	13,57	13,30	7,63	5,93
LQC 752	9,42	11,88	12,23	11,53	5,65	6,98
LQC 753	11,02	17,95	18,42	13,30	8,13	9,33
LQC 780	9,42	12,84	11,29	13,80	11,64	8,47
LQC 854	3,20	7,21	6,50	1,75	8,52	4,65
ACA-DC 182	5,02	14,79	12,35	13,14	15,68	11,95
ACA-DC 183	6,54	12,24	13,31	11,97	14,77	12,05
ACA-DC 270	6,33	8,17	9,76	4,39	11,85	6,54
ACA-DC 276	6,01	10,88	9,42	6,09	10,89	4,16
ACA-DC 731	5,60	9,96	7,75	6,96	10,61	3,92
ACA-DC 4052	6,98	6,68	5,45	9,52	7,21	3,06

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η μέγιστη κατανάλωση της λακτόζης δεν συνάδει σε όλες τις περιπτώσεις με το υπόστρωμα στο οποίο παρουσιάστηκε και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Ωστόσο είναι εμφανές πως για τα περισσότερα στελέχη ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με οργανικές πηγές αζώτου ευνόησε και την κατανάλωση λακτόζης.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος φαίνεται να έχουν παραχθεί κατά την επώαση των στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει Medium D, χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια σύνδεση της παραπάνω παρατήρησης με τη μέγιστη κατανάλωση της λακτόζης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η μέγιστη κατανάλωση λακτόζης πραγματοποιήθηκε στα περισσότερα στελέχη όταν το τυρόγαλα εμπλουτίστηκε με μία μόνο πηγή οργανικού αζώτου, συνήθως το εκχύλισμα κρέατος. Εξήγησε αυτό θα μπορούσε να αποτελεί πως οι υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου οδηγούν το μεταβολισμό των στελεχών προς παραγωγή βιομάζας και εν συνεχεία γαλακτικού οξέος. Κρατώντας όμως χαμηλά τα επίπεδα αζώτου, τα στελέχη προσαρμόζονται

καταναλώνοντας μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης, διατηρώντας έτσι τις μεταβολικές τους διεργασίες.



Γράφημα 6 Παραγωγή γαλακτικού οξέος (g/L) μετά από 24 h επώασης χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές οργανικού αζώτου και χωρίς προσθήκη εξωγενούς πηγής αζώτου σε υπόστρωμα αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (CW).

Προγενέστερες μελέτες έχουν αναφερθεί στη σημασία της σύστασης του θρεπτικού υποστρώματος στη μικροβιακή αύξηση αλλά και την επίδρασή της στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Οι Rodrigues et al. (2006) χρησιμοποίησαν το στέλεχος *Lactococcus lactis* 53 για να μελετήσουν την επίδραση της σύστασης του υποστρώματος στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Στη μελέτη αυτή μελετήθηκε ο εμπλουτισμός του τυρογάλακτος με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ζύμης και πεπτόνης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το συνθετικό υπόστρωμα MRS. Τα πειράματα έδειξαν πως το Medium D (50 g/L λακτόζη, 5,8 g/L εκχύλισμα ζύμης, 4,8 g/L πεπτόνη) είχε τη θετικότερη επίδραση ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Το πρόβλημα που προκύπτει με την εφαρμογή του παραπάνω εμπλουτισμού είναι η αύξηση του κόστους παραγωγής. Οι ερευνητές πρότειναν την μείωση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ζύμης στα 3 g/L, με μικρό αντίκτυπο στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.

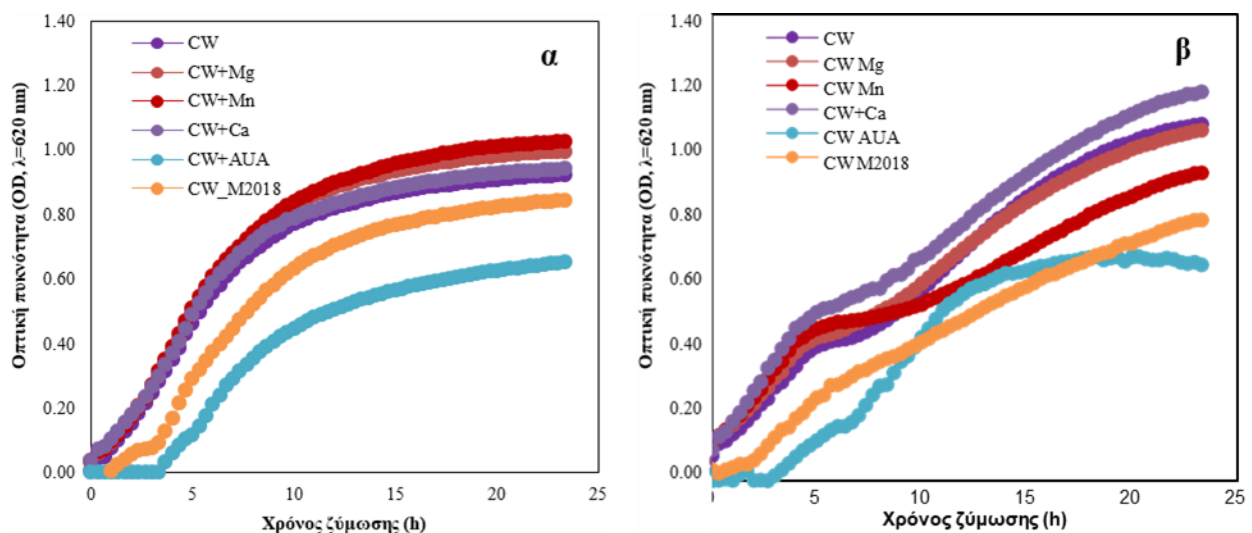
Οι Gudiña et al. (2011) πραγματοποίησαν μια αντίστοιχη μελέτη χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά στελέχη και συγκεκριμένα τα *Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens* CECT 25600, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20, *Lactobacillus plantarum* A14 και *Leuconostoc mesenteroides* A4. Η επίδραση της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης σε συνθετικό υπόστρωμα MRS-λακτόζη μελετήθηκε για το στέλεχος *L. paracasei* ssp. *paracasei*. Τα πειράματα έδειξαν πως το εκχύλισμα ζύμης είχε θετικότερη επίδραση ως προς την παραγωγή βιομάζας, ενώ η προσθήκη πεπτόνης ήταν αυτή που επηρέασε θετικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.

Ακόμη φάνηκε πως η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και η βέλτιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών δεν συνέπιπταν παρά το γεγονός ότι οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ήταν συνδεδεμένες με τη βιομάζα. Η παρατήρηση αυτή ενδέχεται να συνδέεται με το γεγονός ότι η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος ως προς τα δυο βασικά συστατικά του (άνθρακα και άζωτο), δεν αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για την σύνθεση των βιοεπιφανειοδραστικών.

5.2. Μελέτη επίδρασης μεταλλικών αλάτων και ιχνοστοιχείων στον ειδικό ρυθμό αύξησης (μ , h^{-1}) γαλακτικών βακτηρίων

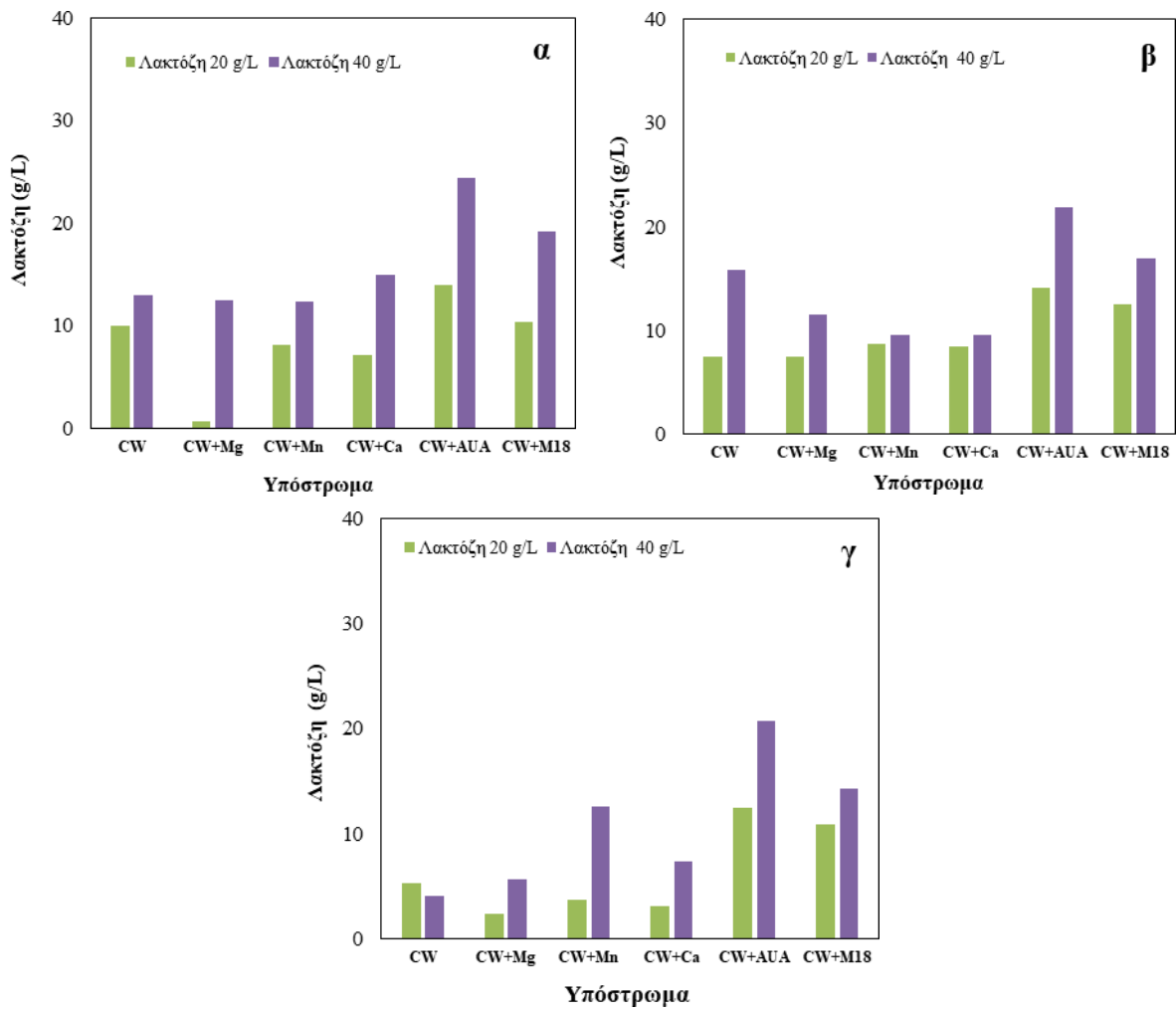
Σε επόμενο στάδιο διεξήχθησαν τα πειράματα για την επίδραση του εμπλουτισμού του τυρογάλακτος με μέταλλα και ιχνοστοιχεία στον ειδικό ρυθμό αύξησης των υπό μελέτη γαλακτικών βακτηρίων. Η επίδραση διαφόρων ιχνοστοιχείων στην παραγωγή επιφανειοδραστικών έχει επισημανθεί σε πολλές μελέτες (Joshi, 2007; Wei, 2007). Τα φωσφορικά άλατα έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή επιφανειοδραστικών. Παρόλο που δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο μηχανισμός που επιδρούν, είναι γνωστό ότι τα φωσφορικά άλατα είναι σημαντικά συστατικά των νουκλεϊκών οξέων, των φωσφολιπιδίων και του κυτταρικού τοιχώματος. Ο σίδηρος επίσης παρουσιάζει σημαντική επίδραση καθώς παίζει καίριο ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Abalos, 2002). Επιπλέον, η προσθήκη μονοθενών και δισηθενών ιόντων (όπως K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) και ιχνοστοιχείων αυξάνει την απόδοση σε επιφανειοδραστικές (Reis, 2013; Ismail, 2015). Σύμφωνα με τους Ghasemi et al., (2019) η προσθήκη μετάλλων και ιχνοστοιχείων ευνοεί τη βιοσύνθεση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών ενισχύοντας τη δράση των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτήν ενώ η προσθήκη Fe^{2+} , Mn^{2+} και Mg^{2+} είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών όταν προστέθηκαν χαμηλού κόστους υποστρώματα (Onur, 2015). Η επιλογή των συγκεντρώσεων και των συστατικών για τον εμπλουτισμό του υποστρώματος βασίστηκε σε προγενέστερα πειράματα των Mouafo et al. (2018) στα οποία για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, η μελάσσα που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα εμπλουτίστηκε με το σύνολο των μετάλλων και ιχνοστοιχείων του M18 (Πίνακας 3).

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα 13 προαναφερθέντα στελέχη και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης (20 και 40 g/L). Στα πειράματα που ακολούθησαν εξετάστηκε η επίδραση του κάθε προαναφερθέντος συστατικού ξεχωριστά, ενώ για να εξεταστεί αποκλειστικά και μόνο αυτός ο παράγοντας δεν πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του υποστρώματος με οργανικές πηγές αζώτου. Στο Γράφημα 7, απεικονίζονται οι κινητικές της μικροβιακής αύξησης για τα στελέχη CECT 278 (Γράφημα 7α) και ACA-DC 183 (Γράφημα 7β) με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L και η επίδραση σε αυτή των διαφορετικών μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Και για τα δύο στελέχη CECT 278 (Γράφημα 7α) και ACA-DC 183 (Γράφημα 7β) φάνηκε πως η μικροβιακή αύξηση επηρεάστηκε θετικά ακόμη και χωρίς την προσθήκη οποιασδήποτε πηγής αζώτου.

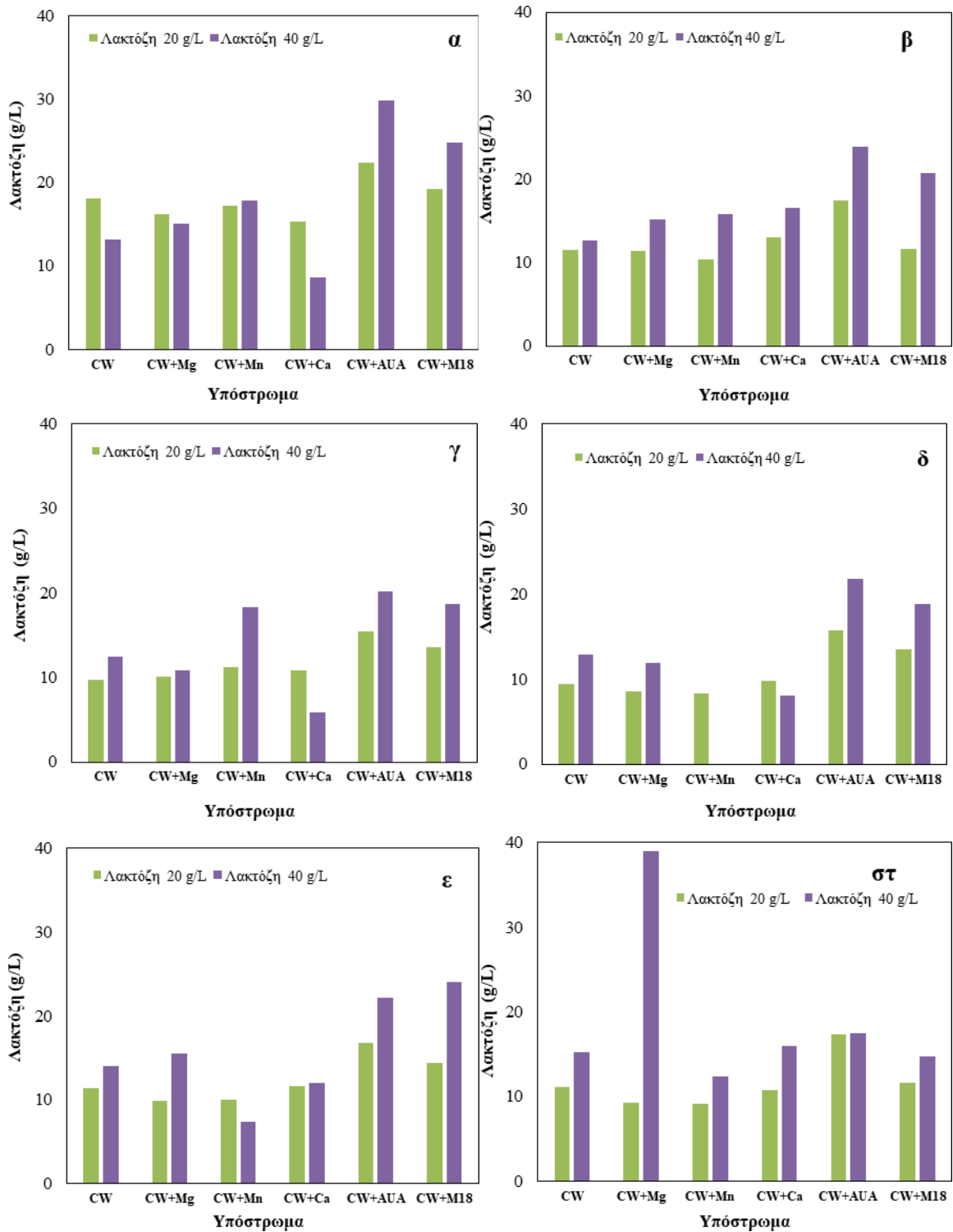


Γράφημα 7 Κινητική αύξησης των στελεχών CECT 278 (α) και ACA-DC 183 (β) μετά την προσθήκη στο τυρόγαλο διαφορετικών μεταλλικών αλάτων και συνδυασμό αυτών.

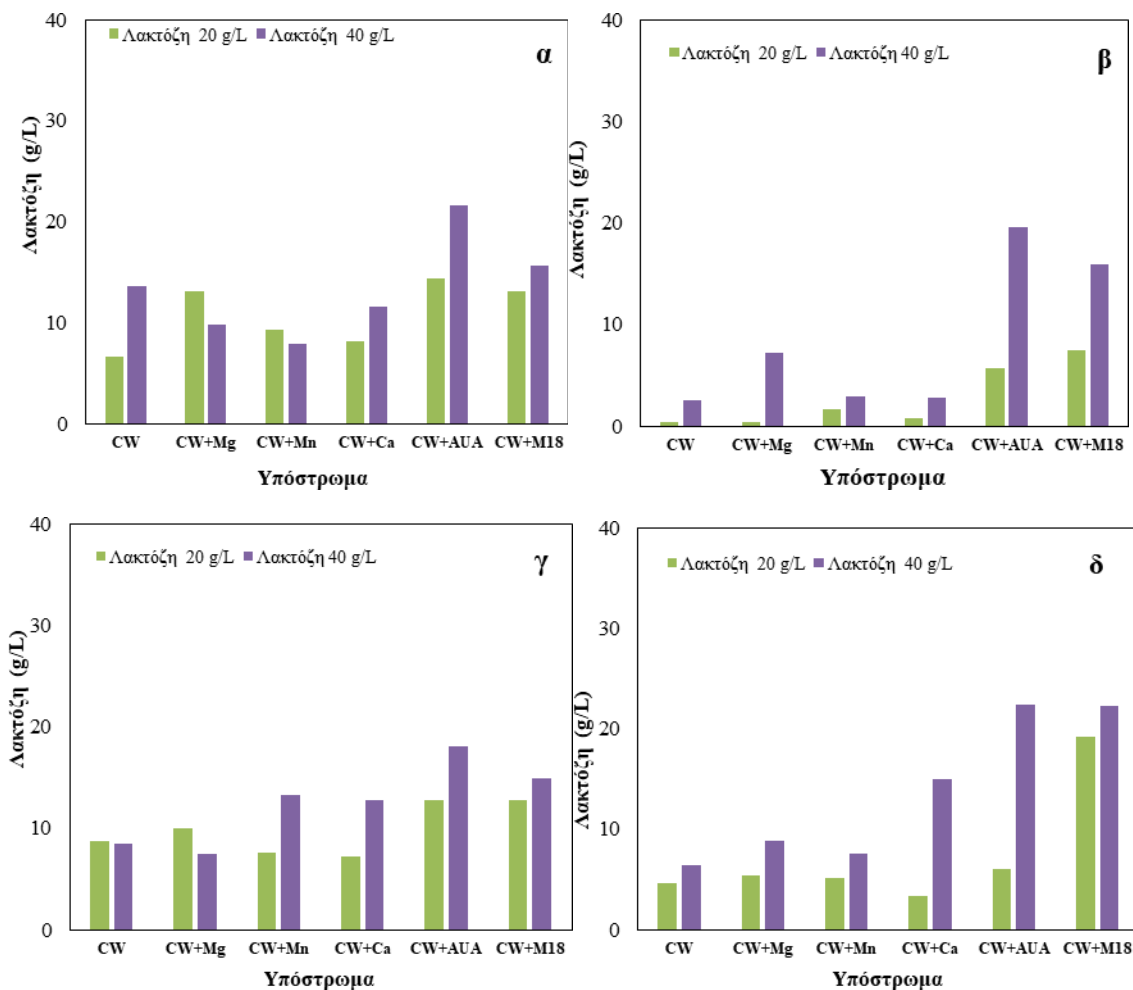
Η προσθήκη ασβεστίου, μαγνησίου και μαγγανίου φάνηκε να έχει θετική επίδραση στην κυτταρική αύξηση με την τιμή του μ_{\max} να είναι $0,073 \text{ h}^{-1}$ για το στέλεχος CECT 278 όταν αναπτύχθηκε σε εμπλουτισμένο με ασβέστιο τυρόγαλο ενώ αντίστοιχα ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης για το στέλεχος ACA-DC 183 ήταν $0,094 \text{ h}^{-1}$ κατά την επώασή του παρουσία μαγγανίου. Στα Γραφήματα 8-10 παρουσιάζεται η κατανάλωση της λακτόζης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος για κάθε ένα από τα μελετώμενα στελέχη.



Γράφημα 8 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών CECT 278 (α), CECT 4023 (β) και E108 (γ) σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλο (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών.



Γράφημα 9 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών ACA-DC 182 (α), ACA-DC 183 (β), ACA-DC 270 (γ), ACA-DC 271 (δ), ACA-DC 276 (ε), ACA-DC 731 (στ) σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλο (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών.



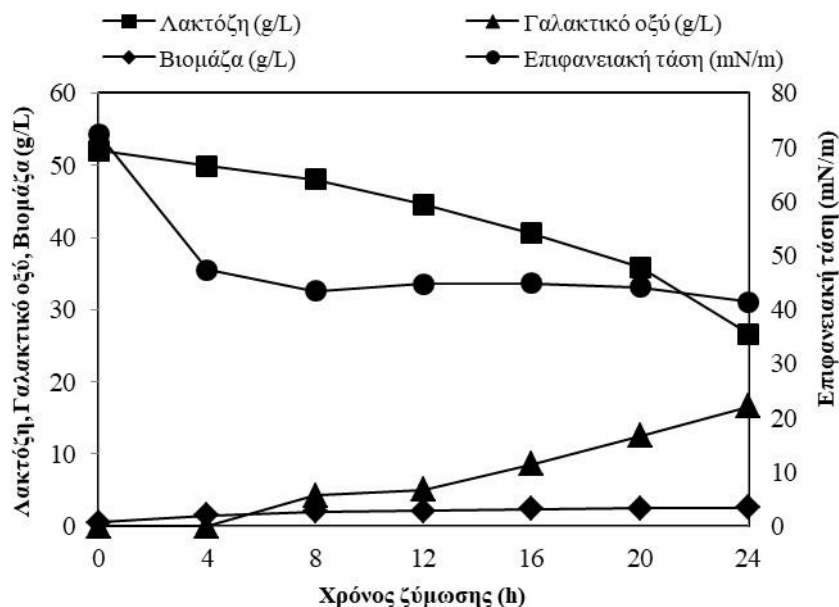
Γράφημα 10 Κατανάλωση λακτόζης των στελεχών LQC 752 (α), LQC 753 (β), LQC 854, LQC 780 σε αρχική συγκέντρωση 20 και 40 g/L μετά την προσθήκη διαφορετικών αλάτων και θρεπτικών στο τυρόγαλα (CW) μετά από 24 h επώασης στο φωτόμετρο μικροπλακών

Όπως φαίνεται στα Γραφήματα 9-10 στην πλειονότητα των περιπτώσεων η κατανάλωση της λακτόζης ήταν μεγαλύτερη όταν η αρχική συγκέντρωση τυρογάλακτος ήταν 40 g/L ενώ γίνεται εύκολα αντιληπτό πως σε όλα σχεδόν τα στελέχη μετά το πέρας των μετρήσεων παρέμεινε αρκετή ποσότητα μη καταναλωθείσας λακτόζης. Τέλος, φαίνεται πως η μεγαλύτερη κατανάλωση λακτόζης παρατηρήθηκε όταν το τυρόγαλα εμπλουτίστηκε με συστατικά που περιείχαν και ανόργανες πηγές. Βάσει των προηγούμενων μελετών η εξήγηση σε αυτό έγκειται στο γεγονός πως με την προώθηση της αύξησης της βιομάζας καταναλώνεται μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης χωρίς αυτό όμως να συνεπάγεται και τη μέγιστη παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών (Gudiña et al., 2011).

5.3. Ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων σχετικά με την σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, ακολούθησε η διεξαγωγή ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρες ενεργού όγκου 1,6 L, ώστε να μελετηθεί η πορεία παραγωγής

βιοεπιφανειοδραστικών. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για τις ζυμώσεις αυτές ήταν τα *L.rhamnosus* CECT278 και *L. fermentum* ACA-DC 183, καθώς έδωσαν τα πιο καλά αποτελέσματα στα πειράματα σε φωτόμετρο μικροπλακών. Στις ζυμώσεις που ακολούθησαν, το τυρόγαλα εμπλουτίστηκε με το Medium B. Στις ζυμώσεις των στελεχών CECT 278 και ACA-DC 183 το υπόστρωμα εμπλουτίστηκε επιπλέον με ασβέστιο και μαγγάνιο αντίστοιχα. Το εμβόλιο αποτέλεσε το 5% του ενεργού όγκου της ζύμωσης

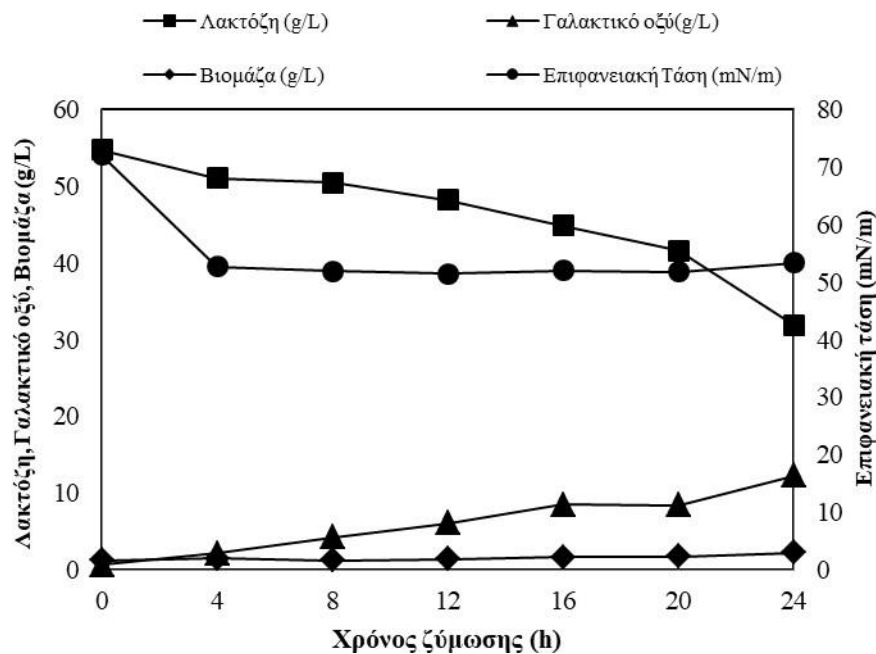


Γράφημα 11 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με ασβέστιο και οργανικές πηγές αζώτου (Medium B) (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα)

Η πρώτη ζύμωση του στελέχους CECT 278 πραγματοποιήθηκε σε τυρόγαλα το οποίο δέχτηκε εμπλουτισμό με ασβέστιο, εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης με σκοπό την αύξηση της ποσότητας των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 11, η επιφανειακή τάση μετά από απότομη πτώση τις πρώτες 4 ώρες (47,4 mN), έφθασε τα 43,8 mN/m στις 8 ώρες ζύμωσης, τιμή που παρέμεινε μέχρι και το τέλος της ζύμωσης χωρίς να σημειώσει κάποια ιδιαίτερη μεταβολή. Η μείωση στην επιφανειακή τάση αλλά και η μεγαλύτερη ποσότητα τελικού προϊόντος (0,3 g/L) σε σχέση με την ποσότητα από την αντίστοιχη ζύμωση χωρίς τον εμπλουτισμό με οργανικές πηγές αζώτου (Πίνακας 7), δε φαίνεται να σχετίζεται με κάποιον άλλον παράγοντα της ζύμωσης πέρα από τον εμπλουτισμό αυτό. Είναι αρκετά πιθανό το παραπάνω αποτέλεσμα να οφείλεται στην προσθήκη πεπτόνης, η οποία όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα ενισχύει την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Η ποσότητα της καταναλωθείσας λακτόζης και του FAN ήταν 25,4 g/L και 47 mg/L, αντίστοιχα. Τέλος η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ξεκίνησε στο διάστημα μεταξύ 4-8 ωρών και συνεχίστηκε μέχρι και τις 24 ώρες φτάνοντας 16,6 g/L.

Στο Γράφημα 12 απεικονίζονται η κινητική που προέκυψε από τη ζύμωση του στελέχους *L. rhamnosus* CECT 278, όταν αυτή πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα αποτελούμενο από τυρόγαλα εμπλουτισμένο μόνο με ασβέστιο. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποστρώματος είχε σαν στόχο τη διερεύνηση της ζύμωσης με το

χαμηλότερο δυνατό κόστος αξιοποιώντας αποκλειστικά τα συστατικά του αποβλήτου για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.



Γράφημα 12 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους CECT 278 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με ασβέστιο (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).

Κατά τη ζύμωση αυτή καταναλώθηκαν 22,9 g/L λακτόζης και 33,4 mg/L FAN του τυρογάλακτος ενώ παρήχθησαν 11,7 g/L γαλακτικού οξέος σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (24 h). Αναφορικά με την επιφανειακή τάση, παρατηρήθηκε απότομη μείωση τις πρώτες 4 ώρες όπου μειώθηκε κατά 19,4 mN/m φτάνοντας στα 52,7 mN/m και παραμένοντας σε αυτή την τιμή μέχρι και την ολοκλήρωση της ζύμωσης χωρίς να σημειώσει κάποια ιδιαίτερη μεταβολή.

Στον Πίνακα 7, αναφέρονται οι συντελεστές απόδοσης που προέκυψαν από τις δύο παραπάνω ζυμώσεις ως προς τη βιομάζα, την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών και γαλακτικού οξέος, αλλά και οι ποσότητες βιομάζας και συνδεδεμένων με το κύτταρο βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στο τέλος της ζύμωσης. Στον Πίνακα 8 αναφέρονται στοιχεία της ζύμωσης που σχετίζονται με την επιφανειακή τάση όπως η μέγιστη μείωση (ST_{max}) που σημειώθηκε και η χρονική στιγμή (T_f ST_{max}) όπου αυτή επετεύχθη, καθώς επίσης και η τιμή της επιφανειακής τάσης στο τέλος της ζύμωσης αλλά και η μείωση που προκάλεσε η εκχύλιση των βιοεπιφανειοδραστικών στην επιφανειακή τάση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS (ST= 72 mN/m). Τέλος αναφέρεται η ποσότητα της καταναλωθείσας λακτόζης του υποστρώματος αλλά και η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος μετά από 24 ώρες επώασης.

Πίνακας 7 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{Γ.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, για το στέλεχος *L. rhamnosus* CECT 278 με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L.

<i>L. rhamnosus</i> CECT 278	$Y_{X/S}^a$ (g/g)	$Y_{P/S}^{a,b}$ (g/g)	$Y_{Γ.O/S}^a$ (g/g)	Τελικό προϊόν(g/L)	Μέγιστη Συγ/ση Προϊόντος (g/L)	Βιομάζα(g/L)
CW+ Medium B	0,09	0,014	0,65	0,3	0,36	2,3
CW	0,04	0,009	0,51	0,2	0,21	1,0

a:Ο συντελεστής απόδοσης YP/S αφορά την χρονική στιγμή όπου σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή προϊόντος

b:Οι συντελεστές απόδοσης υπολογίστηκαν με βάση την καταναλωθείσα λακτόζη σε κάθε παρτίδα και στο σύνολο των τριών ζυμώσεων

Πίνακας 8 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *L. rhamnosus* CECT 278 σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L.

<i>L. rhamnosus</i> CECT 278	T_f (h) ^a	ST_f (mN/m) ^b	$T_f ST_{max}$ (h) ^c	ST_{max} (mN/m) ^d	$ST_{Μείωση}$ (mN/m) ^e	Λακτόζη (g/L)	Γ.Ο. (g/L) ^f
CW + Medium B	24	43,1	8	41,4	30,6	25,4	16,6
CW	24	53,4	12	51,5	20,5	22,9	11,7

a: T_f (h): Χρονική διάρκεια ζύμωσης

b: ST_f (mN/m) : Επιφανειακή τάση στο τέλος της ζύμωσης

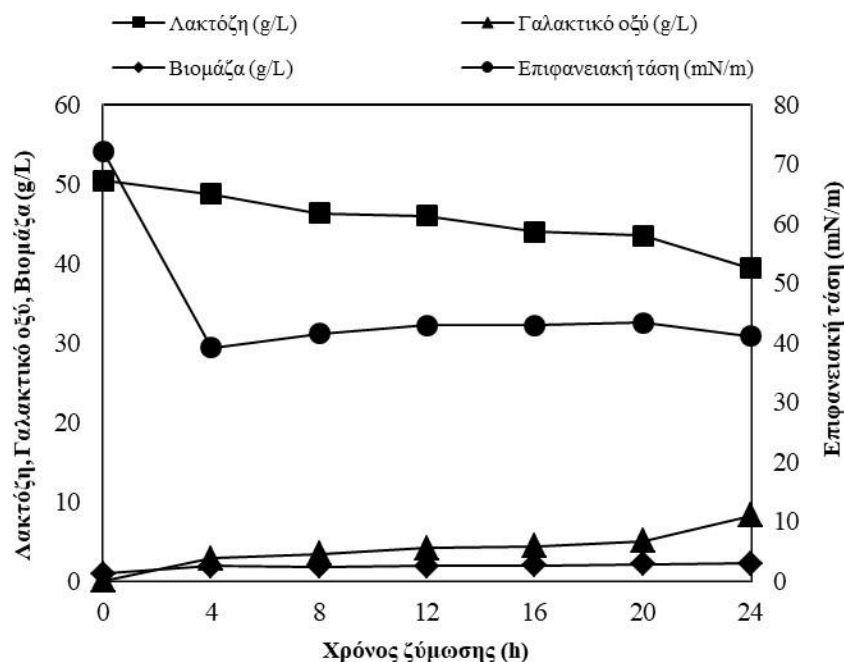
c: $T ST_{max}$ (h): Χρονική στιγμή που σημειώθηκε η μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

d: ST_{max} (mN/m): Μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

e: $ST_{Μείωση}$ (mN/m): Μείωση που προκλήθηκε στην επιφανειακή τάση του PBS ($ST= 72$ mN/m)

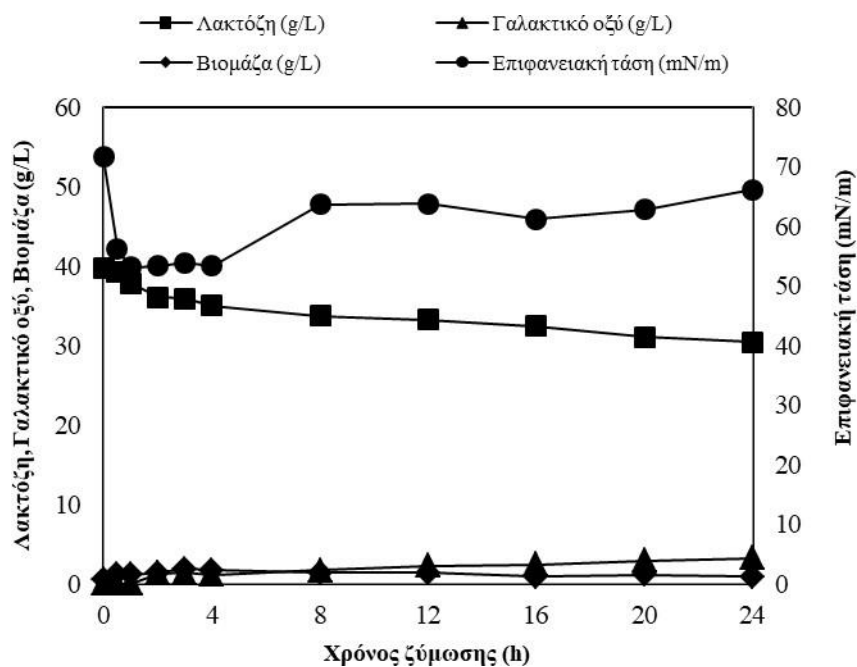
f: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης

Από τους Πίνακες 7 και 8 φαίνεται να επαληθεύονται οι μελέτες των (Rodrigues et al., 2006a) και (Rodrigues et al., 2006b) για το στέλεχος *Lactococcus lactis* 53, σύμφωνα με τις οποίες το τυρόγαλο εμπλουτισμένο με πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης δείχνει να ευνοεί την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών. Ακόμη, οι Gudina et al. (2011) τεκμηρίωσαν ότι η προσθήκη πεπτόνης παρουσίασε θετική επίδραση στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ενώ το εκχύλισμα ζύμης ήταν βασικό συστατικό για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Έτσι όπως προκύπτει και παραπάνω, αν και η διαφορά των δύο υποστρωμάτων δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη ως προς την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος, οι βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από τη ζύμωση του στελέχους στο εμπλουτισμένο τυρόγαλο οδήγησαν σε αρκετά μεγαλύτερη μείωση στην επιφανειακή τάση του PBS.



Γράφημα 13 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους ACA-DC 183 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με μαγγάνιο και οργανικές πηγές αζώτου (Medium B) (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα για το στέλεχος ACA-DC 183. Για το στέλεχος αυτό πραγματοποιήθηκε η πρώτη ζύμωση σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο εμπλουτίστηκε με Medium B και μαγγάνιο για να διαπιστωθεί η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών με τις βέλτιστες συνθήκες με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων στο φωτόμετρο μικροπλακών. Έτσι, φαίνεται πως η επιφανειακή τάση σημείωσε και σε αυτή την περίπτωση σημαντική πτώση τις πρώτες τέσσερις ώρες, αφού μειώθηκε κατά 33 mN/m, φτάνοντας στα 39,2 mN/m. Στο σημείο αυτό είχε και την χαμηλότερή της τιμή μιας και στη συνέχεια σταθεροποιήθηκε περίπου στα 42 mN/m από την 8^η μέχρι και την 24^η ώρα ζύμωσης. Επιπλέον στη συγκεκριμένη ζύμωση καταναλώθηκαν 11 g/L λακτόζης, 48 mg/L FAN ενώ παρήχθησαν μέχρι και το τέλος της ζύμωσης 8,2 g/L γαλακτικού οξέος.



Γράφημα 14 Κινητική ανάπτυξης του στελέχους ACA-DC 183 σε τυρόγαλο εμπλουτισμένο με μαργγάνιο (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα).

Στη ζύμωση που ακολούθησε έγινε λήψη δείγματος μισή ώρα μετά την έναρξή της και ακολούθησαν δειγματοληψίες κάθε μία ώρα μέχρι να συμπληρωθούν οι 4 πρώτες ώρες ζύμωσης. Η στρατηγική αυτή ακολούθηθηκε προκειμένου να εντοπιστεί η χρονική στιγμή που ξεκίνησε η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών. Με τον τρόπο αυτό μπόρεσε να ελεγχθεί καλύτερα η πορεία της ζύμωσης στο διάστημα αυτό, που όπως φάνηκε από τις προηγούμενες ζυμώσεις ήταν καθοριστικής σημασίας για την παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών. Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών ξεκίνησε 30 λεπτά μετά τον εμβολιασμό ($ST=56,3$ mN/m) (Γράφημα 13). Η επιφανειακή τάση μέχρι και το διάστημα των 4 ωρών παρέμεινε στα 53,3 mN/m σημειώνοντας μείωση 18,3 mN/m. Η πτωτική της τάση σταμάτησε μετά από τις 4 ώρες φτάνοντας στα 66,1 mN/m στη λήξη της ζύμωσης. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται από τους Rodrigues et al. (2006) οι οποίοι μελέτησαν τα στελέχη *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* και *L. coryniformis* χρησιμοποιώντας συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν μείωση της επιφανειακής τάσης κατά 12-15 mN/m μετά από μισή ώρα επώασης. Η κατανάλωση της λακτόζης και του FAN ήταν 9,4 g/L και 30 mg/L, αντίστοιχα, ενώ το γαλακτικό οξύ που ξεκίνησε να παράγεται μετά τις δύο πρώτες ώρες ζύμωσης ήταν 3,2 g/L. Στους Πίνακες 9 και 10 παρουσιάζονται οι συντελεστές απόδοσης βιομάζας, βιοεπιφανειοδραστικών και γαλακτικού οξέος για κάθε ζύμωση καθώς και η μέγιστη τιμή μείωσης της επιφανειακή τάσης για το στέλεχος ACA-DC 183.

Πίνακας 9 Επίδραση εμπλουτισμένου τυρογάλακτος στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{Γ.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας, σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, με το στέλεχος *L. fermentum* ACA 183 (αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L).

<i>L. fermentum</i> ACA-DC 183	$Y_{X/S}^a$ (g/g)	$Y_{P/S}^{a,b}$ (g/g)	$Y_{Γ.O/S}^a$ (g/g)	Τελικό προϊόν(g /L)	Μέγιστη Συγ/ση Προϊόντος (g/L)	Βιομάζα (g /L)
CW + Medium B	0,12	0,03	0,75	0,20	0,36	1,3
CW	0,05	0,01	0,34	0,12	0,12	0,5

a: Οι συντελεστές απόδοσης υπολογίστηκαν με βάση την καταναλωθείσα λακτόζη σε κάθε παρτίδα και στο σύνολο των τριών ζυμώσεων

b: Ο συντελεστής απόδοσης $Y_{P/S}$ αφορά την χρονική στιγμή όπου σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή προϊόντος

Πίνακας 10 Επίδραση εμπλουτισμένου και μη τυρογάλακτος στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *L. fermentum* ACA 183 σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L

<i>L. fermentum</i> ACA-DC 183	T_f (h) ^a	ST_f (mN/m) ^b	$T_f ST_{max}$ (h) ^c	ST_{max} (mN/m) ^d	ST Μείωση (mN/m) ^e	Λακτόζη (Κατ/νη) (g/L)	Γ.O (g/L) ^f
CW+ Medium B	24	41,1	4	39,2	32,8	11	8,2
CW	24	62,8	1	53,1	18,3	9,4	3,2

a: T_f (h): Χρονική διάρκεια ζύμωσης

b: ST_f (mN/m) : Επιφανειακή τάση στο τέλος της ζύμωσης

c: $T_f ST_{max}$ (h): Χρονική στιγμή που σημειώθηκε η μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

d: ST_{max} (mN/m): Μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

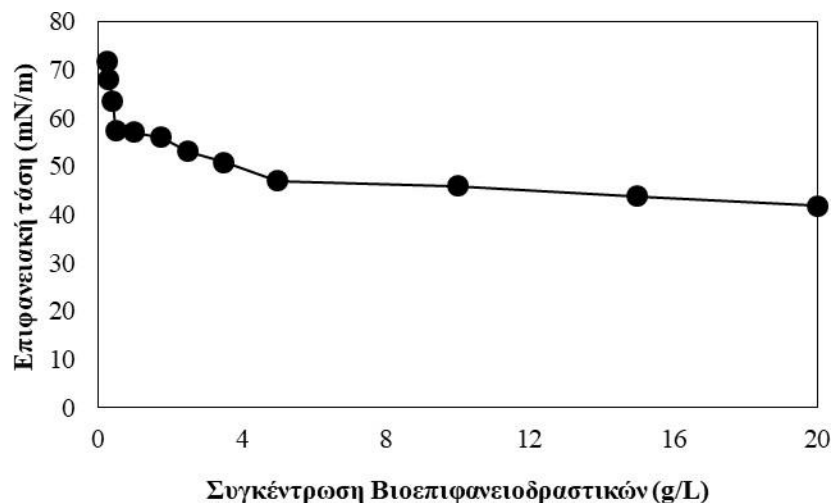
e: ST Μείωση (mN/m): Μείωση που προκλήθηκε στην επιφανειακή τάση του PBS ($ST_{PBS} = 72$ mN/m)

f: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης

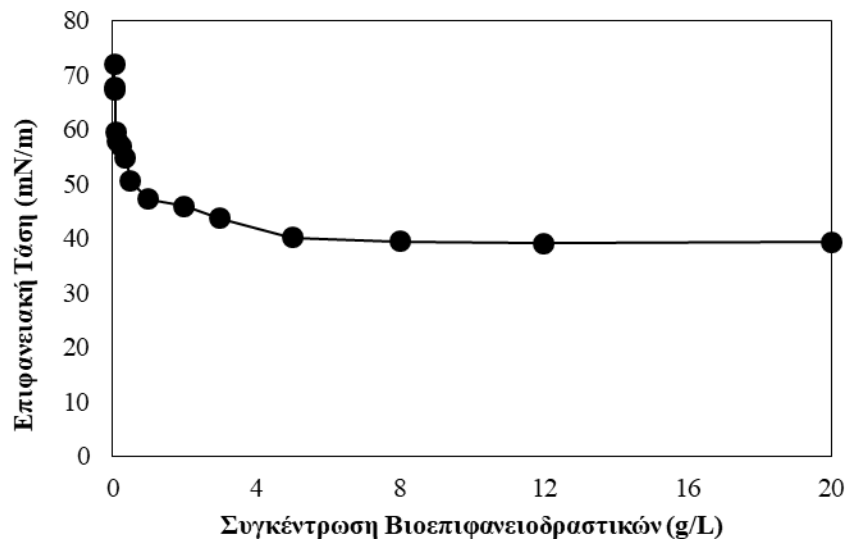
Σχετικά με τα αποτελέσματα των ζυμώσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 10 για το στέλεχος ACA-DC 183 φαίνεται πως η προσθήκη οργανικών πηγών αζώτου επηρέασε την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών και βιομάζας. Όπως και με το στέλεχος *L. rhamnosus* CECT 278 η μείωση που προκλήθηκε στην επιφανειακή τάση ήταν μεγαλύτερη. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10, η επιφανειακότητα μειώθηκε κατά 13,9 (mN/m) περισσότερο όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία οργανικών πηγών αζώτου. Η χρήση του εμπλουτισμένου τυρογάλακτος οδηγεί επίσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας (1,3 g/L σε σχέση με 0,5 g/L). Και σε αυτή την περίπτωση φάνηκε να επαληθεύονται όσα αναφέρονται στη βιβλιογραφία, σχετικά με την επίδραση της πεπτόνης στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών και του εκχυλίσματος ζύμης στην παραγωγή βιομάζας (Rodrigues et al., 2006a; Rodrigues et al., 2006b; Gudina et al., 2011).

5.4. Προσδιορισμός της κρίσιμης συγκέντρωσης σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για τις παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες από τα στελέχη *L. rhamnosus* CECT 278 και *L. fermentum* ACA-DC 183

Μετά τη λυοφιλίωση για την παραλαβή των συνδεδεμένων με τη βιομάζα βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται από το κάθε στέλεχος, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC). Η επιφανειακή τάση δε δύναται να μειωθεί περαιτέρω, σε περίπτωση αύξησης της συγκέντρωσης των βιοεπιφανειοδραστικών πάνω από τη CMC, ενώ ο προσδιορισμός της είναι απαραίτητος καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τελική εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών. Από το Γράφημα 14 και Γράφημα 15 βρέθηκε πως η CMC για τις βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από το στέλεχος *L. rhamnosus* CECT 278 είναι 3,7 g/L ενώ για το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 είναι 0,56 g/L. Η τιμή της CMC φαίνεται να επηρεάζεται από παράγοντες της ζύμωσης όπως το υπόστρωμα, το χρησιμοποιούμενο στέλεχος και τη χημική σύσταση των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών. Μελέτες αναφέρουν εύρος διαφορετικών CMC (0,39-3 g/L) για βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων π.χ.: *L. plantarum* ATCC 8041 (CMC= 1 g/L), *L. rhamnosus* (CMC= 3 g/L), *L. pentosus* (CMC= 0,39 g/L).



Γράφημα 15 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος *L. Rhamnosus* CECT278



Γράφημα 16 Κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) για το στέλεχος *L. fermentum* ACA- DC 183.

5.5. Μελέτη επίδρασης της προκαλλιέργειας, της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης και των συνθηκών αερισμού στην παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε το στέλεχος ACA-DC 183, καθώς έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, για την περαιτέρω μελέτη επίδρασης διαφορετικών παραμέτρων της ζύμωσης. Όπως φάνηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (3.4), η μεγαλύτερη μείωση στην επιφανειακή τάση δεν επήλθε ταυτόχρονα με την αύξηση της βιομάζας, παρόλο που πρόκειται για συνδεδεμένες με τα κύτταρα βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Μάλιστα η επιφανειακή τάση φάνηκε να σημειώνει τη σημαντικότερη μείωση κατά τις πρώτες ώρες ζύμωσης, το οποίο ενδεχομένως να εξηγείται από το ρόλο των βιοεπιφανειοδραστικών, που είναι η διαλυτοποίηση συστατικών του υποστρώματος ώστε να γίνουν ευκολότερα προσβάσιμα από το μικροβιακό κύτταρο (Sharma et al., 2016; Sharma & Singh Saharan, 2014). Για το σκοπό αυτό, κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθούν περαιτέρω οι συνθήκες της ζύμωσης και συγκεκριμένα ο όγκος της προκαλλιέργειας, ο χρόνος επώασης της προκαλλιέργειας, καθώς και οι συνθήκες αερισμού και αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης κατά τη βιοδιεργασία.

Πίνακας 11 Επίδραση διαφορετικών στρατηγικών ζύμωσης στους συντελεστές απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/S}$), προϊόντος ($Y_{P/S}$) και γαλακτικού οξέος ($Y_{Γ.O/S}$), στη συγκέντρωση τελικού προϊόντος και βιομάζας σε ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες με το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 χρησιμοποιώντας τυρόγαλα εμπλουτισμένο με Μπ ως θρεπτικό υπόστρωμα.

Λακτόζη (Αρχική)(g/L)	Εμβόλιο (%) ^a	Χρόνος επώασης εμβολίου (h)	$Y_{X/S}^b$ (g/g)	$Y_{P/S}^{b,c}$ (g/g)	$Y_{Γ.O/S}^b$ (g/g)	Μέγιστη συγκέντρωση προϊόντος (g/L)	Τελικό προϊόν (g/L)
<i>Αναερόβιες συνθήκες</i>							
40	5	12	0,05	0,010	0,34	0,120	0,120
40	10	12	0,06	0,015	0,37	0,280	0,180
40	10	16	0,11	0,002	0,11	0,008	0,008
20	5	12	0,09	0,030	0,54	0,180	0,130
<i>Αερόβιες συνθήκες</i>							
40	10	12	0,07	0,020	0,83	0,260	0,260
40	5	12	0,06	0,012	0,60	0,110	0,110
20	10	12	0,05	0,015	0,65	0,120	0,120

a: Ποσοστό του εμβολίου επί του ενεργού όγκου της ζύμωσης

b: Οι συντελεστές απόδοσης υπολογίστηκαν με βάση την καταναλωθείσα λακτόζη σε κάθε παρτίδα και στο σύνολο των τριών ζυμώσεων

c: Ο συντελεστής απόδοσης $Y_{P/S}$ αφορά την χρονική στιγμή όπου σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή προϊόντος

Πίνακας 12 Επίδραση διαφορετικών στρατηγικών ζύμωσης ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, γαλακτικού οξέος και την κατανάλωση της λακτόζης κατά τη διάρκεια ζυμώσεων διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου με το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 χρησιμοποιώντας τυρόγαλο εμπλουτισμένο με Μπ ως το μόνο θρεπτικό υπόστρωμα

Λακτόζη (Αρχική)	Εμβόλιο (%) ^a	$T_{εμβολίου}$ (h) ^b	T_f (h) ^c	ST_f (mN/m) ^d	Βιομάζα (g/L)	$TST_{max}(h)$ ^e	St_{max} (mN/m) _f	$ST_{Μείωση}$ (mN/m) ^g	Λακτόζη (Κατ/σα) (g/L)	$\Gamma.O^h$ (g/L)
<i>Αναερόβιες συνθήκες</i>										
40	5	12	24	70,1	0,75	4	53,1	18,9	9,40	3,2
40	10	12	24	51,9	1,05	3	45,9	26,1	17,80	6,6
40	10	16	24	63,9	0,53	1	60,1	11,6	3,50	0,4
20	5	12	24	71,4	0,50	12	42,0	30	5,40	3,1
<i>Αερόβιες συνθήκες</i>										
40	10	12	24	63,1	0,80	2	52,4	19,6	12,4	10,3

40	5	12	24	62,4	0,60	8	51,9	20,1	9,0	5,6
20	10	12	24	63,9	0,40	12	59,4	12,6	8,0	5,2

a: Ποσοστό του εμβολίου επί του ενεργού όγκου της ζύμωσης

b: Διάρκεια επώασης του εμβολίου

c: T_f (h): Χρονική διάρκεια ζύμωσης

d: ST_f (mN/m) : Επιφανειακή τάση στο τέλος της ζύμωσης

e: $T ST_{max}$ (h): Χρονική στιγμή που σημειώθηκε η μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

f: ST_{max} (mN/m): Μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης

g: $ST_{Μείωση}$ (mN/m): Μείωση που προκλήθηκε στην επιφανειακή τάση του PBS ($ST= 72$ mN/m)

h: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης

Στις ζυμώσεις που αναφέρονται στην Ενότητα 4.3 το εμβόλιο αποτέλεσε το 5% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Κατά τη διερεύνηση των διαφορετικών συνθηκών της ζύμωσης για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, κρίθηκε σημαντική η μελέτη της επίδρασης του εμβολίου σε αυτή. Συνεπώς πραγματοποιήθηκε η ζύμωση με τις ίδιες συνθήκες με το εμβόλιο να αποτελεί το 10% του ενεργού όγκου. Η αλλαγή αυτή φάνηκε να επηρεάζει θετικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών καθώς η επιφανειακή τάση έφτασε στα 45,9 mN/m από την 3^η ώρα και η συγκέντρωση τους ήταν 0,28 g/L. Ακόμη φαίνεται πως το υπόστρωμα αξιοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό, όταν το εμβόλιο αποτελεί το 10% μιας καικαταναλώνονται 17,8 g/L λακτόζης, ενώ στην περίπτωση της ζύμωσης με 5% εμβόλιο καταναλώθηκαν 9,4g/L από τα 40 g/L αρχικής λακτόζης του υποστρώματος.

Επιπρόσθετα, για τον έλεγχο της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών κατά τη στάσιμη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, όπως υποστήριξαν παλαιότερες μελέτες (Valreads, 1996), πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με 10% εμβόλιο διαφορετικής ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε κατά τη στάσιμη φάση ανάπτυξης της προκαλλιέργειας (16 ώρες επώασης). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στη ζύμωση με τις συγκεκριμένες συνθήκες δεν υπήρξε οποιαδήποτε εξέλιξη ως προς την παραγωγή προϊόντων αλλά και ως προς τη μείωση της επιφανειακής τάσης όπως φαίνεται στους Πίνακες 11 και 12.

Για τον έλεγχο της πιθανότητας να αξιοποιείται καλύτερα το υπόστρωμα μειώνοντας ταυτόχρονα και το κόστος παραγωγής, εξετάστηκε η δυνατότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών σε υπόστρωμα τυρογάλακτος το οποίο περιείχε 20 g/L λακτόζη (με 5% εμβόλιο). Παρόλο που η συγκεκριμένη ζύμωση σημείωσε τη μέγιστη μείωση στην επιφανειακή τάση (30 mN/m), αυτή δεν συνδυάστηκε με την επιθυμητή κατανάλωση του υποστρώματος (5,4 g/L λακτόζης). Επιπλέον η μείωση αυτή επήλθε μετά από 12 ώρες ζύμωσης, δηλαδή 9 ώρες αργότερα από την αντίστοιχη ζύμωση με 10% εμβόλιο και 40 g/L λακτόζη, ενώ παρήχθησαν 0,18 g/L ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών.

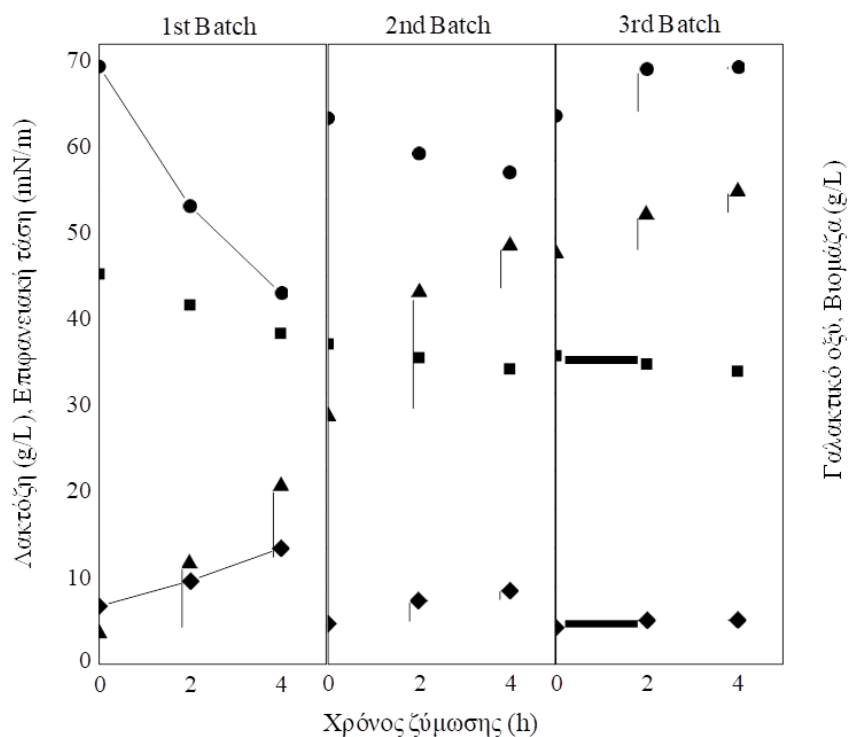
Τέλος, ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της αρχικής ποσότητας λακτόζης στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης, έχοντας αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 και 40 g/L υπό αερόβιες συνθήκες, για να αποφευχθεί παραγωγή γαλακτικού οξέος η οποία φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Τα καλύτερα αποτελέσματα, αναφορικά με τη μέγιστη μείωση της επιφανειακής τάσης, τον χρόνο που αυτή επετεύχθη και την αξιοποίηση του υποστρώματος, στις αερόβιες συνθήκες, προήλθαν από τη ζύμωση με 40

g/L λακτόζη και 10% εμβόλιο. Η επιφανειακή τάση μειώθηκε κατά 19,6 mN/m ενώ καταναλώθηκαν 12,4 g/L λακτόζης και προέκυψαν 0,26 g/L ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών. Στην περίπτωση της ζύμωσης με 5% εμβόλιο καταναλώθηκαν 9,4 g/L από τα 40 g/L αρχικής λακτόζης του υποστρώματος. Αν και η μείωση στην επιφανειακή τάση ήταν αντίστοιχη της ζύμωσης με 10% εμβόλιο (20,1 mN/m), η παραγόμενη ποσότητα προϊόντος ήταν μικρότερη (0,11 g/L). Τέλος η ζύμωση υπό αερόβιες συνθήκες και 20 g/L λακτόζη, προκάλεσε τη μικρότερη μείωση στην επιφανειακή τάση (12,6 mN/m), η οποία προκλήθηκε μετά από 12 ώρες ζύμωσης, ενώ καταναλώθηκαν 8 g/L λακτόζης.

Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση της κατανάλωσης του FAN, ώστε να αξιολογηθεί η περίπτωση που η συγκέντρωση του αζώτου αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις, ο μικροοργανισμός κατανάλωσε σταθερά συγκεκριμένη ποσότητα FAN (30-50 mg/L), χωρίς ποτέ να καταναλωθεί πλήρως.

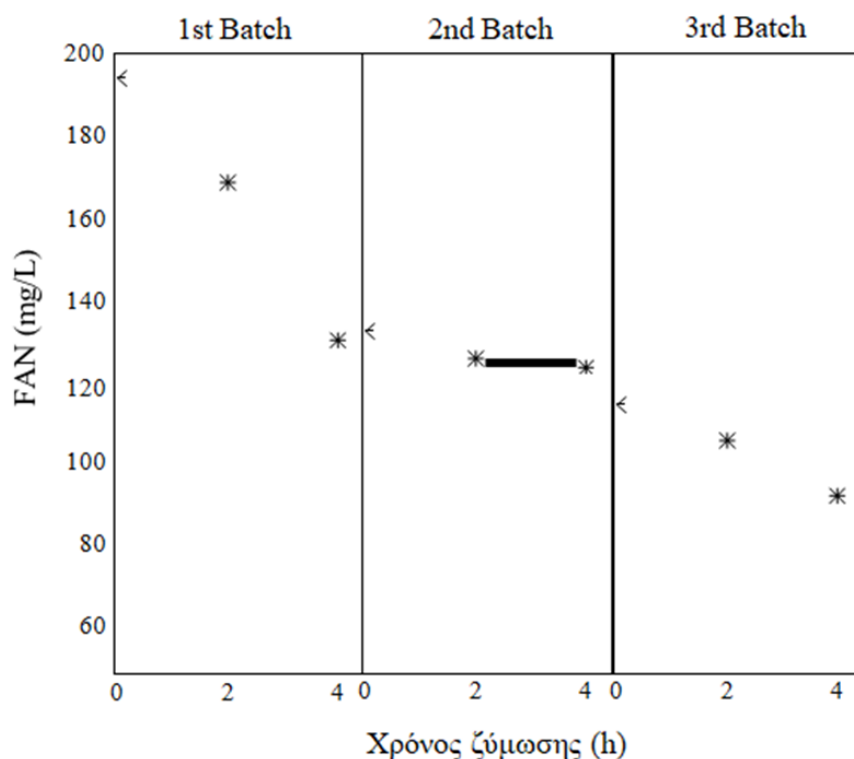
5.6. Ζύμωση με ανακύκλωση υποστρώματος του στελέχους *L. fermentum* ACA-DC 183 προς παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών

Στις ζυμώσεις που προηγήθηκαν παρατηρήθηκε πως η εναπομείνασα λακτόζη κατά την ολοκλήρωση της ζύμωσης ξεπερνούσε το 50% της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης τους υποστρώματος. Επιπλέον η μεγαλύτερη πτώση της επιφανειακής τάσης πραγματοποιήθηκε κατά τις πρώτες ώρες διεξαγωγής των ζυμώσεων. Το πείραμα που περιγράφεται στο Γράφημα 16 πραγματοποιήθηκε ώστε να εξεταστεί η ταυτόχρονη παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τελικού προϊόντος με την μεγαλύτερη δυνατή κατανάλωση λακτόζης και συνεπώς την καλύτερη αξιοποίηση του υποστρώματος προς παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών.



Γράφημα 17 Ζύμωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (●: Επιφανειακή τάση, ■: Λακτόζη, ▲: Γαλακτικό οξύ, ◆: Βιομάζα)

Η συγκεκριμένη πρακτική φάνηκε να έχει θετικά αποτελέσματα τόσο ως προς την ποσότητα βιοεπιφανειοδραστικών που παρήχθησαν συνολικά και από τους τρεις εμβολιασμούς (0,764 g/L), αλλά και ως προς την κατανάλωση λακτόζης. Συγκεκριμένα, σε διάστημα 12 ωρών καταναλώθηκαν 12,2 g/L λακτόζης, κατανάλωση που στις ζυμώσεις της ενότητας 3.6 επετεύχθη μόνο κατά την αερόβια και αναερόβια ζύμωση του στελέχους για 24 ώρες. Ακόμη, παρήχθησαν 1,28 g/L βιομάζας συνολικά και 4,6 g/L γαλακτικού οξέος. Η έλλειψη των αμινοξέων που απαιτούν τα γαλακτικά βακτήρια για να αναπτυχθούν είναι πιθανό να εξηγεί τη μείωση στην κατανάλωση του FAN στη δεύτερη και την τρίτη ζύμωση (Klotz, 2017). Πιο συγκεκριμένα, μετά τον πρώτο εμβολιασμό καταναλώθηκαν 63 mg/L FAN με παραγωγή βιομάζας 0,75 g/L ενώ μετά τους δύο επόμενους καταναλώθηκαν 19 και 21 mg/L αντίστοιχα (Γράφημα 17). Η μείωση της παραγωγής προϊόντος αλλά και της κατανάλωσης λακτόζης και FAN μετά τις 4 ώρες ζύμωσης ενδέχεται να συνδέεται με τη μείωση στην παραγωγή βιομάζας λόγω έλλειψης απαραίτητων αμινοξέων από το υπόστρωμα.



Γράφημα 18 Κατανάλωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) κατά τη ζύμωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Πίνακας 13 Συντελεστές απόδοσης βιομάζας, βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, γαλακτικού οξέος και τελικού προϊόντος κατά τη ζύμωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Παρτίδες ζύμωσης	*Y _x /S (g/g)	*Y _p /S (g/g)	*Y _{Γ.ο} /S (g/g)	Τελικό προϊόν(g/L)
1 ^η	0,110	0,053	0,28	0,364
2 ^η	0,126	0,087	0,56	0,296
3 ^η	0,059	0,060	0,47	0,104
Σύνολο	0,105	0,06	0,38	0,764

*Οι συντελεστές απόδοσης υπολογίστηκαν με βάση την καταναλωθείσα λακτόζη σε κάθε παρτίδα και στο σύνολο των τριών ζυμώσεων

*αντιστοιχεί στην καταναλωθείσα λακτόζη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

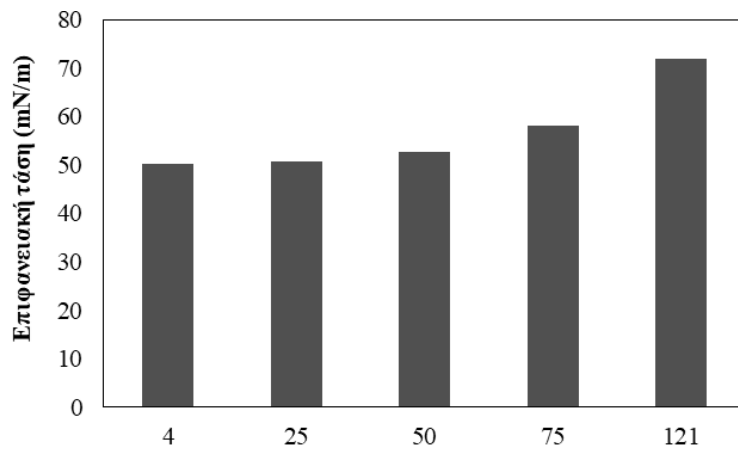
* αφορά στη μείωση που προκαλείται στην επιφανειακή τάση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS (ST PBS= 72 mN/m)

Πίνακας 14 Επιφανειακή τάση, καταναλωθείσα λακτόζη και παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά τη ζύμωση του στελέχους *L.fermentum* ACA-DC 183 με ανακύκλωση υποστρώματος αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος για παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

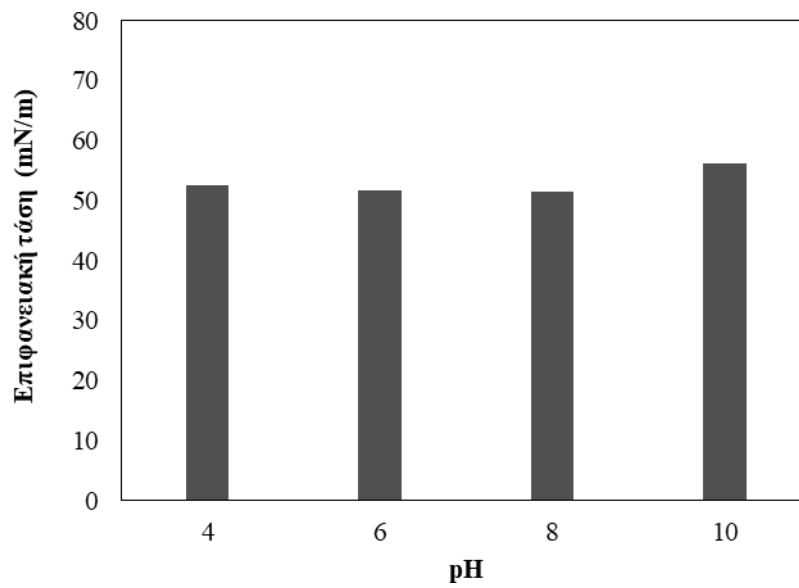
Παρτίδες	T _f (h)	ST _f (mN/m)	Βιομάζα (g/L)	TST _{max} (h)	ST _{max} (mN/m)	ST _{Μείωση} * (mN/m)	Λακτόζη* (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)
1 ^η	4	43,1	0,75	4	43,1	28,9	6,9	1,9
2 ^η	4	57,1	0,43	4	57,1	14,9	3,4	1,9
3 ^η	4	67,4	0,10	2	67,2	4,6	1,7	0,8
Σύνολο	12		1,28				12,2	4,6

5.7. Δοκιμή σταθερότητας βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

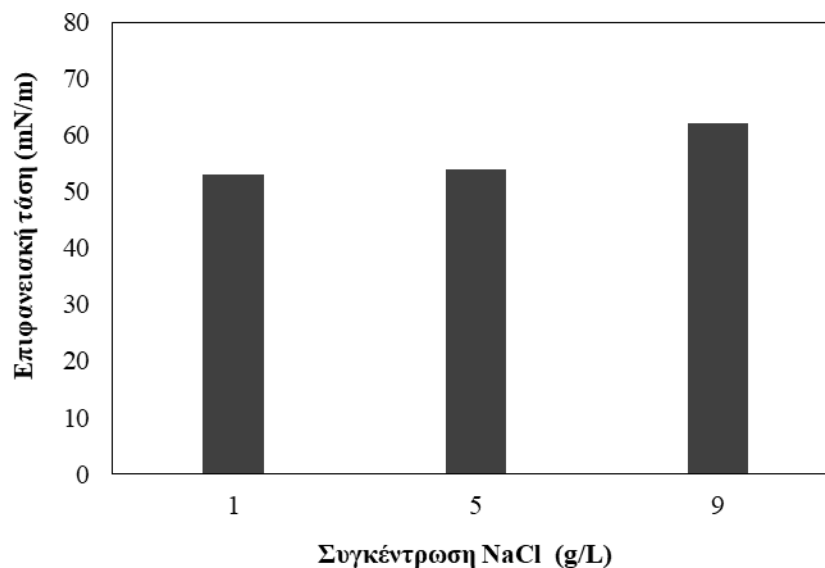
Η δυνατότητα χρήσης μιας βιοεπιφανειοδραστικής σε οποιαδήποτε εφαρμογή εξαρτάται από την ικανότητά της να διατηρεί τις ιδιότητές στις απαιτούμενες συνθήκες. Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.7στην παρούσα μελέτη η σταθερότητα των βιοεπιφανειοδραστικών που παρήχθησαν από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 εξετάστηκε ως προς την ανθεκτικότητά τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 25, 50, 75, 120 °C), τιμές pH (4, 6, 8, 10) και συγκεντρώσεις άλατος (1, 5, 9 g/L NaCl). Η δοκιμή αφορά την διατήρηση της ικανότητας των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών να μειώνουν την επιφανειακή τάση όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον ίσες με την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων. Από το Γράφημα 18 φαίνεται πως η έκθεση των βιοεπιφανειοδραστικών σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 4 έως 50 °C δεν επηρέασε την ιδιότητά τους να μειώνουν την επιφανειακή τάση, η οποία κυμάνθηκε από 50 έως και 52 mN/m. Στους 75 °C φάνηκε να μειώνεται περισσότερο η δραστηριότητα των βιοεπιφανειοδραστικών στην επιφανειακή τάση του δείγματος, φτάνοντας στα 58 mN/m ενώ καμία μείωση δεν παρατηρήθηκε μετά την έκθεσή τους στους 121 °C (ST= 72 mN/m). Σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, οι βιοεπιφανειοδραστικές φάνηκε να μην επηρεάζονται από τις μεταβολές στις διαφορετικές τιμές του pH διότι η επιφανειακή τάση βρέθηκε μεταξύ των 52 και 56 mN/m (Γράφημα 19). Αναφορικά με τη συγκέντρωση άλατος και σύμφωνα με το Γράφημα 20 φαίνεται πως οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 παρουσιάζουν ανθεκτικότητα παρουσία αυτού, σε συγκεντρώσεις μέχρι και 5 g/L παραμένοντας σταθερές ως προς την τιμή της επιφανειακής τάσης (55 mN/m) ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl στα 10 g/L σημειώθηκε αύξηση της επιφανειακής τάσης η οποία έφτασε στα 65 mN/m.



Γράφημα 19 Επίδραση θερμοκρασίας στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183



Γράφημα 20 Επίδραση τις τιμές pH στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183



Γράφημα 21 Επίδραση της συγκέντρωσης άλατος στην επιφανειακή τάση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183.

5.8. Χαρακτηρισμός παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών

Ο χαρακτηρισμός των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών βασίζεται στη χημική σύσταση των παραγόμενων μορίων. Στην παρούσα μελέτη ο χαρακτηρισμός βασίστηκε στο ποσοστό πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λίπους που εμπεριέχει το τελικό προϊόν. Για τον προσδιορισμό αυτών των ποσοστών, συγκεκριμένη ποσότητα ξηρού προϊόντος επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι φωτομετρικές μέθοδοι Lowry και Dubois για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και ολικών σακχάρων, αντίστοιχα, όπως αναφέρεται στις ενότητες 4.8.5 και 4.8.6, ενώ το λίπος προσδιορίστηκε βαρυμετρικά, όπως αναφέρεται στην ενότητα 4.8.7.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ποσότητα των πρωτεϊνών στα δείγματα ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών αποτέλεσε το 28 έως 59% του τελικού προϊόντος. Τα ποσοστά του λίπους και των υδατανθράκων βρέθηκαν μεταξύ 13-19% και 39-65%, αντίστοιχα. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων και αφού βρέθηκαν σε αυτά ποσότητες και από τις τρεις δομικές ομάδες, οι παραγόμενες βιοεπιφανειοδραστικές χαρακτηρίζονται γλυκολιποπρωτεΐνες. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Vecino et al. (2015) για παραγωγή γλυκολιποπρωτεϊνών από το στέλεχος *L. pentosus*, αλλά και από τους Mouafo et al. (2018) οι οποίοι περιγράφουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών από το στέλεχος *L. paracasei* αποτελούμενων από 63% πρωτεΐνες, 36% υδατάνθρακες και 1% λίπος.

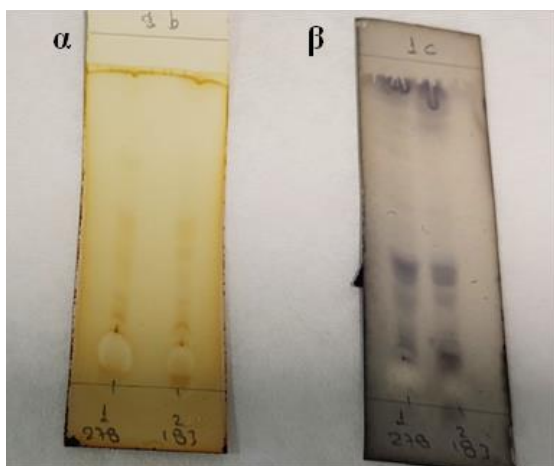
5.8.1. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) αποτελεί μία από τις απλούστερες και ευρύτερα διαδεδομένες μεθόδους για τον χημικό χαρακτηρισμό βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών (Shavandi et al., 2011). Για τον χαρακτηρισμό των βιοεπιφανειοδραστικών που απομονώθηκαν από τα στελέχη

ACA-DC 183 και CECT 278, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα διαλυτών ως κινητή φάση και έπειτα ακολούθησε χρώση με διαφορετικές ουσίες για την εμφάνιση του χρωματογραφήματος. Απώτερος στόχος ήταν η επιβεβαίωση της σύστασης των βιοεπιφανειοδραστικών μέσω της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

Στην περίπτωση που ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα διαλυτών CHCl_3 : CH_3OH : NH_3 20% (65:25:5), η εμφάνιση του χρωματογραφήματος έλαβε χώρα με i) ψεκασμό με νινυδρίνη και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C για 30 min, ii) σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου και iii) ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 20% και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C. Το συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών έχει προταθεί για την ανάλυση γλυκολιπιδίων (Bryant, 1990). Η εμφάνιση κηλίδων στο χρωματογράφημα επιτεύχθηκε μετά από την ανάπτυξη σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου (Εικόνα 10α) και μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 20% και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C (Εικόνα 10β). Σύμφωνα με τη μελέτη των (Campos et al., 2019), η εμφάνιση καφέ κηλίδων μετά από έκθεση σε ατμούς ιωδίου αποτελεί ένδειξη της παρουσίας λιπιδίων. Οι ατμοί ιωδίου σχηματίζουν ένα μη-ομοιοπολικό, καφέ σύμπλοκο με τα λιπίδια. Το ιώδιο συνδέεται με τους διπλούς δεσμούς επομένως πλήρως κορεσμένα λιπίδια χρωματίζονται με μεγάλη δυσκολία.

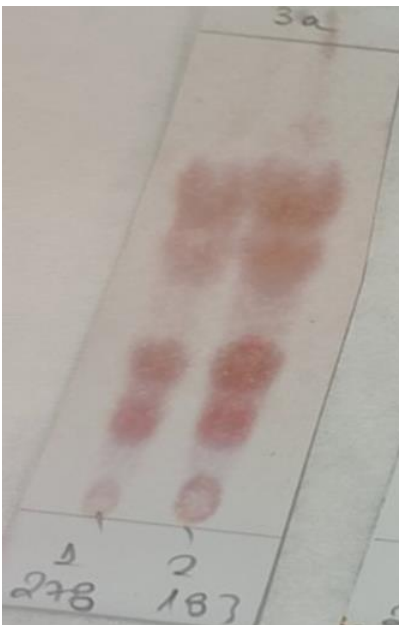
Στην περίπτωση που η πλάκα υπέστη ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 20% και θέρμανση στους 100 °C, παρατηρείται εμφάνιση μπλε-μωβ κηλίδων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι κηλίδες και οι ζώνες που εμφανίστηκαν Εικόνα 10α και 10β είναι ενδεικτικές της ύπαρξης γλυκολιπιδίων (Athenaki, 2015).



Εικόνα 10 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση CHCl_3 : CH_3OH : NH_3 20% (65:25:5). Εμφάνιση χρωματογραφήματος α) σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου και β) με ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 20% και θέρμανση της πλάκας στους 100°C.

Οι αναλύσεις των ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών που ανακτήθηκαν από τα κύτταρα των CECT 278 και ACA-DC 183 με τις μεθόδους Lowry και Dubois έδειξαν ότι και στις δύο περιπτώσεις πρόκειται για σύμπλοκα σακχάρων-πρωτεϊνών-λιπιδίων. Για την επιβεβαίωση της δομής, αναπτύχθηκαν επίσης πλάκες TLC χρησιμοποιώντας ως σύστημα διαλυτών CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O (25:15:4:2) και έπειτα η εμφάνιση του χρωματογραφήματος έλαβε χώρα με ψεκασμό με νινυδρίνη και θέρμανση της πλάκας στους 100°C. Η εμφάνιση κόκκινων-ιώδων κηλίδων είναι ενδεικτική της παρουσίας αμινομάδων στις υπό μελέτη βιοεπιφανειοδραστικές

(Campos et al., 2019; Derguine-Mecheri et al., 2021; Satpute et al., 2019; Shavandi et al., 2011), το οποίο ήταν εμφανές και στις βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 11). Η επιβεβαίωση της παρουσίας υδατανθράκων έλαβε χώρα με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής φαινόλης και την εμφάνιση χαρακτηριστικών πορτοκαλί ζωνών (Εικόνα 12).



Εικόνα 11 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O (25:15:4:2). Εμφάνιση χρωματογραφήματος με ψεκασμό με νινυδρίνη και θέρμανση της πλάκας στους 100°C



Εικόνα 12 Χρωματογράφημα TLC ακατέργαστων βιοεπιφανειοδραστικών από τα στελέχη CECT 278 και ACA-DC 183. Κινητή φάση CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O (25:15:4:2). Εμφάνιση χρωματογραφήματος με ψεκασμό με θειϊκή φαινόλη

Η χημική δομή των επιφανειοδραστικών που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το στέλεχος και το υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Vecino et al., 2017). Στις περισσότερες μελέτες ωστόσο, αναφέρονται κατά κύριο λόγο ενώσεις που αποτελούνται από σάκχαρα-πρωτεΐνες-λιπίδια, γλυκολιπίδια ή γλυκοπρωτεΐνες (Satpute et al., 2016). Το πλούσιο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των βιοεπιφανειοδραστικών που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια, αποτελεί επίσης ένα χαρακτηριστικό τους (Satpute et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, οι Nataraj et al., (2021) χαρακτήρισαν ως προς τη χημική τους δομή τις επιφανειοδραστικές που παράγονταν από τα στελέχη *Lactobacillus acidophilus* NCFM και *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG μετά από ανάπτυξή τους σε MRS. Αναλύσεις με FTIR έδειξαν ότι η επιφανειοδραστική που παρήγαγε το στέλεχος NCFM αποτελούνταν από σάκχαρα, λιπίδια και πρωτεΐνες, ενώ το GG αποτελούνταν από υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Οι Vecino et al. (2017) παρατήρησαν σημαντικές αλλαγές στη σύσταση των βιοεπιφανειοδραστικών (συνδεδεμένων με το κύτταρο) που παρήγαγε το στέλεχος *Lactobacillus paracasei* ανάλογα με το υπόστρωμα που αναπτύχθηκε. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που το στέλεχος αναπτύχθηκε σε γλυκόζη που προερχόταν από υδρόλυση κυτταρίνης (από κλαδέματα αμπέλου), η παραγόμενη βιοεπιφανειοδραστική είχε τη δομή γλυκολιποπεπτιδίου. Αντίθετα, όταν το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε λακτόζη, δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου λιπίδια, παρά μόνο πρωτεΐνες (50-36%) και υδατάνθρακες (23-19%). Οι Moldes et al. (2013) χαρακτήρισαν τις επιφανειοδραστικές που παρήγαγε το στέλεχος *L. pentosus* και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι αποτελούνταν κατά 44,7% από πρωτεΐνη και κατά 13,4% από σάκχαρα. Η ύπαρξη σακχάρων και πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε και στο φάσμα FTIR, ωστόσο υπήρχαν ενδείξεις παρουσίας λιπιδίων στην ένωση, χωρίς οι ερευνητές να είναι σε θέση να καθορίσουν την περιεκτικότητά τους.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερεύνησε την ικανότητα 13 στελεχών γαλακτικών βακτηρίων ως προς την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, χρησιμοποιώντας απόβλητα της βιομηχανίας παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, κι ειδικότερα το τυρόγαλα ως χαμηλού κόστους υπόστρωμα για τη διεξαγωγή της ζύμωσης.

Σε πρώτη φάση, μελετήθηκε η ικανότητα των υπό μελέτη στελεχών να αναπτύσσονται και να καταναλώνουν τη λακτόζη του τυρογάλακτος σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με διάφορες πηγές οργανικού αζώτου, μεταλλικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. Από τα 13 στελέχη που μελετήθηκαν, τα περισσότερο υποσχόμενα ήταν τα *L. rhamnosus* CECT 278 και *L. fermentum* ACA-DC 183. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη μελέτη της επίδρασης της σύστασης του υποστρώματος, τα πειράματα στο φωτόμετρο μικροπλακών έδειξαν πως ο εμπλουτισμός του τυρογάλακτος με Medium D (10 g/L πεπτόνη, 8 g/L εκχύλισμα κρέατος, 4 g/L εκχύλισμα ζύμης) ως οργανική πηγή αζώτου, είχε τη θετικότερη επίδραση ως προς την μικροβιακή αύξηση και την κατανάλωση λακτόζης, με τιμές μ_{max} 0,144 h⁻¹ και 0,140 h⁻¹, αντίστοιχα. Ως προς τον εμπλουτισμό του υποστρώματος με μεταλλικά άλατα, η προσθήκη ασβεστίου στο στέλεχος CECT 278 και Mn στο στέλεχος ACA-DC 183 επηρέασε θετικά τόσο την κατανάλωση λακτόζης, όσο και τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (με τιμές μ_{max} 0,073 h⁻¹ και 0,094 h⁻¹, αντίστοιχα). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρες, σε υπόστρωμα τυρογάλακτος εμπλουτισμένου με Medium B (5 g/L πεπτόνη, 3 g/L εκχύλισμα ζύμης) το οποίο είναι οικονομικότερο σε σχέση με το Medium D. Ο εμπλουτισμός αυτός είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, με τις τελικές συγκεντρώσεις προϊόντος να διαμορφώνονται στα 0,3 και 0,2 g/L αντίστοιχα, για τα στελέχη CECT278 και ACA-DC 183, ενώ η τελική συγκέντρωση βιομάζας ήταν 2,3 και 1,3 g/L, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, με τον συγκεκριμένο εμπλουτισμό σημειώθηκαν χαμηλότερες τιμές στην επιφανειακή τάση (41,1 και 39,2 mN/m, αντίστοιχα), σε σχέση με τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μη εμπλουτισμένο τυρόγαλα. Επίσης για την μείωση του κόστους πρώτων υλών πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα σε βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου, όπου το τυρόγαλα δεν εμπλουτίστηκε με κάποια πηγή αζώτου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα μικρότερες συγκεντρώσεις βιομάζας (1,0 και 0,5 g/L) και τελικού προϊόντος (0,2 και 0,12 g/L) αλλά και υψηλότερες τιμές στην επιφανειακή τάση (51,5 και 53,1 mN/m). Από τα πειράματα αυτά κοινή παρατήρηση αποτελεί η παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, κυρίως στην αρχή της εκθετικής φάσης (4-12 ώρες ζύμωσης).

Μεταξύ των στελεχών *L. rhamnosus* CECT 278 και *L. fermentum* ACA-DC 183, το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 183 παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα κατά τις δύο προηγούμενες ζυμώσεις, οπότε και επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη ώστε να εξεταστούν και άλλες παράμετροι της ζύμωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα πως η επιλογή των 40 g/L ως αρχική συγκέντρωση λακτόζης οδηγεί σε υψηλότερη κατανάλωση της λακτόζης του υποστρώματος και μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η ζύμωση σε τυρόγαλα με αρχική συγκέντρωση 20 g/L λακτόζης φάνηκε να ευνοεί την μείωση της επιφανειακής τάσης (42 mN/m) όμως η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών πραγματοποιήθηκε αργότερα (στις 12 ώρες ζύμωσης) από

τις άλλες περιπτώσεις (1 έως 8 ώρες ζύμωσης) και η αξιοποίηση της λακτόζης του υποστρώματος ήταν μικρότερη (5,4 g/L). Οι αερόβιες συνθήκες ζύμωσης επέδρασαν θετικά ως προς την παραγωγή βιομάζας, ενώ φάνηκε πως οι ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L στις οποίες η προκαλλιέργεια αποτέλεσε το 10% του ενεργού όγκου ζύμωσης απέδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα, συνδυάζοντας τη μεγαλύτερη μείωση στην επιφανειακή τάση (26,1 και 19,6 mN/m) με την κατανάλωση της λακτόζης (17,8 και 12,4 g/L). Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών φάνηκε να λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τις πρώτες ώρες ζύμωσης (περίπου τις πρώτες 4 ώρες) σε όλες τις περιπτώσεις, χρονικό διάστημα όπου σημειωνόταν και η μεγαλύτερη κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN). Είναι λοιπόν αρκετά πιθανό η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών να συνδέεται με την κατανάλωση των απαραίτητων για αυτά αμινοξέων του υποστρώματος και ελλείπει αυτών να μειώνεται ο ρυθμός παραγωγής τους. Ανασταλτικός παράγοντας φάνηκε να αποτελεί και η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος για την παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών αφού η επιφανειακή τάση σε όλες τις ζυμώσεις έφτασε στη μέγιστη μείωση, λίγο μετά την ανίχνευσή του στο υγρό της ζύμωσης και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ή αυξήθηκε.

Η ανακύκλωση του υποστρώματος (τρεις ανακυκλώσεις) φαίνεται μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, με το στέλεχος ACA-DC 183. Παρόλο που παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών στην 2^η και 3^η ανακύκλωση, πιθανόν λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης FAN (63 mg/L) στο υπόστρωμα, η συνολική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών έφθασε τα 0,76 g/L με απόδοση 0,06 g/g καταναλωθείσας λακτόζης.

Η κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (CMC) αποτελεί μία πολύ σημαντική παράμετρο των βιοεπιφανειοδραστικών, καθώς καθορίζει τις επικείμενες χρήσεις τους. Οι βιοεπιφανειοδραστικές που παρήχθησαν από τα στελέχη *L. fermentum* ACA-DC 183 και *L. rhamnosus* CECT 278 είχαν τιμές CMC 0,56 g/L και 3,7 g/L αντίστοιχα, τιμές που συνάδουν με τη βιβλιογραφία σε σχέση με άλλα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Οι βιοεπιφανειοδραστικές από το στέλεχος ACA-DC 183 επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν ως προς την σταθερότητά τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 25, 50, 75, 120 °C), pH (4, 6, 8, 10) και συγκεντρώσεις άλατος (1, 5, 9 g/L), όπου φάνηκε να σταματούν να μειώνουν την επιφανειακή τάση μόνο μετά την έκθεσή τους σε θερμοκρασία που έφθανε τους 121°C και συγκέντρωση άλατος που έφθανε στα 10 g/L. Η μεταβολή της τιμής του pH, οι θερμοκρασίες κάτω των 75 °C και η συγκέντρωση άλατος μέχρι τα 5 g/L δεν φάνηκε να επηρεάζουν τις προς εξέταση βιοεπιφανειοδραστικές. Τελικώς, η σύσταση των παραχθέντων βιοεπιφανειοδραστικών, σε πρωτείνες, υδατάνθρακες και λίπος, αντιστοιχεί στην παραγωγή προϊόντος γλυκολιποπρωτεϊνικής σύστασης, η οποία επιβεβαιώθηκε και μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης κρίνονται ελπιδοφόρα, ενώ η χρήση GRAS γαλακτικών στελεχών για την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών, που δύνανται να βρουν εφαρμογή στη βιομηχανία των τροφίμων, φαίνεται να διαθέτει προοπτική. Τα πειράματα έδειξαν ότι το τυρόγαλα δύνανται να χρησιμοποιηθεί ως πλήρες υπόστρωμα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών. Το πιο πολλά υποσχόμενο στέλεχος, ο *L. fermentum* ACA-DC 183 παράγει βιοεπιφανειοδραστικές στην αρχή της εκθετικής φάσης (μέγιστο τις πρώτες 4 ώρες ζύμωσης), οπότε η

ανακύκλωση υποστρώματος είναι μια στρατηγική ζύμωσης που μπορεί να οδηγήσει στην μείωση των ακατανάλωτων σακχάρων του υποστρώματος. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των βιοεπιφανειοδραστικών από το συγκεκριμένο στέλεχος. Η μελέτη της προσθήκης απαραίτητων για την αύξηση αμινοξέων αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό παράγοντα βελτιστοποίησης της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών. Μελλοντικά πειράματα θα μπορούσαν να εστιάσουν τόσο στην ανακύκλωση του υποστρώματος (μέχρι εξαντλήσεως της λακτόζης), όσο και της ανακύκλωσης των μικροβιακών κυττάρων. Τέλος η πλήρης αποσαφήνιση της χημικής δομής των παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών (χρήση τεχνικών FTIR, GC-MS, NMR) είναι απαραίτητη καθώς θα καθορίσει και το φάσμα των τελικών τους εφαρμογών.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

7.1. Ελληνική βιβλιογραφία

- Αγγελής Γεώργιος (2007) , Αθήνα, *Μικροβιολογία και Μικροβιακή Βιοτεχνολογία*, Εκδόσεις Σταμούλη
- Ανυφαντάκης Εμμανουήλ (2004) Αθήνα, *Τυροκομία, Χημεία- Φυσικοχημεία- Μικροβιολογία* Εκδόσεις Σταμούλη
- Ριτζούλης Χρήστος (2011) Θεσσαλονίκη, *Φυσικοχημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Τζιόλα

7.2. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A., & Bastida, J. (2002). Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(7), 777-784.
- Adu, S. A., Naughton, P. J., Marchant, R., & Banat, I. M. (2020). Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. *Pharmaceutics*, 12(11), 1099.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants, a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81-90.
- Aleixandre-Tudó, J. L., Castelló-Cogollos, L., Aleixandre, J. L., & Aleixandre-Benavent, R. (2020). Tendencies and challenges in worldwide scientific research on probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3), 785-797.
- Amiri, A., Mousakhani-Ganjeh, A., Amiri, Z., Guo, Y. G., Singh, A. P., & Kenari, R. E. (2020). Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system. *Food chemistry*, 310, 125821.
- 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.
- Athenaki, M., 2015. Study of lipid production by the Zygomycete *Mortierella isabellina* during growth on blends of cellulosic sugars. Agricultural University of Athens.
- Banaszewska, A., Cruijssen, F. C. A. M., Claassen, G. D. H., & Van der Vorst, J. G. A. J. (2014). Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry. *Journal of dairy science*, 97(4), 1893-1908.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.
- Bryant, F.O., 1990. Improved method for the isolation of biosurfactant glycolipids from *Rhodococcus* sp. strain

- H13A. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1494–1496.
- Campos, J. M., Stamford, T. L. M., & Sarubbo, L. A. (2019). Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation*, 30(4), 313-324.
- Derguine-Mecheri, L., Kebbouche-Gana, S., Djenane, D., 2021. Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp.YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1–18.
- Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4), 929- 935.
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, 77-90.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Eurostat 2020. Agriculture, forestry and fishery statistics. 2020 Edition
- Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-food byproducts as a new source of natural food additives. *Molecules*, 24(6), 1056.
- Fiocco, D., Longo, A., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). How probiotics face food stress: they get by with a little help. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(9), 1552- 1580.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Garcia, S. N., Osburn, B. I., & Jay-Russell, M. T. (2020). One health for food safety, food security, and sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 1.
- García-Ruiz, A., de Llano, D. G., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno- Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food microbiology*, 44, 220-225.
- Ghaly, A. E., & Kamal, M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38(3), 631-644.
- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., & Yousefi, G. (2019). Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: strain screening followed by product characterization. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Grufferty, M. B., & Mulvihill, D. M. (1987). Proteins recovered from milks heated at alkaline pH values. *International Journal of Dairy Technology*, 40(4), 82-85.

- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2011). Biosurfactant-producing lactobacilli: screening, production profiles, and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011.
- Hajfarajollah, H., Eslami, P., Mokhtarani, B., & Akbari Noghabi, K. (2018). Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(6), 768-783.
- Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (Eds.). (2008). *Food emulsifiers and their applications* (Vol. 19). New York: Springer.
- Hatha, A. A. M., Edward, G., & Pattanathu Rahman, K. S. M. (2007). Microbial biosurfactants—review.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- Hippolyte, M. T., Augustin, M., Hervé, T. M., Robert, N., & Devappa, S. (2018). Application of response surface methodology to improve the production of antimicrobial biosurfactants by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* N2 using sugar cane molasses as substrate. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-16.
- Hörmann, B., Müller, M. M., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 674- 680.
- Ismail, W., Shammery, S. A., El-Sayed, W. S., Obuekwe, C., El Nayal, A. M., Raheem, A. S. A., & Al-Humam, A. (2015). Stimulation of rhamnolipid biosurfactants production in *Pseudomonas aeruginosa* AK6U by organosulfur compounds provided as sulfur sources. *Biotechnology Reports*, 7, 55-63.
- Joshi, J., Sanket, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2007). Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(2), 313-319.
- Kaur, H. P., Prasad, B., & Kaur, S. (2015). A review on applications of biosurfactants produced from unconventional inexpensive wastes in food and agriculture Industry. *World J Pharm Res*, 4, 827-42.
- Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., BŁażejczak, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: a review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185-198.
- Kiran, G. S., Thomas, T. A., Selvin, J., Sabarathnam, B., & Lipton, A. P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource technology*, 101(7), 2389-2396.
- Klotz, S., Kuenz, A., & Prüße, U. (2017). Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chemistry*, 19(19), 4633-4641.
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., & Lin, C. S.K. (2014).

- Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587-2627.
- Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., & Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 27-34.
- Lolou, V., & Panayiotidis, M. I. (2019). Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation*, 5(2), 41.
- Lydon, H. L., Baccile, N., Callaghan, B., Marchant, R., Mitchell, C. A., & Banat, I. M. (2017). Adjuvant antibiotic activity of acidic sophorolipids with potential for facilitating wound healing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02547-16.
- Kachrimanidou, V., Papadaki, A., Lappa, I., Papastergiou, S., Kleisiari, D., & Kopsahelis, N. (2021). Biosurfactant Production from Lactobacilli: an Insight on the Interpretation of Prevailing Assessment Methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19.
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology letters*, 34(9), 1597-1605.
- Merghni, A., Dallel, I., Noumi, E., Kadmi, Y., Hentati, H., Tobji, S., & Mastouri, M. (2017). Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial pathogenesis*, 104, 84-89.
- Moldes, A.B., Paradelo, R., Vecino, X., Cruz, J.M., Gudiña, E., Rodrigues, L., Teixeira, J.A., Domínguez, J.M., Barral, M.T., 2013. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Biomed Res. Int.* 2013. doi:10.1155/2013/961842
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva Júnior, A., & Nero, L. A. (2013). Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109-112.
- Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed research international*, 2018.
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11), 509-515.
- Murphy, B. F., & Mulvihill, D. M. (1988). Proteins recovered from acid whey/skim milk mixtures heated at alkaline pH values. *International Journal of Dairy Technology*, 41(1), 22-27.

- Nashida, J., Nishi, N., Takahashi, Y., Hayashi, C., Igarashi, M., Takahashi, D., & Toshima, K. (2018). Systematic and stereoselective total synthesis of mannosylerythritol lipids and evaluation of their antibacterial activity. *The Journal of organic chemistry*, 83(13), 7281-7289.
- Nataraj, B.H., Ramesh, C., Mallappa, R.H., 2021. Characterization of biosurfactants derived from probiotic lactic acid bacteria against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolates.
- Neu, T. R., & Poralla, K. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Applied microbiology and biotechnology*, 32(5), 521-525.
- Onur, G. (2015). Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters (Master's thesis).
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073.
- Patel, A., Pruthi, V., Singh, R. P., & Pruthi, P. A. (2015). Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource technology*, 188, 136-144.
- Phulpoto, I. A., Yu, Z., Hu, B., Wang, Y., Ndayisenga, F., Li, J., & Qazi, M. A. (2020). Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial cell factories*, 19 (1), 1-12.
- Pinu, F. R., & Villas-Boas, S. G. (2017). Extracellular microbial metabolomics: the state of the art. *Metabolites*, 7(3), 43.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 110, 48-68.
- Qiu, Y., Lei, P., Zhang, Y., Sha, Y., Zhan, Y., Xu, Z., & Ouyang, P. (2018). Recent advances in bio-based multi-products of agricultural Jerusalem artichoke resources. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-15.
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., & Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: production and applications. *Biodegradation-life of science*, 31-61.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 434.
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 135-142.
- Rodrigues, Lígia R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C., & Oliveira, R. (2006). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

49(1), 79–86.

- Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(1), 1-14.
- Salveti, E., Harris, H. M., Felis, G. E., & O'Toole, P. W. (2018). Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and environmental microbiology*, 84(17), e00993-18.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S., & Parnavitana, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC microbiology*, 14(1), 1-9.
- Sarma, H., & Prasad, M. N. (Eds.). (2021). *Biosurfactants for a sustainable future: production and applications in the environment and biomedicine*. John Wiley & Sons.
- Satpute, S.K., Kulkarni, G.R., Banpurkar, A.G., Banat, I.M., Mone, N.S., Patil, R.H., Cameotra, S.S., 2016. Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.* 56, 1140–1158. doi:10.1002/jobm.201600143
- Satpute, S.K., Mone, N.S., Das, P., Banat, I.M., Banpurkar, A.G., 2019. Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant. *BMC Microbiol.* 19, 1–15. doi:10.1186/s12866-019-1412-z
- Sharma, D., & Singh Saharan, B. (2014). Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International journal of microbiology*, 2014.
- Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S. (2016). *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Basel, Switzerland: Springer.
- Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H., Nuhi, A., 2011. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 82, 477–482.
- Shu, Q., Lou, H., Wei, T., Liu, X., & Chen, Q. (2021). Contributions of Glycolipid Biosurfactants and Glycolipid-Modified Materials to Antimicrobial Strategy: A Review. *Pharmaceutics*, 13(2), 227.
- Stipcevic, T., Piljac, T., & Isseroff, R. R. (2005). Di-rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* displays differential effects on human keratinocyte and fibroblast cultures. *Journal of dermatological science*, 40(2), 141.
- Vallejo, C. M., Restrepo, M. A. F., Duque, F. L. G., & Díaz, J. C. Q. (2021). Production, characterization and kinetic model of biosurfactant produced by lactic acid bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*.

- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E. J., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2017). Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of industrial and engineering chemistry*, *55*, 40-49.
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource technology*, *100*(15), 3713-3717.
- Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Basic protein and peptide protocols*, 1-4.
- Wei, Y. H., Lai, C. C., & Chang, J. S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, *42*(1), 40-45.
- Williams, W., & Trindade, M. (2017). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants. In *Functional metagenomics: tools and applications* (pp. 95-117). Springer, Cham.
- Zhu, L., Xu, Q., Liu, X., Xu, Y., Yang, L., Wang, S., & Liu, H. (2020). Oil-water interfacial behavior of soy β -conglycinin-soyasaponin mixtures and their effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, *101*, 105531.