



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Βακτηριακή ποικιλότητα σε βιομηχανικό  
προζύμι: εναλλαγές και αλληλεπιδράσεις των μικροβιακών  
πληθυσμών στο χρόνο.**

**ΘΕΟΧΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπων**

**Δρ. Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου**

**Καθηγήτρια Μικροβιολογίας**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1	Προζύμι	1
1.1.1	Τα βασικά συστατικά του προζυμιού	3
1.1.2	Χημική ανάλυση προζυμιού	7
1.1.3	Μικροβιολογία του προζυμιού	14
1.1.3.1	Ζυμομύκητες	15
1.1.3.1.1	Βιοτεχνολογικές εφαρμογές ζυμομυκήτων	16
1.1.3.2	Βακτήρια γαλακτικού οξέος	17
1.1.3.2.1	<i>Lactobacillus</i>	23
1.1.3.2.2	Βιοτεχνολογικές εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων	25
1.1.3.3	Βακτήρια οξικού οξέος	29
1.1.3.3.1	<i>Acetobacter malorum</i>	30
1.1.3.4	Άλλα βακτήρια που ανιχνεύονται στο προζύμι	31
1.1.3.5	Αλληλεπιδράσεις βακτηρίων και ζυμομυκήτων στο προζύμι	33
1.1.4	Προζύμι και αρτοποιία	36
1.1.4.1	Αρτοποιία με βάση το προζύμι	36
1.1.4.2	Τύποι προζυμιού	40
1.1.4.3	Διαδικασία και συνθήκες παραγωγής προζυμιού	42
1.1.5	Διατήρηση προϊόντων ζύμης	44
1.1.6	Το μέλλον των αρτοποιημάτων και εφαρμογές	49
	Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	51
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>52</b>
2.1	Θρεπτικά υποστρώματα	52
2.1.1	Malt Extract Agar	52
2.1.2	MRS	52
2.1.3	Sour Dough Medium	52
2.1.4	Φρέσκο Εκχύλισμα Ζυμομύκητα	52

2.1.5 SuMRS	52
2.2 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα	53
2.2.1 Ισοτονικό διάλυμα αλάτων Ringer (1/4)	53
2.2.2 Διάλυμα Γλυκερόλης 30% (w/v)	53
2.2.3 Διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10 % (w/v)	53
2.2.4 Διάλυμα γλυκόζης 10 % (w/v)	53
2.3 Δειγματοληψία	53
2.4 Απομόνωση βακτηρίων από δείγματα προζυμιού	55
2.5 Φαινοτυπικός διαχωρισμός των βακτηρίων	56
2.6 Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων	57
2.7 Η μέθοδος της αντίδρασης BOX – PCR για τη διάκριση των βακτηριακών στελεχών	57
2.8 Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου (sequencing)	59
2.9 Διατήρηση μικροβιακών στελεχών	60
2.9.1 Διατήρηση σε τρυβλία	60
2.9.2 Διατήρηση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης 30 % (v/v)	60
2.9.3 Διατήρηση βακτηρίων με τη μέθοδο λυοφιλίωσης	61

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

	<b>62</b>
3.1 Μικροβιακό φορτίο Προζυμιού τύπου Β: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών.	62
3.2 Μικροβιακό φορτίο Προζυμιού τύπου Γ: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών	66
3.3 Μικροβιακό φορτίο Προζυμιού τύπου Β: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών	72
3.4 Συγκριτικά αποτελέσματα βακτηριακού πληθυσμού σε βιομηχανικό προζύμι.	78

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **84**

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **90**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΠΡΟΖΥΜΙ

Ορισμός προζυμιού : Το σύνολο ποσότητας από αλεύρι, νερό, αλάτι και μικροβιακό φορτίο (βακτηρίων και ζυμών) το οποίο δημιουργεί ένα ομοιογενές μίγμα ονομάζεται προζύμι (Πίνακας 1.1). Χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων ζύμης, ψωμιού, πίτσας, και γλυκών (De Vuyst και Vancanneyt, 2007).

**Πίνακας 1.1** Συστατικά προζυμιού (Παπαεμμανουήλ, 2003)

Αλεύρι 60%
Νερό 38%
Αλάτι 1,8%
Ομάδα βακτηρίων
Ομάδα ζυμομυκήτων

Το σύνολο των συστατικών του προζυμιού αφού προστεθεί αλεύρι και νερό, υφίσταται μικροβιακή ζύμωση και κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται τα προϊόντα της αρτοποιίας. Από τα τελευταία, υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στην αγορά η οποία κυρίως δημιουργείται και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των φυσικοχημικών παραγόντων της ζύμωσης και στην ποικιλομορφία των διαφορετικών μικροοργανισμών που συμμετέχουν.

Ως μαγιά ορίζεται η βιομάζα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, τα κύτταρα του οποίου είναι πλούσια σε νερό (70%), είναι στρογγυλά με διάμετρο κατά μέσο όρο 1/100 του χιλιοστού. Ένα γραμμάριο μαγιάς αποτελείται από 8-10 δισεκατομμύρια κύτταρα, με περιορισμένη διάρκεια συντήρησης, περίπου 20-25 ημέρες σε θερμοκρασίες έως και 10 °C. Όσο και αν το μεγαλύτερο μερίδιο της γεύσης του ψωμιού προέρχεται από το σιτάλευρο, η ζύμωση με καλλιέργεια μαγιάς, σε λογική δοσολογία, δίνει ένα ψωμί με λεπτή γεύση. Εδώ και λίγα χρόνια, έχει αναπτυχθεί εκ νέου ένα διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παρασκευή προϊόντων αρτοποιίας με προζύμι, καθώς απεδείχθη ότι η χρήση προζυμιού προσδίδει

περισσότερα αρώματα, πλουσιότερη γεύση, και αυξάνει τη διάρκεια της διατήρησής του. Σε πολλές περιπτώσεις η μαγιά αντικαθιστά το προζύμι (Sadeghi, 2008).

Τα προϊόντα άρτου από προζύμι αποτελούν τη βάση της διατροφής μας από τα αρχαία χρόνια. Από τότε έως και σήμερα, το προζύμι είναι ο «ζυμωτικός παράγοντας» που επέτρεψε την παρασκευή του ψωμιού. Οι Αιγύπτιοι και οι Αρχαίοι Έλληνες, ανέπτυξαν την τέχνη της αρτοποιίας και έμαθαν να ελέγχουν τη ζύμωση με προζύμι. Οι λαοί της Μεσογείου, χωρίς να γνωρίζουν για τη φύση των μικροοργανισμών που περιέχονται στο προζύμι είχαν παρατηρήσει σημαντική βελτίωση των προϊόντων τους κατά τη χρήση συστατικών που ήταν πλούσια σε ζυμωτικούς παράγοντες, όπως ο μούστος των σταφυλιών και οι ζαχαρώδεις ουσίες όπως το μέλι (Παπαεμμανουήλ, 2005).

Οι Αρχαίοι Έλληνες για να διατηρήσουν το προζύμι τους, εφάρμοσαν τεχνικές αποξήρανσης στον ήλιο καταφέροντας να το κρατήσουν ενεργό για αρκετούς μήνες. Στη συνέχεια, οι Γαλάτες και οι Ρωμαίοι διαπίστωσαν ότι τα ψωμιά τους γίνονταν πιο ελαφριά όταν πρόσθεταν στο ζυμάρι τον αφρό από τη ζύμωση της μύρας (μαγιά μύρας). Καθ' όλη τη διάρκεια του Μεσαίωνα, η χρήση της μαγιάς μύρας περιορίστηκε με αποτέλεσμα να επανέρθουν τα βαριά ψωμιά, με σφιχτή ψίχα και πολύ όξινη γεύση που παρασκευάζονται αποκλειστικά από προζύμι.

Αυτός ο τρόπος παρασκευής διατηρήθηκε έως τον 19ο αιώνα, οπότε και δημιουργήθηκε η βιομηχανία παραγωγής μαγιάς, με αποτέλεσμα την εγκατάλειψη της χρήσης προζυμιού (Παπαεμμανουήλ, 2005).

Στη Νότια Καλιφόρνια χρησιμοποιούσαν για πάρα πολλά χρόνια αποκλειστικά προζύμι στο ψωμί τους. Μάλιστα ήταν τόσο γνωστό στο San Francisco που το κυρίαρχο στέλεχος του προζυμιού αυτού, ονομάστηκε *Lactobacillus sanfranciscensis* ([www.answers.com/topic/sourdough](http://www.answers.com/topic/sourdough)). Ο λόγος όμως που η χρήση του προζυμιού όλο και πληθαίνει σε διάφορα προϊόντα ζύμης δεν αφορά μόνο τη θρεπτική του αξία αλλά και ότι επιφέρει τεράστιες αλλαγές στον όγκο, στο άρωμα, τη διατήρηση, ακόμη και τον σχηματισμό των ψίχουλων του ψωμιού (Arendt και συνεργάτες, 2007).

Η μικροβιακή σύνθεση του προζυμιού δε γίνεται να είναι παντού και πάντα η ίδια, καθώς σημαντικό ρόλο, σύμφωνα με τους Zotta και συνεργάτες (2008), παίζουν ο τύπος του αλευριού που χρησιμοποιείται, τα υπόλοιπα φυσικά συστατικά του μείγματος καθώς και η τεχνική παρασκευής του προζυμιού. Το προζύμι είτε

παρασκευάζεται σε φούρνους είτε πωλείται στο εμπόριο, παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των στελεχών των ζυμών και των λακτοβακίλων που απομονώνονται σε αυτό, επομένως γίνεται αναφορά σε διαφορετικές τεχνικές παρασκευής και διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (De Vuyst και συνεργάτες, 2002).

### **1.1.1 Βασικά συστατικά του προζυμιού**

Η διαδικασία παραγωγής του προζυμιού απαιτεί συστατικά όπως το αλεύρι, το νερό, το αλάτι και η μαγιά. Τον σημαντικότερο όμως ρόλο στην παρασκευή του, παίζει το αλεύρι που θα χρησιμοποιηθεί και συγκεκριμένα ο τρόπος με τον οποίο είναι επεξεργασμένο, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη διατήρηση των θρεπτικών ουσιών του (Παπαεμμανουήλ, 2003).

#### **Το Αλεύρι**

Το αλεύρι από πλευράς σύστασης αποτελείται από:

- Υδατάνθρακες (70% άμυλο, διαλυτά σάκχαρα, κυτταρίνη και πεντοζάνες) Συμβάλλουν κυρίως στην ποιότητα του αλευριού και επηρεάζουν τον σχηματισμό της κόρας, τη διόγκωση, την απορρόφηση-δέσμευση του νερού και το μπαγιάτεμα του ψωμιού λόγω της αναδιάταξης του αμύλου.
- Πρωτεΐνες (κυρίως από γλουτένη) Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο επηρεάζει κυρίως τις αρτοποιητικές ικανότητες του αλευριού. Η γλουτένη παίζει καθοριστικό ρόλο στην αρτοποιητική ικανότητα ενός ζυμαριού να απορροφά νερό τουλάχιστον διπλάσιο του βάρους της, να δημιουργεί πλέγμα εγκλείοντας τα παραγόμενα από τη ζύμωση αέρια. Η ποιότητα και η ποσότητα της γλουτένης χαρακτηρίζει ένα άλευρο ως "δυνατό" ή "αδύνατο". Το ποσοστό πρωτεϊνών που περιέχονται στο άλευρο είναι 6-20% ενώ στα ελληνικά άλευρα το ποσοστό κυμαίνεται γύρω στο 12-13% (Χαχλιούτης, 2009).
- Λιπαρές ύλες Το σκουρόχρωμο αλεύρι περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα λιπαρών σε σχέση με το λευκό. Γενικότερα λόγω της διακύμανσης της περιεκτικότητας των αλεύρων σε λιπαρά δεν υπάρχει ιδιαίτερη επίδραση στις αρτοποιητικές ικανότητές του. Παρ' όλα αυτά τα ποσοστά των λιπιδίων κυμαίνονται μεταξύ 1-2%. Είναι όμως γεγονός ότι μειώνουν την ανάπτυξη της σκληρότητας κατά τη διάρκεια του μπαγιατέματος.

- Ανόργανα συστατικά Η περιεκτικότητα του κάθε αλεύρου σε ανόργανα συστατικά (μεταλλικά άλατα και διάφορα ιχνοστοιχεία) διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία του σιταριού, την κάθε σοδειά και τον τρόπο αποθήκευσής του. Έχει θετική επίδραση πάνω στη γλουτένη ιδιαίτερα κατά το ψήσιμο.
- Βιταμίνες Όσο αυξάνεται ο βαθμός άλεσης τόσο αυξάνεται και η περιεκτικότητα σε βιταμίνες και ένζυμα. Περιέχονται βιταμίνες E και B ( B1,B2, B6), παντοθενικό οξύ και προβιταμίνη A (Χαχλιούτης, 2009).
- Υγρασία Η υγρασία του αλεύρου δε θα πρέπει να υπερβαίνει το 15%, διότι τότε παρατηρούνται φαινόμενα όπως, η ανάπτυξη μυκήτων, δυσάρεστων οσμών, προσέλκυση εντόμων, ταχεία αποσύνθεση της γλουτένης και μικρότερη απορρόφηση νερού από το ζυμάρι.
- Ένζυμα Συμβάλλουν στη διεξαγωγή χημικών αντιδράσεων. Τα κυριότερα ένζυμα που περιέχονται είναι τα αμυλολυτικά (αμυλάσες), τα πρωτεολυτικά (πρωτεάσες) και τα λιπολυτικά (λιπάσες) (Κρισταντώνης, 2007).

### **Το Νερό**

Το νερό παίζει πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία παραγωγής προζυμιού καθώς είναι αυτό που ενυδατώνει το αλεύρι, υγραίνει το άμυλο και τις πρωτεΐνες οπότε χρησιμεύει ως σύνδεσμος για την εισαγωγή του αμύλου στο πλέγμα της γλουτένης, καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία ζυμαριού.

Η ενεργοποίηση των ενζύμων και η ζύμωση γίνονται παρουσία του νερού, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο το κατάλληλο περιβάλλον. Από μικροβιολογική άποψη δε πρέπει να περιέχεται στο νερό μικροβιολογικό φορτίο διότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης μπορεί να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί και να παραμείνουν στο τελικό προϊόν. Θα πρέπει λοιπόν στο νερό του δικτύου της κάθε περιοχής, να γίνει η απαραίτητη επεξεργασία αντισηπτικότητας με την προσθήκη ενδεδειγμένης ποσότητας χλωρίου ή άλλου τύπου έλεγχου.

Η δόση του χλωρίου που προστίθεται θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη και όπως ορίζουν οι κανονισμοί, καθώς μεγαλύτερη δόση μπορεί να εμποδίσει τη δράση της μαγιάς και συνεπώς να αλλοιώσει τη γεύση.

Η ποιότητα του νερού παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του προζυμιού, καθώς νερό με μεγάλο βαθμό σκληρότητας (δε θα πρέπει να ξεπερνά το 25) έχει επίδραση στο μέγεθος του ζυμαριού και σε αντίθετη περίπτωση δρα αρνητικά στην

συνεκτικότητα του ζυμαριού (Παπαεμμανουήλ, 2003). Θα πρέπει επίσης να υπολογιστεί η ποσότητα του νερού που θα προστεθεί, διότι μικρή ποσότητα νερού, δημιουργεί ζυμάρι χωρίς όγκο, ενώ προσθήκη μεγάλης ποσότητας νερού οδηγεί σε ένα αρκετά διογκωμένο προϊόν όχι όμως καλής ποιότητας. (Cauvain, 2003γ).

### **Το Αλάτι**

Ουσιαστική και απαραίτητη κρίνεται η προσθήκη αλατιού για την παρασκευή του προζυμίου, καθώς βελτιώνει την ελαστικότητα και τη συνεκτικότητά του αφού ισχυροποιεί τη γλουτένη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η προσθήκη του αλατιού επιφέρει και άλλα πλεονεκτήματα στο ζυμάρι, σε αυτό οφείλεται το χρώμα της κόρας του ψωμιού καθώς και η γεύση του. Το αλάτι σχετίζεται άμεσα με τη γλουτένη και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των προϊόντων ζύμης και το καλοκαίρι εμποδίζει, με τις υγροποιητικές του ιδιότητες, την αποξηράνσή του, ενώ τον χειμώνα κάνει την κόρα πιο μαλακή (Cauvain, 2003β).

Το αλάτι δρα ανταγωνιστικά ως προς τη μαγιά, ελέγχοντας τη δράση της και κατά συνέπεια, τη διαδικασία ζύμωσης, ενώ παράλληλα παρεμποδίζει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Χαχλιούτης, 2009).

Το αλάτι πρέπει να μπαίνει στην αρχή ή το αργότερο 3 λεπτά μετά την έναρξη του ζυμώματος και πάντα η δόση του δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 1,8% επί του βάρους του αλεύρου. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι η προσθήκη αλατιού 5 λεπτά πριν το τέλος του ζυμώματος, λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό διότι με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μέγιστη οξείδωση (Παπαεμμανουήλ, 2003).

### **Η Μαγιά**

Είναι προφανές η «μαγιά» ταυτίζεται με τον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Vela, 1997), του οποίου τα ένζυμα μαζί με τα ένζυμα στο άλευρο, διασπούν το άμυλο σε δεξτρίνες και άλλα σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Κατά τη ζύμωση αυτών των σακχάρων απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, δημιουργώντας ταυτόχρονα εσωτερική κυψέλωση (Εικόνα 1.1) και διόγκωση του ζυμαριού. Έχει μεγάλη θρεπτική αξία, περιέχει πολλές βιταμίνες (βιοτίνη, βιταμίνες B1, B2, B6, νιασίνη, παντοθενικό οξύ, προβιταμίνη D) (Χαχλιούτης, 2009).





**Εικόνα 1.1 :** Τα αποτελέσματα της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα στο ψωμί, διόγκωση του ψωμιού και εσωτερική κυψέλωση ([www.breadcetera.com](http://www.breadcetera.com)).

Η μαγιά παράγεται κυρίως βιομηχανικά, ως «φρέσκια νωπή μαγιά», με υπόλευκο χρώμα, αρκετά στερεή και ομοιογενής και διατίθεται στο εμπόριο με δύο τρόπους, ως πεπιεσμένη πάστα ή υπό μορφή ξηρής σκόνης (βλέπε Εικόνα 1.2) (Παπαεμμανουήλ, 2003).



**Εικόνα 1.2** Κοινά προϊόντα ζυμομύκητα του εμπορίου (Madigan και συνεργάτες, 2005).

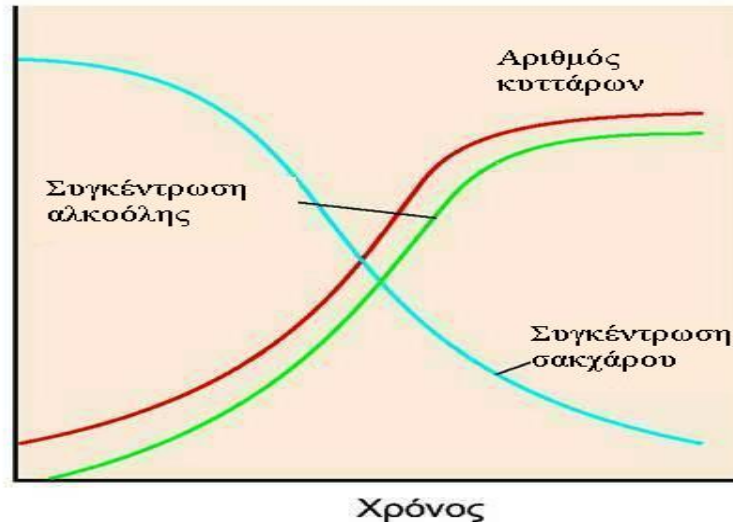
### 1.1.2 Χημική ανάλυση προζυμιού

Οι ζυμώσεις είναι αναερόβιες μεταβολικές διεργασίες που προμηθεύουν ενέργεια στη μορφή ATP. Κατά τις ζυμώσεις αθροίζονται ή απεκκρίνονται προϊόντα, όπως γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη. Ζυμώσεις παρατηρούνται υπό αναερόβιες συνθήκες και σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, αλλά συχνότερα σε μικροοργανισμούς. Οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν το παραγόμενο κατά τη ζύμωση ATP για αύξηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων τους. Οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται κυρίως από το παραγόμενο προϊόν π.χ. αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση, προπιονική ζύμωση, για να αναφέρουμε μόνο μερικές απ' αυτές. Το αρχικό υπόστρωμα για τις περισσότερες ζυμώσεις είναι η γλυκόζη.

Το ATP κερδίζεται κατά τις ζυμώσεις με φωσφορυλίωση υποστρώματος. Η φωσφορυλίωση γίνεται δυνατή χάρις σε μια ισχυρά εξώθερμη αντίδραση αφυδρογόνωσης (συνήθως μετατροπή αλδεύδης σε καρβοξυλικό οξύ). Το υδρογόνο μεταφέρεται πρώτα σε ένα συνένζυμο. Το ανηγμένο συνένζυμο (π.χ., NADH) οξειδώνεται αντιδρώντας με έναν άλλο μεταβολίτη. Με την αναγωγική αυτή αντίδραση της ζύμωσης παράγεται το τελικό προϊόν το οποίο και αποβάλλεται (Karlson και συνεργάτες, 1998).

#### Αλκοολική ζύμωση

Η τυπική μικροβιακή διαδικασία παραγωγής στην οποία το προϊόν συντίθεται κατά την πρωτογενή αυξητική φάση είναι η αλκοολική (αιθανολική) ζύμωση. Η αιθανόλη είναι το προϊόν αναερόβιας ζύμωσης του ζυμομύκητα και συγκεκριμένων βακτηρίων και συντίθεται στο πλαίσιο του ενεργειακού μεταβολισμού. Επειδή αύξηση μπορεί να λάβει χώρα μόνον όταν παράγεται ενέργεια, η παραγωγή αιθανόλης συντελείται παράλληλα με τη αύξηση (Εικόνα 1.3).



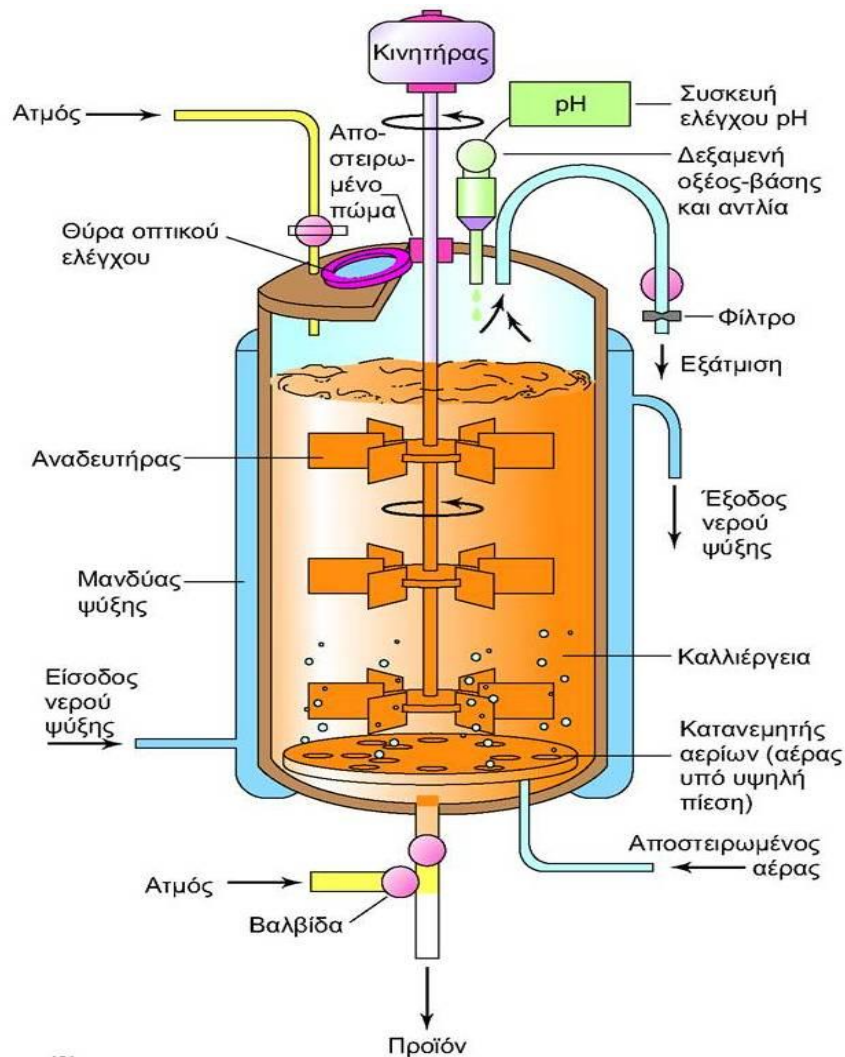
**Εικόνα 1.3** Σύνθεση αλκοόλης από ζυμομύκητα. (—) Συγκέντρωση σακχάρου, (—) Συγκέντρωση αλκοόλης, (—) Αριθμός κυττάρων (Madigan και συνεργάτες, 2005).

Στη Βιομηχανική Μικροβιολογία, ο όρος ζύμωση αναφέρεται σε κάθε είδους μικροβιακές διεργασίες μεγάλης κλίμακας, ανεξαρτήτως του εάν η ζύμωση αυτή είναι βιοχημική ή όχι. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες βιομηχανικές ζυμώσεις είναι αερόβιες. Η δεξαμενή όπου εκτελείται η βιομηχανική ζύμωση ονομάζεται ζυμωτήρας και ο μικροοργανισμός που συμμετέχει σε αυτή ονομάζεται ζυμωτής.

Οι ζυμωτήρες κατασκευάζονται σχεδόν πάντοτε από ανοξείδωτο χάλυβα και είναι ουσιαστικά ένας μεγάλος κύλινδρος, με φραγμένη βάση και οροφή, στον οποίο έχουν προσαρμοστεί διάφοροι σωλήνες και βαλβίδες (Εικόνα 1.4). Η επιτυχής λειτουργία του, οφείλεται στην αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος και στην απαγωγή της θερμότητας η οποία επιτυγχάνεται μέσω του μανδύα ψύξης καθώς έτσι απομακρύνονται οι υδρατμοί ή το νερό ψύξης.

Αποφασιστική σημασία για τον ζυμωτήρα έχει το σύστημα αερισμού, το οποίο παίζει ρόλο στη μετάβαση του οξυγόνου από την αέρια στην υγρή φάση. Για τη διασφάλιση επαρκούς αερισμού χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές εγκαταστάσεις: ο κατανεμητής αερίων και ο αναδευτήρας (Εικόνα 1.4). Ο κατανεμητής είναι συνήθως ένας δακτύλιος που φέρει πολλαπλές οπές μέσω των οποίων διοχετεύεται στον ζυμωτήρα αποστειρωμένος αέρας υπό πίεση με τη μορφή φυσαλλίδων, απ' όπου το οξυγόνο περνά με διάχυση στο υγρό. Σε μικρούς ζυμωτήρες η χρήση μόνο κατανεμητή είναι επαρκής, αλλά σε βιομηχανικούς ζυμωτήρες η ανάδευση με αναδευτήρα έχει ουσιαστική σημασία. Επιτυγχάνεται έτσι η ανάμειξη του

οργανισμού με το υγρό αλλά και των φυσαλίδων του αέρα με το υγρό, με αποτέλεσμα τη διασφάλιση της ομοιόμορφης πρόσβασης των μικροβιακών κυττάρων στα θρεπτικά συστατικά.



**Εικόνα 1.4** Σχηματικό διάγραμμα ζυμοτήρα (Madigan και συνεργάτες, 2005)

Όλες οι μικροβιακές ζυμώσεις πρέπει να βρίσκονται υπό συνεχή παρακολούθηση καθώς δε μετράται μόνο η αύξηση του μικροοργανισμού και η σύνθεση του προϊόντος, αλλά ελέγχεται η εξέλιξη της διεργασίας με τη ρυθμιστική μεταβολή περιβαλλοντικών παραγόντων. Ελέγχονται συνήθως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του οξυγόνου, το pH, η κυτταρική μάζα και η συγκέντρωση του προϊόντος.

Οι ζυμομύκητες (ζύμες) ανήκουν στους μικροοργανισμούς με τις περισσότερες βιοχημικές χρήσεις. Καλλιεργούνται για τη βιομάζα τους, τα κυτταρικά τους αλλά και τα τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Τα κύτταρα του

ζυμομύκητα χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία ως πηγή διαφόρων τροφίμων, βιταμινών αλλά και άλλων αυξητικών παραγόντων. Αν και η βιομηχανική παραγωγή αλκοόλης επιτυγχάνεται με τη μεγάλης κλίμακας ζύμωση του ζυμομύκητα, εν τούτοις ο μικροοργανισμός αυτός είναι πιο γνωστός για τον ρόλο που παίζει στην παρασκευή αλκοολούχων ποτών.

**Πίνακας 1.2** Βιομηχανικές χρήσεις του ζυμομύκητα και των προϊόντων του (Madigan και συνεργάτες, 2005).

<p><b>Παραγωγή κυττάρων ζυμομύκητα</b></p> <p>Ζύμη αρτοποιίας, για παρασκευή ψωμιού</p> <p>Ζύμη αφυδατωμένων τροφών, ως θρεπτικό συμπλήρωμα</p> <p>Ζύμη αφυδατωμένων ζωοτροφών, ως ζωοτροφή</p>
<p><b>Προϊόντα του ζυμομύκητα</b></p> <p>Εκχύλισμα του ζυμομύκητα, ως θρεπτικό υπόστρωμα μικροβιακών καλλιιεργειών</p> <p>Βιταμίνες B, Βιταμίνη D</p> <p>Ένζυμα για τη βιομηχανία τροφίμων: ιντερβάση</p> <p>Αντιδραστήρια βιοχημικής έρευνας: ATP, NAD*, RNA</p>
<p><b>Προϊόντα ζύμωσης του ζυμομύκητα</b></p> <p>Αιθανόλη, ως βιομηχανική αλκοόλη και ως συμπλήρωμα της βενζίνης</p> <p>Γλυκερόλη</p>
<p><b>Αλκοόλη ποτών</b></p> <p>Μπίρα, κρασιά</p>
<p><b>Αποσταγμένα ποτά</b></p> <p>Ουίσκι, μπράντυ, βότκα, ρούμι</p>

Η παραγωγή κυττάρων ζυμομύκητα και η παραγωγή αλκοόλης μέσω της ζύμωσής του είναι, από βιομηχανική άποψη, δύο εντελώς διαφορετικές διαδικασίες, υπό την έννοια ότι η πρώτη προϋποθέτει την παρουσία οξυγόνου για τη βέλτιστη παραγωγή κυτταρικού υλικού, ενώ η αλκοολική ζύμωση είναι αναερόβια διαδικασία. Ωστόσο, σχεδόν σε όλες αυτές τις βιομηχανικές διαδικασίες χρησιμοποιείται το ίδιο, ή παραπλήσια είδη ζυμομυκήτων, όλα παράγωγα του *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι αρτοποιοί χρησιμοποιούν τον ζυμομύκητα ως αντιδραστήριο διόγκωσης του ζυμαριού πριν το ψήσιμο. Μια δευτερεύουσα συνεισφορά του στην παρασκευή του ψωμιού είναι ότι του προσδίδει άρωμα. Κατά τη διαδικασία διόγκωσης, ο ζυμομύκητας αναμειγνύεται με υγρό ζυμάρι παρουσία μικρής ποσότητας ζάχαρης. Ο ζυμομύκητας μετατρέπει τη ζάχαρη σε αλκοόλη και CO<sub>2</sub>, το οποίο διαστέλλεται προκαλώντας διόγκωση του ζυμαριού. Όταν το ψωμί ψηθεί, η θερμότητα απομακρύνει το CO<sub>2</sub> και την αλκοόλη, δημιουργώντας κοιλότητες μέσα στο ψωμί και προσδίδοντάς του χαρακτηριστική υφή (Εικόνα 1.1).

Ο ζυμομύκητας είτε προορίζεται για την αρτοποιία είτε για διατροφικούς σκοπούς, καλλιεργείται σε μεγάλους αεριζόμενους ζυμωτήρες, σε θρεπτικό υπόστρωμα που έχει ως κύριο συστατικό μελάσες. Οι μελάσες περιέχουν μεγάλες ποσότητες ζάχαρης, η οποία αφ' ενός λειτουργεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας και αφ' ετέρου περιέχει ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και αμινοξέα, που χρησιμοποιούνται από τον ζυμομύκητα. Για την παρασκευή ενός πλήρους θρεπτικού υλικού αύξησης του ζυμομύκητα απαιτείται η προσθήκη φωσφορικού οξέος (πηγή φωσφόρου) και θειικού οξέος (πηγής αζώτου και θείου). Μικρή ποσότητα μελάσας προστίθεται στην αρχή και καθώς η καλλιέργεια του ζυμομύκητα αναπτύσσεται και καταναλώνει τα σάκχαρα, προστίθεται επιπλέον μελάσα.

Οι ζύμες της αρτοποιίας κυκλοφορούν στο εμπόριο με δύο τρόπους, είτε ως συμπυκνωμένη πάστα είτε υπό μορφή ξηρής σκόνης (Εικόνα 1.2). Η πάστα συμπυκνωμένης ζύμης παρασκευάζεται όταν αναμειχθεί καθαρή βιομάζα ζυμομύκητα με γαλακτοματοποιητικά αντιδραστήρια, άμυλο και άλλα πρόσθετα που της προσδίδουν την κατάλληλη υφή και επιτρέπουν εύλογο χρόνο αποθήκευσης. Κατόπιν, το προϊόν μορφοποιείται σε κύβους ή ταμπλέτες ποικίλου μεγέθους για οικιακή ή εμπορική χρήση. Η πάστα συμπυκνωμένης ζύμης περιέχει υγρασία 70% περίπου (Madigan και συνεργάτες, 2005), συνεπώς πρέπει να φυλάσσεται σε ψυγείο, ώστε να διατηρείται η ενεργότητα του μύκητα (ιδανική θερμοκρασία 4 °C).

Ο ζυμομύκητας που πωλείται υπό μορφή σκόνης για την παρασκευή γλυκισμάτων ονομάζεται συνήθως ενεργή ξηρά ζύμη και συντηρείται στους 21-27 °C για μερικές εβδομάδες, ενώ στους 5-6 °C για δύο χρόνια (Χαχλιούτης, 2009). Ο ζυμομύκητας που προκύπτει από τη φυγοκέντριση αναμειγνύεται με πρόσθετα και ξηραίνεται σε κενό αέρα έως ότου η υγρασία του μειωθεί στο 8% περίπου. Κατόπιν συσκευάζεται σε αεροστεγή δοχεία (χαρτόνια ή σάκους) με πολλαπλά τοιχώματα,

ενίστε σε ατμόσφαιρα αζώτου ώστε να επιμηκυνθεί ο χρόνος ασφαλούς αποθήκευσης. Η ενεργή ξηρά ζύμη δεν είναι εξίσου δραστική ως αντιδραστήριο διόγκωσης, σε σύγκριση με την συμυκνωμένη νωπή ζύμη, αλλά μπορεί να αποθηκευτεί για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

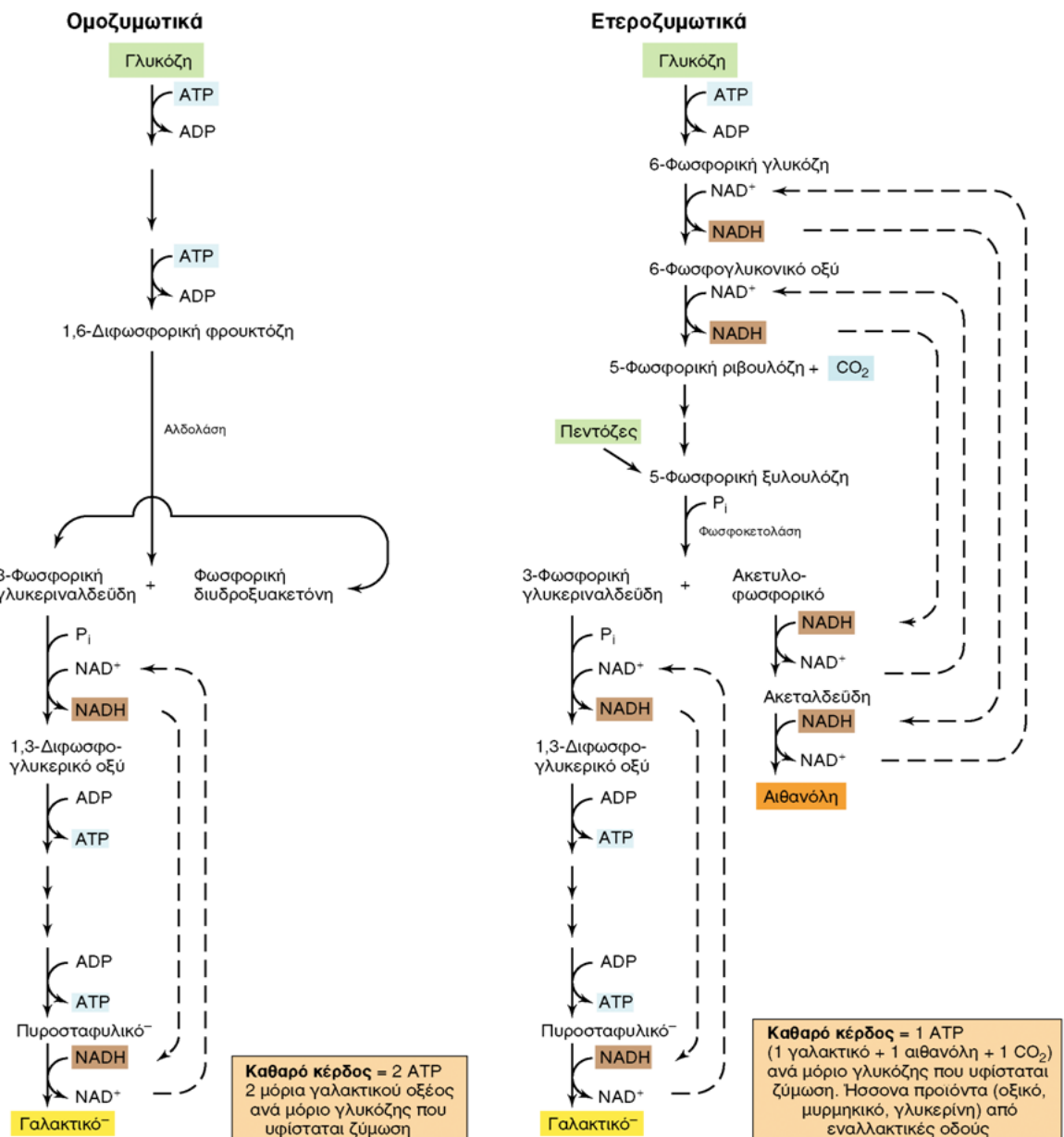
Ο διατροφικός ζυμομύκητας, που πωλείται ως διατροφικό συμπλήρωμα, είναι αδρανοποιημένος με θέρμανση και συνήθως αφυδατωμένος. Τα κύτταρά του ζυμομύκητα είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β, αλλά και πρωτεΐνες, εκτός από εκείνα που αποτελούνται από αμινοξέα που περιέχουν θείο. Ο ζυμομύκητας μπορεί να προστεθεί σε αλεύρι σίτου ή αραβοσίτου, ώστε να αυξηθεί η θρεπτική αξία αυτών των τροφών, ενώ πωλείται και υπό μορφή δισκίων ως υγιεινή τροφή (Madigan και συνεργάτες, 2005).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις περισσότερες ζυμώσεις, ενεργό ρόλο παίζουν όχι μόνο συγκεκριμένα στελέχη ζυμομυκήτων αλλά και περισσότερα στελέχη λακτοβακίλλων (LAB). Τα LAB από βιοχημική άποψη, κατατάσσονται στα ομοζυμοτικά βακτήρια, παράγοντας αποκλειστικά και μόνο γαλακτικό οξύ, αλλά και ετεροζυμοτικά όπου εκτός από το γαλακτικό οξύ, παράγουν ταυτοχρόνως οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και φορμικό οξύ.

Στα ομοζυμοτικά προκαλείται γλυκόλυση των εξοζών. Χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση της 1,6-διφωφο-φρουκτόζης (FDP) σε δύο ίσο-τριόζες, την 3-φωφο-γλυκεριναλδεύδη (GAP) και τη φωφο-διυδροξυ-ακετόνη, με τη δράση της 1,6-δισφωφορικής αλδολάσης. Από την 3-φωφο-γλυκεριλδευδη σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ από το οποίο τελικά παράγεται γαλακτικό οξύ που είναι και το μόνο προϊόν αυτού του τρόπου ζύμωσης.

Στα ετεροζυμοτικά παρατηρείται οξειδωση της γλυκόζης προς 6-φωφο-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενο από μια αποκαρβοξυλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωφο-γλυκεριναλδευδη και ακετυλο-φωφορικό οξύ με τη δράση της φωφοκετολάσης (Γαζής, 2006). Η φωφορική τριόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με την παραγωγή 1 mol ATP, ενώ το ακετυλοφωφορικό οξύ προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από το NADH που δημιουργείται κατόπιν σε αιθανόλη χωρίς να παράγεται ATP. Με αποτέλεσμα τα ετεροζυμοτικά να παράγουν 1 mol ATP από γλυκόζη έναντι των 2 mol ATP που παράγουν τα ομοζυμοτικά. Επειδή τα ετεροζυμοτικά αποκαρβοξυλιώνουν το 6-φωφογλυκονικό οξύ, παράγουν CO<sub>2</sub> ως προϊόν ζύμωσης, ενώ τα ομοζυμοτικά παράγουν ελάχιστο έως και καθόλου CO<sub>2</sub>.

Ένας απλός τρόπος ανίχνευσης κάποιου ετεροζυμωτικού βακτηρίου είναι η παραγωγή CO<sub>2</sub> σε εργαστηριακές καλλιέργειες (Madigan και συνεργάτες, 2005). Οι ομοιότητες και οι διαφορές τους παραθέτονται αναλυτικά στην Εικόνα 1.5.



**Εικόνα 1.5:** Η ζύμωση της γλυκόζης από ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια. Δεν παρατηρείται σύνθεση ATP από αντιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό αιθανόλης. Παρουσία οξυγόνου, τα ετεροζυμωτικά έχουν την ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου με NADH σχηματίζοντας νερό. Τότε παράγεται οξικό οξύ αντί αιθανόλης, έτσι είναι δυνατή η παραγωγή ενός επιπλέον μορίου ATP (Madigan και συνεργάτες, 2005).



### 1.1.3 Μικροβιολογία του προζυμιού

Στις περισσότερες ζυμώσεις για τη δημιουργία προζυμιού ενεργό ρόλο παίζουν συγκεκριμένα στελέχη ζυμομυκήτων και λακτοβακίλων που συμμετέχουν σε αυτές. Μικροβιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία περισσότερων από 50 είδη LAB βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria), κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus*, και περισσότερα από 25 είδη ζυμών με κυρίαρχη την παρουσία των γενών *Saccharomyces* και *Candida*.

Αν και η διαδικασία της ζύμωσης δεν πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες, χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παρασκευή προζυμιού βακτήρια και ζυμομύκητες σε ποσότητα  $10^4 - 10^7$  cfu/g, ενώ το μικροβιακό φορτίο στο αλεύρι κυμαίνεται μεταξύ  $2 \cdot 10^4$  και  $6 \cdot 10^6$  cfu/g. Το μικροβιακό φορτίο του προζυμιού παραμένει σχετικά σταθερό, λόγω του υψηλού πληθυσμού των αντίστοιχων μικροοργανισμών καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ LAB βακτηρίων και ζυμών. Η αναλογία LAB βακτηρίων: ζυμών είναι κατά κανόνα 100 : 1. Συμμετέχουν επίσης και άλλα βακτήρια του περιβάλλοντος και διάφορα δυνητικά παθογόνα (De Vuyst και Neysens, 2005). Τα βακτήρια σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μεσόφιλα και εντοπίζονται επίσης σε παραδοσιακό προζύμι (De Vuyst και Neysens, 2005).

Στα είδη των ζυμομυκήτων που συμμετέχουν στο προζύμι περιλαμβάνονται τα παρακάτω είδη *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exigus*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* ή *Candida holmi*, *Torulopsis colliculosa*. Στα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνονται τα είδη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bucheri*, *Lactobacillus fermentum* ή *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Pediococcus cerevisisae* (Randazzo και συνεργάτες, 2005).

Αυτοί οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα προϋπάρχοντα μόνο- και δισακχαρίδια (γλυκόζη, σακχαρόζη κ.α), τη μαλτόζη που προέρχεται από την αμυλασική δραστηριότητα του ζυμαριού και επίσης, για τα γαλακτικά βακτήρια, οργανικά οξέα που υπάρχουν στο αλεύρι (Αγγελόπουλος και Φωτίου, 2009). Εκτός όμως των στελεχών του γένους *Lactobacillus*, συχνά απομονώνονται από είδη προζυμιού και στελέχη των γενών *Leuconostoc*, *Weissella* και *Pediococcus*, ενώ σε λίγες περιπτώσεις ανιχνεύονται λακτόκοκκοι, εντερόκοκκοι και στρεπτόκοκκοι (De Vuyst και Neysens, 2005). Σύμφωνα με έρευνα των Savic και συνεργάτες (2007) σε

δείγματα προζυμιού και σε δείγματα σίκαλης διαφόρων γεωγραφικών περιοχών, το ποσοστό ανίχνευσης των εντερόκοκκων άγγιζε το 26% και των στρεπτόκοκκων 6%. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *Enterococcus faecium* το οποίο συναντάται συχνά σε δείγματα προζυμιού (Robert και συνεργάτες, 2009), ανιχνεύεται κυρίως στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και θεωρείται σημαντική η συμβολή του, καθώς βοηθά στη μείωση του pH του προζυμιού (Savic και συνεργάτες, 2007).

### 1.1.3.1 Ζυμομύκητες

Το 1859, ο Louis Pasteur, ήταν ο πρώτος ο οποίος περιέγραψε τη δράση των ζυμομυκήτων οι οποίοι μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, μέσω ζυμώσεων αερόβιας αναπνοής. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζυμομύκητες δημιουργούν ένα ισχυρό και ελαστικό δίκτυο γλουτένης, το οποίο συγκρατεί το διοξείδιο του άνθρακα μέσα στο προζύμι. Με αυτόν τον τρόπο αναγκάζει το ζυμάρι να αυξηθεί, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων του ψησίματος, επηρεάζοντας τον όγκο του τελικού προϊόντος αλλά και τη γεύση καθώς συμβάλλει στην ανάπτυξη αρωματικών συνθέτων (De Vuyst και συνεργάτες, 2002). Όταν η ποσότητα του οξυγόνου που υπάρχει στο προζύμι καταναλωθεί, η ζύμωση συνεχίζεται μέσω της μεταβολικής οδού της αλκοολικής ζύμωσης (Stear, 1990).

Ο πλέον δημοφιλής ζυμομύκητας είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά), ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή των προϊόντων ζύμης (αερόβια ζύμωση), καθώς και για την παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών (αναερόβια ζύμωση) όπως το κρασί και η μπύρα. (Καλογεράκης, 2003).



**Εικόνα 1.6** Μακροσκοπική και μικροσκοπική απεικόνιση ζυμομυκήτων ([www.85.238.144.18/analytics/Micro\\_Manual/TEDISdata/prods/4975-1\\_05397\\_0500-2.jpg](http://www.85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/4975-1_05397_0500-2.jpg)), ([www.panacea.med.uoa.gr/extra/578.jpg](http://www.panacea.med.uoa.gr/extra/578.jpg)).

Στον Πίνακα 1.3, παραθέτονται, ανά τύπο προζυμιού, τα είδη των ζυμομυκήτων που συχνά απομονώνονται αλλά και αυτά που σπάνια ανιχνεύονται.

**Πίνακας 1.3** Είδη ζυμομυκήτων που κυριαρχούν στις ζυμώσεις Τύπου I και II (Arendt και συνεργάτες, 2007)

<b>ΤΥΠΟΣ I</b>	<b>ΤΥΠΟΣ II</b>
<b>Κυρίαρχα στελέχη</b>	<b>Κυρίαρχα στελέχη</b>
<i>Candida humilis</i>	---
<b>Συχνά απομονωθέντα στελέχη</b>	<b>Συχνά απομονωθέντα στελέχη</b>
<i>Saccharomyces exiguous</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	
<b>Άλλα είδη που ανιχνεύτηκαν</b>	<b>Άλλα είδη που ανιχνεύτηκαν</b>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida boidinii</i>	
<i>Debaromyces hansenii</i>	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	
<i>Galactomyces geotrichum</i>	
<i>Torulaspota pretoriensis</i>	

#### 1.1.3.1.1 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές ζυμομυκήτων

Η χρήση του ζυμομυκήτα *S. cerevisiae* στη διαδικασία της ζύμωσης του προζυμιού, άρχισε να εφαρμόζεται στην Ευρώπη, πριν τον Μεσαίωνα (Wirtz, 2003). Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1770 και 1780, οι πρώτες εταιρίες που παρήγαγαν ζυμομύκητες για προζύμι ήταν στο Schidam της Ολλανδίας (Calvel και συνεργάτες, 2001). Πολλές από τις βιομηχανικές χρήσεις του ζυμομύκητα και των προϊόντων του έχουν προαναφερθεί στον Πίνακα 1.2.

Οι επιστήμονες καλλιεργούν ποικιλίες ζυμομυκήτων για να έχουν τη δυνατότητα να κάνουν το ζυμάρι να διογκώνεται και να παράγουν ψωμί με όγκο, χαρακτηριστική υφή και γεύση ([www.eufic.org/article/el/artid/yeast/](http://www.eufic.org/article/el/artid/yeast/)). Ο ζυμομύκητας μετατρέπει τη ζάχαρη σε αλκοόλη και CO<sub>2</sub>, το οποίο διαστέλλεται προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη διόγκωση του ζυμαριού.

Ο εμβολιασμός των ζυμομυκήτων στο προζύμι, γίνεται πλέον από καθαρή βιομάζα που παράγεται βιομηχανικά. Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται επιλέγονται προσεκτικά, μέσω εκλεκτικών υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων. Η ποσότητα ζυμομύκητα που προστίθεται είναι περίπου 1,8-3,0 % της ξηρής βιομάζας (Berry, 1982).

Όταν το ψωμί ψηθεί, η θερμότητα απομακρύνει το CO<sub>2</sub> και την αλκοόλη, δημιουργώντας κοιλότητες μέσα στο ψωμί και προσδίδοντάς του χαρακτηριστική υφή. Υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης, βοηθούν στην αυξανόμενη παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα οπότε όσο περισσότερο διοξείδιο του άνθρακα παραχθεί, τόσο γρηγορότερα θα αυξηθεί ο όγκος του προϊόντος. Μέσα στο φούρνο, όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 100 °C, παρατηρείται αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από το ζυμομύκητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Gatto και Torriani, 2004).

### **1.1.3.2 Βακτήρια γαλακτικού οξέος**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή αλλά και στην αλλοίωση διαφόρων ζυμωμένων προϊόντων διατροφής (Gobbetti 1998, De Vuyst και Neysens 2005, Gobbetti και συνεργάτες, 2005). Είναι αναερόβια, χωρίς να είναι ευαίσθητα στο O<sub>2</sub> με αποτέλεσμα να μπορούν τόσο παρουσία του όσο και απουσία του (De Vuyst και συνεργάτες, 2002). Δε διαθέτουν κυτοχρώματα και πορφυρίνες, έχουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες, ενώ οι διατροφικές τους απαιτήσεις περιλαμβάνουν αμινοξέα, βιταμίνες, πουρίνες και πυριμιδίνες.

Τα διάφορα γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Πίνακας 1.4) έχουν καθοριστεί βάσει της μορφολογίας του κυττάρου, της σύνθεσης των βάσεων του DNA και του τύπου του ζυμωτικού μεταβολισμού τους. Παρατηρείται ότι το γένος στο οποίο υπάρχουν μεγάλες διαφορές ως προς τη σύνθεση του DNA είναι το γένος *Lactobacillus*, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη στα οποία υπάρχει μικρή

ποικιλομορφία (Madigan και συνεργάτες, 2005). Το γονιδίωμά τους είναι σχετικά μικρό (από 1,7 έως 3,3 Mb) και αποτελούν μέλη του γένους *Bifidobacterium*, θετικά κατά Gram βακτήρια που ταξινομικά ανήκουν στα *Actinobacteria*.

**Πίνακας 1.4:** Διάκριση κύριων γενών οξυγαλακτικών βακτηρίων (Madigan και συνεργάτες, 2005)

ΓΕΝΟΣ	ΣΧΗΜΑ-ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΖΥΜΩΣΗ	DNA (mol % G+C)
<i>Streptococcus</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ετεροζυμωτικό	38-41
<i>Pediococcus</i>	Κόκκοι σε τετράδες	Ομοζυμωτικό	34-42
<i>Lactobacillus</i>	1) Ραβδόμορφα, συνήθως σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	32-53
	2) Ραβδόμορφα, συνήθως σε αλυσίδες	Ετεροζυμωτικό	34-53
<i>Enterococcus</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	38-40
<i>Lactococcus</i>	Κόκκοι σε αλυσίδες	Ομοζυμωτικό	38-41

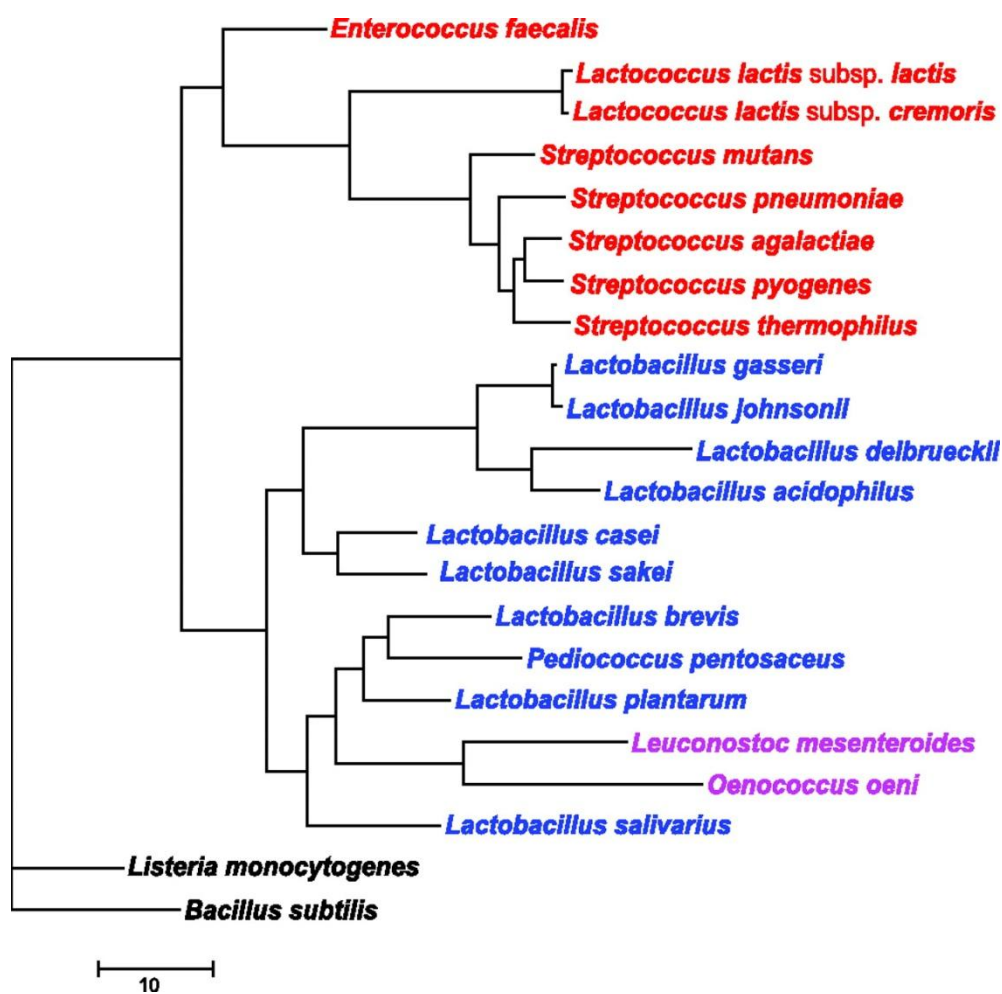
Ένας διαχωρισμός μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά στη φύση των προϊόντων που σχηματίζονται με τη ζύμωση σακχάρων και κατατάσσονται στα ομοζυμωτικά, παράγοντας αποκλειστικά και μόνο γαλακτικό οξύ, αλλά και ετεροζυμωτικά βακτήρια όπου εκτός από το γαλακτικό οξύ, παράγουν ταυτοχρόνως οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και φορμικό οξύ (Εικόνα 1.5).

Η κλασική ταξινόμηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος βασίζεται σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, στα οποία περιλαμβάνονται η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα του κυττάρου και άλλα κυτταρικά χαρακτηριστικά. Πρόσφατα στις τεχνικές ταξινόμησης έχουν προστεθεί και τα μοριακά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, όπως η

ποσοστιαία ανά γραμμομόριο περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), η δομή και η αλληλουχία στην 16S rRNA, οι ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των προϊόντων των γονιδίων, η PFGE κ.α.

Φυλογενετικά τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ανήκουν στην κλωστριδιακή υποομάδα των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων (Εικόνα 1.7). Είναι αρνητικοί στην καταλάση, μη σπορογόνοι κόκκοι, που περιέχουν λιγότερο από 55% G + C / mol στο DNA τους. Αυτό ξεχωρίζει τα κλασσικά γαλακτικά βακτήρια από τα bifidobacteria, που περιέχουν περισσότερο από 55% G + C / mol στο DNA τους και πλησιάζουν φυλογενετικά τα βακτήρια.

Εμφανίζονται σαν κόκκοι, κοκκοβάκιλλοι ή βάκιλλοι και βρίσκονται σε τρόφιμα (γαλακτοκομικά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, ποτά κ.α.), φυτά, εντερική χλωρίδα ανθρώπου και ζώων, αλλά και στη στοματική κοιλότητα και τον γυναικείο κόλπο (Γαζής, 2006).



Εικόνα 1.7 Φυλογενετικό δένδρο των Lactobacillales (Makarova και Koonin, 2007)

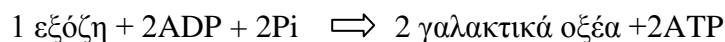
Για την παραγωγή της απαιτούμενης για την επιβίωσή τους ενέργειας καταβολίζουν σάκχαρα απουσία οξυγόνου απελευθερώνοντας διοξείδιο του άνθρακα, μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος και μικρές ποσότητες άλλων τελικών προϊόντων (π.χ. οξικό οξύ, αιθανόλη, μαννιτόλη) (McDonald και συνεργάτες, 1987). Χαρακτηρίζονται ως οξεόφιλοι μικροοργανισμοί (άριστο pH 4,5 – 6,4) και ζυμώνουν τους υδατάνθρακες με δύο τρόπους (βλέπε 1.1.2), τον ομοζυμωτικό και τον ετεροζυμωτικό (Corsetti και Settanni, 2007).

Ο ομοζυμωτικός τρόπος προκαλεί γλυκόλυση των εξοζών και συμβαίνει στα στελέχη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Pediococcus*. Χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση της 1,6-διφωφο-φρουκτόζης (FDP) σε δύο ίσο-τριόζες, την 3-φωφο-γλυκεριναλδεύδη (GAP) και τη φωφο-διυδροξυ-ακετόνη, με τη δράση της 1,6-δισφωφορικής αλδολάσης. Από την 3-φωφο-γλυκεριλδευδη σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ από το οποίο τελικά παράγεται γαλακτικό οξύ που είναι και το μόνο προϊόν αυτού του τρόπου ζύμωσης.

Ο ετεροζυμωτικός τρόπος χαρακτηρίζεται από την οξείδωση της γλυκόζης προς 6-φωφο-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενο από μια αποκαρβοξυλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωφο-γλυκεριναλδευδη και ακετυλο-φωφορικό οξύ με τη δράση της φωφοκετολάσης (Γαζής, 2006).

Το αποτέλεσμα αυτού του τρόπου ζύμωσης της εξόζης παράγει CO<sub>2</sub>, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσα μέρη στο υπόστρωμα, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος εξαιτίας της καλύτερης προσαρμοστικής ικανότητάς τους σε αυτό το περιβάλλον (De Vuyst και Neysens, 2005). Εδώ ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του *Lactobacillus spp.* Τα ετεροζυμωτικά έχουν επίσης την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξωτερικούς δέκτες ηλεκτρονίων (π.χ φρουκτόζη) για να αναγεννούν NADH, να παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες, να συμβάλλουν στη βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών (EPS) (Γαζής, 2006).

### Ομοζυμωτικός τρόπος



### Ετεροζυμωτικός τρόπος



ή (αν υπάρχει εξωτερικός δέκτης ηλεκτρονίων)



Από οικολογική άποψη, τα LAB εντοπίζονται στα φυτά, σε πολλά τρόφιμα (κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα), και σε πολλά άλλα προϊόντα ευρείας κατανάλωσης. Πολλά μάλιστα είδη αυτών των βακτηρίων, όπως *Bifidobacterium* ανιχνεύονται στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου των ανθρώπων και των ζώων, προσφέροντας μεγάλη προστασία έναντι των παθογόνων με αποτέλεσμα τα περισσότερα από τα στελέχη αυτών των ειδών να χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά (Τζανετάκης και Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2000). Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι, τα τελευταία 25 χρόνια έρευνας στο γονιδίωμα, τη φυσιολογία αλλά και στις εφαρμογές αυτών των βακτηρίων παρουσιάζεται αξιοσημείωτη ανάπτυξη (Mayo και συνεργάτες, 2008).

Οι τροφικές απαιτήσεις τους, είναι πολύπλοκες και αναπτύσσονται σε ποικίλα περιβάλλοντα όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων, βιταμινών και εκεί όπου η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή (McDonald και συνεργάτες, 1987).

Εξαιτίας των παραπάνω ιδιοτήτων τους, συμβάλλουν τόσο στη δομή, στο άρωμα αλλά και γενικότερα στην παραγωγή νέων βελτιωμένων προϊόντων (De Vuyst και Neysens, 2005). Ο λόγος όμως που έχουν εστιάσει την προσοχή τους πολλοί επιστήμονες στους λακτοβάκιλους σχετίζεται με την προσαρμοστικότητά τους στο εκάστοτε περιβάλλον και επικεντρώνονται κυρίως στη μελέτη του μεταβολισμού των υδατανθράκων, λιπιδίων και αμινοξέων τους, στην πρωτεόλυση καθώς και στην παραγωγή πτητικών ενώσεων.

Η μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και η ενεργότητα των λακτοβάκιλων στο προζύμι επηρεάζεται και από ενδογενείς παράγοντες (όπως ένζυμα), από την αλληλεπίδραση μεταξύ λακτοβάκιλων, ζυμομυκήτων και άλλων βακτηρίων, καθώς



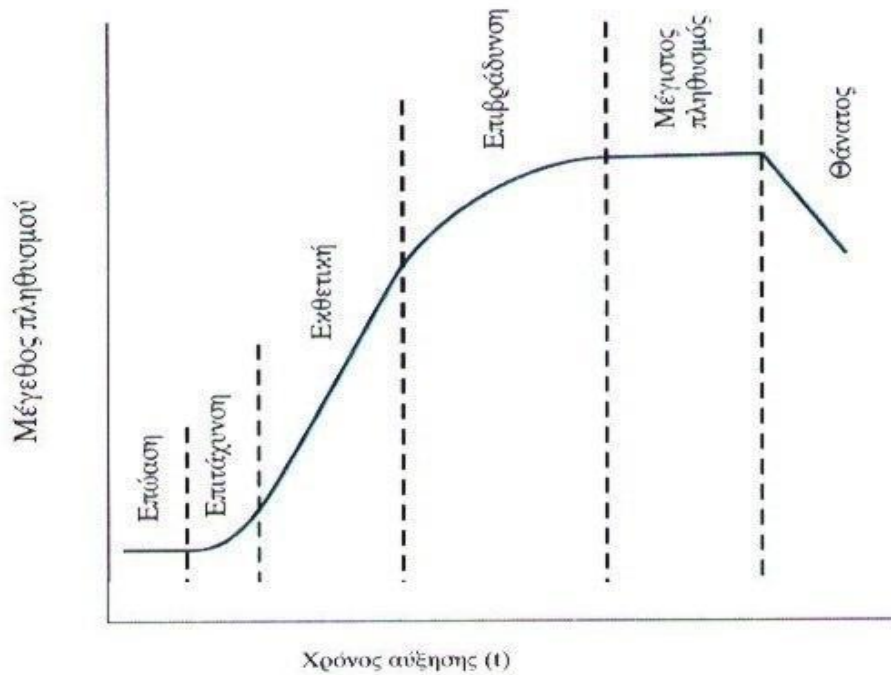
και από παράγοντες όπως η θερμοκρασία ή ακόμη και η σύσταση του νερού που χρησιμοποιείται κάθε φορά (Scheirlinck και συνεργάτες, 2007). Πολλοί είναι και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στο ρυθμό ανάπτυξής τους. Στο προζύμι, οι παράγοντες αυτοί είναι η θερμοκρασία, το pH, η ελαστικότητα του προζυμιού και οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των μικροοργανισμών όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθανόλη.

Η θερμοκρασία, όσον αφορά στο προζύμι και γενικότερα τα προϊόντα ζύμης, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς ύστερα από έρευνες των Ganzle και συνεργάτες, (2004), βρέθηκε ότι :

- Η αύξηση της θερμοκρασίας (21 °C - 28 °C) οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του οξικού και του γαλακτικού οξέος, ενώ αντιθέτως μειώνεται ο δείκτης ζύμωσης (fermentation quotient, FQ).
- Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 35 °C, παρατηρείται μείωση της παραγωγής του οξικού οξέος και του δείκτη (FQ), ενώ η παραγωγή του γαλακτικού και της αιθανόλης δεν επηρεάζεται καθόλου.
- Ιδανικές τιμές θερμοκρασίες θεωρούνται 28 °C και 32 °C (Ganzle και συνεργάτες, 2004).

Συμπερασματικά, για τη διόγκωση της ζύμης ιδανική θερμοκρασία θεωρείται οι 27 °C, στους 35 °C επιταχύνεται μεν το φούσκωμα, αλλά ταυτόχρονα παράγονται και ανεπιθύμητες βλαβερές ουσίες με αποτέλεσμα η ζύμη να κολλάει ([www.asset.tovima.gr](http://www.asset.tovima.gr)).

Καθοριστικό ρόλο στον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο προζύμι έχει και το pH, καθώς τιμές  $pH > 5$  είναι ιδανικές, ενώ σε  $pH = 4$  παρεμποδίζεται η όλη διαδικασία (Ganzle και συνεργάτες, 2004). Αναλυτικά, οι τιμές του pH το πρώτο 12ωρό όπως και την τελευταία ημέρα της διαδικασίας παραμένουν σταθερές ( $pH > 5$ ), ενώ μετέπειτα αρχίζουν σιγά σιγά να πέφτουν  $pH < 4$  (Scheirlinck και συνεργάτες, 2007).



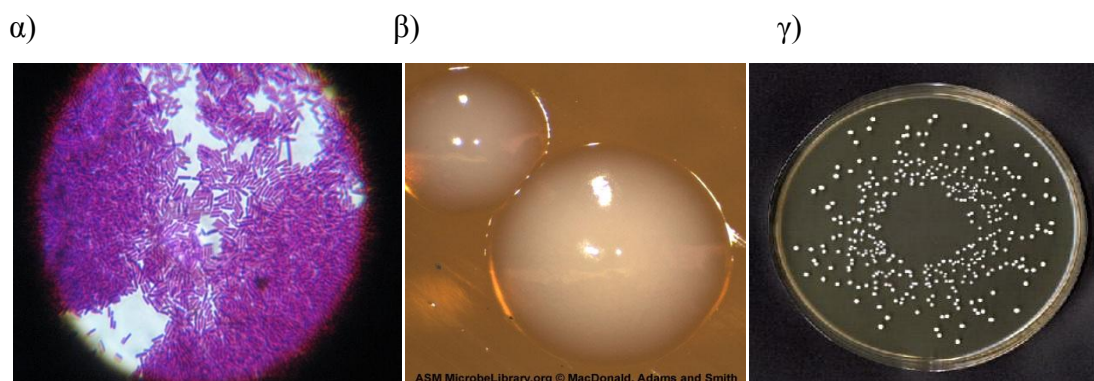
**Εικόνα 1.8** Κλασική καμπύλη αύξησης των μικροοργανισμών. Ανάλογη καμπύλη ακολουθούν οι μικροοργανισμοί στο προζύμι. Οι φάσεις επηρεάζονται και είναι ανάλογες από τη θερμοκρασία των 27 °C (Καραγκούνη, 1999), (Sadeghi, 2008).

Σε γενικές γραμμές, ο χρόνος διπλασιασμού μπορεί να κυμαίνεται από 20 λεπτά έως και πολλές ημέρες, ενώ πιο συγκεκριμένα για τους μικροοργανισμούς στο προζύμι διαρκεί περίπου 1 ώρα. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης έχουμε τη μέγιστη παραγωγή CO<sub>2</sub>.

Στις φάσεις επιβράδυνσης και στασιμότητας επιτυγχάνεται υψηλή αύξηση της οξύτητας και καλή εξέλιξη της γεύσης τα οποία είναι τα επιθυμητά αποτελέσματα. Η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης παρατηρείται όταν πλέον έχει επέλθει εξάντληση των θρεπτικών πηγών ή η συσσώρευση των άχρηστων τοξικών προϊόντων (Schuenemann και Treu, 1999).

#### 1.1.3.2.1 *Lactobacillus*

Το γένος *Lactobacillus* (Εικόνα 1.9) είναι το μεγαλύτερο αλλά και από τα πιο σημαντικά μέλη της ομάδας των οξυγαλακτικών βακτηρίων, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη φαινοτυπική, βιοχημική και φυσιολογική ποικιλομορφία (De Angelis και Gobbetti, 2004).



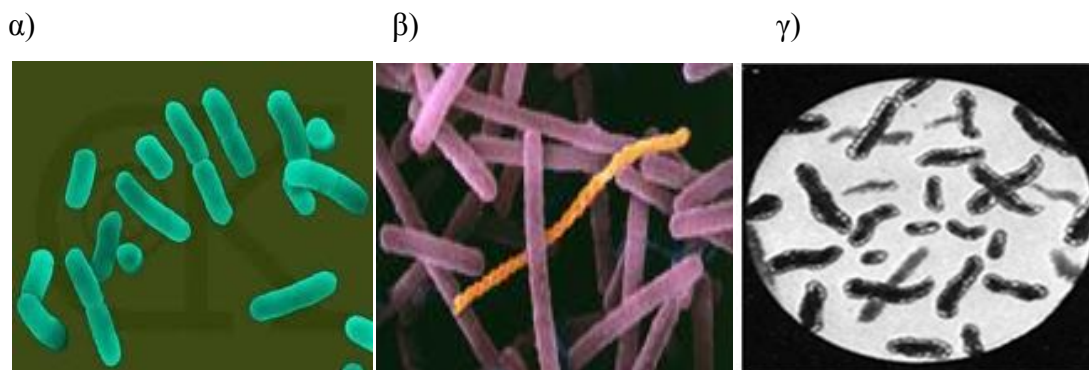
**Εικόνα 1.9:** Μακροσκοπική και μικροσκοπική απεικόνιση λακτοβάκιλων  
 α) *Lactobacillus* (<http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSebnTtUcvuOQ0EOaHWp70FF>),  
 β) *Lactobacillus plantarum* ([www.archive.microbelibrary.org](http://www.archive.microbelibrary.org)), γ) *Lactobacillus acidophilus*  
 (<http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRy6kxt8Q2x6kA2k7HJkp9wM>).

Είναι το μεγαλύτερο γένος, από την ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, με μεγάλο αριθμό ειδών, τα οποία απομονώνονται από τα ζώα, τον άνθρωπο, τα φυτά και τα τρόφιμα. Χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τυριού, ψωμιού με προζύμι, γιαουρτιού και άλλων προϊόντων που καταναλώνουμε καθημερινά (De Angelis και Gobbetti, 2004).

Μικροοργανισμοί όπως ο *Lactobacillus delbrueckii* (Εικόνα 1.10), χρησιμοποιείται στην παρασκευή γιαουρτιού, ο *Lactobacillus acidophilus* στην παρασκευή ξινόγαλου, ενώ άλλα είδη χρησιμοποιούνται ακόμη και στην παρασκευή ζωοτροφών (Madigan και συνεργάτες, 2005).

Χαρακτηριστική είναι η ανθεκτικότητά τους σε όξινα περιβάλλοντα σε σχέση με τα άλλα LAB, και ικανοί να αναπτύσσονται σε τιμές pH έως και 4. Έτσι είναι δυνατόν να απομονωθούν επιλεκτικά από φυσικές ύλες με τη χρήση όξινου θρεπτικού υποστρώματος πλούσιου σε υδατάνθρακες (Madigan και συνεργάτες, 2005). Είναι λοιπόν υπεύθυνοι, για την ολοκλήρωση των τελικών σταδίων των περισσότερων από τις οξυγαλακτικές ζυμώσεις (De Angelis και Gobbetti, 2004).

Ο λόγος που το γένος *Lactobacillus* ξεχωρίζει σε σχέση με τα γένη *Leuconostoc* και *Lactococcus* οφείλεται στη δυνατότητα αύξησης της οξύτητας του μίγματος, στην ανάπτυξη πλούσιου αρώματος, στη βελτίωση της θρεπτικής αξίας και στην εξασφάλιση της σταθερότητας των προϊόντων ζύμης (Corsetti και Settanni, 2007).



**Εικόνα1.10:** Εικόνες των πιο συχνά απομονωθέντων ειδών *Lactobacillus* από φωτονικό μικροσκόπιο:

α) *Lactobacillus delbrueckii*, β) *Lactobacillus acidophilus*, γ) *Lactobacillus brevis*, ([www.bioinformatica.uab.es.com](http://www.bioinformatica.uab.es.com)), ([www.nccam.nih.gov/health/probiotics/lactobacillus.jp](http://www.nccam.nih.gov/health/probiotics/lactobacillus.jp)), ([www.nobodybuy.com/2010/01/07export46333/200x200\\_p750442/bacillus brevis.jpg](http://www.nobodybuy.com/2010/01/07export46333/200x200_p750442/bacillus brevis.jpg))

Το βασικότερο πλεονέκτημά τους είναι ότι έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή βακτήρια για τη χρήση τους σε τρόφιμα και είναι λογικό οι χρήσεις τους να διευρύνονται όλο και περισσότερο σε αυτόν τον τομέα. Οι λακτοβάκιλλοι εκτίθενται και επιβιώνουν κάτω από ιδιόζουσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα, σε ακραίες θερμοκρασίες, τιμές pH και οξυγόνου ακόμη και κάτω από ισχυρές πιέσεις.

Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί κατά πολύ οι έρευνες που επικεντρώνονται στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ως πρότυπο για αρκετές έρευνες χρησιμοποιείται το *Lactococcus lactis* (De Angelis και Gobbetti, 2004).

#### 1.1.3.2.2 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται εδώ και πάρα πολλά χρόνια για τη ζύμωση ή την καλλιέργεια γαλακτοκομικών προϊόντων (γιαούρτι, τυρί, βούτυρο) σε όλο τον κόσμο ([www.medicalnewstoday.com/articles/14023.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/14023.php)).

Η παρασκευή ζύμης περιλαμβάνει τη μικροβιακή διαδικασία, κατά την οποία παράγονται οξέα με αποτέλεσμα την αλλαγή στη δομή των πρωτεϊνών του γάλακτος (μετουσίωση ή θρόμβωση) και ομοίως αλλάζει και η υφή του προϊόντος. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του τελικού προϊόντος παίζουν οι μεταβλητές όπως η

θερμοκρασία καθώς και η σύσταση του γάλακτος, ([www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria/](http://www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria/)), διότι συνεισφέρουν στη βελτίωση των οργανοληπτικών γνωρισμάτων των τροφίμων αυτών όπως και στην αποφυγή των μολύνσεων με συνέπεια τη διατήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (De Angelis και συνεργάτες, 2007).

Το γαλακτικό οξύ προσδίδει στο γάλα την ελαφρώς ξινή γεύση του, έτσι οι επιπρόσθετες χαρακτηριστικές γεύσεις και τα αρώματα είναι συνήθως το αποτέλεσμα σε όλα τα προϊόντα που σχετίζονται με τα οξυγαλακτικά βακτήρια ([www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria/](http://www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria/)).

Συγκεκριμένα για το γιαούρτι και για άλλα προϊόντα γάλακτος υπάρχει σημαντική δυνατότητα να αξιοποιηθούν τα LAB ως προβιοτικές καλλιέργειες. Αυτές συμπληρώνουν και βοηθούν τα φυσιολογικά βακτήρια του εντέρου μας να λειτουργήσουν πιο αποτελεσματικά. Η παγκόσμια αγορά για τα προϊόντα αυτά συνεχίζει να επεκτείνεται σε απόκριση των απαιτήσεων ενός καταναλωτικού κοινού με συνεχώς αυξανόμενη συνείδηση για το θέμα της υγείας.

Παρόλο που είναι γνωστά κυρίως για τον ρόλο τους στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, τα LAB χρησιμοποιούνται επίσης και για την παρασκευή κρασιού και μύρας. Κατά τη ζύμωση της μύρας, οι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται παράγοντας ανεπιθύμητη γεύση και θολότητα (Rehman και συνεργάτες, 2006).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται αναντικατάστατα τόσο στην παραγωγή όσο και στη συντήρηση πολλών προϊόντων ζύμης. Η προσαρμογή τους όμως στο εκάστοτε περιβάλλον σχετίζεται με πάρα πολλούς μηχανισμούς, όπως:

- Τον μεταβολισμό ή / και τη μεταφορά της μαλτόζης (πρωτεύον) και της φρουκτόζης (εφεδρικός αποδέκτης ηλεκτρονίων) για παράδειγμα, η μετατροπή της οποίας σε μαννιτόλη, προσδίδει χαρακτηριστικό άρωμα στα προϊόντα.
- Συγκεκριμένες αντιδράσεις καταπόνησης.
- Η παραγωγή αντιμικροβιακών χημικών ενώσεων.

Σύμφωνα λοιπόν, με όλες τις παραπάνω διεργασίες τα LAB συνεισφέρουν:

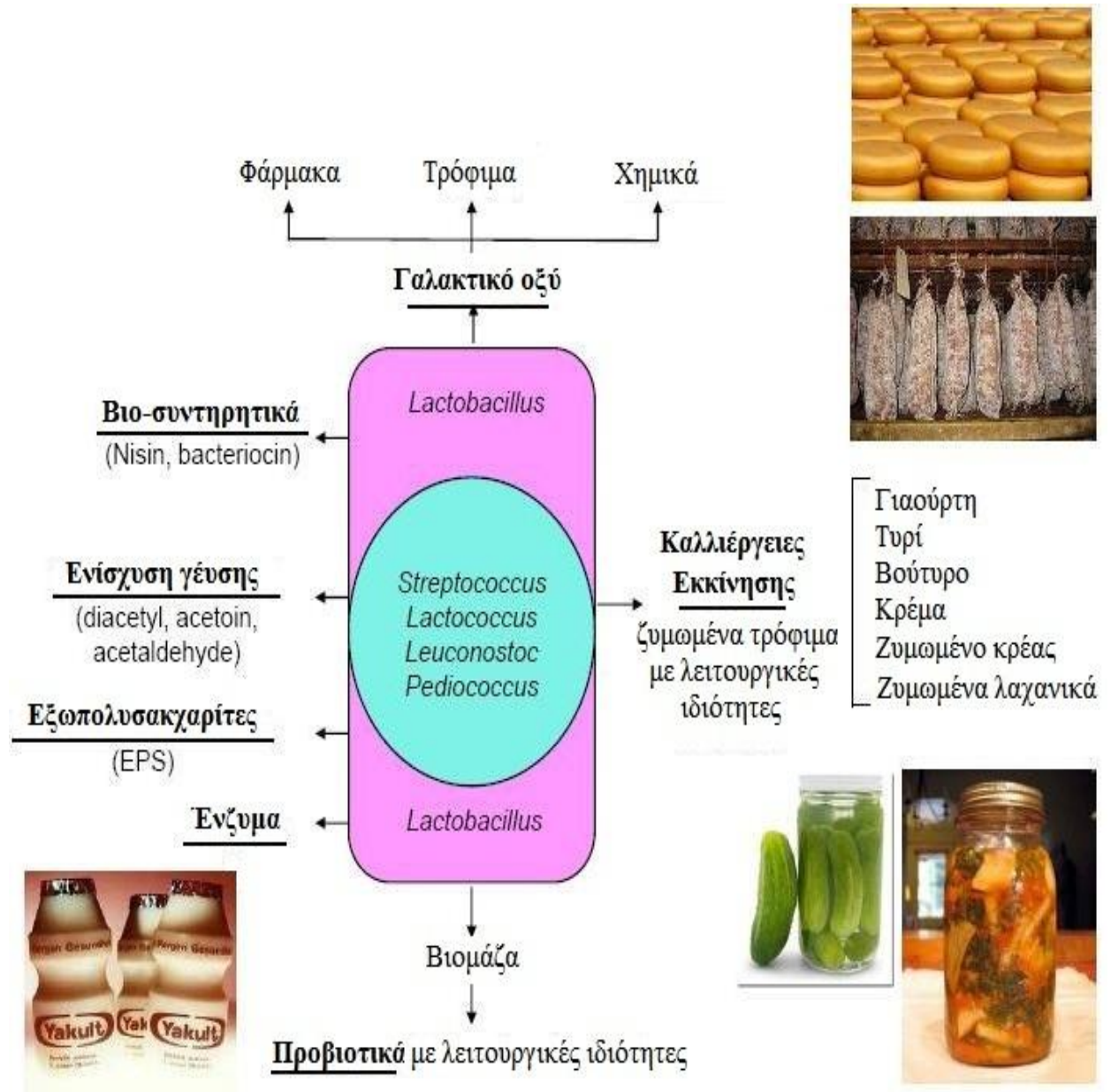
- Στην ομαλή και επιτυχημένη δημιουργία του προζυμιού (χάρη στον μεταβολισμό των αμινοξέων)
- Βοηθούν το μείγμα, τόσο στη δομή όσο και στην υφή του (με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών EPS)
- Αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη της μούχλας με αποτέλεσμα την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων (χάρη στην παραγωγή οξικού οξέος και βακτηριοκινών) πράγμα που έχει φυσικά και οικονομική σημασία ειδικά από την πλευρά του καταναλωτή (De Vuyst και Vancanney, 2007).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα LAB παράγουν ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών (οργανικά οξέα, ένζυμα, EPS) πιο συγκεκριμένα, παράγουν γαλακτικό οξύ (13,7 g / kg), οξικό οξύ (1,7 g / kg), αιθανόλη (πάνω από 24,32 g / kg), και μαννιτόλη (7,32 g / kg), καθώς μικρές συγκεντρώσεις αργινίνης και ορνιθίνης της τάξεως του 1 g / kg, έχουν ανιχνευτεί σε αρκετά προζύμια.

Σημαντικό όμως είναι να αναφερθεί ότι οι τιμές τους, δεν παραμένουν σταθερές και ανιχνεύσιμες καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (De Vuyst και συνεργάτες, 2008). Οι τιμές της ορνιθίνης αυξάνονται από την 2<sup>η</sup> έως και την 5<sup>η</sup> ημέρα ενώ μετέπειτα είναι μη ανιχνεύσιμη. Οι τιμές του γαλακτικού οξέος παραμένουν σταθερές μόνο την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης, η μαννιτόλη ανιχνεύεται μέχρι και την 4<sup>η</sup> έως 5<sup>η</sup> ημέρα, επιπρόσθετα το ποσό της αιθανόλης αυξάνεται όταν μειώνεται ο αριθμός των ζυμομυκήτων (Scheirlinck και συνεργάτες, 2007).

Όλοι αυτοί οι μεταβολίτες λειτουργούν θετικά για το μείγμα καθώς προσδίδουν μεγάλη ανθεκτικότητα στα προϊόντα ζύμης. Αυτό συμβαίνει διότι, με την παραγωγή των οξέων, επιτυγχάνεται αυτομάτως μείωση του pH ενώ αντιθέτως επιταχύνεται η ενεργότητα ενζύμων στο αλεύρι (πρωτεάση, αμυλάση) οδηγώντας έτσι στην επιβράδυνση της αλλοίωσης των προϊόντων αυτών (Arendt και συνεργάτες, 2007).

Τα συστατικά αυτά, χαρίζουν γεύση και άρωμα στα προϊόντα και ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στα μη πτητικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων των οργανικών οξέων που απελευθερώνονται από ομο- και ετερο- ζυμωτικά βακτήρια και στα πτητικά συστατικά του προζυμιού όπως οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, οι εστέρες και οι θειώδεις ενώσεις (Rehman και συνεργάτες, 2006). Στην Εικόνα 1.11 παραθέτονται συνοπτικά οι περισσότερες από τις βιομηχανικές χρήσεις των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.



**Εικόνα 1.11:** Ο ρόλος των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) στη βιομηχανία ([www.islab.tp.ugm.ac.id/files201010Role-of-LAB-in-industry5.jpg](http://www.islab.tp.ugm.ac.id/files201010Role-of-LAB-in-industry5.jpg)).

Ο όρος βιοσυντήρηση των τροφίμων αναφέρεται στην αύξηση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων, καθώς και στην παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων από μικροβιολογική άποψη, λόγω της αυξημένης παραγωγής οργανικών οξέων όπως οξικό, γαλακτικό, φορμικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ, αναστέλλεται η αύξηση άλλων μικροοργανισμών ή απομακρύνονται τυχόν υπάρχουσες τοξικές ουσίες (Rehman και συνεργάτες, 2007).

Η παραγωγή βακτηριοσινών, πεπτίδια ή μικρές πρωτεΐνες με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση (Demain και Davies, 1999) ενάντια ακόμη και σε συγγενικά είδη, προσφέρει το πλεονέκτημα συντήρησης των τροφίμων με φυσικό τρόπο απαλλαγμένο από χημικά συντηρητικά και βελτίωσης των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους (Fang και Toole, 2009). Τα αντιμικροβιακά αυτά συστατικά είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και στην οξύτητα (Cotter και συνεργάτες, 2005).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των LAB είναι και η ανασταλτική δράση τους στην ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων (μούχλες) όπως είναι τα στελέχη των γενών *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* και *Monilia*, καθώς και πολλών παθογόνων βακτηρίων (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*) που συχνά ανιχνεύονται στα τρόφιμα (Gobbetti και συνεργάτες, 2005).

Συνεπώς, τα LAB βακτήρια θεωρούνται αναντικατάστατα στη συντήρηση πολλών ζυμωμένων προϊόντων στη βιομηχανία (Carr και συνεργάτες, 2002) και είναι πρεσβευτές οικονομικής σημασίας, αλλά και εξαιρετικής αξίας για τη διατήρηση και προαγωγή της υγείας του ανθρώπου ([www.eufic.org/article/page/FTARCHIVE/lactic-acid-bacteria](http://www.eufic.org/article/page/FTARCHIVE/lactic-acid-bacteria)).

### **1.1.3.3 Βακτήρια οξικού οξέος**

Τα βακτήρια οξικού οξέος ανήκουν στην ομάδα των αρνητικών κατά Gram, υποχρεωτικώς αερόβιων και αυτοκινούμενων βάκιλων, ενώ από φυλογενετική άποψη, ανήκουν στα α-πρωτεοβακτήρια. Εκτελούν ατελή οξειδωση αλκοολών και σακχάρων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οργανικών οξέων ως τελικά προϊόντα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των μικροοργανισμών είναι η ανθεκτικότητά τους σε όξινες συνθήκες, δηλαδή σε τιμές pH <5.



Διαχωρίζονται σε οργανισμούς με περίτριχη και πολική μαστιγοφορία. Στην περίτριχη κατηγορία κατατάσσεται το γένος *Acetobacter* ενώ, στους πολικά μαστιγοφόρους το γένος *Gluconobacter*. Οι διαφορές των δύο παραπάνω γενών δεν έγκειται μόνο στη μαστιγοφορία, αλλά και ως προς την ικανότητα του *Acetobacter* να οξειδώνει το οξύ προς CO<sub>2</sub>. Αυτό συμβαίνει επειδή το *Acetobacter* περιέχει όλα τα ένζυμα για τον πλήρη κύκλο του κιτρικού οξέος, ενώ το *Gluconobacter* όχι.

Οι αποικίες τους αναγνωρίζονται σε τρυβλία με CaCO<sub>3</sub> και αιθανόλη, δεδομένου ότι το παραγόμενο οξικό οξύ διαλύει υπό διαφορετικές συνθήκες το αδιάλυτο CaCO<sub>3</sub>, με αποτέλεσμα το άγαρ γύρω από τις αποικίες να γίνεται διαυγές.

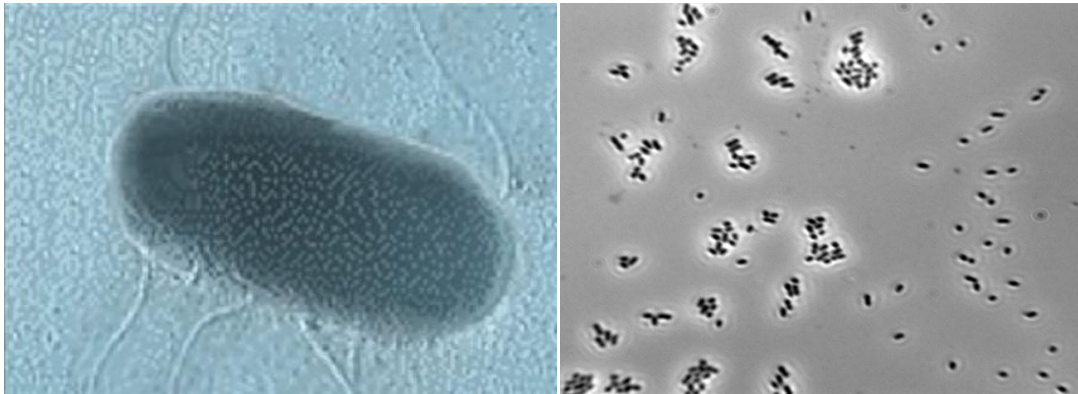
Μια επιπλέον σημαντική ικανότητα των βακτηρίων αυτών είναι η δυνατότητα σύνθεσης κυτταρίνης. Η κυτταρίνη αυτή είναι καθαρή, δεν είναι αναμεμιγμένη με άλλα πολυμερή και σχηματίζεται ως μάζα έξω από το κυτταρικό τοίχωμα, με αποτέλεσμα τα βακτήρια να είναι ενσωματωμένα σε ένα στρώμα ακανόνιστα διατεταγμένων μικροινιδίων κυτταρίνης (Madigan και συνεργάτες, 2005).

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων οξικού οξέος χρησιμοποιούνται για την εμπορική παραγωγή ξιδιού, απαντώνται συχνά σε αλκοολούχους χυμούς και μπορούν να απομονωθούν από τη μύρα και τον μηλίτη οίνο.

#### **1.1.3.3.1 *Acetobacter malorum***

Υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο, με αποικίες υπόλευκου χρώματος και στρογγυλού σχήματος και διαμέτρου 0.5 mm (Εικόνα 1.12), είναι συχνά ανιχνεύσιμο σε αλκοολούχα ποτά, στο ξίδι, στον χυμό μήλου, το κακάο, σε διάφορα φυτά, φρούτα, καθώς και στο έδαφος ([www.terpconnect.umd.edu/.../data.html](http://www.terpconnect.umd.edu/.../data.html)).

Χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να μετατρέπει την αιθανόλη σε οξικό οξύ παρουσία οξυγόνου. Υπάρχουν και άλλα είδη στο γένος αυτό αλλά και διάφορα βακτήρια που έχουν την δυνατότητα να παράγουν οξικό οξύ κάτω από ποικίλες συνθήκες, το *Acetobacter* είναι όμως πιο γνωστό για αυτήν τη χαρακτηριστική του ικανότητα (<http://en.goldenmap.com/Acetobacter>).



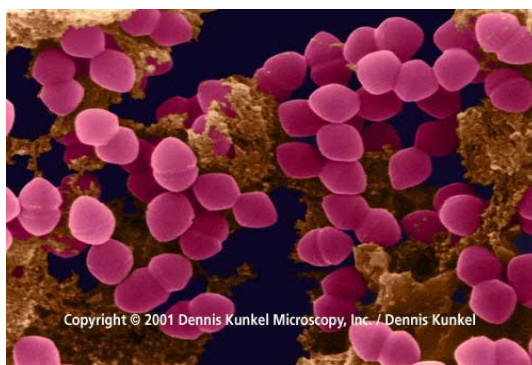
**Εικόνα 1.12** *Acetobacter malorum* (<http://en.goldenmap.com/Acetobacter>), (<http://enologyaccess.org/EA2/images/stories/Microbes/a.malorum40xps.jpg>)

Ο De Vuyst και οι συνεργάτες το 2008, ήταν οι πρώτοι επιστήμονες, που ανίχνευσαν το *Acetobacter malorum*, σε ετήσια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Βέλγιο όπου εξετάστηκαν 39 δείγματα προζυμιού από 11 φούρνους της πόλης.

#### **1.1.3.4 Άλλα βακτήρια που ανιχνεύονται στο προζύμι**

Σε δείγματα προζυμιού εκτός από τα είδη των γενών *Lactobacillus* και *Acetobacter* στο ανιχνεύονται και μικροοργανισμοί που δεν είναι αναμενόμενη η απομόνωσή τους, όπως για παράδειγμα ο μικροοργανισμός *Enterococcus faecium* (Εικόνα 1.13), ο οποίος είναι παθογόνος σε κάποιες περιπτώσεις. Το 2005 σε έρευνα των Kitahara και συνεργάτες, κατά την επεξεργασία δειγμάτων προζυμιού διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, παρατηρήθηκε συχνή ανίχνευση του στελέχους *Enterococcus faecium*.

Η ύπαρξή του σε δείγματα προζυμιού, επιβεβαιώνει ότι οι εντερόκοκκοι προέρχονται είτε από το έδαφος είτε από το νερό, είτε πιθανότατα από το αλεύρι. Ανιχνεύεται κυρίως στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και προσφέρει γρήγορη μείωση του pH. Σε μία πρόσφατη έρευνα, του Foulquié και συνεργάτες (2006), αναφέρεται ότι σε πολλές χώρες οι εντερόκοκκοι χρησιμοποιούνται σε διάφορα τρόφιμα ως προβιοτικά.



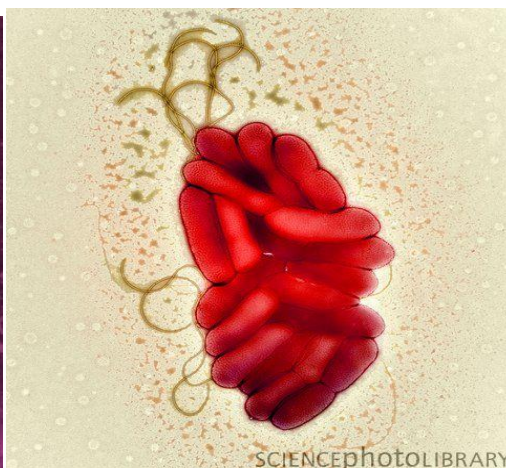
**Εικόνα 1.13** Φωτογραφία (μεγέθυνσης x3,585), του Gram (+) κόκκου *Enterococcus faecium* από μικροσκόπιο. ([www.denniskunkel.com/images/StockImages/Images\\_01/96453B.jpg](http://www.denniskunkel.com/images/StockImages/Images_01/96453B.jpg)).

Το στέλεχος *Stenotrophomonas maltophilia* (Εικόνα 1.14), είναι ένας ακόμα μη αναμενόμενος αερόβιος αρνητικός κατά Gram βάκιλος ο οποίος αναπτύσσεται στους 30 °C και έχει απομονωθεί από πολλά και διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το νερό, τα φυτά, καθώς και σε κατεψυγμένα προϊόντα ακόμη και στο γάλα (Hsiao-Chuan και συνεργάτες, 2005).

α)



β)



**Εικόνα 1.14:** Απεικόνιση του αρνητικού κατά Gram βάκιλου, *Stenotrophomonas maltophilia*, στο μικροσκόπιο (μεγέθυνσης: α) x20,500, β) x9000, ([www.sciencephoto.com/image/81847/large/C0017446S.maltophilia\\_bacteria\\_TEM-SPL.jpg](http://www.sciencephoto.com/image/81847/large/C0017446S.maltophilia_bacteria_TEM-SPL.jpg))

Παραθέτοντας κάποια στοιχεία από έρευνες του Scheirlinck και των συνεργατών του (2007), χρονικά μπορεί να προσδιοριστεί η παρουσία των διαφόρων στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση.

✓ Μετά την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης ανιχνεύονται κυρίως είδη που ανήκουν είτε στο γένος *Enterococcus* είτε *Lactococcus* και που φυσιολογικά δεν θα έπρεπε να ανιχνεύονται στο προζύμι. Ο πληθυσμός τους μειώνεται σημαντικά την επόμενη ημέρα. Η εξαφάνισή τους οφείλεται στη ζύμωση, κατά την οποία παράγεται γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα τη μείωσή τους καθώς δυσκολεύονται να προσαρμοστούν σε ένα τόσο όξινο περιβάλλον.

✓ Κατά την 2<sup>η</sup> έως και 4<sup>η</sup> ημέρα ανιχνεύονται είδη των γενών *Lactobacillus* ή *Leuconostoc*, *Pediococcus* ή *Weissella*.

✓ Την 5<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούνται μόνο μικρές αλλαγές στον μικροβιακό πληθυσμό οδηγώντας έτσι σε ένα σταθερό σύστημα προζυμιού.

### **1.1.3.5 Αλληλεπιδράσεις βακτηρίων και ζυμομυκήτων στο προζύμι**

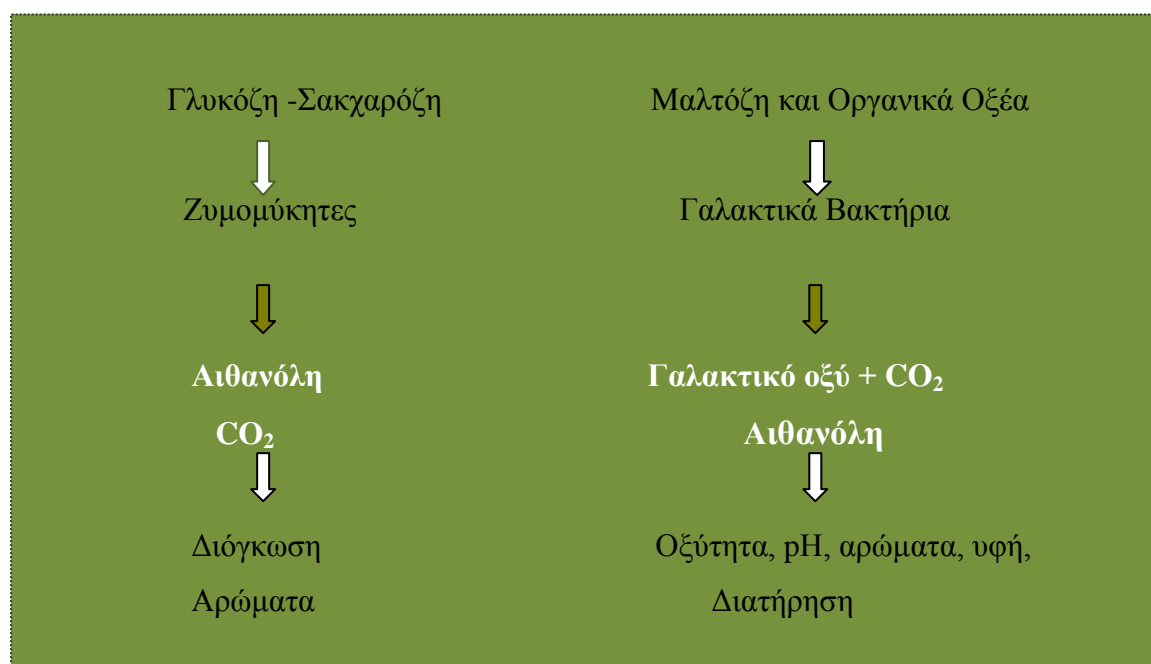
Βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση της σταθερότητας στη σχέση μεταξύ ζυμομυκήτων και LAB βακτηρίων, κατά την πορεία της ζύμωσης, είναι η έλλειψη ανταγωνισμού για τη βασική πηγή άνθρακα μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών (Gobbetti, 1998). Τα βακτήρια δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, παράγοντας οξέα (γαλακτικό και οξικό οξύ), με αποτέλεσμα τη μείωση του pH και τη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος (Vollmar και Meuser, 1992).

Οι συγκεκριμένες ομάδες των LAB βακτηρίων ευθύνονται για την παραγωγή αιθανόλης, διαφόρων αρωματικών ενώσεων, βακτηριοσινών, εξωπολυσακχαριτών και ενζύμων (De Vuyst και συνεργάτες, 2008). Διασπών σάκχαρα όπως η μαλτόζη σε απλούστερα για να δώσουν τροφή στους ζυμομυκήτες. Η πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα ζυμομυκήτων επάγει τη διάχυση των αμινοξέων από το εσωτερικό των κυττάρων προς το εξωτερικό περιβάλλον αφού η κυτταρική μεμβράνη γίνεται περισσότερο διαπερατή σε μακρομόρια και αυτό διευκολύνει τη θρέψη και ανάπτυξη των κυττάρων των λακτοβακίλλων ακόμη και σε θρεπτικό υπόστρωμα ελλιπές σε απαραίτητα αμινοξέα (βαλίνη και ισολευκίνη) (Ganzle και συνεργάτες, 2002).

Από την άλλη πλευρά, η ικανότητα πρωτεόλυσης των LAB βακτηρίων οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των αλειφατικών, δικαρβοξυλικών και υδρόξυ-αμινοξέων τα οποία ενεργοποιούν την ανάπτυξή τους και συγχρόνως χρησιμοποιούνται από τους ζυμομύκητες (Gobbetti, 1998). Οι ζυμομύκητες τρέφονται με απλά σάκχαρα τα οποία μετατρέπουν σε αλκοόλη και οξικό οξύ (Ganzle και συνεργάτες, 1996).

Η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα από τις ζύμες και τους λακτοβάκιλους, υπολογίζεται, με βάση τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης, του γαλακτικού και του οξικού οξέος. Πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα παίζει η συγκέντρωση των κυττάρων ζύμης καθώς και το είδος της ζύμης (Ganzle και συνεργάτες, 2004).

Στην Εικόνα 1.15, παρουσιάζεται η συμβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμομυκήτων στο προζύμι, με αποτέλεσμα να προσδίδουν χαρακτηριστική γεύση, ιδιαίτερο άρωμα, υφή, και οξύτητα.



**Εικόνα 1.15:** Σχηματική απεικόνιση των ενώσεων που παράγονται κατά την αρτοποιήση και οι επιπτώσεις τους στο ψωμί (Hui και συνεργάτες, 2006).

Αναλυτικά κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, παρατηρείται αύξηση των LAB βακτηρίων από το πρώτο κιάλας 12ωρο ( $10^8$ - $10^9$  cfu/g) ενώ η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων καθυστερεί αρκετά 24ωρα μετά ( $10^7$  cfu/g) (Scheirlinck και συνεργάτες, 2007).

Η ξινή γεύση που έχει ένα προϊόν με προζύμι, προέρχεται από την παραγωγή του γαλακτικού και οξικού οξέος. Υπάρχουν όμως πολλοί τρόποι για να αυξηθεί η οξύτητα, όπως για παράδειγμα να παραταθεί ο χρόνος της ζύμωσης είτε να αυξηθεί η θερμοκρασία ([www.egullet.com/imgs/egci/sourdough/science.html](http://www.egullet.com/imgs/egci/sourdough/science.html)).

Η γεύση του προϊόντος δεν επηρεάζεται όμως από τους ζυμομύκητες εκτός και αν η ποσότητά τους είναι μεγαλύτερη από το 2,5 % του ξηρού βάρους του προζυμιού. Στην περίπτωση αυτή, η γεύση γίνεται πιο όξινη (Calvel και συνεργάτες, 2001, Cauvain, 2003β).

Σε μελέτες του Gobbetti και συνεργάτες (1994) σε μεικτές καλλιέργειες, παρατηρήθηκε πως κατά τη συμβίωση των LAB βακτηρίων και του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*, υπήρξε μείωση της ανάπτυξης των LAB βακτηρίων καθώς και μείωση στην παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ταχείας κατανάλωσης της μαλτόζης και της γλυκόζης από τα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* που αναπτύσσονται μαζί με βακτήρια *Lactobacillus sanfranciscensis* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει αυτές τις πηγές άνθρακα.

Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης, στην οποία παρατηρήθηκε ότι σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας, η συνύπαρξη του *Lactobacillus sanfranciscensis* και *Saccharomyces cerevisiae* (Ganzle και συνεργάτες, 1996) ήταν απαραίτητη, για την παραγωγή οξικού οξέος αφού η αντικατάσταση των ζωντανών κυττάρων ζύμης με εκχύλισμα ζύμης δεν οδήγησε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα παίζουν τόσο οι ζυμομύκητες όσο και τα LAB βακτήρια και η συνεισφορά της κάθε ομάδας μικροοργανισμών στον όγκο του προζυμιού διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αρχικής καλλιέργειας και της τεχνολογίας που εφαρμόζεται κάθε φορά (Arendt και συνεργάτες, 2007).

Έχει βρεθεί μάλιστα, πως ο χρόνος που απαιτείται για να προσεγγιστεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα σε μεικτή καλλιέργεια *Lactobacillus sanfranciscensis* και *Saccharomyces cerevisiae* είναι ίσος με το ένα τρίτο του χρόνου εκείνου που απαιτείται όταν ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* έχει καλλιεργηθεί σε καθαρή καλλιέργεια (Gobbetti, 1998).

Το σημαντικότερο όλων είναι, ότι παρά τις απαιτήσεις και τις μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των LAB βακτηρίων και των ζυμομυκήτων, επιτυγχάνεται μια σταθερή συνύπαρξη στο προζύμι, όπου οι ζυμομύκητες προσφέρουν τη φρουκτόζη που χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων από τους λακτοβάκιλλους για να αυξήσουν την ενεργειακή τους απόδοση. Η πρακτική επίδραση αυτών των αντιδράσεων φαίνεται στην αλλαγή της αναλογίας μεταξύ γαλακτικού και οξικού οξέος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται όλη τη διαδικασία παρασκευής του προζυμιού (Vogel και συνεργάτες, 1999).

#### **1.1.4 Προζύμι και Αρτοποιήση**

##### **1.1.4.1 Αρτοποιήση με βάση το προζύμι**

Η αρτοποιήση μπορεί να γίνει με βάση το σιτάρι και τη σίκαλη. Στην πρώτη περίπτωση η καλλιέργεια του μικροβιακού πληθυσμού του προζυμιού προσανατολίζεται στην ανάπτυξη κυρίως των ζυμομυκήτων παρουσία πάντα κάποιων πληθυσμών λακτοβακίλων και επικεντρώνεται περισσότερο στη διόγκωση του ζυμαριού αλλά και στην ανάπτυξη διαφόρων αρωμάτων τα οποία σχετίζονται άμεσα με την οξύτητα του μίγματος (Γαλλία, Ισπανία, Ελλάδα και Κίνα).

Ο τρόπος αρτοποιήσης με βάση τη σίκαλη αποδίδει ένα προζύμι με δυνατή οξύτητα. Επομένως, η καλλιέργεια προσανατολίζεται περισσότερο στην ανάπτυξη των λακτοβακίλων σε σχέση με τους ζυμομύκητες (Γερμανία, Ουκρανία, Πολωνία, Ρωσία) (Παπαεμαννουηλ, 2005).

**Πίνακας 1.5:** Ποικιλότητα γαλακτικών βακτηρίων σε προζύμι διαφορετικής προέλευσης  
Τελική Έκθεση Προόδου (2007).

Χώρα	Προϊόν	Γαλακτικά βακτήρια (LAB)	Βιβλιογραφικές αναφορές
Γαλλία	Άρτος σιταριού	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Infantes and Tourneur, (1991)
Γερμανία	Προζύμι σιταριού	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i>	Spicher, (1959)
«	Προζύμι σιταριού	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>Weissella viridescens</i>	Spicher (1987)
«	Άρτος σίκαλης	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i>	Spicher and Schröder (1978), Spicher και συνεργάτες (1979)
«	Προζύμι σίκαλης	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	Spicher (1984)
«	Προζύμι σίκαλης	<i>L. amylovorus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. reuteri</i>	Müller και συνεργάτες, (2001)
«	Δημητριακά σίκαλης	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i>	Meroth και συνεργάτες, (2003)
Δανία	Προζύμι σίκαλης	<i>L. reuteri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. amylovorus</i>	Rosenquist and Hansen, (2000)



(Συνέχεια Πίνακα 1.5)

Ελλάδα	Προζύμι σιταριού	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>W. cibaria</i>	De Vuyst και συνεργάτες, (2002)
ΗΠΑ	Προζύμι San Francisco, Γαλλικός άρτος	<i>L. sanfranciscensis</i>	Kline and Sugihara, (1971)
Ιράν	Sangak	<i>L. plantarum</i> , <i>L. Brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>P. Cerevisiae</i>	Azar και συνεργάτες, (1977)
Ισπανία	Προζύμι σιταριού	<i>L. brevis</i> , <i>L. Plantarum</i>	Barber και συνεργάτες, (1983)
«	Προζύμι σιταριού	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Barber and Báguena (1988), (1989)
Ιταλία	Προζύμι σιταριού	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i>	Gobbetti και συνεργάτες, (1994)
«	Panettone	<i>L. brevis</i> , <i>L. Plantarum</i>	Galli and Ottogalli (1973)
«	Panettone, Brioche	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Galli <i>et al.</i> (1988)
«	Pizza (Naples)	<i>L. sakei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Coppola <i>et al.</i> (1996)
«	Προζύμι Verona	<i>L. sanfranciscensis</i>	Zapparoli <i>et al.</i> (1996), Zapparoli <i>et al.</i> (1998)
«	Lombardian mother sponges	<i>L. sanfranciscensis</i>	Foschino <i>et al.</i> (1999)
«	Apulian (προζύμι σιταριού)	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Leuconostoc citreum</i>	Corsetti <i>et al.</i> (2001)

(Συνέχεια Πίνακα 1.5)

Μαρόκο	Προζύμι starter sponges	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Boraam <i>et al.</i> (1993)
«	Αλεύρι σιταριού	<i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Faid <i>et al.</i> (1994)
Μεξικό	Pozol (ρύζι)	<i>L. lactis</i> , <i>L. suis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. Delbrueckii</i>	Escalante <i>et al.</i> (2001)
Πορτογαλία	Broa	<i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. equinus</i>	Rocha and Malcata, (1999)
Ρωσία	Προζύμι σίκαλης	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i>	Kazanskaya <i>et al.</i> (1983)
Σουδάν	Kisra (προζύμι σόργου)	<i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. amylovorus</i>	Hamad <i>et al.</i> (1992)
«	Kisra	<i>L. lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>E. Faecalis</i>	Hamad <i>et al.</i> (1997)
Σουηδία	Σιτάρι, σίκαλη	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>W. Viridescens</i>	Spicher and Lönner, (1985)
«	Προζύμι σίκαλης	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>P. Pentosaceus</i>	Lönner <i>et al.</i> (1986)
Φιλανδία	Προζύμι σίκαλης	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	Salovaara and Katunpää, (1984)

#### 1.1.4.2 Τύποι προζυμιού

Σύμφωνα με τους Bocker και συνεργάτες (1995), τα διάφορα είδη προζυμιού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις διαφορετικούς τύπους:

**Τύπος I:** Η παρασκευή προζυμιού γίνεται με την παραδοσιακή μέθοδο σύμφωνα με την οποία πρώτα παρασκευάζεται το προζύμι, ως μια συνεχής διαδικασία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C έως 30 °C) και στη συνέχεια αυτό προστίθεται στα υπόλοιπα συστατικά ανάμιξης για την παρασκευή του ψωμιού ή οποιουδήποτε αρτοπαρασκευάσματος (De Vuyst και συνεργάτες, 2002). Με αυτόν τον τρόπο διατηρούνται οι μικροοργανισμοί σε μια ενεργή μεταβολική κατάσταση (Sadeghi, 2008). Σε αυτόν τον τύπο προζυμιού ανήκουν όλα τα είδη των ελληνικών παραδοσιακών προζυμιών.

Κατά τη διαδικασία ζύμωσης, ανιχνεύονται συνήθως στελέχη λακτόβακιλλων (Πίνακας 1.6), με κυρίαρχο στέλεχος το *L. sanfranciscensis*, ενώ αρκετά συχνά απομονώνονται στελέχη όπως *L. brevis*, *L. pontis*, *L. plantarum*. Έχουν επίσης απομονωθεί στελέχη *L. hammesii*, *L. rossii* και *L. mindensis* (Arendt και συνεργάτες, 2007).

**Τύπος II:** Στον συγκεκριμένο τύπο προζυμιού, γίνεται προσθήκη ζυμομυκήτων μέσα στο ζυμάρι. Είναι μια λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία που διαρκεί 2-5 ημέρες κατά την οποία πραγματοποιείται ζύμωση σε ένα μόνο στάδιο σε θερμοκρασία >30 °C. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία (Vogel και συνεργάτες, 1999).

Τα στελέχη που κυριαρχούν σε αυτόν τον τύπο προζυμιού (Πίνακας 1.6) είναι *Lactobacillus panis* και *Lactobacillus pontis* ενώ συχνά απομονώνονται *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*. Σπάνια έχουν βρεθεί στελέχη όπως *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus amylovorus*, και *Lactobacillus frumenti* (Arendt και συνεργάτες, 2007).

**Πίνακας 1.6.** Λακτοβάκιλοι που κυριαρχούν στους Τύπους I και II προζυμιού (Arendt και συνεργάτες, 2007)

<b>ΤΥΠΟΣ I</b>	<b>ΤΥΠΟΣ II</b>
<b>Κυρίαρχα στελέχη</b>	<b>Κυρίαρχα στελέχη</b>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus panis, Lactobacillus pontis</i>
<b>Συχνά απομονωθέντα στελέχη</b>	<b>Συχνά απομονωθέντα στελέχη</b>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lactobacillus pontis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus plantarum,</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lactobacillus spicheri</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Weissella confusa</i>	
<b>Άλλα είδη που έχουν ανιχνευθεί</b>	<b>Άλλα είδη που έχουν ανιχνευθεί</b>
<i>Lactobacillus rossii</i>	<i>Lactobacillus amilovorans</i>
<i>Lactobacillus mindensis</i>	<i>Lactobacillus frumenti</i>
<i>Lactobacillus hammesii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus nantensis</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>
<i>Pediococcus spp.</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Weissella cibaria</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

**Τύπος III:** Ο τρίτος τύπος αφορά στην παρασκευή του προζυμιού από λυοφυλιωμένη ζύμη, η οποία παρασκευάζεται από παραδοσιακό προζύμι, το οποίο έχει υποστεί ξήρανση με εξάτμιση του νερού. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για ενίσχυση του αρώματος στο τελικό προϊόν (De Vuyst και συνεργάτες, 2002).

#### **1.1.4.3 Διαδικασία και συνθήκες παραγωγής προζυμιού**

Τα συστατικά κατά προσέγγιση μιας τυπικής συνταγής προζυμιού σε ποσοστά του συνολικού ξηρού βάρους, είναι: 60 % αλεύρι, 38 % νερό, 1,1 % αλάτι και 1,1 % ζυμομύκητες. Τα συστατικά αυτά, αναμιγνύονται σε μία σειρά μεγάλων δοχείων και κατά τη διάρκεια της ανάμιξής τους, το μίγμα αερίζεται και εμπλουτίζεται με ένα θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει σάκχαρα, άλατα και βιταμίνες και παρέχεται είτε συνεχώς είτε κατά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Είναι επίσης γνωστό ότι, το μικροβιακό φορτίο των περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως το προζύμι που συντηρείται παραδοσιακά σε χώρους μη ασηπτικούς, μεταβάλλεται γιατί οι φυσικοχημικές παράμετροι που επιδρούν είναι ποικίλες και όχι απαραίτητα σταθερές (π.χ. σύσταση νερού, αλεύρου, ο ανθρώπινος παράγοντας κ.λ.π.).

Σημαντικό ρόλο παίζει και ο χώρος, ο οποίος θα πρέπει να είναι ζεστός και υγρός για να αρχίσει η αλκοολική ζύμωση απ' όπου παράγεται το διοξείδιο του άνθρακα με αποτέλεσμα τη διόγκωση του ψωμιού. Από αυτό το διογκωμένο ζυμάρι αρκεί να φυλαχθούν 500 γραμμάρια, στα οποία θα προστεθούν πολλές φορές αλεύρι και νερό καταλήγοντας μετά από 48 ώρες σε μια ελαφρώς όξινη ζύμωση και στη δημιουργία φυσικού προζυμιού (Παπαεμμανουήλ, 2005).

Στην Εικόνα 1.16 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα μέρα προς μέρα, της παρασκευής του ζυμαριού προσθέτοντας καθημερινά λίγο χλιαρό νερό και ελάχιστο αλεύρι. Η φύλαξη διαρκεί 5 μέρες και γίνεται σε σκεπασμένο μπολ σε θερμοκρασία δωματίου ([www.breadcetera.com](http://www.breadcetera.com)).

1<sup>η</sup> Ημέρα



Τέλος 1<sup>ης</sup> Ημέρας



Τέλος 2<sup>ης</sup> Ημέρας



Τέλος της 5<sup>ης</sup> ημέρας



Ενεργός μεταλευτής Starter



**Εικόνα 1.16:** Διαδικασία παραγωγής προζυμιού. 1) 1<sup>η</sup> Ημέρα, αναμειγνύονται 100 g αλεύρι και 100 g νερό βρύσης και το μείγμα διατηρείται για 24 ώρες σκεπασμένο σε θερμοκρασία 27 °C 2) μετά τις πρώτες 24 ώρες ανιχνεύονται βακτήρια του γένους *Leuconostoc*, τα οποία εντοπίζονται από τη δυσάρεστη μυρωδιά τους, και τα οποία αργότερα πεθαίνουν λόγω του όξινου περιβάλλοντος, 3) την 2<sup>η</sup> καθώς και την 3<sup>η</sup> ημέρα γίνεται απόρριψη ενός μέρους του πληθυσμού που έχει αναπτυχθεί και προσθέτονται 50 g αλεύρι και 50 g νερό και διατηρείται στην ίδια θερμοκρασία. Μετά την 3<sup>η</sup> ημέρα δεν παρατηρείται αύξηση του όγκου αλλά ανιχνεύονται τα επιθυμητά βακτήρια και οι ζυμομύκητες, καθώς παρατηρούνται οι πρώτες φυσαλίδες. 4) μετά το τέλος της 5<sup>ης</sup> ημέρας συνεχίζεται η απόρριψη και η προσθήκη νερού και αλεύρου ανά 12 ώρες, 5) μετά το 12ωρό έχει πλέον επιτευχθεί η δημιουργία του προζυμιού. ([www.breadcetera.com](http://www.breadcetera.com)), (<http://www.wildyeastblog.com/2007/07/13/raising-a-starter>)

### 1.1.5 Διατήρηση προϊόντων ζύμης

Είναι ευρέως γνωστό, πως τα προϊόντα άρτου έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής και η περίοδος αυτή εκτείνεται από τη στιγμή της παρασκευής τους έως και την ημερομηνία κατανάλωσής τους (Arendt και συνεργάτες, 2007).

#### A) ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Ο άρτος και τα προϊόντα της αρτοποιίας είναι δυνατόν να επιμολυνθούν τόσο από βιολογικούς κινδύνους (από επιμόλυνση των προϊόντων) όσο από φυσικούς κινδύνους (από χρήση χημικών προσθέτων).

- Κίνδυνοι από βιολογικά αίτια

Οι βιολογικοί κίνδυνοι δε γίνονται εύκολα αντιληπτοί για αυτό απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή καθώς είναι υπεύθυνοι για δηλητηριάσεις κυρίως σε άτομα ευάλωτα σε μικροοργανισμούς (παιδιά, έγκυες, ηλικιωμένοι) (Χαχλιούτης, 2009). Οι βιολογικοί κίνδυνοι που παρατηρούνται στα τρόφιμα ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

- Παράσιτα - Πρωτόζωα
- Ιοί
- Βακτήρια
- Ζύμες
- Μύκητες

Τρόποι εξάλειψης των μικροβιολογικών κινδύνων είναι:

- Χρήση γαντιών μιας χρήσης.
- Σωστή θερμική επεξεργασία των παρασκευών για την καταστροφή τους.
- Με εφαρμογή κανόνων υγιεινής που επιβάλλουν οι διάφοροι κανόνες υγιεινής.
- Διατήρηση των τροφίμων σε αεροστεγής δοχεία και με κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας.
- Απολύμανση των επιφανειών εργασίας πριν και μετά το πέρας μιας εργασίας.

Όσον αφορά τις μολύνσεις από μύκητες, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή, αλλά προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Η ύπαρξη μυκήτων στην αρτοποιία σχετίζεται με την επιμόλυνση των προϊόντων, μετά το ψήσιμο, διότι τα σπόρια τους επιζούν των θερμοκρασιών ψησίματος. Επίσης οφείλεται σε επιμολύνσεις από σπόρια των μυκήτων τα οποία προέρχονται από την ατμόσφαιρα, τις επιφάνειες εργασίας, τον εξοπλισμό και το προσωπικό.

Οι πιο γνωστοί στην Αρτοποιία μύκητες είναι:

1. *Aspergillus fumigates* (άσπρη μούχλα)
2. *Aspergillus niger* (μαύρη μούχλα)
3. *Rhizopus nigricans* (μαύρη μούχλα)
4. *Penicillium stdniferum* (πράσινη μούχλα)

Τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για πολλές τροφικές μολύνσεις και τροφικές δηλητηριάσεις και δεν διακρίνονται με γυμνό μάτι. Στην αρτοποιία οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν αναφερθεί είναι δύο. Ο *Staphylococcus aureus* στα προϊόντα που περιέχουν γέμιση, λόγω της ιδανικής υγρασίας για την παραγωγή τοξίνης και σε ορισμένες περιπτώσεις η *Salmonella* η οποία οφείλεται στις πρώτες ύλες, στους χειρισμούς του προσωπικού στο νερό και στο περιβάλλον.

Πολλά βακτήρια του γένους *Bacillus cereus* είναι υπεύθυνα για αλλοιώσεις που προκαλούν την <σχοινώδη> αλλοίωση του ψωμιού. Ειδικότερα ο εξοπλισμός κατά την προετοιμασία της ζύμης, οι μεταφορικές ταινίες και οι μηχανές τεμαχισμού των προϊόντων μετά το ψήσιμο αποτελούν σοβαρές πηγές μόλυνσης.

Οι ζύμες αποτελούν μικρό τμήμα του αρχικού τους μικροβιακού φορτίου, αναπτύσσονται αργά σε σχέση με τα βακτήρια και η ανάπτυξή τους αναστέλλεται σε ορισμένες περιπτώσεις από τα προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων. Κατά την ανάπτυξή τους στα τρόφιμα εκδηλώνονται με παρουσία γλοιωδών μεμβρανών, θολερότητα ιζημάτων, με την ανάπτυξη ανώμαλων οσμών και γεύσεων, καθώς και με τη μεταβολή της οξύτητας των τροφίμων επειδή αποδομούνται τα οργανικά οξέα.



- Κίνδυνοι από φυσικά αίτια

Κίνδυνοι από οποιοδήποτε ξένο σώμα που δε βρίσκεται υπό φυσιολογικές συνθήκες μέσα στο τρόφιμο, όπως γυαλί, έντομα, πλαστικά, μέταλλα, κόκαλα, πέτρες, ξύλο.

- Κίνδυνοι από χημικά αίτια

Η μόλυνση στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας (χρωστικές, συντηρητικά, αντιοξειδωτικά κ.α.) καθιστώντας το τρόφιμο ακατάλληλο για κατανάλωση. Έχουν θεσπιστεί ανώτατα επιτρεπτά όρια για την ποσότητα συγκέντρωσης, ενώ σε άλλα τρόφιμα απαγορεύεται ακόμα και η ύπαρξή τους (Χαχλιούτης, 2009).

## B) ANTIMETΩΠΙΣΗ

Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι, ενώ τα προϊόντα ζύμης δημιουργούνται από μικροοργανισμούς, χαλάνε και από μικροοργανισμούς. Ένα από τα βασικότερα θέματα στον τομέα της παρασκευής προϊόντων ζύμης είναι η δυνατότητα επέκτασης της «ζωής» τους.

Έχει βρεθεί ότι, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην παράταση της διάρκειας ζωής των αρτοπαρασκευασμάτων όπως για παράδειγμα η υψηλή ικανότητα αλληλεπίδρασης του νερού με το αλεύρι, επιπλέον ο μεγάλος όγκος του εκάστοτε προϊόντος ή και ακόμα η δυνατότητα αποφυγής μιας τυχόν μικροβιακής μόλυνσης παίζουν ξεχωριστό ρόλο για τη διατήρηση των προϊόντων αυτών (Sadeghi, 2008).

Μια σημαντική αλλοίωση της ποιότητας του ψωμιού είναι η ανάπτυξη της μούχλας η οποία εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο και προέρχεται από τη δράση των μυκήτων οι οποίοι σχηματίζουν άσπρες, μαύρες, πράσινες και κόκκινες κηλίδες ανάλογα με το γένος. Στο ψωμί αναπτύσσονται μύκητες οι οποίοι βρίσκονται στο έδαφος και στο σπόρο του σιταριού και μεταφέρονται στο προϊόν (Χαχλιούτης, 2009). Η αφορμή ανάπτυξης των μυκήτων στα προϊόντα ζύμης (Εικόνα 1.10), δεν είναι άλλη από τις πολύ χαμηλές τιμές pH που αναγκαστικά έχει το ίδιο το προϊόν (Cauvain, 2003α). Ένας καλός τρόπος αντιμετώπισής τους είναι η ψύξη των

προϊόντων αμέσως μετά το ψήσιμο απομακρύνοντας τους ατμούς από γύρω τους και την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία χώρου γύρω στους 15-20 °C, σε καλά αεριζόμενους χώρους.



**Εικόνα 1.10:** Αλλοιώσεις προϊόντων ζύμης κυρίως από μύκητες ([www.endiaferonta.com/wp-content/uploads/2009/anti-theft-sandwich.com](http://www.endiaferonta.com/wp-content/uploads/2009/anti-theft-sandwich.com))

Η σχοινίαση είναι μια από τις σοβαρότερες αλλοιώσεις του ψωμιού και όχι μόνο, και οφείλεται συνήθως στο στέλεχος *Bacillus sp.*, το οποίο προκαλεί δυσάρεστη οσμή και μια κολλώδης μαλακή ψίχα, ενώ εξωτερικά το ψωμί μοιάζει να μην έχει υποστεί κάποια αλλοίωση (Χαχλιούτης, 2009).

Αποτελεσματικό μέσο για να περιοριστεί η βλαστική του ικανότητα καθώς και η ανάπτυξη άλλων βακτηρίων και μυκήτων, είναι η αύξηση της οξύτητας, η οποία δημιουργεί δυσμενές περιβάλλον για την επιβίωση των ενδοσπορίων τους. Η οξύτητα μπορεί να αυξηθεί είτε με την προσθήκη μέσου οξίνισης κατά τη ζύμωση (Μεταξόπουλος και συνεργάτες, 2003) είτε μέσω της αντιμικροβιακής δράσης του ίδιου προζυμίου που προκύπτει από το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα, την αιθανόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου που ούτως ή άλλως παράγονται. Η δράση τους όμως αυτή, είναι λιγότερο αποτελεσματική, γι αυτό το λόγο συνιστάται η προσθήκη προπιονικού και οξικού οξέος (Cauvain, 2003α).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αντιμικροβιακές ενώσεις, βακτηριοσίνες, (χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια και πρωτεΐνες με βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό τρόπο δράσης) (Μεταξόπουλος και συνεργάτες, 2003), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη βλαστική ικανότητα και την ανάπτυξη του γένους *Bacillus*, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό πλεονέκτημα των LAB στην διατήρηση των προϊόντων ζύμης (Weckx και συνεργάτες, 2009).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι λακτοβάκιλοι συμβάλλουν στη διατήρηση των προϊόντων ζύμης, παράγοντας μεταβολίτες (οργανικά οξέα, εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και ένζυμα), για τους οποίους έχει αποδειχθεί ότι, έχουν θετικά αποτελέσματα στην υφή και στη διατήρηση αυτών των προϊόντων. Η ικανότητά τους αυτή, θεωρείται εξέχουσας σημασίας, καθώς με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η χρήση πρόσθετων ουσιών στα προϊόντα ζύμης, με αποτέλεσμα τα τρόφιμα να είναι περισσότερο υγιή (Lacaze και συνεργάτες, 2007).

Σε μελέτες είχε αναφερθεί πως η προσθήκη πρωτεασών στο ζυμάρι καθώς και οι όξινες συνθήκες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παράταση της ζωής τέτοιων προϊόντων (Arendt και συνεργάτες, 2007). Άλλες ουσίες που συμβάλλουν στη διατήρηση αυτών των προϊόντων, είναι τα λιπαρά οξέα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου κ.α.

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με αυτό το ζήτημα, όπως για παράδειγμα οι Katina, (2005) και Corsetti και Settanni (2007) μελέτησαν τις επιπτώσεις που έχει η χρήση προζυμιού στη διάρκεια ζωής του ψωμιού και παρατήρησαν σαφή παράταση της διάρκειας ζωής του σε σχέση με ένα άλλο ψωμί που παρασκευάζεται χωρίς προζύμι.

Ο Arendt και οι συνεργάτες (2007), παρατήρησαν βελτίωση της διατήρησης του ψωμιού όταν κατά τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Lactobacillus plantarum*. Σε προζύμια και ψωμιά που παράγονται με αυτό το στέλεχος, παρατηρήθηκε επιβράδυνση της ανάπτυξης του μύκητα στον οποίο οφείλονται οι αλλοιώσεις. Επιπροσθέτως αυτό το στέλεχος λακτοβάκιλου χρησιμοποιείται σε διάφορα τρόφιμα, ως το ασφαλέστερο στέλεχος καθώς παράγει μεγάλα ποσά εξωπολυσακχαριτών (EPS) που συμβάλλουν στη διατήρηση πολλών προϊόντων ζύμης (Zotta και συνεργάτες, 2008).

Συμπερασματικά το πρόβλημα της διάρκειας ζωής των προϊόντων ζύμης απασχολεί τη βιομηχανία, γιατί με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών LAB παρεμποδίζεται μεν η ανάπτυξη μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα τρόφιμα από την άλλη δε, οι παράγοντες που επιδρούν σε όλη αυτή τη διαδικασία είναι άπειροι προστιθέμενων και εκείνων που σχετίζονται άμεσα με τις φυσικές αλλαγές που συμβαίνουν στο άμυλο και στις πρωτεΐνες (Cauvain, 2003a).

### 1.1.6 Το μέλλον των αρτοπαρασκευασμάτων και εφαρμογές

Το προζύμι, καθώς και όλα τα προϊόντα ζύμης έχουν μεγάλη ιστορία και αναμφισβήτητο μέλλον. Με το πέρασμα των χρόνων δόθηκαν μεγαλύτερες ευκαιρίες στους καταναλωτές να δοκιμάσουν σε μεγαλύτερο εύρος τροφικές εμπειρίες και με αυτόν τον τρόπο αυξήθηκαν κατά πολύ οι γευστικές απαιτήσεις τους, πράγμα που ώθησε την αγορά σε νέα βελτιωμένα προϊόντα ζύμης.

Ακόμη και με μία ίδια συνταγή μπορεί να παρασκευαστεί προζύμι με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αυτό εξαρτάται από τις φυσικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) κάτω από τις οποίες παράγεται αλλά και από τον τρόπο που ζυμώνεται ή ψήνεται. Σημαντικό ρόλο παίζει και η φάση κατά την οποία παράγεται το διοξείδιο του άνθρακα. Μελέτες γίνονται και στην κατηγορία των κατεψυγμένων προϊόντων ζύμης, καθώς και στην παραγωγή ψωμιού χωρίς γλουτένη. Αυτά βέβαια τα προϊόντα είναι χαμηλότερης ποιότητας (Cauvain, 2003α).

Άλλο ένα θέμα που απασχολεί τους επιστήμονες είναι η εύρεση τρόπου παράτασης της διάρκειας των προϊόντων αυτού του τύπου. Όλες πάντως οι θεωρίες καταλήγουν σε ένα δεδομένο: ότι το «μπαγιάτεμα» οφείλεται σε ένα σύνολο φυσικοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα αρτοπαρασκευάσματα και που ως τελικό αποτέλεσμα έχουν τη μεταφορά υγρασίας από τη μάζα των προϊόντων προς το περιβάλλον και αντίστροφα. Κύρια αιτία του, αποτελεί η ανακρυστάλλωση του αμύλου, ενώ σύμφωνα με τον Martin και συνεργάτες (2006), άλλες ενδείξεις αποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες της γλουτένης έχουν άμεση σχέση με τη διαδικασία αυτή. Είναι λοιπόν αναγκαία, η ανάπτυξη νέων μεθόδων που σχετίζονται με τη γλουτένη, διότι είναι το σημαντικότερο συστατικό στη δομή του ζυμαριού.

Σύμφωνα και με τους ερευνητές Salehifar και Shahedi (2007), υπάρχει μια αντιστρεπτή σχέση μεταξύ του περιεχομένου και του μπαγιατέματος, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αρτοπαρασκευασμάτων. Κάποιες προσπάθειες έχουν ήδη γίνει για την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων ζύμης, με την προσθήκη παραγόντων όπως η λεκιθίνη, μονογλυκερίδια (εστέρες πολυγλυκερίνης), πολυαλκοόλες (μανιτόλη, σορβιτόλη), υδροκολλοειδή (συνήθως πολυσακχαρίτες), καθώς και χρήση ειδικών συσκευασιών κατά τη φύλαξη των προϊόντων. Ερευνητές έχουν ξεκινήσει την προσπάθεια παραγωγής ενός κοκτέιλ θερμοανθεκτικών ενζύμων που βοηθούν στην επιμήκυνση της διατήρησης των προϊόντων μετά το ψήσιμο

διατηρώντας τα φρέσκα. Οι φόρμουλες βέβαια είναι ακόμη σε πειραματικό στάδιο (Κουντούρης, 2007).

Το 2010 σε πειράματα του Gerez και των συνεργατών, που έγιναν σε ψωμιά και όπου χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα στελέχη των LAB (*L.brevis* CRL 772, *L.brevis* CRL 796, *L.reuteri* CRL 1100 και *L.plantarum* CRL 778) παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη του *Penicillium sp.* λόγω της σύνθεσης του οξικού οξέος που παράγουν τα LAB και της μείωσης του pH στη ζύμη πετυχαίνοντας με αυτόν τον τρόπο την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αυτών.

Στο μέλλον, φαίνεται ότι θα υπάρξει αυξανόμενη τάση on-line παρακολούθησης της διαδικασίας παρασκευής των προϊόντων ζύμης, με αποτέλεσμα τη διαφύλαξη της ποιότητας των τελικών προϊόντων, μέσω του ελέγχου όλων των σταδίων παραγωγής από την πρώτη ύλη έως το τελικό προϊόν. Είναι πολύ σημαντικό να επισημανθεί ότι, από τις αυτογενείς ζυμώσεις διαφόρων ακατέργαστων στην ουσία υλικών, μπορούν και παραχθούν σταθερά τελικά προϊόντα με αμετάβλητη σύνθεση αλλά και μεταβολική δραστηριότητα. Παρά τις όποιες εναλλαγές του μικροβιακού πληθυσμού, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με αντιδράσεις καταπόνησης καθώς και με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, δεν παύει να διατηρείται η σχετική σταθερότητα του προϊόντος με ουσιαστικά πλεονεκτήματα που έχουν και οικονομικό αντίκτυπο από την πλευρά των καταναλωτών (Cauvain, 2003α).

## Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός του συγκεκριμένου ερευνητικού έργου ήταν ο προσδιορισμός του βακτηριακού πληθυσμού (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση) των δειγμάτων προζυμιού που παραδοσιακά συντηρούνται σε μεγάλη βιομηχανία τροφίμων. Στόχος ήταν να εντοπιστούν τυχόν εποχιακές οργανοληπτικές διακυμάνσεις των πληθυσμών των βακτηρίων.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν δύο δειγματοληψίες σε διάστημα ενός χρόνου για να εξεταστούν διάφορα δείγματα προζυμιού και να συγκριθούν τα αποτελέσματα που προέρχονταν από δύο διαφορετικές φάσεις συγκεκριμένης διαδικασίας συντήρησης η οποία προβλέπεται από την εταιρεία προμήθειας των δειγμάτων. Η μεθοδολογία ανάλυσης των δειγμάτων προζυμιού αποφασίστηκε να περιλαμβάνει μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των μικροβίων και των αποικιών τους, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών να γίνει βάση της κλασσικής μεθόδου καταμέτρησης αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Στόχοι της συγκεκριμένης εργασίας ήταν:

1. Ποσοτική μελέτη των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών των δειγμάτων προζυμιού αρτοβιομηχανίας.
2. Απομόνωση των ενδογενών βακτηριακών στελεχών των παραπάνω δειγμάτων και σύγκριση του μοριακού προφίλ των απομονωθέντων βακτηρίων.
3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας με άλλες μελέτες σε προηγούμενες δειγματοληψίες σε δείγματα προζυμιού από το ίδιο ή και διαφορετικό στάδιο του διαγράμματος παραγωγής των προϊόντων προζυμιού.
4. Τρόποι διατήρησης και συντήρησης των επικρατούντων βακτηριακών στελεχών του προζυμιού.

Απώτερος στόχος ήταν η τυποποίηση του προζυμιού και κατά επέκταση η σταθερότητα της ποιότητας των προϊόντων που προκύπτουν απ' αυτό.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Θρεπτικά υποστρώματα**

#### **2.1.1 Malt Extract Agar (MEA, Atlas, 1993).**

Περιέχει (g/l): Εκχύλισμα βύνης 17,0, πεπτόνη 3,0 και άγαρ 18,0 (Atlas, 1993). Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη, την απομόνωση και τη συντήρηση των στελεχών ζυμομυκήτων. Σε υγρή μορφή (χωρίς άγαρ) χρησιμοποιήθηκε σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας.

#### **2.1.2 MRS (Man, Rogosa, Sharpe) (Scharlau Chemie S.A., Ισπανία).**

Στο υγρό θρεπτικό μέσο προστίθενται άγαρ 18 g/l.

#### **2.1.3 Sour Dough Medium (SDM, Atlas, 1993).**

Περιέχει (g/l): Μαλτόζη 20,0, φρέσκο εκχύλισμα ζυμομύκητα 15,0, πεπτόνη καζεΐνης 6,0, εκχύλισμα ζυμομύκητα 3,0, Tween 80 0,3 και άγαρ 18,0.

#### **2.1.4 Φρέσκο Εκχύλισμα Ζυμομύκητα (Atlas, 1993).**

Χρησιμοποιήθηκε τεχνητό σκεύασμα εμπορίου που περιείχε ζυμομύκητες και το οποίο διαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό σχηματίζοντας διάλυμα 20 % (w/v). Ακολούθησε αποστείρωση στους 121° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια παρέμεινε στους 4 °C για 20 ώρες με σκοπό την καθίζηση του ιζήματος και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 4000 rpm για 15 λεπτά. Το εκχύλισμα περιείχε 1,5 % στερεές ουσίες και χρησιμοποιήθηκε αμέσως.

#### **2.1.5 SuMRS (Atlas, 1993).**

Στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Scharlau Chemie S.A., Ισπανία) προστέθηκαν σακχαρόζη 20 g και φρουκτόζη 15 g ανά λίτρο.

## **2.2 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα**

### **2.2.1 Ισοτονικό Διάλυμα Αλάτων Ringer (1/4) (Wellington και συνεργάτες, 1990).**

Περιέχει (g/l): NaCl 2,15, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5, KCl 0,15 και CaCl<sub>2</sub> 0,075.

### **2.2.2 Διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v) (Wellington και Williams, 1978).**

Περιέχει 30,0 g γλυκερόλη σε 100 ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

### **2.2.3 Διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10 % (w/v)**

Περιέχει 100 g αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη διαλυμένα σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού. Η αποστείρωση έγινε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 40 λεπτά. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των στελεχών στην τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου.

### **2.2.4 Διάλυμα γλυκόζης 10 % (w/v)**

Περιέχει 100 g γλυκόζης διαλυμένα σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού. Η αποστείρωση έγινε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 40 λεπτά. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τη λυοφιλίωση βιομάζας μετά την παραγωγή της σε ανοικτά συστήματα καλλιέργειας.

## **2.3 Δειγματοληψία**

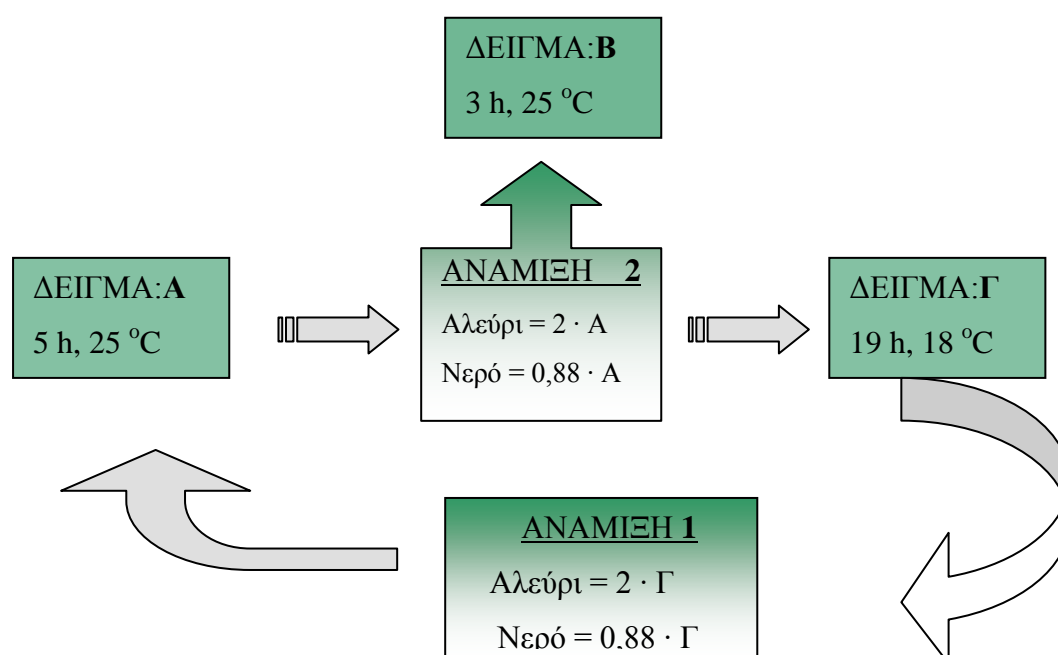
Κατά τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες (Δεκέμβριος 2007 και Δεκέμβριος 2008) σε γνωστή βιομηχανία με σκοπό τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε δείγματα προζυμιού. Στον Πίνακα 2.1 περιλαμβάνονται οι δειγματοληψίες του 2007 και 2008 καθώς και οι προηγούμενες δειγματοληψίες των ετών 2005 και 2006, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε άλλες εργασίες ερευνητών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ. Η αναφορά στις δειγματοληψίες των προηγούμενων ετών γίνεται σε αυτή την εργασία με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.



Πίνακας 2.1. Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν από το 2005 έως το 2008.

Δειγματοληψία	Χρόνος δειγματοληψίας	Περιγραφή δείγματος	Βιβλιογραφική αναφορά
1 <sup>η</sup>	Ιούνιος 2005	Δείγματα προζυμιού Α και Γ	Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής, (2007)
2 <sup>η</sup>	Ιούλιος 2005	Δείγματα προζυμιού Α και Γ	Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής, (2007)
3 <sup>η</sup>	Φεβρουάριος 2006	Δείγματα προζυμιού Α και Γ	Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής, (2007)
4 <sup>η</sup>	Σεπτέμβριος 2006	Δείγματα προζυμιού Α και Γ	Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής, (2007)
5 <sup>η</sup>	Οκτώβριος 2006	Δείγματα προζυμιού Α και Γ	Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής, (2007)
6 <sup>η</sup>	Δεκέμβριος 2007	Δείγματα προζυμιού Β και Γ	Παρούσα εργασία
7 <sup>η</sup>	Δεκέμβριος 2008	Δείγμα προζυμιού Β	Παρούσα εργασία

Κατά την επεξεργασία του προζυμιού από τη βιομηχανία ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία διατήρησης.



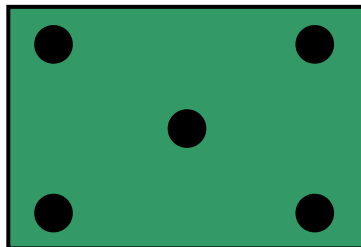
Εικόνα 2.1 Διάγραμμα παραγωγής προϊόντων προζυμιού.

Όπως φαίνεται στη Εικόνα 2.1, το προζύμι σταδίου Α διατηρείται για 5 ώρες στους 25 °C, εν συνεχεία προστίθεται σε αυτό νερό και αλεύρι απ' όπου προκύπτει το προϊόν Β και Γ. Το προζύμι σταδίου Β διατηρείται στους 25 °C για 3 ώρες και προχωρεί στη γραμμή παραγωγής, ενώ το προζύμι Γ διατηρείται στους 18 °C για 19 ώρες και σε αυτό το στάδιο προστίθεται νερό και αλεύρι γίνεται ανάμιξη και δίνει εκ νέου προζύμι τύπου Α. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται συνεχής διατήρηση του προζυμιού.

Κατά τη δειγματοληψία του Δεκεμβρίου 2007 τα δείγματα προέρχονταν από προζύμι που είχε διατηρηθεί για 19 ώρες στους 25 °C (δείγμα «Γ») και από προζύμι που είχε υποστεί επεξεργασία για 3 ώρες στους 25 °C (δείγμα «Β»). Στη δεύτερη δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008), το δείγμα προήλθε μόνο από προζύμι που είχε διατηρηθεί για 3 ώρες στους 25 °C (δείγμα «Β»). Το προζύμι διατηρήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο υπό ψύξη (10 °C). Ακολούθησαν οι μικροβιολογικές αναλύσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν εντός 6 ωρών από την ώρα της δειγματοληψίας.

#### 2.4 Απομόνωση βακτηρίων από δείγματα προζυμιού

Από τη βιομηχανία τα δείγματα προζυμιού μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία και στη συνέχεια στο εργαστήριο ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Το κάθε δείγμα διαμορφώθηκε σε σχήμα παραλληλεπίπεδου και συλλέχθηκε από 5 σημεία (4 σημεία από τα άκρα και 1 σημείο από το μέσον, Εικόνα 2.2) ποσότητα δύο γραμμαρίων με τη βοήθεια αποστειρωμένου διακορευτή όπως ορίζεται από το EN/TS 21568 ([www.iso.org](http://www.iso.org)). Τα 5 υποδείγματα ενώθηκαν και αποτέλεσαν το προς ανάλυση δείγμα.



**Εικόνα 2.2** Σχέδιο δειγματοληψίας υποδειγμάτων από δείγμα προζυμιού.

Κάθε δείγμα γνωστού βάρους (10 g) τοποθετήθηκε σε γυάλινους σωλήνες τύπου universal με ισοτονικό διάλυμα Ringer ¼ (§2.2.1) για μία ώρα υπό ανάδευση στις 150 rpm και στους 4 °C με στόχο την ανάκτηση των μικροοργανισμών. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις του εναιωρήματος σε ισοτονικό διάλυμα αλάτων Ringer από 10<sup>0</sup> έως και 10<sup>4</sup>.

Στη συνέχεια, ποσότητα ίση με 200 μl από κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε τρυβλία με επιλεγμένα θρεπτικά υποστρώματα (§2.1). Η ανάλυση κάθε δείγματος, σε κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Οι καλλιέργειες επώστηκαν για χρονικό διάστημα 2 ημερών στους 30 °C για την απομόνωση βακτηρίων. Στο διάστημα των ημερών επώασης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες, ανά 24 ώρες. Στο κάθε τρυβλίο πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση αποικιών, μικροσκοπική και μακροσκοπική παρατήρηση των μικροοργανισμών. Η μακροσκοπική παρατήρηση σε κάθε τρυβλίο έγινε με στερεοσκόπιο του οίκου OPTIKA microscopes 40X SZM series.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών έγινε με βάση την κλασσική μέθοδο καταμέτρησης αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, η οποία βασίζεται στην αρχή ότι κάθε μεμονωμένη αποικία προέρχεται από μία και μόνο βιώσιμη μονάδα (colony forming unit - cfu), εκφράστηκε σε cfu ανά γραμμάριο δείγματος και υπολογίστηκε από τον Μέσο Όρο (Μ.Ο) των επί μέρους μετρήσεων (Καραγκούνη, 2001). Από κάθε διακριτό πληθυσμό μικροοργανισμών σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα συλλέχθηκαν όλες οι φαινοτυπικά διαφορετικές αποικίες οι οποίες ανακαλλιεργήθηκαν σε καθαρό θρεπτικό υπόστρωμα. Οι απομονωθέντες μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v) στους -20 °C (Κατσίφας, 2000).

## **2.5 Φαινοτυπικός διαχωρισμός των βακτηρίων**

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Υπήρξε συνεχής παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών καθώς και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ανά 24 ώρες και για όλο το χρονικό διάστημα. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση (μέγεθος, χρώμα και υφή) με σκοπό την καταγραφή καθώς και την ομαδοποίηση των μικροβιακών αποικιών. Στη συνέχεια

απομονώθηκαν από όλα τα υποστρώματα, βακτήρια σε καθαρή καλλιέργεια με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (Καραγκούνη, 1999).

## **2.6 Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων**

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίων πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου των Haught και συνεργατών (1994). Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 24 ωρών. Μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 800 μl διαλύματος  $MgSO_4$  10 mM και φυγοκεντρίθηκαν σε 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Στο ίζημα προστέθηκαν 500 μl διαλύματος λύσης (25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3 % σακχαρόζη, 10 mg/ml λυσοζύμη) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 125 μl διαλύματος SDS 10% και ακολούθησε επώαση στους 65 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη 216 μl διαλύματος οξικού καλίου 5 M, απαιτείται έντονη ανάδευση και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο για 30 λεπτά.

Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, έγινε φυγοκέντριση των σωλήνων για 10 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C καθώς και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση του DNA προσθέτοντας ίσο όγκο ισοπροπανόλης και παραμονή αυτού για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντριση για 20 λεπτά, στις 13.000 rpm στους 4 °C.

Στο ίζημα προστέθηκαν 500 μl διαλύματος αιθανόλης 70 % και έπειτα ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm. Ακολούθησε ξήρανση του ιζήματος και αναδιάλυση αυτού σε 100 μl αποστειρωμένου νερού. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

## **2.7 Η μέθοδος της αντίδρασης BOX – PCR για τη διάκριση των βακτηριακών στελεχών**

Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που έχουν περιγραφεί στο προκαρυωτικό γονιδίωμα (REP, ERIC και BOX αλληλουχίες), οι οποίες περιλαμβάνουν παλίνδρομα τμήματα μεγέθους 35 – 40 ζευγών βάσεων.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης BOX χρησιμοποιεί μόρια εκκινητές συμπληρωματικά προς υψηλά συντηρημένες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα σε διακριτές διαγονιδιακές θέσεις στο γονιδίωμα των περισσότερων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA μεταξύ των BOX στοιχείων όταν ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης, διαχωρίζονται δίνοντας την εικόνα ραβδωτού κώδικα (bar code) μοναδικού για κάθε στέλεχος (Versalovic J. και συνεργάτες, 1994).

Ο σχεδιασμός του εκκινητικού μορίου BOXA1R έγινε με βάση γνωστές αλληλουχίες BOX του προκαρυωτικού γονιδιώματος και ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι διότι οι BOX αλληλουχίες απαντώνται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Η αλληλουχία του εκκινητικού μορίου BOXA1R είναι: 5'-CTACGGCAAGG CGACGCT GACC- 3'.

Η σύσταση του μείγματος της PCR για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των BOX αλληλουχιών ήταν η εξής:

- 2 μl DNA (40 ng), 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0,1 % Triton X-100,
- 1 Unit Taq DNA πολυμεράση,
- 0,2 mM dNTPs,
- 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 20 mM από κάθε εκκινητή και
- 4 % DMSO.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους

94 °C που ακολουθείται από 35 κύκλους του 1 λεπτού στους 95 °C, 1 λεπτού στους 53 °C όπου το εκκινητικό μόριο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 8 λεπτών στους 65 °C όπου σχηματίζονται οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες.

Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 65 °C για 16 λεπτά. Τελικά, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % στα 50 mA για 5 ώρες και ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Η μέθοδος BOX-PCR πραγματοποιήθηκε κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008) στα στελέχη που απομονώθηκαν και των οποίων το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 %. Μετά το πέρας των παραπάνω διαδικασιών, ακολούθησε διαχωρισμός των στελεχών βάση της εικόνας ραβδωτού κώδικα (bar code) μοναδικού για κάθε στέλεχος με χρήση του προγράμματος Photo-Cept (Vilber Lourmet, France).

## 2.8 Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου (sequencing)

Το γενωμικό DNA (40 ng) από τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rDNA με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων pA – R1492 που ενισχύουν την περιοχή 8 – 1510 του 16S rDNA (αρίθμηση κατά *E. coli*) (Lane, 1991).

Η σύσταση του μείγματος της PCR αντίδρασης ήταν η εξής:

- 40 ng γενωμικού DNA,
- 10 mM KCl,
- 10 mM Tris – HCl (pH 9),
- 0,1 % (w/v) Triton X-100,
- 1 Unit Taq DNA πολυμεράση,
- 0,2 mM dNTPs,
- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>,
- 40 nM από κάθε εκκινητή και
- 5 % (v/v) DMSO.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο 10 λεπτών στους 94 °C και ακολουθούσαν 35 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους περιλάμβανε

1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 53 °C κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % (w/v) και παρατηρήθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία. Από κάθε ζώνη του πηκτώματος απομονώθηκε το DNA με τη χρήση του Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Γερμανία) και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση αλληλουχίας (Macrogen, Κορέα).

Οι αλληλουχίες, στη συνέχεια, συγκρίθηκαν με όλες τις βακτηριακές αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στις τράπεζες δεδομένων με χρήση του προγράμματος BLAST ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)).

## **2.9 Διατήρηση μικροβιακών στελεχών**

**2.9.1 Διατήρηση σε τρυβλία:** Η διατήρηση των απομονωθέντων βακτηρίων, έγινε σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος βύνης, το οποίο περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1. Τα τρυβλία με τα στελέχη επώασθηκαν για 48 έως 72 ώρες στους 30 °C. Η συντήρηση των τρυβλίων έγινε στους 4 °C για περίοδο τριών έως και τεσσάρων εβδομάδων (Galani και συνεργάτες, 1985).

**2.9.2 Διατήρηση βακτηρίων σε διάλυμα γλυκερόλης 30 % (v/v):** Η συντήρηση των στελεχών για χρονικά διαστήματα μεταξύ 6 και 12 μηνών έγινε υπό μορφή εναιωρήματος κυττάρων σε αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 30 % (w/v) (§2.2.2) (Carvalho και συνεργάτες 2004). Τα απομονωθέντα στελέχη καλλιιεργήθηκαν και επώασθηκαν στους 30 °C για 48 έως 72 ώρες, σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος βύνης και ακολούθησε η μεταφορά τους σε αποστειρωμένα erpendorf χωρητικότητας 2 ml, με τη βοήθεια διαλύματος γλυκερόλης 30 % (w/v). Η γλυκερόλη επιλέχθηκε σαν κρυοπροστατευτική ουσία διότι αποτρέπει την ενδοκυτταρική δημιουργία κρυστάλλων πάγου, οι οποίοι καταστρέφουν τα κυτταρικά οργανίδια (Kirsop, 1991). Τα εναιωρήματα των μικροοργανισμών διατηρήθηκαν στους -20°C και στους -80 °C, με στόχο τη δημιουργία τράπεζας στελεχών.

**2.9.3 Διατήρηση βακτηρίων με τη μέθοδο λυοφιλίωσης:** αφού ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.9.2, στη συνέχεια η καλλιέργεια μοιράστηκε σε πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου 200 ml, έγινε ισοζύγισή των δοχείων και ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία.

1. Φυγοκέντρωση καθαρών καλλιιεργειών (στις 8000 στροφές για 15 λεπτά) και επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα 10 % (w/v) αποβουτυρωμένου γάλακτος (§ 2.2.3).
2. Μεταφορά 2 ml εναιωρήματος μικροοργανισμών σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια λυοφιλίωσης.
3. Τα φιαλίδια καταψύχθηκαν στους -80 °C για 24 ώρες.
4. Ακολούθησε η μεταφορά τους στο λυοφιλιωτή, ο οποίος ήταν σε λειτουργία.

Η λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε στον ALPHA 1-4 λυοφιλιωτή του οίκου Christ υπό πίεση 0,5 mbar και θερμοκρασία -40 °C και διήρκεσε 48 ώρες. Τα λυοφιλιωμένα στελέχη διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C, σε μέρος χωρίς υγρασία.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μικροβιακό φορτίο Προζυμιού τύπου Β: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών

Το δείγμα προζυμιού Β (βλέπε Εικόνα 2.1, § 2.3) ελήφθη τον Δεκέμβριο του 2007 και ακολούθησαν μικροβιολογικές αναλύσεις (§ 2.4). Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων προζυμιού περιλάμβανε αρχικά τη μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων (§ 2.5). Χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αραίωση 3 τρυβλία από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα και ο αριθμός των απομονώσεων προέκυψε από τον μέσο όρο του συνόλου των αποικιών μεταξύ των 3 τρυβλίων.

Στον Πίνακα 3.1 παραθέτονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών οι οποίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MEA, MRS και SDM (§ 2.1), ο αριθμός των απομονώσεων και οι κωδικοί απομονωθέντων βακτηρίων για το συγκεκριμένο δείγμα προζυμιού Β.

Πίνακας 3.1 Ποιοτική ανάλυση προζυμιού Β (Δεκέμβριος 2007)

Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά Αποικιών	Αριθμός Απομονώσεων/ (%)	Κωδικοί Απομονωθέντων Βακτηρίων
Θαμπή, μεγάλη, λευκή	68 (9 %)	Π1 <sub>MEA</sub>
Γυαλιστερή, μεσαία, υπόλευκη	706 (91 %)	Π3 <sub>MEA</sub>
Θαμπή, μεσαία, υπόλευκη	27 (63 %)	Π1 <sub>MRS</sub>
Γυαλιστερή, μικρή, υπόλευκη	16 (37 %)	Π3 <sub>MRS</sub>
Θαμπή, μικρή, λευκή	133(100 %)	Π2 <sub>SDM</sub>
<b>Σύνολο Αποικιών</b>	950	

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.1, απομονώθηκαν 5 διαφορετικές, φαινοτυπικά, αποικίες στο σύνολο των αποικιών. Οι περισσότερες απ' αυτές στο MRS θρεπτικό υπόστρωμα (63 %) αλλά και στο MEA (91 %) ήταν υπόλευκου χρώματος και μεσαίου μεγέθους. Μικρά είναι τα ποσοστά των αποικιών λευκού χρώματος με 9 % ποσοστό στο MEA θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ στο SDM βρέθηκαν σε ποσοστό 100 % μόνο μικρές αποικίες λευκού χρώματος.

Μετά τη φαινοτυπική μελέτη των απομονωθέντων βακτηρίων και αφού ακολούθησε απομόνωση καθαρού DNA (§ 2.6) από κάθε μια απομονωμένη αποικία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου (§ 2.8). Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 3.2 από τα οποία προκύπτει ότι σε κάθε ομάδα των απομονωθέντων βακτηρίων άνηκαν τουλάχιστον 3 διαφορετικά είδη.

**Πίνακας 3.2** Ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων του προζυμίου Β με ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA (Δεκέμβριος 2007).

Κωδικός στελεχούς <sup>α</sup>	Ταυτοποιημένα Είδη	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>β</sup>	% ταυτότητα αλληλουχίας <sup>γ</sup>	Κωδικός
Π1 <sub>MEA</sub>	<i>Lactobacillus siligionis</i> strain NBRC 101315	725	84%	AB370882.1
	<i>Lactobacillus sp.</i> CS1 *	730	84%	AJ564009.1
	<i>Lactobacillus rossiae</i> strain JL4*	743	84%	FJ476119.1
Π3 <sub>MEA</sub>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AUX07	1050	90%	AY486381.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSSB7*	1048	90%	FJ707375.1
	<i>Stenotrophomonas sp.</i> MO3 *	1059	90%	EF025498.1
Π3 <sub>MRS</sub>	<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236	1290	98%	DQ168028.1
	<i>Lactobacillus siligionis</i> *	1390	98%	AB370882.1
	<i>Lactobacillus rossiae</i> strain JL4*	1459	98%	FJ476119.1
Π2 <sub>SDM</sub>	<i>Stenotrophomonas sp.</i> L169	1382	97%	AM913975.1
	<i>Stenotrophomonas sp.</i> L127 *	1382	97%	AM913913.1
	<i>Stenotrophomonas sp.</i> MH107 *	1382	97%	FJ626655.1
Π1 <sub>MRS</sub>	<i>Enterococcus faecium</i> strain Y105*	726	86%	EU807957.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NR1	723	86%	EU717757.1
	<i>Enterococcus faecium</i> strain IJ-06*	723	86%	EU547774.1

<sup>α</sup> Κωδικός καταχώρησης των βακτηριακών στελεχών στην τράπεζα του εργαστηρίου. Ο δείκτης δηλώνει το υπόστρωμα απομόνωσης.

<sup>β</sup> Αριθμός νουκλεοτιδίων 16S rDNA γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην ευθυγράμμιση αλληλουχιών.

<sup>γ</sup> % ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια στην υπάρχουσα τράπεζα στελεχών

\* Πλησιέστερο είδος με βάση την ομολογία της αλληλουχίας

Στον Πίνακα 3.2 παραθέτονται οι κωδικοί του εργαστηρίου βάση των οποίων καταχωρήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη καθώς και το ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια. Ανιχνεύτηκαν 2 στελέχη των γενών *Lactobacillus* στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA και MRS σε ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας 84 % και 98 % αντίστοιχα. Ένα μόνο στέλεχος ανήκει στο γένος *Enterococcus* σε ποσοστό 86 % και τέλος βρέθηκαν δύο στελέχη του γένους *Stenotrophomonas* με ποσοστά 90 % στο MRS θρεπτικό υπόστρωμα και 97 % στο SDM.

Κατά την ποσοτική ανάλυση του προζυμιού Β ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμάνθηκε συνολικά μεταξύ  $2,1 \cdot 10^6$  έως και  $3,9 \cdot 10^7$  βιώσιμες μονάδες ανά g προζυμιού ανάλογα βέβαια και με το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης στα δείγματα προζυμιού Β συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3.

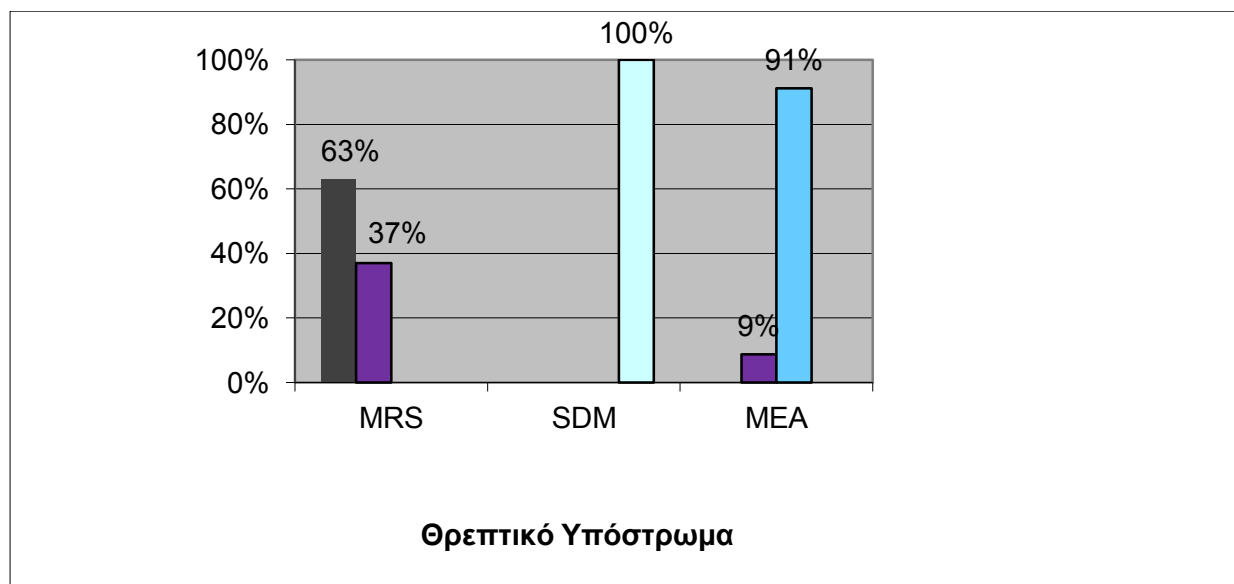
**Πίνακας 3.3:** Αριθμός βιώσιμων μονάδων βακτηρίων ανά g προζυμιού Β σε διαφορετικά στερεά εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα κατά τη δειγματοληψία του Δεκεμβρίου 2007.

<b>Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης Βακτηρίων</b>	<b>Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g</b>
MEA	$3,9 \cdot 10^7$
MRS	$2,1 \cdot 10^6$
SDM	$6,7 \cdot 10^6$

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3, ο πληθυσμός των βακτηρίων στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA ήταν μεγαλύτερος κατά περίπου ένα λογάριθμο σε σχέση με τ' άλλα δύο θρεπτικά υποστρώματα MRS και SDM. Στον Πίνακα 3.4 καταγράφονται ποιοτικά και ποσοτικά οι βακτηριακοί πληθυσμοί που απομονώθηκαν στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 3.4 :** Ολικός πληθυσμός βακτηριακών στελεχών ανά g προζυμιού Β σε αντιστοιχία με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας στο οποίο απομονώθηκαν καθώς και οι επιμέρους πληθυσμοί των στελεχών.

Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	Ολικός Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g	ΣΤΕΛΕΧΗ	Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g
MEA	$3,9 \cdot 10^7$		
MEA		<i>Lactobacillus siliginis</i> strain NBRC101315	$0,34 \cdot 10^7$
MEA		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AUX077	$3,53 \cdot 10^7$
MRS	$2,1 \cdot 10^6$		
MRS		<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236	$0,8 \cdot 10^6$
MRS		<i>Enterococcus faecium</i> strain Y105	$1,3 \cdot 10^6$
SDM	$6,7 \cdot 10^6$		
SDM		<i>Stenotrophomonas sp.</i> L169	$6,7 \cdot 10^6$



**Εικόνα 3.1:** Ποσοστά βακτηριακού πληθυσμού προζυμιού Β επί του συνόλου των βακτηρίων ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. ■ *L. siliginis*, ■ *St. maltophilia*, □ *Stenotrophomonas sp.*, ■ *Enterococcus faecium*.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4 καθώς και στην Εικόνα 3.1, στο MRS, θρεπτικό υπόστρωμα για τον προσδιορισμό λακτοβάκιλλων, αναπτύχθηκαν ο *Lactobacillus siliginis* σε ποσοστό 37 % επί του συνόλου καθώς και ο *Enterococcus faecium* σε 63 %. Στο MEA, εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τον προσδιορισμό κυρίως ζυμομυκήτων, αναπτύχθηκε το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Stenotrophomonas maltophilia* σε ποσοστό περίπου 91 % και ο *Lactobacillus siliginis* σε μικρότερο ποσοστό περίπου 9 %. Τέλος στο SDM, εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως για λακτοβάκιλλους, αναπτύχθηκε μόνο το στέλεχος *Stenotrophomonas sp.*

### 3.2 Μικροβιακό φορτίο του προζυμιού τύπου Γ: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών

Το Δεκέμβριο του 2007 πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία του δείγματος προζυμιού Γ και στη συνέχεια ακολούθησαν οι μικροβιολογικές αναλύσεις (§ 2.4). Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων προζυμιού περιλάμβανε αρχικά τη μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων (§2.5). Στον Πίνακα 3.5 παραθέτονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών οι οποίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MRS και SDM (§ 2.1), ο αριθμός των απομονώσεων και οι κωδικοί απομονωθέντων βακτηρίων για το συγκεκριμένο δείγμα προζυμιού Γ.

Πίνακας 3.5 Ποιοτική ανάλυση προζυμιού Γ (Δεκέμβριος 2007)

Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά Αποικιών	Αριθμός Απομονώσεων- Ποσοστά	Κωδικοί Απομονωθέντων Βακτηρίων
θαμπή, μεσαία, λευκή	460 (77%)	L1 <sub>MRS</sub>
θαμπή, μεσαία, υπόλευκη	32 (5%)	L2 <sub>MRS</sub>
θαμπή, πολύ μικρή, υπόλευκη	12 (2%)	L3 <sub>MRS</sub>
θαμπή, μεσαία, λευκή	91 (16%)	L4 <sub>MRS</sub>
θαμπή, μεγάλη, λευκή	357 (100%)	L1 <sub>SDM</sub>
<b>Σύνολο Αποικιών</b>	952	

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.5, στο δείγμα προζυμίου Γ απομονώθηκαν 5 διαφορετικές φαινοτυπικά αποικίες στο σύνολο των αποικιών. Οι περισσότερες αποικίες που απομονώθηκαν και στα 3 θρεπτικά υποστρώματα ήταν λευκού χρώματος. Οι αποικίες στο SDM θρεπτικό υπόστρωμα ήταν όλες μεγάλου μεγέθους και λευκού χρώματος (100 %), ενώ στο MRS θρεπτικό υπόστρωμα υπήρξε ποικιλομορφία στο μέγεθος, το χρώμα και την υφή των αποικιών, με μεγαλύτερο το ποσοστό ανίχνευσης (αθροιστικά 93 %) των μεσαίων λευκών αποικιών και μόλις 7 % των αποικιών ήταν υπόλευκου χρώματος.

Οι περισσότερες αποικίες αντιστοιχούν στους κωδικούς των απομονωθέντων βακτηρίων L1<sub>MRS</sub> και L1<sub>SDM</sub> με τα αντίστοιχα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που παραθέτονται στον Πίνακα 3.5.

Μετά τη φαινοτυπική ανάλυση των απομονωθέντων μικροοργανισμών, ακολούθησε απομόνωση καθαρού DNA (§ 2.8) σε κάθε μια απομονωθείσα αποικία και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου.

Τα αποτελέσματά της παραθέτονται στον Πίνακα 3.6 όπου καταγράφονται οι κωδικοί των βακτηριακών στελεχών της τράπεζας του εργαστηρίου καθώς και το ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια. Σε κάθε ομάδα των απομονωθέντων βακτηρίων βρέθηκε να ανήκουν τουλάχιστον 3 διαφορετικά είδη.

Ανιχνεύτηκαν 2 στελέχη που ανήκουν στο γένος *Stenotrophomonas* με κωδικούς L1<sub>MRS</sub> και L4<sub>MRS</sub> και ποσοστά ταυτότητας αλληλουχίας 85 % και 89 %. Οι κωδικοί L3<sub>MRS</sub> και L1<sub>SDM</sub> αντιστοιχούν σε 2 στελέχη του γένους *Acetobacter* με αντίστοιχα ποσοστά 98 % και 96 %. Τέλος ο κωδικός στελέχους L2<sub>MRS</sub> ανήκει στο γένος *Acinetobacter* με ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας 87 % με τον μικροοργανισμό με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια.

**Πίνακας 3.6** Ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων του προζυμίου Γ με ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA (Δεκέμβριος 2007).

Κωδικός Στελέχους <sup>α</sup>	Ταυτοποιημένα Είδη	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>β</sup>	% ταυτότητα αλληλουχίας <sup>γ</sup>	Κωδικός
L3 <sub>MRS</sub>	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	1482	98 %	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	1482	98 %	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain K113*	1482	98 %	FJ831444.1
L1 <sub>MRS</sub>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain D1	671	85 %	EU340025.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JY-1*	671	85 %	FJ418173.1
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. MH122 *	671	85 %	FJ626634.1
L4 <sub>MRS</sub>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JY-1	806	89 %	FJ418173.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain D1*	806	89 %	EU340025.1
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. MH122*	808	89 %	FJ626634.1
L2 <sub>MRS</sub>	<i>Acinetobacter lwoffii</i> D16B2	564	87 %	EU386165.1
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain BL*	560	87 %	FJ860882.1
	<i>Acinetobacter</i> sp. CYEB-12 *	560	87 %	FJ422393.1
L1 <sub>SDM</sub>	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	1367	96 %	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain K113*	1367	96 %	FJ831444.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	1367	96 %	DQ523495.1

<sup>α</sup> Κωδικός καταχώρησης των βακτηριακών στελεχών στην τράπεζα του εργαστηρίου. Ο δείκτης δηλώνει το υπόστρωμα απομόνωσης.

<sup>β</sup> Αριθμός νουκλεοτιδίων 16S rDNA γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην ευθυγράμμιση αλληλουχιών.

<sup>γ</sup> % ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια στην υπάρχουσα τράπεζα στελεχών

\* Πλησιέστερο είδος με βάση την ομολογία της αλληλουχίας

Στον Πίνακα 3.7, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων του προζυμιού Γ μεταξύ των δειγματοληψιών του Δεκεμβρίου 2007 και προηγούμενων δειγματοληψιών (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006) που παραθέτονται στην τελική έκθεση προόδου του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», (2007).

**Πίνακας 3.7:** Συγκριτική ποιοτική ανάλυση των βακτηρίων που απομονώθηκαν στο προζύμι Γ κατά τις δειγματοληψίες του Δεκεμβρίου το 2007 και αυτών της Τελικής Έκθεσης Προόδου του προγράμματος\* με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», (2007).

Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	Αποτελέσματα παρούσας εργασίας, 2007	Αποτελέσματα προγράμματος* (Δειγματοληψίες 2005 - 2006)
<b>MEA</b>	<i>Δεν έγινε</i>	<i>Lactobacillus siligionis</i>
	<i>Δεν έγινε</i>	* <i>Gluconobacter oxydans</i>
<b>MRS</b>	-	<i>Lactobacillus siligionis</i>
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	* <i>Acetobacter malorum</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D1	-
	* <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JY-1	-
	-	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> D16B2	-
<b>SDM</b>	-	* <i>Lactobacillus sanfrancisco</i>
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	-

\* Στελέχη με τα υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης ανά θρεπτικό υπόστρωμα.

Στο δείγμα προζυμιού Γ κατά τη τελική έκθεση προόδου του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» (2007), περιγράφεται ότι ανιχνεύτηκαν κατά τις δειγματοληψίες (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006), στελέχη των γενών *Lactobacillus*, *Acetobacter* καθώς και στελέχη του γένους *Staphylococcus*, τα οποία επίσης απομονώθηκαν κατά τη δειγματοληψία της παρούσας εργασίας το 2007 μαζί με στελέχη των γενών *Stenotrophomonas* και *Acinetobacter*.



Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης στα δείγματα προζυμιού Γ του Δεκεμβρίου 2007, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.8. Ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών  $3 \cdot 10^6$  και  $1,8 \cdot 10^7$  όπως εκτιμήθηκε σε βιώσιμες μονάδες ανά g προζυμιού ανάλογα με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις.

**Πίνακας 3.8:** Αριθμός βιώσιμων μονάδων βακτηρίων ανά g προζυμιού Γ ανάλογα με το στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα κατά τις δειγματοληψίες του Δεκεμβρίου 2007 και της Τελικής Έκθεσης Προόδου του προγράμματος\* με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», (2007).

Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	Δείγμα προζυμιού από την παρούσα εργασία (Δεκέμβριος 2007) Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g	Δείγμα προζυμιού του προγράμματος* (Δειγματοληψίες 2005-2006) Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g
MEA	Δεν έγινε	$0,2 \cdot 10^6$
MRS	$3 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$
SDM	$1,8 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^9$

Στην αριστερή στήλη του Πίνακα 3.8, παραθέτονται τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ενώ στις άλλες δύο στήλες καταγράφονται ο αριθμός των βιώσιμων μονάδων ανά θρεπτικό υπόστρωμα και ανά δειγματοληψία.

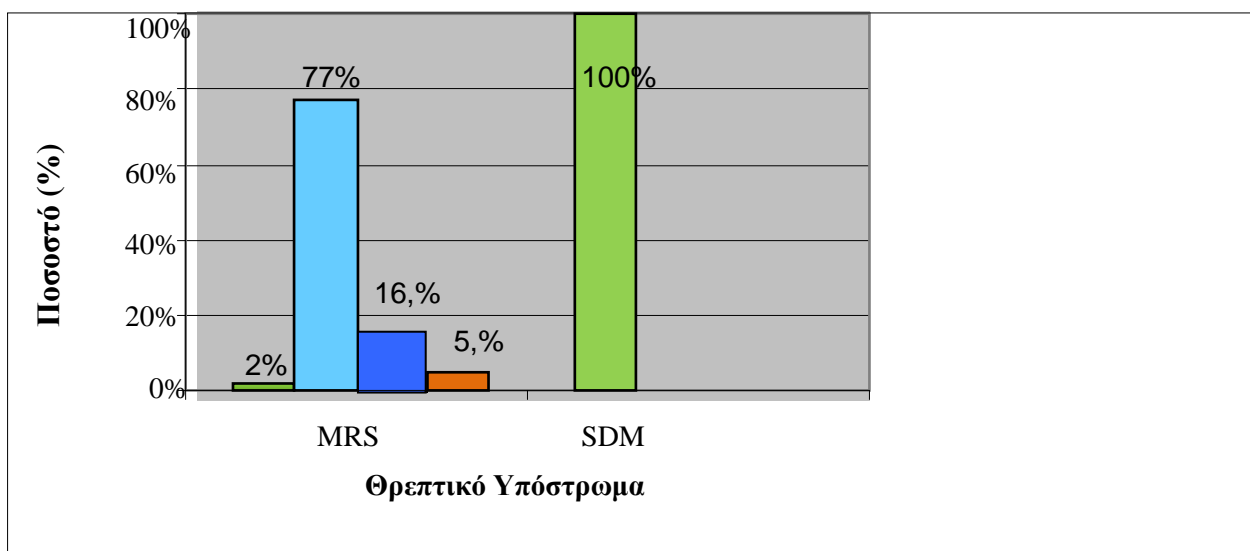
Ο πληθυσμός των βακτηρίων κατά τη δειγματοληψία τον Δεκέμβριο του 2007 ήταν μεγαλύτερος περίπου κατά έναν λογάριθμο στο SDM απ' ότι στο MRS, ενώ στις δειγματοληψίες (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006) που πραγματοποιήθηκαν κατά την τελική έκθεση προόδου, ο πληθυσμός των βακτηρίων στο SDM ήταν μεγαλύτερος κατά τρεις λογαρίθμους σε σχέση με το MRS και το MEA.

Η αντιστοιχία μεταξύ των στελεχών και τα ποσοστά με τα οποία ανιχνεύτηκαν στο προζύμι τύπου Γ αναρτώνται στον παρακάτω συγκεντρωτικό Πίνακα 3.9. Στα δεδομένα του Πίνακα 3.9 καθώς και της Εικόνα 3.2, φαίνεται να κυριαρχεί το βακτήριο οξικού οξέος *Acetobacter malorum* και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα στο MRS, παρατηρήθηκε ανάπτυξη των στελεχών *Acetobacter malorum* (2 %), *Stenotrophomonas maltophilia* D1 (77 %), *Stenotrophomonas maltophilia* JY-1 (16 %) και *Acinetobacter lwoffii* (5 %), ενώ στο SDM απομονώθηκε μόνο το στέλεχος *Acetobacter malorum* (100%).

**Πίνακας 3.9:** Αριθμός βακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν από το προζύμι Γ ανά θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης

Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	Ολικός Αριθμός Βιώσιμων μονάδων / g	ΣΤΕΛΕΧΗ	Αριθμός Βιώσιμων μονάδων / g
<i>MRS</i>	$3 \cdot 10^6$		
<i>MRS</i>		<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	$0,1 \cdot 10^6$
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D1	$2,3 \cdot 10^6$
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JY-1	$0,5 \cdot 10^6$
		<i>Acinetobacter lwoffii</i> D16B2	$0,2 \cdot 10^6$
<i>SDM</i>	$1,8 \cdot 10^7$		
<i>SDM</i>		<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	$1,8 \cdot 10^7$

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2, τα μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης ανήκουν στα στελέχη *Acetobacter malorum* EW-m στο θρεπτικό υπόστρωμα SDM (100 %) και *Stenotrophomonas maltophilia* D1 στο MRS (77 %). Να σημειωθεί ότι και τα δύο θρεπτικά υποστρώματα είναι εκλεκτικά για λακτοβάκιλους.



**Εικόνα 3.2:** Ποσοστά βακτηριακού πληθυσμού προζυμιού Γ ανά εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα.  
■ *Acetobacter malorum*, ■ *Stenotrophomonas maltophilia* D1, ■ *Stenotrophomonas maltophilia* JY-1, ■ *Acinetobacter lwoffii*.

### 3.3 Μικροβιακό φορτίο του προζυμιού Β:

#### Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών

Το δείγμα προζυμιού Β ελήφθη τον Δεκέμβριο του 2008 και ακολούθησαν μικροβιολογικές αναλύσεις (§ 2.4). Κατά την ποιοτική ανάλυση του προζυμιού Β, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των απομονωθέντων μικροοργανισμών (§ 2.5) βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών σε διάφορες κατηγορίες.

**Πίνακας 3.10:** Ποιοτική ανάλυση προζυμιού Β (Δεκέμβριος 2008)

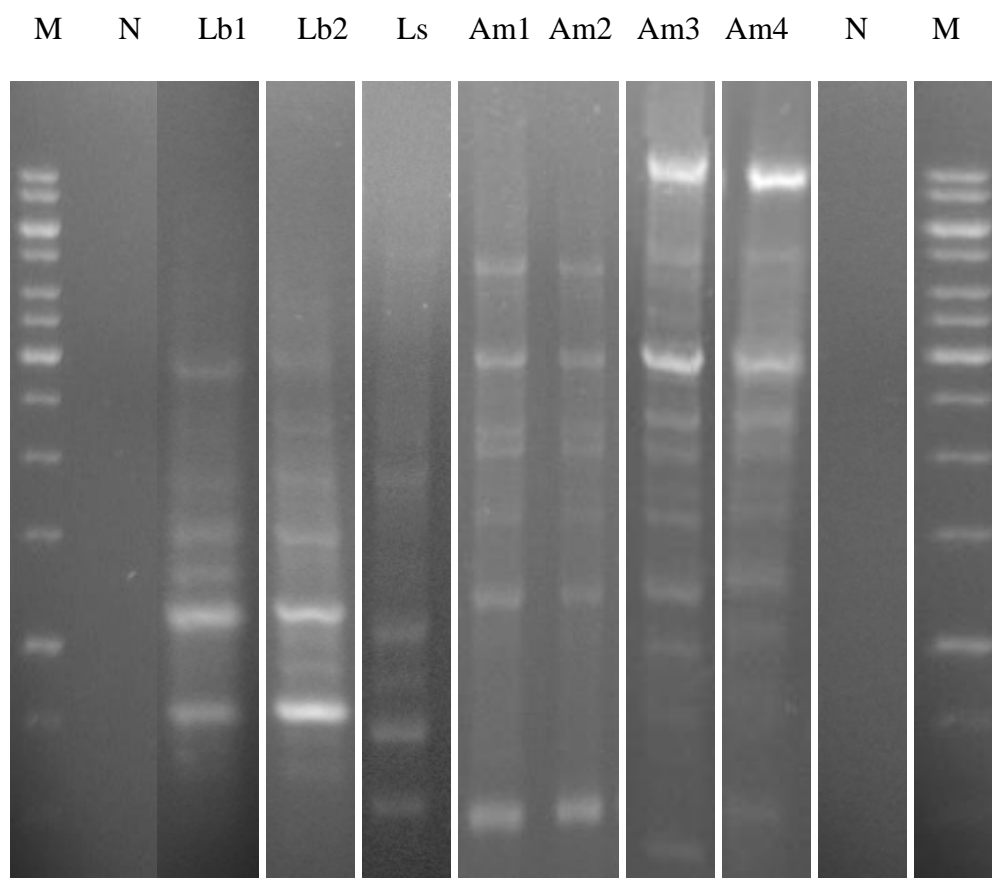
<b>Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά Αποικιών</b>	<b>Αριθμός Απομονώσεων</b>	<b>Κωδικοί Απομονωθέντων Βακτηρίων</b>
Λευκή, θαμπή, στρογγυλή	28	<b>Π1<sub>MRS</sub></b>
Υπόλευκη, Μεσαία, στρογγυλή	55	<b>Π2<sub>MRS</sub></b>
Υπόλευκη, πολύ μικρή, στρογγυλή	24	<b>Π3<sub>MRS</sub></b>
Λευκή, μεγάλη, στρογγυλή	49	<b>Π1<sub>SDM</sub></b>
Υπόλευκη, μεσαία, στρογγυλή	35	<b>Π2<sub>SDM</sub></b>
Υπόλευκη, πολύ μικρή, στρογγυλή	8	<b>Π3<sub>SDM</sub></b>
<b>Σύνολο Αποικιών</b>	199	

Στον Πίνακα 3.10, παραθέτονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών του προζυμιού Β. Όλες οι αποικίες είχαν σχήμα στρογγυλό και οι περισσότερες ήταν μεσαίου μεγέθους. Ο μεγαλύτερος αριθμός απομονώσεων (122 στο σύνολο) ήταν αποικίες χρώματος υπόλευκου οι οποίες αντιστοιχούσαν στους κωδικούς Π2<sub>MRS</sub>, Π3<sub>MRS</sub>, Π2<sub>SDM</sub> και, Π3<sub>SDM</sub>, ενώ λιγότερες ήταν οι αποικίες λευκού χρώματος (77 σύνολο) με κωδικούς Π1<sub>MRS</sub> και, Π1<sub>SDM</sub>. Τα ίδια ακριβώς ποιοτικά αποτελέσματα βρέθηκαν στην 1<sup>η</sup> δειγματοληψία τον Δεκέμβρη του 2007 (Πίνακας 3.1) όπου και εκεί η πλειοψηφία των απομονώσεων ήταν αποικίες χρώματος

υπόλευκου (749 σύνολο), ενώ ο αριθμός των αποικιών λευκού χρώματος ήταν λιγότερες (201 σύνολο).

Από τα δείγματα προζυμιού Β, απομονώθηκαν συνολικά 199 βακτήρια. Αυτά ομαδοποιήθηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου BOX – PCR (§ 2.6.2) και βάση του μοριακού προφίλ των ζωνών, ύστερα από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % και τη φωτογράφησή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία, διαχωρίστηκαν σε 6 διαφορετικές ομάδες που αντιστοιχούν σε 3 είδη.

Στην Εικόνα 3.3, διαχωρίστηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου BOX-PCR τα βακτηριακά στελέχη του προζυμιού Β.



**Εικόνα 3.3:** Αντιπροσωπευτική εικόνα διάκρισης των βακτηριακών στελεχών με εφαρμογή της μεθόδου BOX-PCR. Η θέση Μ αντιστοιχεί σε 1 Kb μάρτυρα, στη θέση Ν Η<sub>2</sub>Ο, στις θέσεις Lb1- Lb2, αντιστοιχούν δύο διαφορετικοί τύποι *Lactobacillus brevis*, στη θέση Ls- *Lactobacillus siliginis*, στις θέσεις Am1-Am4 αντιστοιχούν δύο διαφορετικά στελέχη *Acetobacter malorum*.

**Πίνακας 3.11** Επιλεγμένα στελέχη από κάθε ομάδα μετά την εφαρμογή της μεθόδου BOX-PCR (βλέπε Πίνακα 3.12).

ΟΜΑΔΕΣ	ΣΤΕΛΕΧΗ
Ομάδα 1	MRS16, MRS52, MRS102, SDM225, SDM256
Ομάδα 2	MRS46
Ομάδα 3	MRS60, MRS84, SDM176
Ομάδα 4	MRS29, SDM258
Ομάδα 5	MRS19
Ομάδα 6	MRS37, SDM65

Μετά τον διαχωρισμό των στελεχών σε ομάδες με τη μέθοδο BOX-PCR, ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου.

Στην αριστερή στήλη του Πίνακα 3.12, αναρτώνται οι αριθμοί με τους οποίους έχουν καταχωρηθεί, στην τράπεζα του εργαστηρίου, τα βακτηριακά στελέχη και έχουν απομονωθεί με βάση το πρότυπο BOX-PCR (§ 2.6.2), ενώ στις υπόλοιπες στήλες καταγράφονται τα στελέχη των βακτηρίων μετά από ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA (§ 2.6.3) καθώς και οι κωδικοί αυτών. Στο προζύμι τύπου B, ανιχνεύτηκαν στελέχη του γένους *Lactobacillus*, συγκεκριμένα το στέλεχος *Lactobacillus brevis* (κωδικοί: MRS29, SDM258) και το στέλεχος *Lactobacillus siliginis* (κωδικός: MRS19) η ανίχνευση του οποίου επαληθεύεται και κατά τη δειγματοληψία του Δεκεμβρίου το 2007 στο συγκεκριμένο δείγμα. Τέλος ανιχνεύτηκαν στελέχη του γένους *Acetobacter*, όπως το στέλεχος *Acetobacter malorum* (κωδικοί: MRS16, MRS37, MRS46, MRS52, MRS60, MRS65, MRS84, MRS102, SDM176, SDM225, SDM256). Το ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις στο προζύμι B κυμάνθηκε μεταξύ 99 –100 %.

Πίνακας 3.12 Ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από το προζύμι Β και παίζουν σημαντικό ρόλο στο προζύμι.

Κωδικός στελέχους	Βακτήριο με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια <sup>β</sup>	% ταυτότητα αλληλουχίας <sup>γ</sup>	Αριθμός νουκλεοτιδίων <sup>δ</sup>	Κωδικός
MRS29	<i>Lactobacillus brevis</i> strain b3	99%	1733	FJ227316.1
	<i>Lactobacillus brevis</i> strain bh1*	99%	1733	FJ227309.1
SDM258	<i>Lactobacillus brevis</i> strain bh1	96%	1541	FJ227309.1
	<i>Lactobacillus brevis</i> strain b3*	96%	1537	FJ227316.1
MRS19	<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236	97%	1110	DQ168028.1
	<i>Lactobacillus siliginis</i> *	96%	1223	AB370882.1
MRS37	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	93%	970	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	93%	970	DQ523495.1
MRS84	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	100%	1716	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	100%	1712	DQ523495.1
MRS46	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	93%	1378	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	93%	1375	DQ523495.1
MRS102	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	100%	1712	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	100%	1709	DQ523495.1
SDM256	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m	99%	1677	EU096228.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123*	99%	1677	DQ523495.1
MRS16	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1736	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	99%	1738	EU096228.1
MRS52	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1744	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	100%	1744	EU096228.1
MRS60	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1694	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	99%	1696	EU096228.1
MRS65	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1703	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	99%	1707	EU096228.1
SDM176	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1716	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	99%	1718	EU096228.1
SDM 225	<i>Acetobacter malorum</i> strain A123	100%	1714	DQ523495.1
	<i>Acetobacter malorum</i> strain EW-m*	99%	1714	EU096228.1

<sup>α</sup> Κωδικός καταχώρησης των βακτηριακών στελεχών στην τράπεζα του εργαστηρίου και έχουν απομονωθεί με βάση το πρότυπο BOX-PCR

<sup>β</sup> Πλησιέστερο είδος με βάση την ομολογία της αλληλουχίας

<sup>γ</sup> % ποσοστό ταυτότητας αλληλουχίας με τον μικροοργανισμό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια υπάρχει στην υπάρχουσα τράπεζα στελεχών

<sup>δ</sup> Αριθμός νουκλεοτιδίων 16S rDNA γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην ευθυγράμμιση αλληλουχιών

\* Πλησιέστερο είδος με βάση την ομολογία της αλληλουχίας

Κατά την τελική έκθεση προόδου του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» (2007), είχε γίνει επίσης ποιοτική ανάλυση του προζυμιού Β, όπου απομονώθηκαν συνολικά 78 διαφορετικά στελέχη τα οποία αντιστοιχούν σε 21 είδη. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν οξικά βακτήρια που ανήκαν σε 6 διαφορετικά στελέχη του είδους *Acetobacter malorum* και σε 2 στελέχη *Gluconobacter oxydans*, καθώς και γαλακτικά βακτήρια που ανήκαν στα είδη: *Lactobacillus brevis* (1 στέλεχος), *Lactobacillus sanfranciscensis* (4 στελέχη), *Lactobacillus siliginis* (8 στελέχη), αλλά και 2 ομάδες στελεχών των οποίων η ταυτοποίηση ήταν εφικτή μόνο μέχρι το επίπεδο του γένους *Lactobacillus*.

**Πίνακας 3.13:** Συγκριτική ποιοτική ανάλυση των βακτηρίων που απομονώθηκαν στο προζύμι Β κατά τις δειγματοληψίες του Δεκεμβρίου το 2007 και 2008.

Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	1 <sup>η</sup> Δειγματοληψία Δεκέμβριος 2007	2 <sup>η</sup> Δειγματοληψία Δεκέμβριος 2008
<b>MEA</b>	<i>Lactobacillus siliginis</i> strain NBRC101315	Δεν έγινε
	* <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AUX077	Δεν έγινε
<b>MRS</b>	<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236	<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236
	-	<i>Lactobacillus brevis</i> strain b3
	-	* <i>Acetobacter malorum</i>
	* <i>Enterococcus faecium</i> strain Y105	-
<b>SDM</b>	-	<i>Lactobacillus brevis</i> strain bh1
	-	* <i>Acetobacter malorum</i>
	* <i>Stenotrophomonas sp.</i> L169	-

\* Στελέχη με τα υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης ανά θρεπτικό υπόστρωμα.

Όπως παρατηρείται στις δύο δειγματοληψίες του Δεκεμβρίου το 2007 και το 2008, κοινό στέλεχος ήταν το βακτήριο γαλακτικού οξέος *Lactobacillus siliginis*, το οποίο αναπτύχθηκε και στις δύο περιπτώσεις στο MRS θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ επίσης απομονώθηκαν τα στελέχη *Acetobacter malorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas sp.L169* και *Enterococcus faecium*.

Όσον αφορά τα ποσοτικά αποτελέσματα του προζυμιού Β κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008), αναλυτικά παραθέτονται ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων ανά g προζυμιού σε σύγκριση με τη δειγματοληψία το Δεκέμβριο του 2007.

**Πίνακας 3.14** Αριθμός βιώσιμων μονάδων βακτηρίων ανά g προζυμιού Β, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, κατά τη δειγματοληψία του Δεκεμβρίου 2007 και 2008.

Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα ανάκτησης μικροβιακού φορτίου	Δεκέμβριος 2007 Αριθμός βακτηριακών κυττάρων ανά g προζυμιού	Δεκέμβριος 2008 Αριθμός βακτηριακών κυττάρων ανά g προζυμιού
MRS	$2,1 \cdot 10^6$	$17 \cdot 10^5$
SDM	$6,7 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^5$

Η διακύμανση του βακτηριακού πληθυσμού, κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008), ήταν μεταξύ των τιμών  $6,8 \cdot 10^5$  και  $17 \cdot 10^5$  με διαφορά περίπου έναν λογάριθμο. Μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων απομονώθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS το Δεκέμβριο του 2007, σε σχέση με το SDM. Σε προηγούμενη δειγματοληψία που είχε πραγματοποιηθεί στο ίδιο δείγμα προζυμιού, είχε απομονωθεί μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων στο SDM παρά στο MRS. Επίσης διέφερε σημαντικά και ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων ανά g προζυμιού, όπου τότε ήταν της τάξης του  $6,7 \cdot 10^6$  για το SDM και  $2,1 \cdot 10^6$  για το MRS θρεπτικό υπόστρωμα.

Πιο αναλυτικά στον Πίνακα 3.15, καταγράφονται τα επιμέρους ποσοστά των στελεχών που απομονώθηκαν βάση BOX-PCR και της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA στο δείγμα προζυμιού Β.



**Πίνακας 3.15** Αριθμός βιώσιμων μονάδων ανά g προζυμιού Β καθώς και τα ποσοστά αυτών σε αντιστοιχία με το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κατά τη δειγματοληψία του Δεκεμβρίου 2008.

Θρεπτικό Υπόστρωμα	Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g	Στελέχη	Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων / g	Ποσοστό (%)
<b>MRS</b>	$17 \cdot 10^5$	<i>Lactobacillus brevis</i> strain b3	$0,7 \cdot 10^5$	4 %
		<i>Lactobacillus siliginis</i> strain M2-236	$0,2 \cdot 10^5$	1,0 %
		<b><i>Acetobacter malorum</i></b>	$16,1 \cdot 10^5$	<b>95 %</b>
<b>SDM</b>	$6,8 \cdot 10^5$	<i>Lactobacillus brevis</i> strain bh1	$0,1 \cdot 10^5$	1 %
		<b><i>Acetobacter malorum</i></b>	$6,7 \cdot 10^5$	<b>99 %</b>

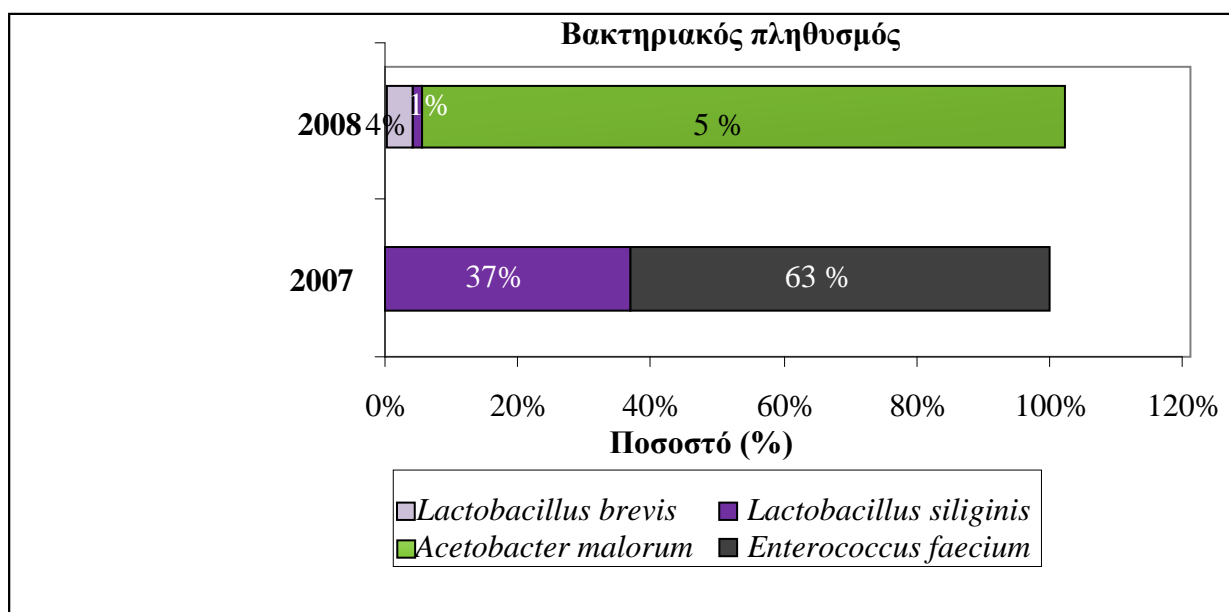
Κατά τη 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία, παρατηρήθηκε κυριαρχία του βακτηρίου οξικού οξέος, *Acetobacter malorum* σε ποσοστό 95 % και 99 % στο MRS και στο SDM αντιστοίχως. Απομονώθηκαν επίσης, σε μικρότερα ποσοστά, ο *Lactobacillus siliginis* στο MRS και ο *Lactobacillus brevis* και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στη δειγματοληψία τον Δεκέμβρη του 2007, είχε επίσης ανιχνευτεί ο *Lactobacillus siliginis* στο MRS με μεγαλύτερο ποσοστό (37 %) και στο MEA με μικρότερο (9 %) (Πίνακας 3.2).

### 3.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΟ ΠΡΟΖΥΜΙ

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα δείγματα προζυμιού εφόσον έχουν προηγηθεί αρκετές δειγματοληψίες, ήταν αναπόφευκτη, καθώς έχει ενδιαφέρον να απεικονιστούν οι διακυμάνσεις του βακτηριακού πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου.

Στην Εικόνα 3.4, παραθέεται σύγκριση του βακτηριακού πληθυσμού ανάμεσα στις 2 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν για το προζύμι Β στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

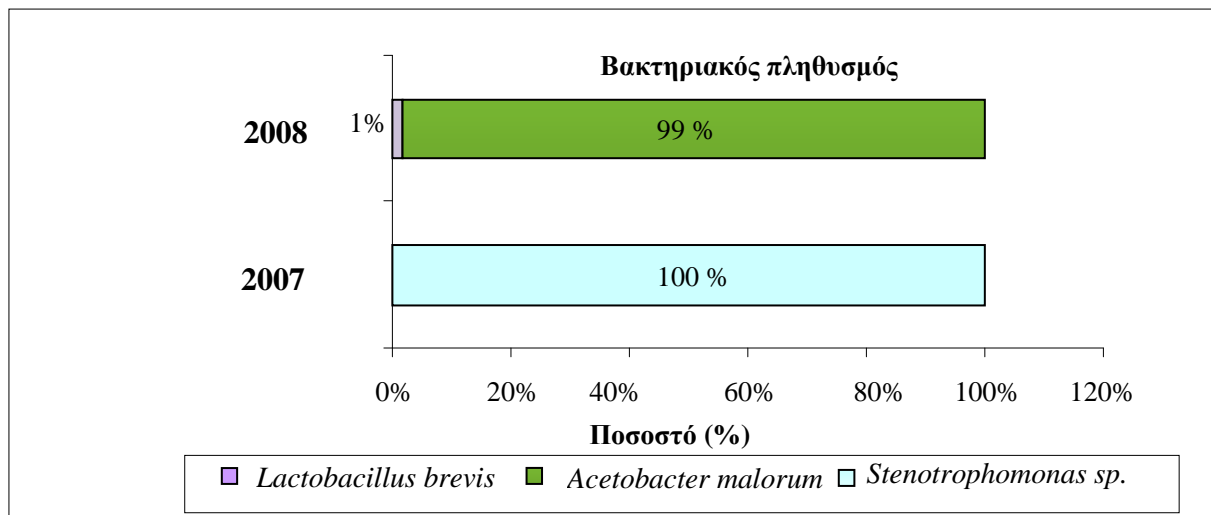
- **1η Δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2007) και 2η Δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008)**



**Εικόνα 3.4:** Βακτηριακή ποικιλότητα προζυμιού Β στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS.

Από την Εικόνα 3.4 προκύπτει ότι το μόνο κοινό στέλεχος που ανιχνεύτηκε και στις 2 δειγματοληψίες στο εκλεκτικό υπόστρωμα MRS είναι ο *Lactobacillus siliginis*. Στη δειγματοληψία του 2007 ανιχνεύτηκαν επίσης ο *Enterococcus faecium* (63 %), και στη δειγματοληψία του 2008 στέλεχη των ειδών *Lactobacillus brevis* (4 %) και *Acetobacter malorum* (95 %).

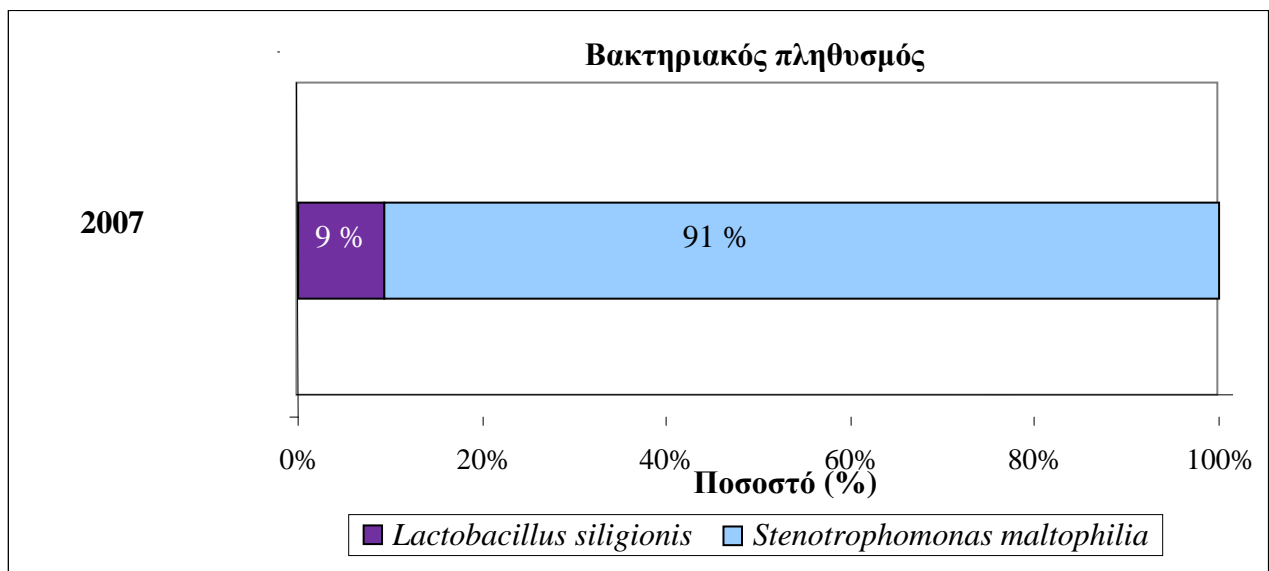
Στην Εικόνα 3.5 πιο συγκεκριμένα παραθέτονται τα συγκριτικά αποτελέσματα του βακτηριακού πληθυσμού μεταξύ των 2 δειγματοληψιών (Δεκέμβριος 2007 και Δεκέμβριος 2008) που πραγματοποιήθηκαν στο προζύμι Β και απομονώθηκαν στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SDM.



**Εικόνα 3.5:** Βακτηριακή ποικιλότητα προζυμιού Β στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα SDM.

Στο SDM, και στις δύο δειγματοληψίες παρατηρούνται μόνο διαφορές μεταξύ των απομονωθέντων μικροοργανισμών. Αξιοσημείωτη είναι, η ανίχνευση του *Stenotrophomonas sp.* (100 %) μόνο κατά τη δειγματοληψία του 2007 ενώ κατά τη δειγματοληψία του 2008, απομονώθηκαν τα βακτήρια *Lactobacillus brevis* (1 %) και *Acetobacter malorum* (99 %).

➤ **Δειγματοληψία -Δεκέμβριος 2007**



**Εικόνα 3.6:** Βακτηριακή ποικιλότητα προζυμιού Β στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA.

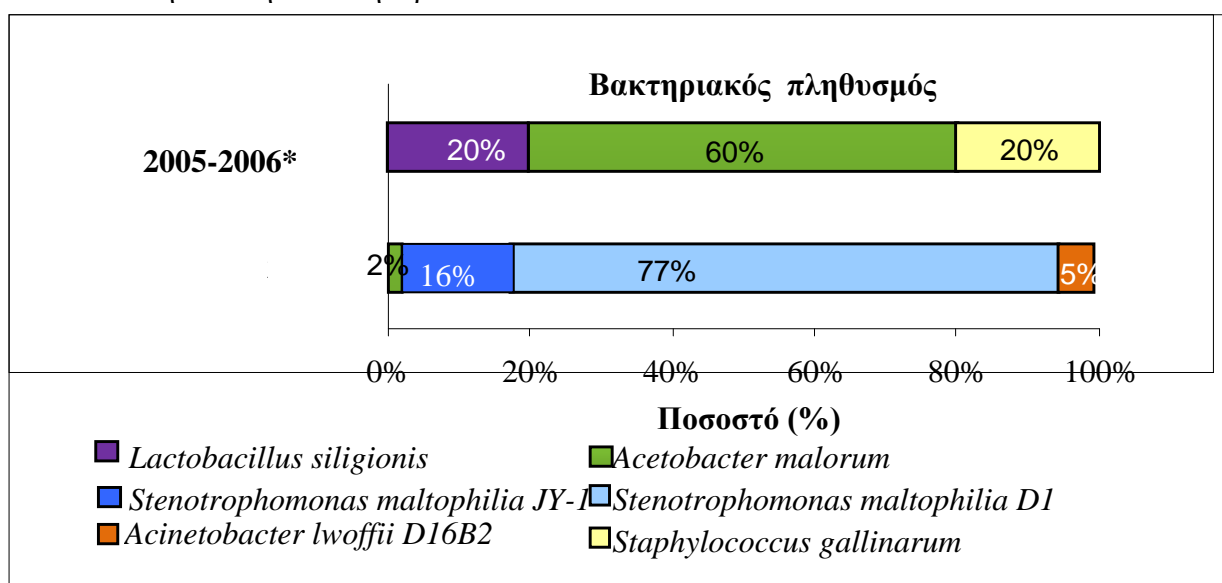
Στην Εικόνα 3.6, καταγράφονται τα ποσοστά του βακτηριακού πληθυσμού στο προζύμι Β σε θρεπτικό υπόστρωμα MEA μόνο κατά τη δειγματοληψία του 2007, καθώς στη δειγματοληψία του 2008 δε χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο εκλεκτικό

θρεπτικό υπόστρωμα. Απομονώθηκαν τα στελέχη *Lactobacillus siliginis* (9 %) και *Stenotrophomonas maltophilia* (91 %).

Ανάλογα λοιπόν με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τη δειγματοληψία του προζυμίου Β, οι επιμέρους πληθυσμοί των βακτηρίων για τις δειγματοληψίες του Δεκεμβρίου 2007 και του Δεκεμβρίου 2008 κυμάνθηκαν στο MRS και SDM θρεπτικό υπόστρωμα αντίστοιχα: Α) Δειγματοληψία (2007) στο MRS: *Lactobacillus siliginis* (37 %) και *Enterococcus faecium* (63 %) ενώ στο SDM: στελέχη του γένους *Stenotrophomonas* (100 %). Κατά τη συγκεκριμένη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA όπου απομονώθηκαν τα στελέχη *Lactobacillus siliginis* (9 %) και *Stenotrophomonas maltophilia* (91 %). Β) Δειγματοληψία (2008) στο MRS: *Lactobacillus brevis* (4 %), *Lactobacillus siliginis* (1%) και *Acetobacter malorum* (95 %), ενώ στο SDM: *Lactobacillus brevis* (1 %) και *Acetobacter malorum* (99 %).

Τα αποτελέσματα για το προζύμι Γ παραθέτονται στις Εικόνες 3.7 και 3.8, όπου έγινε σύγκριση της βακτηριακής ποικιλότητας του δείγματος Γ στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα MRS και SDM, μεταξύ των δειγματοληψιών 2007 και των προηγούμενων δειγματοληψιών (2005-2006) που αναφέρονται στην τελική έκθεση προόδου του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» (2007).

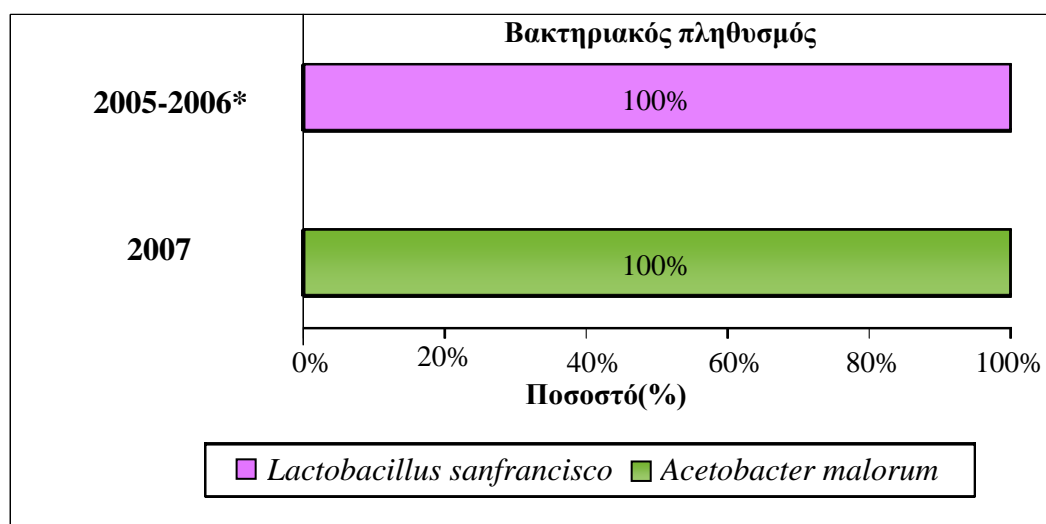
- **Δειγματοληψίες: Δεκέμβριος 2007** (1η) και Δειγματοληψίες (2005-2006) στη Τελική Έκθεση Προόδου 2007\*



**Εικόνα 3.7:** Βακτηριακή ποικιλότητα προζυμίου Γ στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS

Κατά τη 1η δειγματοληψία (2007) στο δείγμα προζυμιού Γ απομονώθηκαν στο MRS τα στελέχη *Acetobacter malorum* (2 %), *Stenotrophomonas maltophilia* D1 (77 %), *Stenotrophomonas maltophilia* JY-1 (17 %) και *Acinetobacter lwoffii* (5 %), και ενώ στο SDM το στέλεχος *Acetobacter malorum* (100 %).

Όσον αφορά στις προηγούμενες δειγματοληψίες που αναφέρονται στην τελική έκθεση προόδου του προγράμματος\* με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» (2007), τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης και για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα, έδειξαν ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά των επιμέρους ειδών βακτηρίων στο δείγμα Γ κατείχαν, τα βακτήρια *Lactobacillus siliginis* (20 %), *Acetobacter malorum* (60 %), *Staphylococcus gallinarum* (20 %) στο MRS θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ στο SDM ο μικροοργανισμός *Lactobacillus sanfranciscensis* (100 %).



**Εικόνα 3.8:** Βακτηριακή ποικιλότητα προζυμιού Γ στο θρεπτικό υπόστρωμα SDM.

Ωστόσο, οι εικόνες (3.7) και (3.8) αποτελούν μια ένδειξη της μικροβιακής ποικιλότητας στο δείγμα προζυμιού Γ, διότι παρατηρείται ετερογένεια στο βακτηριακό πληθυσμό και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Στο MRS, στην 1<sup>η</sup> δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2007) κυριαρχούν στελέχη του γένους *Stenotrophomonas* και σε μικρά ποσοστά το βακτήριο οξικού οξέος *Acetobacter malorum*.

Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006) κατά το πρόγραμμα με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» και παραθέτεται στην τελική έκθεση προόδου το 2007, ανιχνεύτηκαν στελέχη των ειδών *Acetobacter malorum* σε ποσοστό (60 %) και σε μικρότερα ποσοστά *Lactobacillus siliginis* και *Staphylococcus gallinarum*. Στο SDM ανιχνεύτηκαν αναμενόμενα βακτήρια για τα δείγματα προζυμιού, καθώς στην 1<sup>η</sup> δειγματοληψία απομονώθηκε το βακτήριο *Acetobacter malorum* σε ποσοστό (100 %) και στη τελική έκθεση προόδου του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής» (2007), απομονώθηκε το LAB βακτήριο *Lactobacillus sanfrancisco* και αυτό σε ποσοστό (100 %).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πάνω από ένα αιώνα η συγκεκριμένη βιομηχανία χρησιμοποιεί το ίδιο προζύμι με σκοπό να διατηρεί σταθερά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων της. Το προζύμι περιλαμβάνει στη σύστασή του μια ενεργή καλά οργανωμένη και ισορροπημένη μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από βακτήρια και ζυμομύκητες. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός του βακτηριακού πληθυσμού (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση) των δειγμάτων προζυμιού ώστε να εντοπιστούν τυχόν εποχιακές διακυμάνσεις των πληθυσμών των βακτηρίων, καθώς και αλλαγές στην ποιοτική μικροβιακή σύσταση του προζυμιού.

Κατά την ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, τον Δεκέμβρη του 2007, μελετήθηκε το προζύμι δύο διαφορετικών σταδίων (Εικόνα 2.1), σταδίου Β (3 h, 25 °C) και σταδίου Γ (19 h, 18 °C) και έγινε εκτίμηση της διακύμανσης του βακτηριακού πληθυσμού. Στην 1η δειγματοληψία (2007), έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός και οι αναλύσεις έδειξαν ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων ήταν της τάξεως του  $10^6$  cfu / g και για τους δυο τύπους προζυμιού (Β και Γ). Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία τον Δεκέμβρη του 2008, παρατηρήθηκε διαφορά της τάξης του ενός λογαρίθμου στον βακτηριακό πληθυσμό, μόνο για το δείγμα τύπου Β. Αξίζει να αναφερθεί ότι, κατά την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2007) στα δείγματα προζυμιού Β και Γ αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν 950 περίπου απομονώσεις ανά δείγμα. Κατά τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2008), ο αριθμός των απομονώσεων ήταν περίπου 200 για το δείγμα προζυμιού Β.

Και στις 2 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, κυρίαρχα γένη βακτηρίων ήταν τα *Lactobacillus*, *Stenotrophomonas* και *Acetobacter*. Πιο αναλυτικά, το στέλεχος *Lactobacillus siliginis* απομονώθηκε μόνο στο προζύμι Β σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα και στις 2 δειγματοληψίες σε ποσοστό που κυμαινόταν μεταξύ 1-37 % επί του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων. Ο μικροοργανισμός *Acetobacter malorum* απομονώθηκε κατά τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία (2008), στο προζύμι Β σε ποσοστό 95 % στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS και στο SDM στην ίδια δειγματοληψία σε ποσοστό 99 %.

Στο προζύμι Γ κατά τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία ο ίδιος μικροοργανισμός επίσης απομονώθηκε στο SDM σε ποσοστό 100 %. Το στέλεχος *Stenotrophomonas maltophilia* ανιχνεύτηκε κατά τη 1<sup>η</sup> δειγματοληψία στο προζύμι Β, σε ποσοστό 91 % στο ΜΕΑ και στο προζύμι Γ στο ΜRS θρεπτικό υπόστρωμα σε ποσοστό 77 %.

Το 2007, στο Πρόγραμμα με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», έγιναν 3 δειγματοληψίες (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006) κατά το οποίο κυρίαρχα γένη βακτηρίων στο προζύμι τύπου Γ, βρέθηκαν να είναι τα *Lactobacillus* στο SDM θρεπτικό υπόστρωμα με είδη τα *Lactobacillus siliginis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfranciscensis* και στο θρεπτικό υπόστρωμα ΜRS ο μικροοργανισμός *Acetobacter malorum*. Φαίνεται λοιπόν σε όλες τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, ανεξαρτήτως χρονικής περιόδου, να ανιχνεύονται ως επί των πλείστον ίδια γένη βακτηρίων με μικρές διαφορές στα είδη αυτών.

Σύμφωνα με έρευνα του Scheirlinck και συνεργάτες (2007), στα πρώτα στάδια της ζύμωσης ανιχνεύονται μικροοργανισμοί που κανονικά δεν θα έπρεπε να εντοπίζονται στο προζύμι, δηλαδή μικροοργανισμοί που συνήθως απαντώνται στον αέρα, στο έδαφος, κ.α. Αναφέρεται κυρίως σε είδη των γενών *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc* τα οποία προσφέρουν γρήγορη μείωση του pH. Παράδειγμα αποτελεί ο συχνής παρουσίας μικροοργανισμός *Enterococcus faecium*, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί από πολλούς ερευνητές.

Στην παρούσα ερευνά απομονώθηκε από το προζύμι σταδίου Β, κατά την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία, το στέλεχος *Enterococcus faecium* σε ποσοστό 63 % στο θρεπτικό υπόστρωμα ΜRS. Αντίστοιχα ποσοστά ανίχνευσης του συγκεκριμένου στελέχους, σε όλα τα δείγματα, βρέθηκαν και στην έρευνα του Weckz και των συνεργατών του το 2010, οι οποίοι απομόνωσαν το συγκεκριμένο στέλεχος κατά την παρασκευή προζυμιού μόνο μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και 5<sup>ης</sup> ημέρας. Επίσης σε έρευνα του Savic και των συνεργατών του (2007) σε δείγματα προζυμιού, το ποσοστό των LAB αγγίζει το 78 % ενώ ο πληθυσμός του γένους *Enterococcus* το 26 %.

Η συχνή παρουσία του στελέχους *Enterococcus faecium* σε προζύμι διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, μπορεί να προέρχεται είτε από το έδαφος, το σιτάρι είτε από το νερό. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, εντερόκοκκοι βρέθηκαν σε δείγματα προζυμιού σε έρευνα της Girrafa (2003) σε ποσοστό ακόμα και 50 %, επίσης οι Robert και συνεργάτες (2009) καθώς και οι Kitahara και συνεργάτες (2005),



απομόνωσαν το συγκεκριμένο στέλεχος στα περισσότερα από τα δείγματα προζυμιού που επεξεργάστηκαν. Τέλος σε έρευνα, των Foulquié και συνεργάτες (2006), αναφέρεται ότι σε πάρα πολλές χώρες οι εντερόκοκκοι χρησιμοποιούνταν σε διάφορα τρόφιμα ως προβιοτικά.

Σε δείγματα προζυμιού έχουν επίσης ανιχνευτεί, σε πολλές έρευνες (Corsetti and Settanni, 2007, Konzliniskis και συνεργάτες, 2008), στελέχη του *Bacillus spp.*, και σύμφωνα με τους Menten and Rkcelik (2007), η παρουσία τους προκαλούσε αλλοίωση των προϊόντων ζύμης, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό και την κολλώδη υφή των θρυμμάτων.

Ο De Vuyst και οι συνεργάτες (2008), ήταν οι πρώτοι επιστήμονες, που ανίχνευσαν είδη του γένους *Acetobacter* στο προζύμι, καθώς συνηθίζεται να ανιχνεύεται στο κακάο και στο κρασί. Στην παρούσα έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο προζύμι Γ, ανιχνεύτηκε το στέλεχος *Acetobacter malorum* EW-m στο θρεπτικό υπόστρωμα SDM και το στέλεχος *Acetobacter malorum* A123 στο θρεπτικό υπόστρωμα MRS σε ποσοστά 100 % και 2 % αντίστοιχα. Κατά την 2<sup>η</sup> δειγματοληψία, το 2008, στο προζύμι Β απομονώθηκαν τα ίδια ακριβώς στελέχη σε ποσοστά 99 % στο SDM και 95 % στο MRS.

Σε σύγκριση με την Τελική Έκθεση Προόδου (2007) του προγράμματος με τίτλο «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», κατά το οποίο έγιναν δειγματοληψίες (Ιούλιος 2005, Φεβρουάριος 2006 και Οκτώβριος 2006) στο προζύμι Γ, είχε απομονωθεί το στέλεχος *Acetobacter malorum* σε ποσοστό 60 % στο MRS, ενώ στο προζύμι Α, είχε βρεθεί ο ίδιος μικροοργανισμός την ίδια χρονική περίοδο σε μικρότερο βέβαια ποσοστό 18,7 %. Επιβεβαιώνεται με αυτόν τον τρόπο, η παρουσία του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε όλα τα στάδια της διαδικασίας παραγωγής προζυμιού, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και σε υψηλό ποσοστό.

Αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό του γένους *Stenotrophomonas* κατά τη 1<sup>η</sup> δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2007) στο προζύμι σταδίου Β: όπου ανιχνεύτηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα MEA σε ποσοστό 91 % και στο SDM σε ποσοστό 100 %, στο προζύμι Γ: ανιχνεύτηκε στο MRS σε ποσοστό 92 %. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την έρευνα των Scheirlinck και συνεργάτες (2007), οι οποίοι ανέφεραν ότι η παρουσία του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στο προζύμι σχετίζεται άμεσα με το αλεύρι, καθώς είναι γνωστό πως δεν είναι αποστειρωμένο.

Ο Cauvain (2003α) καθώς και ο De Vuyst και συνεργάτες (2008) παρατήρησαν πως η σύνθεση του πληθυσμού των λακτοβακίλων σαφέστατα επηρεάστηκε από το είδος του αλεύρου καθώς και από τα υπόλοιπα συστατικά, αλλά πολύ περισσότερο επηρεάστηκε από το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του προζυμιού. Ωστόσο, παραμένει ασαφές με ποιόν τρόπο, όλα όσα προαναφέρθηκαν, καθώς και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, επηρεάζουν τη σύνθεση και τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού του προζυμιού με το πέρασμα του χρόνου.

Πολύ ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία της ζύμωσης όπως αναφέρουν στην έρευνά τους Ganzle και συνεργάτες (2004), έπαιξαν παράμετροι όπως η θερμοκρασία, καθώς η αύξησή της μείωσε τον δείκτη ζύμωσης (FQ), ενώ αυξήθηκε παράλληλα η παραγωγή του οξικού και του γαλακτικού οξέος.

Καθοριστικό ρόλο στον ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών, παίζουν και οι τιμές του pH. Σύμφωνα με έρευνα του Scheirlinck και συνεργάτες (2007), το πρώτο 12ωρό καθώς και την τελευταία ημέρα της διαδικασίας, οι τιμές του pH παρέμειναν σταθερές ( $\text{pH} > 5$ ), ιδανικές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κυρίως των γενών *Enterococcus* και *Lactococcus*. Στη συνέχεια σιγά σιγά μειώθηκαν σε  $\text{pH} < 4$  όπου ανιχνεύθηκαν κυρίως στελέχη του γένους *Lactobacillus*. Μεταξύ των στελεχών του συγκεκριμένου γένους υπάρχει σαφής ανταγωνισμός με συνέπεια την παραγωγή οξέων (γαλακτικό και οξικό οξύ) και τη σαφή μείωση του pH, δημιουργώντας το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων στο προζύμι.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *Enterococcus faecium* το οποίο ανιχνεύτηκε στην παρούσα εργασία κυρίως στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και του οποίου η συμβολή στη μείωση του pH είναι σημαντική. Πρέπει να διευκρινιστεί όμως ότι, δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των τιμών του pH και της διάρκειας ζωής των προϊόντων ζύμης, αλλά η επιμήκυνση της διάρκειας ζωής αυτών των προϊόντων έχει να κάνει αποκλειστικά με τον τύπο και το ποσό των οξέων που παράγονται κατά τη ζύμωση. Όπως παραθέεται σε έρευνα της Kaditzky (2008), τα υψηλά επίπεδα τιμών οξικού οξέος οδηγούν σε παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων ζύμης.

Η ποιοτική διαφορά στη σύσταση του προζυμιού η οποία σημειώτεον υπήρχε ακόμα και ανάμεσα στα διάφορα δείγματα προζυμιού της ίδιας δειγματοληψίας ήταν κάτι αναμενόμενο, αφού τα συστατικά του και ο χώρος παρασκευής δεν ήταν αποστειρωμένα. Παρ' όλα αυτά στη διάρκεια του χρόνου, οι πληθυσμοί των βακτηρίων μπορεί να αυξομειώνονταν με αποτέλεσμα κάποιες φορές να βρίσκονταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιούνταν, όμως διατηρήθηκε η σταθερότητα του δείγματος και η γενικότερη μεταβολική δραστηριότητα, παρ' όλο που η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού ποικίλει ανάλογα με τη στιγμή της δειγματοληψίας στο διάγραμμα παραγωγής προϊόντων προζυμιού.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ❖ Κατά τη διαδικασία παραγωγής προζυμιού πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες απ' όπου εξετάστηκαν δείγματα προζυμιού δύο διαφορετικών σταδίων και απομονώθηκαν μικροοργανισμοί με κυρίαρχα γένη βακτηρίων, τα *Lactobacillus*, *Acetobacter* και *Stenotrophomonas*, και συγκεκριμένα τα είδη *Lactobacillus siliginis*, *Acetobacter malorum* και *Stenotrophomonas maltophilia* αντίστοιχα.
- ❖ Παρατηρήθηκε ανάπτυξη των βακτηρίων οξικού οξέος σε μεγαλύτερα ποσοστά απ' ότι των βακτηρίων γαλακτικού οξέος.
- ❖ Στα δείγματα προζυμιού του συγκεκριμένου ερευνητικού έργου εντοπίστηκαν στελέχη του γένους *Enterobacter* και *Stenotrophomonas*, η παρουσία των οποίων δεν θα πρέπει να δημιουργεί ανησυχία, διότι έχουν ανιχνευτεί σε πολλές πρόσφατες έρευνες στο προζύμι διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών και προφανώς προέρχονται από το αλεύρι ή το νερό και δεν δημιουργούν πρόβλημα στο τελικό προϊόν όταν ανιχνεύονται σε χαμηλά ποσοστά.

- ❖ Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, ποσοτικά το μικροβιακό φορτίο του προζυμιού παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα ανεξάρτητα από το στάδιο διαχείρισης.
- ❖ Η ποιοτική σύσταση του προζυμιού αλλάζει ανάλογα με το στάδιο του προζυμιού και τον χρόνο της δειγματοληψίας χωρίς όμως να έχει επιδράσεις στις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των LAB βακτηρίων και των ζυμομυκήτων αλλά και στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν τα ίδια ή παρόμοια μεταβολικά μονοπάτια.

## Βιβλιογραφία

### Ξένη Βιβλιογραφία

1. **Arendt E. K., Ryan Liam A. M. and Dal Bello F.** (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, volume 24: 165-174.
2. **Atlas R.M.** (1993) *Handbook of Microbiological Media*, Parks L.C. (Ed) CRC Press Inc. USA.
3. **Azar M., Ter-Sarkissian N., Ghavifek H., Ferguson T. and Ghassemi H.** (1977) Microbiological aspects of Sangak bread. *Journal of Food Science and Technology* 14: 251–254
4. **Barber S. and Báguena R.** (1989) Microflora de la masa madre panaria. XI. Evolución de la microflora de masas madre durante el proceso de elaboración por el sistema de ‘refrescos’ sucesivos y de sus correspondientes masa panarias. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 29: 478–491.
5. **Barber S., Báguena R., Martínez-Anaya M.A. and Torner M.J.** (1983) Microflora de la masa madre panaria. I. Identificación y propiedades funcionales de microorganismos de masas madre industriales, elaboradas con harina de trigo. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 23: 552–562.
6. **Berry, D.R.** (1982) *The Biology of Yeast*, ed: Arnold E., London, UK.
7. **Böcker G., Stolz P., and Hammes W. P.** (1995) Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der saureteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl Brot* 49:370-374.

8. **Boraam F., Faid M., Larpent J.P. and Breton A.** (1993) Lactic acid bacteria and yeasts associated with traditional sourdough Moroccan bread. *Sciences des Aliments* 13: 501–509.
9. **Calvel, R., MacGuire, J.J. and Wirtz, R.L.** (2001) *The taste of bread*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
10. **Carr FJ., Chill D., and Maida N.** (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.*28(4):281-370
11. **Cauvain S.P.** (2003 $\alpha$ ) Bread in the future. In: *Bread making by Cauvain S.P.*, p.6-7. Woodhead publishing limited , England.
12. **Cauvain S.P.** (2003 $\beta$ ) Breadmaking, an overview. In: *Bread making by Cauvain S.P.*, p. 15. Woodhead publishing limited, England.
13. **Cauvain S.P.** (2003 $\gamma$ ) The role of the water in dough formation and bread quality. In: *Bread making by Cauvain S.P.*, p.317. Woodhead publishing limited, England.
14. **Coppola S., Pepe O., Masi P. and Sepe M.** (1996) Characterization of leavened doughs for pizza in Naples. *Advances in Food Science* 18: 160–162.
15. **Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N. and Gobbetti M.** (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 64: 95–104.
16. **Corsetti A. and Settanni L.** (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International* 40, 539-558.

17. **Cotter P.D., Hill C. and Ross P.** (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3: 777-788.
18. **De Angelis M. and Gobbetti M.** (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review, *Proteomics* 4: 106-122.
19. **De Angelis M., Gobbetti M., Cagno R., Gallo G., Curci M., Siracusa S., Crecchio C. and Parente E.** (2007) Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology* 114: 69-82.
20. **Demain L.A. and Davies E. J.** (1999) Bacteriocin from LAB, *Manual of industrial Microbiology and Biotechnology* (2<sup>nd</sup> Edition), 795.
21. **De Vuyst L. and Neysens P.** (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology* 16: 43-56.
22. **De Vuyst L., Vancanneyt M., Schrijvers V., Paramithiotis S., Hoste B., Swings J., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., and Messens W.** (2002) The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation, *Appl Environ Microbiol.*68: 6059–6069.
23. **De Vuyst L. and Vancanneyt M.** (2007) Biodiversity and identification of sourdough Lactic Acid Bacteria, *Food Microbiology* 24: 120-127
24. **De Vuyst L., Vancanneyt M., Ilse S., Meulen R., Schoor A.V., Vandamme P. and Huys G.** (2008) Taxonomy structure and stability of the bacterial community in the Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 74: 2414-2423.

25. **Escalante A., Wachter C. and Farres A.** (2001) Lactic Acid Bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 64: 21–31.
26. **Faid M., Boraam F., Zyani I. and Larpent, J.P.** (1994) Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 198: 287–291.
27. **Fang F. and O Toole PW.** (2009) Genetic tools for investigating the biology of commensal lactobacilli. *Frontiers in Bioscience* 14: 3111-3127.
28. **Foschino R., Terraneo R., Mora D. and Galli A.** (1999) Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Italian Journal of Food Science* 11: 19–28.
29. **Foulquié Moreno MR., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. And De Vuyst L.** (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 1-24.
30. **Galani I., Drainas C. and Typas, M.A.** (1985) Growth requirements and the establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology letters*. 7, 673-678.
31. **Galli A., Franzetti L. and Fortina M. G.** (1988) Isolation and identification of sour dough microflora. *Microbiologie–Aliments–Nutrition* 6: 345–351.
32. **Galli A. and Ottogalli G.** (1973) Aspetti della microflora degli impasti panettone. *Annali di Microbiologia e Enzimologia* 23: 39–49.
33. **Ganzle G. M., Hammes W. P. and Stolz P.** (1996) Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Adv. Food Sci.* 18:176-184.



- 34. Ganzle G. M., Thiele C. and Vogel R.F.** (2002) Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal Chem.* 79 (1)Q45-51
- 35. Ganzle G. M., Hammes W. P. and Brandt J.M.** (2004) Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur. Food Res Technol* 218: 333-338.
- 36. Ganzle G. M., Vermeulen N. and Vogel F. R.** (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough, *Food microbiology* 24: 128-138.
- 37. Carvalho CG., Marques MP, Fernandes P. and Da Fonseca MM.** (2004) A simple imaging method for biomass determination, *J. Microbiol Methods* 1: 135-140.
- 38. Gatto V. and Torriani, S.** (2004) Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Annals of Microbiology.* 54, 31-42.
- 39. Gerez C.L., Torino M.I, Obregozo M.D and Font de Valdez** (2010) A ready to use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. *J. Food Prot.*, 73:758-762
- 40. Giraffa G** (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 215-222. Gobbetti M (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.*, 9: 267-274.
- 41. Gobbetti M.** (1998) The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology* 9: 267-274.

- 42. Gobbetti M., Corsetti A. and Rossi J.** (1994) The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 275–279.
- 43. Gobbetti M. and Corsetti A.** (1997) *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology* 14: 175-188.
- 44. Gobbetti M., Corsetti A., De Angelis M., and Di Cagno R.** (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 16: 57-69.
- 45. Hamad S.H., Böcker G., Vogel R.F. and Hammes W.P.** (1992) Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kisra production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 728–731.
- 46. Hamad S.H., Dieng M.C., Ehrmann M.A. and Vogel R.F.** (1997) Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83: 764–770.
- 47. Haught C., Wilkinson D.L., Zgafas K. and Harrison R.G.** (1994) A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. *Biotechniques* 16: 46-48.
- 48. Holzapfel H.W., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. and Schillinger U.** (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, No. 2: 365S-373s.
- 49. Hsiao-Chuan Chang,<sup>1</sup> Chiy-Rong Chen,<sup>1</sup> Juey-Wen Lin,<sup>2</sup> Gwan-Han Shen,<sup>3</sup> Kai-Ming Chang,<sup>3</sup> Yi-Hsiung Tseng,<sup>1,4\*</sup> and Shu-Fen Weng<sup>1\*</sup>.** (2005) Isolation and Characterization of Novel Giant *Stenotrophomonas maltophilia* Phage  $\Phi$ SMA5. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1387-1393.

- 50. Hui Y., Corke H., Nip W. and De Leyn I.** (2006) Bakery products: science and technology. Blackwell Publishing Iowa USA, pp 176-178.
- 51. Infantes M. and Tourneur C.** (1991) Etude de la flore lactique de levains naturels de panification provenant de differentes regions francaises. Sciences des Aliments 11: 527–545.
- 52. Kaditzky Susanne** (2008) Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria. Doctoral thesis, Technische Universität München.
- 53. Karlson P., Doenecke D. and Koolman J.** (1998) Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, (231-233).
- 54. Katina, K.** (2005) Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and self-life of the wheat bread. VTT Technical Research Centre of Finland.
- 55. Kazanskaya L.N., Afanasyeva O.V. and Patt V.A.** (1983) Microflora of rye sours and some specific features of its accumulation in bread baking plants of the USSR. In J. Holas, F. Kratochvil, Developments in food science. Progress in cereal chemistry and technology (Vol. 5B) (pp. 759–763). London: Elsevier.
- 56. Kirsop E.B.** (1991) In: Maintenance of microorganisms and culture cells-a manual of laboratory methods 2<sup>d</sup> edition, ed: Kirsop and Doyle, pp 166-167, Academic Press, London, U.K.
- 57. Kitahara M., Sakata S. and Benno Y.** (2005) Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from five sourdoughs. Applied Microbiology 40:353-357.
- 58. Kline L. and Sugihara T.F.** (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. Applied Microbiology 21: 459–465.

- 59. Konzliniskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D.** (2008) Characterization of rye sourdough microflora. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Foodbalt p. 89- 93.
- 60. Lacaze G., Wick M. and Cappelle S.** (2007) Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. Food Microbiology 24: 155-160
- 61. Lane D.J.** (1991) 16S / 23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 115-175.
- 62. Lönner C., Welander T., Molin N., Dostalek M. and Blickstad E.** (1986) The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. Food Microbiology 3: 3–12.
- 63. Lönner C. and Preve-Akesson K.** (1989) Effects of lactic acid bacteria on the properties of sour dough bread. Food Microbiology 6: 19-35.
- 64. Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J.** (2005) Brock Βιολογία των μικροοργανισμών, τόμος 1, 12: 411-412, 464-467, τόμος 2, 30:1108, 1110-1112, 1126-1128.
- 65. Makarova K. S. and Koonin E. V.** (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology 189, 4:1199-1208.
- 66. Martín C. P., Pijpekamp A., Vliet T., Jongh H.H.J, Plijterand J.J. and Hamer R.J.** (2006) The role of the gluten network in the crispness of bread crust, Journal of Cereal Science, Volume 43, Issue 3, Pages 342-352.
- 67. Mayo B., Van D. Sinderen and Ventura M.** (2008) Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid - Producing Bacteria: From Basics to Applications. Curr Genomics 9(3): 169-183.

- 68. Mc Donald L.C., McFeeters R.F., Daeschel M.A. and Fleming H.P.** (1987) A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 5: 1382-1384.
- 69. Mentos O. and Rkcelik M.** (2007) Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. *Food contro* 8(4) :359-363.
- 70. Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M. and Hammes W.P.** (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 475–482.
- 71. Müller M.R.A., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M.A. and Vogel R.F.** (2001) Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiology* 18: 217–227.
- 72. Randazzo Cl., Heilig H., Restuccia C., Giudici P. and Caggia C.** (2005) Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *Journal of Applied Microbiology* 99: 251-258.
- 73. Rehman S., Paterson A. and Piggott J.R.** (2006) Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science and Technology* 17: 557-566.
- 74. Rehman S., Nawaz H., Sarfraz H., Ahmad M. M., Mian Anjum Murtaza M. A. and Ahmad M.C.** (2007) Effect of Sourdough Bacteria on the Quality and Shelf Life of Bread, *Pakistan Journal of Nutrition*, 562-565.
- 75. Robert H., Gabriel V. and Fontagne-Faucher C.** (2009) Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology* 135: 53-59.

- 76. Rocha J.M. and Malcata F.X.** (1999) On the microbiological profile of traditional Portuguese sourdough. *Journal of Food Protection* 62: 1416–1429.
- 77. Rosenquist H. and Hansen A.** (2000) The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiology* 17: 241–250.
- 78. Sadeghi A.** (2008) The Secrets of Sourdough; A Review of Miraculous Potentials of Sourdough in Bread Shelf Life, *biotechnology* 3: 413-417.
- 79. Salehifar M. and Shahedi M.** (2007) Effects of Oat Flour on Dough Rheology, Texture and Organoleptic Properties of Taftoon Bread, *J. Agric. Sci. Technol.* (2007) Vol. 9: 227-234
- 80. Salovaara H. and Katunpää H.** (1984) An approach to the classification of Lactobacilli isolated from Finnish sour rye dough ferments. *Acta Alimentaria Polonica* 10: 231–239.
- 81. Savic D., Savic T., Skrinjar M. and Jokovic N.** (2007) Profile of Lactic Acid Bacteria in rye flour and sourdough. *Journal of Culture Collections* 5: 38-45.
- 82. Scheirlinck Ilse, Van der Meulen R., Van Schoor A., Huys G., Vancanneyt M., Vandamme P. and De Vuyst L.** (2007) Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and spelt Sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* 73: 4741-4750
- 83. Schuenemann C. and Treu G.** (1999) Guidelines for Bread and Small Baking Goods, *Technologie der Backwarenherstellung* 25: 5-8.

- 84. Spicher G.** (1959) Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in Sauerteigen anzutreffenden stabchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitblatt für Bakteriologie II Abt*, 113: 80–106.
- 85. Spicher G.** (1984) Weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Mikroflora handelsüblicher Sauerteig-Starter. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 178: 106–109.
- 86. Spicher G.** (1987) Die Mikroflora des Sauerteiges. XXII. Mitteilung: Die in Weizensauerteigen vorkommenden *Lactobacillen*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 184: 300–303.
- 87. Spicher G. and Lönner C.** (1985) Die Mikroflora des Sauerteiges. XXI. Mitteilung: Die in Sauerteigen schwedischer Backereien vorkommenden *Lactobacillen*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 181: 9–13.
- 88. Spicher G. and Schröder R.** (1978) Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in Reinzucht-Reinzuchtsauern' anzutreffenden stabchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 167: 342–354.
- 89. Spicher G., Schröder R. and Schöllhammer K.** (1979) Die Mikroflora des Sauerteiges. VII. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in 'Reinzuchtsauern' auftretenden Hefen. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 169: 77–81.
- 90. Stear, C.A.** (1990) Effects of dough additives In: *Handbook of breadmaking technology*. pp. 542, Elsevier Applied Science, New York, USA.
- 91. Vela G. R.** (1997) Bread, *Applied food microbiology* 11: 290

- 92. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. and Lupski J.R.** (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Cellular and Molecular Biology* 5: 25-40.
- 93. Vogel F.R., Knorr R., Müller MR, Steudel U., Ganzle M.G. and Ehrmann A.** (1999) Non-diary lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 403-411.
- 94. Vollmar A. and Meuser F.** (1992) Influence of starter cultures consisting of lactic acid bacteria and yeast on the performance of a continuous sourdough fermenter. *Cereal Chemistry* 69: 20-27.
- 95. Weckx S., Van der Meuler R., Alleersch J., Huys G., Vandamme P., Van Hummelen P. and De Vuyst Luc.** (2010) Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Appl Environ Microbiol* 76(16): 5402-8.
- 96. Weckx S., Allemeersch J., Van der Meuler R., Vrancken G., Vandamme P., Van Hummelen P. and De Vuyst Luc.** (2009) Development and Validation of a Species-Independent Functional Gene Microarray That Targets Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 75(20): 6488-6495.
- 97. Wellington, E.M.H., Cresswell, N. and Saunders, V.A.** (1990) Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and non-sterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1413-1419.
- 98. Wellington, E.M.H. & Williams, S.T.** (1978) Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Lett.* 6: 151-157.
- 99. Wirtz, R.L.** (2003) Improving the taste of bread. In: *Bread making—improving quality*, ed: Cauvain, P.S., pp.467-484. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.



- 100.Zapparoli G., De Benedictis P., Salardi C., Veneri G., Torriani S. and Dellaglio F.** (1996) Lactobacilli of sourdoughs from Verona bakery: a preliminary investigation. *Advances in Food Science* 18: 163–166.
- 101.Zapparoli G., Torriani S. and Dellaglio F.** (1998) Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 166: 325–332.
- 102.Zotta T., Piraino P. and Parente E.** (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for *Cornetto*, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World J. Microbiol Biotechnol* 24: 1785-1795.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- 1. Αγγελόπουλος Β. και Φωτίου Κ.** (2009) Επίδραση διαφόρων συνθηκών αποθήκευσης στο ρυθμό μαγιάτεματος του ψωμιού που παρασκευάζεται με διάφορους τύπου; Προζυμιών, ΤΕΙ Τεχνολογίας τροφίμων Θεσσαλονίκης, 2:7-9.
- 2. Γαζής Γ.** (2006) Απομόνωση και ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων από γιαούρτια της ελληνικής αγοράς, Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, σελ. 20-26.
- 3. Καλογεράκης Ν.** (2003) Στοιχεία Μικροβιολογίας, Αρχές βιοχημικής μηχανικής, Πολυτεχνείο Κρήτης, σελ.15-16.
- 4. Καραγκούνη – Κύρτσου Α.Δ.** (2001) Άσκηση 4:Εκτίμηση των παραμέτρων, προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού. Εργαστηριακές ασκήσεις γενικής μικροβιολογίας, σελ. 37-43.

5. **Καραγκούνη – Κύρτσου Α.Δ.** (1999) Μικροβιολογία, σελ. 300 - 301. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.
6. **Κατσίφας Ε.** (2000) Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην επιβίωση και αύξηση στρεπτομυκήτων σε δείγματα εδάφους. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
7. **Κουντούρης Γ.** (2007) Το πρόβλημα του μπαγιατέματος στα αρτοσκευάσματα, ο αρτοποιός και η δουλειά του 23: 26-28, Εκδόσεις Κορμός.
8. **Κριτσαντώνης Α.** (2007) Η σύσταση του αλεύρου. Ο αρτοποιός και η δουλειά του 33:32-33, Εκδόσεις Κορμός.
9. **Μεταξόπουλος Ι., Ματαράγκας Μ. και Δροσινός Ε.Χ.** (2003) Βακτηρισίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως βιοσυντηρητικών (II). Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας (ΠΕΚΕ) 54: 69-77.
10. **Παπαεμμανουήλ Δ.** (2003) Τα κύρια συστατικά στην παραγωγή του ψωμιού, ο αρτοποιός και η δουλειά του 9: 22-24, Εκδόσεις Κορμός.
11. **Παπαεμμανουήλ Δ.** (2005) Ο κόσμος του προζυμιού, ο αρτοποιός και η δουλειά του 25: 40-41, Εκδόσεις Κορμός.
12. **Τζανετάκης Ν. και Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε.** (2000) Μικροβιολογία και Υγιεινή παραδοσιακών τυριών. Τεχνολογία Τροφίμων και Αειφορία Θεσσαλονίκη ΑΠΘ.
13. **Τελική Έκθεση Προόδου** (2007) Πρόγραμμα «Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε τυποποιημένα είδη διατροφής», κωδικός 70/3/4862. Ανάδοχος Φορέας: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, «Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών».

- 14. Χαχλιούτης Χ. (2009)** Η αρτοποιία στη σύγχρονη Ελλάδα. Ανάλυση της επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP). Οι βασικές αρχές παρακολούθησης & εγκαταστάσεις αυτού. Οικονομία & Διοίκηση τμήμα τουριστικών επιχειρήσεων, σελ 19-53.

### **Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις**

1. [www.85.238.144.18/analytics/Micro\\_Manual/TEDISdata/prods/4975-1\\_05397\\_0500-2.jpg](http://www.85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/4975-1_05397_0500-2.jpg)
2. [www.answers.com/topic/sourdough](http://www.answers.com/topic/sourdough)
3. [www.archive.microbelibrary.org](http://www.archive.microbelibrary.org)
4. [www.asset.tovima.gr](http://www.asset.tovima.gr)
5. [www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/Bossie/yeastimages.jpg](http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/Bossie/yeastimages.jpg)
6. [www.bioinformatica.uab.es.com](http://www.bioinformatica.uab.es.com)
7. [www.breadcetera.com](http://www.breadcetera.com)
8. [www.con-tech-gr.blogspot.com](http://www.con-tech-gr.blogspot.com)
9. [www.denniskunkel.com/images/StockImages/Images\\_01/96453B.jpg](http://www.denniskunkel.com/images/StockImages/Images_01/96453B.jpg)
10. [www.egullet.com/imgs/egci/sourdough/science.html](http://www.egullet.com/imgs/egci/sourdough/science.html)
11. [www.endiaferonta.com/wp-content/uploads/2009/anti-theft-sandwich.com](http://www.endiaferonta.com/wp-content/uploads/2009/anti-theft-sandwich.com)
12. <http://en.goldenmap.com/Acetobacter>
13. <http://enologyaccess.org/EA2/images/stories/Microbes/a.malorum40xps.jpg>
14. [www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria](http://www.eufic.org/article/el/page/FTARCHIVE/artid/lactic-acid-bacteria)
15. [www.islab.tp.ugm.ac.id/files201010Role-of-LAB-in-industry5.jpg](http://www.islab.tp.ugm.ac.id/files201010Role-of-LAB-in-industry5.jpg)
16. <http://www.iso.org>
17. [www.medicalnewstoday.com/articles/14023.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/14023.php)
18. <http://nccam.nih.gov/health/probiotics/lactobacillus.jpg>
19. [www.nobodybuy.com/2010/01/07/export46333/200x200\\_p750442/bacillus-brevis.jpg](http://www.nobodybuy.com/2010/01/07/export46333/200x200_p750442/bacillus-brevis.jpg)
20. [www.panacea.med.uoa.gr/extra/578.jpg](http://www.panacea.med.uoa.gr/extra/578.jpg)
21. [www.pnas.orgcontent1034215611F1.medium.gif](http://www.pnas.orgcontent1034215611F1.medium.gif)
22. [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)

23. [www.sciencephoto.com/image/81847/large/C0017446-S.\\_maltophilia\\_bacteria,\\_TEM-SPL.jpg](http://www.sciencephoto.com/image/81847/large/C0017446-S._maltophilia_bacteria,_TEM-SPL.jpg)
24. <http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRy6kxt8Q2x6kA2k7HJkp9wM>
25. <http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSebnTtUcvuOQ0EOaHWp70FF>
26. [www.terpconnect.umd.edu/.../data.html](http://www.terpconnect.umd.edu/.../data.html)
27. [www.wildyeastblog.com/2007/07/13/raising-a-starter](http://www.wildyeastblog.com/2007/07/13/raising-a-starter)