

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) με
γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες σε λάδια από τον
απομονωθέντα αλόφιλο μικροοργανισμό *Halomonas*
sp. RPA5.

Ραφαήλ Παπαμάρκου

Λεμεσός, 2016

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

Πτυχιακή εργασία

Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) με
γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες σε λάδια από τον
απομονωθέντα αλόφιλο μικροοργανισμό *Halomonas*
sp. RPA5.

Ραφαήλ Παπαμάρκου

Σύμβουλος καθηγητής:
Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός, 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ραφαήλ Παπαμάρκου, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνετέλεσαν στην πραγματοποίησή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα ήθελα να δώσω στον επιβλέπον καθηγητή μου Δρ. Ιωάννη Βυρίδη για τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξη του κατά την διάρκεια διεκπεραίωσης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα πτυχιακής αλλά, και την συνεχή γνώση και διδακτική εμπειρία που μου πρόσφερε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ευστάθιο Καλυβιώτη για την πολύτιμη βοήθεια του όταν χρειάστηκε να χρησιμοποιήσουμε τον ιξωμετρίτη και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με την ελεγχόμενη ένταση διατμητικής τάσης του εργαστηρίου του καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του για τις ρεολογικές ιδιότητες και τα οπτικά δεδομένα που παρουσίασαν τα δείγματά μας. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδακτορικό φοιτήτρια Έφη-Μαρία Δράκου για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια των τελευταίων μηνών τόσο στην παροχή των βασικών γνώσεων και στην εξοικείωση με το εργαστηριακό περιβάλλον όσο και στη βιβλιογραφική ανασκόπηση. Η συνεργασία μαζί της μου έδωσε την δυνατότητα να αποκτήσω γνώσεις στον εργαστηριακό τομέα και συνέβαλε ευχάριστα στην ολοκλήρωση της εμπειρίας αυτής, καθιστώντας την εποικοδομητική. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους ήταν δίπλα μου και με στήριξαν άμεσα ή έμμεσα να εκπληρώσω τους στόχους μου αντιμετωπίζοντας με επιτυχία την κάθε νέα πρόκληση στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασία είναι η απομόνωση ενός νέου μικροβιακού στελέχους από την Αλυκή του Ακρωτηρίου στη Λεμεσό με γαλακτωπατοποιητική ικανότητα σε διάφορους οργανικούς διαλύτες κάτω από κανονικές και ακραίες συνθήκες.

Αρχικά, η πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη (EPS) από τον αλόφιλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* όπου ταυτοποιήθηκε με την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA και απομονώθηκε από την Αλυκή του Ακρωτηρίου στη Λεμεσό. Ο μικροοργανισμός αυτός παράγει μία σημαντική ποσότητα εξωπολυσακχαριτών και βελτιστοποιείται χρησιμοποιώντας ως βιομέσο, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και οξικό οξύ με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 3 mL/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7 και θερμοκρασία ίση με 30 °C. Οι παραγόμενοι εξωπολυσακχαρίτες του μικροοργανισμού αυτού ελέγχθησαν σε διαφορετικές επί τις εκατό κατ' όγκο συγκεντρώσεις (% κ.ο.) εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 % κ.ο.) και σε ακραίες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αποστείρωσης παρουσιάζοντας σημαντικά αποτελέσματα γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας. Οι διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη, ενώ το Tween 80 και Triton X-100 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα μεγαλύτερα ποσοστά παρουσιάστηκαν στα έλαια και κυρίως στο ελαιόλαδο με τα ποσοστά για 1 % και 2 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS να ισούνται με 73.88 και 93.01 % αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στις ακραίες συνθήκες σε pH=11, T=100 °C και αποστείρωση για 1 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο είχαμε ποσοστά 93.18, 71.90 και 95.99 %. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των υδατανθράκων (0.0514 g/L) και πρωτεϊνών (0.385 g/L) του παραγόμενου EPS. Ακόμη, ελέγχθησαν οι ρεολογικές ιδιότητες τους και κυρίως το ιξώδες (1.26 ± 0.1 mPa·s) και τέλος, παρουσιάστηκαν τα οπτικά δεδομένα τους με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με την ελεγχόμενη ένταση διατμητικής τάσης.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τον αλόφιλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* απομονώθηκε ακόμη ένας μικροοργανισμός του γένους αυτού ο *Halomonas sp. RPA9* μέσω της ίδιας προαναφερθέντας διαδικασίας. Ο μικροοργανισμός

αυτός όμως, έχει την ικανότητα να παράγει καροτένιο-bacterioruberin και βελτιστοποιείται χρησιμοποιώντας ως βιομέσο, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και γλυκερόλη με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 1 mL/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7 και θερμοκρασία ίση με 30 °C. Ο ποιοτικός προσδιορισμός επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση της Φασματοφωτομετρίας Μοριακής Απορρόφησης Υπεριώδης/Ορατού. Με την μέθοδο αυτή, έγινε ταυτοποίηση του φάσματος σε μήκος κύματος 350–600nm με την κορυφή να εμφανίζεται στα 475 nm όπου σε συνδυασμό με την κατάλληλης βιβλιογραφίας καταλήξαμε στην πιθανότητα παραγωγή του καροτένιου, bacterioruberin. Αξίζει να σημειωθεί ότι, για να προσδιοριστεί ποσοτικά η συγκέντρωση του καροτένιου bacterioruberin θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μέτρηση του δείγματος μας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Λέξεις κλειδιά: Περιβαλλοντικό δείγμα, Αλόφιλος, *Halomonas sp.*, Εξωπολυσακχαριτης (EPS), Bacterioruberin, Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα και Σταθερότητα

ABSTRACT

The aim of this thesis is the isolation of a new strain of the Akrotiri Salt Lake in Limassol emulsification capacity in various organic solvents under normal and extreme conditions.

This thesis focuses on the production of exopolysaccharide (EPS) from the halophiles microorganism *Halomonas sp. RPA5* which was identified through an analysis of 16S rRNA gene sequence and was isolated from the Salt Lake in Akrotiri Limassol. This microorganism produces a significant quantity of exopolysaccharides and is being optimised through the use of Viomes, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ and acetic acid with 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g / L and 3 mL / L respectively, with a pH of 7 and temperature of 30 °C. The produced exopolysaccharides of this microorganism were tested at different concentrations on percentage of the volume (vol%) of extracted EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 vol%) at extreme pH, temperature and sterilizing conditions, presenting significant results of emulsification capacity and stability. The various organic solvents used are olive oil, sunflower oil, corn oil, petroleum, hexane, hexadecane, and kerosene, while Tween 80 and Triton X-100 were used as controls. The larger percentages appeared in oils, especially in olive oil with the rates for 1% and 2% of the volume of extracted EPS were equal to 73.88 and 93.01% respectively. Correspondingly, in the extreme conditions of pH = 11, T = 100 °C and sterilization for 1 vol% of extracted EPS and organic solvent, the rates of 93.18, 71.90 and 95.99% had appeared in olive oil. Also, a quantitative determination of carbohydrates (0.0514 g / L) and protein (0.385 g / L) of the resulting EPS was conducted. Furthermore, their rheological qualities were checked and especially the viscosity of (1.26 ± 0.1 mPa·s), and, finally their optical data were presented through the use of electronic microscope with interdepartmental voltage controlled intensity.

Furthermore, it is noteworthy that apart from halophiles microorganism *Halomonas sp. RPA5*, another microorganism of this genus was isolated, the *Halomonas sp. RPA9*, through the same procedure mentioned above. This microorganism however, has the ability to produce carotene-bacterioruberin and is being optimized through the use of Viomes, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ and glycerol with 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g / L and 1 mL / L respectively with a pH of 7 and temperature of 30 °C. This qualitative identification was achieved through the use of Molecular spectrophotometry UV / visible absorption. With this process, an identification in the range of 350-600nm was

conducted, while the peak appeared at 475 nm and with the support of the appropriate literature we reached to the possibility of producing carotene, bacterioruberin. It is noted that, in order to determine in quantitative terms the concentration of carotene bacterioruberin, a measurement of the sample should take place through the use of the method of HPLC.

Keywords: Environmental sample, Halophiles, *Halomonas sp.*, Exopolysaccharide (EPS), Bacterioruberin, Emulsion Capacity and Stability Index

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vii-viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xviii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xix
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xx
1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες	1
1.1.1 Κατηγορίες επιφανειοδραστικών ουσιών.....	2
1.1.2 Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	3
1.1.2.1 Μείωση επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης.....	3
1.1.2.2 Βιοαποικοδομησιμότητα	5
1.1.2.3 Χαμηλή τοξικότητα.....	6
1.1.2.4 Σχηματισμός και αποδόμηση γαλακτωμάτων.....	6
1.1.2.5 Χημική ποικιλομορφία.....	6
1.1.2.6 Ανθεκτικότητα έναντι αλατότητας, θερμοκρασίας και pH.....	6
1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών...	7
1.1.4 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών	7
1.1.4.1 Διεργασίες υποβάθμισης και αποκατάστασης υδρογονανθράκων	7
1.1.4.2 Μικροβιακή αύξηση της ανάκτησης πετρελαίου.....	8
1.1.4.3 Αποκατάσταση μετάλλων	9
1.1.4.4 Εφαρμογές στην ιατρική	10

1.1.4.5	Εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων	10
1.1.4.6	Εφαρμογές στη γεωργία	11
1.1.4.7	Εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών	12
1.2	Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ή Εξωπολυσακχαρίτες (EPS)	12
1.2.1	Κατηγορίες εξωπολυσακχαριτών (EPS)	14
1.2.2	Βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών (EPS).....	15
1.2.3	Εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών (EPS)	16
1.2.3.1	Εμπορικές εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών (EPS).....	16
1.3	Γαλακτώματα	17
1.3.1	Ιδιότητες μορίων γαλακτωμάτων τροφίμων.....	19
1.3.2	Γαλακτωματοποιητές.....	19
1.3.3	Βιο-γαλακτωματοποιητές	20
1.4	Ρεολογικές ιδιότητες.....	21
1.4.1	Έννοια και ορισμός του ιξώδες	22
1.5	Υγροβιότοπος Ακρωτηρίου.....	22
1.5.1	Αλυκή Ακρωτηρίου	22
1.5.2	Χλωρίδα – Πανίδα.....	23
1.6	Ακραιόφιλος	24
1.6.1	Αλόφιλοι.....	24
1.6.1.1	Πλεονεκτήματα αλόφιλων μικροοργανισμών.....	25
1.6.1.2	Βιομηχανικές εφαρμογές αλόφιλων μικροοργανισμών	27
1.6.1.3	Μικροοργανισμοί του γένους <i>Halomonas sp</i>	29
1.7	Καροτενοειδή	30
1.7.1	Εφαρμογές – λειτουργίες καροτενοειδών	31
1.7.2	Bacterioruberin	32
1.8	Σκοπός της πτυχιακής εργασίας	33

2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
2.1	Πειραματικές Μέθοδοι	34
2.1.1	Δειγματοληψία περιβαλλοντικού δείγματος	34
2.1.2	Παρασκευή βιομέσου για την καλλιέργεια εμπλουτισμού	35
2.1.3	Παρασκευή βιομέσου για την καλλιέργεια ανάπτυξης και απομόνωσης μικροοργανισμών	35
2.1.4	Παρασκευή βιομέσων για τις υγρές καλλιέργειες των δειγμάτων <i>RP45</i> και <i>RP49</i>	37
2.1.5	Μέθοδος εξαγωγής εξωπολυσακχαρίτη (EPS).....	39
2.1.6	Flocculation Activity (FA)	41
2.1.7	Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα – Emulsion Capacity Index	42
2.1.8	Ρύθμιση Θερμοκρασίας.....	43
2.1.9	Ρύθμιση pH.....	44
2.1.10	Παρουσίας υδατανθράκων	44
2.1.11	Παρουσίας πρωτεϊνών	43
2.1.12	Μέθοδος εξαγωγής καροτένιου.....	44
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
3.1.1	Έλεγχος του δείγματος <i>RP45</i> σε διαφορετικές συνθήκες και υποστρώματα ...	46
3.1.2	Σύσταση υγρού βιομέσου και οπτική πυκνότητα δείγματος για την διεξαγωγή των πειραμάτων.....	47
3.1.3	Υπολογισμός Flocculation Activity (FA).....	48
3.1.4	Υπολογισμός Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα – Emulsion Capacity Index..	49
3.1.4.1	Διάφοροι οργανικοί διαλύτες για 0.5 και 2.5 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS ..	50
3.1.4.2	Διάφοροι οργανικοί διαλύτες για 0.5 % κ.ο. Tween 80 και Triton X-100 ..	52
3.1.4.3	Οργανικός διαλύτης το ελαιόλαδο	53
3.1.4.3.1	Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο.....	55

3.1.4.4	Οργανικός διαλύτης το ηλιέλαιο.....	58
3.1.4.4.1	Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο.....	60
3.1.4.5	Οργανικός διαλύτης το αραβοσιτέλαιο.....	61
3.1.4.5.1	Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο.....	63
3.1.4.6	Οργανικός διαλύτης το ελαιόλαδο με pH = 3 και 7 – 14.....	65
3.1.5	Παρουσία υδατανθράκων.....	66
3.1.6	Παρουσία πρωτεϊνών.....	67
3.1.7	Ρεολογικές ιδιότητες εκχυλισμένου EPS.....	69
3.1.8	Οπτικά δεδομένα εκχυλισμένου EPS.....	71
3.2	Έλεγχος του δείγματος <i>RPA9</i> σε διαφορετικές συνθήκες και υποστρώματα.....	74
3.2.1	Σύσταση υγρού βιομέσου και οπτική πυκνότητα δείγματος για την διεξαγωγή των πειραμάτων.....	75
3.2.2	Ανίχνευση του καροτένιου, bacterioruberin.....	77
3.3	Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με βάση την αλληλουχία 16S rRNA.....	78
3.3.1	Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού <i>RPA5</i>	78
3.3.2	Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού <i>RPA9</i>	79
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	81
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βιομηχανικές εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών και κυρίως του γένους <i>Halomonas</i> sp.....	28
Πίνακας 2: Η χρήση διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα σε στερεές καλλιέργειες του δείγματος <i>RPA5</i> και η ανάπτυξη τους.....	Error! Bookmark not defined. 6
Πίνακας 3: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Halomonas</i> sp. <i>RPA5</i> μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.....	47
Πίνακας 4: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 550 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.....	48
Πίνακας 5: Ποσοστά αποτελεσμάτων για τα τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound για δείγματα με αλατότητες 40 g/L NaCl.....	49
Πίνακας 6: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο.	50
Πίνακας 7: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 2.5 % κ.ο.	51
Πίνακας 8: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Tween 80.....	52
Πίνακας 9: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Triton X-100.....	52
Πίνακας 10: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ελαιόλαδο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.....	53
Πίνακας 11: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ηλιέλαιο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.....	58

Πίνακας 12: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το αραβοσιτέλαιο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.....	61
Πίνακας 13: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH = 3 και 7 – 14.....	65
Πίνακας 14: Τιμές απορρόφησης του μικροοργανισμού <i>Halomonas sp. RPA5</i> μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 490 nm	67
Πίνακας 15: Τιμές απορρόφησης του μικροοργανισμού <i>Halomonas sp. RPA5</i> μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 595 nm	68
Πίνακας 16: Η χρήση διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα σε στερεές καλλιέργειες του δείγματος <i>RPA9</i> και η ανάπτυξη τους.....	74
Πίνακας 17: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Halomonas sp. RPA9</i> μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.....	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl σε σχέση με τις ημέρες..48
- Διάγραμμα 2: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο..... 51
- Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 2.5 % κ.ο..... 51
- Διάγραμμα 4: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Tween 80..... 52
- Διάγραμμα 5: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Triton X-100..... 53
- Διάγραμμα 6: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο..... 54
- Διάγραμμα 7: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο..... 55
- Διάγραμμα 8: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο..... 59
- Διάγραμμα 9: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο..... 60
- Διάγραμμα 10: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο..... 62

Διάγραμμα 11: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.	63
Διάγραμμα 12: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH = 3 και 7 – 14.....	66
Διάγραμμα 13: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Halomonas sp. RPA9</i> μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl σε σχέση με τις ημέρες.....	76
Εικόνα 1: Σημείο δειγματοληψίας από την περιοχή της Αλυκής Ακρωτηρίου	34
Εικόνα 2: Τοπογραφική απεικόνιση περιοχής συλλογής δειγμάτων Αλυκής Ακρωτηρίου....	34
Εικόνα 3: Ανάπτυξη αποικιών σε τρυβλία Petri για: α) δείγμα <i>RPA9</i> , β) δείγμα <i>RPA5</i>	37
Εικόνα 4: Υγρές καλλιέργειες με ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αλατότητες 0, 100 και 200 g/L NaCl για το δείγμα <i>RPA5</i>	38
Εικόνα 5: Υγρή καλλιέργεια με ανάπτυξη μικροοργανισμού με αλατότητα 100 g/L NaCl για το δείγμα <i>RPA9</i>	39
Εικόνα 6: Υγρή καλλιέργεια με ανάπτυξη μικροοργανισμού, <i>Halomonas sp. RPA5</i> σε αλατότητα 40 g/L NaCl.....	40
Εικόνα 7: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH=11 και σε αυτόκαυστο.....	58
Εικόνα 8: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH= 11	61
Εικόνα 9: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH= 11	64
Εικόνα 10: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό <i>Halomonas sp. RPA5</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 50x (0.32 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο.	71

Εικόνα 11: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό <i>Halomonas sp. RPA5</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. και φίλτρο Ph2	72
Εικόνα 12: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό <i>Halomonas sp. RPA5</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=3 και φίλτρο Ph2	72
Εικόνα 13: Η μορφολογία των συσσωματωμάτων του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό <i>Halomonas sp. RPA5</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=3 και φίλτρο Ph2	73
Εικόνα 14: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό <i>Halomonas sp. RPA5</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=11 και φίλτρο Ph2	73
Εικόνα 15: Αλληλουχία 16S rRNA του μικροοργανισμού για το δείγμα <i>RPA5</i> αποτελούμενη από 1199 βάσεις – νουκλεοτίδια	79
Εικόνα 16: Αλληλουχία 16S rRNA του μικροοργανισμού για το δείγμα <i>RPA9</i> αποτελούμενη από 1309 βάσεις – νουκλεοτίδια	80
Σχήμα 1: Δομή επιφανειοδραστικών ουσιών και η δράσης τους στο νερό (Δαβρής Γ. 2013)..	1
Σχήμα 2: Συσσώρευση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στη διεπιφάνεια μεταξύ υγρού και αέρα	4
Σχήμα 3: Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας, επιφανειακής τάσης και σχηματισμού μικκυλίων (Whang et al, 2008)	5
Σχήμα 4: Μηχανισμός δράσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ρυπασμένα εδάφη από βαρέα μέταλλα (Mulligan, 2005).	10
Σχήμα 5: Εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών στη γεωργία (Dhara & Swaranjit, 2013). ..	11
Σχήμα 6: Σχηματισμός εξωκυτταρικής πολυμερικής μήτρας πάνω σε ένα βιοφίλμ	13

Σχήμα 7: Δεσμευμένα EPS (Bound EPS) παρουσία των χαλαρά δεσμευμένων EPS (Loosely Bound EPS, LB–EPS) και των συνεκτικά δεσμευμένα EPS (Tightly Bound EPS, TB–EPS) και διαλυτά EPS (Soluble EPS).....	15
Σχήμα 8: Ηλεκτρονικό μικρογράφημα γαλακτώματος μαγιονέζας. Στη διεπιφάνεια νερού σταγονιδίων λαδιού φαίνεται η συγκεντρωμένη πρωτεΐνη.....	18
Σχήμα 9: Εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών ως ξενιστές με χαμηλό κόστος παραγωγής για τις χημικές ουσίες, τα υλικά και τα βιοκαύσιμα.....	27
Σχήμα 10: Χημική δομή: α) α-καροτένιου, β) β-καροτένιου, γ) λουτεΐνης, δ) ζεαξανθίνης και ε) λυκοπαΐνης	31
Σχήμα 11: Χημική δομή bacterioruberin (Kuo-Lung Ku b et al., 2010).....	33
Γραφική Παράσταση 1: Καμπύλη του ιξώδες (mPa·s) σε σύγκριση με το ρυθμό διάτμησης (1/s) για το δείγμα 1.5 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS	70
Γραφική Παράσταση 2: Καμπύλη απορρόφησης του δείγματος <i>RPA9</i> σε μήκος κύματος 350 – 600 nm	77
Καμπύλη Βαθμονόμησης 1: Η καμπύλη βαθμονόμησης των υδατανθράκων σε σχέση με τη συγκέντρωση (mgL ⁻¹) με την προσθήκη γραμμής τάσης (trend line), της σχέσης και του συντελεστή συσχέτισης (R ²) για απορρόφηση σε μήκος κύματος 490 nm.....	67
Καμπύλη Βαθμονόμησης 2: Η καμπύλη βαθμονόμησης των πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση (mg/L) με την προσθήκη γραμμής τάσης (trend line), της σχέσης και του συντελεστή συσχέτισης (R ²) για απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm.....	69

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

EPS:	Εξωκυτταρικές Πολυμερείς Ουσίες ή Εξωπολυσακχαρίτες
EI _{24h}	Emulsion Index
EC	Emulsion Capacity Index – Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα
ES	Emulsion Stability Index – Σταθερότητα γαλακτώματος
FA	Flocculation Activity
λ:	Μήκος Κύματος
LDL	Χοληστερόλη Χαμηλής Πυκνότητας
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery – Μικροβιακά Βελτιωμένη Ανάκτηση Πετρελαίου
PCR:	Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
UV – Vis:	Ultraviolet – Visible, Υπεριώδες – Ορατό
CMC	Critical Micelle Concentration, Κρίσιμη Συγκέντρωση Μικκυλίων
PHA	Πολυυδροξυαλκανοϊκά Βιοπλαστικά
SMP	Soluble Microbial Products, Διαλυτά Μικροβιακά Προϊόντα
HLB	Υδρόφιλης – Λιπόφιλης Ισορροπίας

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

- Tween 80: Tween ή Πολυσορβικό είναι μια χημική επιφανειοδραστική ουσία με παχύρρευστη υδροδιαλυτή μορφή που συχνά χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής και διαλυτοποιητής.
- Triton X-100: Triton X-100 είναι μη ιοντική επιφανειοδραστική ουσία με μια υδρόφιλη και μια υδρόφοβη ομάδα που συχνά χρησιμοποιείται για τη λύση κυττάρων, εκχύλιση πρωτεϊνών ή οργανιδίων, για γαλακτωματοποίηση και διαλυτοποίηση.
- EPS: Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ή Εξωπολυσακχαρίτες
- Gums: Πολυσακχαρίτες φυσικής προέλευσης, που μπορεί να προκαλέσουν μια μεγάλη αύξηση του ιξώδους ενός διαλύματος, ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

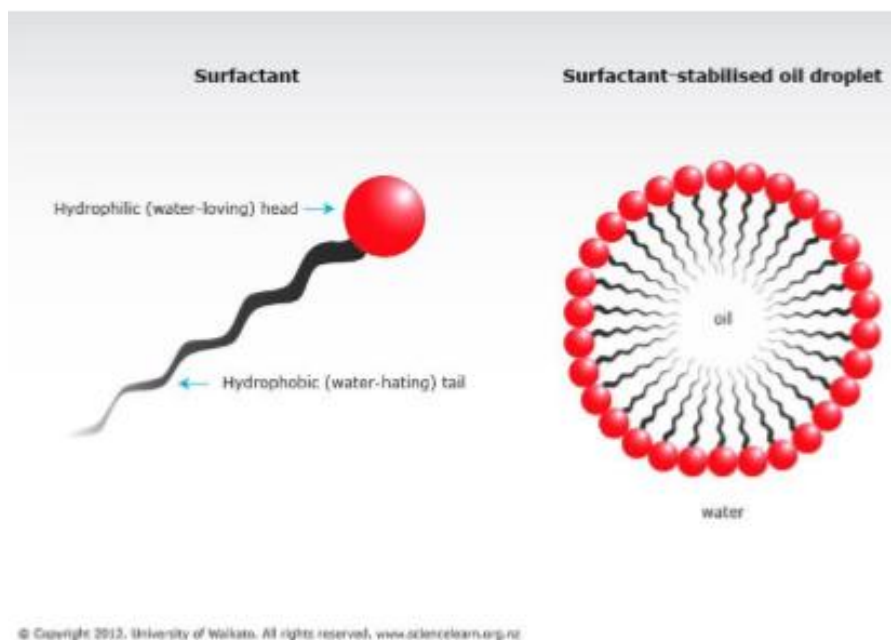
Στις μέρες μας, έχοντας να αντιμετωπίσουμε τις τεράστιες οικονομικές προκλήσεις του 21^{ου} αιώνα σε συνδυασμό με τη συνεχή ανάγκη για κατανάλωση ενέργειας οδήγησαν στη προώθηση και εξέλιξη του κλάδου της Βιοτεχνολογίας για την παραγωγή χρήσιμων ενεργειακών προϊόντων. Η Βιοτεχνολογία, προάγει το σύνολο των εμπορικών τεχνικών που χρησιμοποιούν έμβιους οργανισμούς, ή ουσίες που προέρχονται από αυτούς για την παραγωγή ή την τροποποίηση κάποιου προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση των χαρακτηριστικών οικονομικά σημαντικών φυτών και ζώων και για την ανάπτυξη μικροοργανισμών για επίδραση στο περιβάλλον (Αμερικάνικο Κογκρέσο, 1984).

Τα τελευταία χρόνια, η αύξηση στην εξερεύνηση των φυσικών πηγών για βιοτεχνολογικές διεργασίες οδήγησε σε ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και καροτενοειδών από αλόφιλους μικροοργανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η επιλογή του μικροοργανισμού αλλά και των κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης αποτελεί πολύ σημαντικό στάδιο για την παραγωγή της επιθυμητής ουσίας. Αρχικά, οι εφαρμογές των ουσιών αυτών επικεντρωνόταν κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών και αργότερα στην βιοϊατρική και την φαρμακοβιομηχανία, Έτσι, η αποκτούμενη γνώση άρχισε να διαχέεται συντελώντας στην παραγωγή προϊόντων με καλύτερους τρόπους, φιλικότερους προς το περιβάλλον, εξοικονομώντας ενέργεια και δημιουργώντας ποιοτικότερα τελικά προϊόντα προς κατανάλωση. Το γεγονός αυτό καθιστά τους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα τους αλόφιλους να αποτελούν μια πολύ μεγάλη ομάδα με τεράστια θεωρητική και πρακτική σημασία.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι ουσίες όπου το μόριο τους αποτελείται από μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά, για τον λόγο αυτό ονομάζονται και αμφίφιλες. Λόγω της δομής τους, οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες παρουσιάζουν την ιδιότητα μείωσης της επιφανειακής (υγρού – αέρα) και διεπιφανειακής (υγρού – υγρού) τάσης καθώς επίσης, επηρεάζουν και τον τρόπο με τον οποίο τα άλλα μόρια συμπεριφέρονται στις διεπιφάνειες και σε ένα διάλυμα. Το υδρόφιλο τμήμα του μορίου προσανατολίζεται στο εξωτερικό του συσσωματώματος και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια προς πολικές ομάδες και μόρια όπως, το νερό. Αντίθετα, στο υδρόφοβο τμήμα συσσωματώνονται σε διεπιφάνειες, προς το εσωτερικό (Πάκου 2010) (Σχήμα 1). Επίσης, το υδρόφιλο τμήμα μπορεί να είναι οξύ, πεπτιδίο ή μόνο/πολυσακχαρίτης ενώ, το υδρόφοβο τμήμα μπορεί να είναι κορεσμένος ή ακόρεστος υδρογονάνθρακας ή λιπαρό οξύ.



Σχήμα 1: Δομή επιφανειοδραστικών ουσιών και η δράση τους στο νερό (Δαβρής Γ. 2013).

Οι ιδιότητες που παρουσιάζουν οι ουσίες αυτές, τις καθιστούν εξαιρετικά χρήσιμες σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα, στο τομέα παραγωγή καλλυντικών, απορρυπαντικών, χρωμάτων, υφασμάτων, πολυμερών, για γαλακτωματοποίηση, αφρισμό, πύκνωση, καθαρισμό, ύγρανση, διασπορά ή διαλυτοποίηση κ.α. (Van Hamme et al, 2006).

Επιπλέον, εκτός από τις χημικά συντιθέμενες επιφανειοδραστικές ουσίες όπως, SDS, CTAB, Triton X-100, Tween 80, κυρίως πετρελαϊκού χαρακτήρα, που είναι συνήθως τοξικές και μη-βιοδιασπώμενες (Fernando Bautista et al. 2009), υπάρχουν και οι αντίστοιχες μικροβιακής προέλευσης επιφανειοδραστικές ουσίες γνωστές ως βιοεπιφανειοδραστικές.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν οι ουσίες αυτές, αλλά και του μεγάλου εύρους διαθεσιμότητάς τους έχουν λάβει ιδιαίτερης προσοχής από την επιστημονική κοινότητα στον τομέα της έρευνας καθώς, είναι μη-τοξικές, βιοδιασπώμενες και παρουσιάζουν όλα τα πλεονεκτήματα των χημικά συντιθέμενων επιφανειοδραστικών ουσιών. Ακόμη, ένας σημαντικός αριθμός βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών παρουσιάζει αποτελεσματικότερες και ειδικότερες επιφανειοδραστικές ιδιότητες από τις χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες παρέχοντας έτσι, δυνατότητες για νέες βιομηχανικές εφαρμογές. Οι κυριότερες εφαρμογές των ουσιών αυτών είναι στο τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος μέσω της υποβάθμιση υδρογονανθράκων στο περιβάλλον του εδάφους, στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από το μολυσμένο έδαφος και υδρογονανθράκων από το υδάτινο περιβάλλον, σε βιολογικά φυτοφάρμακα, στη παρασκευή φαρμάκων και καλλυντικών, στη βιομηχανία πετρελαίου μέσω της ανάκτησης πετρελαίου και στο τομέα της γεωργίας και των τροφίμων (Das & Mukherjee, 2007). Όμως, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες δεν είναι σε θέση ακόμη να ανταγωνιστούν τις χημικές επιφανειοδραστικές ουσίες λόγω, του υψηλότερου κόστους παραγωγής τους (Gautam & Tyagi, 2006, Pacwa et al, 2011). Το μέλλον των ουσιών αυτών εξαρτάται απόλυτα από την οικονομική ισορροπία μεταξύ του κόστους παραγωγής τους, τα λειτουργικά οφέλη και την ανάπτυξη των οικονομικών διαδικασιών με τη χρήση χαμηλού κόστους πρώτων υλών (Cameotra & Makkar, 1998, Desai & Banat, 1997).

1.1.1 Κατηγορίες επιφανειοδραστικών ουσιών

Οι χημικά επιφανειοδραστικές ουσίες, είναι συνήθως κατανεμημένες σύμφωνα με τη φύση των πολικών ομάδων τους, αντίθετα, οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες κατανέμονται κυρίως με βάση τη χημική σύνθεση και τη μικροβιακή τους προέλευση (Pacwa et al, 2011). Τα μικρού μοριακού βάρους μόρια είναι αποτελεσματικότερα στη μείωση της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης, ενώ τα υψηλού μοριακού βάρους, πολυμερή, δρουν αποτελεσματικότερα ως γαλακτωματοποιητές – σταθεροποιητές (Rosenberg & Ron, 1999; Calvo et al, 2009). Οι σημαντικότερες κατηγορίες μικρού μοριακού βάρους περιλαμβάνουν λιποπεπτίδια, γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια, ενώ αυτές με υψηλό μοριακό βάρος

περιλαμβάνουν αμφιπαθείς πολυσακχαρίτες, πολυμερείς ουσίες, πρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και λιποπρωτεΐνες (Δάβρης Γ. 2013).

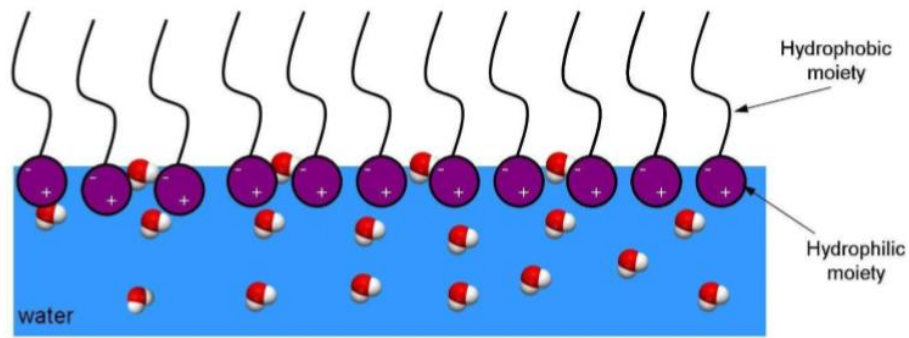
Επιπλέον, οι επιφανειοδραστικές ουσίες διακρίνονται με βάση το φορτίο τους σε ανιονικούς, κατιονικούς, μη ιονικούς και αμφοτερικούς. Οι ανιονικοί έχουν αρνητικό φορτίο στο υδρόφιλο άκρο τους και είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι στην παρασκευή σαμπουάν, λόγω των άριστων ιδιοτήτων τους, στον καθαρισμό και την περιποίηση μαλλιών. Οι κατιονικοί έχουν θετικό φορτίο στο άκρο τους και έχουν απολυμαντικές και συντηρητικές ιδιότητες καθώς επίσης, χρησιμοποιούνται στο δέρμα για τον καθαρισμό τραυμάτων ή εγκαυμάτων. Οι μη ιονικοί δεν φέρουν κανένα φορτίο στο υδρόφιλο άκρο τους, είναι λιγότερο ερεθιστικοί από άλλα ανιονικά ή κατιονικά επιφανειοδραστικά και έχουν υψηλό δυναμικό γαλακτωματοποίησης. Οι αμφοτερικοί είναι επιφανειοδραστικά πολύ ήπια, κάτι το οποίο τα καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλα για χρήση σε παρασκευάσματα προσωπικής φροντίδας για ευαίσθητα δέρματα. Μπορούν να είναι ανιονικά, κατιονικά ή μη-ιονικά στο διάλυμα, ανάλογα με την οξύτητα ή το pH του νερού. Οι συγκεκριμένες επιφανειοδραστικές ουσίες μπορεί να περιέχουν και δύο φορτισμένες ομάδες με διαφορετικό πρόσημο. Τέλος, τα τασιενεργά αυτά παρουσιάζουν εξαιρετικές δερματολογικές ιδιότητες (Manisha et al,2009).

1.1.2 Ιδιότητες βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, αλλά και το μεγάλο εύρος διαθεσιμότητάς τους έχουν λάβει ιδιαίτερης προσοχής από την επιστημονική κοινότητα στον τομέα της έρευνας. Οι σημαντικότερες ιδιότητές που παρουσιάζουν οι ουσίες αυτές αναφέρονται περιληπτικά πιο κάτω.

1.1.2.1 Μείωση επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης

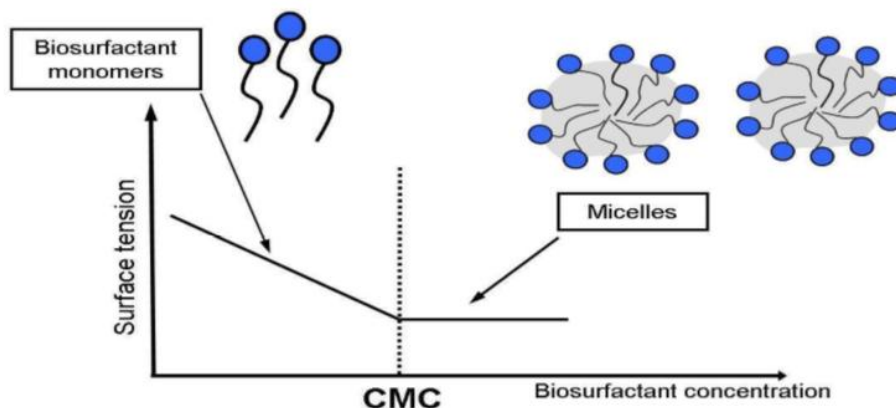
Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών ή μεταξύ ενός υγρού και ενός στερεού. Με τη μείωση της επιφανειακής (υγρού – αέρα) και της διεπιφανειακής (υγρού – υγρού) τάσης μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ δύο ανόμοιων φάσεων και επιτρέπουν σε αυτές τις φάσεις να αναμιχθούν και να αλληλεπιδράσουν πιο εύκολα (Σχήμα 2) (Soberón-Chávez et al, 2011).



Σχήμα 2: Συσσώρευση βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στη διεπιφάνεια μεταξύ υγρού και αέρα.

Με βάση την βιβλιογραφία μία καλή επιφανειοδραστική ουσία μπορεί να μειώσει την επιφανειακή τάση του νερού, από 72 σε 35 mN/m και τη διεπιφανειακή τάση νερού – δεκαεξανίου από 40 σε 1 mN/m. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπερασματικά ότι οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι αποτελεσματικότερες και αποδοτικότερες και η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων τους (Critical Micelle Concentration, CMC) είναι περίπου 10 – 40 φορές μικρότερη σε σχέση με τις χημικά συντιθέμενες επιφανειοδραστικές ουσίες (Desai & Banat, 1997).

Επίσης, οι ιδιότητες των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτώνται άμεσα από τη συγκέντρωση των επιφανειακά ενεργών ενώσεων, μέχρι να φθάσει η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC). Για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τη CMC, τα βιοεπιφανειοδραστικά μόρια συνδέονται και σχηματίζουν μικκύλια, κυστίδια και διπλοστοιβάδες όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3. Η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων ως επί το πλείστον χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας της επιφανειοδραστικής ουσίας. Ακόμη, μέσω της μικυλλιοποίησης μπορούν οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες να μειώσουν την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση και να αυξήσουν τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των υδρόφοβων οργανικών ενώσεων (Whang et al, 2008).



Σχήμα 3: Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης βιοεπιφανειοδραστικής ουσίας, επιφανειακής τάσης και σχηματισμού μικκυλίων (Whang et al, 2008).

Παρατηρείται ότι, όταν υπάρχει χαμηλή κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (CMC) οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι πιο αποτελεσματικές, άρα απαιτείται λιγότερη ποσότητα των ουσιών αυτών για να μειώσουν στον ίδιο βαθμό την επιφανειακή τάση (Desai & Banat, 1997).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η μικυλλιοποίηση παίζει καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων (Nguyen et al, 2008). Τα μικρογαλακτώματα είναι σταθερά και σαφή υγρά μίγματα νερού και ελαίου διαχωριζόμενα από μονοστοιβάδες ή συσσωματώματα βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών όπως, εξωπολυσακχαριτών. Ο σχηματισμός τους πραγματοποιείται όταν μια υγρή φάση διασπείρεται σαν σταγονίδια σε μια άλλη υγρή φάση, για παράδειγμα έλαιο διασπείρεται σε νερό όπου έχουμε το άμεσο μικρογαλάκτωμα ή νερό διασπείρεται σε έλαιο όπου έχουμε το αντίστροφο μικρογαλάκτωμα (Desai & Banat, 1997).

Η αποτελεσματικότητα των βιοεπιφανειοδραστικών προσδιορίζεται με μέτρηση της ικανότητας αλλαγής της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης, τη μελέτη υδρόφιλης – λιπόφιλης ισορροπίας (HLB) και τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων. Ένας καθοριστικός παράγοντας για την κατανόηση πως σχετίζεται ένα βιοεπιφανειοδραστικό με το γαλάκτωμα νερού – ελαίου ή ελαίου – νερού είναι η τιμή της υδρόφιλης – λιπόφιλης ισορροπίας (HLB). Ο παράγοντας αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της κατάλληλης εφαρμογής των βιοεπιφανειοδραστικών. Γαλακτωματοποιητές με χαμηλή τιμή υδρόφιλης – λιπόφιλης ισορροπίας (HLB) είναι λιπόφιλες για να σταθεροποιήσουν το γαλάκτωμα νερού σε λάδι, ενώ γαλακτωματοποιητές με υψηλή τιμή υδρόφιλης – λιπόφιλης ισορροπίας (HLB) έχουν αντίθετο αποτέλεσμα και παρέχουν καλύτερη διαλυτότητα στο νερό (Desai & Banat, 1997, Christofi & Ivshina, 2002). Τέτοια παραδείγματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής έρευνας.

1.1.2.2 Βιοαποικοδομησιμότητα

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες αποικοδομούνται πιο εύκολα σε σύγκριση με τις συνθετικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Mohan et al, 2006) και είναι κατάλληλες για περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως, διασπορά πετρελαιοκηλίδων και βιοεπανόρθωση (Mulligan, 2005).

1.1.2.3 Χαμηλή τοξικότητα

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες είναι μη ή ελάχιστα τοξικές ουσίες και για το λόγο αυτό θεωρούνται κατάλληλες για βιομηχανική χρήση στο τομέα των φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων (Karadia & Yagnik, 2013). Μέσα από έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι τα βιοεπιφανειοδραστικά παρουσιάζουν χαμηλότερη αιμολυτική δραστηριότητα σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια σε σχέση με συνθετικά επιφανειοδραστικά κατιονικά ή ανιονικά (Dehghan et al, 2005). Επιπλέον, οι ουσίες αυτές δεν δημιουργούν επιβλαβή επίδραση στην καρδιά, το ήπαρ, τους πνεύμονες και τους νεφρούς (Hwang et al, 2011).

1.1.2.4 Σχηματισμός και αποδόμηση γαλακτωμάτων

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να παράγουν σταθερά γαλακτώματα με διάρκεια ζωής μήνες ακόμη και χρόνια (Velikonja & Kosaric, 1993) ενώ, έχουν και την ικανότητα να σταθεροποιούν ή να αποσταθεροποιούν γαλακτώματα. Τα υψηλού μοριακού βάρους μόρια είναι σε γενικές γραμμές καλύτεροι γαλακτωματοποιητές από τα μικρού μοριακού βάρους.

1.1.2.5 Χημική ποικιλομορφία

Η μεγάλη ποικιλία των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών τα οδηγεί σε μία πολύ ενδιαφέρουσα ομάδα υλικών με πληθώρα εφαρμογών, στη γεωργία, τα τρόφιμα, την υγειονομική περίθαλψη, τη δημόσια υγεία, την αξιοποίηση αποβλήτων και στον έλεγχο της περιβαλλοντικής ρύπανσης μέσα από την αποδόμηση των υδρογονανθράκων που υπάρχουν στο έδαφος.

1.1.2.6 Ανθεκτικότητα έναντι αλατότητας, θερμοκρασίας και pH

Η σταθερότητα που παρουσιάζουν οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες σε ακραίες συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας και pH είναι μια από τις σημαντικότερες ιδιότητές και ο κύριος λόγος που τους προσδίδει αμέτρητες βιομηχανικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Έτσι, και ο απομονωθέντας αλόφιλος μικροοργανισμός της παρούσας πτυχιακής εργασίας *Halomonas sp. RPA5* παρουσιάζει αυτές τις ιδιότητες που τον καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό για περαιτέρω έρευνα αλλά και για πληθώρα βιομηχανικών εφαρμογών.

1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Η παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών σε θρεπτικό, φυσικοχημικό και γενετικό επίπεδο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Ένας από τους βασικούς παράγοντες είναι η ποικιλία των θρεπτικών μέσων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Οι διαφορετικές πηγές άνθρακα, αζώτου, μετάλλων, σιδήρου, φωσφορικών και αλάτων αυτών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή τους. Σημαντικοί παράγοντες για την παραγωγή των βιοεπιφανειοδραστικών είναι επίσης και οι συνθήκες ανάπτυξης, αλλά και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως, pH, θερμοκρασία, αλατότητα, ανάδευση και η διαθεσιμότητα του οξυγόνου.

1.1.4 Εφαρμογές βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών

Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν πλέον μεγάλο αριθμό βιομηχανικών εφαρμογών και έχουν αντικαταστήσει σε πολλές περιπτώσεις τα χημικώς συντιθέμενα επιφανειοδραστικά. Σε αυτό συνέτειναν αφενός οι εξαιρετικές τους ιδιότητες και αφετέρου η περιβαλλοντική τους αποδοχή, αφού είναι ουσίες εύκολα βιοαποικοδομήσιμες με χαμηλή τοξικότητα.

Μερικές από τις εφαρμογές τους είναι στην υποβάθμιση υδρογονανθράκων στο περιβάλλον του εδάφους, στην ανάκτηση πετρελαίου, στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από το μολυσμένο έδαφος και υδρογονανθράκων από το υδάτινο περιβάλλον, στην βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

1.1.4.1 Διεργασίες υποβάθμισης και αποκατάστασης υδρογονανθράκων

Είναι πλέον γεγονός ότι η αλόγιστη παραγωγή και χρήση των υδρογονανθράκων έχει αναπόφευκτα οδηγήσει σε εκτεταμένη ρύπανση του περιβάλλοντος. Οι υδρογονάνθρακες είναι ουσίες τοξικές και επιδρούν αρνητικά στους ζωντανούς οργανισμούς. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να καθαρισθούν οι ρυπασμένες περιοχές. Οι υδρογονάνθρακες, οι οποίοι συνιστούν υδρόφοβες οργανικές χημικές ουσίες, παρουσιάζουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: α) περιορισμένη διαλυτότητα στα υπόγεια ύδατα, β) μέτρια έως κακή ανάκτηση με χρήση φυσικο-χημικών μεθόδων, γ) περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα σε μικροοργανισμούς και δ) περιορισμένη διαθεσιμότητα σε οξειδωτικά και αναγωγικά χημικά (Magdalena et al, 2011). Η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών είναι μια υποσχόμενη μέθοδος που μπορεί να καταστήσει πιο αποτελεσματική την βιοεπανόρθωση ρυπασμένων περιοχών. Οι ουσίες αυτές μπορούν να βοηθήσουν την βιοαποκατάσταση υδρογονανθράκων με δύο σημαντικούς μηχανισμούς: α) περιλαμβάνει την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας

υποστρώματος για τους μικροοργανισμούς και β) την αλληλεπίδραση με την επιφάνεια του κυττάρου αυξάνοντας την υδροφοβικότητα της επιτρέποντας ευκολότερα τη σύνδεση υδρόφοβων υποστρωμάτων με βακτηριακά κύτταρα (Mulligan & Gibbs, 2004). Μειώνοντας την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάσης, τα βιοεπιφανειοδραστικά αυξάνουν τις επιφανειακές περιοχές των αδιάλυτων ενώσεων οι οποίες οδηγούν σε αύξηση της κινητικότητας και βιοδιαθεσιμότητας των υδρογονανθράκων. Έτσι, ενισχύεται η βιοαποικοδόμηση και η απομάκρυνσή τους. Επίσης, τα βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να ενισχύσουν την βιοαποικοδόμηση υδρογονανθράκων με κινητοποίηση, διαλυτοποίηση ή γαλακτωματοποίηση (Nguyen et al, 2008; Déziel et al, 1996; Bai et al, 1997; Rahman et al, 2003; Urum & Pekdemir, 2004; Nieves et al, 2008).

1.1.4.2 Μικροβιακή αύξηση της ανάκτησης πετρελαίου

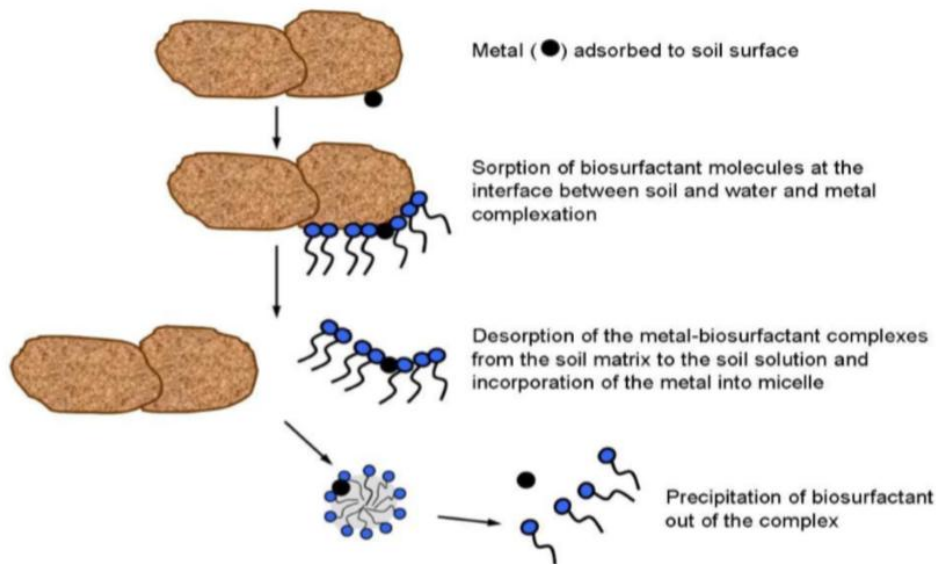
Οι βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να συμμετέχουν και στην Μικροβιακή Βελτιωμένη Ανάκτηση Πετρελαίου (MEOR). Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται για την άντληση πετρελαίου που παραμένει μέσα στις δεξαμενές μετά από την πρωτογενή (μηχανική) και δευτεροβάθμια (φυσική) διαδικασία ανάκτησης. Αποτελεί μία σημαντική τριτογενής μέθοδο με τους μικροοργανισμούς ή τα μεταβολικά προϊόντα τους (βιοεπιφανειοδραστικών, βιοπολυμερών, βιομάζας, οξέων, διαλυτών, αερίων και ενζύμων) να χρησιμοποιούνται για την αύξηση της ανάκτηση πετρελαίου από τις δεξαμενές. Η εφαρμογή τους αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και προηγμένες μεθόδους για την ανάκτηση ενός σημαντικού ποσοστού υπολειπόμενου ελαίου. Ως συνήθως, το έλαιο αυτό παραμένει σε τμήματα της δεξαμενής όπου η πρόσβαση είναι δύσκολη και παγιδεύεται στους πόρους μέσω των τριχοειδή πιέσεων (Sen, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι ουσίες αυτές μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ λαδιού – πετρωμάτων και ελαίου – νερού με αποτέλεσμα τη μείωση των τριχοειδών δυνάμεων επιτρέποντας τη διάχυση πετρελαίου διαμέσου των πόρων των πετρωμάτων. Επίσης, τα βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να δεσμευτούν ισχυρά στη διεπαφή ελαίου – νερού δημιουργώντας γαλακτώματα. Έτσι, σταθεροποιείται το εκροφημένο έλαιο στο νερό και απομακρύνεται το ελαίου μαζί με το νερό έγχυσης (Suthar et al, 2008). Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για εκχύλιση ενώσεων υδρογονάνθρακα από πετρελαϊκούς σχιστόλιθους για να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα της ενέργειας του πετρελαϊκού καυσίμου.

1.1.4.3 Αποκατάσταση μετάλλων

Η περιβαλλοντική ρύπανση και ειδικότερα η ρύπανση του εδάφους από βαρέα μέταλλα αποτελεί κίνδυνο τόσο για τον άνθρωπο όσο και για πολλούς άλλους ζωντανούς οργανισμούς του οικοσυστήματος μας. Τα βαρέα μέταλλα είναι πολύ τοξικά γι' αυτό η παρουσία τους ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις παρουσιάζει σοβαρές επιπτώσεις. Στις μέρες μας, έχουν ανακαλυφθεί πολλές τεχνικές για τον καθαρισμό και την αποκατάσταση των εδαφών που ρυπάνθηκαν από βαρέα μέταλλα. Η αποκατάσταση αυτών των εδαφών περιλαμβάνει μη βιολογικές μεθόδους, όπως για παράδειγμα η ανασκαφή, και η διάθεση ρυπασμένου εδάφους σε χώρους υγειονομικής ταφής ή βιολογικές τεχνικές (Aşçi & Nurbaş, 2010). Ακόμη, η απομάκρυνση των μετάλλων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με βιολογικές μεθόδους, όπως τεχνικές που χρησιμοποιούν τα φυτά (phytoremediation) ή με βιοαποκατάσταση μέσω της χρήσης μικροοργανισμών.

Σημειώνεται ότι, τα βαρέα μέταλλα δεν είναι βιοδιασπώμενα όμως μπορούν να μεταφερθούν από μία χημική κατάσταση σε μία άλλη, η οποία μπορεί να αλλάξει την τοξικότητά και την κινητικότητα τους. Διάφορες μορφές των μετάλλων μετασχηματίζονται είτε με μεθόδους αλκυλίωση ή με μεθόδους οξειδοαναγωγής. Επίσης, τα μέταλλα μπορούν να συσσωρευτούν από μικροοργανισμούς μέσω του μεταβολισμού τους παθητικά ή ενδοκυτταρικά, ανάλογα με τον μεταβολισμό πρόσληψη τους. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα των μετάλλων έμμεσα επηρεάζοντας το pH, την παραγωγή ή και την απελευθέρωση ουσιών (Briuns et al, 2000; Ledin, 2000).

Η χρήση των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών για την βιοαποικοδόμηση των ρυπασμένων εδαφών από βαρέα μέταλλα βασίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μέταλλα (Σχήμα 4). Τα ανιονικά βιοεπιφανειοδραστικά σχηματίζουν σύμπλοκα με μέταλλα σε μία μη ιοντική μορφή με ιοντικούς δεσμούς. Έτσι, το σύμπλοκο μετάλλου – βιοεπιφανειοδραστικού απομακρύνεται στο διάλυμα του εδάφους εξαιτίας της μείωση της διεπιφανειακής τάσης. Αντίθετα, τα κατιονικά βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να αντικαταστήσουν τα φορτισμένα ιόντα του μετάλλου.



Σχήμα 4: Μηχανισμός δράσης βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών σε ρυπασμένα εδάφη από βαρέα μέταλλα (Mulligan, 2005).

1.1.4.4 Εφαρμογές στην ιατρική

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρησιμοποίηση και η εμπορική εφαρμογή των βιοεπιφανειοδραστικών στην ιατρική έχει αυξηθεί. Η αντιμυκητιακή, αντιβακτηριδιακή και αντική δράση τους καθιστά τα μόρια αυτά σημαντικά για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών και τη χρησιμοποίησή τους ως θεραπευτικούς παράγοντες. Τα βιοεπιφανειοδραστικά έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την προσκόλληση των παθογόνων οργανισμών σε στερεές επιφάνειες ή σε θέσεις που μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις, και γι' αυτό μπορούν να χρησιμοποιούνται ως μέσα επικάλυψης ιατρικών υλικών για την μείωση σε μεγάλο αριθμό των νοσοκομειακών λοιμώξεων χωρίς να απαιτείται η χρήση συνθετικών φαρμάκων και χημικών ουσιών (Rodrigues et al, 2006).

1.1.4.5 Εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων

Τα βιοεπιφανειοδραστικά παρουσιάζουν πολλές εφαρμογές στον τομέα της επεξεργασίας τροφίμων. Η πιο σημαντική είναι η χρήση τους ως συστατικά σύνθεσης και αντισυγκολλητικούς παράγοντες. Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων, οι αντισυγκολλητικές, σταθεροποιητικές και αντιμικροβιακές δράσεις τους είναι σημαντικές ιδιότητες οι οποίες θα μπορούσαν να διερευνηθούν στην επεξεργασία και τη σύνθεση τροφίμων. Εκτός από το να δρουν ως παράγοντες μείωσης της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης, προωθώντας τον σχηματισμό και την σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων παρουσιάζουν και πολλές άλλες

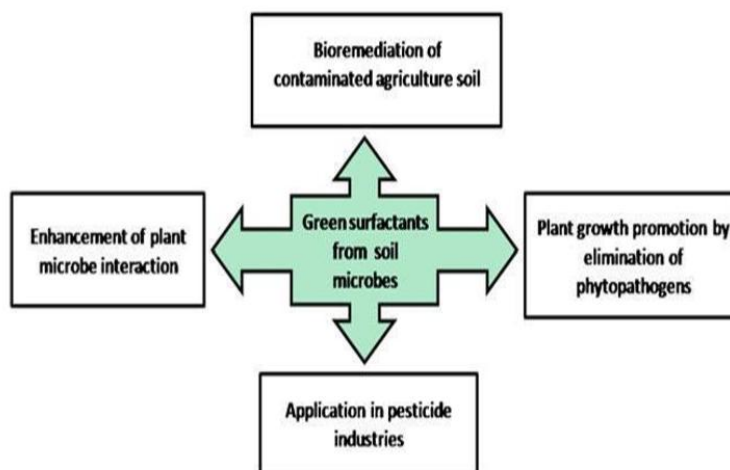
λειτουργίες στα τρόφιμα όπως, η σταθεροποίηση αεριούχων συστημάτων και ο έλεγχος της συσσωμάτωσης των σφαιριδίων λίπους (Kachholz & Schlingmann, 1987).

Στο τομέα της αρτοποιίας και του παγωτού τα βιοεπιφανειοδραστικά δρουν ως επιβραδυντές παλαίωσης και διαλυτοποίησης αρωματικών ελαίων. Επιπλέον, αυτά χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές λίπους και αντι-πιτσιλιστικοί παράγοντες κατά το μαγείρεμα ελαίων και λιπών (Kosaric, 2001). Επίσης, με την προσθήκη ραμνολιπιδίου μπορεί να βελτιωθεί η σταθερότητα της ζύμης, η υφή, ο όγκος και η διατήρηση των προϊόντων αρτοποιίας (Van Haesendonck & Vanzeveren, 2004).

Τέλος, χρησιμοποιούνται για την παροχή ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων στους καταναλωτές. Η βακτηριακή παρουσία σε επιφάνειες βιομηχανιών τροφίμων αποτελεί δυνητικές πηγές μόλυνσης, οι οποίες πιθανότατα θα οδηγήσουν στην αλλοίωση των τροφίμων και στην μετάδοση ασθενειών (Hood & Zottola, 1995).

1.1.4.6 Εφαρμογές στη γεωργία

Με βάση την διπλή υδρόφοβη και υδρόφιλη φύση των βιοεπιφανειοδραστικών είναι προφανές ότι μπορούν να αξιοποιηθούν ευρέως και στο τομέα της γεωργίας (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Εφαρμογές των βιοεπιφανειοδραστικών στη γεωργία (Dhara & Swaranjit, 2013).

Η παρουσία οργανικών και ανόργανων ρύπων είναι παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την παραγωγικότητα της γεωργικής γης. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικά στην απομάκρυνση υδρογονανθράκων και βαρέων μετάλλων, και ταυτόχρονα βοηθούν στη βελτίωση της ποιότητας του χώματος (Sun et al, 2006). Επίσης, ενισχύουν την αποικοδόμηση ορισμένων

χημικών εντομοκτόνων που συσσωρεύονται στο γεωργικό έδαφος (Zhang et al, 2011). Ακόμη, λόγω της αντιμικροβιακής δράσης τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα φυτοφαρμάκων ως συστατικά έναντι παθογενειών των φυτών. (Dhara & Swaranjit, 2013).

1.1.4.7 Εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών

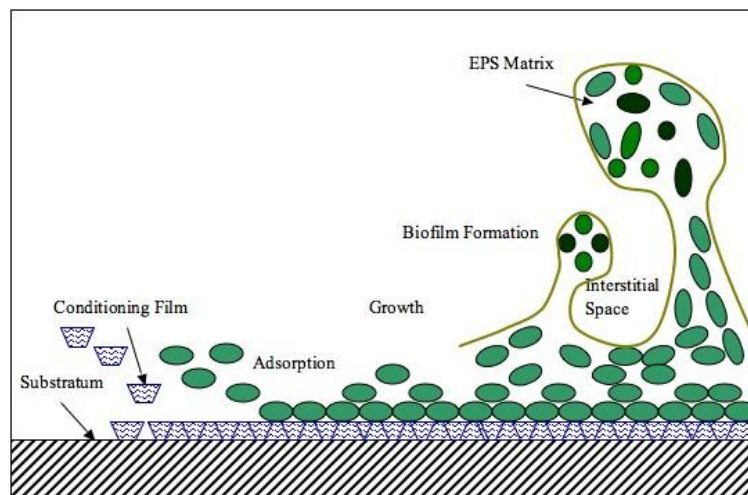
Η βιομηχανία καλλυντικών αποτελεί ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών για τις βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες καθώς, χρησιμοποιούνται σε σαμπουάν και σε πολλά προϊόντα όπως, αποσμητικά, οδοντόπαστες, υγρά φακών επαφής και προϊόντα περιποίησης σώματος (Williams, 2009). Στη χρήση τους αυτή συντελούν οι ενυδατικές ιδιότητες τους καθώς και η συμβατότητά τους με το δέρμα.

1.2 Εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ή Εξωπολυσακχαρίτες (EPS)

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ασχοληθήκαμε κατά αποκλειστικότητα με βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες και συγκεκριμένα με τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ή εξωπολυσακχαρίτες (EPS). Οι EPS είναι ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς στο γύρω περιβάλλον τους έχοντας την τάση να παράγουν βιοφίλμ (Staudt C et al, 2004). Τα EPS καθορίζουν τη δομή και τις λειτουργίες του βιοφίλμ ενώ θεωρούνται το βασικό συστατικό που καθορίζει τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες ενός βιοφίλμ (Flemming et al, 2004). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για την αξία των EPS είναι το σχήμα, η χρώση, η πολικότητα, η υδροφοβικότητα και η ευελιξία στο να επηρεάζει την ικανότητά προσρόφησης σε επιφάνειες και άλλα EPS.

Τα EPS αποτελούνται κυρίως από μονοσακχαρίτες και πρωτεΐνες, αλλά περιλαμβάνουν και μακρομόρια όπως DNA, λιπίδια, νουκλεϊνικά οξέα και χουμικές ουσίες. Οι μονοσακχαρίτες που εμφανίζονται συχνά στα EPS είναι εξόζες, πεντόζες, ουρονικά οξέα, και αμινοσάκχαρα και συνδέονται μεταξύ τους από 1,4-β- ή 1,3-β- δεσμούς με ισχυρή δομή και πολυμερούς ακαμψία ενώ, οι 1,2-α- ή 1,6-α- δεσμοί είναι γενικά παρόν στους εύκαμπτους πολυσακχαρίτες. Τα EPS είναι το κατασκευαστικό υλικό για τις αποικίες των βακτηρίων και παραμένουν προσκολλημένοι στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου ή εκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης τους. Αυτές οι ενώσεις είναι σημαντικές στον σχηματισμό βιοφίλμ και στην προσκόλληση κυττάρων σε διάφορες επιφάνειες. Το EPS αποτελεί το 50 % έως 90 % της συνολικής οργανικής ύλης ενός βιοφίλμ (Flemming et al, 2004 & Donlan RM et al,

2002. Τα βιοφίλμ λειτουργούν ως προστατευτική μήτρα για το κύτταρο και παρουσιάζουν δομική ετερογένεια και πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 6). Κυρίως, εμφανίζονται σε συμπαγή υποστρώματα και υδατικά διαλύματα και είναι εμφανή με γυμνό μάτι σε μεγάλη ανάπτυξή τους. Είναι πιθανόν να περιέχουν ποικιλία μικροοργανισμών εκτελώντας εξειδικευμένες μεταβολικές δραστηριότητες όπως, να επικοινωνούν και ανταλλάσσουν θρεπτικά συστατικά μεταξύ τους (Staudt C et al, 2004 & Flemming et al, 2004). Οι μικροοργανισμοί αυτοί συνθέτουν ένα ευρύ φάσμα πολυσακχαριτών, είτε αυτοί είναι ενδοκυτταρικοί, δομικοί, και εξωκυτταρικοί με σκοπό την προστασία του κυττάρου από τις αντίξοες συνθήκες ελέγχοντας παράλληλα τις ουσίες που εισέρχονται και εξέρχονται από αυτό.



Σχήμα 6: Σχηματισμός εξωκυτταρικής πολυμερικής μήτρας πάνω σε ένα βιοφίλμ.

Ουσιαστικά, τα EPS αποτελούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα βιοφίλμ με μορφή γέλης, που είναι ιδιαίτερα ενυδατωμένο και συχνά φορτισμένο, όπου οι μικροοργανισμοί ενσωματώνονται και ακινητοποιούνται σε αυτό. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παραγωγή τους είναι μια άμεση αντίδραση στις περιβαλλοντικές πιέσεις, όπως, η θερμοκρασίας, το pH, η πίεση, η ακτινοβολία και η οσμωτικής πίεσης. Τα EPS που παράγονται από αρχαία, οξεόφιλους ή θερμόφιλους μικροοργανισμούς μπορούν να προσαρμοστούν σε αυτές τις ακραίες συνθήκες καθώς, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη προσαρμογή των μικροοργανισμών δημιουργώντας παράλληλα ένα περιβάλλον που επιτρέπει τη διατήρησή τους για επιβίωση.

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή των βιοφίλμ είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών, η βακτηριακή κινητικότητα, οι υδροδυναμικές συνθήκες, η μεσοκυττάρια

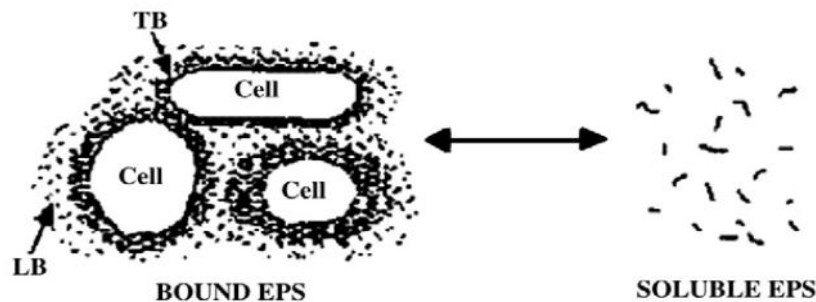
επικοινωνία, οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μέσα από την αλλαγή της μορφολογία των παραγόμενων βιοφίλμ από μεταλλαγμένα συστατικά που στερούνται της παρουσίας των EPS.

Επιπλέον, τα EPS προωθούν το σχηματισμό κροκιδωτικών (bioflocs) τροποποιώντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιακών αδρανών υλικών, νηματοειδή βακτηριακών στελεχών και οργανικών και ανόργανων σωματιδίων, μπορούν όμως να επηρεαστούν από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, η αλατότητα και η θερμοκρασία. Οι εξωπολυσακχαρίτες αυτοί κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την θέση τους στο κύτταρο: α) κυτοσολικοί πολυσακχαρίτες οι οποίοι παρέχουν πηγή άνθρακα και ενέργειας για το κύτταρο, β) αυτοί που συνθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και περιλαμβάνουν πεπτιδογλικάνες, αμινοξέα και λιποσακχαρίτες, γ) και τέλος αυτοί που βρίσκονται στο εξωτερικό περιβάλλον σχηματίζοντας βιοφίλμ.

1.2.1 Κατηγορίες εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Τα EPS διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα διαλυτά EPS (Soluble EPS) και στα δεσμευμένα EPS (Bound EPS) (Σχήμα 7). Τα διαλυτά EPS αποτελούνται από τα ίδια συστατικά με τα διαλυτά μικροβιακά προϊόντα (Soluble Microbial Products, SMP) όπου, είναι διαλυτές οργανικές ενώσεις που απελευθερώνονται στο διάλυμα κατά την κυτταρική λύση (αποσύνθεση της βιομάζας), εκκρίνονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του υποστρώματος (ανάπτυξη βιομάζας) και χάνονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.

Τα δεσμευμένα EPS είναι αυτά που ασχοληθήκαμε στην παρούσα πτυχιακή εργασία και αποτελούνται από μια δομή διπλής στρώσης, η οποία υποδιαιρείται στα χαλαρά δεσμευμένα EPS (Loosely Bound EPS, LB-EPS) και στα συνεκτικά δεσμευμένα EPS (Tightly Bound EPS, TB-EPS). Η υποδιαίρεση αυτή εξαρτάται από τη δύναμη της οριοθέτησης μεταξύ των EPS και των κυττάρων. Για το διαχωρισμό αυτής της κατηγορίας EPS χρησιμοποιείται κυρίως η μέθοδος της φυγοκέντρησης όπου, δημιουργούνται τα χαλαρά συνδεδεμένα που απελευθερώνονται στο υπερκείμενο υγρό (LB-EPS) και αυτά που παραμένουν στο κύτταρο (TB-EPS) (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Δεσμευμένα EPS (Bound EPS) παρουσία των χαλαρά δεσμευμένων EPS (Loosely Bound EPS, LB-EPS) και των συνεκτικά δεσμευμένα EPS (Tightly Bound EPS, TB-EPS) και διαλυτά EPS (Soluble EPS).

1.2.2 Βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Η βιοσύνθεση των πλείστων εξωπολυσακχαριτών (EPS) πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά αυτά εκκρίνονται εξωκυτταρικά, ως μακρομόρια. Όμως, υπάρχουν και μερικές εξαιρέσεις όπου η βιοσύνθεση και ο πολυμερισμός των εξωπολυσακχαριτών (EPS) πραγματοποιείται εξωκυτταρικά με τη δράση των ενζύμων που μετατρέπουν το υπόστρωμα σε πολυμερές και το εκκρίνουν στο εξωκυτταρικό περιβάλλον τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι οι λεβάνες και οι δεξτράνες.

Η βιοσύνθεση περιλαμβάνει το υπόστρωμα που προσλαμβάνεται από το κύτταρο, την κεντρική οδό του μεταβολίτη και τη σύνθεση του πολυσακχαρίτη. Με βάση τον τύπο του υποστρώματος η πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών από το κύτταρο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ενεργητικό είτε με παθητικό σύστημα μεταφοράς. Στη συνέχεια, το υπόστρωμα μπορεί να καταβολιστεί με ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση ή να μεταφερθεί και να οξειδωθεί αμέσως στη περιπλασματική οξειδωτική οδό. Η ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση είναι παρούσα σε όλα τα βακτήρια, ενώ η περιπλασματική οξειδωτική οδός υπάρχει μόνο σε μερικά βακτήρια. Τα συστήματα αυτά, σε αρκετά στελέχη εξωπολυσακχαριτών (EPS) μπορούν να λειτουργούν και να συνθέτουν ταυτόχρονα πολυσακχαρίτες όταν είναι διαθέσιμο αρκετό υπόστρωμα. Στο κυτταρόπλασμα, το υπόστρωμα καταβολίζεται με τη βοήθεια της γλυκόλυσης και οι κύριοι μεταβολίτες που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες στη σύνθεση των μικρών βιομορίων όπως, αμινοξέα και μονοσακχαρίτες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η έκκριση του EPS είναι μια δύσκολη λειτουργία για το βακτήριο, για παράδειγμα στα υδρόφιλα βακτήρια με υψηλό μοριακό βάρος τα πολυμερή που συναρμολογούνται στο κυτταρόπλασμα πρέπει να διασχίσουν το κύτταρο.

1.2.3 Εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Η έρευνα των EPS τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μεγάλη ανάπτυξη. Μερικές από τις εφαρμογές τους είναι η χρησιμοποίηση τους ως βιολογικά υλικά όπως, η βακτηριακή κυτταρίνη αλλά και ως μέσα τροποποίησης υδατικών συστημάτων όπως, το Xanthangum, Gellan, Dextran. Επιπλέον, πολλά μικροβιακά EPS παρουσιάζουν αναπτυγμένες ιδιότητες που είναι σχεδόν ταυτόσημες με κάποιους φυσικούς πολυσακχαρίτες (gums) οι οποίοι εξάγονται κυρίως από φυτά και άλγη (Suresh & Mody et al, 2009). Έτσι, γίνονται προσπάθειες μέσα από καινοτόμες προσεγγίσεις για να αντικατασταθούν οι φυσικοί πολυσακχαρίτες (gums) με μικροβιακούς πολυσακχαρίτες. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες φυσικής προέλευσης, που μπορεί να προκαλέσουν μια μεγάλη αύξηση του ιξώδους ενός διαλύματος, ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ως παράγοντες πάχυνσης, πηκτωματοποίησης, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές ενώ, σε άλλες βιομηχανίες χρησιμοποιούνται ως συγκολλητικά, συνδετικοί παράγοντες, αναστολείς κρυστάλλωσης, παράγοντες αποσαφήνισης, κροκιδωτικά μέσα, παράγοντες διόγκωσης, σταθεροποιητές αφρού και άλλα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι περισσότεροι αυτοί φυσικοί πολυσακχαρίτες προέρχονται από τα ξυλώδη στοιχεία των φυτών ή από τις φλούδες των σπόρων.

Ακόμη, μπορούν να αντικαταστήσουν τις συνθετικές ταινίες των συσκευασιών με βιοπολυμερή (π.χ. πολυσακχαρίτες), λόγω του ότι είναι μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και μπορούν να παράγονται από ανανεώσιμες πηγές, γεγονός σημαντικό για την επίλυση των οικολογικών προβλημάτων προωθώντας ταυτόχρονα τη βιώσιμη ανάπτυξη (Freitas F et al, 2010).

1.2.3.1 Εμπορικές εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Οι κυριότερες εμπορικές εφαρμογές των EPS παρουσιάζονται σε εξειδικευμένα τμήματα της αγοράς όπως αυτά της βιομηχανίας τροφίμων, ως ενισχυτής γεύσης, παράγοντες πάχυνσης, πηκτωματοποίησης, γαλακτωματοποιητές, σταθεροποιητές, στη παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων, στη βιομηχανία καλλυντικών και στη βιοϊατρικής λόγω της υψηλής καθαρότητας τους, αλλά και τις μοναδικές και επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Επιπλέον, για μεγαλύτερη αποδοτικότητα της διαδικασίας αυτής γίνονται οι απαραίτητες βελτιστοποιήσεις στις συνθήκες ζύμωσης ως προς το pH, τη θερμοκρασία, τη ποσότητα της πηγής άνθρακα και άλλα. Το σημαντικότερο εμπόδιο που παρουσιάζεται στο τομέα της εφαρμογής των EPS είναι το υψηλό κόστος παραγωγής τους λόγω, του ακριβού

υποστρώματος που απαιτείται για την ανάπτυξη τους και οι ενεργοβόρες συνθήκες ανάπτυξής και καθαρισμού τους. Ουσιαστικά, η διαδικασία της ζύμωσης αποτελεί το ένα τρίτο του συνολικού κόστους παραγωγής των EPS και η κύρια αιτία είναι η πηγή άνθρακα που απαιτείται για την ανάπτυξη τους, ανεξάρτητα αν η παραγωγή τους είναι σε μικρή (Εργαστήριο) ή μεγάλη (Βιομηχανική) κλίμακα.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι γίνονται συνεχείς προσπάθειες από την επιστημονική κοινότητα έτσι ώστε να ανακαλυφθούν και να χρησιμοποιηθούν οικονομικά και φιλικά προς το περιβάλλον υποστρώματα ζύμωσης αλλά και παραγωγικές διαδικασίες, διατηρώντας την ποιότητα και την απόδοση των παραγόμενων προϊόντων. Ένα μεγάλο ποσοστό αποβλήτων, αλλά και βιομηχανικών και γεωργικών παραπροϊόντων χρησιμοποιούνται στις μέρες μας ως βασικό θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή χρήσιμων ενεργειακών προϊόντων αξιοποιώντας ένα απόβλητο παράγοντας κάτι χρήσιμο. Ταυτόχρονα, προστατεύεται το περιβάλλον από την απόθεση τους σε αυτό και εξοικονομούνται και χρήματα που θα απαιτούνταν για την επεξεργασία τους. Τα κύρια απόβλητα, αλλά και τα βιομηχανικά και γεωργικά παραπροϊόντων που χρησιμοποιούνται είναι οι μελάσες, τα υγρά απόβλητα από τα ελαιοτριβεία, τυρόγαλα από γαλακτοβιομηχανίες, διάφορα λαχανικά και υπολείμματα φρούτων, καθώς και λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, π.χ. γάστρα, ρύζι και πίτουρο. Η χρησιμοποίηση τέτοιων πολύπλοκων πρώτων υλών απαιτεί εντατικές ερευνητικές δραστηριότητες για την ανάπτυξη διεργασιών όπως αυτή της προεπεξεργασίας, της ζύμωση και άλλες τεχνικές επεξεργασίας. Οι μελάσες έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και καιρό για μικροβιακή παραγωγή διαφόρων πολυσακχαριτών όπως dextran, gellan και levan 65 λόγω της υψηλής σακχαρόζης τους και άλλων θρεπτικών συστατικών, χαμηλού κόστους και εύκολης διαθεσιμότητας, καθώς και της εύκολης αποθήκευσής τους. Επίσης, για την παραγωγή προϊόντων με υψηλή απόδοση απαιτείται η χρήση κλειστών και ελεγχόμενων συστημάτων καλλιέργειας όπως, φωτοβιοαντιδραστήρας (photobioreactors) που είναι αρκετά ακριβά και ενεργοβόρα σε σύγκριση με τα ανοικτά συστήματα.

1.3 Γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς, τα οποία προκύπτουν από την ανάμιξη δύο μη αλληλοδιαλυόμενων υγρών όπου το ένα βρίσκεται διεσπαρμένο σε μορφή πολύ μικρών σφαιριδίων (ασυνεχής φάση) σε όλη τη μάζα του άλλου υγρού (συνεχής φάση). Έτσι, εάν νερό και λάδι αναμειχθούν ισχυρά, τα δύο υγρά διασπείρονται το ένα στην μάζα

του άλλου, με αποτέλεσμα την δημιουργία γαλακτώματος το οποίο καλείται γαλάκτωμα λαδιού σε νερό (O/W). Τέτοια παραδείγματα είναι τα γαλακτώματα μαγιονέζας, γάλατος, κρέμα κ.α. (Σχήμα 8). Τα γαλακτώματα αυτά δεν είναι σταθερά γιατί τα σταγονίδια της ασυνεχούς φάσης με την επιφανειακή τους τάση τείνουν να συσσωματωθούν με αποτέλεσμα την καταστροφή του γαλακτώματος και το διαχωρισμό των δύο φάσεων (Λάγουρη, 2004).



Σχήμα 8: Ηλεκτρονικό μικρογράφημα γαλακτώματος μαγιονέζας. Στη διεπιφάνεια νερού σταγονιδίων λαδιού φαίνεται η συγκεντρωμένη πρωτεΐνη.

Η διάμετρος των σφαιριδίων καθορίζει την εμφάνιση ενός γαλακτώματος. Έτσι, εάν η διάμετρος τους είναι από 0,15 έως 100 μm, τότε το γαλάκτωμα είναι θολό – γαλακτώδη. Από την άλλη, τα μικρογαλακτώματα με διάμετρο από 0,0015 έως 0,15 μm είναι διαφανή και πολύ πιο σταθερά γιατί ο ρυθμός κατακάθισης τους εξαρτάται από τη διάμετρο των σφαιριδίων (Belitz et al, 2006).

Σε ένα γαλάκτωμα η συγκέντρωση των σφαιριδίων περιγράφεται με καμπύλη κατανομής με την κατ' όγκο (κ.ο.) περιεκτικότητα σε σύγκριση με το μέγεθός τους. Η μέθοδος της μείωσης του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα προϋπάρχον γαλάκτωμα ονομάζεται ομογενοποίηση και στη βιομηχανία τροφίμων για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρησιμοποιούνται οι μηχανικές συσκευές γνωστές ως ομογενοποιητές οι οποίες υποβάλλουν τα υγρά σε έντονη μηχανική αναταραχή με εφαρμογή πίεσης. (McClements, 1999).

Τα πραγματικά γαλακτώματα περιέχουν διάφορα μεγέθη σταγονιδίων, περίπου από 0.1 έως μερικές δεκάδες μm δηλαδή, υπάρχει πολυδιασπορά. Το εύρος του μεγέθους των σφαιριδίων μπορεί να παρουσιαστεί ως μια κατανομή μεγέθους σφαιριδίων στην οποία το ποσοστό του

όγκου της διεσπαρμένης φάσης (ή μήκος, εμβαδόν ή αριθμός σωματιδίων) μέσα σε μια δεδομένη σειρά εύρους εκφράζεται ως ιστόγραμμα. Η διάκριση μεταξύ των διανομών όγκου, εμβαδού, μήκους και αριθμού είναι σημαντική και το κάθε ένα προσφέρει στις ιδιότητες του γαλακτώματος. (Coupland, 2007).

Επίσης, οι κύριοι παράμετροι που επηρεάζουν το γαλάκτωμα είναι η γαλακτωματοποιητική ικανότητα της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία, το pH, το ιξώδες, ο ρυθμός προσθήκης του λαδιού η παρουσία σακχάρων, η παρουσία surfactants με μικρό μοριακό βάρος, ο τύπος του λαδιού και η συγκέντρωση διαλύτης πρωτεΐνης.

1.3.1 Ιδιότητες μορίων γαλακτωμάτων τροφίμων

Οι σημαντικότερες ιδιότητες των τροφίμων που βασίζονται σε γαλακτώματα όπως, εμφάνιση, σύσταση και γεύση καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος των σφαιριδίων που περιέχουν τα γαλακτώματα (McClements 1999). Επομένως, είναι σημαντικό για την επιστημονική κοινότητα τροφίμων να μπορούν να ελέγχουν αξιόπιστα, να προβλέπουν, να μετρούν και να αναφέρουν το μέγεθος των σφαιριδίων στα γαλακτώματα.

Ένα γαλάκτωμα καλείται μονοδιάστατο αν όλα τα σφαιρίδια του είναι του ίδιου μεγέθους, ενώ καλείται πολυδιάστατο αν αποτελείται από σφαιρίδια ποικίλου μεγέθους. Σε ένα μονοδιάστατο γαλάκτωμα Το μέγεθος των σφαιριδίων του μπορούν να χαρακτηριστούν πλήρως από μία ιδιότητα, όπως η διάμετρος (d) ή η ακτίνα (r). Τα μονοδιάστατα γαλακτώματα χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μελέτες λόγω του ότι η ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων τους είναι απλούστερη από αυτή των πολυδιάστατων. Όμως, τα γαλακτώματα των τροφίμων περιέχουν ποικιλία μεγέθους σφαιριδίων και έτσι η μέτρηση του μεγέθους τους είναι πιο πολύπλοκη από αυτή των μονοδιάστατων συστημάτων. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις, η γνώση του μέσου μεγέθους των σφαιριδίων και το εύρος της κατανομής μεγέθους τους είναι επαρκής (McClements 1999).

1.3.2 Γαλακτωματοποιητές

Οι γαλακτωματοποιητές είναι ουσίες που το μόριο τους περιέχει μία υδρόφοβη (μη πολική) και μια υδρόφιλη (πολική) ομάδα. Η προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή προκαλεί σταθεροποίηση του γαλακτώματος (Emulsion Stability Index – ES) μέσω του σχηματισμού ενός προστατευτικού υμενίου γύρω από τα αιωρούμενα σφαιρίδιά του μέσα στη διασπορά του υγρού, όπου θα παρεμπόδιζε την συσσωμάτωσή τους. Έτσι, όταν αναδευτεί λάδι με νερό στη παρουσία ενός γαλακτωματοποιητή, το μη πολικό τμήμα των μορίων του στραφεί προς

τα σφαιρίδια του λαδιού ενώ, το πολικό τμήμα του θα προσανατολιστεί προς την υδατική φάση με αποτέλεσμα τα σφαιρίδια του νερού να επικαλυφθούν από ένα ηλεκτρικά φορτισμένο υμένιο που εμποδίζει την συσσωμάτωσή τους και να σταθεροποιηθεί το γαλάκτωμα τους. Η παρασκευή των γαλακτωματοποιητών μπορεί να προέρχεται από βιολογικά υλικά όπως, κρέας, γάλα και αυγό ή προέρχονται από λιπαρά οξέα και τα παράγωγά τους (Λάγουρη 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι, κάθε γαλακτωματοποιητής έχει συγκεκριμένη δυναμικότητα. Αν δυναμικότητα του κάθε γαλακτωματοποιητή φθάσει στο όριο της τότε, η έξτρα προσθήκη εξωτερικής φάσης προκαλεί καταστροφή στο γαλάκτωμα.

Η εφαρμογή των γαλακτωματοποιητών καθορίζεται με βάση τα Επιτρεπόμενα Πρόσθετα Τροφίμων (Αριθμοί Ε), όπως ορίζεται στον σχετικό Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σε συνδυασμό με τη σχετική Κοινοτική Νομοθεσία (Belitz et al, 2006).

Οι κύριοι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι φωσφολιπίδια και αμφίφυλες πρωτεΐνες με σκοπό την αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης και την ενίσχυση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων μέσω της επιβράδυνσης της κίνησης των σφαιριδίων. Οι πολυσακχαρίτες (EPS) σαν γαλακτωματοποιητές χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν το ιξώδες της σταθερής φάσης των γαλακτωμάτων (McClements, 1999).

1.3.3 Βιο-γαλακτωματοποιητές

Οι βιο-γαλακτωματοποιητές είναι υψηλότερου μοριακού βάρους ενώσεις που αποτελούνται από σύνθετα μίγματα ετεροπολυσακχαριτών, λιποπολυσακχαριτών, λιποπρωτεϊνών και πρωτεϊνών (Perfumo et al. 2009). Οι βιο-γαλακτωματοποιητές γαλακτωματοποιούν αποτελεσματικά δύο μη αναμίξιμα υγρά, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά, είναι λιγότερο αποτελεσματικές στη μείωση της επιφανειακής τάσης. Για παράδειγμα, σε ένα έλαιο-μολυσμένο περιβάλλον, ο γαλακτωματοποιητής διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διασπορά των υδρογονανθράκων με σύνδεση και την πρόληψη από τη συγχώνευση τους. Σε σύγκριση με τους χημικά παραγόμενους γαλακτωματοποιητές ανακαλύφθηκε ότι βιο-γαλακτωματοποιητές είναι πιο σταθεροί σε ακραίες συνθήκες όπως, θερμοκρασία, pH και αλατότητα όπως, ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε από την Αλυκή του Ακρωτηρίου και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία (Banatetal. 2000). Οι βιο-γαλακτωματοποιητές είναι απαραίτητοι για το σχηματισμό και την σταθεροποίηση του γαλακτώματος. Μειώνουν την επιφανειακή τάση του ελαίου και ύδατος με το σχηματισμό

ενός προστατευτικού στρώματος γύρω από τα σταγονίδια του γαλακτώματος και του μπλοκ συνένωσης με προσρόφηση μέσω της διεπαφής ελαίου/νερού.

1.4 Ρεολογικές ιδιότητες

Οι μηχανικές ιδιότητες, η υφή, και το ιξώδες των τροφίμων αποτελούν τις βασικές παραμέτρους για την ποιότητα των τροφίμων. Οι έννοιες μαλακό, σκληρό, παχύρρευστο, λεπτόρρευστο, εύπλαστο, υδαρές, κρεμώδεις κ.α. παρουσιάζουν την βασική έννοια της μηχανικής, δηλαδή τη ρεολογική συμπεριφορά. Με την έννοια της ρεολογίας, εννοούμε την επιστήμη που μελετά τις αλλαγές του σχήματος και τις ροές των ρευστών. Επίσης, η ρεολογία των τροφίμων εκτός από τα πιο πάνω, ασχολείται λεπτομερέστατα με θέματα δομής και ιδιοτήτων των τροφίμων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι ρεολογικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της ροής των ρευστών για τα τρόφιμα αλλά και για βιολογικά υγρά όπως, το αίμα.

Στις μέρες μας, η χρησιμοποίηση των ρευστών τροφίμων δηλαδή, αυτών που όταν ρέουν λόγω της βαρύτητας, αλλάζει το σχήμα τους είναι καθημερινή και με ευρεία εφαρμογών. Μερικές από τις εφαρμογές του είναι τα παγωτά που χαρακτηρίζονται ως ρευστά σε κάποια θερμοκρασία και ως στερεά σε κάποια άλλη, οι σάλτσες, ο ντοματοχυμός, οι σούπες, οι παιδικές τροφές, το ντρέσινγκ κ.α.. Ουσιαστικά, αυτά είναι συστήματα διασποράς στερεών σε ρευστό μέσο νερού ή ελαίου σαν αιώρημα. Αντίθετα, αν υπάρχει διασπορά σταγονιδίων μίας φάσης σε κάποια άλλη όπως για παράδειγμα σταγονιδίων ελαίου σε συνεχή φάση νερού, όπως στο γάλα τότε το προϊόν αποτελεί γαλάκτωμα που είναι και η κύρια ιδιότητα που μας ενδιαφέρει για μετέπειτα χρήση και εφαρμογή του υπό μελέτη απομονωθέντα αλόφιλου μικροοργανισμού.

Ο χαρακτηρισμός και διερεύνηση των ρεολογικών ιδιοτήτων των τροφίμων πραγματοποιείται για την ποιοτική αξιολόγηση τους, για το αν τα τρόφιμα αυτά θα είναι αρεστά στους πιθανούς καταναλωτές τους, για το αν θα υπάρχει πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών ενός τροφίμου μέσω της μελέτης των φυσικών και ρεολογικών ιδιοτήτων για παράδειγμα η επίδραση του νερού ή του προστιθέμενου λίπους στις ρεολογικές ιδιότητες και τέλος, για την εξαγωγή αριθμητικών αποτελεσμάτων για τις ρεολογικές παραμέτρους όπως, το ιξώδες, κ.α που μας ενδιαφέρουν για τους υπολογισμούς της ροής των ρευστών στις διάφορες διεργασίες, υπολογισμού μεγέθους και τύπου αντλιών για τη μεταφορά και άντληση των υγρών ή των ημίρρευστων τροφίμων.

1.4.1 Έννοια και ορισμός του ιξώδες

Το ιξώδες αποτελεί την χαρακτηριστικότερη ιδιότητα ρεολογικής συμπεριφοράς ενός ρευστού ή ημίρρευστου προϊόντος. Η φυσική έννοια του ιξώδες είναι η αντίσταση των ρευστών στη ροή δηλαδή, είναι το μέγεθος της εσωτερικής τριβής των μορίων των ρευστών. Το ιξώδες (μ) ορίζεται ως συνήθως αντίστροφο μέγεθος του ποιοτικού μεγέθους της ρευστότητας ($\mu=1/\rho$).

1.5 Υγροβιότοπος Ακρωτηρίου

Η συλλογή των δειγμάτων για την απομόνωση του αλόφιλου μικροοργανισμού με τις προαναφερθέντες ιδιότητες και χαρακτηρίστηκα πραγματοποιήθηκε από τον υγροβιότοπο του Ακρωτηρίου στη Λεμεσό. Ο υγρότοπος του Ακρωτηρίου περιλαμβάνει, την Αλυκή Ακρωτηρίου, τους υγροτόπους γλυκού νερού ή αλλιώς Λιβάδι Φασουρίου, τις υφάλμυρες λίμνες, τις αλοφητικές κοινωνίες και το δάσος maquis (Κ. Καΐλης, 2005).. Το σύνολο των βιοτόπων αυτών αποτελεί τα σημαντικότερα οικοσυστήματα της χώρα μας, παγκοσμίου εμβέλειας λόγω, των σπάνιων ειδών υδρόβιας χλωρίδας και πανίδας.

Όλη περιοχή ανήκει στο έδαφος των Βρετανικών Βάσεων όμως, η Αλυκή είναι υπό τη διαχείριση του Τμήματος Αλιείας και Θαλασσιών Ερευνών, του Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, ενώ τα γειτονικά έλη τα οποία αποτελούν κρατική δασική γη είναι υπό τη διαχείριση του Τμήματος Δασών. Το Τμήμα Δασών εφαρμόζει μέτρα πυροπροστασίας της περιοχής, καθώς και τον Περί Δασών Νόμο. Η Αλυκή είναι απαγορευμένη περιοχή για το κυνήγι, ενώ διάφορες διεθνείς αποφάσεις συμβάλλουν, επίσης, στην προστασία της. Αναφέρεται ότι η Αλυκή μαζί με το Λιβάδι Ακρωτηρίου, έχει κηρυχθεί από το Μάρτιο του 2003, ως Υγρότοπος Διεθνούς Σημασίας στα πλαίσια της Συνθήκης Ραμσάρ. Επιπλέον, η Αλυκή έχει ανακηρυχθεί ως Ειδική Προστατευόμενη Περιοχή σύμφωνα με τη Συνθήκη της Βαρκελώνης, καθώς και ολόκληρη η χερσόνησος έχει χαρακτηριστεί ως Σημαντική Περιοχή Πτηνοπανίδας από το Διεθνή Πτηνολογικό Σύνδεσμο.

1.5.1 Αλυκή Ακρωτηρίου

Η Αλυκή Ακρωτηρίου βρίσκεται στην επαρχία Λεμεσού και είναι η μεγαλύτερη αλυκή σε έκταση στην Κύπρο με περίπου 940 εκτάρια. Είναι μια φυσική κοιλάτητα με το χαμηλότερό της σημείο να βρίσκεται 2,7 μέτρα κάτω από το επίπεδο της επιφάνειας της θάλασσας. Η μισή περίπου έκταση της καλύπτεται από νερό βάθους κάτω από 30 εκατοστά,

δημιουργώντας έτσι ιδανικές συνθήκες για τη διατροφή των υδρόβιων πουλιών (Κ. Καΐλης, 2005). Επίσης, καλύπτεται με υφάλμυρο νερό από τις αρχές Δεκεμβρίου μέχρι και τα τέλη Ιουλίου, οπότε και αρχίζει να ξηραίνεται. Εμπλουτίζεται με φρέσκο νερό από τις ετήσιες βροχοπτώσεις, τις απορροές του νερού των γύρω περιοχών, τις διοχετεύσεις νερού των παρακείμενων ελών του Φασουρίου και το θαλασινό νερό κατά τη διάρκεια καταιγίδων.

Άξιο αναφοράς είναι ο τρόπος σχηματισμού της Αλυκής Ακρωτηρίου. Εκατομμύρια χρόνια πριν, το νότιο άκρο της χερσονήσου Ακρωτηρίου αποτελούσε ένα μικρό ξεχωριστό νησί. Σταδιακά, με προσχώσεις από τους χείμαρρους του Κούρη και του Γαρύλλη, τελικά το νησάκι ενώθηκε με την υπόλοιπη Κύπρο, σχηματίζοντας την Αλυκή (Κ. Καΐλης, 2005).

1.5.2 Χλωρίδα – Πανίδα

Η Αλυκή, καθώς και η ευρύτερη περιοχή Ακρωτηρίου, είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω της βιοποικιλότητας της. Τα πιο γνωστά είδη υδρόβιων πουλιών που επισκέπτονται την Αλυκή είναι τα φλαμίνγκο *Phoenicopterus ruber* και αγριόπαπιες. Υπολογίζεται ότι περίπου 10.000 φλαμίνγκο και περίπου ο μισός αφρικανικός πληθυσμός των νυφογερανών (*Anthropoides virgo*) καταφθάνουν στην Αλυκή κάθε χειμώνα (Κ. Καΐλης, 2005). Κατά την διάρκεια της άνοιξης ερωδιοί, γλάροι, κύκνοι, χαλκόκοτες και κορμοράνοι χρησιμοποιούν τον υγροβιότοπο ως διαμετακομιστικό σταθμό, ενώ τα αγριοπετεινάρα, τα νεραλδίκια και οι караπαττάδες αναπαράγονται εκεί. Επίσης, περίπου 345 είδη φυτών έχουν αναφερθεί πως ανήκουν σε 59 διαφορετικές οικογένειες πολλές από τις οποίες δεν είναι μόνο σπάνιες αλλά και ενδημικές στην Κύπρο, όπως για παράδειγμα η ορχιδέα, *Orchis palustris*. Ακόμη, το φύκος *Dunaniella viridis* είναι η αρχή του κύκλου ζωής της Αλυκής. Τα φύκη αυτά είναι τροφή για την γαρίδα *Branchinella spinosa* και αυτή με τη σειρά της γίνεται τροφή για τα μεγαλύτερα ζώα και πουλιά (Κ. Καΐλης, 2005). Επιπλέον, αλμυρά λιβάδια με αλόφυτα και υδροχαρή φυτά βρίσκονται γύρω από την αλυκή με κύρια τα *Juncus spp.*, τα αλμυρίδια *Salicornia fruticosa*, τα *Suaeda spp.* και η *Inula crithmoides*. Ακόμη, στις γύρω υφάλμυρες λίμνες και στην Αλυκή έχει βρεθεί και ένα σπάνιο είδος ψαριού, το *Aphanius fasciatus* που ανήκει στην οικογένεια *Cyprinodontidae*. Το ψάρι αυτό προσαρμόζεται άμεσα στις συνθήκες που επικρατούν σε οικοσυστήματα όπως την Αλυκή με εναλλαγή υγρής-ξηρής περιόδου και για το λόγο αυτό αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Τέλος, η Αλυκή Ακρωτηρίου είναι ο μόνος χώρος αναπαραγωγής του δενδρόβιου βατράχου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, πρώτη φορά γίνεται απομόνωση περιβαλλοντικού δείγματος από την Αλυκή του Ακρωτηρίου από την επιστημονική κοινότητα για έρευνες στον τομέα την Βιοτεχνολογίας και την εφαρμογή αυτών των αλόφιλων μικροοργανισμών για την παραγωγή χρήσιμων ενεργειακών προϊόντων.

1.6 Ακραιόφιλος

Ακραιόφιλος ονομάζεται ο οργανισμός όπου ευδοκιμεί κάτω από ακραίες συνθήκες, φυσικές ή/και γεωχημικές, δηλαδή συνθήκες στις οποίες η πλειοψηφία των οργανισμών της Γης δεν θα μπορούσαν να επιβιώσουν (I. Βυρίδης, 2016).

1.6.1 Αλόφιλοι

Αλόφιλοι, ονομάζονται οι οργανισμοί που απαιτούν χλωριούχο νάτριο (NaCl) για την ανάπτυξη τους και επιβιώνουν σε περιβάλλοντα με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να βρεθούν σε θαλάσσια περιβάλλοντα, σε υπεραλμυρές λίμνες όπως, η Νεκρά Θάλασσα και Αλυκές ενώ συνήθως ανήκουν στα Αρχαία, βακτήρια και Ευκαρυωτικά (Setati, 2010 & Quillaguamán et al, 2010). Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ανοχή τους στην αλατότητα, σε αλοανεκτικοί, αλόφιλοι ή ακραίοι αλόφιλοι. Αλοανεκτικός, ονομάζεται ο οργανισμός που είναι ικανός να αναπτυχθεί παρουσία άλατος, χωρίς αναγκαία να το χρειάζεται. Οι αλόφιλοι, μπορούν να διαχωριστούν σε ήπιοι αλόφιλοι (1 – 6 % κ.ο.) και μέτριοι αλόφιλοι (3 – 15 % κ.ο. ενώ μπορούν να ανεχθούν 0 – 25 % κ.ο.) ανάλογα με τις απαιτήσεις τους σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) και τέλος, οι ακραίοι αλόφιλοι είναι οι οργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ αλμυρά περιβάλλοντα με συγκέντρωση σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) περίπου από 15 έως 30 % κ.ο. (Ventosa et al., 1998, Oren, 2008 & Ventosa et al., 1998).

Οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί για να ευδοκιμούν στα υπεράλμυρα περιβάλλοντα, χρησιμοποιούν δύο κύριους μηχανισμούς δράσης – προσαρμογής για την πρόληψη του χλωριούχου νατρίου (NaCl) από διάχυση εντός των κυττάρων. Ο πρώτος μηχανισμός δράσης τους είναι η συσσώρευση ανόργανων ιόντων κυρίως χλωριούχου καλίου (KCl) για την εξισορρόπηση της οσμωτικής πίεσης. Ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιείται κυρίως από αερόβια και εξαιρετικά αλόφιλα αρχαία και μερικά αναερόβια αλόφιλα βακτήρια (Oren et al., 1999 & Oren et al., 2002). Αντίθετα, τα περισσότερα αλόφιλα βακτήρια και ευκαρυωτικά συσσωρεύουν υδατοδιαλυτές οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες αναφέρονται ως συμβατές διαλυτές ουσίες ή ωσμολύτες, για να διατηρήσουν χαμηλή

την ενδοκυτταρική συγκέντρωση άλατος (Oren et al., 2008, Quillaguamán et al., 2010 & Roberts et al., 2005). Οι συμβατές διαλυτές ουσίες μπορούν να δρουν ως σταθεροποιητές για βιολογικές δομές και επιτρέπουν στα κύτταρα να προσαρμοστούν όχι μόνο σε άλατα, αλλά και για θέρμανση, ξήρανση, κρύο ή ακόμη και για παγωμένες συνθήκες (Delgado-García et al., 2012), επιτρέποντας στους αλόφιλους να αναπτυχθούν σε pH περίπου ίσο με 10 και θερμοκρασίες πάνω των 50°C (Hozzein et al., 2013). Τα περισσότερα αλόφιλα βακτήρια συσσωρεύουν εκτοΐνη ή hydroxyectoine ως κυρίαρχες συμβατές διαλυτές ουσίες ενώ άλλα ενδοκυτταρικές συμβατές διαλυτές ουσίες περιλαμβάνουν αμινοξέα, γλυκίνη, βεταΐνη και άλλες οσμωτικές διαλυμένες ουσίες συσσωρευμένες σε μικρές ποσότητες (Louis & Galinski, 1997, Vargas et al., 2008 & Ventosa et al., 1998).

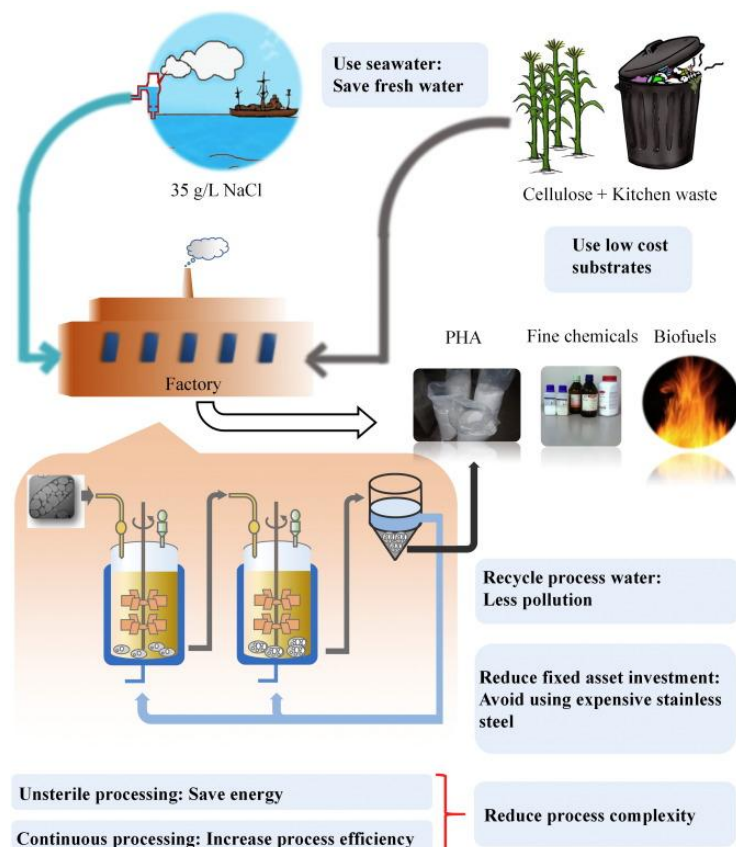
Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι μέτριοι αλόφιλοι μικροοργανισμοί αποτελούν πολύ σημαντικοί για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Καταρχήν, μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τον κίνδυνο μόλυνσης τους. Επίσης, είναι σχετικά εύκολη η καλλιέργεια τους ενώ οι απαιτήσεις τους σε θρεπτικά είναι απλές, μιας και οι περισσότεροι από αυτούς μπορούν να χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων ως πηγή του άνθρακα. Όμως, αυτό που τα κάνει να ξεχωρίζουν είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν ενώσεις βιομηχανικού ενδιαφέροντος.

1.6.1.1 Πλεονεκτήματα αλόφιλων μικροοργανισμών

Λόγω των μειονεκτημάτων των βιολογικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της κατανάλωσης ενέργειας για αποστείρωση, η υψηλή κατανάλωση πόσιμου νερού, η ασυνεχής ζύμωση για την αποφυγή μικροβιακής μόλυνσης, οι πολύ ακριβές εγκαταστάσεις ζύμωσης από ανοξείδωτο χάλυβα και τα ανταγωνιστικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για κατανάλωση από τον άνθρωπο οδηγεί τη βιομηχανική βιοτεχνολογία να είναι λιγότερο ανταγωνιστική σε σύγκριση με τις χημικές διεργασίες. Όμως, οι τελευταίες έρευνες και εφαρμογές παρουσιάζουν ότι οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί υπόσχονται ραγδαίες αλλαγές και αντιμετώπιση όλων αυτών των αδυναμιών. Οι μοναδικές ιδιότητες τους, για παράδειγμα η ανάπτυξη τους σε υψηλό pH, υψηλή συγκέντρωση άλατος (NaCl) και υψηλές θερμοκρασίες επιτρέπουν διεργασίες ζύμωσης χωρίς αποστειρωμένες συνθήκες και υπό συνεχή τρόπο. Ταυτόχρονα, οι μέθοδοι γενετικού χειρισμού έχουν αναπτυχθεί για αυτούς τους μικροοργανισμούς. Μέχρι στιγμής, οι αλόφιλοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολυυδροξυαλκανοϊκών βιοπλαστικών (PHA), εκτοΐνη, ένζυμα, και βιο-τασιενεργά με αυξημένη απόδοση και χαμηλό κόστος για τις βιοδιεργασίες. Τα πλεονεκτήματα είναι τα

χαμηλά ποσά ενέργειας, λιγότερη κατανάλωση πόσιμου νερού, χαμηλές επενδύσεις παγίου κεφαλαίου, και συνεχή παραγωγή.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας εφαρμογής που εμφανίζει τα πιο πάνω αποτελέσματα είναι η παραγωγή PHA όπου μπορεί να μειώσει το κόστος στις διαδικασίες ζύμωσης και ανάκτησης (Σχήμα 9). Οι κύριοι λόγοι για την μείωση του κόστους της ζύμωσης και ανάκτησης είναι: α) Η υψηλή συγκέντρωση άλατος όπου αποτρέπει τη μόλυνση από μη αλόφιλα, μειώνοντας έτσι την πολυπλοκότητα του κόστους, την ενέργεια και τη διαδικασία της αποστείρωσης (Quillaguamán et al, 2010). β) Το θαλασσινό νερό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως άλας που περιέχει το βιομέσο, μειώνοντας έτσι την κατανάλωση φρέσκου νερού (Tan et al, 2011 & Yue et al, 2014). γ) Η αποτελεσματικότητα της μακροχρόνιας και συνεχούς διαδικασίας είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη μιας παρτίδας (Wang et al, 2014). δ) Υποστρώματα χαμηλού κόστους συμπεριλαμβανομένων των σύμμεικτων απορριμμάτων οικιακής χρήσης ή/και κυτταρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν από μερικά αλόφιλα μειώνοντας έτσι το κόστος του υπόστρωμα (Yue et al, 2014). ε) Το κόστος για την ανάκτηση PHA από ορισμένα αλόφιλα μπορεί να μειωθεί με τη λύση των κυττάρων μέσω του οσμωτικού σοκ (Quillaguamán et al., 2010). Επιπλέον, μειώνεται και η ρύπανση όταν το νερό ανακυκλώνεται κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης.



Σχήμα 9: Εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών ως ξενιστές με χαμηλό κόστος παραγωγής για τις χημικές ουσίες, τα υλικά και τα βιοκαύσιμα.

Πηγή: Jin Yin et al., 2014.

1.6.1.2 Βιομηχανικές εφαρμογές αλόφιλων μικροοργανισμών

Η βιομηχανική βιοτεχνολογία έχει ως στόχο την χρησιμοποίηση των αλόφιλων μικροοργανισμών για την παραγωγή χρήσιμων ενεργειακών προϊόντων. Πιο κάτω παρουσιάζονται μερικές από τις κύριες εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών:

- ❖ Στη ζύμωση τροφίμων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το στέλεχος *Tetragenococcus* όπου χρησιμοποιείται για τη ζύμωση της soy sauce καθώς και άλλα στελέχη για τη ζύμωση άλλων τροφίμων.
- ❖ Στη παραγωγή συμβατών διαλυμένων ουσιών, οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί για να προστατέψουν το κύτταρό τους σε αντίξοες συνθήκες όπως, υπεραλατότητας, συσσωρεύουν στο κυτταρόπλασμά τους υψηλές συγκεντρώσεις χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις, για να αντιμετωπίσουν την οσμωτική πίεση και να διατηρήσουν τη θετική πίεση σπαργής. Μερικές από τις συμβατικές διαλυμένες ουσίες όπως, η εκτοΐνη, η βεταΐνη και η γλυκίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στρεσογόνες προστατευτικές ουσίες, έναντι θερμικής μετουσίωσης, υψηλής αλατότητας, κατάψυξης και αποξήρανσης. Ακόμη, χρησιμοποιούνται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, (Polymerase Chain Reaction, PCR), σε φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά καθώς και στη τεχνολογία τροφίμων (Ventosa, Nieto & Oren, 1998, Lippert και Galinski, 1992 & Pastor et al., 2010).
- ❖ Στην αποικοδόμηση – υποβάθμιση τοξικών αρωματικών ενώσεων, σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα όπως, αλυκές, θάλασσες κ.α., οι ανθρωπογενείς παράγοντες αποτελούν τις κύριες εστίες μόλυνσης και τοξικότητας. Έτσι, φαρμακευτικές ουσίες, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και άλλες χημικές ουσίες καταλήγουν πολύ συχνά στα θαλασσινά νερά όπου, οι συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν, με αποτέλεσμα η χρησιμοποίηση των αλόφιλων μικροοργανισμών είναι επιτακτική ανάγκη. Παράδειγμα, αποτελεί ο *H. Halodurans* ο οποίος, αποικοδομεί το βενζοϊκό οξύ και άλλες αρωματικές ενώσεις (Haddadi & Shavandi, 2013).
- ❖ Στο σχηματισμός πολυμερών ενώσεων, με τους βακτηριακούς πολυσακχαρίτες να έχουν σημαντικές εφαρμογές ως ενισχυτές για την ανάκτηση πετρελαίου. Λόγω του

ότι τα περισσότερα περιβάλλοντα δράσης αυτών των πολυσακχαριτών είναι σε αλατούχα περιβάλλοντα εμφανίζουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων αλλά, είναι και πιο ανθεκτικά και αποδοτικά σε αυτές τις αντίξοες συνθήκες δράσης τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το στέλεχος, *Bacillus species* το οποίο παράγει ένα πολυσακχαρίτη με ψευδοπλαστική συμπεριφορά, ανθεκτικό στη θερμική αποικοδόμηση και στη διάτμηση, ενώ παρουσιάζει μεγαλύτερα ιξώδη σε υψηλότερες θερμοκρασίες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με άλλα εμπορικά πολυμερή.

- ❖ Στη παραγωγή ενζύμων, με σημαντικό αριθμό ένδο και έξω-κυττάρων ενζύμων που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από αλόφιλους μικροοργανισμούς με παραδείγματα υδρολασών όπως, φωσφατάσες, νουκλεάσες, αμυλάσες και πρωτεάσες (Setati et al., 2010). Το ένζυμο νουκλεάση που παράγεται από τα στελέχη *M. Varians sub sp. Halophilus* είναι χρήσιμη για τη βιομηχανική παραγωγή του 59-γουανιλικού οξέως και του 59-Ινοσινικού οξέως. Επιπλέον, ένα στέλεχος του *Halomonas elongata* παράγει εστεράσες με υψηλή συγγένεια σε εστέρες βραχείας αλυσίδας.
- ❖ Ακόμη, παρουσιάζονται μερικές εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών και κυρίως του γένους *Halomonas sp.* που μας ενδιαφέρει στη παρούσα πτυχιακή εργασία στο Πίνακα 1 (Jin Yin et al., 2014).

Πίνακας 1: Βιομηχανικές εφαρμογές των αλόφιλων μικροοργανισμών και κυρίως του γένους *Halomonas sp.*

Product	Application	Representative producer	Reference
Polyhydroxyalkanoates (PHA)	Biomaterials		
Polyhydroxybutyrate (PHB)	Plastics	<i>Halomonas boliviensis</i> <i>Halomonas</i> sp. TD01	Quillaguamán et al. (2004) Tan et al. (2011)
Poly(hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate) (PHBV)	Plastics, medical materials	<i>Haloferax mediterranei</i>	Don et al. (2006)
Ectoines	Protectants for proteins and cells		
Ectoïne	Cell membrane protection, antiageing skin protection	<i>Halomonas elongata</i> <i>Halomonas salina</i>	Sauer and Galinski (1998) Zhang et al. (2009)
Hydroxyectoine	Protection of proteins against misfolding, degradation and freezing	<i>Marinococcus</i> M52	Frings et al. (1995)
Halophilic hydrolases			
Amylases	Food industry	<i>Halomonas</i> sp. <i>Halobacillus</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.	Coronado et al. (2000) Amoozegar et al. (2003) Chakraborty et al. (2009)
Proteases	Additives in pharmaceuticals, laundry detergents, and so on	<i>Bacillus</i> sp.	Shivanand and Jayaraman (2009)
		<i>Halobacillus</i> sp. <i>Chromohalobacter</i> sp.	Karbalaee-Heidari et al. (2009) Vidyasagar et al. (2009)
Xylanases and cellulases	Bleaching, hydrolysis of cellulose	<i>Streptomonospora</i> sp.	Ren et al. (2013)
		<i>Halomonas</i> sp.	Shivanand et al. (2013)
Biosurfactants and bioemulsifiers	Solubilisation of hydrophobic substrates	<i>Halomonas</i> spp. <i>Natrialba</i> sp. strain E21	Gutiérrez et al. (2007) Kebbouche-Gana et al. (2013)
Bioemulsifier protein PhaR		<i>Halomonas</i> sp. (recombinant)	Fu et al. (2014)
Other products			
β-Carotene	Food additive	<i>Dunaliella</i> spp.	Ben-Amotz and Avron (1981)
Glycerol	Cosmetic industries	<i>Dunaliella</i> spp.	Ben-Amotz and Avron (1981)
Bacteriorhodopsin	Light-driven proton pump protein	<i>Halobacterium halobium</i>	Oesterhelt and Stoekenius (1973)

Πηγή: Jin Yin et al., 2014.

1.6.1.3 Μικροοργανισμοί του γένους *Halomonas* sp.

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Halomonas* sp. αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα ταξινομημένων και φυσιολογικά διαφορετικών οργανισμών που αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας (Kushner & Kamekura 1988). Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα περισσότερα από τα βακτήρια εκκρίνουν εξωκυτταρικά εξωπολυμερικές ουσίες, οι οποίες μπορεί να έχουν σφιχτούς (tightly) ή χαλαρούς (loosely) δεσμούς στην επιφάνεια του κυττάρου και ταυτόχρονα βοηθούν το κύτταρο να επιβιώνει (Sutherland 2001). Οι εξωπολυμερικές ουσίες που εκκρίνονται αποτελούνται από σάκχαρα και μη σακχαρούχα συστατικά όπως, πρωτεΐνες, ουρονικά οξέα, θειικά και ακετυλο ομάδες) (Llamas et al., 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η παρουσία όλων αυτών των συστατικών σε αυτές τις ουσίες προσδίδει αντικαρκινικές, ανοσοδιαμορφωτικές και δραστικές γαλακτωματοποίητικές ιδιότητες (Ruiz Ruiz et al., 2011, Perez Fernandez et al., 2000 & Bouchotroch et al., 2000). Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί του γένους *Halomonas* sp. παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες π.χ. μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλό pH και αλατότητα και σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές (Πίνακας 1). Αυτό τους καθιστά σε

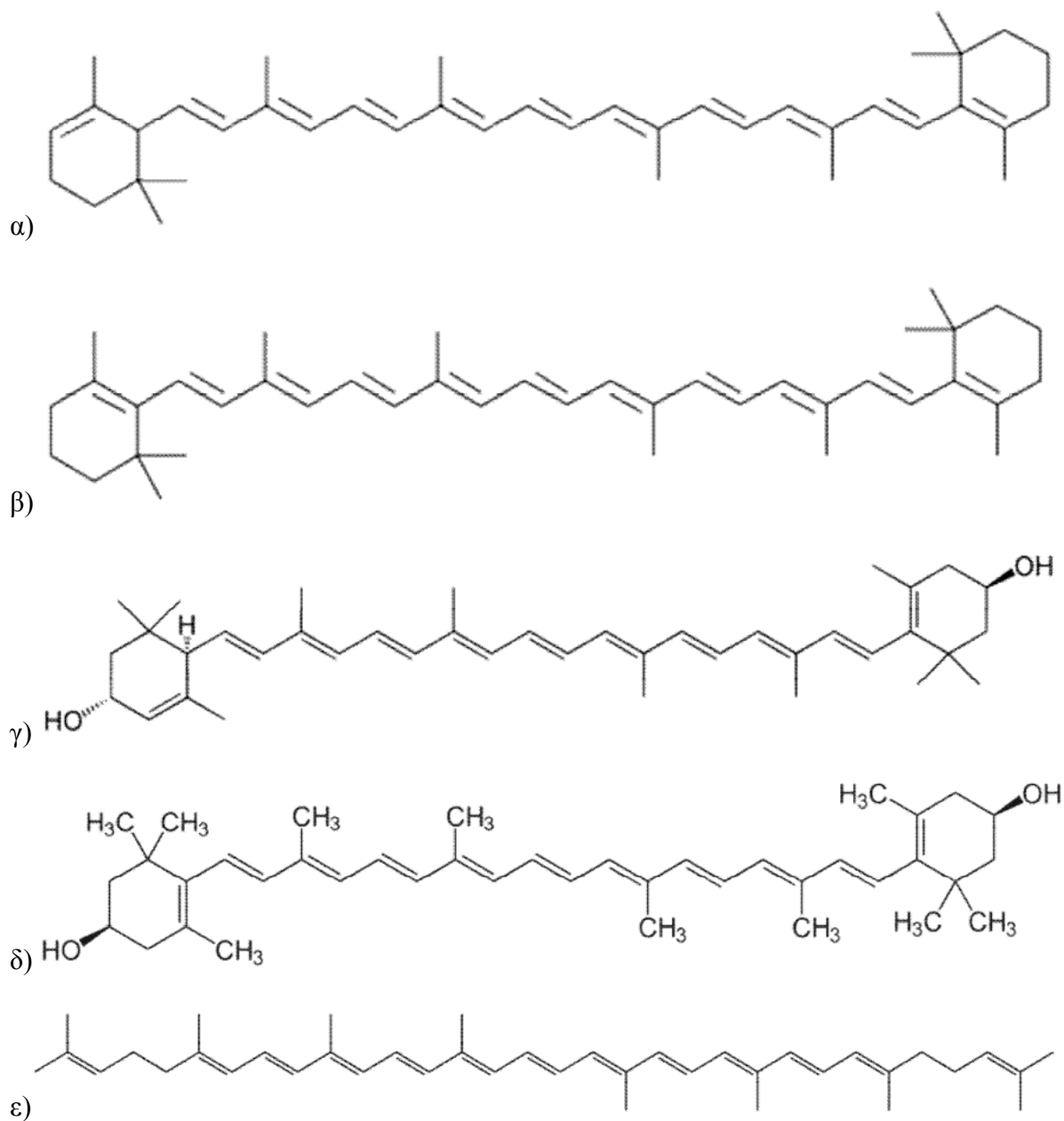
πλεονεκτική θέση έναντι των υπόλοιπων μικροοργανισμών γιατί μπορούν να αναπτυχθούν με λιγότερα ποσά ενέργειας, λιγότερη κατανάλωση πόσιμου νερού, χαμηλές επενδύσεις παγίου κεφαλαίου και συνεχή παραγωγή.

1.7 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι οργανικές, φυσικές χρωστικές ουσίες (πορτοκαλιά, κίτρινα και κόκκινα) που βρίσκονται: α) στους χρωμοπλάστες όπου είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και την αποθήκευση των χρωστικών, β) στους χλωροπλάστες όπου είναι φωτοσυνθετικά οργανίδια των φυτών και εμποδίζουν ορισμένες οξειδώσεις κατά τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης και γ) σε ορισμένους άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων μερικών μυκήτων, βακτηρίων και φύκων (ωρισμένα φύκη) (Bogan Altincicek et al., 1996). Αξίζει να σημειωθεί, ότι υπάρχουν περισσότερα από 600 γνωστά είδη καροτενοειδών τα οποία χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τα ξανθόφυλλα όπου είναι αυτά που περιέχουν οξυγόνο και τα καροτένια όπου είναι υδρογονάνθρακες και δεν περιέχουν καθόλου οξυγόνο.

Επιπλέον, χαρακτηρίζονται ως τετρατερπένια, δηλαδή αποτελούνται από 40 άτομα άνθρακα που δημιουργούνται από τέσσερις μονάδες τερπενίων με την κάθε μία να περιέχει δέκα άτομα άνθρακα. Επίσης, χαρακτηρίζονται ως πολυένια με δακτυλίους στα άκρα που σχηματίζονται από μονάδες ισοπρενίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα καροτένια είναι ενδοκυτταρικά συστατικά και δεν μπορούν να εκκριθούν στο μέσο μιας ζύμωσης (Χρ. Πανοπούλου, 2006). Τα μήκη κύματος που απορροφούν είναι από 400 έως 550 nm (βιολετί και πράσινο φως), με αποτέλεσμα οι ενώσεις τους να εκπέμπουν κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα. Τα καροτενοειδή είναι σχεδόν αδιάλυτα στο νερό και η απορρόφηση τους επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερα όταν συνδέονται με έλαια. Μεταφέρονται στον ορό του αίματος και δεσμεύονται στα μόρια της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Οι ιστοί με τους περισσότερους δέκτες LDL λαμβάνουν τα περισσότερα καροτενοειδή (Χρ. Πανοπούλου, 2006).

Η α-καροτίνη, η β-καροτίνη, η λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, και λυκοπαΐνη είναι τα πιο κοινά καροτενοειδή (Καράταγλης, 1994) (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Χημική δομή: α) α-καροτένιου, β) β-καροτένιου, γ) λουτεΐνης, δ) ζεαξανθίνης και ε) λυκοπαΐνης.

1.7.1 Εφαρμογές – λειτουργίες καροτενοειδών

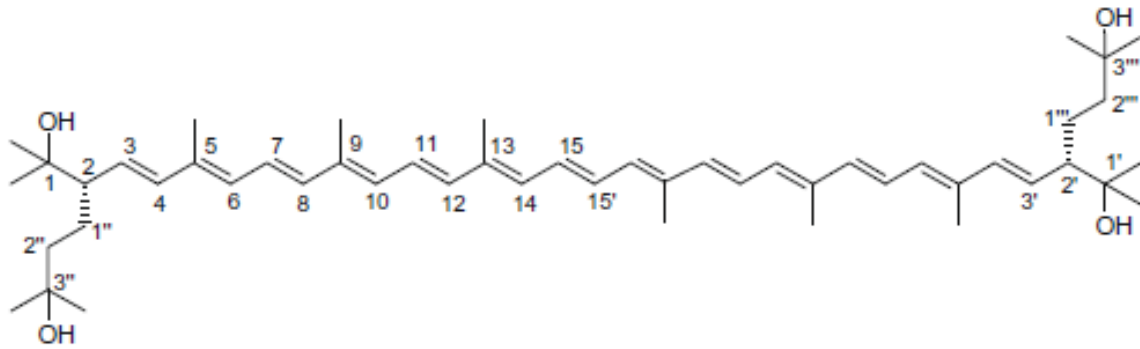
Τα καροτενοειδή βρίσκονται κυρίως στα τρόφιμα και σήμα κατατεθέν για την αναγνώριση τους είναι το έντονο πορτοκαλί, κίτρινο, πράσινο και κόκκινο χρώμα των φρούτων και λαχανικών όπως, οι τομάτες, οι γλυκές πατάτες, τα καρότα, οι κολοκύθες, και άλλα. Επιπλέον, μπορούν να βρεθούν στα πέταλα των ανθέων και στις ρίζες όπου η συγκέντρωσή τους μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Εκτιμάται ότι η παγκόσμια ετήσια παραγωγή των χρωστικών αυτών ανέρχεται στα 100 εκατομμύρια τόνους (Χρ. Πανοπούλου, 2006).

Ακόμη, υπάρχουν σοβαρές υποψίες ότι τα καροτενοειδή βοηθούν στην προσέλκυση των εντόμων για τη γονιμοποίηση τους. Το ίδιο συμβαίνει και με τα πουλιά, τα οποία χρησιμοποιούν τις χρωστικές αυτές για να δώσουν το κόκκινο, κίτρινο ή πορτοκαλί χρώμα στο φτέρωμά τους με το οποίο θα προσελκύσουν το ταίρι τους.

Οι κυριότερες λειτουργίες των καροτενοειδών στους φυτικούς οργανισμούς (φύκη (algae), φυτά) είναι να απορροφούν την ηλιακή ενέργεια για τη χρησιμοποίηση της στη φωτοσύνθεση και να προστατεύουν την χλωροφύλλη από τη φωτογήρανση (Armstrong GA, Hearst JE, 1996). Στον άνθρωπο, είναι ιδιαίτερα σημαντικά λόγω του ότι αποκτούν τη δράση της προβιταμίνης A και μετατρέπονται σε ρετινάλη. Στο μάτι, μερικά καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη, η ασταξανθίνη και η ζεαξανθίνη δρουν άμεσα για την προστασία της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς μέσω της απορρόφησης του επικίνδυνου μπλε και υπεριώδους φωτός. Επίσης, έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τα αντιοξειδωτικά είναι το «κλειδί» για την παράταση της νεότητας και της ζωής. Ως αντιοξειδωτική χαρακτηρίζεται όποια ουσία μπορεί να καθυστερήσει ή να εμποδίσει την καταστροφική οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών, που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά και η διαδικασία της γήρανσης.

1.7.2 Bacterioruberin

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, ασχοληθήκαμε κατά αποκλειστικότητα με ένα διαφορετικό είδος καροτένιου όπου αποτελείται από 50 άνθρακες αντί 40, την bacterioruberin (Σχήμα 11) (Kuo-Lung Ku b et al., 2010). Η bacterioruberin ανήκει στην οικογένεια των εξαιρετικά αλόφιλων αρχαιο βακτηρίων και είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του ροζ ή κόκκινου χρώματος στις αλυκές. Ο κύριος ρόλος της bacterioruberin στο κύτταρο είναι η προστασία του DNA από πιθανές βλάβες που μπορεί να προκύψουν από το υπεριώδες φως (UV light) όχι επειδή η bacterioruberin έχει την ικανότητα να απορροφά το υπεριώδες φως, αλλά επειδή δρα ως ένα ισχυρό et al., 1998). Είναι σε θέση να προστατεύουν τα κύτταρα από αντιδραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία δρώντας ως στόχος. Η ρίζα bacterioruberin που παράγεται είναι λιγότερο δραστική από την αρχική ρίζα, και πιθανότατα θα αντιδράσει με άλλη ρίζα, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης των ριζών (Saito T., et al., 1997).



Σχήμα 11: Χημική δομή bacterioruberin (Kuo-Lung Ku b et al., 2010).

1.8 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασία είναι η απομόνωση ενός νέου μικροβιακού στελέχους από την Αλυκή του Ακρωτηρίου στη Λεμεσό με γαλακτωματοποιητική ικανότητα σε διάφορους οργανικούς διαλύτες κάτω από κανονικές και ακραίες συνθήκες.

Στην μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής σύνθεσης υποστρώματα και αλατότητες σε κάθε ένα από τα οποία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας παρατηρήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού και η ικανότητα του να συνθέτει εξωπολυσακχαρίτες (EPS) κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του προϊόντος και μελέτη ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του όπως, η γαλακτωματοποιητική του ικανότητα και σταθερότητα, το ιξώδες, η ποσότητα σακχάρων και πρωτεϊνών και τα οπτικά δεδομένα που παρουσίαζε κάτω από ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, αλατότητας και αποστείρωσης.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πειραματικές Μέθοδοι

2.1.1 Δειγματοληψία περιβαλλοντικού δείγματος

Αρχικά, η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την Αλυκή Ακρωτηρίου από διάφορα ύψη (επιφανειακό νερό, μέση επιφάνεια και βυθό) και από διαφορετικά μέρη της μέσω της μεθόδου της τυχαίας δειγματοληψίας (Εικόνα 1 και 2).



Εικόνα 1: Σημείο δειγματοληψίας από την περιοχή της Αλυκής Ακρωτηρίου.



Εικόνα 2: Τοπογραφική απεικόνιση περιοχής συλλογής δειγμάτων Αλυκής Ακρωτηρίου.

Πηγή: Google Maps.

2.1.2 Παρασκευή βιομέσου για την καλλιέργεια εμπλουτισμού

Για την παρασκευή του βιομέσου για την καλλιέργεια εμπλουτισμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια, NaCl, Yeast Extract, Peptone Bacteriological, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O και MgO₄S×7H₂O σε 150, 1,1, 0.5, 0.5 και 0.2 g/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7. Με το τέλος της αποστείρωσης του βιομέσου στο αυτόκαυστο (Prestige Medical Version 3 Model 210006 Classic Sterilizer) στους 121°C τοποθετούνται 20 mL από το βιομέσο και 5 mL από τα υγρά δείγματά μας σε falcon tube με τελικό όγκο 25 mL. Τα δείγματα με στερεά μέσα (λάσπη, άλας) προστέθηκαν με την βοήθεια σπάτουλας. Όλα τα δείγματα αναδεύτηκαν καλά και επώαστηκαν (WiseCube WIS-10 Fuzzy Control System) για 72 ώρες στους 30 °C.

2.1.3 Παρασκευή βιομέσου για την καλλιέργεια ανάπτυξης και απομόνωσης μικροοργανισμών

Για την παρασκευή των βιομέσων για καλλιέργεια ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν αρχικά διαφορετικές αλατότητες, 100 g/L και 200 g/L NaCl για την παρατήρηση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε υψηλή αλατότητα. Στα βιομέσα αυτά χρησιμοποιήθηκαν, NaCl, Yeast Extract, Peptone Bacteriological, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O και Agar Bacteriological με 100 και 200, 10, 5, 0.5, 0.5, 0.5 και 16 g/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7. Ακολούθως, μέσα στο Laminar Flow Cabinet για εκμηδένιση των πιθανοτήτων επιμόλυνσης των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε η πλήρη ετοιμασία των τρυβλίων για την ανάπτυξη των αποικιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όπως αναφέρθηκε στην βιβλιογραφία οι πιθανότητες επιμόλυνσης των τρυβλίων είναι ελάχιστες λόγω της υψηλής αλατότητας (100 και 200 g/L) του βιομέσου μας καθώς έχουμε να κάνουμε με ισχυρά αλόφιλους μικροοργανισμούς. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 100 μL από το βιομέσο της καλλιέργειας εμπλουτισμού και καλύφθηκε όλο το τρυβλίο με την βοήθεια του διανομέα μίας χρήσης. Με το τέλος της διαδικασίας αυτής, τα τρυβλία έκλεισαν με parafilm και επώαστηκαν στον αναδευτήρα (WiseCube WIS-10 Fuzzy Control System) στους 30 °C για διάστημα μίας εβδομάδας. Οπτική παρακολούθηση και καταγραφή των τρυβλίων γινόταν σε διάστημα τριών ημερών για μία πλήρη εικόνα της ανάπτυξής τους.

Στη συνέχεια, για την πλήρη απομόνωση και καθαρισμό των μικροοργανισμών έγινα ακόμη τρεις καθαρές στερεές καλλιέργειες με το ίδιο βιομέσο χρησιμοποιώντας την μέθοδο των παράλληλων γραμμών, παίρνοντας πάντα τις αποικίες με το πιο έντονο κίτρινο, ροζ και πορτοκαλί χρώμα. Για τον πλήρη έλεγχο και την ανεύρεση των βέλτιστων συνθηκών

ανάπτυξης των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά οργανικά συστατικά για το βιομέσο όπως, πεπτόνη 5 g/L, γλυκόζη 5 g/L, λακτόζη 5 g/L, φαινόλη 1 g/L (μηδενική ανάπτυξη), γλυκερόλη 1 mL/L, προπιονικό οξύ 1 mL/L (μηδενική ανάπτυξη), βουτυρικό οξύ 1 mL/L (μηδενική ανάπτυξη), βαλερικό οξύ 1 mL/L (μηδενική ανάπτυξη), οξικό οξύ 1 mL/L, ευγενόλη 1 mL/L (ελάχιστη ανάπτυξη) και μεθανόλη 1 mL/L αλλά, και διαφορετικές αλατότητες όπως, 0, 40, 60, 80, 100, 120, 200, 250 g/L NaCl.

Όταν ελέγχθηκαν όλες οι πιο πάνω παράμετροι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι μικροοργανισμοί με την μεγαλύτερη ανάπτυξη και το έντονο κιτρινο–πορτοκαλί χρώμα που μας ενδιέφερε για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν αυτοί που προέρχονταν από τα δείγματα *RPA5* και *RPA9* όπου συλλέχθηκαν από το κόκκινο νερό της αλυκής από διάφορα ύψη και από το κόκκινο νερό μαζί με αλάτι από το βυθό της αντίστοιχα. Το δείγμα *RPA5* είχε έντονο κίτρινο–πορτοκαλί χρώμα, εξωπολυσακχαρίτης και το *RPA9* είχε έντονο πορτοκαλί χρώμα πιθανότατα bacterioruberin (Εικόνα 3).

Μετά από μία σειρά επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την ανεύρεση των ιδανικών συνθηκών καταλήξαμε στο συμπέρασμα, ότι το ιδανικότερο οργανικό συστατικό για την καλλιέργεια ανάπτυξης είναι το οξικό οξύ για το δείγμα *RPA5* λόγω της γρήγορης και έντονης ανάπτυξής του και η γλυκερόλη για το δείγμα *RPA9* γιατί υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη χρησιμοποιώντας ένα φτηνό οργανικό συστατικό. Μεγάλη ανάπτυξη υπήρχε και κατά την χρησιμοποίηση και των άλλων οργανικών συστατικών με πιο κύρια αυτή της μεθανόλης.





β)

Εικόνα 3: Ανάπτυξη αποικιών σε τρυβλία Petri για: α) δείγμα *RPA9*, β) δείγμα *RPA5*.

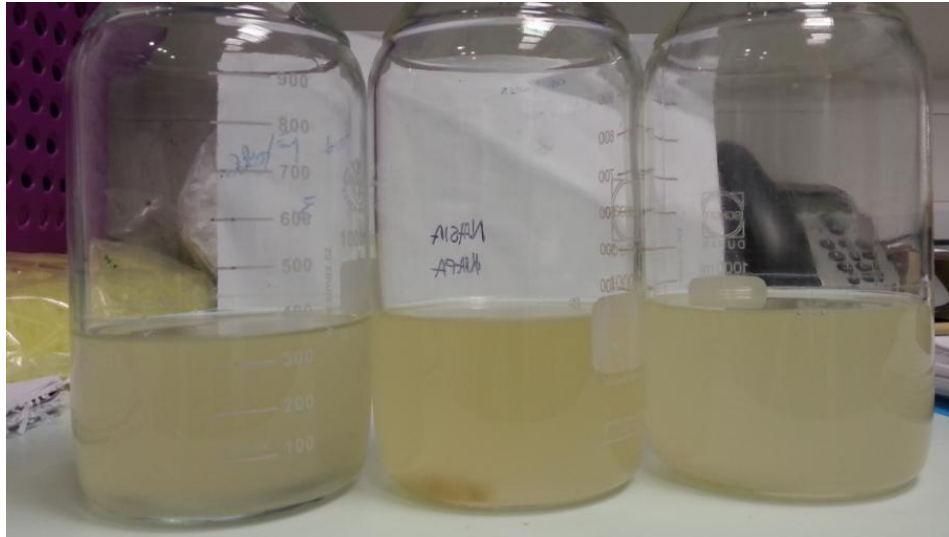
2.1.4 Παρασκευή βιομέσων για τις υγρές καλλιέργειες των δειγμάτων *RPA5* και *RPA9*

Μετά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την κατάληξη ποια δείγματα θα χρησιμοποιηθούν για τη συνέχεια των πειραμάτων παρασκευάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες για να μπορεί να πραγματοποιηθεί η μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών (OD) σε μήκος κύματος 600 nm και η εξαγωγή του εξωπολυσακχαρίτη (*RPA5*) και του καροτενίου – bacterioruberin (*RPA9*) από το κάθε δείγμα. Στην συνέχεια, η έρευνα διαχωρίστηκε σε δύο ξεχωριστά πειράματα ένα για τον μικροοργανισμό με τα δείγματα *RPA5* και ένα για τον μικροοργανισμό με τα δείγματα *RPA9*.

Για την υγρή καλλιέργεια του *RPA5* χρησιμοποιήθηκαν, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και οξικό οξύ με 0, 100 και 200, 0.5, 0.5, 0.5, 0.2, 0.2 g/L και 3 mL/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7. Αντίστοιχα, για την υγρή καλλιέργεια του *RPA9* χρησιμοποιήθηκαν, NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και γλυκερόλη με 0, 100 και 200, 0.5, 0.5, 0.5, 0.2, 0.2 και 5 g/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7.

Οι τρεις υγρές καλλιέργειες που παρασκευάστηκαν με αλατότητες 0, 100 και 200 g/L NaCl εμβapτίστηκαν μέσα στο Laminar Flow Cabinet με την βοήθεια του κρίκου εμβολιασμού μίας χρήσης με τις αποικίες των μικροοργανισμών από τις στερεές καλλιέργειες των τρυβλίων *RPA5* και *RPA9* και αποθηκεύτηκαν στον αναδευτήρα (WiseCube WIS-10 Fuzzy Control System) στους 30 °C και στις 100 rpm (στροφές) για μία εβδομάδα. Για το κάθε βιομέσο παρασκευάστηκε και ένας μάρτυρας (Control) για ξεκάθαρα και συγκρίσιμα αποτελέσματα. Κατά την διάρκεια της εβδομάδας γινόταν και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm στο φασματοφωτόμετρο μοριακής απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer) για την

ανακάλυψη της μέγιστης ανάπτυξης των μικροοργανισμών για να γίνει σε αυτό το σημείο η εξαγωγή του εξωπολυσακχαρίτη και του καροτενίου για το κάθε δείγμα αντίστοιχα. Με το πέρασμα της μίας εβδομάδας οι υγρές καλλιέργειες είχαν αναπτύξει ένα θολό χρώμα. Τα δείγματα *RPA5* είχαν αναπτύξει ένα θολό χρώμα και είχαν δημιουργήσει στερεή βιομάζα πορτοκαλο-μπεζ χρώματος (Εικόνα 4) ενώ, στα δείγματα *RPA9* αυτό με αλατότητα 100 g/L NaCl είχε δημιουργηθεί στερεή βιομάζα πορτοκαλιού και ροζ χρώματος (Εικόνα 5).



Εικόνα 4: Υγρές καλλιέργειες με ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αλατότητες 0, 100 και 200 g/L NaCl για το δείγμα *RPA5*.



Εικόνα 5: Υγρή καλλιέργεια με ανάπτυξη μικροοργανισμού με αλατότητα 100 g/L NaCl για το δείγμα *RPA9*.

2.1.5 Μέθοδος εξαγωγής εξωπολυσακχαρίτη (EPS)

Με βάση την μεθοδολογία του άρθρου “ Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia sp.1* using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced ” πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των EPS (J. Bezawada a et al., 2013). Μέσα από τα αποτελέσματα της οπτικής πυκνότητας και με μία σειρά πειραμάτων καταλήξαμε ότι οι ιδανικές συνθήκες για την βέλτιστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* για την εξαγωγή του εξωπολυσακχαρίτη (EPS) ήταν διαφορετικές από τα αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για την υγρή καλλιέργεια του *Halomonas sp. RPA5* είναι NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και οξικό οξύ με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 3 mL/L αντίστοιχα με pH ίσο με 7 και θερμοκρασία ίση με 30 °C. Η υγρή καλλιέργεια με μέγιστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού για την εξαγωγή του EPS κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες και υπόστρωμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Υγρή καλλιέργεια με ανάπτυξη μικροοργανισμού, *Halomonas sp. RPA5* σε αλατότητα 40 g/L NaCl.

Μετά την οπτική παρατήρηση και τη μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης (OD_{600nm}) στα 600 nm του μικροοργανισμού, *Halomonas sp. RPA5* απομονώθηκαν 25 mL από την υγρή καλλιέργεια των *RPA5* σε falcon tubes των 50 mL. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε με την χρήση του κατάλληλου ρότορα (Centurion Scientific K3 Series) για 30 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm για το διαχωρισμό των κυττάρων (στερεή βιομάζα – tightly bound) από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα που έχουν μείνει στο πάτο του falcon tube εναωρήθηκαν σε 12.5 mL νερού και αναδεύθηκαν καλά για να ομογενοποιηθούν. Το υπερκείμενο – loosely bound, που συλλέχθηκε διαχωρίστηκε σε δύο falcon tubes και προστέθηκε ίση ποσότητα αιθανόλης (12.5 mL) και αναδεύθηκαν καλά για να ομογενοποιηθούν. Με το τέλος της ανάδευσης, τα δείγματα με τα κύτταρα (στερεή βιομάζα – tightly bound) θερμάνθηκαν στους 65 °C με την βοήθεια του θερμαντήρα και μαγνητικό αναδευτήρα (WiseStir MSH-20A) για 15 λεπτά για την λύση των κυττάρων τους (J. Bezawada a et al., 2013). Μετά την θέρμανση των δειγμάτων επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρησης για 30 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm. Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο από το κάθε δείγμα και τοποθετήθηκε σε νέα falcon tubes όπου προστέθηκε 12.5 mL αιθανόλης και αναδεύτηκαν. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους - 20 °C για 24 ώρες.

Με το πέρας των 24 ωρών, τα δείγματα βγήκαν από την κατάψυξη για να ξεπαγώσουν. Όταν πέρασαν περίπου 20 λεπτά όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm. Ακολούθως, όλα τα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων αφαιρέθηκαν και αφέθηκαν όλα τα δείγματα για 24 ώρες για να εξατμιστεί η αιθανόλη και να ζυγιστούν στον αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών (KERN ABJ-NM/ABS-N), έτσι ώστε τα δείγματα μας να έχουν την απαιτούμενη της εκατό κατ' όγκο συγκέντρωση (% κ.ο.) για την πραγματοποίηση των απαιτούμενων πειραμάτων και την εξασφάλιση ακριβότερων αποτελεσμάτων. Τέλος, προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα σε απιονισμένο νερό για το κάθε δείγμα.

2.1.6 Flocculation Activity (FA)

Για την εξέταση του Flocculation Activity (FA) για tightly bound για τα δείγματα RPA5 χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του άρθρου “Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia sp.1* using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced” με την μέθοδο της καολίνης (J. Bezawada a et al., 2013). Η καολίνη είναι είδος άμμου όπου δεσμεύει τα EPS έτσι ώστε να καθιζάνουν. Το μείγμα καολίνης περιέχει καολίνη και χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2), 5 και 10 g/L αντίστοιχα με pH ίσο με 8 – 8.5 υπό ανάδευση. Σε νέα falcon tubes τοποθετούμε 50 mL του μείγματος καολίνης και 0.1 mL εκχυλισμένου EPS. Επίσης, παρασκευάστηκε και ένα δείγμα ως μάρτυρας μόνο με 50 mL του μείγματος καολίνης. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο αναδευτήρα (WiseCube WIS-10 Fuzzy Control System) για ανάδευση στις 180 rpm για 4 λεπτά. Με το τέλος, της ανάδευσης όλα τα δείγματα αφέθηκαν να ηρεμίσουν για 5 λεπτά. Ακολούθως, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα τους ($\text{OD}_{550\text{nm}}$) σε μήκος κύματος, 550 nm. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η μικρή ποσότητα του δείγματος που εξετάστηκε στο φάσμα απορρόφησης προερχόταν από την επιφάνεια του μείγματος καολίνης και εκχυλισμένου EPS για να μην προκύψουν σφάλματα στα αποτελέσματά μας. Επειδή, η καολίνη δεν μπορούσε να μετρηθεί αραιώθηκε 1:5 δηλαδή, 1 mL καολίνης και 4 mL απιονισμένο νερό.

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων των τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις για την οπτική πυκνότητας των δειγμάτων στα 550 nm. Η τιμή του μάρτυρα πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί 5 λόγω του ότι έγινε αραιώση 1 προς 5.

Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ποσοστού για τα τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound είναι:

$$\left[\frac{\text{Απορρόφηση Μάρτυρα} - \text{Απορρόφηση Δείγματος}}{\text{Απορρόφηση Μάρτυρα}} \right] \times 10 \quad (1)$$

2.1.7 Γαλακτωματοποιητική Ικανότητα – Emulsion Capacity Index

Για την εξέταση της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας, Emulsion Capacity Index (EI_{24h}) για loosely bound χρησιμοποιήθηκαν μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες όπου μέσα σε αυτούς τοποθετήθηκε ίση ποσότητα οργανικού διαλύτη και δείγματος, 4 mL για την κάθε περίπτωση (F. Freitas et al., 2014). Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστούν τα δείγματα για την παρουσία των EPS ήταν ελαιόλαδο, αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο, πετρέλαιο, κηροζίνη, δεκαεξάνιο και εξάνιο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες το Tween 80 και το Triton X. Αφού προστέθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες οργανικού διαλύτη και δείγματος, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 60 δευτερόλεπτα στις 2500 στροφές με την βοήθεια του vortex (DLAB MX-S) για να ομογενοποιηθούν και να μπει η μία φάση μέσα στην άλλη και να γαλακτοποιηθούν ώστε να παρατηρηθεί η παρουσία των EPS. Ο έλεγχος των δειγμάτων έγινε με το πέρας 24 ωρών και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων των τεστ, της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας για loosely bound χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 2. Ουσιαστικά, ισούται με το ύψος του ολικού γαλακτώματος (cm) που δημιουργήθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες δια το συνολικό ύψος της υγρής στήλης σε κάθε περίπτωση για τους διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο, κηροζίνη) και Tween 80 και Triton X-100 ως μάρτυρες, αλλά και τις διαφορετικές επί τις εκατό κατ' όγκο συγκεντρώσεις (% κ.ο) εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 % κ.ο.) που χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλασιάζοντας το πηλίκο με το 100 με το πέρας των 24 ωρών και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ποσοστού γαλακτωματοποιητικής ικανότητας για τα τεστ, Emulsion Index (EI_{24h}) είναι:

$$\left[\frac{\text{Ύψος Ολικού Γαλακτώματος}}{\text{Συνολικό Ύψος Υγρής Στήλης}} \right] \times 100 \quad (2)$$

2.1.8 Ρύθμιση Θερμοκρασίας

Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στις επιθυμητές τιμές τα δείγματα τοποθετήθηκαν σφραγισμένα σε ποτήρι ζέσεως μαζί με το θερμόμετρο για να ελέγχεται η θερμοκρασία για τριάντα λεπτά στο θερμαντήρα (WiseStir MSH-20A). Με το πέρας των τριάντα λεπτών τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το ζεστό νερό για να πάρουν την θερμοκρασία του δωματίου και έπειτα να γίνουν τα τεστ για να διαπιστώσουμε την γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα και σταθερότητα κάτω από ακραίες συνθήκες.

2.1.9 Ρύθμιση pH

Για την ρύθμιση του pH των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε pH-μετρο (WTW SERIES inoLab pH 720), ενώ για την ρύθμιση του βασικού pH χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) ενώ, για το όξινο pH χρησιμοποιήθηκε θειικό οξύ (H_2SO_4).

2.1.10 Παρουσίας υδατανθράκων

Για την εξέταση της παρουσίας υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του άρθρου “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances” (M. Dubois et al., 1956). Αρχικά, έγινε αραιώση των δειγμάτων 1:10 (1 mL δείγματος και 9 mL απιονισμένου νερού) για να βρίσκονται οι μετρήσεις των δειγμάτων στα όρια της καμπύλης βαθμονόμησης. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες όπου μέσα σε αυτούς τοποθετήθηκε 1 mL δείγματος και 25 μ L διαλείμματος φαινόλης 8 % για την κάθε περίπτωση. Μετά, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 10 δευτερόλεπτα στο vortex (DLAB MX-S) για να ομογενοποιηθούν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2.5 mL θειικού οξέος. Αφού προστέθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 10 δευτερόλεπτα με την βοήθεια του vortex για να ομογενοποιηθούν και μετά αφέθηκαν να ηρεμίσουν για 20 λεπτά. Με το πέρας των 20 λεπτών μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 490 nm με την βοήθεια του Φασματοφωτόμετρου Μοριακής Απορρόφησης. Έπειτα, χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις της απορρόφηση σε συνδυασμό με την καμπύλη

βαθμονόμησης μπορεί να ανευρεθεί η άγνωστη συγκέντρωση υδατανθράκων στα δείγματά μας.

2.1.11 Παρουσίας πρωτεϊνών

Αρχικά, για την εξέταση της παρουσίας πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του άρθρου “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding” (Marion M. Bradford, 1976). Αρχικά, έγινε αραίωση των δειγμάτων 1:10 (1 mL δείγματος και 9 mL απιονισμένου νερού) για να βρίσκονται οι μετρήσεις των δειγμάτων στα όρια της καμπύλης βαθμονόμησης. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες όπου μέσα σε αυτούς τοποθετήθηκε 1 mL δείγματος και 1 mL Comassie Brilliant Blue G-250 για την κάθε περίπτωση. Αφού προστέθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 10 δευτερόλεπτα με την βοήθεια του vortex για να ομογενοποιηθούν και μετά αφέθηκαν να ηρεμίσουν για 10 λεπτά. Με το πέρας των 10 λεπτών μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 595 nm με την βοήθεια του Φασματοφωτομέτρου Μοριακής Απορρόφησης. Έπειτα, χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις της απορρόφησης σε συνδυασμό με την καμπύλη βαθμονόμησης μπορεί να ανευρεθεί η άγνωστη συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δείγματά μας.

2.1.12 Μέθοδος εξαγωγής καροτένιου

Μετά την οπτική παρατήρηση και τη μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του καροτένιου – bacterioruberin με βάση τα άρθρα, “Characterization of halophilic C₅₀ carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China” και “Influence of nutritive factors on C₅₀ carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation” απομονώθηκαν 40 mL από την υγρή καλλιέργεια του *RPA9* σε falcon tubes των 50 mL. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε με την χρήση του κατάλληλου ρότορα (Centurion Scientific K3 Series) για 30 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm για την συλλογή των κυττάρων (στερεή βιομάζα). Στη συνέχεια, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα που έχουν μείνει στο πάτο του falcon tubes εναιωρούνται σε 20 mL ακετόνης αφού πρώτα έχουν αναδευτεί για 10 λεπτά με την βοήθεια του vortex στις 1000 στροφές (rpm) επειδή, τα καροτένια είναι ενδοκυτταρικά συστατικά και δεν μπορούν να εκκριθούν στο μέσο μιας ζύμωσης. Η πιο πάνω διαδικασία με την εναιώρηση των κυττάρων σε ακετόνη πραγματοποιήθηκε μόνο για το δείγμα *RPA9* καθώς το *RPA5* δεν είχε εμφανίσει έντονο

πορτοκαλί χρώμα ικανό για την εξαγωγή καροτένιου. Με το τέλος της ανάδευσης για την εξαγωγή των χρωστικών επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στους 4 °C και στις 12.000 rpm. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν ακόμη δύο φυγοκεντρήσεις μέχρι η βιομάζα να αποκτήσει ένα θολό μπλε χρώμα με την πρώτη να πραγματοποιείται σε 7.5 mL ακετόνη για 15 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm ενώ η δεύτερη, σε 5 mL ακετόνη για 10 λεπτά στους 4 °C και στις 6000 rpm. Τέλος, όλα τα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε falcon tube όπου έγινε η μέτρηση του φάσματος τους με την βοήθεια του Φασματοφωτόμετρου Μοριακής Απορρόφησης Υπεριώδους/Ορατού (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer) σε μήκος κύματος 350–600 nm.

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1.1 Έλεγχος του δείγματος *RP45* σε διαφορετικές συνθήκες και υποστρώματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα όπου συλλέχθηκαν από των Αλυκή του Ακρωτηρίου αναπτυχθήκαν σε στερεές καλλιέργειες όπου, μέσα από την οπτική παρατήρηση τους επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη το δείγμα *RP45*. Στο κεφάλαιο 2 περιγράφονται αναλυτικά οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για τον έλεγχο του δείγματος *RP45* σε διάφορες συνθήκες όπως, αλατότητα, pH και οργανικά συστατικά ως υποστρώματα. Η επιλογή του *RP45* για την ανάπτυξη καθαρών αποικιών έγινε με βάση το έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα που παρουσίαζε.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στα πειράματα παρατηρούμε ότι τα δείγματα *RP45* μπορούν να επιβιώσουν σε αλατότητες 0–200 g/L NaCl, σε pH 6–10 και σε θερμοκρασίες 20–40 °C. Επίσης, για τον πλήρη έλεγχο και την ανεύρεση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά οργανικά συστατικά ως υποστρώματα όπως, πεπτόνη 5 g/L, γλυκόζη 5 g/L, λακτόζη 5 g/L, φαινόλη 1 g/L, γλυκερόλη 1 mL/L, προπιονικό οξύ 1 mL/L, βουτυρικό οξύ 1 mL/L, βαλερικό οξύ 1 mL/L, οξικό οξύ 1 mL/L, ευγενόλη 1 mL/L και μεθανόλη 1 mL/L. Τα αποτελέσματα της χρησιμοποίησης διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Η χρήση διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα σε στερεές καλλιέργειες του δείγματος *RP45* και η ανάπτυξη τους.

Οργανικά Συστατικά (Συγκέντρωση)	Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε τρυβλία
Πεπτόνη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, έντονες μεγάλες κίτρινο – πορτοκαλιές αποικίες
Γλυκόζη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, μικρές αποικίες, απαλού κίτρινου χρώματος
Λακτόζη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, μεγάλες αποικίες απαλό κίτρινο
Γλυκερόλη (1 mL/L)	Μεγάλη και έντονη ανάπτυξη απαλού κίτρινου χρώματος
Οξικό οξύ (1 mL/L)	Μεγάλη και έντονη ανάπτυξη κίτρινου χρώματος
Μεθανόλη (1 mL/L)	Μεγάλη και έντονη ανάπτυξη κίτρινου χρώματος
Ευγενόλη (1 mL/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, μεγάλες αποικίες απαλό κίτρινο

Προπιονικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Φαινόλη (1 g/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Βαλερικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Βουτυρικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη

Μετά από μία σειρά επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την ανεύρεση των ιδανικότερων συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού, *Halomonas sp. RPA5* καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι, η ιδανικότερη αλατότητα είναι 40 g/L NaCl, pH ίσο με 7, θερμοκρασία ίση με 30 °C και το ιδανικότερο οργανικό συστατικό ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια ανάπτυξης είναι το οξικό οξύ λόγω της γρήγορης και έντονης ανάπτυξής του.

3.1.2 Σύσταση υγρού βιομέσου και οπτική πυκνότητα δείγματος για την διεξαγωγή των πειραμάτων

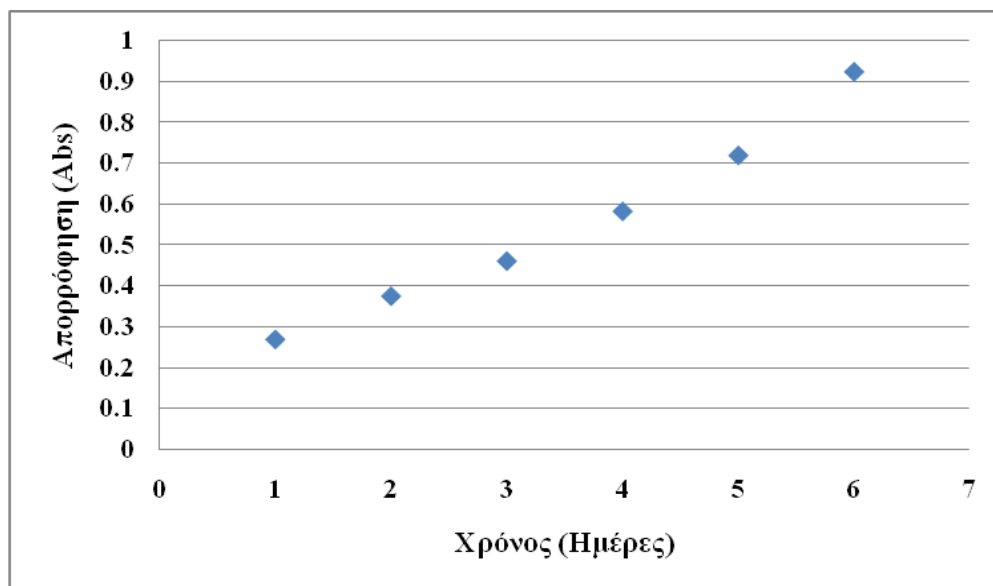
Τα συστατικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για το βιομέσο της υγρής καλλιέργειας του *Halomonas sp. RPA5* είναι NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και οξικό οξύ με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 3 mL/L αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, μέσα από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις υγρές καλλιέργειες έγινε η μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης τους μέσω της οπτικής πυκνότητάς (OD, λ=600nm) για αλατότητα 40 g/L NaCl όπου, είναι η ιδανική αλατότητα. Οι τιμές του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα 3 και Διάγραμμα 1, όπου το σημείο με την μέγιστη τιμή είναι το ιδανικότερο για την εξαγωγή του EPS και την διεξαγωγή των τεστ γιατί σε αυτό το σημείο υπάρχει η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα EPS από τους μικροοργανισμούς. Η ιδανικότερη μέρα πραγματοποίησης της εξαγωγής των EPS είναι η έκτη με έβδομη.

Πίνακας 3: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.

Αλατότητα	1 ^η Μέρα (Abs)	2 ^η Μέρα (Abs)	3 ^η Μέρα (Abs)	4 ^η Μέρα (Abs)	5 ^η Μέρα (Abs)	6 ^η Μέρα (Abs)
40 g/L NaCl	0.269	0.375	0.461	0.583	0.720	0.925

*Τα τεστ πραγματοποιήθηκαν με το υγρό βιομέσο της 6^{ης} μέρα με τις πιο πάνω τιμές οπτικής πυκνότητας. Πρέπει τα τεστ να πραγματοποιούνται στο σημείο με την μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας (OD).



Διάγραμμα 1: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl σε σχέση με τις ημέρες.

3.1.3 Υπολογισμός Flocculation Activity (FA)

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων των τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις του Πίνακα 4 για την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων στα 550 nm. Η τιμή του μάρτυρα πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί 5 λόγω του ότι έγινε αραίωση 1 προς 5.

Πίνακας 4: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 550 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.

Αλατότητα	Απορρόφηση (Abs)
Μάρτυρας	0.159 (0.159×5=0.795)
40 g/L NaCl	0.594
40 g/L NaCl	0.552
40 g/L NaCl	0.613

Με βάση τις μετρήσεις του Πίνακα 4 και χρησιμοποιώντας την εξίσωση 1 καταλήγουμε στα ποσοστά των αποτελεσμάτων των τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound για

δείγματα με αλατότητα 40 g/L NaCl που παρουσιάζονται στο Πίνακα 5. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν μετά από μία σειρά επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για το Flocculation Activity (FA) ήταν σχετικά σε μικρά ποσοστά. Για το λόγο αυτό η περαιτέρω μελέτη του παρόντος τεστ δεν συνεχίστηκε στα επόμενα πειράματα και ασχοληθήκαμε κατά αποκλειστικότητα με την γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα του παρόντος μικροοργανισμού.

Πίνακας 5: Ποσοστά αποτελεσμάτων για τα τεστ, Flocculation Activity (FA) για tightly bound για δείγματα με αλατότητες 40 g/L NaCl.

Αλατότητα	Ποσοστά FA (%)
40 g/L NaCl	25.28
40 g/L NaCl	30.57
40 g/L NaCl	22.89
Μέσος Όρος	26.25

3.1.4 Υπολογισμός Γαλακτωματοποιητικής Ικανότητας – Emulsion Capacity Index

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων των τεστ, της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας για loosely bound χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 2. Ουσιαστικά, ισούται με το ύψος του ολικού γαλακτώματος (cm) που δημιουργήθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες δια το συνολικό ύψος της υγρής στήλης σε κάθε περίπτωση για τους διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο, κηροζίνη) και Tween 80 και Triton X-100 ως μάρτυρες, αλλά και τις διαφορετικές επί τις εκατό κατ' όγκο συγκεντρώσεις (% κ.ο) εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 % κ.ο.) που χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλασιάζοντας το πηλίκο με το 100 με το πέρας των 24 ωρών και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα αποτελέσματα του ποσοστού γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας για τα τεστ, Emulsion Index (EI_{24h}) για loosely bound και τις ακραίες συνθήκες (θερμοκρασία, pH και αυτόκαυστο) παρουσιάζονται στους Πίνακες που ακολουθούν για δείγματα με αλατότητα 40 g/L NaCl. Επίσης, εικόνες από τα δείγματα με τις διαφορετικές επί τις εκατό κατ' όγκο συγκεντρώσεις αλλά και τους διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες παρουσιάζονται πιο κάτω.

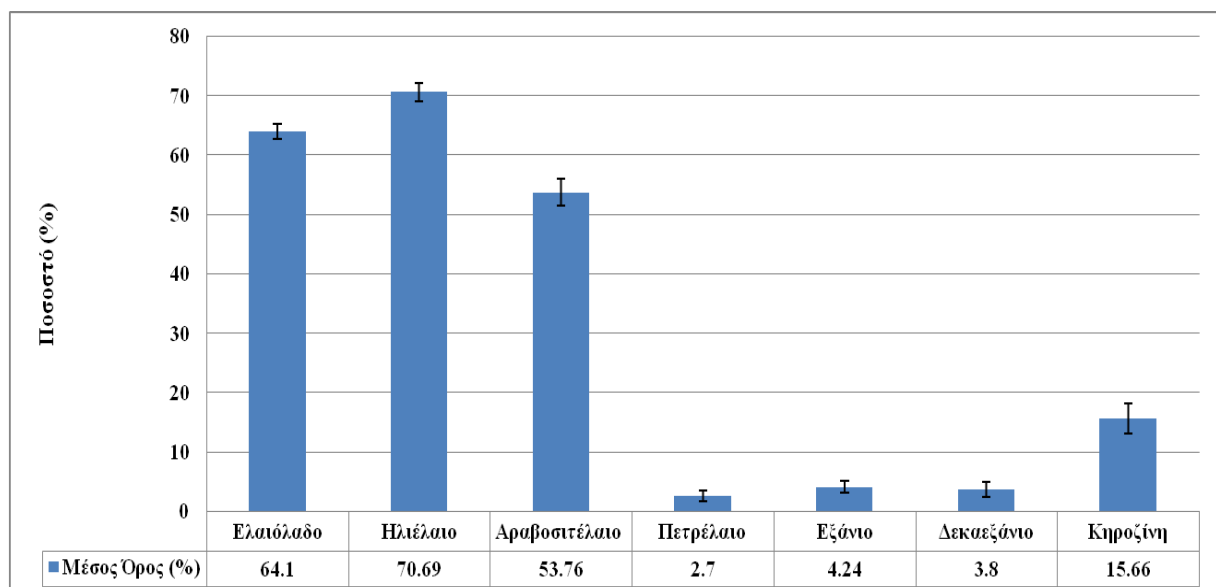
Επιπλέον, για την ρύθμιση των ακραίων συνθηκών (θερμοκρασίας και pH) για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα των EPS για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

3.1.4.1 Διάφοροι οργανικοί διαλύτες για 0.5 και 2.5 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS

Αρχικά, έγινε το τεστ για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμένων EPS για τους οργανικούς διαλύτες ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη και για συγκεντρώσεις 0.5 και 2.5 % κ.ο. με βάση το άρθρο “A statistical approach on optimization of exopolymetric substance production by *Halomonas sp. S19* and its emulsification activity” για να ελεγχθεί το διάστημα των ποσοστών της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας. Τα αποτελέσματα για τα 0.5 % κ.ο. και 2.5 % κ.ο. παρουσιάζονται στο Πίνακα 6 και 7 και στο Διάγραμμα 2 και 3 αντίστοιχα.

Πίνακας 6: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο.

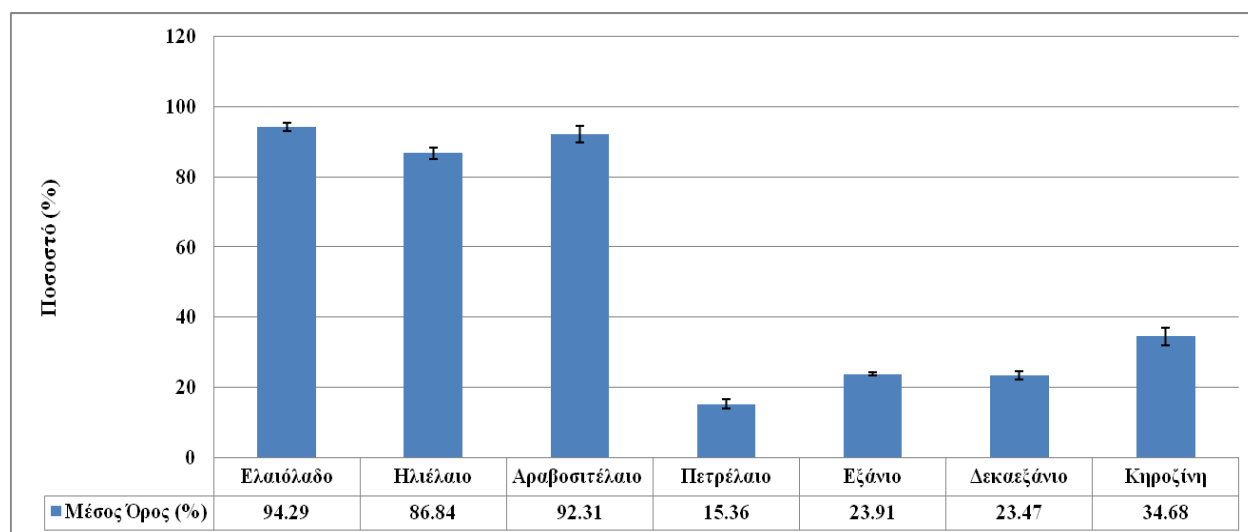
Αλατότητες	Ελαιόλαδο	Ηλιέλαιο	Αραβοσιτέλαιο	Πετρέλαιο	Εξάνιο	Δεκαεξάνιο	Κηροζίνη
40 g/L NaCl	60.00	67.80	51.61	3.51	3.57	3.33	15.26
40 g/L NaCl	63.33	70.50	53.23	2.79	5.36	3.23	14.48
40 g/L NaCl	68.96	73.77	56.45	1.79	3.79	4.84	17.24
Μέσος Όρος (%)	64.10	70.69	53.76	2.70	4.24	3.80	15.66



Διάγραμμα 2: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο.

Πίνακας 7: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 2.5 % κ.ο.

Αλατότητες	Ελαιόλαδο	Ηλιέλαιο	Αραβοσιτέλαιο	Πετρέλαιο	Εξάνιο	Δεκαεξάνιο	Κηροζίνη
40g/L NaCl	95.31	87.80	94.92	14.51	23.57	23.35	34.48
40g/L NaCl	92.89	87.72	90.67	16.79	24.38	22.23	32.26
40g/L NaCl	94.67	85.00	91.33	14.79	23.79	24.84	37.29
Μέσος Όρος (%)	94.29	86.84	92.30	15.36	23.91	23.47	34.68



Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 2.5 % κ.ο.

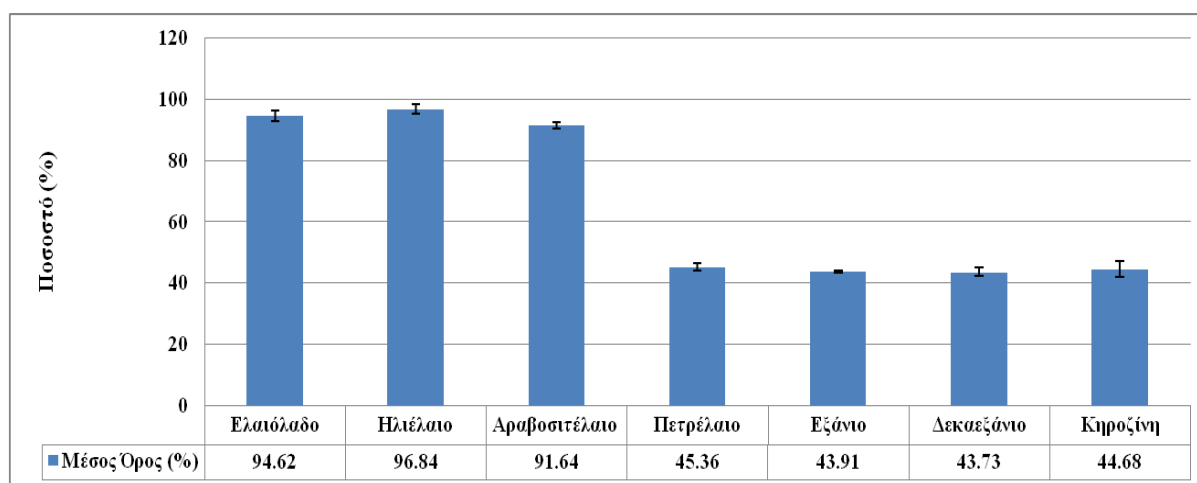
Με βάση τα αποτελέσματα που εμφανίστηκαν διαπιστώθηκε ότι, οι ιδανικότεροι οργανικοί διαλύτες με τα μεγαλύτερα ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας είναι τα έλαια (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και αραβοσιτέλαιο), καθώς οι υπόλοιποι οργανικοί διαλύτες παρουσιάζουν μικρά ποσοστά. Για το λόγο αυτό, η συνέχιση των πειραμάτων επικεντρώθηκε αποκλειστικά σε έλαια ως οργανικούς διαλύτες για την ανεύρεση του ιδανικότερου οργανικού διαλύτη, συγκέντρωσης αλλά και στη σταθερότητα του γαλακτωματοποιητή κάτω από ακραίες συνθήκες, όπως θερμοκρασία, pH και αποστείρωση.

3.1.4.2 Διάφοροι οργανικοί διαλύτες για 0.5 % κ.ο. Tween 80 και Triton X-100

Επίσης, έγινε το τεστ για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα του Tween 80 και Triton X-100 για τους οργανικούς διαλύτες ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη με συγκέντρωση 0.5 % κ.ο. για να ελεγχθούν τα ποσοστά της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας του Tween 80 και Triton X-100 ως μάρτυρες. Τα αποτελέσματα για τα 0.5 % κ.ο. παρουσιάζονται στο Πίνακα 8 και 9 και στο Διάγραμμα 4 και 5 αντίστοιχα.

Πίνακας 8: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Tween 80.

Αλατότητες	Ελαιόλαδο	Ηλιέλαιο	Αραβοσιτέλαιο	Πετρέλαιο	Εξάνιο	Δεκαεξάνιο	Κηροζίνη
40g/L NaCl	96.31	97.8	92.92	44.51	43.57	43.35	44.48
40g/L NaCl	92.89	97.72	90.67	46.79	44.38	42.23	42.26
40g/L NaCl	94.67	95	91.33	44.79	43.79	44.84	47.29
Μέσος Όρος (%)	94.62	96.84	91.64	45.36	43.91	43.47	44.67

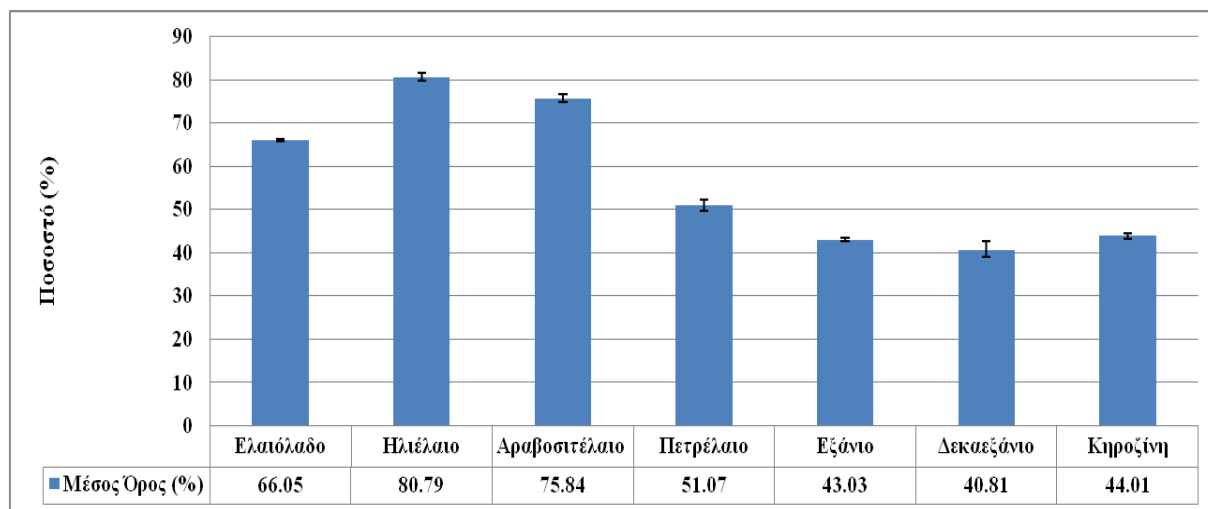


Διάγραμμα 4: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Tween 80.

Πίνακας 9: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Triton X-100.

Αλατότητες	Ελαιόλαδο	Ηλιέλαιο	Αραβοσιτέλαιο	Πετρέλαιο	Εξάνιο	Δεκαεξάνιο	Κηροζίνη
40g/L NaCl	66.14	79.85	76.52	52.51	42.57	39.35	44.48

40g/L NaCl	65.67	80.72	74.67	49.79	43.38	40.23	43.26
40g/L NaCl	66.34	81.8	76.33	50.92	43.14	42.84	44.29
Μέσος Όρος (%)	66.05	80.79	75.84	51.07	43.03	40.81	44.01



Διάγραμμα 5: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικούς διαλύτες, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη για 0.5 % κ.ο. Triton X-100.

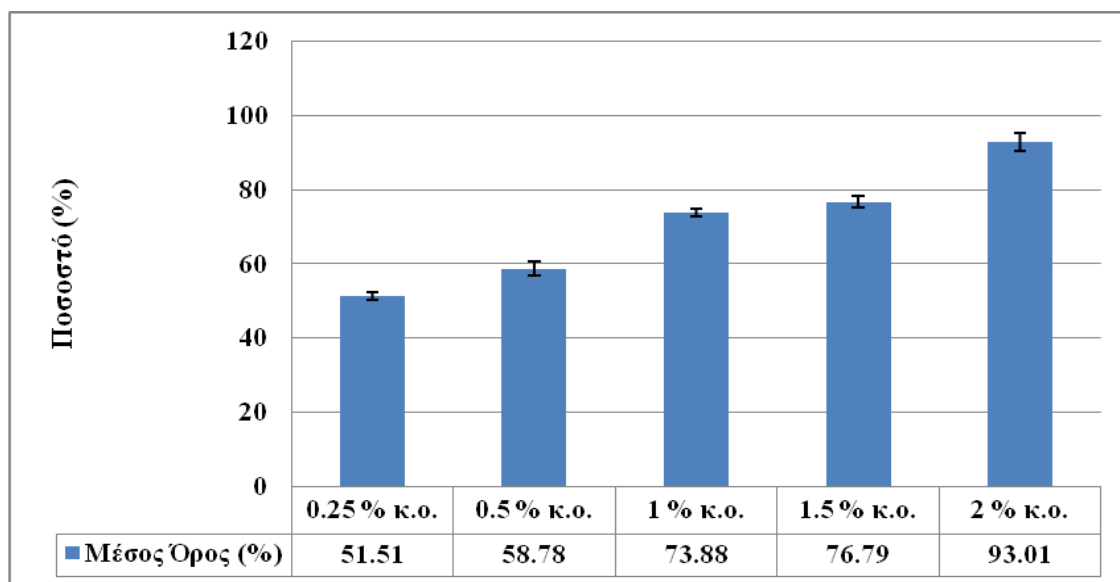
3.1.4.3 Οργανικός διαλύτης το ελαιόλαδο

Αρχικά, ελέγχθηκε ως οργανικός διαλύτης το ελαιόλαδο για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο.) και για ακραίες συνθήκες με 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο. Τα αποτελέσματα για τα 0.25 – 2 % κ.ο. παρουσιάζονται στο Πίνακα 10α και στο Διάγραμμα 6 ενώ για τις ακραίες συνθήκες στο Πίνακα 10β και στο Διάγραμμα 7. Για την ρύθμιση των ακραίων συνθηκών (θερμοκρασίας και pH) για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα των EPS για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται πιο πάνω.

Πίνακας 10: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ελαιόλαδο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

α)

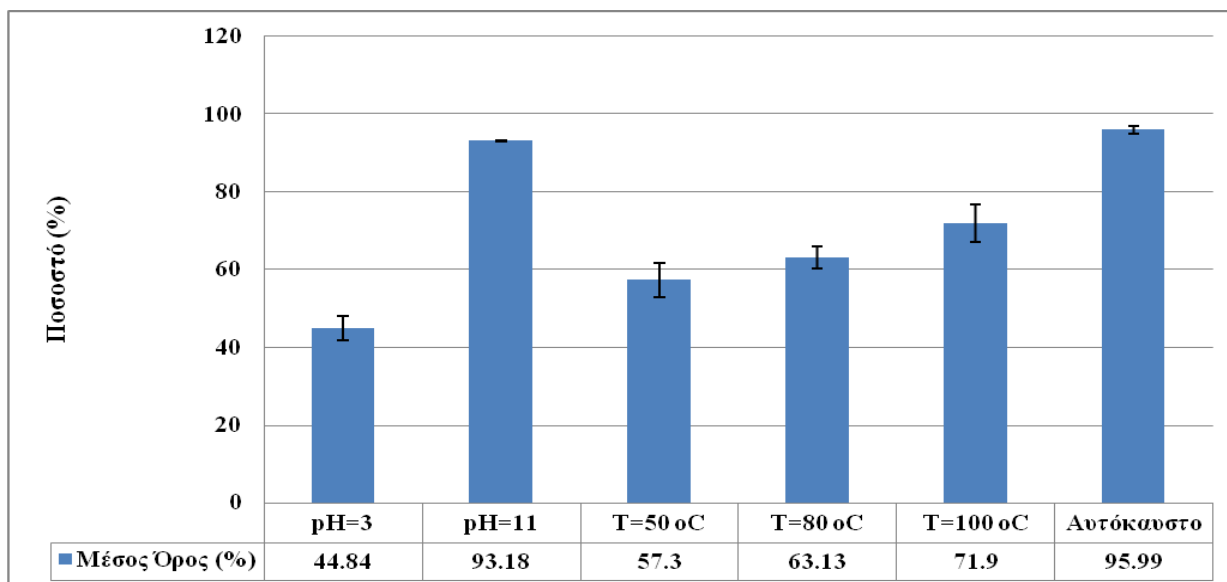
Αλατότητες	0.25 % κ.ο.	0.5 % κ.ο.	1.0 % κ.ο.	1.5 % κ.ο.	2.0 % κ.ο.
40 g/L NaCl	50.63	59.67	72.88	77.42	93.55
40 g/L NaCl	52.63	60.00	73.77	75.00	95.16
40 g/L NaCl	51.28	56.66	75.00	77.96	90.32
Μέσος Όρος (%)	51.51	58.78	73.88	76.79	93.01



Διάγραμμα 6: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτοματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο..

β)

Αλατότητες	pH=3	pH=11	T=50 °C	T=80 °C	T=100 °C	Αυτόκαυστο
40 g/L NaCl	43.86	93.33	62.50	63.67	67.80	96.49
40 g/L NaCl	48.28	93.22	55.17	60.18	77.19	94.92
40 g/L NaCl	42.37	92.98	54.24	65.55	70.70	96.55
Μέσος Όρος (%)	44.84	93.18	57.30	63.13	71.90	95.99

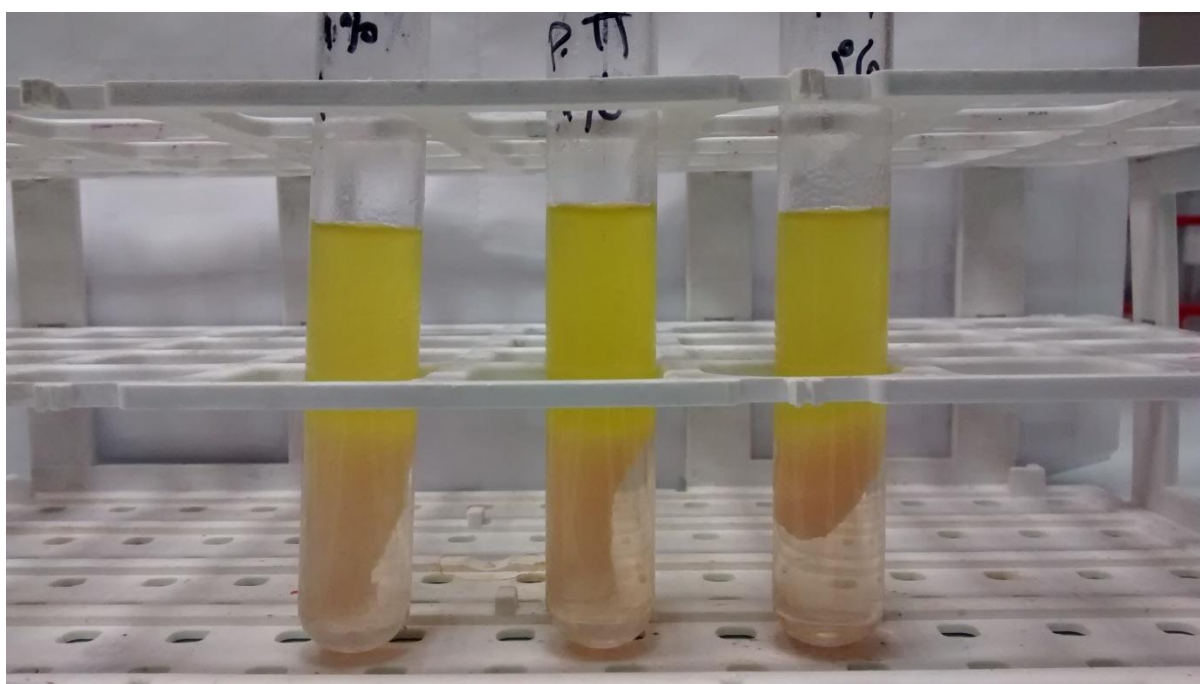


Διάγραμμα 7: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτοματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

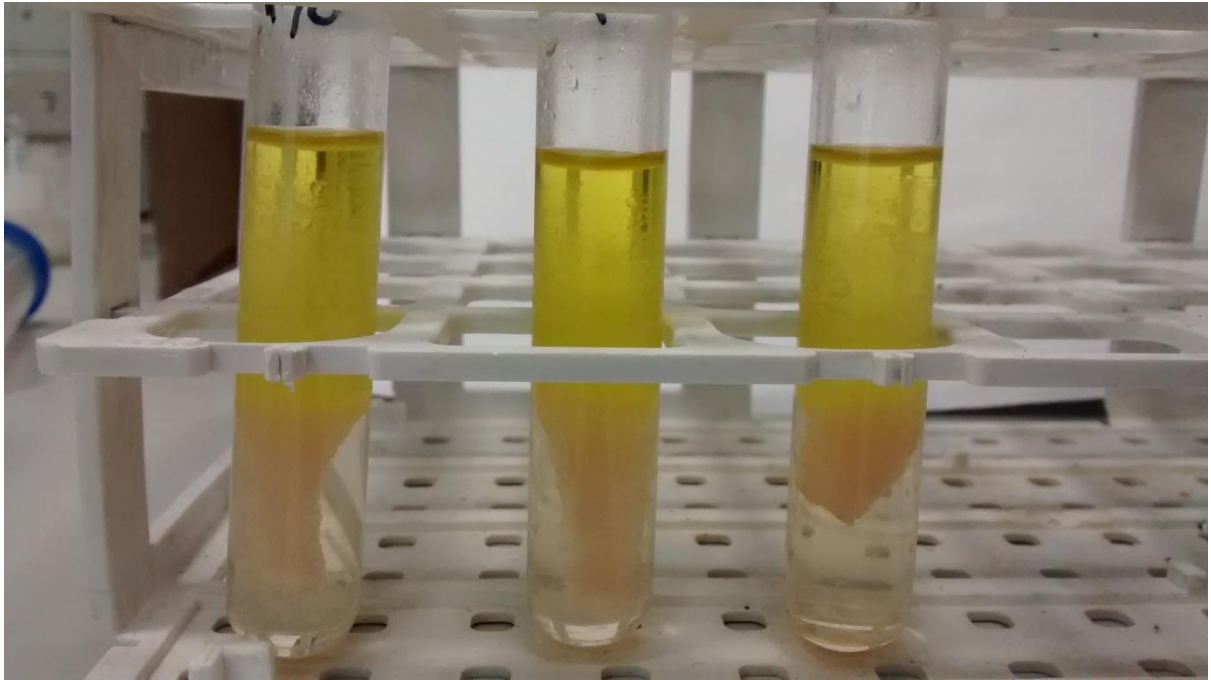
3.1.4.3.1 Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο

Εικόνες από τα αποτελέσματα της γαλακτοματοποιητικής ικανότητας του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* για τα διάφορα δείγματα με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο καθώς, και η σταθερότητα που παρουσιάζουν με το πέρας των πέντε ημερών παρουσιάζονται πιο κάτω.

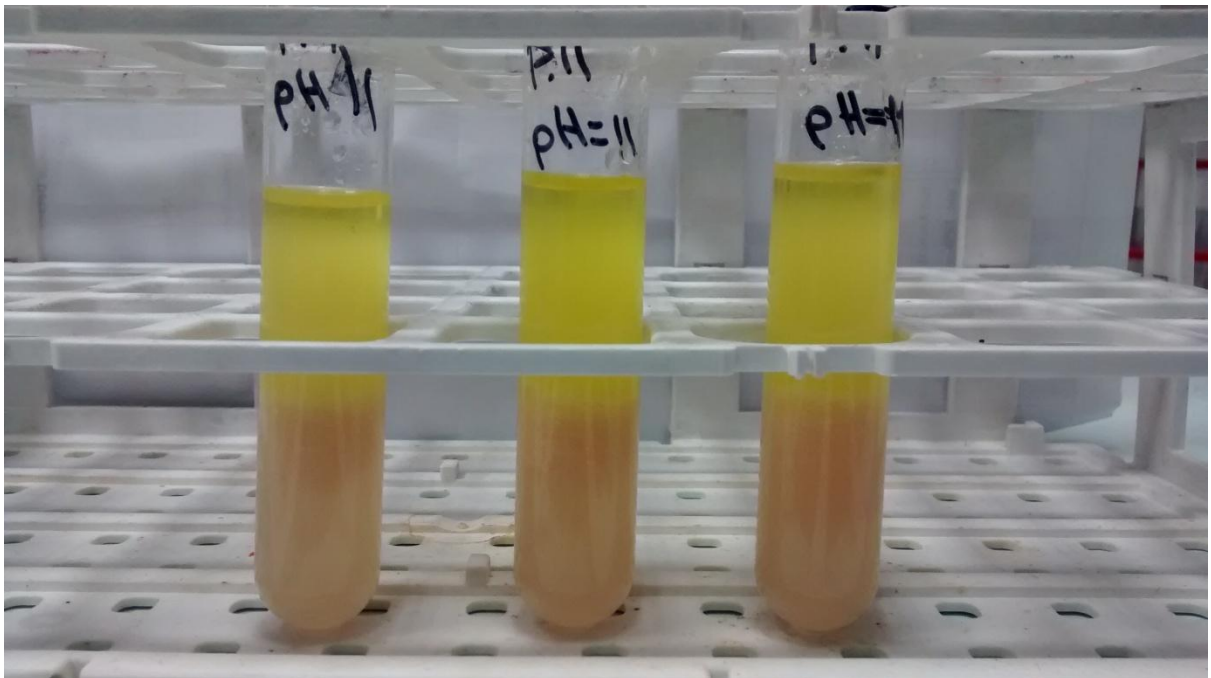
Δείγματα για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



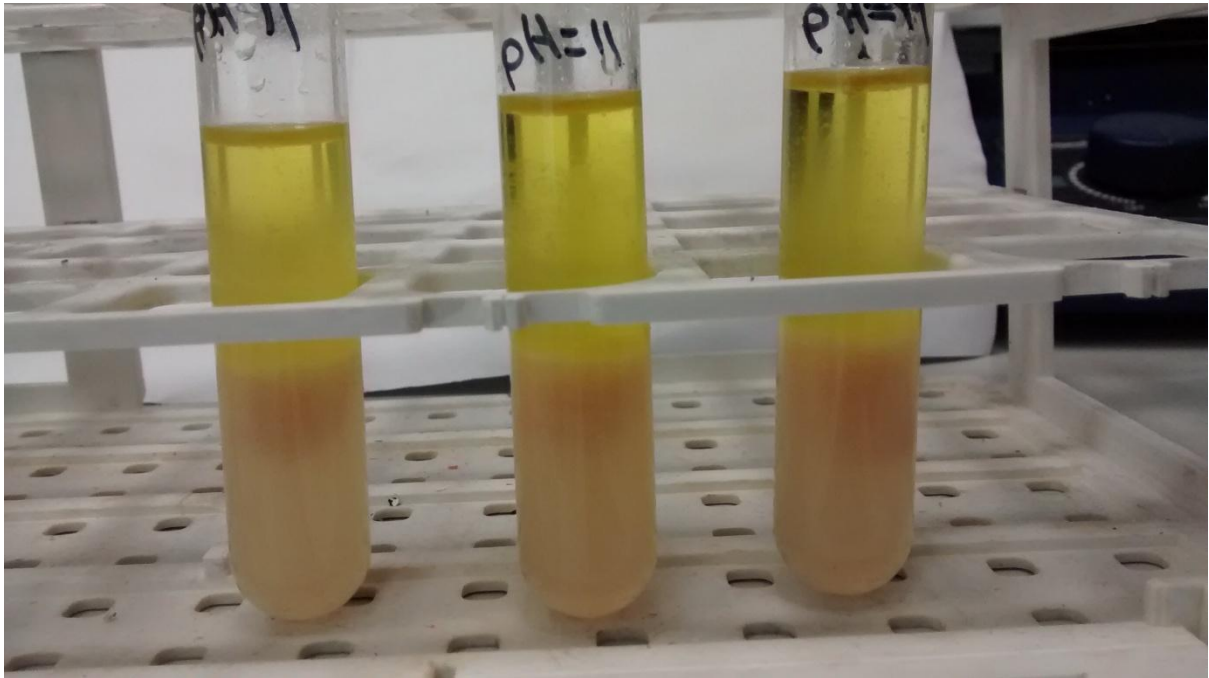
Η σταθερότητα του γαλακτώματος με το πέρας πέντε ημερών:



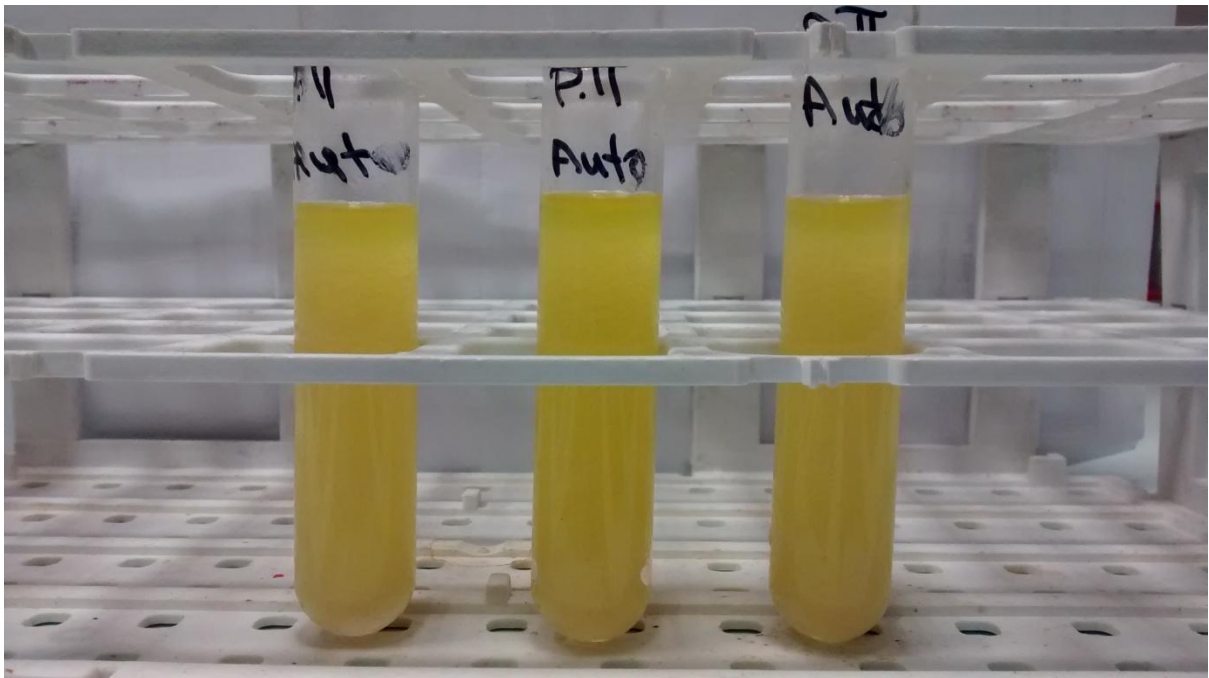
Δείγματα με pH=11 για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



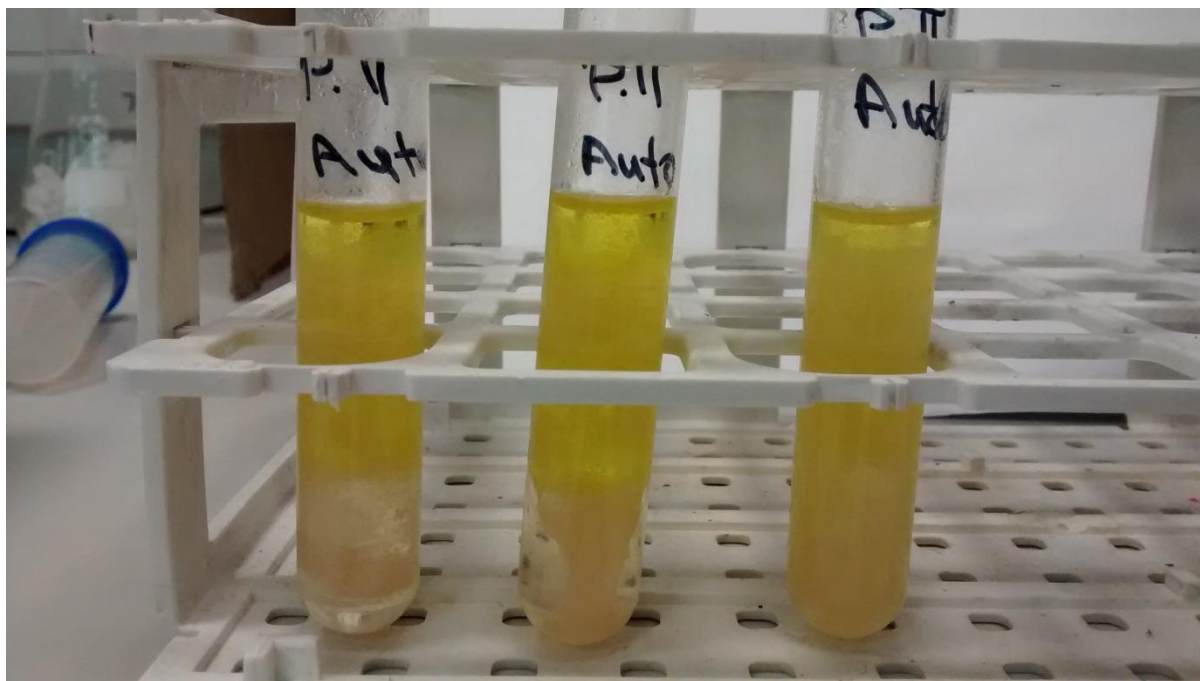
Η σταθερότητα του γαλακτώματος με το πέρας πέντε ημερών:



Δείγματα αυτόκαυστου για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



Η σταθερότητα του γαλακτώματος με το πέρας πέντε ημερών:



Εικόνα 7: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH=11 και σε αυτόκαυστο.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για το ηλιέλαιο και για το αραβοσιτέλαιο για να διαπιστώσουμε ποιο από τα τρία έλαια που ήταν προς εξέταση παρουσίαζε τα πιο αποδοτικά αποτελέσματα γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας.

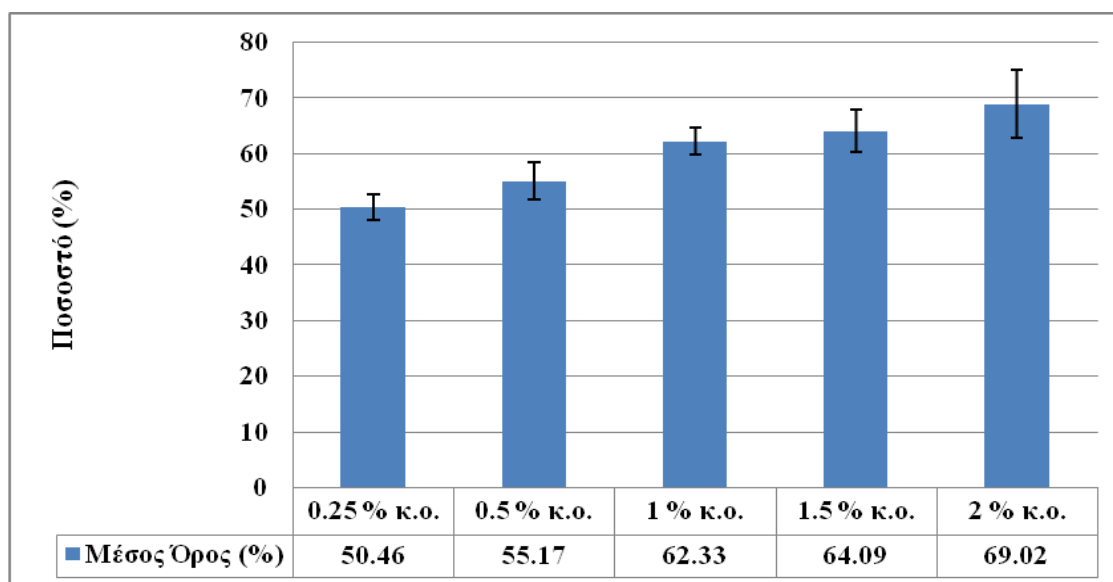
3.1.4.4 Οργανικός διαλύτης το ηλιέλαιο

Όπως για το ελαιόλαδο έτσι και για το ηλιέλαιο επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία για να διαπιστώσουμε ποιο από τα έλαια που ήταν προς εξέταση παρουσίαζε τα πιο αποδοτικά αποτελέσματα γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας. Έτσι, ελέγχθηκε ως οργανικός διαλύτης το ηλιέλαιο για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο.) και για ακραίες συνθήκες με 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο. Τα αποτελέσματα για τα 0.25 – 2 % κ.ο. παρουσιάζονται στο Πίνακα 11α και στο Διάγραμμα 8 ενώ για τις ακραίες συνθήκες στο Πίνακα 11β και στο Διάγραμμα 9. Για την ρύθμιση των ακραίων συνθηκών (θερμοκρασίας και pH) για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα των EPS για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται πιο πάνω.

Πίνακας 11: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ηλιέλαιο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

α)

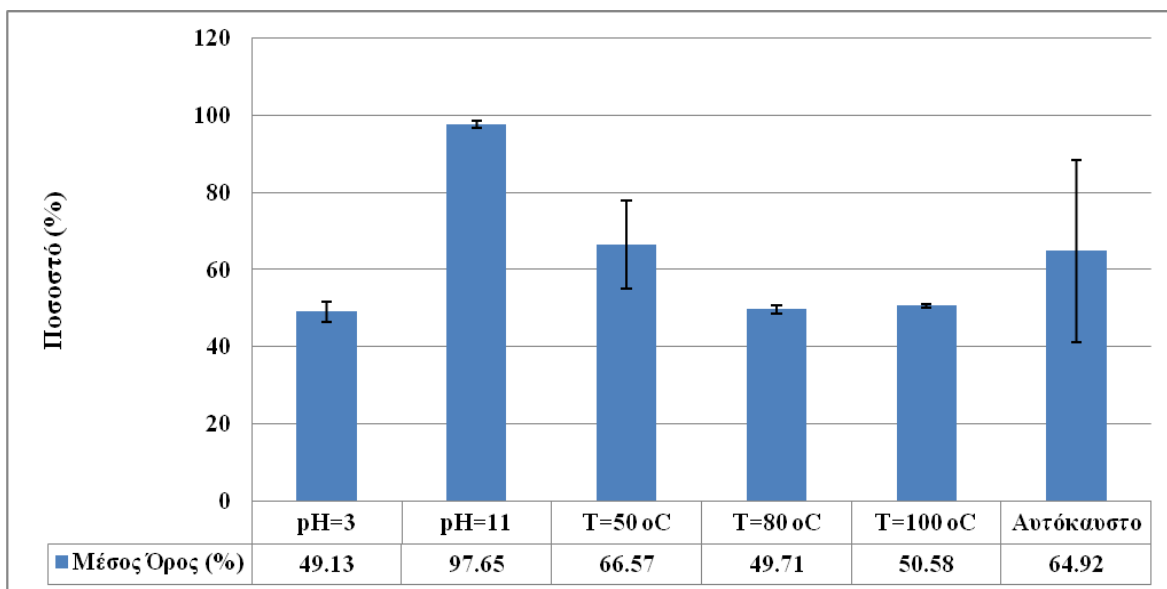
Αλατότητες	0.25 % κ.ο.	0.5 % κ.ο.	1.0 % κ.ο.	1.5 % κ.ο.	2.0 % κ.ο.
40 g/L NaCl	50.17	58.97	60	66.13	75.41
40 g/L NaCl	52.93	53.85	62	66.45	63.33
40 g/L NaCl	48.27	52.7	65	59.68	68.33
Μέσος Όρος (%)	50.46	55.17	62.33	64.09	69.02



Διάγραμμα 8: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο..

β)

Αλατότητες	pH=3	pH=11	T=50 °C	T=80 °C	T=100 °C	Αυτόκαυστο
40 g/L NaCl	49.12	98.21	58.33	49.15	50.88	92.21
40 g/L NaCl	51.72	98.24	55.17	50.85	50.00	50.00
40 g/L NaCl	46.55	96.49	76.21	49.12	50.85	52.54
Μέσος Όρος (%)	49.13	97.65	63.24	49.71	50.58	64.92

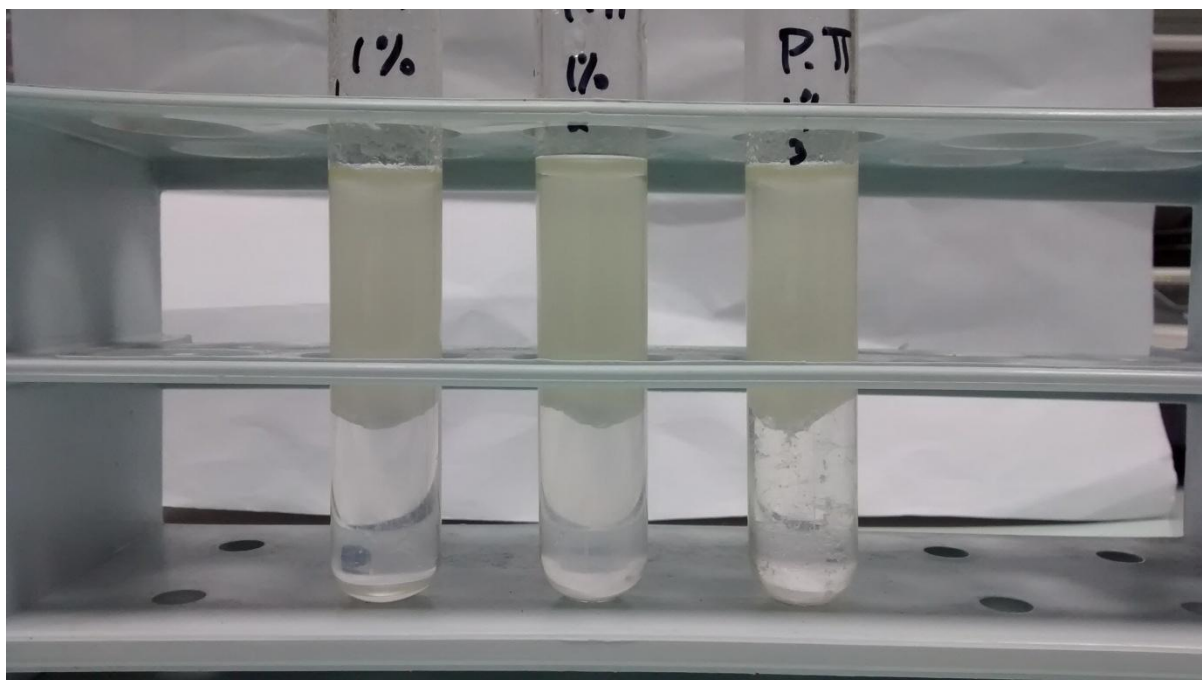


Διάγραμμα 9: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

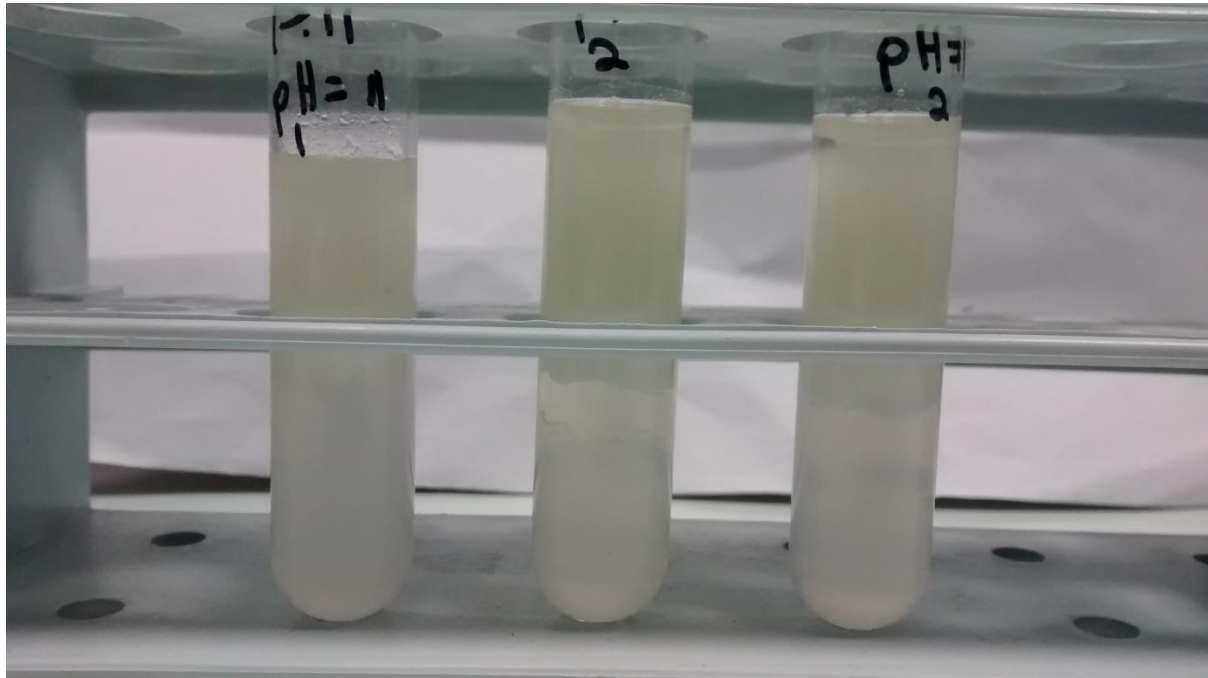
3.1.4.4.1 Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο

Εικόνες από τα αποτελέσματα της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* για τα διάφορα δείγματα με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο παρουσιάζονται πιο κάτω.

Δείγματα για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



Δείγματα με pH=11 για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



Εικόνα 8: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το ηλιέλαιο για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH= 11.

3.1.4.5 Οργανικός διαλύτης το αραβοσιτέλαιο

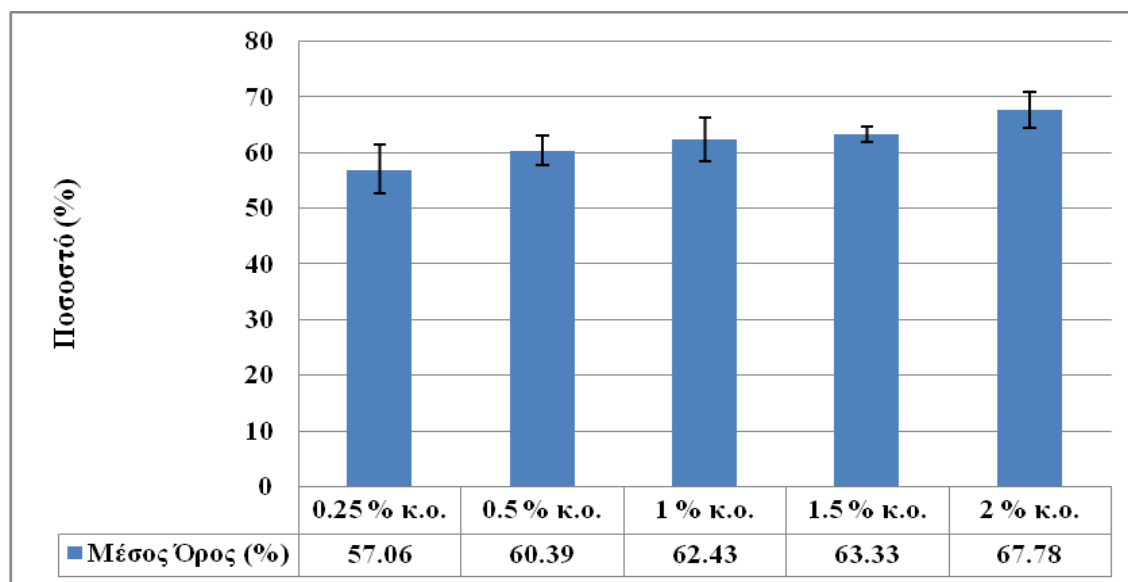
Όπως για το ελαιόλαδο και το ηλιέλαιο, έτσι και για το αραβοσιτέλαιο επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία για να διαπιστώσουμε ποιο από τα έλαια που ήταν προς εξέταση παρουσίαζε τα πιο αποδοτικά αποτελέσματα γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας. Έτσι, ελέγχθηκε ως οργανικός διαλύτης το αραβοσιτέλαιο για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο.) και για ακραίες συνθήκες με 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο. Τα αποτελέσματα για τα 0.25 – 2 % κ.ο. παρουσιάζονται στο Πίνακα 12α και στο Διάγραμμα 10 ενώ για τις ακραίες συνθήκες στο Πίνακα 12β και στο Διάγραμμα 11. Για την ρύθμιση των ακραίων συνθηκών (θερμοκρασίας και pH) για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα των EPS για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται πιο πάνω.

Πίνακας 12: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το αραβοσιτέλαιο για: α) 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 και 2.0 % κ.ο., β) για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

α)

Αλατότητες	0.25 % κ.ο.	0.5 % κ.ο.	1.0 % κ.ο.	1.5 % κ.ο.	2.0 % κ.ο.
------------	-------------	------------	------------	------------	------------

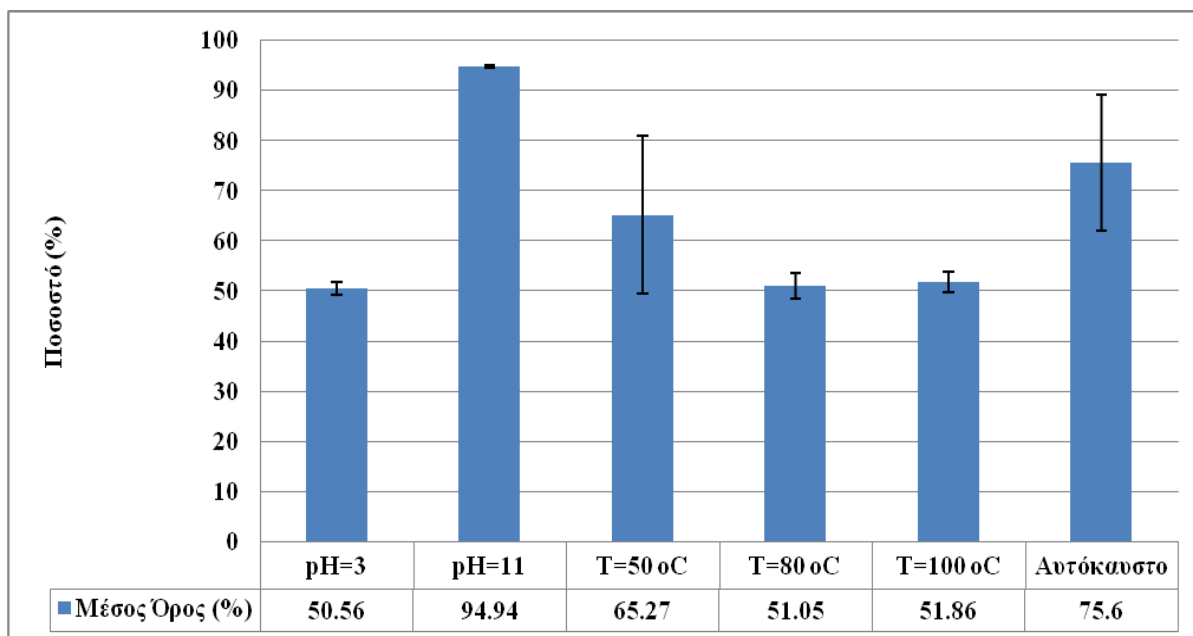
40 g/L NaCl	65.79	70.00	67.74	61.29	65.00
40 g/L NaCl	63.29	64.52	70.97	62.50	62.50
40 g/L NaCl	58.21	53.85	64.62	57.38	62.50
Μέσος Όρος (%)	57.06	60.39	62.43	63.33	67.78



Διάγραμμα 10: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 % κ.ο.

β)

Αλατότητες	pH=3	pH=11	T=50°C	T=80°C	T=100°C	Αυτόκαυστο
40 g/L NaCl	51.67	95.16	83.33	49.18	53.97	83.05
40 g/L NaCl	50.85	94.74	54.84	50.00	50.00	83.75
40 g/L NaCl	49.15	94.92	57.63	53.97	51.61	60.00
Μέσος Όρος (%)	50.56	94.94	65.27	51.05	51.86	75.60

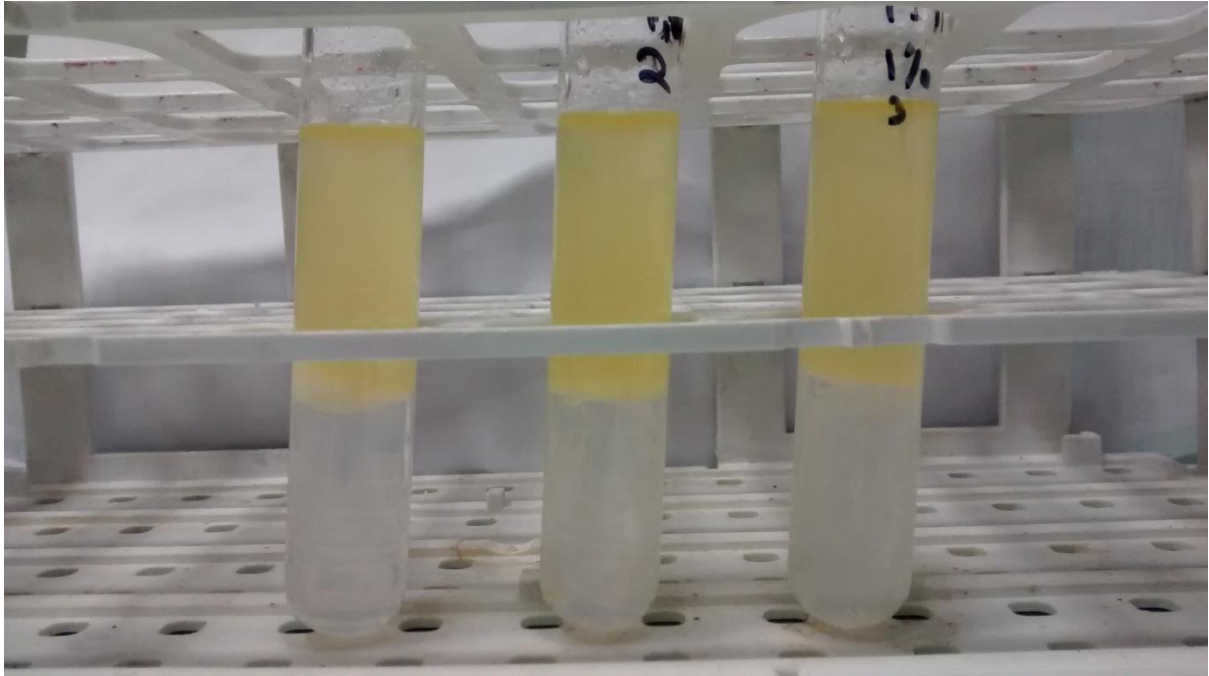


Διάγραμμα 11: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 1.0 % κ.ο. σε pH=3 και 11, T=50, 80 και 100 °C και σε αυτόκαυστο.

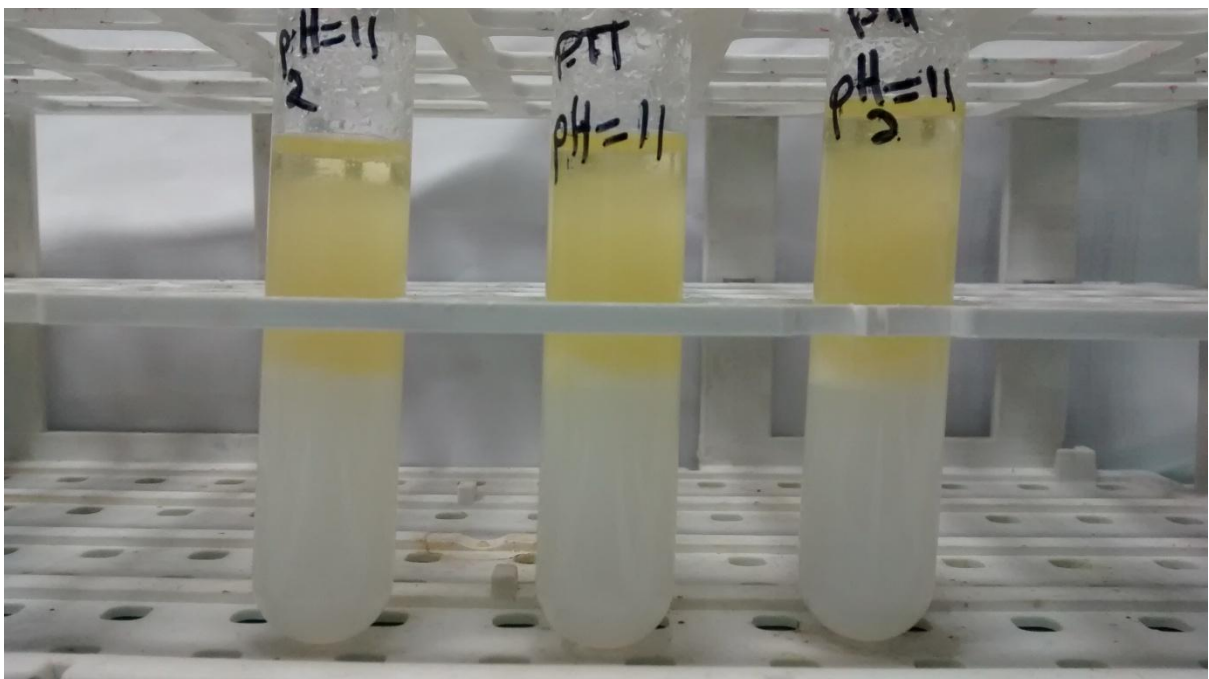
3.1.4.5.1 Εικόνες γαλακτωμάτων με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο

Εικόνες από τα αποτελέσματα της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* για τα διάφορα δείγματα με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο παρουσιάζονται πιο κάτω.

Δείγματα για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



Δείγματα με pH=11 για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS:



Εικόνα 9: Γαλακτώματα με οργανικό διαλύτη το αραβοσιτέλαιο για 1.0 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και για 1.0 κ.ο. σε pH= 11.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, ο ιδανικότερος οργανικός διαλύτης με την μεγαλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα σε σύγκριση με τους υπό εξέταση οργανικούς διαλύτες είναι το ελαιόλαδο. Επίσης, παρατηρούμε ότι τα δείγματα μας εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα και στις ακραίες

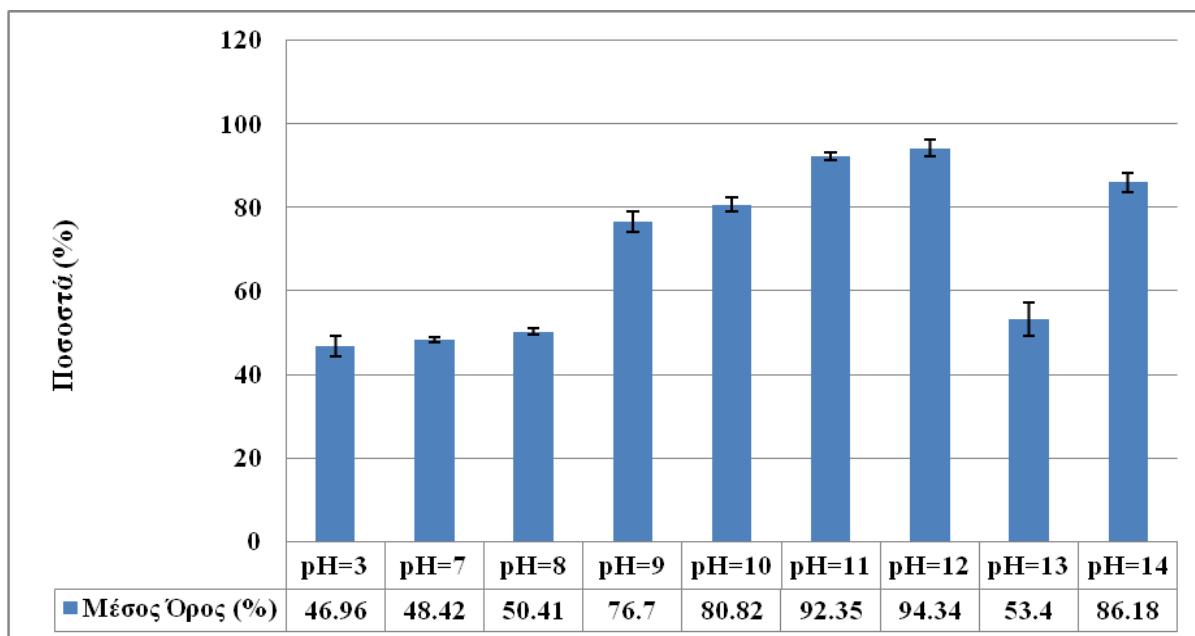
συνθήκες και ιδιαίτερα σε βασικά pH και στο αυτόκαυστο. Ακόμη, ένας γαλακτωματοποιητής για έχει την ικανότητα σταθεροποίησης, επιβάλλεται να διατηρεί τουλάχιστον το 50% του αρχικού όγκου του γαλακτώματος του με το πέρας 24 ώρες από την παρασκευή του (Willumsen & Karlson, 1997). Ο παρόν γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιείται στα πειράματα μας παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα (>70) ακόμη και με το πέρας εβδομάδων.

3.1.4.6 Οργανικός διαλύτης το ελαιόλαδο με pH = 3 και 7 – 14

Έτσι, συνεχίστηκαν τα πείραμα για περεταίρω έρευνα του παραγόμενου EPS με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο και συγκέντρωση εκχυλισμένου EPS 1 % κ.ο.. Τα πειράματα που ακολούθησαν αφορούσαν pH ίσο με 3 και από 7 – 14 για να δούμε πόσο επηρεάζει το pH την γαλακτωματοποιητική ικανότητα του παραγόμενου EPS. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 13 και το Διάγραμμα 12. Για την ρύθμιση των pH για τη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και σταθερότητα των EPS για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται πιο πάνω.

Πίνακας 13: Ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας με οργανικό διαλύτη, το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH = 3 και 7 – 14.

Αλατότητες	pH=3	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10	pH=11	pH=12	pH=13	pH=14
40 g/L NaCl	49.15	48.33	50.00	79.36	79.37	91.67	96.55	52.54	83.87
40 g/L NaCl	47.46	49.15	50.00	74.6	82.54	93.22	93.33	50.00	86.21
40 g/L NaCl	44.27	47.77	51.24	76.14	80.56	92.15	93.15	57.67	88.45
Μέσος Όρος (%)	46.96	48.42	50.41	76.70	80.82	92.35	94.34	53.40	86.18



Διάγραμμα 12: Μέσος όρος ποσοστών γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και τυπική απόκλιση με οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο για 1.0 % κ.ο. σε pH = 3 και 7 – 14.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται πιο πάνω διαπιστώνουμε ότι όσο αυξάνεται το pH δηλαδή, γίνεται πιο βασικό αυξάνεται και η γαλακτωματοποιητική ικανότητα του παραγόμενου EPS από τον μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5*. Επίσης, παρατηρούμε ότι στο pH=13 υπάρχει μία σημαντική μείωση σε σύγκριση με το pH=12 και 11, αυτό ίσως να οφείλεται σε κάποιο πειραματικό σφάλμα κατά την προσθήκη της βάσης (NaOH) στα διαλύματα. Για το pH=14 υπάρχει μια μικρή μείωση στο ποσοστό γαλακτωματοποίησης και αυτό πιθανότατα οφείλεται στην καταστροφή μερικών εκχυλισμένων EPS από το υπερβολικά βασικά περιβάλλον.

3.1.5 Παρουσία υδατανθράκων

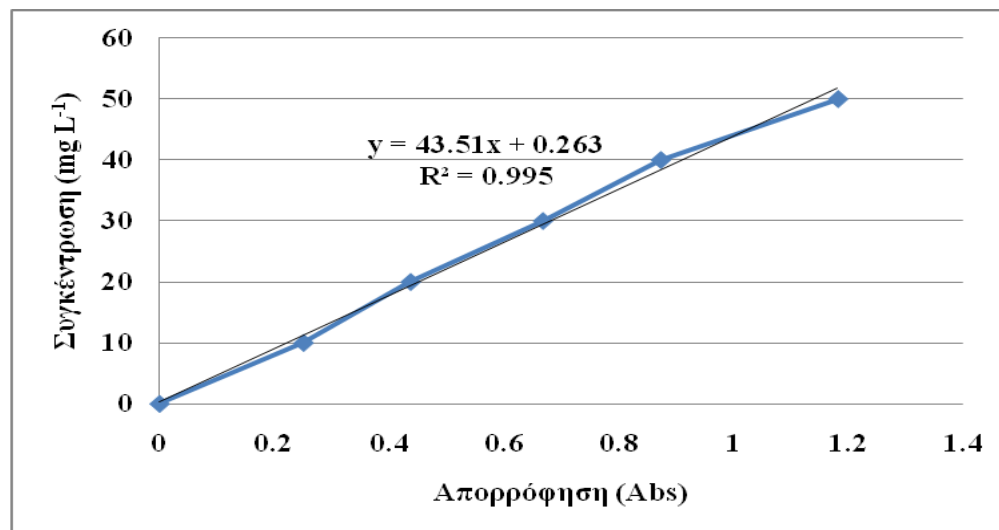
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης υδατανθράκων στα άγνωστα δείγματα *RPA5* ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2. Επίσης, για να υπολογιστεί η ποσότητα των συνολικών υδατανθράκων στο δείγμα *RPA5* άγνωστης συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση, $y = 43.51x + 0.263$ (Καμπύλη Βαθμονόμησης 1) όπου αντικαθιστώντας τη μέση τιμή των τριών τιμών του άγνωστου δείγματος (Πίνακας 14) που είναι 0.112 Abs στο x και λύνοντας ως προς y την εξίσωση υπολογίστηκε η άγνωστη συγκέντρωση (C) του δείγματος να είναι ίση με 5.14 mg/L. Λόγω της αραιώσης των

δειγμάτων 10 φορές η συγκέντρωση που προκύπτει από τους υπολογισμούς πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί 10. Άρα, η συγκέντρωση που προκύπτει είναι ίση με 0.0514 g/L.

Επιπλέον, μέσα από τη Καμπύλη Βαθμονόμησης 1 παρατηρείται ότι ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) είναι ίσος με 0.995 άρα, βρίσκεται πολύ κοντά στη μονάδα και έτσι είναι ακριβής, σωστή και με λιγότερα σφάλματα.

Πίνακας 14: Τιμές απορρόφησης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 490 nm.

Δείγματα	Απορρόφηση (Abs)
Δείγμα 1	0.121
Δείγμα 2	0.102
Δείγμα 3	0.112
Μέσος Όρος	0.112



Καμπύλη Βαθμονόμησης 1: Η καμπύλη βαθμονόμησης των υδατανθράκων σε σχέση με τη συγκέντρωση (mgL^{-1}) με την προσθήκη γραμμής τάσης (trend line), της σχέσης και του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για απορρόφηση σε μήκος κύματος 490 nm.

3.1.6 Παρουσία πρωτεϊνών

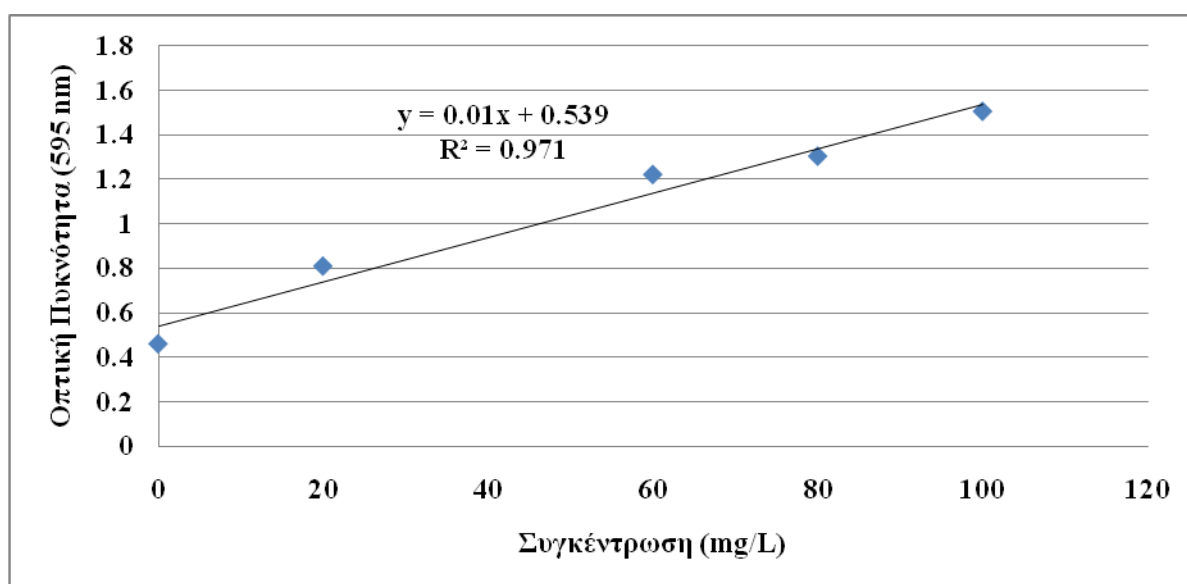
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα άγνωστα δείγματα *RPA5* ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2. Επίσης, για να υπολογιστεί

η ποσότητα των συνολικών πρωτεϊνών στο δείγμα *RPA5* άγνωστης συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση, $y = 0.01x + 0.539$ (Καμπύλη Βαθμονόμησης 2) όπου αντικαθιστώντας τη μέση τιμή των τεσσάρων τιμών του άγνωστου δείγματος (Πίνακας 15) που είναι 0.924 Abs στο y και λύνοντας ως προς x την εξίσωση υπολογίστηκε η άγνωστη συγκέντρωση (C) του δείγματος να είναι ίση με 38.5 mg/L. Λόγω της αραιώσης των δειγμάτων 10 φορές η συγκέντρωση που προκύπτει από τους υπολογισμούς πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί 10. Άρα, η συγκέντρωση που προκύπτει είναι ίση με 0.385 g/L.

Επιπλέον, μέσα από τη Καμπύλη Βαθμονόμησης 2 παρατηρείται ότι ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) είναι ίσος με 0.971 άρα, βρίσκεται πολύ κοντά στη μονάδα και έτσι είναι ακριβής, σωστή και με λιγότερα σφάλματα.

Πίνακας 15: Τιμές απορρόφησης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA5* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 595 nm.

Δείγματα	Απορρόφηση (Abs)
Δείγμα 1	0.900
Δείγμα 2	0.934
Δείγμα 3	0.918
Δείγμα 4	0.944
Μέσος Όρος	0.924

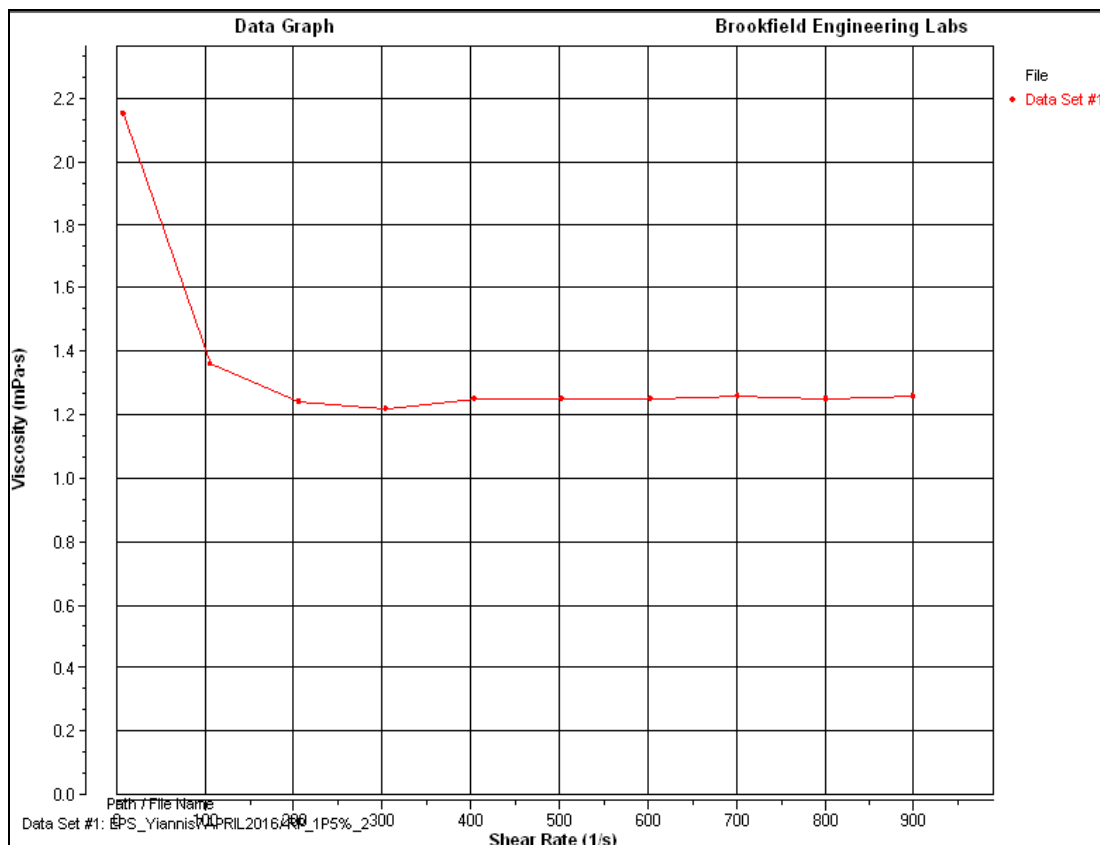


Καμπύλη Βαθμονόμησης 2: Η καμπύλη βαθμονόμησης των πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση (mg/L) με την προσθήκη γραμμής τάσης (trend line), της σχέσης και του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm.

3.1.7 Ρεολογικές ιδιότητες εκχυλισμένου EPS

Για την ανεύρεση των βασικών ρεολογικών ιδιοτήτων του εκχυλισμένου EPS και συγκεκριμένα του ιξώδους χρησιμοποιήθηκε ο ιξωμετρίτης (Brookfield Viscometer DV2T) όπου προσθέτοντας την απαιτούμενη ποσότητα (3–5 mL) εκχυλισμένου EPS και ρυθμίζοντας τις απαραίτητες συνθήκες κατασκευάζεται η γραφική παράσταση του ιξώδους (mPa·s) σε σύγκριση με το ρυθμό διάτμησης (1/s) για το κάθε ένα υπό εξέταση δείγμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις από 0.25 μέχρι 2 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και με ακραίες συνθήκες όπως pH (3, 7–14), θερμοκρασία (50, 80 και 100 °C) και με αυτόκαυστο. Με βάση τα αποτελέσματα που εμφάνισαν οι καμπύλες βαθμονόμησης για το ιξώδες όλων των δειγμάτων παρουσιάστηκε μία μικρή διαφορά (± 0.1) για το λόγο αυτό επισυνάπτεται πιο κάτω μόνο η γραφική παράσταση του δείγματος 1.5 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS.

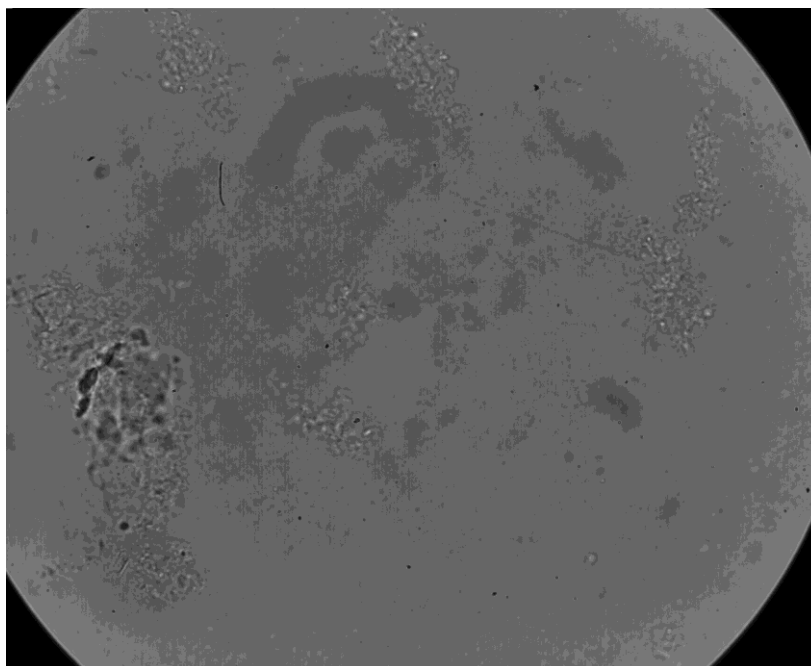


Γραφική Παράσταση 1: Καμπύλη του ιξώδες (mPa·s) σε σύγκριση με το ρυθμό διάτμησης (1/s) για το δείγμα 1.5 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS.

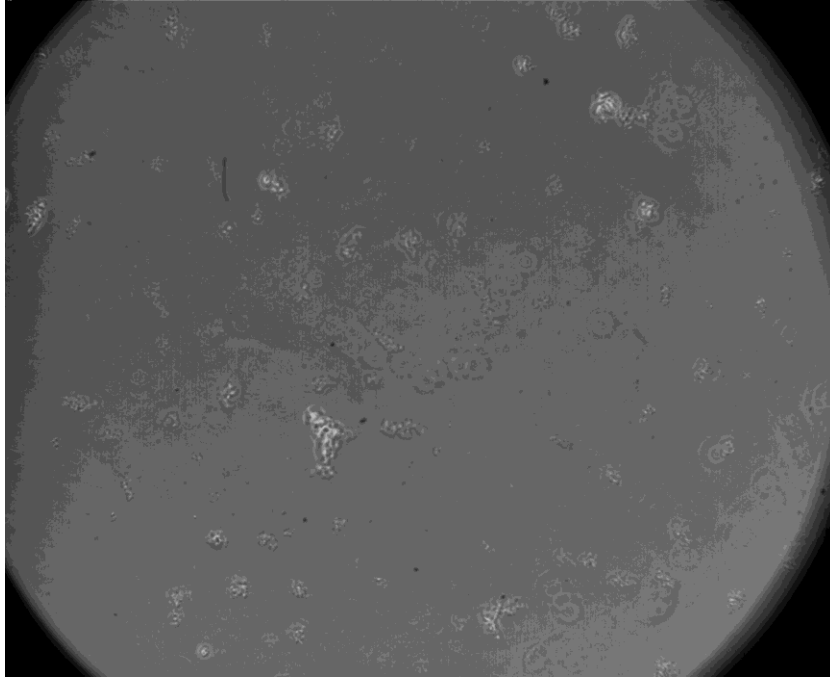
Η μέση τιμή του ιξώδες για όλα τα δείγματα υπολογίστηκε 1.26 ± 0.1 mPa·s μια τιμή που βρίσκεται πολύ κοντά στη τιμή του ιξώδες του νερού (1 mPa·s). Αυτό είναι λογικό γιατί η ρύθμιση της συγκέντρωσης του εκχυλισμένου EPS πραγματοποιείται με νερό. Σε σύγκριση με άλλα άρθρα “Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol” και “Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolates *Enterobacter strain A47 DSM 23139*” η τιμή αυτή είναι σχετικά μικρή και αυτό λογικά οφείλεται στις ρεολογικές ιδιότητες του παρόντος μικροοργανισμού.

3.1.8 Οπτικά δεδομένα εκχυλισμένου EPS

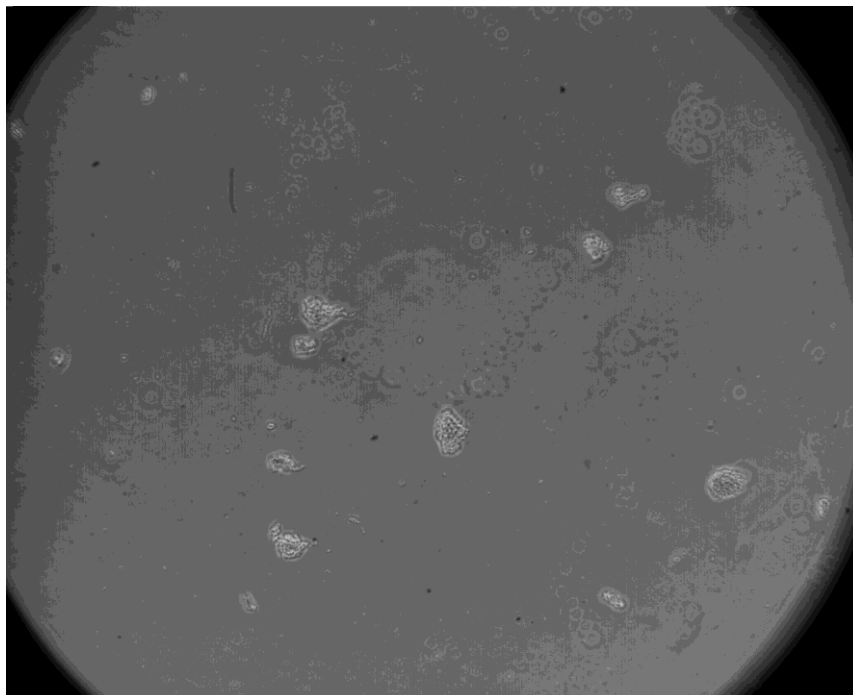
Με τη χρησιμοποίηση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με την ελεγχόμενη ένταση διατμητικής τάσης (X-Stream VISION™ XS-3, DANTEC DYNAMICS OLYMPUS) μπορέσαμε να παρατηρήσουμε την μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με μεγενθύνσεις 10x (1.65 microns per pixel) και 50x (0.32 microns per pixel) για τα διάφορα δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις από 0.25 μέχρι 2 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και με ακραίες συνθήκες όπως pH (3, 7–14), θερμοκρασία (50, 80 και 100 °C) και με αυτόκαυστο. Πιο κάτω παρουσιάζονται μερικές από τις εικόνες που συλλεχθήκαν από το μικροσκόπιο σε διαφορετικές μεγεθύνεις και διαφορετικά φίλτρα.



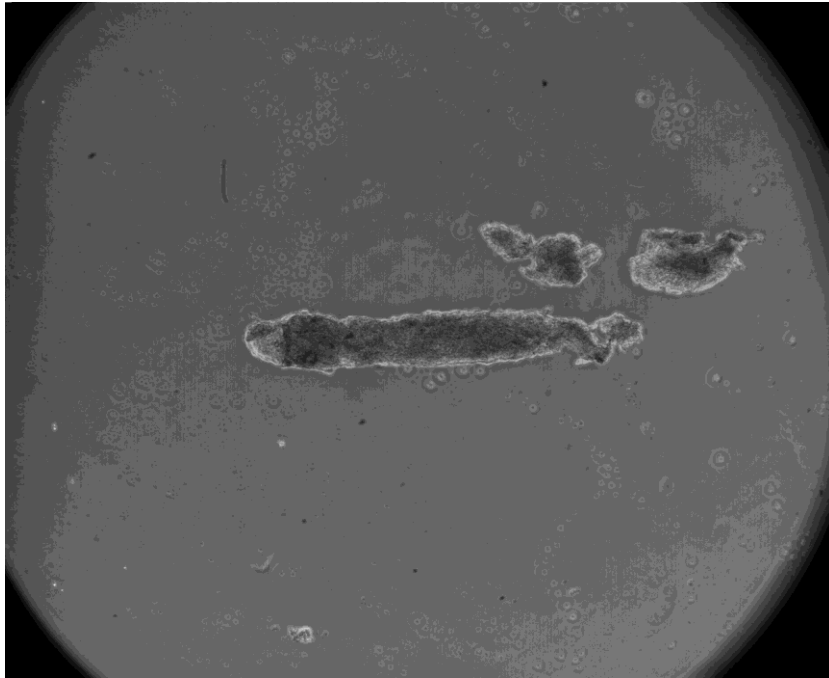
Εικόνα 10: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 50x (0.32 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο.



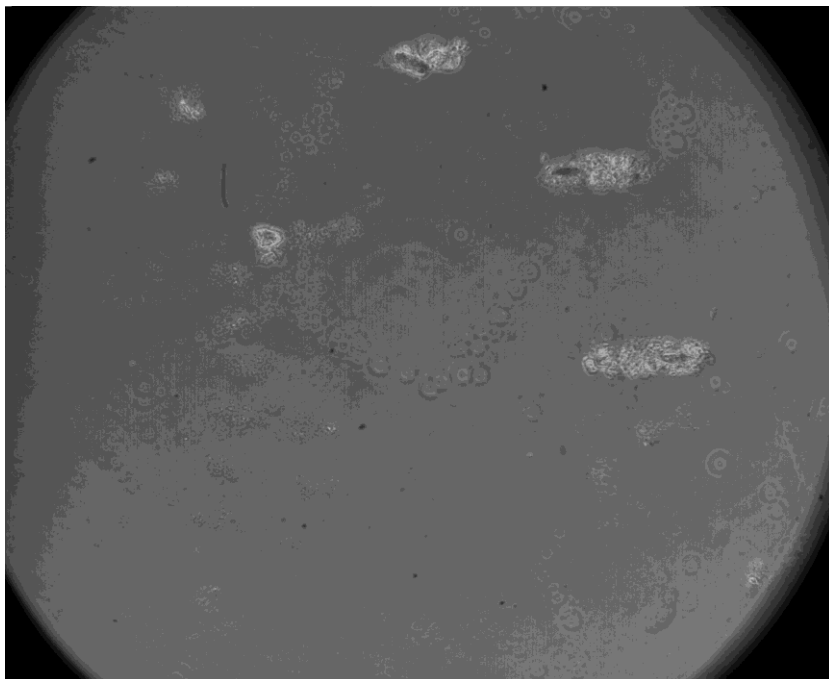
Εικόνα 11: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas* sp. *RPA5* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. και φίλτρο Ph2.



Εικόνα 12: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas* sp. *RPA5* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=3 και φίλτρο Ph2.



Εικόνα 13: Η μορφολογία των συσσωματωμάτων του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas* sp. RPA5 κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=3 και φίλτρο Ph2.



Εικόνα 14: Η μορφολογία του εκχυλισμένου EPS που παράγεται από τον απομονωθέντα αλοφιλο μικροοργανισμό *Halomonas* sp. RPA5 κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε 10x (1.65 microns per pixel) με συγκέντρωση 1% κ.ο. με pH=11 και φίλτρο Ph2.

Μέσα από την οπτική παρατήρηση της μορφολογίας των εκχυλισμένων EPS που παράγονται από τον απομονωθέντα αλοφίλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* υπολογίστηκε το μέσο μέγεθος τους να είναι περίπου 0.85 μm. Επίσης, παρατηρώντας τις εικόνες 12 και 13 διαπιστώνουμε την δημιουργία συσσωματωμάτων μέσω της αύξησης του διατμητικού ρυθμού. Αυτό έγινε λόγω του μεγάλου και παρόμοιου μεγέθους που έχουν τα σωματίδια τους. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι παρόλο που αυξήθηκε ο διατμητικός ρυθμός τα σωματίδια παραμένουν σταθερά χωρίς να αλλοιώνεται η σύστασή τους ή να διαχωρίζονται και να θρυμματίζονται γεγονός που παρουσιάζει την σταθερότητα που παρουσιάζουν τα σωματίδια του εκχυλισμένου EPS.

3.2 Έλεγχος του δείγματος *RPA9* σε διαφορετικές συνθήκες και υποστρώματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα όπου συλλέχθηκαν από των Αλυκή του Ακρωτηρίου αναπτυχθήκαν σε στερεές καλλιέργειες όπου, μέσα από την οπτική παρατήρηση τους επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη εκτός από το δείγμα *RPA5* και το δείγμα *RPA9*. Στο κεφάλαιο 2 περιγράφονται αναλυτικά οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για τον έλεγχο του δείγματος *RPA9* σε διάφορες συνθήκες όπως, αλατότητα, pH και οργανικά συστατικά ως υποστρώματα. Η επιλογή του *RPA9* για την ανάπτυξη καθαρών αποικιών έγινε με βάση το έντονο πορτοκαλί χρώμα που παρουσίαζε.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στα πειράματα παρατηρούμε ότι τα δείγματα *RPA9* μπορούν να επιβιώσουν σε αλατότητες 0–250 g/L NaCl, σε pH 5–10 και σε θερμοκρασίες 20–40 °C. Επίσης, για τον πλήρη έλεγχο και την ανεύρεση των συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά οργανικά συστατικά ως υποστρώματα όπως, πεπτόνη 5 g/L, γλυκόζη 5 g/L, λακτόζη 5 g/L, φαινόλη 1 g/L, γλυκερόλη 1 mL/L, προπιονικό οξύ 1 mL/L, βουτυρικό οξύ 1 mL/L, βαλερικό οξύ 1 mL/L, οξικό οξύ 1 mL/L, ευγενόλη 1 mL/L και μεθανόλη 1 mL/L. Τα αποτελέσματα της χρησιμοποίησης διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Η χρήση διαφορετικών οργανικών συστατικών ως υποστρώματα σε στερεές καλλιέργειες του δείγματος *RPA9* και η ανάπτυξη τους.

Οργανικά Συστατικά	Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε τρυβλία
---------------------------	--

(Συγκέντρωση)	
Πεπτόνη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, έντονες μεγάλες πορτοκαλίες αποικίες
Γλυκόζη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, μικρές αποικίες, απαλού πορτοκαλιού χρώματος
Λακτόζη (5 g/L)	Μεγάλη ανάπτυξη, μεγάλες αποικίες απαλού πορτοκαλιού χρώματος
Γλυκερόλη (1 mL/L)	Μεγάλη και έντονη ανάπτυξη έντονου πορτοκαλιού χρώματος
Οξικό οξύ (1 mL/L)	Μικρή και ανάπτυξη κίτρινου χρώματος
Μεθανόλη (1 mL/L)	Μικρή ανάπτυξη πορτοκαλιού χρώματος
Ευγενόλη (1 mL/L)	Μικρή ανάπτυξη, απαλού κίτρινου χρώματος
Προπιονικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Φαινόλη (1 g/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Βαλερικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη
Βουτυρικό οξύ (1 mL/L)	Μηδενική ανάπτυξη

Μετά από μία σειρά επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την ανεύρεση των ιδανικότερων συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού, *RPA5* καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι, η ιδανικότερη αλατότητα είναι 40 g/L NaCl, pH ίσο με 7, θερμοκρασία ίση με 30 °C και το ιδανικότερο οργανικό συστατικό ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια ανάπτυξης είναι η γλυκερόλη λόγω της γρήγορης και έντονης ανάπτυξής του.

3.2.1 Σύσταση υγρού βιομέσου και οπτική πυκνότητα δείγματος για την διεξαγωγή των πειραμάτων

Τα συστατικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για το βιομέσο της υγρής καλλιέργειας του *Halomonas sp. RPA9* είναι NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και γλυκερόλη με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 1 mL/L αντίστοιχα.

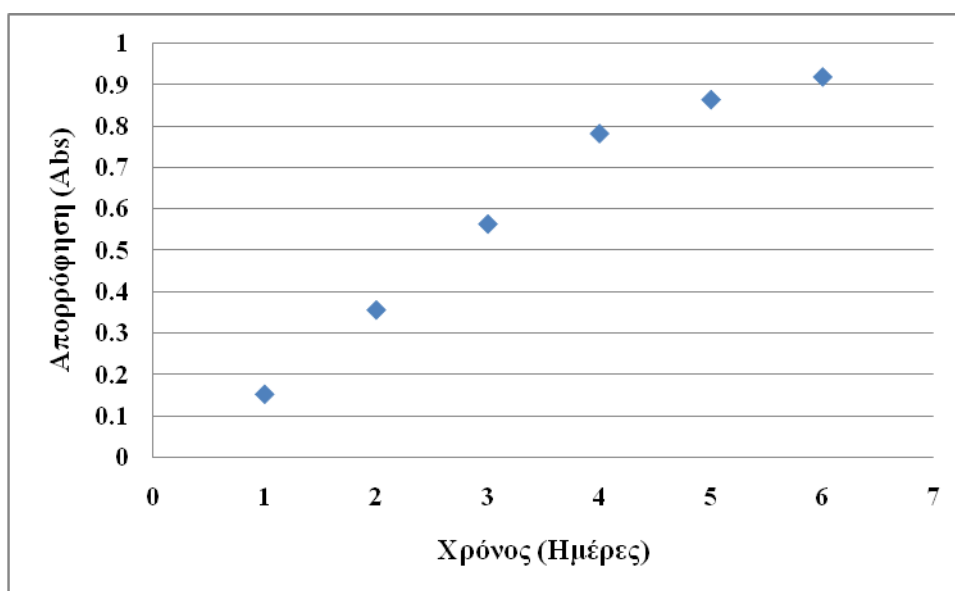
Στη συνέχεια, μέσα από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις υγρές καλλιέργειες έγινε η μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης τους μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD, λ=600nm) για αλατότητα 40 g/L NaCl όπου, είναι η ιδανική αλατότητα. Οι τιμές του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA9* παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα 17, όπου το σημείο με την μέγιστη τιμή είναι το ιδανικότερο για την εξαγωγή του καροτενίου (bacterioruberin) και την διεξαγωγή των τεστ γιατί σε αυτό το σημείο υπάρχει η μέγιστη

παραγόμενη ποσότητα καροτένιου από τους μικροοργανισμούς. Η ιδανικότερη μέρα πραγματοποίηση της εξαγωγής του καροτένιου είναι η έκτη με έβδομη.

Πίνακας 17: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA9* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl.

Αλατότητα	1 ^η Μέρα (Abs)	2 ^η Μέρα (Abs)	3 ^η Μέρα (Abs)	4 ^η Μέρα (Abs)	5 ^η Μέρα (Abs)	6 ^η Μέρα (Abs)	7 ^η Μέρα (Abs)
40 g/L NaCl	0.152	0.356	0.564	0.783	0.865	0.920	1.141

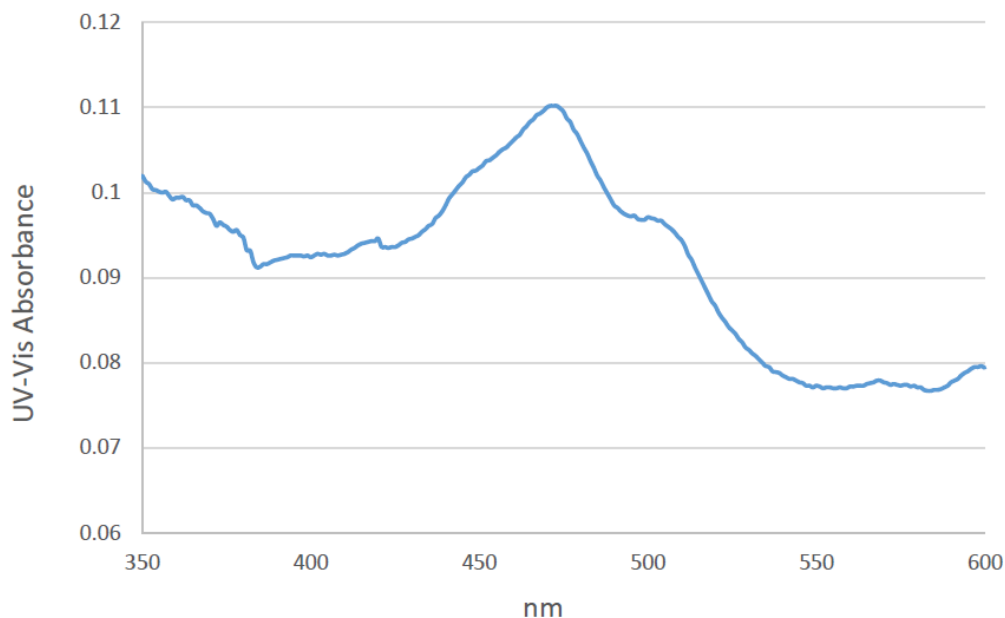
*Τα τεστ πραγματοποιήθηκαν με το υγρό βιομέσο της 7^{ης} μέρα με τις πιο πάνω τιμές οπτικής πυκνότητας. Πρέπει τα τεστ να πραγματοποιούνται στο σημείο με την μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας (OD).



Διάγραμμα 13: Τιμές ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Halomonas sp. RPA9* μέσω της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm με αλατότητα 40 g/L NaCl σε σχέση με τις ημέρες.

3.2.2 Ανίχνευση του καροτένιου, bacterioruberin

Για την ανίχνευση του καροτένιου, bacterioruberin έγινε η Γραφική Παράσταση της καμπύλης απορρόφησης του υπεριώδους/ορατού, το δείγμα είχε εκχυλιστεί τρεις φορές με ακετόνη όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2 για την πλήρη συλλογή των κυττάρων καθώς το καροτένιο (bacterioruberin) παράγεται ενδοκυτταρικά (Γραφική Παράσταση 2).



Γραφική Παράσταση 2: Καμπύλη απορρόφησης του δείγματος RPA9 σε μήκος κύματος 350 – 600 nm.

Με βάση την πιο πάνω γραφική παράσταση με κορυφή στα 475 nm και με την βοήθεια της κατάλληλης βιβλιογραφίας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι από τη συλλογή και απομόνωση του περιβαλλοντικού δείγματος της Αλυκής, πιθανότατα καταλήξαμε στην παραγωγή του καροτένιου, bacterioruberin (Kuo-Lung Ku b et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι, για να προσδιοριστεί ποσοτικά η συγκέντρωση του καροτένιου bacterioruberin θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μέτρηση του δείγματος μας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, λόγω του περιορισμένου χρόνου και κάποιων τεχνικών προβλημάτων που εμφανίστηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ασχοληθήκαμε κατά αποκλειστικότητα με την παραγωγή EPS και τις γαλακτωματοποιητικές ικανότητες που παρουσίαζε ο μικροοργανισμός, *Halomonas sp. RPA5*. Το παρόν πείραμα όμως, μπορεί να αποτελέσει από μόνο του μία νέα πτυχιακή εργασία με μεγάλο ενδιαφέρον και χρίζει

περεταίρω έρευνας καθώς είναι ένα καινούργιο θέμα έρευνας που κανείς δεν έχει ασχοληθεί με κάτι παρόμοιο μέχρι στιγμής στην Κύπρο.

3.3 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με βάση την αλληλουχία 16S rRNA

Η διαδικασία της εξαγωγής της αλληλουχίας 16S rRNA για τα δείγματα *RPA5* και *RPA9* πραγματοποιήθηκε με στόχο την ταυτοποίηση τους με ήδη υπάρχον στελέχη ή με την ανεύρεση νέων και προσδιορισμός του γένους τους. Τα διαλύματα των γονιδίων που προέκυψαν από την ετοιμασία των δειγμάτων εστάλησαν για ταυτοποίηση στην εταιρεία MacroGene Netherlands η οποία έχει την δυνατότητα να προσδιορίσει την σειρά των νουκλεοτιδίων που αποτελούν τη συγκεκριμένη αλληλουχία.

3.3.1 Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *RPA5*

Με βάση τα αποτελέσματα που εστάλησαν από την εταιρεία για το μικροοργανισμό του δείγματος *RPA5* επιλέχθηκε η πιο κάτω σειρά νουκλεοτιδίων όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 15, αποτελούμενη από 1199 βάσεις. Στη συνέχεια, τέθηκε για σύγκριση στη βάση δεδομένων NCBI και αναλύθηκε στο πρόγραμμα BLAST για γονίδια. Το τμήμα των βάσεων που επιλέχθηκε θεωρείται το πιο αντιπροσωπευτικό μέρος της γραφικής του ριβοσωμικού 16S rRNA λόγω του ότι οι βάσεις δεν επισκιάζονται ή μια από την άλλη και ακολουθούν την αλληλουχία των εκκινητών.

```
AGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCGCGATCC
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA
GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGAGG
AAGAAGGCTTGTGGGTAAATACCCTGCAAGAAGGACATCACTCACAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAAT
CGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAA
GCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAAGTGCAGGCTAGAGTGCAGGA
GAGGAAGGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAT
ACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCG
TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGA
CTAGCCGTTGGGGTCCTCGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
```

ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAC
CCTTGACATCGAGCGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACGCTCAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC
GTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAACCTCTAGG
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGGTGGGGGACGACGTC

Εικόνα 15: Αλληλουχία 16S rRNA του μικροοργανισμού για το δείγμα *RPA5* αποτελούμενη από 1199 βάσεις – νουκλεοτίδια.

Η μερική αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA, μετά από σύγκριση με άλλα στελέχη της βάσης δεδομένων NCBI χαρακτηρίστηκε να ανήκει στο γένος *Halomonas sp.* κατά 99 %.

3.3.2 Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *RPA9*

Με βάση τα αποτελέσματα που εστάλησαν από την εταιρεία για το μικροοργανισμό του δείγματος *RPA9* επιλέχθηκε η πιο κάτω σειρά νουκλεοτιδίων όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 16, αποτελούμενη από 1309 βάσεις. Στη συνέχεια, τέθηκε για σύγκριση στη βάση δεδομένων NCBI και αναλύθηκε στο πρόγραμμα BLAST για γονίδια. Το τμήμα των βάσεων που επιλέχθηκε θεωρείται το πιο αντιπροσωπευτικό μέρος της γραφικής του ριβοσωμικού 16S rRNA λόγω του ότι οι βάσεις δεν επισκιάζονται η μια από την άλλη και ακολουθούν την αλληλουχία των εκκινήτων.

TATCGGATGAGCCCATGTTCGGATTAGCTTGCTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGG
CGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACAC
GGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAAC
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
CAGCGGGGAAGAAGGCATGGCGGCTAATACCCGCCATGAAGGACATCACCCGCA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGCCAAGCCGG
ATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCCGGGAACGGCATTTCGGAACCTGGCAGGCTAGA
GTGCAGGAGAGGAAGGTGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCG
GGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGCG
CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGTCGACCAGCCGTTGGACCCCTGAGGGTCTGGTGGCGCAGTTAACGCAAT
AAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAATGAATTGACG

GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCTGCCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCCGGGGTGCCTTCGGG
AACGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTTGG
GTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTATCCCTTTTTGCCAGCGGTCCGGCCGG
GAACTTTCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGGAAGGTGGGGGACAACA
TCAAGTCATCAATGGCCCTTTACGGGCAGGGGTACCACCGTGCTACAATGGGCC
GGGACAAAAGGGTTT

Εικόνα 16: Αλληλουχία 16S rRNA του μικροοργανισμού για το δείγμα *RPA9* αποτελούμενη από 1309 βάσεις – νουκλεοτίδια.

Η μερική αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA, μετά από σύγκριση με άλλα στελέχη της βάσης δεδομένων NCBI χαρακτηρίστηκε να ανήκει στο γένος *Halomonas sp.* κατά 98 %.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με το τέλος αυτής πτυχιακής εργασίας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι μέσα από την απομόνωση αλόφιλων μικροοργανισμών από την Αλυκή του Ακρωτηρίου στη Λεμεσό μπορούμε να καταλήξουμε στην παραγωγή χρήσιμων ενεργειακών προϊόντων όπως, εξωπολυσαχαρίτης (EPS) και καροτένιο (bacterioruberin).

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA οδήγησε στη διεύρυνση της ομάδας των μικροοργανισμών του γένους *Halomonas sp.*. Επιπλέον, συμπεραίνουμε ότι ο μικροοργανισμός *Halomonas sp. RPA5* παράγει σημαντικές ποσότητες εξωπολυσακχαριτών (EPS) και το καταλληλότερο βιομέσο για την βέλτιστη ανάπτυξη και παραγωγή του είναι το NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και οξικό οξύ με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 3 mL/L αντίστοιχα. Επίσης, το ιδανικότερο pH για την ανάπτυξη είναι 7 και η θερμοκρασία 30 °C αντίστοιχα. Οι παραγόμενοι εξωπολυσακχαρίτες του μικροοργανισμού αυτού ελέχθησαν σε διαφορετικές επί τις εκατό κατ' όγκο συγκεντρώσεις (% κ.ο) εκχυλισμένου EPS (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 % κ.ο) και σε ακραίες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αποστείρωσης παρουσιάζοντας σημαντικά αποτελέσματα γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητας. Οι διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πετρέλαιο, εξάνιο, δεκαεξάνιο και κηροζίνη, ενώ το Tween 80 και Triton X-100 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα μεγαλύτερα ποσοστά παρουσιάστηκαν στα έλαια και κυρίως στο ελαιόλαδο με τα ποσοστά για 1 % και 2 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS να ισούνται με 73.88 και 93.01 % αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στις ακραίες συνθήκες σε pH=11, T=100 °C και αποστείρωση για 1 % κ.ο. εκχυλισμένου EPS και οργανικό διαλύτη το ελαιόλαδο είχαμε ποσοστά 93.18, 71.90 και 95.99 %. Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός αυτός εμφανίζει πολύ μεγάλα ποσοστά γαλακτωματοποιητικής ικανότητας και σταθερότητα. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία και ασφάλεια ως εναλλακτική λύση έναντι των χημικών γαλακτωματοποιητών και συμβάλλοντας σημαντικά στην αντικατάσταση των χημικά συντιθέμενων επιφανειοδραστικών με βιο-επιφανειοδραστικά που είναι φιλικά προς τον περιβάλλον και μη τοξικά.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τον αλόφιλο μικροοργανισμό *Halomonas sp. RPA5* απομονώθηκε ακόμη ένας μικροοργανισμός του γένους αυτού ο

Halomonas sp. RPA9 όπου, παρουσιάζει την ικανότητα να παράγει καροτένιο-bacterioruberin και το βέλτιστο βιομέσο για την παραγωγή και ανάπτυξη του είναι το NaCl, Yeast Extract, NH₄Cl, K₂HPO₄×3H₂O, MgO₄S×7H₂O, KH₂PO₄ και γλυκερόλη με 40, 0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/L και 1 mL/L αντίστοιχα. Το ιδανικότερο pH και θερμοκρασία για την ανάπτυξη του είναι 7 και 30 °C αντίστοιχα. Ακόμη, ο ποιοτικός προσδιορισμός επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση της Φασματοφωτομετρίας Μοριακής Απορρόφησης Υπεριώδης/Ορατού με επιτυχία. Με την μέθοδο αυτή, έγινε ταυτοποίηση του φάσματος σε μήκος κύματος 350–600nm με την κορυφή να εμφανίζεται στα 475 nm όπου σε συνδυασμό με την κατάλληλης βιβλιογραφίας καταλήξαμε στην πιθανότητα παραγωγή του καροτένιου, bacterioruberin.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο πειράματα εμφανίζουν σημαντικά αποτελέσματα και χρίζουν περαιτέρω έρευνας σε μεγαλύτερη κλίμακα. Επιπλέον, σημαντικές μελλοντικές έρευνες μπορούν να ασχοληθούν με το παρόν θέμα αναβαθμίζοντας το και εφαρμόζοντας νέες μεθόδους όπως, η χρησιμοποίηση φθηνών υποστρωμάτων που προέρχονται από απόβλητα βιομηχανιών (π.χ. γαλακτοβιομηχανία) ή οικιακής χρήσης, και ως πηγή άλατος να χρησιμοποιηθεί θαλασσινό νερό εφαρμόζοντας απλά μόνο ένα φιλτράρισμα κατά την είσοδο στον αντιδραστήρα για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών, μικροοργανισμών και στερεών. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται σημαντικά το κόστος της όλης διαδικασίας οδηγώντας στην δημιουργία μίας οικονομικά συμφέρουσας βιομηχανίας αφού δεν χρειάζεται να εφαρμοστούν μέθοδοι απολύμανσης αλλά και οι πρώτες ύλες που θα χρησιμοποιηθούν θα προέρχονται από απόβλητο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Στη βιβλιογραφία εφαρμόζεται συγκεκριμένο πρότυπο μορφοποίησης, το οποίο έχει επιλεγεί από το Τμήμα:

1. Altincicek, B., Kovacs, J.L. and Gerardo, N.M. (2011) ‘Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*’, *Biology Letters*, 8(2), pp. 253–257. doi: 10.1098/rsbl.2011.0704.
2. Armstrong, G.A., Hearst, J.E. (1996). ‘Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis’. *FASEB J.* 10 (2): 228–37. PMID8641556
3. Bezawada, J., Hoang, N.V., More, T.T., Yan, S., Tyagi, N., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. (2013) ‘Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia* sp.1 using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced’, *Journal of Environmental Management*, 128, pp. 83–91. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.04.039.
4. Bradford, M. (1976) ‘A rapid and sensitive method for the Quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding’, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
5. Bramhachari, P.V. and Dubey, S.K. (2006) ‘Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23’, *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), pp. 571–577. doi: 10.1111/j.1472-765x.2006.01967.x.
6. Breuer, U. (2009) ‘Lactobacillus molecular biology from Genomics to Probiotics Å..sa Ljungh and Torkel WadstrÅm (eds.), Caister academic press, Norfolk, UK, 2009, 206 pages ISBN: 978-1-904455-41-7’, *Engineering in Life Sciences*, 9(5), pp. 404–404. doi: 10.1002/elsc.200990012.
7. Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) ‘Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms’, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167–193. doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
8. Donlan, R.M. (2002) ‘Biofilms: Microbial life on surfaces’, *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063.

9. Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C. and Schorr-Galindo, S. (2012) 'Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction', *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp. 951–962. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083.
10. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) 'Colorimetric method for determination of sugars and related substances', *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017.
11. *Extracellular polymeric substance* (2014) in *Wikipedia*. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Extracellular_polymeric_substance (Accessed: 4 May 2016)
12. Fang, C.-J., Ku, K.-L., Lee, M.-H. and Su, N.-W. (2010) 'Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation', *Bioresource Technology*, 101(16), pp. 6487–6493. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.044.
13. Flemming, Hans-Curt; Wingender, Jost; Griebe, Thomas; Mayer, Christian (2000), 'Physico-Chemical Properties of Biofilms', in L. V. Evans, *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*, CRC Press, pp. 20, ISBN 978-9058230935
14. Freitas, F., Alves, V.D. and Reis, M.A.M. (2011) 'Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications', *Trends in Biotechnology*, 29(8), pp. 388–398. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.
15. Freitas, F., Alves, V.D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R. and Reis, M.A.M. (2009) 'Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct', *Carbohydrate Polymers*, 78(3), pp. 549–556. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.05.016.
16. Freitas, F., Alves, V.D., Gouveia, A.R., Pinheiro, C., Torres, C.A.V., Grandfils, C. and Reis, M.A.M. (2013) 'Controlled production of Exopolysaccharides from *Enterobacter* A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and Emulsifying abilities', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), pp. 641–657. doi: 10.1007/s12010-013-0560-0.

17. Gonzalez Azon, C. (1997) 'Book reviews: Rheological methods in food process engineering. James F. Steffe. Second edition published by Freeman Press, 2807 still valley Dr., east Lansing, MI 48823. ISBN 0 9632936 1 4', *Food Science and Technology International*, 3(1), pp. 61–62. doi: 10.1177/108201329700300108.
18. <http://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHARM147/%CE%9A%CE%91%CE%A1%CE%9F%CE%A4%CE%95%CE%9D%CE%9F%CE%95%CE%99%CE%94%CE%97.pdf> (Accessed: 6 October 2015)
19. Ide, H., Takeshi, S., Hiroaki, T., (1998) 'Studies on the antioxidation activity of bacterioruberin', *Urakami Found Mem*, 6:127–33.
20. Karuppiyah, P., Venkatasamy, V., Viswaprakash, N. and Ramasamy, T. (2015) 'A statistical approach on optimization of exopolymeric substance production by *Halomonas* sp. S19 and its emulsification activity', *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1). doi: 10.1186/s40643-015-0077-1.
21. Llamas, I., Amjres, H., Mata, J.A., Quesada, E. and Béjar, V. (2012) 'The potential Biotechnological applications of the Exopolysaccharide produced by the Halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*', *Molecules*, 17(12), pp. 7103–7120. doi: 10.3390/molecules17067103.
22. Mandelli, F., Miranda, V.S., Rodrigues, E. and Mercadante, A.Z. (2011) 'Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), pp. 1781–1790. doi: 10.1007/s11274-011-0993-y.
23. Martínez-Checa, F. Toledo, F. (2002) 'Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), pp. 358–363. doi: 10.1007/s00253-001-0903-6.
24. Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C. and Quesada, E. (2006) 'Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*', *Research in Microbiology*, 157(9), pp. 827–835. doi: 10.1016/j.resmic.2006.06.004.
25. Peters, H. (1987) 'Engineering properties of foods (food science and technology, Vol. 19). Herausgegeben von M. A. Rao und S. S. H. Rizvi. 398 Seiten, zahlr. Abb. Und

- tab. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 1986. Preis: 83, 50 \$', *Food / Nahrung*, 31(8), pp. 816–816. doi: 10.1002/food.19870310814.
26. Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E.T. and Nicolaus, B. (2009) 'High level synthesis of levan by a novel Halomonas species growing on defined media', *Carbohydrate Polymers*, 78(4), pp. 651–657. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.05.031.
 27. Poli, A., Esposito, E., Orlando, P., Lama, L., Giordano, A., de Appolonia, F., Nicolaus, B. and Gambacorta, A. (2007) 'Halomonas alkaliantarctica sp. Nov., isolated from saline lake cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium', *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1), pp. 31–38. doi: 10.1016/j.syapm.2006.03.003.
 28. Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, G.K., Carranza, D., Mata, J.A., Llamas, I., Santamaría, M., Quesada, E. and Molina, I.J. (2010) 'An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium Halomonas stenophila strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), pp. 345–355. doi: 10.1007/s00253-010-2886-7.
 29. Saito, T., Miyabe, Y., Ide, H. and Yamamoto, O. (1997) 'Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin', *Radiation Physics and Chemistry*, 50(3), pp. 267–269. doi: 10.1016/s0969-806x(97)00036-4.
 30. Schneider, C. (1983) 'D. R. Heldman und R. P. Singh: Food process engineering. 2. Aufl. 415 Seiten, 152 Abb., 22 tab. AVI publishing company Inc., Westport, Connecticut 1981. Preis: 26.50\$', *Food / Nahrung*, 27(4), pp. 388–388. doi: 10.1002/food.19830270415.
 31. SHAHMOHAMMADI, H.R., ASGARANI, E., TERATO, H., SAITO, T., OHYAMA, Y., GEKKO, K., YAMAMOTO, O. and IDE, H. (1998) 'Protective roles of Bacterioruberin and Intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents', *Journal of Radiation Research*, 39(4), pp. 251–262. doi: 10.1269/jrr.39.251.
 32. Sui, L., Liu, L. and Deng, Y. (2014) 'Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai bay, china', *Chinese*

- Journal of Oceanology and Limnology*, 32(6), pp. 1280–1287. doi: 10.1007/s00343-015-4033-x.
33. Suresh and Mody (2009). 'Microbial Exopolysaccharides: Variety and Potential Applications'. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-36-3.
34. Staudt, C., Horn, H., Hempel, D.C. and Neu, T.R. (2004) 'Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms', *Biotechnology and Bioengineering*, 88(5), pp. 585–592. doi: 10.1002/bit.20241.
35. Tegge, G. (1967) 'Earle, R. L.: Unit operations in food processing (Grund-verfahren der Nahrungsmittelverarbeitung). Food science and technology division, Pergamon press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig, 1966. 342 Seiten, zahlreiche Abbildungen und Tabellen, kartoniert Preis 35 s net', *Starch - Stärke*, 19(3), pp. 80–81. doi: 10.1002/star.19670190307.
36. Ullrich, M. (2009). *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5.
37. Welman AD (2009). 'Exploitation of Exopolysaccharides from lactic acid bacteria'. *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5.
38. Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q. and Chen, G.-Q. (2015) 'Halophiles, coming stars for industrial biotechnology', *Biotechnology Advances*, 33(7), pp. 1433–1442. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008.
39. Αγαθαγγέλου, Μ. (2014). 'ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΒΑΝΙΛΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΒΑΝΙΛΙΝΗ ΑΠΟ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ'. ΤΕΠΑΚ, Λεμεσός.
40. ΚΑΡΑΛΕΥΘΕΡΗ, Μ.-ΚΟΥΛΟΥΡΗ, Θ. (2010). 'ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΔΙΒΑΘΜΙΟΥ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΤΗ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΤΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ'. ΑΤΕΙ, Θεσσαλονίκης. Available at: http://eureka.lib.teithe.gr:8080/bitstream/handle/10184/4526/Karaleftheri_Koulouri.pdf?sequence=4 Open Document (Accessed: 7 February 2016).

41. Κουτίνας, Μ. (2016). *Εργαστηριακές Σημειώσεις Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας ΙΙ, Ακραιόφιλοι Μικροοργανισμοί: Ανάπτυξη Αλόφιλου Μικροοργανισμού σε Τριβλία Petri*. ΤΕΠΑΚ, Λεμεσος.
42. Κυπριακή Δημοκρατία. (2012) *Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών - Ανακοινωθέντα*. Available at: <http://www.cyprus.gov.cy/moi/pio/pio.nsf/All/E841CFB8DCD11F88C225703E00382783?OpenDocument> (Accessed: 7 May 2016).
43. Μπιλιαδέρης, Κ.Γ. (1998). *Φυσικοχημεία Τροφίμων*. Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
44. Ράπτης, Γ. (2014). 'Βιοτεχνολογική παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών με χρήση καθαρής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Tetragenococcus koreensis*'. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, Πάτρα
45. *Ρεολογικά δεδομένα με ιξώδες* (2009) Available at: <https://www.google.com/search?q=%CF%81%CE%B5%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%AC+%CE%B4%CE%B5%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%AD%CE%BD%CE%B1+%CE%BC%CE%B5+%CE%B9%CE%BE%CF%8E%CE%B4%CE%B5%CF%82&ie=utf-8&oe=utf-8> (Accessed: 7 May 2016).
46. Σαραβάκος, Γ.Δ., (1973). *Ροή Ρευστών*. Ε.Μ.Π., Αθήνα.
47. Πανοπούλου, Χρ., (2006). *ΤΑ ΦΥΤΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ*, Ηράκλειο.