

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ
ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΗ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Γεωργία Νικολάου

Λεμεσός 2013

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

Μελέτη της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε
τυροκομικά απόβλητα για βέλτιστη παράγωγή
αιθανόλης και γαλακτικού οξέος

Γεωργία Νικολάου

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Κουτίνας Μιχάλης

Λεμεσός 2013

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Γεωργία Νικολάου, 2013

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, σε όσους βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν στην εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Ιδιαίτερα οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Κουτίνα Μιχάλη για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και στήριξη που μου παρείχε όλο αυτό τον καιρό.

Επίσης, ανεκτίμητη ήταν και η ψυχική υποστήριξη και βοήθεια της οικογένειας και των φίλων μου κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μητέρα μου και στο σύντροφό μου οι οποίοι ήταν δίπλα μου κατά την διάρκεια των σπουδών μου, στηρίζοντας με σε κάθε μου δύσκολη στιγμή.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	viii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	x
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	1
1.1 Παραγωγή τυριού.....	1
1.2 Σύνθεση τυρόγαλου	2
1.2.1 Χαρακτηριστικά αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος.....	2
1.3 Τύποι τυρόγαλου.....	3
1.4 Το τυρόγαλο ως απόβλητο.....	4
1.5 Αξιοποίηση τυρόγαλου	4
1.5.1 Χρήση βιοκαταλυτών στην επεξεργασία τυρόγαλου.....	6
1.5.2 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη	8
1.6 Ζύμωση λακτόζης-Παραγωγή αιθανόλης (C ₂ H ₅ O)	9
1.6.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	9
1.7 Ζύμωση λακτόζης- Παραγωγή γαλακτικού Οξέος.....	11
1.7.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέως από μικροοργανισμούς	12
1.7.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	13
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
2.1 Εισαγωγή	16

2.2. Όργανα – Υλικά – Μέθοδοι.....	16
2.2.1. Αποστείρωση	16
2.2.2. Μέτρηση pH.....	17
2.2.3. Χρήση φασματοφωτομέτρου	17
2.2.4. Χρήση HPLC	18
2.2.5. Χρήση GC	20
2.2.6 Μέτρηση Ξηρής Βιομάζας.....	23
2.3 Πείραμα 1	26
2.3.1 Υλικά - Μέθοδοι	26
2.3.2 Συνθήκες Εμβολιασμού	26
2.3.3. Καλλιέργειες του <i>Kluyveromyces marxianus</i>	27
2.3.4. Μετρήσεις	28
2.4 Πείραμα 2	29
2.4.1 Υλικά - Μεθόδοι	29
2.4.2 Συνθήκες εμβολιασμού και καλλιέργειες του <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	29
2.4.3. Μετρήσεις	30
3.1. Σκοπός των πειραμάτων	31
3.2 Ζυμώσεις του μύκητα <i>Kluyveromyces marxianus</i> σε λακτόζη.....	31
3.2.1. Προσδιορισμός αιθανόλης με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC).....	34
3.3 Ζυμώσεις του μύκητα <i>Lactobacillus delbrueckii</i> σε λακτόζη	36
3.3.1. Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC)	40
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύσταση θρεπτικού βιομέσου.....	26
Πίνακας 2: Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα <i>K. marxianus</i>	28
Πίνακας 3: Συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>L. delbrueckii</i>	30

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού οξέος:.....	20
Γράφημα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης Αιθανόλης	22
Γράφημα 3: Καμπύλη Βαθμονόμησης Ξηρής Βιομάζας του <i>K. marxianus</i>	25
Γράφημα 4: Καλλιέργεια του μύκητα <i>K. marxianus</i> στους 30 ° C αερόβια	31
Γράφημα 5: Καλλιέργεια του μύκητα <i>K. marxianus</i> στους 30 ° C και 33 ° C αναερόβια.....	33
Γράφημα 6: Συγκεντρώσεις αιθανόλης σε (g/L) κατά τη ζύμωση του <i>K. marxianus</i> Αναερόβια	35
Γράφημα 7: Καλλιέργεια του <i>Lactobacillus delbrueckii</i> αναερόβια	36
Γράφημα 8: Καλλιέργεια του βακτηρίου <i>L. delbrueckii</i> στους 30 °C και 33 °C αναερόβια..	38
Γράφημα 9: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε (g/L) κατά τη ζύμωση του <i>L. delbrueckii</i> στους 30 °C, 33 °C, και 35 °C Αναερόβια	40
Γράφημα 10: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε (g/L) κατά τη ζύμωση του <i>L. delbrueckii</i> στους 30 °C και 33 °C Αναερόβια	41
Γράφημα 11: Καλλιέργεια του βακτηρίου <i>L. delbrueckii</i> μαζί με το μύκητα <i>K. marxianus</i> στους 33 °C αναερόβια	42
Γράφημα 12: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε (g/L) κατά τη ζύμωση του <i>L. delbrueckii</i> μαζί με το μύκητα <i>K. marxianus</i> στους 33 °C αναερόβια	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά).....	11
Εικόνα 2: Πεχάμετρο.....	17
Εικόνα 3: Διάταξη HPLC.....	19
Εικόνα 4: Διάταξη GC.....	21
Εικόνα 5: Φούρνος.....	23
Εικόνα 6: Φυγόκεντρος.....	24
Εικόνα 7: Επωαστήρας κλίβανος (incubator).....	27
Εικόνα 8: Καλλιέργεια του <i>Lactobacillus delbrueckii</i> σε βιομέσο αριστερά και δοχείο ελέγχου δεξιά.....	36

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
BOD	Biochemical Oxygen Demand
COD	Chemical Oxygen Demand
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
ΔΟΤΓ	Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας
GC	Gas chromatography
PBR	Packed Bed Reactor
CSTR	Continuous stirred-tank reactor
SCP	Single cell protein
UV	Ultraviolet
DCW	Dry Cell Weight

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Βιομάζα	Σύνολο μικροβιακής μάζας
Γαλακτόζη	Υδατάνθρακας, μονοσακχαρίτης που δεν απαντάται ελεύθερος στη φύση, και που ενώνεται με τη γλυκόζη προκειμένου να σχηματίσει τη λακτόζη, ένα δισακχαρίτη που απαντάται στο γάλα
Λακτόζη	Σάκχαρο που βρίσκεται κυρίως στο γάλα και σχηματίζεται από γαλακτόζη και γλυκόζη
Μικροοργανισμοί	Μικροσκοπικοί μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί.
Μικκύλια	Τα διεσπαρμένα τεμαχίδια ενός κολλοειδούς (μίγματα σε οποιαδήποτε κατάσταση της τάξης μεγέθους 10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁴ cm.)
Πρωτεόλυση	Αντιδράσεις αποδόμησης των σύμπλοκων πρωτεϊνικών ουσιών
Πυτιά	Πηκτικό ένζυμο που χρησιμοποιείται στην πήξη γάλακτος για την παραγωγή τυριού.
Υδρόλυση	Διάσπαση χημικών δεσμών μιας χημικής ένωσης υπό την επίδραση του νερού
Φάση επώασης καθυστέρησης	- Φάση, στην οποία τα μικροβιακά κύτταρα προσαρμόζονται στο υπόστρωμα βιοσυνθέτοντας κατάλληλα ένζυμα. Μετά από αυτή ακολουθεί η εκθετική.
Laminar flow cabinet	Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
Incubator	Επωαστήρας κλίβανος με ελεγχόμενη θερμοκρασία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανέκαθεν, το γάλα αποτελούσε εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο, με σημαντικό χαρακτηριστικό του το ευρύ φάσμα των θρεπτικών ουσιών που περιέχει, καθώς αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας και δομικών συστατικών για τον οργανισμό μας. Στην Ευρώπη, τα τελευταία 30 χρόνια η ανάπτυξη της τυροκομίας επιφέρει αρνητικές οικολογικές ανησυχίες, πάνω στο θέμα των αποβλήτων, αφού κατά τις διαδικασίες παραγωγής τυριού παράγονται μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων, η διαχείριση των οποίων αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα. Μέσα από τις διάφορες διεργασίες παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων από τυροκομικές μονάδες προκύπτουν απόβλητα τα οποία καταλήγουν σε θάλασσες, ποτάμια, λίμνες, ωκεανούς και συστήματα αποχέτευσης με αποτέλεσμα να συμβαίνουν δραστικές μεταβολές στους οργανισμούς που ζουν στο νερό με κίνδυνο την εξαφάνισή τους (Gonzalez 1996, Pedro *et al.*, 2010). Από το είδος της εγκατάστασης και την παραγωγική διαδικασία που ακολουθείται, εξαρτάται ο όγκος των παραγόμενων αποβλήτων ενώ η σύστασή τους ποικίλει ανάλογα με τα προϊόντα που παράγονται και τις μεθόδους παραγωγής. Ανάλογα με τη σύστασή τους μπορούν να προκαλέσουν 5 έως 15 φορές μεγαλύτερη ρύπανση από τα αστικά απόβλητα (Ανυφαντάκης, 2004, Balannec *et al.*, 2005).

Οι αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται από την απόρριψη υγρών τυροκομικών αποβλήτων στους υδάτινους αποδέκτες, οφείλονται σε διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η περιεκτικότητά τους σε οργανικές ουσίες που αποτελούν θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Κατά την κατανάλωση των υποστρωμάτων αυτών γίνεται ταυτόχρονα και κατανάλωση οξυγόνου με παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, νερό, αμμωνία, θειικά και φωσφορικά άλατα. Όταν η συγκέντρωση οξυγόνου μειωθεί στα 3 ppm οι οργανισμοί του υδροβιότοπου δεν μπορούν να αναπαραχθούν, πεθαίνουν λόγω ασφυξίας και αντικαθίστανται από αναερόβιους οργανισμούς. Κατά την αναερόβια αποσύνθεση το οργανικό φορτίο δεν οξειδώνεται πλήρως, ενώ πολλά από τα τελικά προϊόντα προκαλούν προβλήματα δυσοσμίας (Tchobanoglou, 1984).

Διαφορετικές ουσίες όπως λίπη και έλαια, επικαλύπτουν την επιφάνεια του νερού εμποδίζοντας την οξυγόνωση και τη διείσδυση του φωτός. Θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο και ο φωσφόρος ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των αλγών καθιστώντας το νερό ακατάλληλο για πόση και ύδρευση, ενώ η αποσύνθεση των άλγεων μειώνει το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό. Επίσης στα τυροκομικά απόβλητα εμπεριέχονται παθογόνοι

μικροοργανισμοί όπως Salmonella, Shigella, E. Coli, Mycobacterium, ιοί, αμοιβάδες και παράσιτα. Κατά τη βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων απομακρύνονται οι περισσότεροι από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, εκτός από το Salmonella και το Mycobacterium, όπου για την θανάτωσή τους επιβάλλεται χλωρίωση του αποβλήτου πριν τη διοχέτευση του στον αποδέκτη (McGarrey *et.al.*, 2004).

Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση των αποβλήτων τυρόγαλου είναι στις μέρες μας το κύριο θέμα πολλών μελετών. Ένα ποσοστό της τάξεως του 50 % του παγκοσμίως παραγόμενου τυρογάλακτος, περίπου 70.000.000 τόνοι, επεξεργάζεται και μετατρέπεται σε διαφορετικά προϊόντα. Από τη συγκεκριμένη ποσότητα, περίπου η μισή χρησιμοποιείται κατευθείαν υπό υγρή μορφή, 30 % υπό μορφή σκόνης τυρογάλακτος, 15 % ως λακτόζη και άλλα παραπροϊόντα, ενώ το ποσό που απομένει, χρησιμοποιείται υπό τη μορφή πρωτεϊνούχων συμπυκνωμάτων. (Marwaha and Kennedy, 1988).

Στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί πολλοί τρόποι επεξεργασίας και διάφοροι τομείς στους οποίους μπορεί να έχει εφαρμογή το τυρόγαλο. Χωρίς καμία επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή λόγω της περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη, λακτόζη, ασβέστιο, φωσφόρο, θείο και υδροδιαλυτές βιταμίνες. Ωστόσο τα υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης λακτόζης και μετάλλων μπορεί να καταστήσουν το τυρόγαλο ακατάλληλο για ζωοτροφή (Sienkiewicz and Riedel, 1990). Το τυρόγαλο μπορεί επίσης να αποτελέσει γεωργικό λίπασμα με το μειονέκτημα ότι αυξάνει την αλατότητα του εδάφους (Gonzalez, 1996 (Pedro *et al.*, 2010). Με τη διεργασία της κρυσταλοποίησης μπορεί αφαιρεθεί η λακτόζη από το τυρόγαλο και να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε παιδικά γάλατα και σε φαρμακευτικά προϊόντα λόγω πλαστικότητας, ελαφριάς γεύσης και μειωμένης γλυκαντικής δύναμης (Yves, 1979). Μια από τις κύριες οδούς αξιοποίησης του τυρογάλακτος σχετίζεται με τη ζύμωση του προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (γαλακτικό οξύ, αιθυλική αλκοόλη, βιταμίνες, β-γαλακτοσιδάση, ξύδι, βιομάζα) (AK Keller *et.al.*, 1975).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Παραγωγή τυριού

Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (ΔΟΤΓ) με κώδικα αρχών (Codex Stan A-7-1978), ο ορός γάλακτος (ή τυρόγαλο) είναι το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια παρασκευής των τυριών. Δηλαδή λαμβάνεται μετά την καθίζηση της καζεΐνης και με διαχωρισμό από το τυρόπηγμα, μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από το γάλα. Η πήξη επιτυγχάνεται μέσω της δράσης, κυρίως, ενζύμων τύπου πυτιάς. Σύμφωνα με τον Κανονισμό 625/30-3-1978 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ορός γάλακτος ή τυρόγαλο είναι *«το προϊόν που λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς, ή/και φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης»* (Gonzalez, 1996).

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών που παρασκευάζεται από κατσικίσιο, αγελαδινό ή πρόβειο γάλα. Βάση νομοθεσίας τα τυριά χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με την περιεχόμενη υγρασία στη μάζα τους. Έτσι προκύπτουν τα πολύ σκληρά τυριά (έως 32 % υγρασία), τα σκληρά τυριά (έως 32 - 38 % υγρασία), τα ημίσκληρα τυριά (έως 38 - 46 % υγρασία) και τα μαλακά τυριά (μέχρι 46 - 58 % υγρασία). Με την προσθήκη οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηρίων σε παστεριωμένο γάλα παράγονται τα νωπά τυριά (έως 75 % υγρασία), ενώ τα τυριά που λαμβάνονται μετά από ισχυρή θέρμανση του τυρογάλακτος η υγρασία τους δεν υπερβαίνει το 70 % (Hutkins 2006).

Η κύρια βιοχημική οδός που ακολουθείται κατά την διαδικασία της τυροκόμησης είναι η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ λόγω της δράσης οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επομένως, η ορθή επιλογή οξυγαλακτικών βακτηρίων ενισχύει τη λήψη της λακτόζης που περιέχεται στο τυρόγαλο, με αποτέλεσμα το pH των τυριών να μειώνεται κατά τις πρώτες βδομάδες της ωρίμανσής του. Λόγω της μείωσης του pH, αποβάλλεται στο τυρόγαλο ασβέστιο και κατακρατείται περισσότερη πυτιά με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάσπαση των πρωτεϊνών. Η γρήγορη μείωση του pH κάτω από 5,2 τις πρώτες 24 ώρες δημιουργεί συνθήκες στις οποίες δύσκολα αναπτύσσονται κολοβακτηρίδια ή άλλα ανεπιθύμητα μικρόβια (Κατεχάκη Ε. 2010). Μια άλλη σημαντική διεργασία η οποία λαμβάνει μέρος κατά την παρασκευή των τυριών είναι η πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση περιλαμβάνει την υδρόλυση

των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αλλά και τη διεργασία της λιπόλυσης, της διάσπασης δηλαδή των γλυκεριδίων του λίπους και της παραγωγής ελεύθερων λιπαρών οξέων, κυρίως αυτών με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα όπως το βουτυρικό οξύ.

1.2 Σύνθεση τυρόγαλου

Το τυρόγαλο είναι προϊόν που εφοδιάζει τον άνθρωπο με ενέργεια και με πολλά απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Η λακτόζη αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος (4-5 % βάρος/όγκο) και διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη εφοδιάζοντας τον οργανισμό σε ενέργεια μέσα από τη διαδικασία της γλυκογονόλυσης. Άλλα συστατικά του τυρόγαλου αποτελούν οι πρωτεΐνες (12-13 %), μεταλλικά άλατα (7-11 %), και το ασβέστιο, το οποίο είναι βασικό δομικό συστατικό των οστών και των δοντιών. Το τυρόγαλο περιέχει επίσης γαλακτικό οξύ σε μεταβλητή ποσότητα (0,5-10 %), κιτρικό οξύ (περίπου 1 %) και μη πρωτεϊνικό άζωτο (0.5-0.8 %) (Gonzalez 1996, Ζώτου Α. 2009).

Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο τυρόγαλο μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου και να επηρεάσουν τα επίπεδα χοληστερίνης του αίματος, ανάλογα αν πρόκειται για κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η λακτόζη μπορεί επίσης να προκαλέσει προβλήματα υγείας, όπως δυσανεξία στη λακτόζη ή γαλακτοζαιμία. Στους ανθρώπους, η δυσανεξία στη λακτόζη είναι κοινό πρόβλημα και προκαλείται λόγω της απώλειας της λακτάσης. Όταν δεν παράγεται αρκετή λακτάση ώστε να αφομοιώσει την ποσότητα της λακτόζης που καταναλώνεται, τα αποτελέσματα (αν και συνήθως δεν είναι επικίνδυνα) μπορεί να είναι πολύ οδυνηρά.

1.2.1 Χαρακτηριστικά αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του πρόβειου γάλακτος (5.8 % w/w) είναι μεγαλύτερη από του αγελαδινού (3.3 % w/w). Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης δεν είναι πάντα σταθερή μεταξύ των δύο ειδών, αφού επηρεάζεται από τη διατροφή, τη περίοδο της γαλακτοπαραγωγής, το κλίμα, την εποχή και την υγιεινή κατάσταση του μαστού των ζώων. Οι πρωτεΐνες στο πρόβειο γάλα αποτελούν το 95 % του ολικού αλατιού, ενώ το υπόλοιπο 5 % είναι το μη πρωτεϊνικό αλάτι. Οι κύριες πρωτεΐνες στο πρόβειο και στο αγελαδινό γάλα είναι οι ίδιες αλλά διαφέρουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Οι πρωτεΐνες εμφανίζονται σε δυο διακριτές φάσεις, με την πρώτη να αποτελεί την ασταθή μικκυλιακή φάση που

αποτελείται από καζεΐνες και τη δεύτερη να συνιστά τη διαλυτή φάση που αποτελείται από πρωτεΐνες (Park *et al.*, 2007).

Ο μηχανισμός της ενζυμικής και της όξινης πήξης τους δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές. Το πρόβειο γάλα είναι πολύ ευαίσθητο στη χυμοσίνη και η πήξη του πραγματοποιείται πολύ πιο γρήγορα σε σύγκριση με το αγελαδινό. Ακόμη, η θέρμανση του πρόβειου γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες επιμηκύνει σε μικρό βαθμό το χρόνο πήξης με πυτιά σε σύγκριση με το αγελαδινό. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του πρόβειου γάλακτος σε καζεΐνη και κολλοειδές ασβέστιο προκαλούν αυτές τις διαφορές με το αγελαδινό (Alichanidis *et al.*, 1996).

1.3 Τύποι τυρόγαλου

Το τυρόγαλο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε διάφορους τύπους ανάλογα κυρίως με τη διεργασία παραγωγής του και διακρίνεται σε «*τυρόγαλο πυτιάς ή γλυκό τυρόγαλο*» και σε «*όξινο τυρόγαλο*». Σύμφωνα με τον Κώδικα των Ομοσπονδιακών Κανονισμών των ΗΠΑ το τυρόγαλο που λαμβάνεται από μια διεργασία κατά την οποία ένα σημαντικό ποσό λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ ή από το σχηματισμό τυροπήγατος με άμεση οξίνιση του γάλακτος, αποτελεί το «*τοξικό τυρόγαλο*». Το τυρόγαλο που λαμβάνεται από μια διεργασία κατά την οποία μια μικρή ποσότητα λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ συνιστά το «*γλυκό τυρόγαλο*». Το «*γλυκό τυρόγαλο*» είναι συνήθως υποπροϊόν της τυροκομίας και λαμβάνεται μετά από πήξη του γάλακτος με πυτιά (pH 5.9-6.6) ενώ το όξινο (pH 4.3-4.6) λαμβάνεται κατά την παρασκευή καζεΐνης μετά από οξίνιση του γάλακτος με οξέα. Το γλυκό τυρόγαλο λαμβάνεται επίσης, από την παρασκευή καζεΐνης με χρήση πυτιάς και το όξινο από την παρασκευή φρέσκων τυριών με βιολογική οξίνιση. Ο γλυκός ορός γάλακτος είναι γενικότερα πλουσιότερος σε λακτόζη ενώ το όξινο τυρόγαλο συνήθως έχει περισσότερη τέφρα και χαμηλότερο περιεχόμενο σε πρωτεΐνη από το γλυκό (Gonzalez 1996, Maria *et al.*, 2009, Pedro *et al.*, 2010). Οι διαφορές μεταξύ των δυο τύπων τυρογάλακτος, επιδρούν σημαντικά στις θρεπτικές ιδιότητές τους και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εφαρμογή των σύγχρονων μεθόδων επεξεργασίας του τυρόγαλου. Το όξινο τυρόγαλο, χρησιμοποιείται συνήθως πιο περιορισμένα για βρώση σε αντίθεση με το γλυκό τυρόγαλο, λόγω της όξινης γεύσης του και της υψηλής περιεκτικότητας του σε άλατα (Mawson, 1994).

1.4 Το τυρόγαλο ως απόβλητο

Η διάθεση αποβλήτων από τυροκομικές μονάδες, γίνεται μέσω σωληνώσεων σε θάλασσες, ποτάμια, λίμνες, ωκεανούς, σε σπηλιές και συστήματα αποχέτευσης. Το περιβαλλοντικό πρόβλημα που προκύπτει είναι ιδιαίτερα σοβαρό, αφού προκαλούνται δραστικές μεταβολές στους οργανισμούς που ζουν στο νερό, με κίνδυνο την εξαφάνισή τους λόγω καταστροφής του διαλυμένου οξυγόνου. Το μέγεθος της επικινδυνότητας είναι φανερό και από την ανάλυση των συστατικών του τυρόγαλου ως απόβλητο, η οποία ποικίλει ανάλογα με τα προϊόντα που παράγονται και τις μεθόδους παραγωγής.

Τα μέσα αστικά υγρά απόβλητα έχουν BOD (Biochemical Oxygen Demand) 300 mg οξυγόνου ανά λίτρο. Ένα μέσο ποσό 200 λίτρων ανά άτομο ανά ημέρα αντιστοιχεί σε 60 γραμμάρια οξυγόνου. Για το τυρόγαλο το BOD είναι περίπου 60 g οξυγόνου/λίτρο, δηλ. 1 λίτρο τυρογάλακτος αντιστοιχεί σε 1 άτομο. Επομένως, το τυρόγαλο αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα, λόγω των μεγάλων παραγόμενων ποσοτήτων του και του υψηλού περιεχομένου του σε οργανικές ουσίες. Οι υψηλές ποσότητες BOD = 30.000 - 50.000 ppm και COD = 60.000 - 80.000 ppm, οφείλονται κυρίως λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης σε λακτόζη καθώς η πρωτεϊνική ανάκτηση μειώνει το COD (Chemical Oxygen Demand) του ορού γάλακτος κατά περίπου 10.000 ppm μόνο (Μαλανδράκη Ε. 2008, Jelen, 2002). Για την επεξεργασία και χρήση του τυρόγαλου, τα τελευταία 50 χρόνια δοκιμάστηκαν διάφορες πρακτικές για ποσοτική και ποιοτική αξιοποίηση του τυρόγαλου. Από την παγκόσμια παραγωγή αξιοποιείται περίπου 55 % ενώ η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτεται ως απόβλητο.

1.5 Αξιοποίηση τυρόγαλου

Για τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση και εκμετάλλευση του απορριπτόμενου τυρόγαλου έχουν αναπτυχθεί διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας, όπως η αερόβια επεξεργασία, αναερόβια επεξεργασία, επεξεργασία με μεμβράνες, κατασκευή κατάλληλων υγροτόπων, πήξη/ηλεκτροπήξη/ κροκίδωση/ καθίζηση, βιοαποκατάσταση κ.α. (Κατή Π., 2010).

Κατά την αερόβια επεξεργασία, αναπτύσσονται μικροοργανισμοί σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο, οι οποίοι θα μετατρέψουν τα οργανικά συστατικά του αποβλήτου σε CO₂, H₂O, NO₃, διασπάσιμα οργανικά υλικά και υπολειμματικό κυτταρικό υλικό. Η παροχή οξυγόνου

παρέχει ενέργεια για τη βιοοξειδωση του υποστρώματος, κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του βιοαποικοδομούμενου BOD μετατρέπεται σε κυτταρική μάζα. Πρόκειται για μέθοδο με υψηλή κατανάλωση ενέργειας, η οποία απαιτεί συνήθως μεγάλες εγκαταστάσεις υψηλού κόστους. (Καττή Π., 2010).

Η αναερόβια επεξεργασία τυροκομικών αποβλήτων, θεωρείται ως η πιο βασική διεργασία που εφαρμόζεται, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των συγκεκριμένων αποβλήτων σε οργανικό φορτίο. Παρ' όλα αυτά, η απόδοση των συμβατικών τεχνικών αναερόβιας επεξεργασίας μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά, από τις υψηλές συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών και λιπιδίων που εμπεριέχονται στα απόβλητα. Η έρευνα των Kalyuzhni *et.al.* (1996), αναφέρει ότι η λειτουργία ενός συμβατικού αντιδραστήρα τύπου *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB), με όγκο 10,74 m³ είναι αποτελεσματική σε pH περίπου 4 και κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου (Καττή Π., 2010).

Μια από τις κύριες οδούς αξιοποίησης του τυρόγαλου σχετίζεται με τη ζύμωση του προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως γαλακτικό οξύ, αιθυλική αλκοόλη, βιταμίνες, β-γαλακτοσιδάση, ξύδι και βιομάζα. Χωρίς καμία επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή για διάφορα ζώα λόγω της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη, λακτόζη, ασβέστιο, φωσφόρο, θείο και υδροδιαλυτές βιταμίνες. Το τυρόγαλο μπορεί επίσης να αποτελέσει γεωργικό λίπασμα με το μειονέκτημα ότι αυξάνει την αλατότητα του εδάφους (Gonzalez, 1996, Pedro *et al.*, 2010). Τα υψηλά όμως επίπεδα συγκέντρωσης λακτόζης και μετάλλων μπορεί να καταστήσουν το τυρόγαλο ακατάλληλο για ζωοτροφή (Sienkiewicz and Riedel, 1990).

Με τη διαδικασία της κρυσταλοποίησης μπορεί να αφαιρεθεί η λακτόζη από το τυρόγαλο και να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε παιδικά γάλατα και σε διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα, λόγω πλαστικότητας ελαφριάς γεύσης και μειωμένης γλυκαντικής δύναμης (Yves, 1979). Με αναγωγή της λακτόζης προκύπτει η λακτιτόλη, η οποία χαρακτηρίζεται για τη γλυκαντική της δύναμη, ενώ με ισομερισμό της λακτόζης προκύπτει η λακτουλόζη, η γλυκύτητα της οποίας ανέρχεται στο 48 – 62 % της σακχαρόζης και χρησιμοποιείται σε συμπληρώματα διατροφής. Ωστόσο αναζητούνται συνεχώς νέες χρήσεις της λακτόζης με τις περισσότερες να βασίζονται στην απευθείας ζύμωση της. Η λακτόζη, μπορεί να υποστεί υδρόλυση, ως πηγή άνθρακα, από ορισμένους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να αυξάνονται η γλυκαντική αξία και η διαλυτότητα ευνοώντας τη χρήση του τυρογάλακτος σε

προϊόντα διατροφής. Επίσης, με ενζυμική και όξινη υδρόλυση επιτυγχάνεται η παραγωγή γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη, το οποίο επιτρέπει την κατανάλωση του από άτομα με δυσανεξία στο συγκεκριμένο σάκχαρο (Kosaric and Asher, 1985).

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες αξιοποίησης της παραγόμενης λακτόζης, οι οποίες περιλαμβάνουν τη βιο-επεξεργασία του τυρόγαλου και τη μετατροπή της λακτόζης σε αιθανόλη. Στην Ιρλανδία, τις Η.Π.Α και ιδιαίτερα στην Νέα Ζηλανδία, περίπου το 50 % του παραγόμενου τυρογάλακτος χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης (Mawson, 1994). Επιπρόσθετα, το τυρόγαλο χρησιμοποιείται σε αρτοπαρασκευάσματα, στη ζαχαροπλαστική-μαγειρική, στην παρασκευή τυριών τυρογάλακτος, για παραγωγή σκόνης τυρογάλακτος (30%), ασφαλωμένου τυρογάλακτος (45%), για την παραγωγή λακτόζης (15%) και το υπόλοιπο ως πρωτεϊνικό συμπύκνωμα. (Gonzalez 1996, Pedro *et al.*, 2010, Rojan *et al.*, 2007).

1.5.1 Χρήση βιοκαταλυτών στην επεξεργασία τυρόγαλου

Η τεχνολογία ακινητοποιημένων κυττάρων και ενζύμων εφαρμόζεται συχνά σε διεργασίες βιομετατροπής του τυρόγαλου λόγω της βελτίωσης του συνολικού κόστους. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα / κύτταρα, ορίζονται ως «*τα ένζυμα / μικροβιακά κύτταρα που περιορίζονται ή τοποθετούνται σε καθορισμένες περιοχές του χώρου με τη διατήρηση της καταλυτικής τους δραστηριότητας, και τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατ'επανάληψη και συνεχώς*». Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνολογίας είναι ότι, η υψηλή πυκνότητα των κυττάρων στο βιοαντιδραστήρα, βελτιώνει τη σταθερότητα του και αυξάνει την αποδοτικότητα του.

Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος αντιδραστήρα με ακινητοποιημένους βιοκαταλύτες, εξαρτάται από τις απαιτήσεις κάθε διεργασίας. Ο αντιδραστήρας διαλείποντος έργου (PBRs) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος για την τεχνολογία ακινητοποιημένων κυττάρων. (Grosova. *et al.*, 2008, Sheu. *et al.* 1998). Ένας αντιδραστήρας PBR χρησιμοποιήθηκε από τους Sheu *et al.* (1998) για την παραγωγή γαλακτο-ολιγοσακχαρίτων (GOS) μέσω της ακινητοποίησης της β-γαλακτοσιδάσης σε γλουταραλδεΐδη. Η μέγιστη απόδοση σε GOS ήταν περίπου 18 %, 21 %, και 26 % των συνολικών σακχαριτών σε ξηρή βάση με αρχική συγκέντρωση λακτόζης μεταξύ 100, 200, και 300 g L⁻¹. Οι αντιδραστήρες PBRs έχουν το πλεονέκτημα της απλής λειτουργίας τους και των υψηλών ποσοστών μεταφοράς μάζας. Η

μεταφορά οξυγόνου μπορεί να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα για την εφαρμογή των αντιδραστήρων ακινητοποιημένων κυττάρων σε βιομηχανική κλίμακα, εκτός εάν αυτοί είναι σε σειρά. Ένα άλλο πρόβλημα των συγκεκριμένων συστημάτων είναι η περιοδική διακύμανση του κυτταρικού πληθυσμού, λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών κατά μήκος του αντιδραστήρα (Becerra M. *et al.* 2001), καθώς και το ότι η θερμοκρασία ή το pH δεν είναι εύκολο να ρυθμιστούν (ειδικά σε αντιδραστήρες που ξεπερνούν τα 15 cm σε διάμετρο) (Grosova Z. *et al.*, 2008). Αντιδραστήρες PBR χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, καθώς είναι οι δημοφιλέστεροι για την ενζυματική υδρόλυση της λακτόζης. Αυτοί οι αντιδραστήρες προτιμώνται σε διεργασίες που περιλαμβάνουν παρεμπόδιση προϊόντος, η οποία μπορεί να προκείψει κατά την ενζυματική υδρόλυση της λακτόζης (Grosova Z. *et al.*, 2008).

Αντίθετα, με τα συστήματα PBR σε έναν αντιδραστήρα συνεχούς ροής CSTR, τα περιεχόμενα του αντιδραστήρα αναμιγνύονται τέλεια. Κατά συνέπεια, όλες οι ενώσεις στον αντιδραστήρα έχουν την ίδια συγκέντρωση, η οποία είναι η ίδια με τη συγκέντρωση της εκροής, ενώ ο ρυθμός της αντίδρασης καθορίζεται από τη σύνθεση του ρεύματος εξόδου από τον αντιδραστήρα. (Kosseva M.R. *et al.*, 1995, Krischke W. *et al.*, 1991). Επίσης στον CSTR αντιδραστήρα ο μέσος ρυθμός της αντίδρασης είναι χαμηλότερος και ως εκ τούτου, είναι καταλληλότερος για το υπόστρωμα στη κινητική αντίδραση. Η ανοικτή κατασκευή του CSTR, επιτρέπει την εύκολη αντικατάσταση του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη ενώ, διευκολύνεται ο έλεγχος της θερμοκρασίας και του pH. Έτσι, ο αντιδραστήρας CSTR, είναι κατάλληλος για χρήση όταν το κόστος δεν είναι πολύ υψηλό και όταν είναι απαραίτητη μια σταθερή παραγωγικότητα. Πολλές εφαρμογές αυτού του τύπου βιοαντιδραστήρα απαντώνται για την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Grosova Z. *et al.*, 2008, Kosseva M.R. *et al.*, 1995, Krischke W. *et al.*, 1991).

Η βιομετατροπή του τυρόγαλου σε διάφορα προϊόντα, μειώνει το ρυπαντικό φορτίο του τυρογάλακτος και η μετέπειτα διάθεσή του είναι ασφαλέστερη. Τα προϊόντα που παράγονται από το τυρόγαλο έχουν ευρύ φάσμα χρήσεων, όπως συστατικά τροφίμων με μοναδικές λειτουργικές και θρεπτικές ιδιότητες. Το τυρόγαλο είναι επίσης μια ανανεώσιμη πηγή βιοενέργειας, καθώς από την επεξεργασία του μπορούμε να παράγουμε αιθανόλη και πολύτιμα οργανικά οξέα, όπως, οξικό, κιτρικό, γλυκονικό και γαλακτικό οξύ (Maria *et al.*, 2009).

1.5.2 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη

Το τυρόγαλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ειδικότερα ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (π.χ. γένη *Kluyveromyces*, *Candida*, *Trichosporum*, *Torula*), τα οποία αποδίδουν βιομάζα υψηλής βιολογικής αξίας. Η βιομάζα αυτή, καλείται μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP -single cell protein) και χρησιμοποιείται συνήθως ως συμπλήρωμα ζωικών τροφών αλλά και για την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας. Από τις διεργασίες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, η διεργασία της Βιέννης (Vienna process) και η διεργασία Bel (Bel process) είναι αυτές που ξεχώρισαν σε εμπορική κλίμακα από τη δεκαετία του 1940 (Gonzalez, 1996, Solange *et al.*, 2010). Στη διεργασία της Βιέννης, χρησιμοποιείται μόνο το είδος *Candida intermedia*, το οποίο χαρακτηρίζεται από τον αποκλειστικά οξειδωτικό μεταβολισμό της λακτόζης (Gonzalez 1996).

Αντίθετα, η διεργασία Bel process αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης που αυξάνει την αξία τροφίμων και βιομηχανικών υποπροϊόντων. Σε αυτή τη διεργασία αναπτύσσονται σε ισορροπία τρία είδη ζυμών (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyce fragilis*, *Torulopsis bovina*), μέσα σε διήθημα τυρόγαλου. Επειδή οι εν λόγω μικροοργανισμοί δε μπορούν να μεταβολίσουν τις πρωτεΐνες του, αποφεύγεται η χρήση πλήρους τυρογάλακτος. Οι πρωτεΐνες προωθούν τη συσσωμάτωση των ζυμών, παρεμποδίζοντας τη ζύμωση. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο τυρόγαλο, μερικές φορές, μπορεί να είναι απαραίτητη η προσθήκη αλατιού και φωσφόρου. (Gonzalez 1996, Nancy *et al.*, 2010). Οι μύκητες σε αυτή την περίπτωση αναπτύσσονται σε συνεχείς καλλιέργειες για περίοδο μεγαλύτερη από ένα έτος χωρίς διακοπή, σε pH 3,5 και θερμοκρασία 38 °C. Η υψηλή θερμοκρασία και το χαμηλό pH συνίστανται για την αποφυγή επιμολύνσεων. Το υπόστρωμα τυρογάλακτος παστεριώνεται στους 80 °C για να απομακρυνθούν τα βακτήρια, ενώ επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα οξυγόνου επιβάλλονται για την αποφυγή σχηματισμού αιθανόλης. Η απόδοση αγγίζει το 50 % του βάρους της χρησιμοποιούμενης λακτόζης ενώ η βιομάζα ανακτάται με φυγοκέντριση, πλασμολείεται με θέρμανση στους 85 °C και τελικά ξηραίνεται. Η βιομάζα που παράγεται περιέχει 48 – 52 % πρωτεΐνες με ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων, είναι πλούσια σε λυσίνη και βιταμίνες B και χρησιμοποιείται κυρίως ως πρόσθετο σε ζωοτροφές αλλά και σε είδη ανθρώπινης διατροφής (Castillo, 1990, Mawson, 1994).

1.6 Ζύμωση λακτόζης-Παραγωγή αιθανόλης (C₂H₅O)

Η διεργασία της ζύμωσης ορίζεται ως η διάσπαση οργανικών ενώσεων από μικροοργανισμούς κάτω αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Αυτή η διάσπαση παράγει τελικά προϊόντα στα οποία περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι τύποι:

- Μικροβιακά κύτταρα π.χ. βακτήρια, ζύμες, μυκητιακά σπόρια.
- Μικροβιακά ένζυμα π.χ. ένζυμα πήξης του γάλακτος ή τυτιά, ανασυνδυαζόμενα μυκητιακά και βακτηριακά ένζυμα θρόμβωσης γάλακτος.
- Μικροβιακοί μεταβολίτες π.χ. αλκοόλες (αιθανόλη, βουτανόλη, 2, 3-βουτανοδιόλη, ισοπροπανόλη), χημικές ουσίες (εστέρας γαλακτικού οξέος, προπιονικός εστέρας, πρωτεΐνες, βιταμίνες, αντιβιοτικά) και καύσιμα (μεθάνιο).
- Ανασυνδυαζόμενα προϊόντα (π.χ. ορμόνες) (Audic *et al.*, 2003).

Για την επεξεργασία του τυρόγαλου και τη μετατροπή της λακτόζης σε αιθανόλη διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί, οι οποίοι μπορούν να μετατρέψουν πάνω από το 90 % της λακτόζης συμπυκνωμένων διαλυμάτων προς παραγωγή αιθανόλης. Αυτό επιτυγχάνεται αερόβια με τις εξής ζύμες: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis* κ.α. (Μαλανδράκη Ε. 2008, Gonzalez 1996, Pedro *et al.*, 2010).

1.6.1 *Kluyveromyces marxianus*

Έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες σχετικά με την ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών να παράξουν αιθανόλη από το τυρόγαλο. Ο μύκητας *Kluyveromyces marxianus*, ο οποίος είναι συνώνυμος με τον *Kluyveromyces fragilis*, προέρχεται από μεγάλη ποικιλία οικοτόπων και είναι ο συνηθέστερος οργανισμός στη βιομηχανία, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης από το τυρόγαλο (Pedro *et al.*, 2010). Πολλοί ερευνητές, κάνουν αναφορά στις παρεμποδιστικές επιδράσεις του μύκητα *Kluyveromyces marxianus*. Αυτές, εμφανίζονται στη ζύμωση τυρόγαλου και ιδιαίτερα στις αργές ζυμώσεις με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε υπολειμματικά σάκχαρα, αλλά και όταν η αρχική συγκέντρωση της λακτόζης αυξάνεται πάνω από 100 έως 150 g L⁻¹, ή σε ορισμένες περιπτώσεις πάνω από 200 g L⁻¹. Αυτά τα προβλήματα αποδίδονται σε οσμωτική ευαισθησία (λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων λακτόζης) και σε χαμηλή ανοχή σε αιθανόλη, καθώς και σε υψηλή

συγκέντρωση αλάτων. Η έκταση των συνεπειών που επιφέρουν τα παραπάνω προβλήματα, φαίνεται να εξαρτάται από το στέλεχος και από τις συνθήκες ζύμωσης του, όπως η διαθεσιμότητα οξυγόνου και άλλων θρεπτικών συστατικών που μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά το χρησιμοποιούμενο μικροοργανισμό. (Pedro *et al.*, 2010).

Η περιορισμένη περιεκτικότητα του τυρογάλαου σε θρεπτικά στοιχεία μπορεί να περιορίσει τη ζύμωση υψηλών συγκεντρώσεων λακτόζης. Οι Janssens *et al.* (1983) ανέφεραν σημαντική βελτίωση στην ικανότητα της ζύμωσης του *Kluyveromyces marxianus*, όταν ο συμπυκνωμένος ορός γάλακτος, που περιείχε περίπου 200 g L⁻¹ λακτόζη, έχει ήδη συμπληρωθεί με 0.5 % πεπτόνη, καθώς και με εργοστερόλη και λινολεϊκό οξύ. Η παροχή των συγκεκριμένων λιπιδίων οδήγησε σε μείωση του χρόνου ζύμωσης από 90 σε 60 ώρες. (Pedro *et al.*, 2010). Η διαθεσιμότητα οξυγόνου είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας που επηρεάζει την επίδοση του στελέχους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η διαθεσιμότητα οξυγόνου πρέπει να είναι επαρκής, χωρίς να προκαλείται υπερβολική ανάπτυξη της ζύμης και να επηρεάζεται η απόδοση σε αιθανόλη. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ευνοούν τη ζύμωση καθώς αρχικά παράγεται υψηλός όγκος αιθανόλης σε ανοξικές συνθήκες η παραγωγή του οποίου συνεχίζεται μετέπειτα σε αερόβιες συνθήκες. (Pedro *et al.*, 2010, Maria *et al.*, 2009)

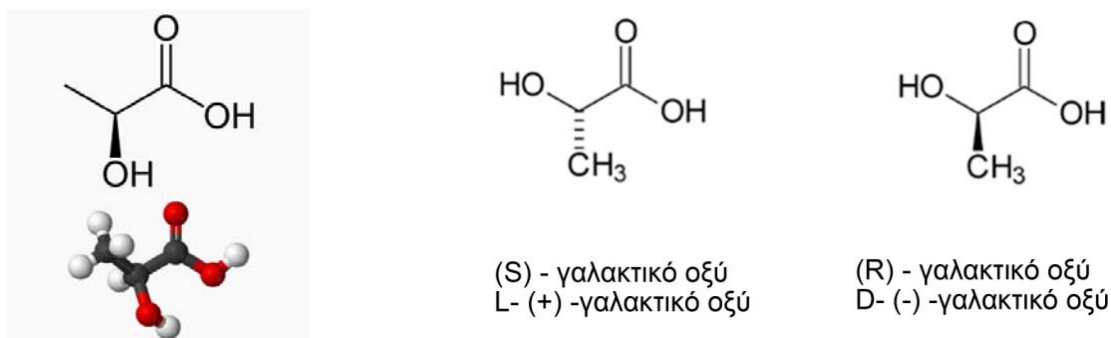
Οι Salman *et al.*, (2006), αναφέρουν ότι το στέλεχος *Kluyveromyces marxianus* παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, λόγω της ιδιότητας του να αναπτύσσεται και να ζυμώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες (40 ° C). Το πλεονέκτημα αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την εξοικονόμηση κόστους αφού δε χρειάζεται ψύξη στις βιο-διεργασίες παραγωγής αιθανόλης. Οι Banat *et al.* (1992) περιέγραψαν ότι το θερμοανεκτικό στέλεχος *Kluyveromyces marxianus*, μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια στους 52 ° C σε λακτόζη και ορό γάλακτος. Το κόστος μπορεί να μειωθεί περαιτέρω με την αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης πάνω από 100 – 120 g L⁻¹. Πρόσφατα οι Nonklang *et al.* (2008), ανέφεραν ότι το στέλεχος *Kluyveromyces marxianus* παράγει σημαντικές ποσότητες αιθανόλης στους 45 ° C από τη γλυκόζη, αλλά όχι από τη λακτόζη. Σε αντιδραστήρες ζύμωσης, ο *Kluyveromyces marxianus* αξιοποιεί πάνω από το 95 % της λακτόζης του τυρογάλακτος, με αποτελεσματικότητα μετατροπής 80 – 85 % της μέγιστης θεωρητικής δυνατής μετατροπής (0,538 Kg αιθανόλης / Kg λακτόζης) (Mawson, 1994).

1.7 Ζύμωση λακτόζης- Παραγωγή γαλακτικού Οξέος

Ένα από τα πιο σημαντικά χημικά που έχουν χρήση στη βιομηχανία ως πρόσθετη ουσία για την παραγωγή τροφίμων είναι το γαλακτικό οξύ, το οποίο έχει χρήση και ως βιομηχανική χημική ουσία για να παραχθεί οξείδιο του προπυλενίου, βιοδιασπώμενα πολυγαλακτικά όξινα πολυμερή, γλυκόλη προπυλενίου ή ακρυλικές ίνες, καθιστώντας την αγορά του γαλακτικού οξέος πρωταρχικής σπουδαιότητας (Lunt, 1998). Το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται επίσης και ως συντηρητικό, ως οξινιστικό στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας και της φαρμακευτικής βιομηχανίας, καθώς και ως οξινιστικό σε σάλτσες, τουρσί, ποτά και στη ζαχαροπλαστική για ρύθμιση του pH, σε καλλυντικά σκευάσματα, στην ιατρική σε χειρουργικά ράμματα κ.α. (Salman *et al.*, 2006, Ana *et al.*, 2004, Parmjit *et al.*, 2007).

Για την εμπορική παραγωγή του γαλακτικού οξέως χρησιμοποιούνται ομοζυμωτικοί μικροοργανισμοί και πλήθος υποστρωμάτων, όπως, ορός γάλακτος, μελάσα, γλυκόζη κ.α. Το εμπορικό προϊόν «γαλακτικό οξύ», αποτελεί είτε τελικό προϊόν της ζύμωσης των μικροοργανισμών είτε προϊόν χημικής σύνθεσης και έχει 2 οπτικά ισομερή, το L (+) γαλακτικό οξύ και το D (-) γαλακτικό οξύ (εικόνα 1.1). Η χημική σύνθεση του γαλακτικού οξέος κατά κύριο λόγο βασίζεται στην υδρόλυση της λακτονιτρίλης από ισχυρά οξέα παράγοντας ένα μίγμα των δυο ισομερών σε αντίθεση με το παραγόμενο οξύ από ζύμωση στο οποίο επικρατεί η μορφή του L-γαλακτικού οξέος. (Holten *et al.*, 1971, Datta *et al.*, 1995).

Εικόνα 1: Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά)



Στη βιοτεχνολογική παραγωγή του γαλακτικού οξέως παρέχονται πολλά πλεονεκτήματα όπως η χρησιμοποίηση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, η χαμηλή θερμοκρασία παραγωγής του, όπως επίσης και η μειωμένη κατανάλωση ενέργειας κατά τη ζύμωση οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Όμως στη βιοτεχνολογική παραγωγή του γαλακτικού οξέως υπάρχουν και 2 κύρια μειονεκτήματα. Το πρώτο είναι η χρήση υποστρωμάτων με υψηλό κόστος, λόγω της χρήσης σακχάρων ως πηγή άνθρακα. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να επιλυθεί με τη χρήση φθηνών πρώτων υλών όπως η μελάσα, το άμυλο, η λιγνίνη, καθώς και γεωργικά απόβλητα, τα οποία μπορούν αν χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για ζυμώσεις που έχουν ως στόχο την παραγωγή γαλακτικού οξέως. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά υλικά όπως το άμυλο και η λιγνίνη πρέπει να προεπεξεργάζονται μέσω φυσικοχημικών και ενζυματικών μεθόδων, αφού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα στις ζυμώσεις (Okano *et al.*, 2010).

Το δεύτερο εμπόδιο για την παραγωγή γαλακτικού οξέως, είναι το κόστος λειτουργίας. Σε αυτό συντελεί η αποστείρωση η οποία είναι απαραίτητη στη ζύμωση για παραγωγή γαλακτικού οξέως. Μικροοργανισμοί με βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης 30-42 °C χρησιμοποιούνται συνήθως για τις βιομηχανικές εφαρμογές και ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να αποφευχθεί η μόλυνση αν το μέσο δεν είναι αποστειρωμένο (Qin *et al.*, 2009). Επίσης, ο διαχωρισμός και οι διεργασίες καθαρισμού μετά τη ζύμωση μπορούν να αυξήσουν σημαντικά το κόστος της παραγωγής του γαλακτικού οξέως. Διάφοροι ερευνητές έχουν μελετήσει την αύξηση της απόδοσης στη ζύμωση για την παραγωγή γαλακτικού οξέως, όμως για να επιτευχθεί χρειάζονται περεταίρω προσπάθειες (Chao *et al.*, 2011).

1.7.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέως από μικροοργανισμούς

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή γαλακτικού οξέως, πρέπει να συνδυάζουν μια σειρά χαρακτηριστικών για να είναι βιομηχανικά ελκυστικοί:

- Υψηλή παραγωγικότητα για να μειώνεται ο χρόνος ζύμωσης
- Υψηλή μετατροπή για να μειώνεται το κόστος του αρχικού υδρογονάνθρακα
- Δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν φθηνά θρεπτικά συστατικά για να μειωθεί το κόστος συντήρησης

- Χαμηλή ποσότητα παραπροϊόντων για να αυξηθεί το επίπεδο καθαρότητας
- Υψηλή συγκέντρωση στο τελικό προϊόν για να μειωθεί το κόστος από διεργασίες εξάτμισης
- Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι ανθεκτικοί στις μολύνσεις (Auras *et al.*, 2010).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να παράγουν γαλακτικό οξύ χωρίζονται σε δυο ομάδες:

- Βακτήρια (π.χ. γένη όπως *Lactobacillus* και *Streptococcus*)
- Μύκητες: Μπορεί να εμφανίσουν χαμηλή απόδοση γαλακτικού οξέως και σχηματισμό υποπροϊόντων όπως φουμαρικό οξύ και αιθανόλη.

Η ποσότητα του γαλακτικού οξέως που παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ορού γάλακτος είναι ανάλογη προς την ποσότητα της διαθέσιμης λακτόζης. Εντούτοις, υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρωμάτων μπορούν να καθυστερήσουν τη μικροβιακή αύξηση και το ρυθμό παραγωγής του προϊόντος. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να καθορίζεται το υψηλότερο επίπεδο αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στον ορό γάλακτος, το οποίο δε θα εμποδίζει τη μικροβιακή αύξηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η βιομηχανική ζύμωση του γαλακτικού οξέως μπορεί να περιοριστεί, από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών, τα οποία απαιτούνται από τους μικροοργανισμούς για κυτταρική αύξηση και συντήρηση (Ghaly *et al.*, 2004). Κάθε μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά, αλλά το *Lactobacillus* (που εμφανίζεται σε πολλές ζυμώσεις τροφίμων) και ο *Rhizopus* είναι τα πιο διαδεδομένα. Μερικά βακτήρια που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είναι ο *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus amylophilus*, κ.α.

1.7.2 *Lactobacillus delbrueckii*

Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει περίπου 50 είδη τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε γαλακτοκομικά προϊόντα, δημητριακά προϊόντα, σε προϊόντα κρέατος και ψαριών, στη μύρα, στο κρασί, στους χυμούς, στη μαγιά και στο νερό. Δεν είναι παθογόνα και προστατεύουν τον άνθρωπο από μολύνσεις (Κουτρώτσιος, 2009). Η χρήση τους συμβάλει στην αύξηση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέως, με

σημαντικό πλεονέκτημα ότι προδίδουν γεύση, υφή και άρωμα στα τρόφιμα (Maria *et al.*, 2009).

Για την παραγωγή προβιοτικού γιαουρτιού χρησιμοποιείται αρχική καλλιέργεια γιαουρτιού που αποτελείται κυρίως από *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* κ.α. (Dave1 *et al.*, 1998). Ο Sodini *et al.*, (2002) αναφέρει ότι, κυρίως οι *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, έχουν σημαντική επίδραση σε ζυμωμένο γάλα, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την όξυνση προϊόντων αλλά και για τις ευεργετικές δράσεις που έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, μπορεί να συμβάλουν θετικά στις διαταραχές του ύπνου, στο μεταβολισμό του ασβεστίου μετά από εμμηνόπαυση και στην υψηλή αρτηριακή πίεση (Narva *et al.*, 2009, Nakamura 2004).

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στη διεργασία της ζύμωσης που στοχεύει στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Εκτός από τις σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Υπάρχει μια βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος και αυτό εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Όταν η θερμοκρασία του μέσου είναι πάνω ή κάτω από εκείνο που απαιτείται για τη βέλτιστη ανάπτυξη, η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά και ο οργανισμός μπορεί τελικά να πεθάνει (Parmjit *et al.*, 2007). Η παραγωγή γαλακτικού οξέως από τη ζύμωση μπορεί να πραγματοποιείται σε συγκριτικά υψηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα βακτήρια. Σε ζυμώσεις, ο *Lactobacillus delbrueckii* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία 45° C, ενώ οι *Lactobacillus helveticus*, και *Lactobacillus acidophilus* μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε θερμοκρασίες από 37-45 ° C. Ωστόσο, για άλλα βακτήρια, όπως ο *Lactobacillus casei*, προτιμάται θερμοκρασία 28-35 ° C. Η συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της ζύμωσης επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη των μικροβίων και το ρυθμό παραγωγής του προϊόντος. Ακόμη, το pH επηρεάζει τουλάχιστον δύο πτυχές των μικροβιακών κυττάρων, τη λειτουργία των ενζύμων και τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών μέσα στο κύτταρο. Οι τιμές του pH επηρεάζουν επίσης το RNA και την πρωτεϊνική σύνθεση (Klonrychev *et al.*, 1979). Για ταχεία και πλήρη ζύμωση, το βέλτιστο εύρος pH είναι 5,5-6,0 και σε ορισμένες περιπτώσεις, 6,0-6,5, ανάλογα με τους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται.

Η διεργασία της ζύμωσης αναστέλλεται έντονα σε χαμηλότερο pH και σταματάει τελείως σε τιμές του pH κάτω από 4,5 (Parmjit *et al.*, 2007)

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων πρέπει να συμμορφώνονται με αυστηρούς περιβαλλοντικούς κανονισμούς, όσο αφορά τη διάθεση των παραπροϊόντων και των αποβλήτων τους. Με την ανάπτυξη της τυροκομίας προκύπτουν οικολογικές ανησυχίες, λόγω των μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που προκύπτουν από τις διεργασίες παραγωγής τυριού, η διαχείριση των οποίων αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα. Το τυρόγαλο που προκύπτει ως απόβλητο, περιέχει μεγάλη συγκέντρωση λακτόζης. Επομένως, για την επεξεργασία του τυρόγαλου και τη μετατροπή της λακτόζης σε οργανικά χημικά προϊόντα βιομηχανικής σημασίας, απαραίτητη είναι η χρήση συγκεκριμένων στελεχών αλλά και για την αντιμετώπιση του περιβαλλοντικού προβλήματος. Με βάση τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη έχει ως κύριο στόχο την ανάπτυξη μιας βιοδιεργασίας επεξεργασίας του τυρογάλακτος, μέσα από την οποία θα παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης και γαλακτικού οξέος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η επιλογή συγκεκριμένων στελεχών από τη βιβλιογραφία, τα οποία είναι ικανά να βιομετατρέψουν τη λακτόζη σε αιθυλική αλκοόλη και γαλακτικό οξύ. Τα στελέχη που επιλέχτηκαν ήταν ο μύκητας *K. marxianus* και το βακτήριο *Lactobacillus delbrueckii* τα οποία εξετάστηκαν πειραματικά ως προς την ικανότητα τους για παραγωγή των προϊόντων από το τυρόγαλο, κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, η τιμή του pH, χρόνος αύξησης της βιομάζας και μείωσης του υποστρώματος αλλά και η απόδοση στη παραγωγή προϊόντων.

Μέσα από μετρήσεις αέριας και υγρής χρωματογραφίας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος ως προϊόντα ζύμωσης του *K. marxianus* και του *Lactobacillus delbrueckii*, ενώ μέσω της φασματοφωτομετρίας πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της συγκέντρωσης της βιομάζας σε κάθε καλλιέργεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Εισαγωγή

Η αναζήτηση οικολογικά και οικονομικά αποδεκτών μεθόδων για την εξάλειψη των προβλημάτων της ρύπανσης από απόβλητα τυροκομικών μονάδων, οδήγησαν στην υλοποίηση των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω. Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των μικροοργανισμών και περιγράφονται οι μέθοδοι με τους οποίους ερευνήθηκαν.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της ανάπτυξης των δυο μικροοργανισμών σε βιομέσο το οποίο φτιάχτηκε στο εργαστήριο. Για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της επώασης, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο (UV). Συγχρόνως χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία (HPLC) για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων του γαλακτικού οξέος που παράγει ο *Lactobacillus delbrueckii* ενώ παράλληλα έγινε χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιθανόλης που παράγεται μέσω του μύκητα *Kluyveromyces marxianus*. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, μελετήθηκε η ανάπτυξη και η ποσοτική απόδοση των μικροοργανισμών, με τον προσδιορισμό συγκεκριμένων βιοχημικών ιδιοτήτων τους. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας.

2.2. Όργανα – Υλικά – Μέθοδοι

2.2.1. Αποστείρωση

Ο όρος αποστείρωση αναφέρεται στις διαδικασίες εκείνες που απομακρύνουν κάθε ζωντανό κύτταρο ή βιώσιμο σπόριο ή άλλη ανθεκτική μορφή ή ίο από μια επιφάνεια ή ένα κομμάτι του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού. Η αποστείρωση είναι βασική προϋπόθεση εφαρμογής της τεχνικής της καθαρής καλλιέργειας και διεξάγεται με διάφορους τρόπους όπως θερμότητα, υπεριώδεις ακτίνες, ιονίζουσες ακτινοβολίες, διήθηση, οξείδιο του αιθυλενίου κ.α.

2.2.2. Μέτρηση pH

Για τις αποστειρώσεις που απαιτήθηκαν στα πειράματα, ακολουθήθηκε η μέθοδος της θερμότητας. Η θερμότητα αποτελεί ένα αποτελεσματικό και ασφαλή τρόπο αποστείρωσης και μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ατμό είτε με ξηρή θερμότητα. Τα υλικά προς αποστείρωση θερμάνθηκαν στους 120 °C για 15 λεπτά με τη χρήση ατμών. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου έως τη τελική τους χρήση στα πειράματα.

Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του πεχαμέτρου, (τύπου Crison micropH2001), στο προς ανάλυση δείγμα (εικόνα 1.2.). Πριν την κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του οργάνου με δύο πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα (pH 4 και pH 7) (Νταρακάς Ε.,2011).

Εικόνα 2: Πεχάμετρο



2.2.3. Χρήση φασματοφωτομέτρου

Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της συγκέντρωσης ουσιών μέσα σε ένα υγρό διάλυμα. Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση το όργανο αξιοποιεί μία από τις βασικές ιδιότητες του φωτός. Αυτή είναι η απορρόφηση τμήματος του φωτός όταν αυτό διέρχεται μέσα από ένα διάλυμα.

Κάθε ουσία έχει το δικό της μέγιστο απορρόφησης του φωτός που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, το οποίο οφείλουμε να γνωρίζουμε όταν θέλουμε να μετρήσουμε την συγκέντρωσή της. Αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί σε ηλεκτρομαγνητική

ακτινοβολία που απορροφάται από τα μόρια της ουσίας την οποία θέλουμε να μετρήσουμε. (Καρκαλούσου Π. 2009)

Η οπτική πυκνότητα στο φασματοφωτόμετρο μετρήθηκε στα 600 nm με το φασματοφωτόμετρο (spectrophotometer UV-Vis), προκειμένου να προσδιοριστεί η μικροβιακή αύξηση. Για κάθε υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά δοχεία (Centrifuge tubes), γυάλινη κυψελίδα των 2 ml, φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού φωτός και φλόγα. Για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε λήψη 1.5 ml δείγματος από την κάθε καλλιέργεια και από το δοχείο ελέγχου (control) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Πριν από τη μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 4' (min) στις 1330 στροφές, ώστε να διαχωριστεί η βιομάζα από το βιομέσο. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στη συνέχεια προστέθηκε 1.5 ml απιονισμένου νερού. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη γυάλινη κυψελίδα για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Σε περίπτωση που η απορρόφηση ήταν μεγαλύτερη από 0.9, το υπό μέτρηση δείγμα αραιώθηκε για την αποφυγή σφαλμάτων.

2.2.4. Χρήση HPLC

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography), ονομάζεται η μέθοδος η οποία επιτυγχάνει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς συστατικών σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών (Knox J. *et.al.* 1978).

Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια μιας κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για το διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς των προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού. (Λιούρτα Ν, 2008).

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος μετά από τη ζύμωση του βακτηρίου *L. delbrueckii*, αναλύθηκε με Υγρή Χρωματογραφία (HPLC). Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε HPLC Shimadzu με ανιχνευτή SPD-20A (UV/Vis detector) και αντλία LC-20AD (εικόνα 1.3.). Επίσης έγινε η χρήση φούρνου CTO-10AS vp, ενώ η μέτρηση

παραγόμενου γαλακτικού οξέως έγινε με τη στήλη 6OH-0138-KO (306 x 7,80 mm) για οργανικά οξέα.

Εικόνα 3: Διάταξη HPLC

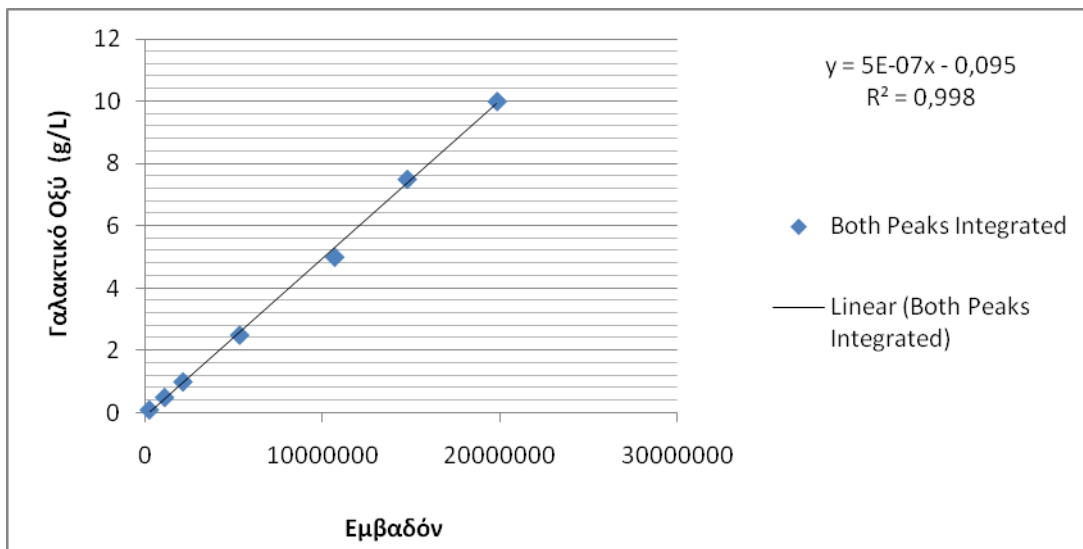


Για τη μέτρηση της παραγόμενης ουσίας, το όργανο ρυθμίστηκε στις εξής συνθήκες λειτουργίας:

1. Ο Ανιχνευτής UV ρυθμίστηκε στα 214 nm.
2. Η ταχύτητα ροής ήταν στα 0,6 ml / min.
3. Χρήση κινητής φάση 0,005 NH_2SO_4 .
4. Η θερμοκρασία (T) της στήλης ήταν στους 60 °C.
5. Κάθε ένεση λάμβανε 30 μL .

Ακολούθησε η κατασκευή και χρήση πρότυπων καμπύλων βαθμονόμησης (γράφημα 1) της καλλιέργειας στο HPLC, ούτως ώστε να προσδιοριστεί το παραγόμενο γαλακτικό οξύ. Για την κατασκευή των καμπύλων αυτών, έγινε ανάλυση των πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος και στη συνέχεια των άγνωστων δειγμάτων. Στο ακόλουθο γράφημα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών γαλακτικού οξέος που λήφθηκαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των διαλυμάτων.

Γράφημα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού οξέος:



Από τη γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας την excel, υπολογίστηκε το $R^2 = 0,9985$ ενώ η εξίσωση που αντιπροσωπεύει την καμπύλη είναι η $y = 5E-07x - 0,0954$. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι γραμμική αφού το R^2 πλησιάζει τη μονάδα.

Παρατηρώντας την καμπύλη, είναι φανερό ότι σχεδόν κανένα από τα σημεία δεν αποκλίνει από την ευθεία. Εξετάζοντας την καμπύλη πιο προσεκτικά, φαίνεται ότι ένα σημείο αποκλίνει ελάχιστα από τη γραμμικότητα των υπόλοιπων σημείων. Η απόκλιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα που προήλθαν κατά τις αραιώσεις κατασκευής των πρότυπων διαλυμάτων γαλακτικού οξέος.

2.2.5. Χρήση GC

Η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) είναι η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση μιγμάτων πτητικών οργανικών ενώσεων. Έχει χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ανάλυση όλων σχεδόν των αερίων και πτητικών υγρών μιγμάτων σε δείγματα φαρμάκων, βενζίνης, περιβαλλοντικών δειγμάτων αέρα και υδάτων, κ.α. Στην αέρια χρωματογραφία το δείγμα μετακινείται στον εισαγωγέα, όπου εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης (στατική φάση) καθώς παρασύρεται από κινούμενο αδρανές αέριο (κινητή φάση).

Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του αερίου κατά μήκος της στήλης και ο

διαχωρισμός επιτυγχάνεται ανάλογα με τη κατανομή του αναλυτή μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη σε επιφάνεια αδρανούς στερεού υποστρώματος (χρωματογραφία αερίου-υγρού).

Η παραγωγή αιθανόλης μετά από τη ζύμωση του μύκητα *K. marxianus*, αναλύθηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC), σε ένα Shimadzu GC-2014 όργανο που είναι συνδεδεμένο με ένα ανιχνευτή ιονισμού φλόγας FID (εικόνα 1.4.). Χρησιμοποιήθηκε εισαγωγή δειγματος AOC-20i, ενώ η μέτρηση παραγόμενης αιθανόλης έγινε με στήλη Zebbron ZB-5.

Εικόνα 4: Διάταξη GC



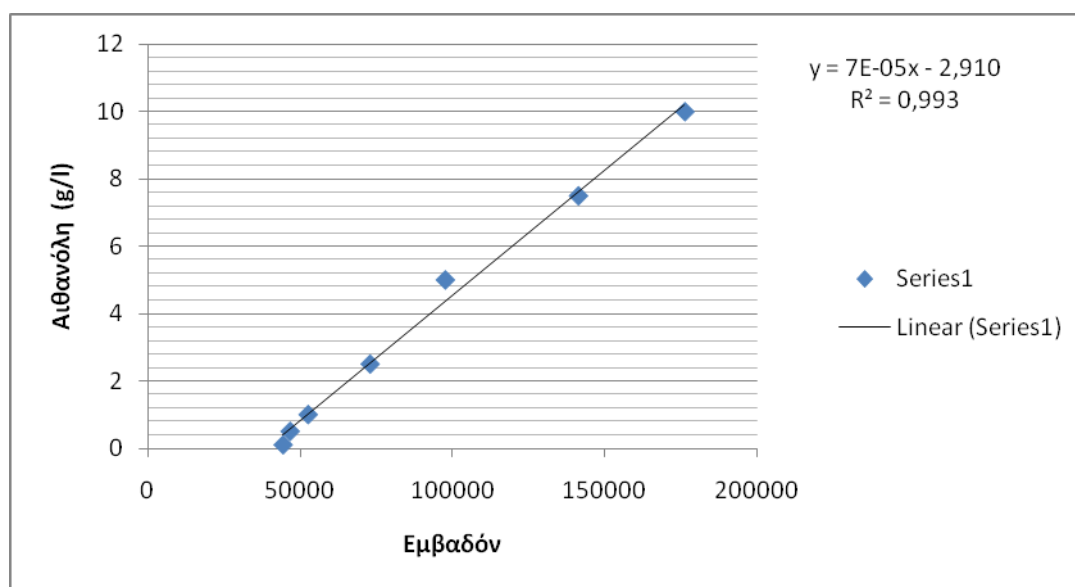
Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε λήψη 1.5 ml δειγματος από την κάθε καλλιέργεια και από τα δοχεία ελέγχου (control) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά, τα δείγματα φιλτράρονταν με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και 1 ml δειγματος μεταφερόταν σε γυάλινα σωληνάκια των 5 ml. Σε 1 ml δειγματος προστέθηκαν 2 ml δεκανίου τα οποία στη συνέχεια αναδεύτηκαν στο vortex για 1' min. Με αυτή τη διαδικασία πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση της αιθανόλης, από την υδατική φάση, στον οργανικό διαλύτη αφού τα δυο υγρά δεν αναμιγνύονται. Τέλος, μεταφέρθηκαν 1,5 ml οργανικού διαλύτη σε vials ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της παραγόμενης αιθανόλης από τον *K. marxianus*.

Το N₂ (άζωτο) χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με συνολική ροή δειγματος 10 mL / min ενώ η ροή στη στήλη ήταν 1.47 mL / min. Η θερμοκρασία στη στήλη ρυθμίστηκε στους 70 °C για 2.5 min, μέχρις ότου το δεκάνιο να γίνει αέριο, ακολούθως η θερμοκρασία ανέβαινε σταδιακά 30 °C / min μέχρι να φτάσει τους 160 °C που θα παραμείνει για 0.5 min.

Για να διεξαχθεί ο προσδιορισμός αιθανόλης, χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης (γράφημα 2) της καλλιέργειας στο GC, χρησιμοποιώντας την πιο πάνω μέθοδο. Για την κατασκευή των καμπύλων αυτών, αρχικά έγινε ανάλυση των πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης αιθανόλης και στη συνέχεια των άγνωστων δειγμάτων.

Στο ακόλουθο γράφημα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και τα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών της αιθανόλης που λήφθηκαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των διαλυμάτων.

Γράφημα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης Αιθανόλης



Από τη γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας την excel, υπολογίστηκε το $R^2 = 0,9936$ ενώ η εξίσωση που αντιπροσωπεύει την καμπύλη είναι η $y = 7E-05x - 2,9105$. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι γραμμική αφού το R^2 πλησιάζει τη μονάδα.

Εξετάζοντας την καμπύλη, παρατηρούμε ότι ένα σημείο αποκλίνει ελάχιστα από τη γραμμικότητα των υπόλοιπων σημείων. Η απόκλιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα που προήλθαν κατά τις αραιώσεις κατασκευής των πρότυπων διαλυμάτων αιθανόλης.

2.2.6 Μέτρηση Ξηρής Βιομάζας

Η μέτρηση ξηρής βιομάζας προσδιορίζει τη βιομάζα που εμπεριέχεται σε ένα δείγμα νερού και υπολογίζεται με εξάτμιση γνωστού όγκου δείγματος νερού σε φούρνο στους 105 °C (εικόνα 1.5.). Το υπόλειμμα εξάτμισης των 105 °C αποτελείται από ξηρή βιομάζα (ανόργανες ή οργανικές) σε διαλυμένη ή κολλοειδή μορφή.

Εικόνα 5: Φούρνος



Ακολουθως, μια κάψα εξάτμισης ζυγίζεται με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό. Ένας γνωστός όγκος δείγματος τοποθετείται στην προζυγισμένη κάψα η οποία τοποθετείται στους 105 °C μέχρι να εξατμισθεί πλήρως το νερό. Στη συνέχεια η κάψα μεταφέρεται σε ξηραντήριο μέχρι να κρυώσει και επαναζυγίζεται με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό. Για τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας, ισχύει ο τύπος:

$$DCW \left(\frac{m.g}{L} \right) = \frac{(A - B) m.g * 1000 \frac{ml}{L}}{C ml}$$

Όπου:

DCW (Dry Cell Weight): Ξηρή Βιομάζα

A: μάζα του φίλτρου μετά την ξήρανση (βάρος ξηρού υπολείμματος + βάρος του φίλτρου μετά τη πλήρη εξάτμιση του νερού στους 105 °C)

B: βάρος φίλτρου

C: όγκος δείγματος (ml)

2.2.6.1. Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας του μύκητα *K. marxianus*

Για την εφαρμογή της διαδικασίας μέτρησης ξηρής βιομάζας και τη κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (γράφημα 3), χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια του *K. marxianus* η οποία επώαστηκε στους 30 ° C με ανάδευση 100 rpm. Η καλλιέργεια έγινε σε μπουκάλι των 600 ml μέσα στην οποία έγινε η προσθήκη 150 ml βιομέσου. Όταν παρατηρήθηκε η θόλωση του βιομέσου λόγω της μικροβιακής ανάπτυξης του *K. marxianus*, ακολούθησε η αραίωση της καλλιέργειας σε τέσσερα διαφορετικά δοχεία, ώστε να επιτευχθούν διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων. Το πρώτο δοχείο περιείχε 40 ml καθαρή βιομάζα. Στα υπόλοιπα τρία έγιναν αραιώσεις με απιονισμένο νερό.

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια δεκαέξι μεταλλικά πιατάκια και χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα για κάθε μια από τις διαφορετικές αραιώσεις βιομάζας. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου. Για να επιτευχθεί αυτό, κάθε αραίωση μεταφερόταν σε centrifuge tube των 50ml και μετέπειτα σε φυγόκεντρο SIGMA 4-16K (εικόνα 1.6.), για 10' min στα 5000 rpm ούτως ώστε να διαχωριστεί η βιομάζα από το βιομέσο. Αφού πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντριση απορρίφθηκε το βιομέσο και έγινε προσθήκη 40 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια επαναλήφθηκε η φυγοκέντριση 2 φορές για 10' min στα 5000 rpm με απιονισμένο νερό.

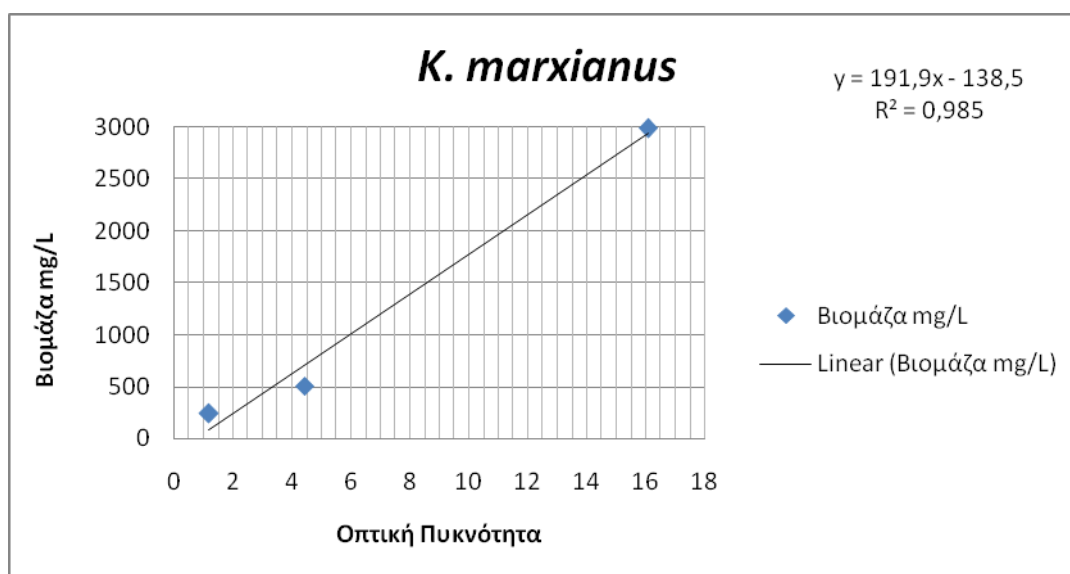
Εικόνα 6: Φυγόκεντρος



Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 600 nm. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση ξηρής βιομάζας με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης.

Κάθε μια από τις τέσσερις αραιώσεις μεταφερόταν στα προζυγισμένα μεταλλικά πιατάκια. Κάθε πιατάκι περιείχε 9 ml δείγματος και τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 105 °C έτσι ώστε να εξατμιστεί η υγρασία και να παραμείνει μόνο η ξηρή βιομάζα. Μετά από την πλήρη ξήρανση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η ζύγιση τους σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εκτιμηθεί το βάρος της ξηρής βιομάζας στο κάθε ένα από αυτά και κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης ξηρής βιομάζας, όπως φαίνεται πιο κάτω:

Γράφημα 3: Καμπύλη Βαθμονόμησης Ξηρής Βιομάζας του *K. marxianus*



Από τη γραφική παράσταση χρησιμοποιώντας την excel, υπολογίστηκε το $R^2 = 0,9855$ ενώ η εξίσωση που αντιπροσωπεύει την καμπύλη είναι η $y = 191,93x - 138,52$. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι γραμμική αφού το R^2 πλησιάζει τη μονάδα.

Εξετάζοντας την καμπύλη, παρατηρούμε ότι ένα σημείο αποκλίνει ελάχιστα από τη γραμμικότητα των υπόλοιπων σημείων. Η απόκλιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα

που προήλθαν κατά τις αραιώσεις της καλλιέργειας για τη κατασκευή των πρότυπων διαλυμάτων.

2.3 Πείραμα 1

Διερεύνηση της ανάπτυξης του μύκητα *Kluyveromyces marxianus* σε τυρόγαλο κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες και συνθήκες ανάδευσης για την παραγωγή αιθανόλης.

2.3.1 Υλικά - Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό βιομέσο λακτόζης του οποίου το pH ρυθμίστηκε στην τιμή $6 \pm 0,1$ με την προσθήκη NaHCO_3 2M.

Πίνακας 1: Σύσταση θρεπτικού βιομέσου

A/A	Συγκέντρωση (gr/l)	Συστατικά
1	5	Yeast Extract
2	1	K_2HPO_4
3	1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
4	5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5	55	Lactose

Η παρασκευή του βιομέσου (πίνακας 1), ήταν η εξής: αρχικά με τη βοήθεια του αναλυτικού ζυγού, πραγματοποιήθηκε με ακρίβεια η ζύγιση της βάσης του θρεπτικού ζωμού, η οποία μετέπειτα τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοχείο με την προσθήκη 1 L αποσταγμένου νερού. Τα συστατικά του βιομέσου αναμείχθηκαν με τη βοήθεια μαγνήτη (styrex) σε stirring plate, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αποστείρωση του στους 120°C . Πριν από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας, το pH του βιομέσου ρυθμίστηκε με την προσθήκη NaHCO_3 2M. Το βιομέσο συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C (Kopsahelis N. *et al.*, 2007)

2.3.2 Συνθήκες Εμβολιασμού

Απαραίτητη προϋπόθεση για αρκετές ζυμώσεις είναι η λήψη μέτρων προστασίας του κάθε ερευνητή, αλλά και η προστασία του μικροοργανισμού που μελετάται από τυχόν μολύνσεις. Για το σκοπό αυτό ο εμβολιασμός των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), ο οποίος ήταν απομονωμένος από την ατμόσφαιρα ώστε να αποφεύγονται οι μολύνσεις.

Ένας εναλλακτικός τρόπος ασφαλούς εμβολιασμού της καλλιέργειας, είναι η χρήση του λύχνου, ο οποίος μπορεί να διατηρεί ασηπτικές συνθήκες, αφού η φλόγα βοηθά την παραγωγή ξηρής θερμότητας, ενώ παράλληλα προφυλάσσονται αποστειρωμένα όλα τα εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν, δημιουργώντας έτσι ένα αποστειρωμένο περιβάλλον. Πριν από κάθε εμβολιασμό, απολυμαίνονται όλες οι επιφάνειες με αραιωμένη αιθανόλη (70% αιθανόλη, 30% H₂O).

2.3.3. Καλλιέργειες του *Kluyveromyces marxianus*

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης επώασης του *K. marxianus*, χρησιμοποιήθηκε βιομέσο λακτόζης σύμφωνα με τη περιγραφή της παραγράφου 2.3.1. Πραγματοποιήθηκαν 6 (έξι) καλλιέργειες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε δοχείο ελέγχου (control) το οποίο εμπεριείχε 100 ml υγρού βιομέσου προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία ή αποτυχία της διαδικασίας εμβολιασμού της καλλιέργειας.

Για τις αερόβιες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν 20ml βιομέσου σε γυάλινα serum bottles. Ο εμβολιασμός του *K. marxianus* πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία (εικόνα 1.7.), σε διάφορες θερμοκρασίες και ρυθμούς ανάδευσης έως ότου ολοκληρωθεί η επώαση.

Εικόνα 7: Επωαστήρας κλίβανος (incubator)



Η παρακολούθηση του πειράματος ολοκληρώθηκε όταν σταμάτησε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Πίνακας 2: Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *K. marxianus*

α/α	Θερμοκρασία σε ° C	Ανάδευση σε rpm	Συνθήκη
1	30	100	Αερόβια
2	30	50	Αερόβια
3	30	0	Αερόβια
4	30	150	Αερόβια
5	30	0	Αναερόβια
6	33	0	Αναερόβια

2.3.4. Μετρήσεις

Στον πίνακα 2., αναφέρονται οι διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μύκητα *K. marxianus*. Για κάθε μια από τις έξι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν οι εξής μετρήσεις:

1. pH: Πριν από την κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του οργάνου με δύο πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα (pH 4 και pH 7). Στη συνέχεια κάθε δοχείο υγρής

καλλιέργειας, ανοιγόταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες με τη χρήση της φλόγας. Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στην υγρή καλλιέργεια και το pH ρυθμίστηκε στο $6 \pm 0,1$, με την προσθήκη NaHCO_3 2M.

2. Οπτική πυκνότητα: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3.

3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αέρια χρωματογραφία (GC): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4.

4. Μέτρηση ξηρής βιομάζας: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

2.4 Πείραμα 2

Διερεύνηση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Lactobacillus delbrueckii* σε τυρόγαλο κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες για την παραγωγή αιθανόλης.

2.4.1 Υλικά - Μεθόδοι

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό βιομέσο λακτόζης του οποίου το pH ρυθμίστηκε στην τιμή $6 \pm 0,1$ με την προσθήκη NaHCO_3 2M.

2.4.2 Συνθήκες εμβολιασμού και καλλιέργειες του *Lactobacillus delbrueckii*

Ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία όπως αυτή που περιγράφεται παραπάνω για την καλλιέργεια του μύκητα *K. marxianus*. Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης επώασης του αναερόβιου *L. delbrueckii*, χρησιμοποιήθηκε βιομέσο λακτόζης όπως ακριβώς περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν πέντε καλλιέργειες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (πίνακας 3). Για την κάθε παρασκευάστηκε ένα δοχείο ελέγχου (control) με την προσθήκη 100 ml υγρού βιομέσου σε Serum bottle προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της διαδικασίας αποστείρωσης.

Για την αναερόβια καλλιέργεια του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν 100 ml βιομέσου σε γυάλινα δοχεία (serum bottles). Ο εμβολιασμός του *Lactobacillus delbrueckii* πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε διαβίβαση αέριου άζωτου

στην καλλιέργεια, ούτως ώστε να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο από το υγρό. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστήρα κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία (incubator), σε διάφορες θερμοκρασίες και χωρίς ανάδευση έως ότου ολοκληρωθεί η επώαση. Για την κατανόηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκε συνεχής παρακολούθηση του πειράματος, με συνεχή λήψη μετρήσεων από την έναρξη του, μέχρι την ολοκλήρωση της επώασης. Η παρακολούθηση του πειράματος ολοκληρώθηκε όταν η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σταμάτησε.

Πίνακας 3: Συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου *L. delbrueckii*

α/α	Θερμοκρασία σε ° C	Συνθήκη
1	33	Αναερόβια
2	30	Αναερόβια
3	35	Αναερόβια
4	30	Αναερόβια
5	33	Αναερόβια

2.4.3. Μετρήσεις

Στον πίνακα 3, φαίνονται οι διάφορες συνθήκες που αναπτύχθηκε το αναερόβιο βακτήριο *L. delbrueckii*. Για κάθε μια από τις πέντε καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν οι εξής μετρήσεις:

1. pH: Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.4.
2. Οπτική πυκνότητα: όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3.
3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αέρια χρωματογραφία (GC): όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

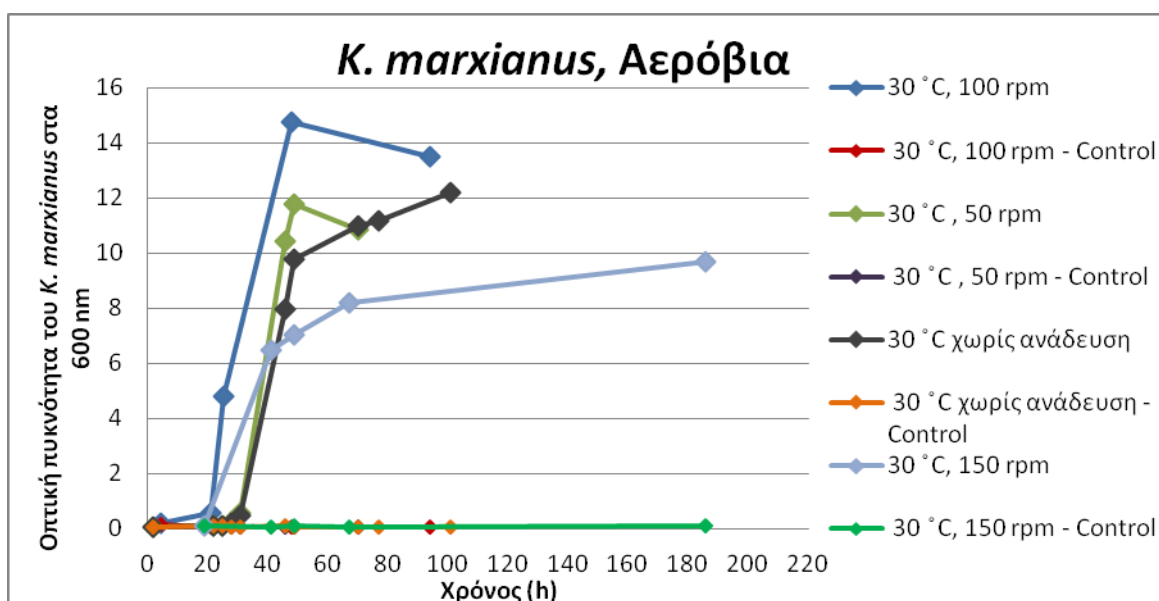
3.1. Σκοπός των πειραμάτων

Έχοντας πλέον αναπτύξει τις κατάλληλες πειραματικές διατάξεις και τις διάφορες μεθόδους για τη μελέτη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών *L. delbrueckii* και *K. marxianus*, σκοπός της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων, ήταν να μελετηθεί η κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την αποδόμηση της λακτόζης ως τη μόνη πηγή άνθρακα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, στα οποία μελετήθηκε η ικανότητα και ο απαιτούμενος χρόνος ανάπτυξης τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ανάδευσης.

3.2 Ζυμώσεις του μύκητα *Kluyveromyces marxianus* σε λακτόζη

Ο μύκητας *K. marxianus*, αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα λακτόζης σε διάφορες θερμοκρασίες κάτω από αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή δειγμάτων από την καλλιέργεια τα οποία μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο. Όταν παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Γράφημα 4: Καλλιέργεια του μύκητα *K. marxianus* στους 30 °C αερόβια



Στο πιο πάνω γράφημα (γράφημα 4), παρουσιάζονται οι οπτικές πυκνότητες επώασης του μύκητα *K. marxianus* στους 30 °C στα 600 nm. Παρατηρώντας τις καλλιέργειες με ανάδευση 50 rpm και χωρίς ανάδευση, παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη του *K. marxianus* στα πειράματα αυτά καθυστερεί αφού ξεκινά περίπου στις 30 ώρες. Αντίθετα οι άλλες δυο καλλιέργειες των 100 rpm και 150 rpm ξεκινούν πιο γρήγορα στις 20 ώρες.

Παρατηρώντας το μέγιστο της οπτικής πυκνότητας ανάμεσα στα γραφήματα παρατηρούμε ότι η συνθήκη των 100 rpm ξεπερνά τις υπόλοιπες συνθήκες με μέγιστη τιμή το 14,757. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι το γεγονός ότι ο μικρότερος ρυθμός ανάδευσης να επηρεάζει τη μεταφορά οξυγόνου μειώνοντας έτσι το ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Επομένως η μεγαλύτερη ανάδευση μπορεί να διευκολύνει τη παροχή οξυγόνου στην καλλιέργεια. Επίσης η ταχύτερη ανάδευση μπορεί να προσδίδει μεγαλύτερη κινητική ενέργεια στα σωματίδια που εμπεριέχονται στην καλλιέργεια αυξάνοντας την ταχύτητα των αντιδράσεων που συμβαίνουν.

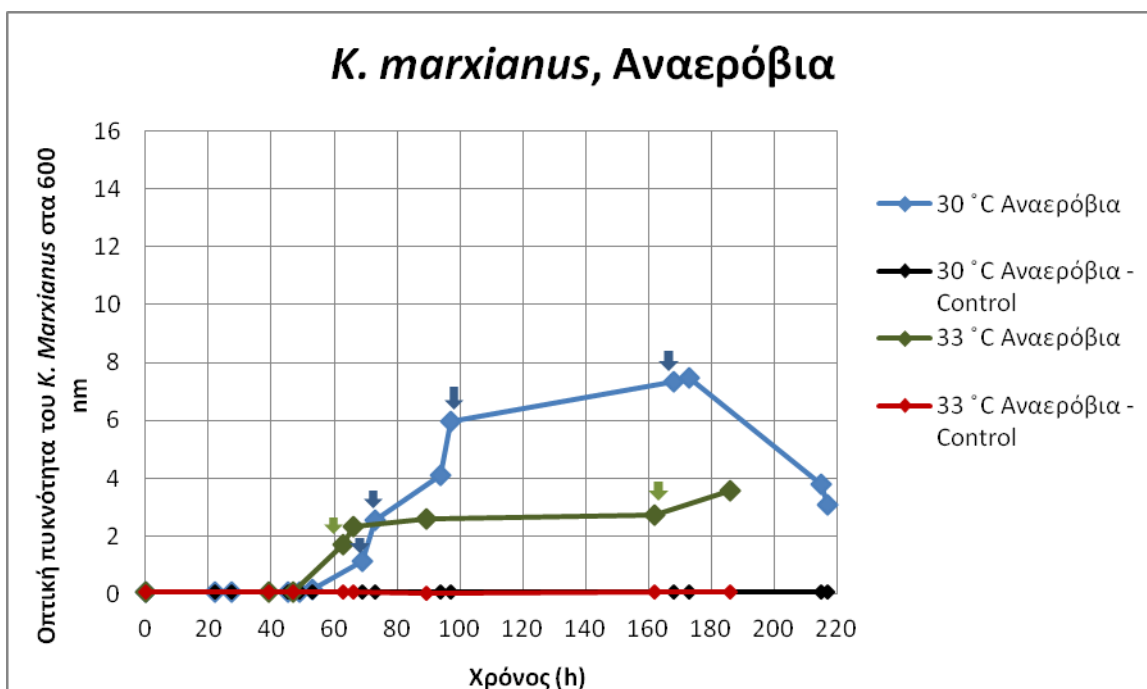
Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων δε μετρήθηκε το pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ωστόσο ενδεχομένως μία πιθανή μείωση του pH να επηρέασε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης να είναι μικρότερος στα γραφήματα των 50 rpm και 150 rpm. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου επηρεάζει το pH κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και κατά συνέπεια τον μεταβολισμό και το ρυθμό ανάπτυξης τους (Haq, et.al. 2005).

Για όλα τα γραφήματα ισχύει ότι για το διάστημα των 19 πρώτων ωρών, έχουμε μηδενική ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ο οποίος βρίσκεται στη φάση καθυστέρησης και προετοιμάζεται να ενεργοποιηθεί και να καταναλώσει το υπόστρωμα. Στη συνέχεια παρουσιάζεται μια έντονη ανάπτυξη της βιομάζας (εκθετική ανάπτυξη του μικροοργανισμού), η οποία συνεχίζεται έως ότου ολοκληρωθεί η φάση ανάπτυξης. Τέλος, για το διάστημα των επόμενων ωρών, παρουσιάζεται η στάσιμη φάση. Πιθανοί λόγοι διακοπής της ανάπτυξης μπορεί να είναι η εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού, η συσσώρευση κάποιου τοξικού προϊόντος ή ακόμα η μείωση του pH σε όξινες τιμές, τέτοιες που να διακόπτεται η όλη διεργασία.

Οι άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης για τους περισσότερους μύκητες κυμαίνονται μεταξύ των 25 °C και 30 °C. Όσον αφορά το pH, οι περισσότεροι μύκητες ευνοούνται από ελαφρά όξινες τιμές αλλά γενικά προτιμούν επίπεδα τιμών 4-7. Εξετάζοντας τις γραφικές 1-4, διαπιστώνουμε ότι οι βέλτιστες αερόβιες συνθήκες στις οποίες ο μύκητας *K. marxianus* φαίνεται να αποδίδει καλύτερα είναι με ανάδευση 100 rpm.

Ακολούθως (γράφημα 5), πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια του μύκητα κάτω από αναερόβιες συνθήκες χωρίς ανάδευση και σε θερμοκρασία 30 °C και 33 °C. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν χωρίς ανάδευση.

Γράφημα 5: Καλλιέργεια του μύκητα *K. marxianus* στους 30 °C και 33 °C αναερόβια



Το γράφημα 5 περιλαμβάνει τη ζύμωση του *K. marxianus* αναερόβια. Τα βέλη στο γράφημα συμβολίζουν την μέτρηση του pH και την ρύθμιση του στο $6 \pm 0,1$. Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, το pH ρυθμιζόταν καθημερινώς με την προσθήκη NaHCO_3 2M στην υγρή καλλιέργεια αφού ήταν γνωστό ότι μία πιθανή μείωση του pH να επηρέαζε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Στο γράφημα των 33 ° C παρατηρούμε ότι στις 66 ώρες η οπτική πυκνότητα βρισκόταν στο 2,34. Μετά από 96 ώρες η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε ελάχιστα αφού στις 162 ώρες έφτασε το 2,74. Σε αυτό το σημείο, το pH ήταν ίσο με 3,59 και τότε ρυθμίστηκε στο 6 και πάρθηκε ακόμα μια μέτρηση. Μετά από 24 ώρες η οπτική πυκνότητα έφτασε στο 3,59 στις 185 ώρες. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μικρή αύξηση της οπτικής πυκνότητας σε διάστημα 24 ωρών, πιθανών να οφείλεται στην ρύθμιση του pH. Γενικά όμως οι πιο πάνω τιμές δεν βοηθούν να συμπεράνουμε με ακρίβεια αν το pH όντως βοηθά στην περαιτέρω ανάπτυξη του *K. marxianus*.

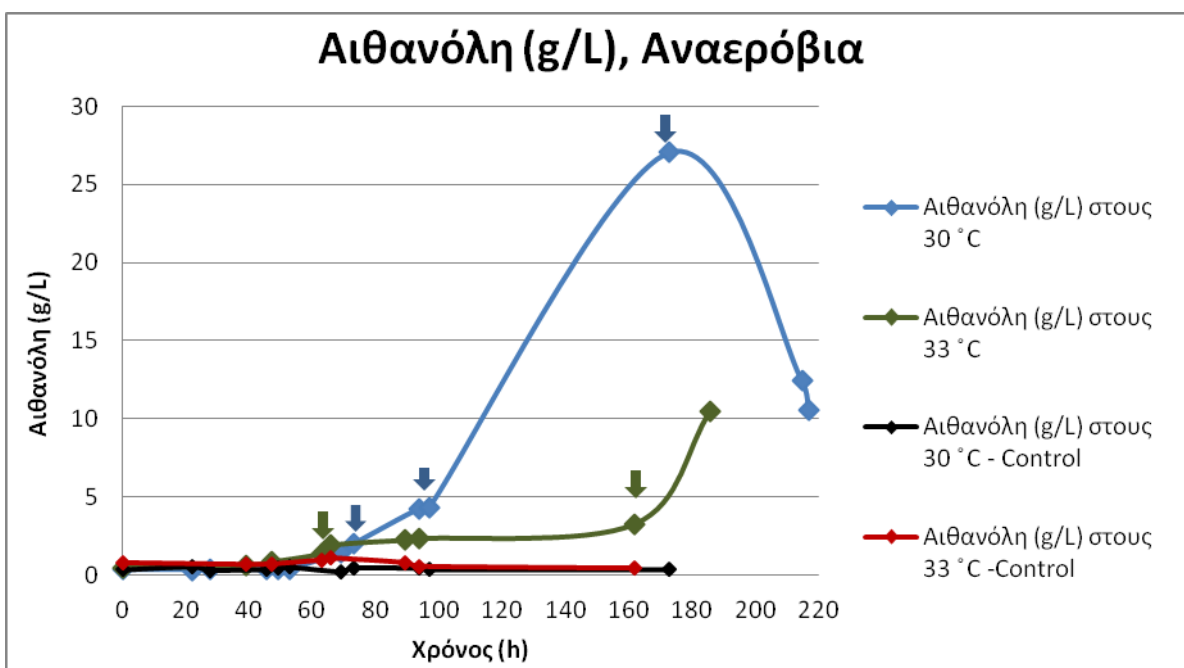
Εξετάζοντας το γράφημα 5 παρατηρούμε ότι στην καλλιέργεια των 30 ° C η ανάπτυξη του *K. marxianus* καθυστερεί αφού ξεκινά περίπου στις 55 ώρες. Αντίθετα η καλλιέργεια των 30 ° C ξεκινά πιο γρήγορα στις 47 ώρες. Διαπιστώνουμε ότι οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες ο μύκητας *K. marxianus* να αποδίδει καλύτερα σε αναερόβιες συνθήκες είναι στους 30 ° C, επαληθεύοντας έτσι τις βέλτιστες συνθήκες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Στην συνέχεια γίνεται ένας έλεγχος μέγιστης παραγωγής αιθανόλης από τον *K. marxianus*, κάτω από αναερόβιες συνθήκες με διατηρούμενο pH ίσο με 6.

3.2.1. Προσδιορισμός αιθανόλης με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC)

Το στέλεχος *K. marxianus* διαθέτει κατάλληλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά για να επιτευχθεί η αξιοποίηση της λακτόζης προς αιθανόλη από το τυρόγαλο. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, ο *K. marxianus* έχει την ικανότητα βιομετατροπής του τυρόγαλου σε αιθανόλη. Το κύριο χαρακτηριστικό της αιθανόλης είναι η δυνατότητα εφαρμογής της στη χημική βιομηχανία, στη φαρμακευτική βιομηχανία και στη βιομηχανία τροφίμων με τη μορφή πρώτων υλών, διαλύτη και καυσίμου (Salman Zafar *et.al.* 2006). Κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί αρκετές έρευνες σχετικά με τη δυνατότητα διάφορων οργανισμών στην παραγωγή αιθανόλης από τυρόγαλο. Ο μύκητας *Kluyveromyces fragilis* είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιημένος στη βιομηχανία αφού σε αντιδραστήρες ζύμωσης αξιοποιεί πάνω από το 95 % της λακτόζης του τυρογάλακτος (Mawson, 1994).

Στο πιο κάτω γράφημα (γράφημα 6), παρουσιάζεται η αύξηση της αιθανόλης (g/L) στις αναερόβιες καλλιέργειες των 30 °C και 33 °C, όπως και η μηδενική παραγωγή αιθανόλης στα control.

Γράφημα 6: Συγκεντρώσεις αιθανόλης σε (g/L) κατά τη ζύμωση του *K. marxianus* Αναερόβια



Για τη κατασκευή της γραφικής παράστασης χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης που μετατρέπει το εμβαδόν της κάθε κορυφής που μετρήθηκε από την αέρια χρωματογραφία σε συγκέντρωση αιθανόλης. Εξετάζοντας το γράφημα 6, διακρίνουμε το κατώτατο όριο παραγωγής αιθανόλης να βρίσκεται στο 0,48 g/L στις μηδέν ώρες σε αναερόβιες συνθήκες στους 33 °C, ενώ το ανώτατο όριο φτάνει το 10,44 g/L στις 186 ώρες. Η συγκέντρωση βιομάζας στο γράφημα 5, παράγραφος 3.2., όπως μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, έχει κατώτατο όριο στις μηδέν ώρες και ανώτατο περίπου στις 186 ώρες. Αυτό θα πει ότι όσο πιο μεγάλη είναι η μικροβιακή ανάπτυξη, τόσο μεγάλη θα είναι και η παραγωγή προϊόντος.

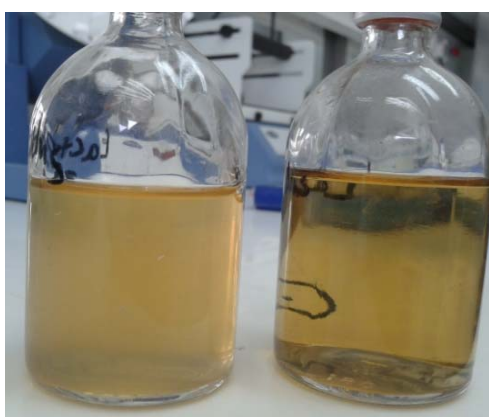
Αντίστοιχα, το γράφημα που αντιπροσωπεύει την καλλιέργεια του *K. marxianus* σε αναερόβιες στους 30 °C, περιέχει ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης που φτάνει τα 27 g/L στις 173 ώρες (γράφημα 6). Το παραγόμενο αυτό ποσό της αιθανόλης είναι 2,5 φορές

μεγαλύτερο από αυτό που παράχθηκε στους 33 °C σε αναερόβιες συνθήκες. Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας όπως φαίνεται στο γράφημα 5 στις 173 ώρες, στους 30 °C, ήταν επίσης 2,5 φορές μεγαλύτερη από το μέγιστο απορρόφησης που πάρθηκε στους 33 °C. Έτσι τα αποτελέσματα του γραφήματος 6 της παραγωγής αιθανόλης σε g/L αναερόβια, σχετίζονται με τη συγκέντρωση της βιομάζας όπως αυτή φαίνεται στο γράφημα 5, για το κάθε πείραμα. Ο έλεγχος και η ρύθμιση του pH στους 33 °C στις 162 ώρες (pH = 3,59), ήταν αποτελεσματική καθώς βελτίωσε την ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε από τα 3,26 g/L, σε μια τιμή τρεις φορές μεγαλύτερη που φτάνει τα 10,44 g/L.

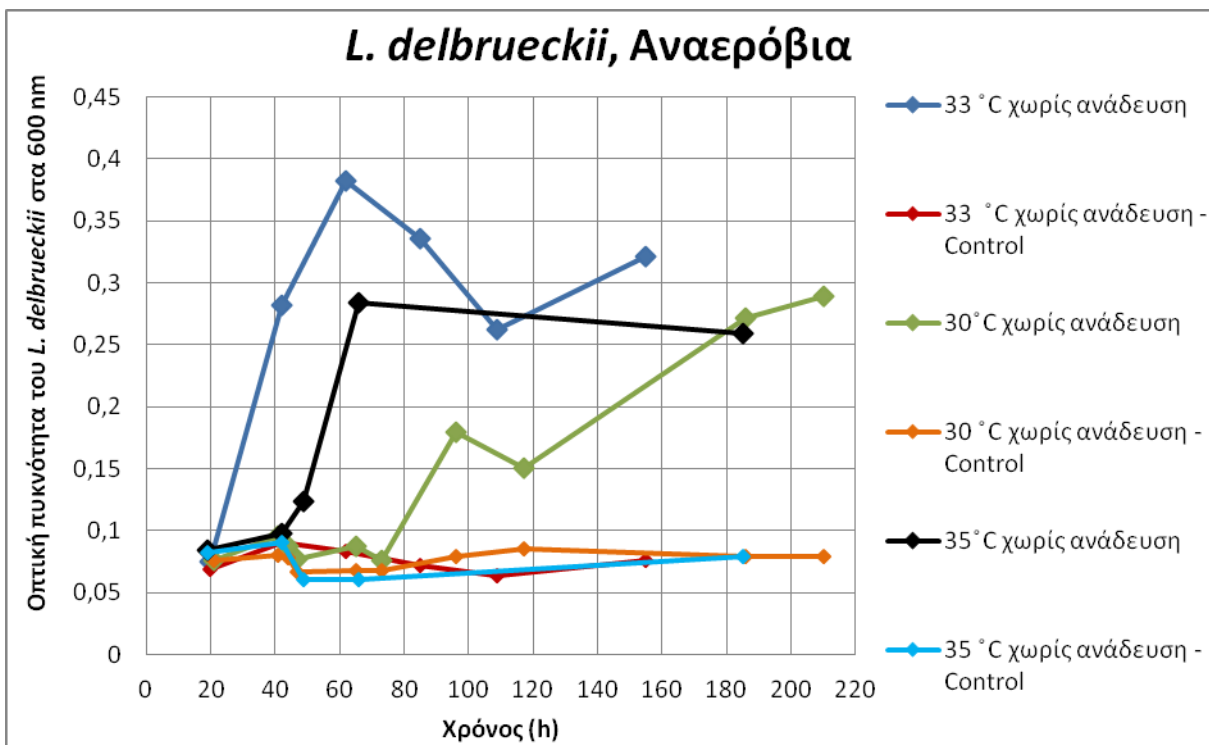
3.3 Ζυμώσεις του μύκητα *Lactobacillus delbrueckii* σε λακτόζη

Στην εικόνα 2, παρουσιάζεται σημαντικά η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. delbrueckii*, από την επώαση σε λακτόζη. Μέσα σε περίοδο περίπου 40 h, παρουσιαζόταν θόλωση του βιομέσου (δοχείο αριστερά) λόγω της συσσώρευση βιομάζας. Δεξιά, φαίνεται το δοχείο μέσα στο οποίο δεν υπάρχει καθόλου μικροοργανισμός παρά μόνο καθαρό βιομέσο και αποτελεί το δοχείο ελέγχου. Σε περίπτωση που το δοχείο ελέγχου (control), θόλωνε τότε διαπιστωνόταν μόλυνση και το πείραμα έπρεπε να επαναληφθεί.

Εικόνα 8: Καλλιέργεια του *Lactobacillus delbrueckii* σε βιομέσο αριστερά και δοχείο ελέγχου δεξιά



Γράφημα 7: Καλλιέργεια του *Lactobacillus delbrueckii* αναερόβια



Στα παραπάνω γράφημα, παρουσιάζονται οι οπτικές πυκνότητες που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο από τη ζύμωση του βακτηρίου *L. delbrueckii* στους 30 °C, 33 °C και 35 °C χωρίς ανάδευση. Παρατηρώντας το γράφημα 7, παρατηρείται ότι η φάση καθυστέρησης στους 30 °C είναι μικρότερη από τα άλλα δύο πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

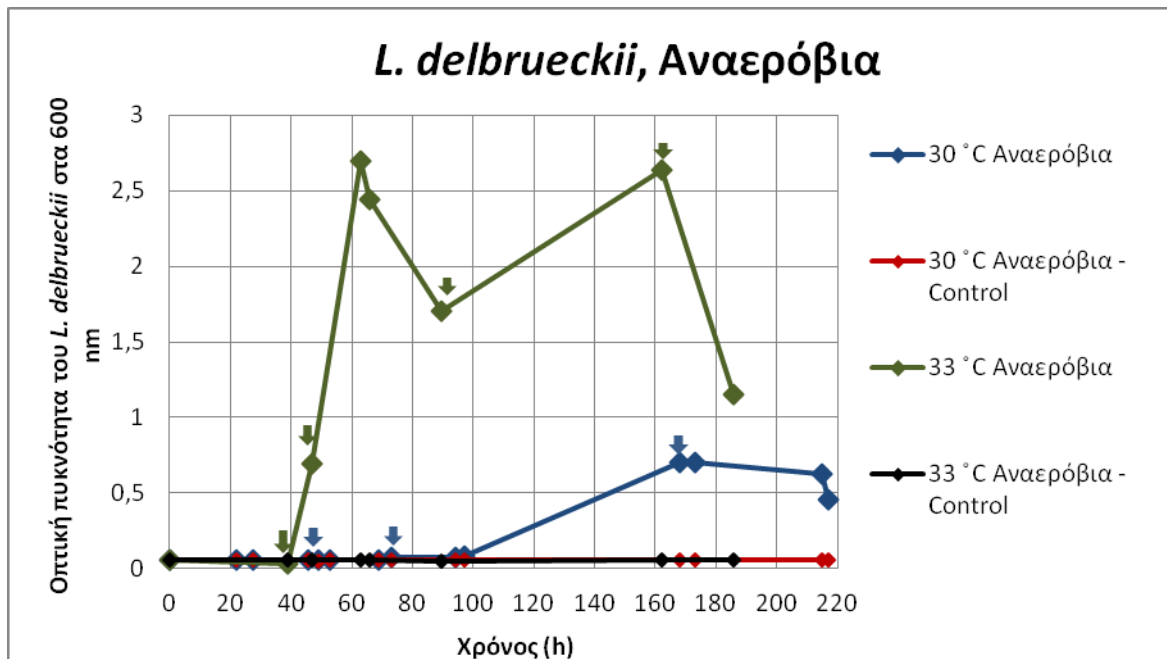
Αξιολογώντας τις μέγιστες τιμές των απορροφήσεων που συλλέχτηκαν στο γράφημα 7, γίνονται σαφές οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες το βακτηριακό στέλεχος *L. delbrueckii* αναπτύσσεται καλύτερα, είναι στους 33 °C. Η μέγιστη τιμή απορρόφησης σε αυτές τις συνθήκες, ισούται με 0,382 στις 62 ώρες ενώ η βακτηριακή ανάπτυξη ξεκινά στις 20 ώρες. Αντίθετα στους 30 °C η ανάπτυξη παρουσιάζει καθυστέρηση καθώς πέρασαν σχεδόν 80 ώρες προτού να ξεκινήσει η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό και η μέγιστη τιμή απορρόφησης σε αυτές τις συνθήκες, ισούται με 0,289 στις 210 ώρες. Παρατηρούμε επομένως ότι μια μείωση της θερμοκρασίας κατά 3 °C, επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αφού ο ρυθμός ανάπτυξης του από τους 33 °C στους 30 °C μειώνεται.

Όπως φαίνεται στο γράφημα των 35 ° C, η τελευταία μέτρηση πάρθηκε στις 185 ώρες (h) και η προτελευταία στις 66 ώρες. Σε αυτό το διάστημα περιέχονται ακόμα 119 ώρες, μέσα στις οποίες δεν έγινε δειγματοληψία. Η μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας φτάνει στο 0,284 στις 66 ώρες. Η απώλεια μετρήσεων δεν αφήνει να κατανοηθεί στα σίγουρα αν ο πληθυσμός της βιομάζας σταματά στο 0,284 ή αν συνεχίζεται η μικροβιακή ανάπτυξη στο διάστημα των επόμενων 119 ωρών. Σε αυτή τη περίπτωση οι συνθήκες, εκείνες στις οποίες ο *L. delbrueckii* αναπτύσσεται γρηγορότερα, είναι στους 33 ° C χωρίς την ύπαρξη οξυγόνου. Καλύτερο συμπέρασμα όσο αφορά τις βέλτιστες συνθήκες του μικροοργανισμού, θα αποδοθεί με την σύγκριση των γραφημάτων των οπτικών πυκνοτήτων, μεταξύ των γραφημάτων της παραγωγής γαλακτικού οξέος (g/L), για τις καλλιέργειες που μελετήθηκαν.

Σε όλες τις καλλιέργειες, όπως φαίνονται στο γράφημα 7, η απουσία οξυγόνου επιτεύχθηκε με την διαβίβαση αέριου αζώτου στο υγρό βιομέσο, ενώ η επώασή τους έγινε σε ειδικό θάλαμο (incubator) χωρίς ανάδευση. Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων δε μετρήθηκε το pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ωστόσο ενδέχεται μία πιθανή μείωση του pH να επηρέασε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τον *L. delbrueckii* να μην αντιπροσωπεύεται στα πιο πάνω γραφήματα.

Ακολούθως (γράφημα 8), πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *L. delbrueckii* κάτω από αναερόβιες συνθήκες, χωρίς ανάδευση και σε θερμοκρασία 30 °C και 33 °C. Τα βέλη στο γράφημα 8, συμβολίζουν τη μέτρηση του pH και τη ρύθμιση του στο $6 \pm 0,1$. Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, το pH ρυθμιζόταν καθημερινώς με την προσθήκη NaHCO_3 2M στην υγρή καλλιέργεια αφού ήταν γνωστό ότι μία πιθανή μείωση του pH να επηρέαζε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Γράφημα 8: Καλλιέργεια του βακτηρίου *L. delbrueckii* στους 30 °C και 33 °C αναερόβια



Όπως είναι γνωστό, ένα από τα παραγόμενα προϊόντα που προκύπτει με την ζύμωση του βακτηρίου *L. delbrueckii*, είναι το γαλακτικό οξύ το οποίο μπορεί εύκολα να ρίξει το pH της καλλιέργειας και να καταστήσει τις συνθήκες ακατάλληλες για ζύμωση. Εξετάζοντας το γράφημα των 33 °C διαπιστώνουμε ότι όντως το pH επηρεάζει τη συμπεριφορά του μικροοργανισμού, αφού η τιμή του που πάρθηκε στις 89,5 ώρες ήταν ίση με 3.90, ενώ η οπτική πυκνότητα ίση με 1,7. Τότε το pH ρυθμίστηκε στο $6 \pm 0,1$, με την προσθήκη NaHCO_3 2M στην καλλιέργεια και ακολούθησε η επόμενη μέτρηση απορρόφησης που λήφθηκε στις 162 ώρες. Η ζύμωση απενεργοποιήθηκε λόγω δημιουργίας όξινου περιβάλλοντος στην καλλιέργεια και με την αύξηση του pH η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε ξανά στο 2,64 στις 162 ώρες.

Όσο αφορά το γράφημα των 30 °C, η αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων ξεκίνησε στις 97 ώρες με μια καθυστέρηση ίση με 57 ώρες περίπου σε σύγκριση με το γράφημα των 33 °C στο οποίο η αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων ξεκίνησε στις 40 ώρες. Παρατηρούμε επομένως ότι μια μείωση της θερμοκρασίας κατά 3 °C, επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αφού ο ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας μειώνεται τους 30 °C.

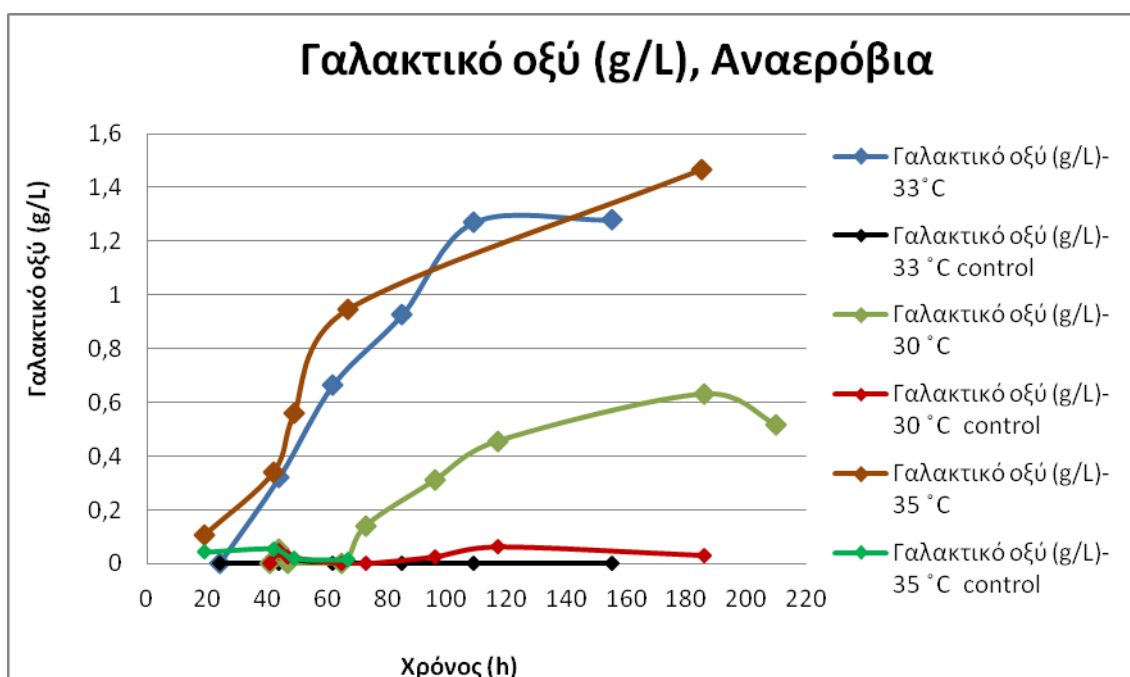
Σε αυτό το σημείο, διαπιστώνουμε ότι οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες το βακτήριο *L. delbrueckii* φαίνεται να αποδίδει καλύτερα, είναι σε θερμοκρασία 33 °C σε αναερόβιες συνθήκες.

3.3.1. Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC)

Για να διεξαχθεί ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος, γίνεται χρήση των καμπύλων βαθμονόμησης της καλλιέργειας του *L. delbrueckii*, παράγραφος 2.2.4., ούτως ώστε να κατασκευαστούν τα γραφήματα παραγωγής γαλακτικού οξέος σε g/L.

Στο γράφημα που ακολουθεί, (γράφημα 9), παρουσιάζεται η αύξηση της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στις αναερόβιες καλλιέργειες των 30 °C, 33 °C, και 35 °C, όπως και η μηδενική παραγωγή γαλακτικού οξέος στα control.

Γράφημα 9: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε (g/L) κατά τη ζύμωση του *L. delbrueckii* στους 30 °C, 33 °C, και 35 °C Αναερόβια



Για τη κατασκευή της γραφικής παράστασης χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης που μετατρέπει το εμβαδόν της κάθε κορυφής που μετρήθηκε από την υγρή χρωματογραφία σε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων δε μετρήθηκε το pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ωστόσο ενδεχομένως μία πιθανή μείωση του pH να επηρέασε τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

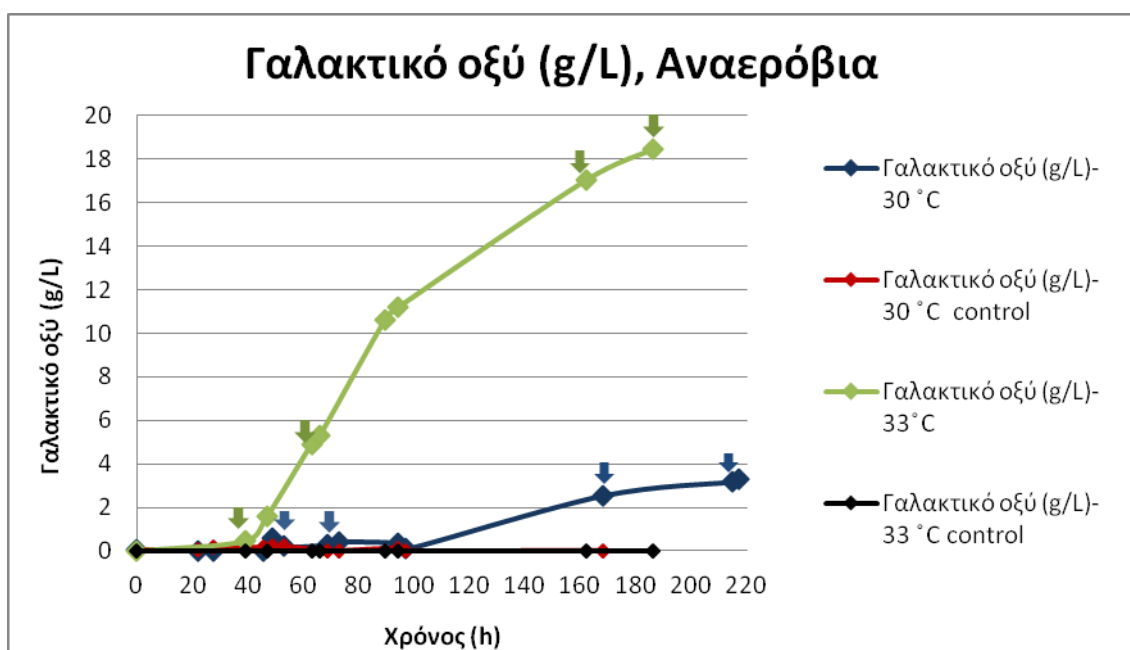
Εξετάζοντας το παραπάνω γράφημα, διακρίνουμε το κατώτατο όριο παραγωγής γαλακτικού οξέος να βρίσκεται στα 0,321 g/L σε αναερόβιες συνθήκες στους 33 °C, ενώ το ανώτατο όριο

φτάνει το 1,279 g/L στις 155 ώρες. Αντίθετα η μέγιστη ποσότητα γαλακτικού οξέος στο γράφημα των 30 °C, φτάνει τα 0,632 g/L, ενώ στο γράφημα των 35 °C, το παραγόμενο γαλακτικό οξύ ξεπερνά τις υπόλοιπες τιμές και φτάνει τα 1,467 g/L στις 185 ώρες.

Τα αποτελέσματα του γραφήματος 9 της παραγωγής γαλακτικού οξέος σε g/L αναερόβια, σχετίζονται με τη συγκέντρωση της βιομάζας όπως αυτή φαίνεται στο γράφημα 7, για το κάθε πείραμα. Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας για κάθε σημείο σε σύγκριση με το παραγόμενο γαλακτικό οξύ, έχουν παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης η τιμή του παραγόμενου γαλακτικού οξέος στους 33 °C δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή των 35 °C.

Στο γράφημα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέως για τις καλλιέργειες που εκτελέστηκαν σε θερμοκρασίες 30 °C και 33 °C αναερόβια στις οποίες γινόταν καθημερινή μέτρηση του pH και ρύθμιση του στο $6 \pm 0,1$, με την προσθήκη NaHCO_3 . Ο χρόνος (time), που φαίνεται στο γράφημα, είναι ο χρόνος δειγματοληψίας της καλλιέργειας.

Γράφημα 10: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε (g/L) κατά τη ζύμωση του *L. delbrueckii* στους 30 °C και 33 °C Αναερόβια



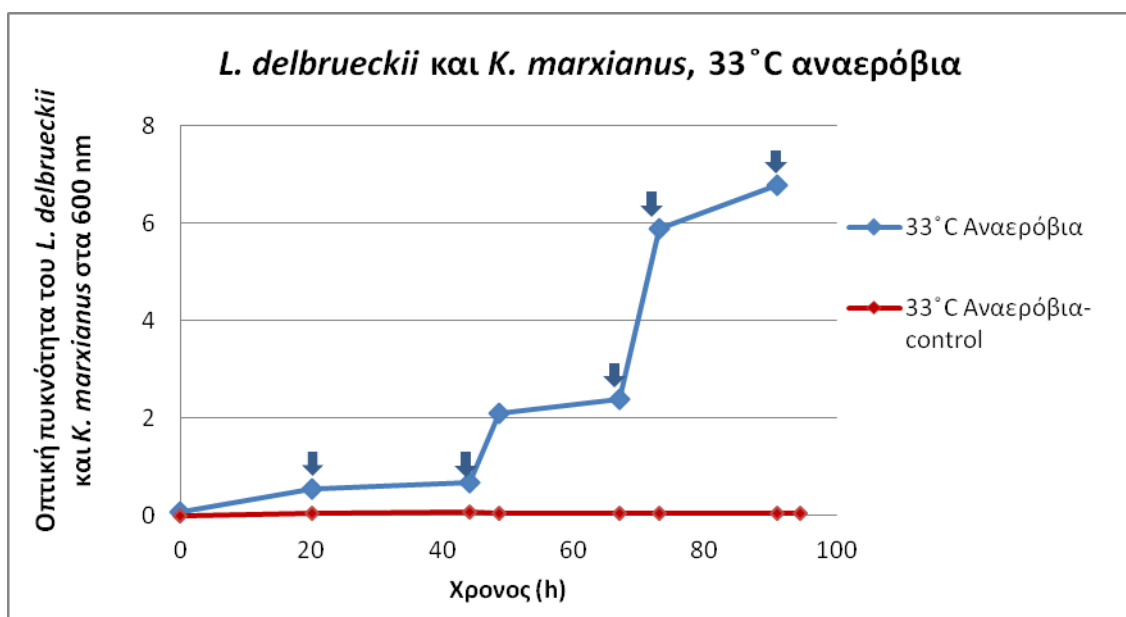
Εξετάζοντας το γράφημα 10, διακρίνουμε ότι το γαλακτικό οξύ έχει συγκέντρωση 3,301 g/L στις 215 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες στους 33 °C, ενώ η μέγιστη φτάνει το 18,46 g/L στις

186 ώρες στους 33 °C. Σχετίζοντας τα γραφήματα 8 και 10, διαπιστώνουμε ότι η συγκέντρωση βιομάζας στο γράφημα 8, όπως μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, έχει ανώτατο όριο περίπου στις 186 ώρες στους 33 °C. Αυτό θα πει ότι όσο πιο μεγάλη είναι η μικροβιακή ανάπτυξη, τόσο μεγάλη θα είναι και η παραγωγή προϊόντος.

Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, το pH ρυθμιζόταν στο 6 σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και διαπιστώθηκε ότι όντως το pH επηρεάζει τη συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Η μέτρηση του pH που πάρθηκε στις 89,5 ώρες στους 33 °C, τη στιγμή δηλαδή όπου το pH ήταν ίσο με 3.90, η καλλιέργεια ενεργοποιήθηκε καταναλώνοντας περισσότερο υπόστρωμα, ενώ η παραγωγή γαλακτικού οξέος έφτασε στο μέγιστο. Αξιολογώντας τις πιο πάνω θερμοκρασίες στο γράφημα 10, παρατηρούμε ότι η αύξηση θερμοκρασίας στους 33 °C κατά τη ζύμωση του βακτηρίου *L. delbrueckii*, αυξάνει την απόδοση παραγωγής του γαλακτικού οξέος και την κατανάλωση του υποστρώματος. Το ίδιο συμβαίνει και κατά τη ζύμωση του *K. marxianus*, αφού βελτιώθηκε η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή αιθανόλης.

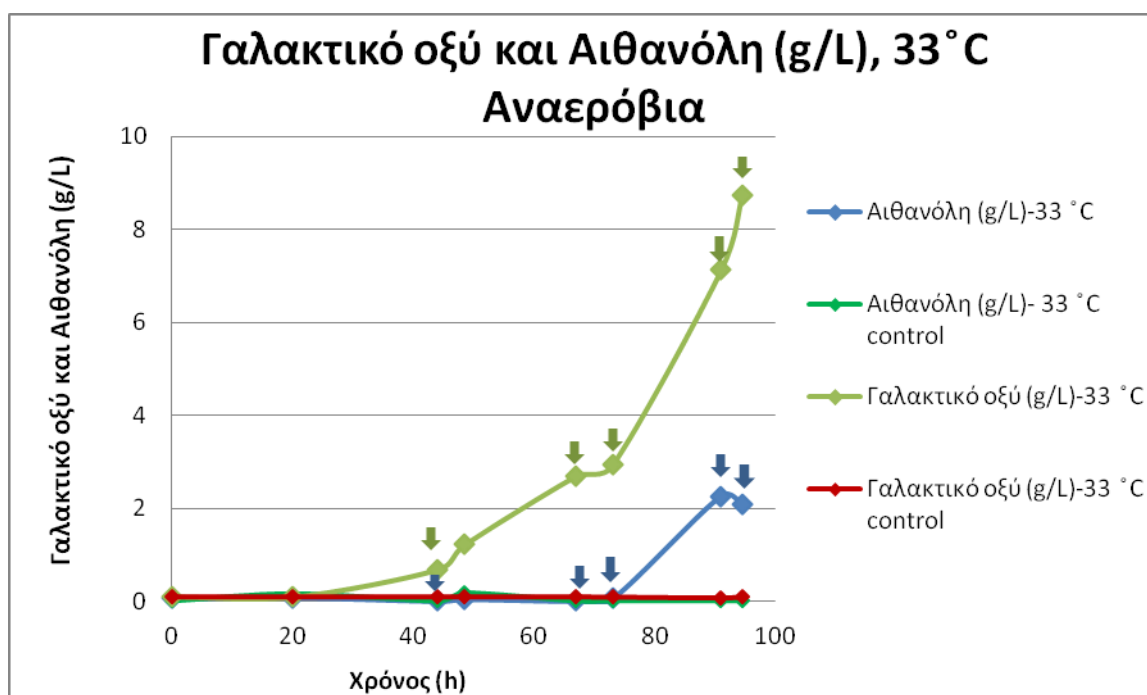
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η συγκαλλιέργεια του *L. delbrueckii* μαζί με το μύκητα *K. marxianus* (γράφημα 11), στη βέλτιστη θερμοκρασία των 33 °C αναερόβια. Ο κυριότερος λόγος καλλιέργειας του βακτηρίου και του μύκητα μαζί, σε αναερόβιες συνθήκες, είναι το πλεονέκτημα παραγωγής εστέρα όταν αντιδράσει το γαλακτικό οξύ με την αιθανόλη.

Γράφημα 11: Καλλιέργεια του βακτηρίου *L. delbrueckii* μαζί με το μύκητα *K. marxianus* στους 33 °C αναερόβια



Στο γράφημα που φαίνεται πιο πάνω, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κυττάρων του *L. delbrueckii* μαζί με το μύκητα *K. marxianus* στους 33 °C αναερόβια, όπως μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 600 nm. Στη καλλιέργεια αυτή γινόταν καθημερινή μέτρηση του pH και ρύθμιση του στο $6 \pm 0,1$, με την προσθήκη NaHCO_3 . Ακολουθούν οι παραγόμενες συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε (g/L), (γράφημα 12), κατά τη ζύμωση του *L. delbrueckii* μαζί με το μύκητα *K. marxianus* στους 33 °C αναερόβια.

Γράφημα 12: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε (g/L) κατά τη ζύμωση του *L. delbrueckii* μαζί με το μύκητα *K. marxianus* στους 33 °C αναερόβια



Όπως φαίνεται στο γράφημα 12, η παραγωγή αιθανόλης είναι ελάχιστη σε σχέση με το γαλακτικό οξύ. Μάλιστα τις πρώτες 73 ώρες, η παραγωγή αιθανόλης ήταν μηδενική και η μεγαλύτερη τιμή της έφτασε το 2,25. Αν συγκρίνουμε αυτή τη τιμή, με τη τιμή παραγωγής αιθανόλης όπως φαίνεται στο γράφημα 6 στους 33 °C αναερόβια, (παράγραφος 3.2.), θα διαπιστώσουμε ότι η παραγόμενη αιθανόλη είναι περίπου η ίδια. Το ίδιο συμβαίνει και με το γαλακτικό οξύ του οποίου η τιμή του στο γράφημα 12, στις 90 ώρες, είναι παρόμοια με τη τιμή γαλακτικού οξέος όπως φαίνεται στο γράφημα 10 στους 33 °C αναερόβια.

Τα αποτελέσματα του γραφήματος 12 της παραγωγής γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε g/L αναερόβια, σχετίζονται με τη συγκέντρωση της βιομάζας όπως αυτή φαίνεται στο γράφημα 11. Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας για κάθε σημείο σε σύγκριση με τα παραγόμενα προϊόντα, έχουν παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης η τιμή του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης (γράφημα 11), είναι παρόμοια με τιμή αυτών όπως φαίνεται στα γραφήματα 7 και 10, δηλαδή στα πειράματα όπου οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά.

Σε γενικές γραμμές τα πιο πάνω αποτελέσματα δεν βοηθούν να συμπεράνουμε με ακρίβεια, αν η ρύθμιση του pH όντως βοηθά στην περαιτέρω ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Για να μπορέσει κανείς να μιλήσει με σιγουριά, θα έπρεπε τα πιο πάνω πειράματα να επαναληφθούν, να λαμβάνονται μετρήσεις ανά δύο ώρες το πολύ και να σταματούν μόνο αν στη καλλιέργεια σταματήσει η κατανάλωση του υποστρώματος και η παραγωγή βιομάζας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ανάπτυξη μιας βιοδιεργασίας επεξεργασίας του τυρογάλακτος, μέσα από την οποία θα παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης και γαλακτικού οξέος και παράλληλα η μείωση του βαθμού ρύπανσης από τον ορό γάλακτος. Στο πλαίσιο αυτό επιλέχθηκε ο *Kluyveromyces marxianus* για την μετατροπή του τυρόγαλου σε αιθυλική αλκοόλη και ο *Lactobacillus delbrueckii* για την μετατροπή του σε γαλακτικό οξύ.

Από τη συνολική θεώρηση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας διαπιστώνεται ότι ο μύκητας *Kluyveromyces marxianus* έχει βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης τους 30 °C σε ανάδευση 100 rpm. Ο μικροοργανισμός *Kluyveromyces marxianus* καλλιεργήθηκε και αναερόβια, αποδεικνύοντας ότι αποδίδει στους 30 °C χωρίς ανάδευση. Αντίθετα ο μικροοργανισμός *Lactobacillus delbrueckii* είχε βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης τους 33 °C χωρίς ανάδευση.

Συγκρίνοντας τη συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus delbrueckii* και του *Kluyveromyces marxianus* στους 33 °C αναερόβια, παρατηρείτε ότι είχαν όμοια συμπεριφορά με τις περιπτώσεις όπου οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά, αφού οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και αιθανόλης στα πειράματα ήταν παρόμοιες. Οι τιμές γαλακτικού οξέος και αιθανόλης στα πειράματα καλλιέργειας των μικροοργανισμών ξεχωριστά στις 90 ώρες, ήταν ίσες με 10,60 g/L και 2,26 g/L αντίστοιχα. Παράλληλα, στη συγκαλλιέργεια των μικροοργανισμών, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και αιθανόλης (90 ώρες), ήταν 7,1 g/L και 2,25 g/L αντίστοιχα.

Η δημιουργία όξινης σύστασης του υποστρώματος λακτόζης κατά τη καλλιέργεια του *Lactobacillus delbrueckii* και του *Kluyveromyces marxianus*, αποτελεί περιοριστικός παράγοντας στην απόδοση παραγωγής προϊόντων, ιδιαίτερα αν το pH χαμηλώσει σε τιμές που μπορεί να απενεργοποιήσει εντελώς την διεργασία. Για την ικανοποιητική απόδοση παραγωγής προϊόντων από τους μικροοργανισμούς, αποδείχτηκε ότι έπρεπε να γίνεται η ρύθμιση του pH στη βέλτιστη τιμή του (pH = 6±1).

Η δυνατότητα βιομετατροπής της λακτόζης σε αιθανόλη και γαλακτικό οξύ, για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων έχει εφαρμοστεί σε πραγματικού μεγέθους εγκαταστάσεις. Οι βιομετατροπές είναι αποτελεσματικά μέσα μείωσης του προβλήματος διάθεσης του ορού

γάλακτος και βιβλιογραφικές έρευνες επιβεβαιώνουν ότι τα οικονομικά δεδομένα αυτών των διαδικασιών μπορούν να είναι ευνοϊκά. Η αναερόβια ζύμωση αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική λύση έναντι των αερόβιων διαδικασιών οι οποίες μπορεί να έχουν υψηλές λειτουργικές απαιτήσεις. Η αναερόβια επεξεργασία προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των αερόβιων διαδικασιών όπως η μηδενική απαίτηση σε οξυγόνο. Τα πιθανά προβλήματα της ζύμωσης του τυρόγαλου, είναι η προφανής απαίτηση σε θερμοκρασία στους 33 °C για αποδοτική επεξεργασία του και το χαμηλό pH του όξινου ορού γάλακτος που περιορίζει σοβαρά την εμπορική εκμετάλλευσή του. Για την αξιοποίηση του τυρογάλακτος στην χώρα μας απαιτούνται μελλοντικές μελέτες με ενδεδειγμένη έρευνα των βιοχημικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών για τη δυνατότητα παραγωγής χρήσιμων προϊόντων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγγλική

1. A. Keller, Gerhardt, 1975, *Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 17, pp. 997-1018
2. Alichanidis E., Anifantakis E., A. Polychroniadou, Nanou M., 1984, *Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture*, Journal of Dairy Research, vol. 51, pp. 141-147.
3. Ana c. Adam, Rubio-Teixeira M., Polaina J., 2004, '*Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective*', Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 44, pp. 553-557
4. Ansari Md. I. A., Datta A. K., (2003), '*An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems*', Institution of Chemical Engineers, vol 81, p.p.58-65.
5. Audic J., Chaufer B., Daufin G., (2003), '*Non-food applications of milk components and dairy coproducts: a review*', vol. 83, pp. 417-438.
6. Auras R., Lim L., Selke S., Tsuji H., (2010), '*Poly (lactic acid), Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications*'.
7. Balannec B., Vourch M., Rabiller-Baudry M., Chauferet B., (2005). *Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration*, Separation and Purification Technology vol 42, pp. 195–200.
8. Banat, I.M., Nigam P., Marchant R., (1992), *Isolation Of Thermotolerant Fermentative Yeast Capable Of Growth At 52 °C And Ethanol Production At 45 °C And 50 °C*, World J. Microbio. Biotechnol., vol.8, pp.259–263.
9. Becerra M., Baroli B., Fadda, Mendez J., (2001), '*Enzyme*', Microb. Technol., vol. 29, pp. 506-512.

10. Castillo F.J., (1990), '*Lactose Metabolism By Yeasts*', Yeast Biotechnology and Biocatalysis, New York: Marcel Dekker, pp.297- 320.
11. Chao G., Cuiqing M., Ping X., (2011), '*Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass*', Biotechnology Advances, vol. 29, pp. 930-939.
12. Dave R.I., Shah N.P., (1998), '*Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt*', vol. 81, pp. 2804–2816.
13. Datta R., Tsai S., Bonsignore P., Moon S., Frank JR. (1995), '*Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives*', FEMS Microbiol Rev., vol. 16, pp. 221–31.
14. Ghaly A.E., Kamal M.A., (2004), '*Submerged Yeast Fermentation of Acid Cheese Whey for Protein Production and Pollution Potential Reduction*', Water Research, vol.38, pp.631-644.
15. Gonzalez S., (1996), '*The biotechnological utilization of cheese whey: A review*', Bioresource Technology, vol. 57, pp.1-11.
16. Grosova Z., Rosenberg M., Rebroš, Czech J., (2008), '*Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review*', Food Sci., vol. 26, pp. 1–14.
17. Graciano F., Heinzle E., Wittmann, Gombert, (2008), '*The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential*', 'Appl Microbiol Biotechnol', vol 79, pp. 339-354.
18. Haq I., Ali S., Qadeer M., (2005), '*Influence of dissolved oxygen concentration on intracellular pH for regulation of Aspergillus niger growth rate during citric acid fermentation in a stirred tank bioreactor*', Int. J. Biol., vol.1, p.p. 34-41.
19. Hickey M., Hillier A., Jago, G. R., (1986), '*Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli*', Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, pp. 825–831.
20. Holten C., Mueller A., Rehbinder D. (1971), '*Lactic acid properties and chemistry of lactic acid and derivatives*', Weinheim, Germany: Verlag Chemie.

21. Hutkins R., (2006), *'Microbiology and Technology of Fermented Foods'*
22. Janssens J., Burris N., Woodward A., Bailey R., (1983), *'Lipid-enhanced ethanol production by Kluyveromyces fragilis'*, Appl. Environ. Microbiol., vol.45, pp. 598-602
23. Klovrychev, Korolev, Bulgakova, V. G., (1979), *'Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of Candida utilis'*, Microbiology, vol. 47, pp. 357–361.
24. Kosaric, N., Asher, Y. J., (1985), Adv. Biochem. Engg., vol. 19.
25. Kosseva M.R., V.N. Beschkov, E.I. Pilafova, Bulg., (1995), Chem. Commun., vol. 28, pp. 690-702.
26. Krischke W., M. Schroder, W. Trosch, (1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 34, pp. 573-578.
27. Lunt J., (1998), *'Large-scale Production, Properties And Commercial Applications Of Polylactic Acid Polymers'*, Polym. Degrad. Stabil., vol.59, pp.145–152.
28. Maria R. Kosseva, Parmjit S. Panesar, Gurpreet Kaur, John F. Kennedy, (2009), *'Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey'*, *'International Journal of Biological Macromolecules'*, vol. 45, pp. 437- 447.
29. Marwaha, S. S. & Kennedy, J. F., (1988), *'Review: whey pollution problem and potential utilization'*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 23, pp. 323-336.
30. McGarrey J., Ravva S., Stanken L.& Moller W., (2004), *'Bacterial analysis of dairy wastewater, a molecular approach'*, United States Department of Agriculture
31. Nancy J., E.G. Hammond, Bonita A. Glatz, (2010), *Conversion of Cheese Whey and Whey Permeate to Oil and Single-Cell Protein*, Journal of Dairy Science, vol. 61, pp. 1537-1547.

32. Narva M, Halleen J, Väänänen K, Korpela R. 2004, *Effects of Lactobacillus helveticus fermented milk on bone cells in vitro*, Life Science, vol. 75, pp. 1727-34.
33. Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-Aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, et al. *Hightemperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042*. Appl Environ Microbiol, 2008, vol. 74, no. 247514-7521.
34. Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. 2010, *Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits*. Appl Microbiol Biotechnol., vol. 85, pp. 413–23.
35. Oscar J. Sanchez, Carlos A. Cardona, 2008, ‘Bioresource Technology’, *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*, vol. 99, pp. 5270-5295.
36. Park W, Juarez M., Ramos M. Haenlein R., *Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk*, Science Direct, vol. 68, pp. 88-113.
37. Parmjit S. Panesar, John F. Kennedy, Dina N. Gandhi, Katarzyna Bunko, 2007, ‘Food Chemistry’, *Bioutilisation of whey for lactic acid production*, vol. 105, pp. 1-14.
38. Pedro M.R. Guimarães, José A. Teixeira, Lucília Domingues, 2010, ‘Biotechnology Advances’, *Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey*, vol.28, pp. 375-384.
39. Knox JH, Done JN, Fell AF et al. High-Performance Liquid Chromatography. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1978.
40. Kopsahelis N., Panas P., Kourkoutas Y., (2007), ‘Evaluation of the Thermally Dried Immobilized Cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* on Apple pieces as a Potent Starter Culture’, J. Agric. Food Chem., vol. 55, p.p. 9829-9836.

41. Rojan P. John, K. Madhavan Nampoothiri, Ashok Pandey, 2007, 'Appl Microbiol Biotechnol', *Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives*, vol. 74, pp. 524-534.
42. Salman Zafar, Mohammad Owais, 2006, 'Biochemical Engineering Journal', *Ethanol production from crude whey by Kluyveromyces marxianus*, vol. 27, pp. 295-298.
43. Sheu, D.C., S.Y. Li, K.J. Duan, C.W. Chen, 1998, *Biotechnol. Tech.*, vol. 12, pp. 273-276
44. Sienkiewicz, T. & Riedel, C.-L. (1990). *Whey and Whey Utilization*. Th. Mann, Germany.
45. Sodini I, Lucas A, Oliveira MN, Remeuf F, Corrieu G. 2002, *Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing*, Journal of Dairy Science, vol. 85, pp. 2479-2488.
46. Solange I. Mussatto, Giuliano Dragone, Pedro M.R. Guimarães, João Paulo A. Silva, Lívia M. Carneiro, Inês C. Roberto, António Vicente, Lucília Domingues, José A. Teixeira, 2010, 'Biotechnology Advances', *Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production*, vol. 28, pp. 817-830.
47. Stiles, M.E., W.H. Holzapfel, 1997, *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*, Int. J. Food Microbiol., vol. 36, pp. 1-29.
48. Tchobanoglou G., 1984, *Wastewater engineering treatment, disposal, reuse*, Pb Frank Burton
49. Tyfield, L.A. 2000. *Galactosemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene: A complex relationship between genotype and phenotype*. Eur. J. Pediatr, 159:S204–S207.
50. Young-Jung Wee, Jin-Nam Kim, Hwa-Won Ryu, 2006, *Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications*, School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Department of Material Chemical and Biochemical Engineering.

51. Yves, V. 1979. *Le lactoserum. Matiere premiere noble pour les industries alimentaires humaines et animales*, Revue Laitiere Fransaise, vol. 372, pp. 27-39.

Ελληνική

1. Ανυφαντάκης Μ. Εμμανουήλ, (2004) *Τυροκομία : Χημεία Φυσικοχημεία Μικροβιολογία*, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
2. Ανυφαντάκη Α., Βαμβακάκη Α., Παπαδόπουλος Ν., (2009), *Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος*, Greek Journal of Dairy Science and Technology, vol.1, pp. 10-69.
3. Δήμου Δήμητρα, 2010, 'Εργαστήριο Γενικής Φυτοπαθολογίας', Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, p.p. 29-35.
4. Ζώτου Α. (2009), *Μελέτη της τεχνολογίας παρασκευής και φυσικοχημικών, μικροβιολογικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών φρέσκου μαλακού τυριού από νωπό, παστεριωμένο και μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
5. Θεοδούλου Π., (2012). *Μελέτη πολυμερισμού στερεάς κατάστασης πολύγαλακτικού οξέος*, Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.
6. Καττή Π., (2010), *Πειραματική διερεύνηση παραγωγής βιοαερίου από μίγματα τυρογάλακτος με υγρά μηχανικού διαχωρισμού αποβλήτων χοιροστασίου διαφορετικής πυκνότητας στη μεσόφιλη περιοχή*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
7. Κουτρώτσιος Γ., (2009), *Διερεύνηση καταλληλότητας χρήσης πυρηνόξυλου και τυρογάλακτος στην παρασκευή υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus ostreatus**, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.
8. Λιούρτα Ν., 2008, 'Συγκριτική Αξιολόγηση Πειραματικών Μεθόδων Προσδιορισμού Πετρελαϊκών Ρύπων σε Περιβαλλοντικά Δείγματα', Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος.
9. Μαλανδράκη Ε., (2008), *Μέθοδοι επεξεργασίας ορού γάλακτος*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

10. Κατεχάκη Ε., (2010), *Επίδραση θερμικά ξηρανθεισών αρχικών καλλιεργειών στην ωρίμανση σκληρών τυριών*, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.
11. Νταρακάς Ευθύμιος, 2011, *‘Εργαστηριακές μέθοδοι αποτίμησης ποιότητας νερού & λυμάτων’*, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών.
12. Πέτρου Καρκαλούσου, 2009, *‘Βιοχημεία Ι (Εργαστήριο)’*, Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας.
13. Σταραφιώτη Σ., 2009, *‘Διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος της βιώσιμης ελιάς μετά από δειγματοληψία’*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας, σελ. 44.