



**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Σχολή Επιστημών Τροφίμων**

**Department of Food Science and Technology
School of Food Sciences**

Πτυχιακή Εργασία

**Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη βιομηχανία
τροφίμων ως Βιοσυντηρητικά.**

Δανικλόγλου Μόνικα (ΑΜ: 14314)

Επιβλέπων/ουσα: Χούχουλα Δήμητρα

Αθήνα, Μάρτιος 2022

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δήμητρα Χούχουλα

2. Μέλος Επιτροπής

Διονύσης Αντωνόπουλος

3. Μέλος Επιτροπής

Ανθυμία Μπατρίνου

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/Η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Δανικλόγλου Μόνικα του Άγγελου, με αριθμό μητρώου 14314 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα Χούχουλα Δήμητρα.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δέσποινα Βουγιουκλάκη, υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου, για τη σημαντική βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη την μελέτη.

Περίληψη στα ελληνικά

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) ανήκουν σε μια ομάδα μικροοργανισμών η οποία συναντάται στα περισσότερα οικοσυστήματα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται στο έδαφος, στα φυτά, στο νερό και στα ζώα. Τα LAB συνήθως είναι υπεύθυνα για πολλές διαδικασίες ζύμωσης των τροφίμων και για αυτόν τον λόγο απομονώνονται από τα τρόφιμα, αλλά βρίσκονται συχνά και σε τρόφιμα τα οποία δεν έχουν υποστεί ζύμωση, όπως στα ψάρια, στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα προϊόντα κρέατος, στα φρούτα, στα λαχανικά καθώς και στα δημητριακά. Βέβαια μπορούν να έχουν και ευεργετικές επιπτώσεις στα τρόφιμα καθώς χρησιμοποιούνται για τη διασφάλιση της ασφάλειας, την ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την αύξηση και διατήρηση της διατροφικής ποιότητας των τροφίμων. Όλα αυτά οφείλονται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη διάφορων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών όπως οι *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, και *Staphylococcus aureus*. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους είναι ο ανταγωνισμός τους για θρεπτικά συστατικά από το μέσο καλλιέργειας ή το τροφικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται, και ο σχηματισμός οργανικών οξέων (κυρίως γαλακτικών και οξικών οξέων), με ταυτόχρονη πτώση του pH. Επίσης παράγουν πολλούς αντιμικροβιακούς μεταβολίτες όπως αιθανόλη, διακετύλιο, υπεροξείδιο του υδρογόνου και άλλα. Σημαντική κατηγορία από μόνη της κατέχει μια ομάδα αντιμικροβιακών πεπτιδίων ή πρωτεϊνών που αναφέρεται ως βακτηριοσίνες


Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) belong to a group of microorganisms found in most ecosystems. Lactic acid bacteria are found in soil, plants, water and animals. LABs are usually responsible for many food fermentation processes and are therefore isolated from food, but are often found in non-fermented foods, such as fish, dairy products, meat products, fruits, vegetables, and as well at cereals. Of course, they can also have beneficial effects on food as they are used to ensure safety, develop organoleptic characteristics and increase and maintain the nutritional quality of food. All this is due to their ability to inhibit the growth of various allogeneic and pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, and *Staphylococcus aureus*. Their main mechanism of action is their competition for nutrients from the culture medium or the nutrient medium on which they grow, and the formation of organic acids (mainly lactic and acetic acids), with a drop in pH. They also produce many antimicrobial metabolites such as ethanol, diacetyl, hydrogen peroxide and others. An important class is a group of antimicrobial peptides or proteins referred to as bacteriocins.

Πίνακας Περιεχομένων

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1	Παραδοσιακοί τρόποι συντήρησης τροφίμων.....	11
1.1.1	Ξήρανση.....	11
1.1.2	Αφυδάτωση.....	11
1.1.3	Παστερίωση.....	12
1.1.4	Αλάτισμα.....	12
1.1.5	Κονσερβοποίηση.....	12
1.1.6	Ψύξη – Κατάψυξη.....	13
1.1.7	Τουρσί.....	13
1.1.8	Συντήρηση με Ζάχαρη.....	13
1.1.9	Κάπνισμα.....	13
1.2	Συντήρηση τροφίμων με χημικά συντηρητικά.....	13
1.2.1	‘Αποδεκτή Ημερησία Πρόσληψη’ (ΑΗΠ, ADI: Acceptable Daily Intake).....	16
1.2.2	Αρνητικές επιπτώσεις των συντηρητικών στον άνθρωπο.....	16
1.3	Συντήρηση των τροφίμων με Βιολογικές Μεθόδους.....	17
1.4	Η έννοια της Βιοπροστασίας.....	18
2	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	19
2.1	Ορισμός.....	19
2.2	Ταξινόμηση των LAB.....	20
2.3	Γαλακτικά βακτήρια και ανθεκτικότητα.....	20
2.4	Μεταβολισμός των LAB.....	20
2.5	Διατροφικές Απαιτήσεις, Ζύμωση και Συνθήκες ανάπτυξης των LAB.....	21
2.6	pH και ζύμωση.....	23
3	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ.....	24
3.1	Ορισμός.....	24
3.2	Είδη Καλλιέργειών εκκίνησης.....	24
3.2.1	Παγωμένες καλλιέργειες (Frozen Cultures).....	25
3.2.2	Πάγωμα - Ξήρανση καλλιέργειας (Λυοφιλοποίηση), (Freeze-Drying cultures).....	25
3.2.3	Ξήρανση καλλιέργειας με ψεκασμό.....	26
3.2.4	Επανενεργοποίηση παγωμένων ή αφυδατωμένων καλλιεργιών.....	26
3.3	Προβιοτικά.....	27
3.3.1	Ορισμός.....	27
3.3.2	Επίδραση των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	27

3.3.3	Κριτήρια επιλογής του ιδανικού προβιοτικού.....	27
4	ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΩΝ LAB ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	29
4.1	Βακτηριοσίνες	29
4.1.1	Κατηγοριοποίηση βακτηριοσίνων	29
4.1.2	Ανθεκτικότητα στη θέρμανση	30
4.1.3	Επίδραση του pH.....	30
4.1.4	Βιοσύνθεση των βακτηριοσινών	30
4.1.5	Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών	31
4.2	Αντιμικροβιακοί Μεταβολίτες.....	32
4.3	Οργανικά οξέα – Μηχανισμός Δράσης.....	33
4.3.1	Χρήση οργανικών οξέων	34
4.3.2	3-hydroxypropionaldehyde (Reuterin).....	34
4.3.3	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	35
4.3.4	Αιθανόλη	35
4.3.5	Διακετύλιο	35
4.4	Μύκητες	36
5	ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ LAB ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	37
5.1	LAB σε γαλακτοκομικά προϊόντα	37
5.1.1	Γιαούρτι.....	37
5.1.2	Kefir	41
5.1.3	Τυρί.....	43
5.1.4	Βουτυρόγαλα.....	44
5.2	LAB και παραγωγή ψωμιού	46
5.2.1	Χρήση και λειτουργία του προζυμιού.....	46
5.2.2	Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία	47
5.3	LAB στη ζυθοποιία.....	47
5.4	LAB στη ζύμωση σταφυλιών (Κρασί).....	48
5.5	LAB στη βιομηχανία κρεάτων	48
5.5.1	Λουκάνικα – Ζύμωση	49
5.5.2	<i>Lb. SAKELI</i> ως το κύριο LAB στα κρέατα	50
5.6	LAB στα λαχανικά.....	50
5.6.1	Είδη LAB στα λαχανικά.....	51
5.6.2	Ξινολάχανο	51
5.6.3	Πίκλες 	52
5.6.4	Ελιές.....	53
5.7	LAB στα ψάρια.....	55
5.7.1	Φρέσκα ψάρια.....	55
5.7.2	Εφαρμογή καλλιιεργειών LAB και των βακτηριοσινών τους σε ψάρια και αλιευτικά προϊόντα.....	55

6	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	61
6.1	1 ^η ΈΡΕΥΝΑ.....	61
6.1.1	Εισαγωγή.....	61
6.1.2	Αποτελέσματα:	65
6.2	2 ^η ΈΡΕΥΝΑ.....	68
6.2.1	Εισαγωγή.....	68
6.2.2	Αποτελέσματα	70
6.2.3	Συμπεράσματα.....	70
6.3	3 ^η ΈΡΕΥΝΑ.....	71
6.3.1	Εισαγωγή.....	71
6.3.2	Αποτελέσματα	71
6.3.3	Συζήτηση	72
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

Πίνακας Σχημάτων

Εικόνα 1: Τα LAB παράγουν μια ποικιλία αντιμικροβιακών ενώσεων που μπορούν να αναστείλουν και να σκοτώσουν ευαίσθητα μικρόβια. Ενώσεις όπως το γαλακτικό οξύ και το διακετύλιο είναι μεταβολικά απόβλητα που μπορούν επίσης να δράσουν ως αντιμικροβιακά. Οι βακτηριοκίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που παράγονται από LAB που στοχεύουν στο να αναστέλλουν τις δραστηριότητες των ανταγωνιστικών βακτηρίων (Collins et al. 2019).	33
Εικόνα 2: Στάδια διαδικασίας δημιουργίας γιαουρτιού (Binda et al. 2019).	38
Εικόνα 3: Μηχανισμοί με τους οποίους η κατανάλωση γιαουρτιού είναι μέρος μιας ισορροπημένης διατροφής και ασκεί ευεργετική επίδραση στην υγεία (Binda et al. 2019).	40
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής κεφίρ (Binda et al. 2019).....	42
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της γενικής διαδικασίας παραγωγής τυριού (Binda et al. 2019).	43
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγικής διαδικασίας καλλιέργειας βουτυρογάλακτος (Binda et al. 2019).....	45

Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1: Τα πιο γνωστά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων (Saltmarch et., 2013):.....	14
Πίνακας 2: Παράγοντες ανάπτυξης για LAB/προβιοτικά βακτήρια και πώς χρησιμοποιούνται συνήθως στη Βιομηχανία Τροφίμων, ποια βασικά θρεπτικά παρέχουν καθώς και πώς επηρεάζουν τη λειτουργικότητα (Vinderola et al. 2019).	22
Πίνακας 3: Παράμετροι ανάπτυξης ορισμένων LAB που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις τροφίμων (Vinderola et al. 2019).....	23
Πίνακας 4: Βακτηριοσίνες που παράγονται από τα LAB (Collins et al. 2019).	31
Πίνακας 5: Βιοσυντήρηση ψαριών και προϊόντων αλιείας με χρήση βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) (Gómez-Sala et al. 2019).....	Error! Bookmark not defined.
Πίνακας 6: Όνομα, χημικός τύπος, θεωρητική μάζα και ανιχνευόμενη μάζα για κάθε ελεγχόμενο αντιμυκητιασικό πρότυπο (Le Lay et al. 2016).	64

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τρόφιμα με το πέρασ του χρόνου έχουν τη τάση να αλλοιώνονται. Αμέσως μετά την αλίευση, συγκομιδή ή σφαγή, τα τρόφιμα υφίστανται βαθμιαίες μεταβολές στις ιδιότητες και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (την γεύση, την οσμή, την εμφάνιση, το χρώμα και την υφή), οι οποίες μπορεί να συνοδεύονται από την παραγωγή επικίνδυνων για την υγεία του ανθρώπου ουσιών ή άλλες απώλειες της θρεπτικής τους αξίας. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να έχουν προκληθεί από έντομα ή από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως βακτήρια και ζυμομήκητες μέσω χημικών αντιδράσεων και ενζυμικών μετατροπών. Για τον λόγο αυτόν από τα παλαιά χρόνια δημιουργήθηκε η ανάγκη για “συντήρηση” (preservation) των τροφίμων δηλαδή την επιμήκυνση του δυνατού χρόνου ζωής και την αποφυγή της ποιοτικής υποβάθμισης τους. Έχουν εφευρεθεί διάφοροι τρόποι συντήρησης τροφίμων οι οποίοι αναλύονται παρακάτω (Masagati 2012).

1.1 Παραδοσιακοί τρόποι συντήρησης τροφίμων.

Οι παραδοσιακοί τρόποι συντήρησης είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι και χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι συντήρησης που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οι εξής:

1.1.1 Ξήρανση

Η ξήρανση είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους και χρησιμοποιείται συνήθως για μυρώδικα, φρούτα και λαχανικά. Αυτό που επιτυγχάνεται με την ξήρανση, είναι η ελάττωση της ενεργότητας του περιεχόμενου νερού στο τρόφιμο, παρεμποδίζοντας έτσι την δράση των μικροοργανισμών επιβραδύνοντας τις χημικές και ενζυμικές αλλοιώσεις (Masagati 2012).

1.1.2 Αφυδάτωση

Με την αφυδάτωση, γίνεται απομάκρυνση της υγρασίας με τη χρήση μηχανικών μέσων και τη χρήση τεχνητής θέρμανσης υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και ροής αέρα. Το τελικό προϊόν είναι σχεδόν τελείως ξηρό όπως για παράδειγμα τα δημητριακά, τα ζυμαρικά, ο καφές και το γάλα σε σκόνη (Masagati 2012).

1.1.3 Παστερίωση

Κατά την παστερίωση, τα τρόφιμα θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, έτσι ώστε να θανατωθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα, χωρίς όμως να υποβαθμιστεί η ποιότητα του τροφίμου. Ο χρόνος παστερίωσης και η θερμοκρασία διαφέρει από προϊόν σε προϊόν π.χ ο χυμός φρούτων παστεριώνεται στους 65 °C για 30 min ή στους 77 °C για 1 min ή στους 88 °C για 15 s ενώ το γάλα για 63 °C για 30 min ή 71,5 °C για 15 s (Masagati 2012).

1.1.4 Αλάτισμα

Η αρχαιότερη μέθοδος συντήρησης τροφίμων είναι το αλάτισμα. Το αλάτι είναι αποτελεσματικό ως συντηρητικό επειδή μειώνει την ενεργότητα του νερού των τροφίμων. Με τον όρο ενεργότητα νερού ενός τροφίμου εννοούμε τη ποσότητα του μη δεσμευμένου νερού το οποίο διατίθεται για μικροβιακή ανάπτυξη. Το αλάτι μειώνει την ενεργότητα του νερού και αυτό οφείλεται στην ικανότητα των ιόντων νατρίου και χλωρίου να αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού. Επίσης, η προσθήκη αλατιού στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει στα μικροβιακά κύτταρα ωσμωτικό σοκ, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια νερού από το κύτταρο προκαλώντας έτσι κυτταρικό θάνατο ή καθυστερημένη ανάπτυξη. Για να παίξει το αλάτι ρόλο ως συντηρητικό, το επίπεδο ποσότητας του στο τελικό προϊόν πρέπει να είναι περίπου 17% (Henney *et al.* 2010; Masagati 2012).

1.1.5 Κονσερβοποίηση

Η κονσερβοποίηση είναι μια από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους συντήρησης φρούτων, λαχανικών και προϊόντων κρέατος. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται οι μικροοργανισμοί και τα ένζυμα που αλλοιώνουν τα τρόφιμα καθώς και διαφυλάσσονται από μια νέα εξωτερική μόλυνση. Κατά τη διαδικασία αυτή το προϊόν τοποθετείται σε ένα αποστειρωμένο και αεροστεγές δοχείο, δέχεται μια θερμική επεξεργασία και τέλος σφραγίζεται και αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση. Η κονσερβοποίηση παρέχει διάρκεια ζωής που κυμαίνεται συνήθως από 1 έως 5 χρόνια (Masagati 2012).

1.1.6 Ψύξη – Κατάψυξη

Κατά τη ψύξη τα τρόφιμα μπορούν να συντηρηθούν για μερικές μέρες σε χαμηλές θερμοκρασίες 4 - 7 °C όπου επιβραδύνονται οι διάφορες βιοχημικές μεταβολές που μπορούν να συμβούν στα τρόφιμα. Στη κατάψυξη η θερμοκρασία κυμαίνεται από 0 έως -18 °C ανάλογα με το τρόφιμο. Με αυτόν τον τρόπο, τα τρόφιμα συντηρούνται όχι μόνο για μερικές ημέρες, αλλά για εβδομάδες ή ακόμα και μήνες. Στις θερμοκρασίες αυτές αφενός παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και αφετέρου αναστέλλεται η δράση των ενζύμων (Masagati 2012).

1.1.7 Τουρσί

Κατά τη διαδικασία αυτή το τρόφιμο υποβάλλεται σε θεμρική επεξεργασία και στη συνέχεια βυθίζεται σε άλμη. Τέλος συσκευάζεται σε δοχείο γεμάτο ξύδι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα προϊόντος στο οποίο εφαρμόζεται αυτή η διαδικασία είναι οι πίκλες (Masagati 2012).

1.1.8 Συντήρηση με Ζάχαρη

Τα σάκχαρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη συντήρηση των τροφίμων. Η υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη παρεμποδίζει τη μικροβιακή ανάπτυξη καθώς απορροφά την υγρασία στο τρόφιμο. Παραδείγματα τροφίμων τα οποία συντηρούνται με ζάχαρη είναι οι μαρμελάδες, τα γλυκά του κουταλιού, διάφορα ζαχαρωτά γλυκίσματα καθώς και τα καραμελωμένα φρούτα (Masagati 2012).

1.1.9 Κάπνισμα

Ο καπνός ξύλου χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη συντήρηση ειδών διατροφής όπως το κρέας. Περιέχει μια σειρά αντιμικροβιακών ενώσεων όπως φαινόλες, συριγγόλη και γκουαϊακόλη και τα παράγωγά τους καθώς και καρβονύλια, κατεχόλη καθώς και παράγωγα ναφθαλίνης. Επίσης χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως αρωματικός παράγοντας (Masagati 2012).

1.2 Συντήρηση τροφίμων με χημικά συντηρητικά

Τα συντηρητικά είναι χημικές ενώσεις οι οποίες έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη των

διαφόρων μικροοργανισμών, δημιουργώντας ακατάλληλες συνθήκες γι' αυτούς ή προστίθενται στα τρόφιμα με σκοπό την βελτίωση της γεύσης, της οσμής, της υφής και της εμφάνισης. Το πιο σημαντικό είναι ότι επιβραδύνουν τη βακτηριακή αποικοδόμηση που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή των τοξινών οι οποίες προκαλούν τροφική δηλητηρίαση. Υπάρχουν σαφείς οδηγίες και διατάξεις για τον σωστό χειρισμό αυτών των χημικών ουσιών από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών. Ανάλογα με το είδος του τροφίμου χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα συντηρητικά. Τα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων είναι τα εξής (Saltmarch 2013):

Πίνακας 1: Τα πιο γνωστά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων (Saltmarch et., 2013):

Αρίθμηση ΕΕ	Ονομασία
E200	Σορβικό οξύ
E202	Σορβικό κάλιο
E203	Σορβικό ασβέστιο
E210	Βενζοϊκό οξύ
E211	Βενζοϊκό νάτριο
E212	Βενζοϊκό κάλιο
E213	Βενζοϊκό ασβέστιο
E214	Αιθυλ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
E215	Αιθυλ-4-υδροξυβενζοϊκό νάτριο
E216	Προπυλ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
E217	Προπυλ-4-υδροξυβενζοϊκό νάτριο
E218	Μεθυλ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
E219	Μεθυλ-4-υδροξυβενζοϊκό νάτριο
E220	Διοξείδιο του θείου
E221	Θειώδες νάτριο
E222	Όξινο θειώδες νάτριο
E223	Μεταθειώδες νάτριο
E224	Μεταθειώδες κάλιο

E225	Θειώδες κάλιο
E226	Θειώδες ασβέστιο
E227	Όξινο θειώδες ασβέστιο
E228	Όξινο θειώδες κάλιο
E230	Διφαινύλιο
E231	2-υδροξυδιφαινύλιο
E232	Διφαινολικό οξείδιο του νατρίου
E233	Θειαβενταζόλη
E234	Νιοσίνη
E235	ιμαρακίνη
E236	Μυρμηκικό οξύ
E237	Μυρμηκικό νάτριο
E238	Μυρμηκικό ασβέστιο
E239	Εξαμεθυλενοτετραμίνη
E240	Φορμαλδεΰδη
E242	Καρβονικό διμεθύλιο
E249	Νιτρώδες κάλιο
E250	Νιτρώδες νάτριο
E251	Νιτρικό νάτριο
E252	Νιτρικό κάλιο
E260	Οξικό οξύ
E261	Οξικό κάλιο
E262	Οξικό νάτριο
E263	Οξικό ασβέστιο
E270	Γαλακτικό οξύ
E280	Προπιονικό οξύ
E281	Προπιονικό νάτριο
E282	Προπιονικό ασβέστιο
E283	Προπιονικό κάλιο
E284	Βορικό οξύ
E285	Τετραβορικό νάτριο
E290	Διοξείδιο του άνθρακα
E296	Μηλικό οξύ
E297	Φουμαρικό οξύ

1.2.1 'Αποδεκτή Ημερησία Πρόσληψη' (ΑΗΠ, ADI: Acceptable Daily Intake)

Πολλά συντηρητικά αν καταναλωθούν σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή. Υψηλότερης επικινδυνότητας είναι τα συνθετικά προσθετικά, και λιγότερο τα φυσικά, για τα οποία υπάρχουν σαφώς λιγότεροι περιορισμοί. Για τις περισσότερες ουσίες υπάρχει η 'Αποδεκτή Ημερησία Πρόσληψη' (ΑΗΠ, ADI: Acceptable Daily Intake) η οποία αναφέρεται στη ποσότητα μιας συντηρητικής ουσίας, που μπορεί να λαμβάνεται από τον καταναλωτή ακόμα και σε όλη τη διάρκεια της ζωής του, χωρίς να υπάρχει καμία αρνητική επίπτωση στην υγεία του. Η αξιολόγηση για το πόσο ασφαλές είναι ένα συντηρητικό σε ένα τρόφιμο για την υγεία του καταναλωτή, βασίζεται σε ανασκοπήσεις των διαθέσιμων τοξικολογικών δεδομένων σε ανθρώπους και ζώα. Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία καθορίζεται το ανώτατο όριο μιας πρόσθετης ουσίας, η οποία δεν έχει καμία αποδεδειγμένη τοξική επίδραση στο ανθρώπινο οργανισμό. Το όριο αυτό ονομάζεται «επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις» (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level) και χρησιμοποιείται για να καθορίσει την ΑΗΠ (Fitch et al 2021).

1.2.2 Αρνητικές επιπτώσεις των συντηρητικών στον άνθρωπο

Παραδείγματα αρνητικών επιπτώσεων που μπορούν να έχουν κάποια συντηρητικά αν καταναλωθούν σε μεγαλύτερη ποσότητα από ότι καθορίζει η ΑΗΠ είναι:

- Ερεθισμός στο δέρμα
- Σύνδρομο υπερκινητικότητας στα παιδιά
- Επιδείνωση της κατάστασης αλλεργικών ατόμων
- Δερματικές αλλεργίες
- Ερεθισμό στομάχου
- Κεφαλαλγία
- Διαταραχές της μνήμης
- Επιθετική συμπεριφορά στον καταναλωτή
- Εμφάνιση ορισμένων κακοηθειών στον άνθρωπο
- Διαστολή αγγείων με αποτέλεσμα τη πτώση της πίεσης και πονοκεφάλους
- Μεθαιμοσφαιριναιμία η οποία εκδηλώνεται με δύσπνοια, πονοκέφαλο, ζαλάδες, αδυναμία και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως
- Υπερκαλιαιμία η οποία εκδηλώνεται με μυϊκή αδυναμία, εμετούς και διαταραχές στη καρδιακή λειτουργία

- Γαστρεντερίτιδα
- Πεπτικές διαταραχές στα βρέφη
- Ημικρανίες (Saltmarch 2013).

1.3 Συντήρηση των τροφίμων με Βιολογικές Μεθόδους.

Οι πιο συνηθισμένες βιολογικές μέθοδοι συντήρησης είναι:

- (α) η συντήρηση με αλκοολική ζύμωση
- (β) η συντήρηση με γαλακτική ζύμωση

Στον χώρο της κατανάλωσης τροφίμων, υπήρξαν αυξανόμενες ανησυχίες για την υγεία και την ασφάλεια σχετικά με μια σειρά συστατικών προϊόντων όπως είναι τα συντηρητικά. Ένα τέτοιο συστατικό είναι η φορμαλδεΐδη, η οποία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης και την πρόληψη της μόλυνσης. Οι κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως και άλλων περιοχών έχουν περιορίσει τη χρήση ορισμένων συντηρητικών (που ονομάζονται επίσης βιοκτόνα) σε τυποποιημένα προϊόντα. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι μεγάλες αλυσίδες πολυκαταστημάτων που πουλάνε κατά κύριο λόγο τρόφιμα όπως η Walmart, η Target και η CVS, έχουν αναπτύξει πολιτικές που περιορίζουν ορισμένα συντηρητικά από τα προϊόντα που πουλούν. Το 2015 η Walmart και η Target πραγματοποίησαν μία μεγάλη συνάντηση στην οποία κάλεσαν τους προμηθευτές τους με σκοπό να παρέχουν ένα σαφές μήνυμα ως προς τις προθέσεις τους να ρυθμίσουν συγκεκριμένες χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των συντηρητικών στα προϊόντα που παρέχουν. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι όσο περνάνε τα χρόνια και δημιουργούνται καινούριες καινοτομίες και δεδομένα στη τεχνολογία τροφίμων, οι καταναλωτές αλλά και οι προμηθευτές είναι πιο ευαισθητοποιημένοι ως προς την αναγκαιότητα αλλά και την ασφάλεια των συστατικών και συντηρητικών που υπάρχουν στα τρόφιμα για την υγεία του καταναλωτή. Οι μοντέρνες τάσεις των καταναλωτών, οι οποίοι θέλουν να καταναλώνουν όσο το δυνατόν λιγότερο ‘επεξεργασμένα’ τρόφιμα, χωρίς πρόσθετα, τα οποία όμως να παρέχουν απόλυτη μικροβιολογική ασφάλεια, έχει οδηγήσει τη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων να αντικαταστήσει τις υπάρχουσες παραδοσιακές μεθόδους ελέγχου της μικροβιολογικής αλλοίωσης και κινδύνου για την ασφάλεια των τροφίμων με καινοτόμες τεχνολογίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να δημιουργείται μια νέα έννοια στον χώρο συντήρησης των τροφίμων η οποία ονομάζεται βιοπροστασία (Becker *et al.* 2020).

1.4 Η έννοια της Βιοπροστασίας

Ως βιοπροστασία, λοιπόν, ορίζεται η επέκταση του χρόνου ζωής και η ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων, η οποία επιτυγχάνεται με την χρήση φυσικών μικροοργανισμών στα τρόφιμα και τη χρήση των αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγουν αυτοί οι μικροοργανισμοί. Τέτοιες μοντέρνες τεχνολογίες περιλαμβάνουν βιολογικά αντιμικροβιακά συστήματα, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria - LAB) και οι βακτηριοσίνες. Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των βακτηριοσινών, είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την επέκταση του χρόνου ζωής και της ασφάλειας ενός τροφίμου, καθώς μέσω αυτής αναστέλλεται η δράση των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς όμως να μεταβάλλονται τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η θρεπτική αξία του τροφίμου (Le Lay *et al.* 2016; Garnier *et al.* 2020).

2 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

2.1 Ορισμός

Τα οξύγαλακτικά βακτήρια (LAB) χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να παράγουν γαλακτικό οξύ, ως κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης της γλυκόζης. Τα LAB χρησιμοποιούνται σε διάφορα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως γαλακτοκομικά (γιαούρτι, κεφίρ ή τυρί) και προϊόντα αρτοποιίας (μαγιά) αλλά και σε προϊόντα που δεν έχουν υποστεί ζύμωση όπως κρέας, λαχανικά και θαλασσινά. Τα LAB μπορούν να μειώσουν τη τιμή του pH και να παράγουν αντιβακτηριακές ενώσεις. Τα τελευταία χρόνια, μέσω πολλών ερευνών έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη LAB έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη μούχλας και ζυμών. Στις αρχές του εικοστού αιώνα χρησιμοποιήθηκε ο όρος 'οξύγαλακτικά βακτήρια' (LAB) για τους 'οργανισμούς που προέρχονται από το γάλα'. Επειδή παρατηρήθηκαν ομοιότητες μεταξύ γαλακτοκομικών οργανισμών και άλλων βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ, ο Orla-Jensen το 1919 σχημάτισε τη βάση της παρούσας ταξινόμησης των LAB. Αν και τα κριτήρια που χρησιμοποίησε (κυτταρική μορφολογία, μηχανισμός ζύμωσης της γλυκόζης, εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης και πρότυπα χρήσης των σακχάρων) εξακολουθούν να είναι πολύ σημαντικά για την ταξινόμηση των LAB, η εμφάνιση πιο σύγχρονων ταξινομικών εργαλείων, ιδιαίτερα οι μοριακές μέθοδοι, έχουν αυξήσει σημαντικά τον αριθμό των γενών των LAB από τα τέσσερα αρχικά αναγνωρισμένα από τον Orla - Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus*). Τα LAB έχουν παραδοσιακά συσχετιστεί με τη ζύμωση τροφίμων και γενικά θεωρούνται ευεργετικοί μικροοργανισμοί καθώς ορισμένα στελέχη τους είναι ακόμη και προαγωγικά για την υγεία (προβιοτικά) βακτήρια αφού βοηθούν στο γαστρεντερικό σύστημα. Τα LAB αποτελούν μια ομάδα gram θετικών, μη σπορογόνων βακτηρίων, σε σχήμα ράβδου ή κόκκου που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες σε γαλακτικό οξύ (Ieyva Salas *et al.* 2017).

2.2 Ταξινόμηση των LAB

Η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στα παρακάτω γνωρίσματα:

- στη μορφολογία (βάκιλλοι, κόκκοι, τετράδες)
- τον τρόπο σχηματισμού του γαλακτικού οξέος
- την σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους και ιδιαίτερα των λιπαρών οξέων που περιέχουν
- τα ισομερή του γαλακτικού οξέος που παράγουν
- τη συμπεριφορά τους απέναντι στο οξυγόνο (αναερόβια ή μικροαερόβια)
- το ποσοστό γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) στο DNA
- τη δομή και την αλληλουχία στο 16S rRNA
- τις ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των προϊόντων πολυμερισμού των γονιδίων τους (Ieyva Salas *et al.* 2017).

2.3 Γαλακτικά βακτήρια και ανθεκτικότητα

Οι γαλακτοβάκιλλοι αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα μέλη του γένους *Lactobacillus* είναι αναερόβια ή μικροαερόφιλα, σε σχήμα ράβδου, θετικά κατά gram βακτήρια. Η ανάπτυξη τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με το περιβάλλον στο οποίο επιβιώνουν. Αρκετοί μικροοργανισμοί που ανήκουν στα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται ως προβιοτικά και χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση τροφίμων. Οι γαλακτοβάκιλλοι βρίσκονται σε πολλά αν όχι στα περισσότερα ζυμωμένα τρόφιμα, ιδίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γιαούρτι, τυριά και γάλατα. Επίσης, αποτελούν σημαντικές καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμώσεις λαχανικών όπως το λάχανο τουρσί και χρησιμοποιούνται στην παρασκευή μαγιάζ. Οι γαλακτοβάκιλλοι βρίσκονται επίσης στα κρέατα. Για παράδειγμα, το είδος *Latilactobacillus. sakei* χρησιμοποιείται σε προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί ζύμωση (Zagorec *et al.* 2017; Wright *et al.* 2011)

2.4 Μεταβολισμός των LAB

Με βάση τα προϊόντα ζύμωσης της γλυκόζης, το γένος *Lactobacillus* χωρίζεται σε τρεις ομάδες :

1. τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά βακτήρια
2. τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια

3. τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά βακτήρια.

Ωστόσο, η μαζική χρήση αλληλουχιών DNA που κωδικοποιούν 16S rRNA οδήγησε σε μια εντυπωσιακή αύξηση του αριθμού των αναγνωρισμένων ειδών LAB. Για παράδειγμα, ο αριθμός των ειδών στο γένος *Lactobacillus* έχει υπερδιπλασιαστεί, μετά την εισαγωγή του 16S rRNA ως κριτήριο ταξινόμησης (Wright *et al.* 2011).

2.5 Διατροφικές Απαιτήσεις, Ζύμωση και Συνθήκες ανάπτυξης των LAB

Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί συστατικά που περιέχουν όσο το δυνατόν περισσότερα από τα βασικά θρεπτικά συστατικά αλλά συνδυάζουν και τεχνολογική λειτουργικότητα δηλαδή επιβίωση στα διάφορα στάδια παραγωγής, σταθερότητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οξίνιση και παραγωγή αρώματος. Ως παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο η τροποποίηση της σύνθεσης του μέσου ανάπτυξης μπορεί να επηρεάσει την τεχνολογική λειτουργικότητα, έδειξε ότι ο αριθμός των λυοφιλιωμένων κυττάρων του *Lactobacillus bulgaricus* παρουσία 2% γλυκόζης που επέζησαν μετά από 10 μήνες αποθήκευσης ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό κυττάρων από την ίδια καλλιέργεια που παράχθηκε σε ένα μέσο που περιέχει 1% γλυκόζη και 1% σακχαρόζη. Ωστόσο, δεδομένου ότι αυτή η καλλιέργεια εκκίνησης δεν καλλιεργείται με λακτόζη, πιθανότατα δεν είχε υψηλά επίπεδα β-γαλακτοσιδάσης, και ήταν αργή στην έναρξη της ζύμωσης του γάλακτος. Μια σημαντική πτυχή που πρέπει να εξεταστεί σε σχέση με το μέσο ανάπτυξης είναι η απαίτηση για αμινοξέα. Δεδομένου ότι τα LAB απαιτούν πολλά αμινοξέα για ανάπτυξη, έτσι είναι λογικό το μέσο να εμπλουτιστεί με ελεύθερα αμινοξέα. Τα ολιγοπεπτίδια είναι η κύρια πηγή αζώτου για τον *Lactococcus lactis* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στο γάλα. Ως αποτέλεσμα, πεπτόνες προστίθενται συστηματικά σε μέσα ανάπτυξης για LAB και *Bifidobacteria*. Σημαντικά επίσης συμπληρώματα για την ανάπτυξη των LAB είναι οι ζύμες καθώς δεν είναι μόνο πλούσιες σε πεπτόνες αλλά περιέχουν και τα περισσότερα από τα άλλα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη: βιταμίνες, νουκλεοτίδια και λιπαρά οξέα. Εκτός από τα συστατικά που προκύπτουν μέσω της ζύμωσης, τέσσερις παράμετροι ζύμωσης επηρεάζουν την ανάπτυξη των προβιοτικών. Αυτοί είναι το οξυγόνο, τα επίπεδα ανάδευσης/οξειδοαναγωγής, η θερμοκρασία και το pH. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη θερμοκρασία για την παραγωγή LAB και προβιοτικών βακτηρίων. Κατά κανόνα, η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων ορίζεται σε αυτήν που θεωρείται ως η βέλτιστη για την ανάπτυξη των προβιοτικών. Η ενεργότητα του νερού (a_w) σπάνια προσαρμόζεται στην παραγωγή LAB και των *Bifidobacteria*. Συνήθως κυμαίνεται σε κλίμακα 0,97-0,98. Το επίπεδο οξυγόνου/οξειδοαναγωγής είναι μια λιγότερο ελεγχόμενη παράμετρος ζύμωσης. Η ανάπτυξη των

LAB και των *Bifidobacteria* σπάνια βελτιώνεται από την παρουσία οξυγόνου. Ο λόγος που το οξυγόνο μπορεί να είναι επιβλαβές είναι κυρίως τοξικό H₂O₂ παράγεται παρουσία οξυγόνου (Vinderola *et al.* 2019).

Πίνακας 2: Παράγοντες ανάπτυξης για LAB/προβιοτικά βακτήρια και πώς χρησιμοποιούνται συνήθως στη Βιομηχανία Τροφίμων, ποια βασικά θρεπτικά παρέχουν καθώς και πως επηρεάζουν τη λειτουργικότητα (Vinderola *et al.* 2019).

Συστατικό	Πηγή	Επιπτώσεις στη λειτουργικότητα
Υδατάνθρακας	Γλυκόζη ή λακτόζη σε γαλακτοκομικά προϊόντα	Μεγαλύτερη σταθερότητα αποθήκευσης του <i>L. Bulgaricus</i> , ταχύτερη οξίνιση των γαλακτοκομικών προϊόντων εάν καλλιεργούνται με λακτόζη
Αμινοξέα ή πεπτόνες	Κυρίως προστίθενται μέσω πεπτονών, ζυμών ή προτεϊνών του γάλακτος	Η ανάπτυξη σε πεπτόνες μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα και χαμηλότερη δραστηριότητα οξίνισης όταν προστίθενται κύτταρα στο γάλα
Λιπαρά οξέα	Οξικό άλας	Υψηλά επίπεδα ακόρεστων λιπών στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες που οδηγούν στη βελτίωση της επιβίωσης στην κατάψυξη και στη μείωση της σταθερότητας αποθήκευσης των αποξηραμένων καλλιεργειών
Νουκλεοζίτες/νουκλεοτίδια	Ζύμες	-
Φωσφορικά άλατα, μαγνήσιο, μαγγάνιο	Προστίθενται κυρίως ως άλατα	Ενισχύει την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών
Βιταμίνες	Ζύμες, Πεπτόνες	-
Κιτρικό άλας	Συστατικό γαλακτοκομικών προϊόντων	Οι <i>Lactococcus</i> , ως καλλιέργειες εκκίνησης, που καλλιεργούνται μέσα σε κιτρικό άλας στη συνέχεια παράγουν υψηλότερα επίπεδα διακετυλίου σε ζυμωμένα γάλατα

Πίνακας 3: Παράμετροι ανάπτυξης ορισμένων LAB που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις τροφίμων (Vinderola et al. 2019).

Είδος	Σε ποια τρόφιμα συναντάται	pH	°C	a _w
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	Τυρί, ξινή κρέμα, kefir	6.0–6.5	29–34	0.96
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	Τυρί, ξινή κρέμα, kefir	6.0–6.5	28–32	0.95
<i>Lc. lactis ssp. lactis. biovar. diacetylactis</i>	Τυρί, ξινή κρέμα, kefir	6.0–6.5	29–34	0.95
<i>Ln. lactis, Ln. cremoris</i>	Τυρί, ξινή κρέμα, kefir	5.5–6.0	20–27	0.96–0.98
<i>Ln. mesenteroides</i>	Ζυμωμένα λαχανικά	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	Γιαούρτι	6.0–6.5	40–42	0.94
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Γιαούρτι	5.5–6.0	42–46	0.95
<i>L. helveticus</i>	Τυρί	5.4–5.9	42–47	-
<i>L. plantarum</i>	Ζυμωμένα λαχανικά, κρέας	-	30–37	0.93
<i>Lb. casei</i>	Τυρί	-	30–37	0.93
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ζυμωμένα λαχανικά, κρέας	-	38–42	-

2.6 pH και ζύμωση

Τα LAB, και σε μικρότερο βαθμό τα μπιφιδοβακτήρια, είναι σχετικά ανθεκτικά στα οξέα, αλλά, χωρίς έλεγχο του pH, η συσσώρευση γαλακτικού οξέος επηρεάζει τελικά τη φυσιολογία τους και τα μικρόβια παύουν να αναπτύσσονται λόγω της αυτοοξίνισης τους. Καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης επιβραδύνεται όταν το pH μειώνεται, ο έλεγχος του pH κοντά στην ουδετερότητα εξασφαλίζει υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη υδροξειδίου του αμμωνίου, του νατρίου ή του καλίου ή με τη συμπερίληψη CaCO₃ ή Ca(OH)₂ που διαλύεται καθώς πέφτει το pH, εξουδετερώνοντας έτσι την οξύτητα. Δυστυχώς, η αναστολή του προϊόντος συμβαίνει ακόμη και υπό έλεγχο pH. Το γαλακτικό συσσωρεύεται και γίνεται ανασταλτικό για την ανάπτυξη (Vinderola et al. 2019).

3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

3.1 Ορισμός

Ως καλλιέργεια εκκίνησης ορίζεται το μικροβιακό παρασκεύασμα ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, το οποίο προστίθεται σε μια πρώτη ύλη, για την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης, μέσω καθοδηγούμενης επιτάχυνσης της ζυμωτικής διαδικασίας. Η ομάδα των LAB κατέχει κεντρικό ρόλο σε αυτές τις διεργασίες, και έχει μακρά και ασφαλή ιστορία εφαρμογής και κατανάλωσης στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων και ποτών. Προκαλούν ταχεία οξίνιση της πρώτης ύλης μέσω παραγωγής οργανικών οξέων, κυρίως γαλακτικού οξέος. Επίσης σημαντικό γεγονός είναι ότι παράγουν οξικό οξύ, αιθανόλη, αρωματικές ενώσεις, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες και πολλά ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος παρέχοντας μικροβιακή ασφάλεια και βελτιώνουν την υφή και το αισθητικό προφίλ του. Η πρώτη παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων έγινε αυθόρμητα λόγω της ανάπτυξης της υπάρχουσας μικροχλωρίδας που υπήρχε με φυσικό τρόπο στην πρώτη ύλη. Η ποιότητα του τελικού προϊόντος εξαρτήθηκε από το μικροβιακό φάσμα και το φορτίο που υπήρχε στην πρώτη ύλη. Η αυθόρμητη ζύμωση βελτιστοποιήθηκε με τον εμβολιασμό της πρώτης ύλης με μικρή ποσότητα μιας ήδη επιτυχημένης ζύμωσης. Αυτή η διαδικασία εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, όπως στην παραγωγή ξινού λάχανου και προζυμιού, και ιδίως για προϊόντα για τα οποία η μικροβιακή οικολογία και ο ακριβής ρόλος της διαδοχής των μικροβιακών πληθυσμών δεν είναι γνωστά (Leroy *et al.* 2004).

3.2 Είδη Καλλιεργείων εκκίνησης

Η διαδοχική διάδοση καλλιεργείων εκκίνησης σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά τρόφιμα είναι επικίνδυνη λόγω της μόλυνσης ή της προσβολής από βακτηριοφάγους. Προτιμάται η χρήση καλλιεργείων εκκίνησης και προβιοτικών σε κατεψυγμένες και αποξηραμένες συμπυκνωμένες μορφές για άμεσο εμβολιασμό. Αυτές οι καλλιέργειες περιέχουν τυπικά 10¹⁰ έως 10¹² CFU/g ή mL. Καθώς αφαιρείται το νερό, υψηλότερα επίπεδα βιώσιμων κυττάρων μπορούν να επιτευχθούν από αυτές τις καλλιέργειες (Vinderola *et al.* 2019).

3.2.1 Παγωμένες καλλιέργειες (Frozen Cultures)

Για τις κατεψυγμένες καλλιέργειες, ο ρυθμός ψύξης είναι βασικός παράγοντας για την επιβίωση των κυττάρων. Για χαμηλούς ρυθμούς, τα κύτταρα είναι επιρρεπή σε γρήγορη απώλεια νερού η οποία οδηγεί σε σχηματισμό πάγου έξω από τα κύτταρα ο οποίος με τη σειρά του βλάπτει τα κύτταρα. Στην πράξη, η αργή κατάψυξη επιτυγχάνεται σε καταψύκτη λαμβάνοντας υπόψη ότι ένας υψηλότερος ρυθμός ψύξης μπορεί να επιτευχθεί ρίχνοντας το αιώρημα κυττάρων σε μια δεξαμενή με υγρό άζωτο ή υγρό CO₂. Τα σταγονίδια συσσωρεύονται σχεδόν αμέσως σε σφαιρίδια και μεταφέρονται από την εμβάπτιση με μεταφορικό ιμάντα πλέγματος. Μικροί κρύσταλλοι πάγου μπορεί να μετατραπούν σε επικίνδυνους μεγάλους κρυστάλλους, εάν υπάρχει διακύμανση της θερμοκρασίας. Οι εμπορικές κατεψυγμένες συμπτυκνωμένες καλλιέργειες πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -45 ° C για να διατηρηθεί η διάρκεια ζωής τους για τουλάχιστον 12 μήνες (Vinderola *et al.* 2019).

3.2.2 Πάγωμα - Ξήρανση καλλιέργειας (Λυοφιλοποίηση), (Freeze-Drying cultures)

Η λυοφιλοποίηση, είναι μακράν η πιο συμβατική διαδικασία για τη βιομηχανική παραγωγή αποξηραμένων βακτηριακών καλλιεργειών. Η μακροχρόνια αποθήκευση επιτυγχάνεται μειώνοντας την ενεργότητα του νερού σε τιμές κάτω από 0,2. Η σταθεροποίηση των βακτηρίων μέσω της λυοφιλοποίησης ξεκινά με την ανάμειξη του βακτηριακού σφαιριδίου που παράγεται με ένα κρυοπροστατευτικό διάλυμα (συνήθως 10% -20% w/v συνολικά στερεά).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

1. Σύντομη περίοδος ανάρρωσης – ηρεμία μίγματος
2. Πάγωμα
3. Αρχική ξήρανση (αφαίρεση πάγου με εξάχνωση)
4. τελική ξήρανση για απομάκρυνση του μη κατεψυγμένου νερού με εκρόφηση

Σε εργαστηριακό περιβάλλον, η ξήρανση με κατάψυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστά σε λιγότερο από 24 ώρες, ενώ σε βιομηχανική κλίμακα αυτή η διαδικασία μπορεί να απαιτήσει 24-72 ώρες. Το πρωτεύον και το δευτερεύον στάδιο ξήρανσης χαρακτηρίζονται από μια σειρά παραμέτρων που ποικίλλουν ως συνάρτηση τριών παραμέτρων: θερμοκρασία, διάρκεια και επίπεδο κενού (Vinderola *et al.* 2019).

3.2.3 Ξήρανση καλλιέργειας με ψεκασμό

Στη δεύτερη θέση σπουδαιότητας και ανάπτυξης έρχεται η μέθοδος της ξήρανσης με ψεκασμό, με κόστος έως και 10 φορές χαμηλότερο από αυτό της ξήρανσης με κατάψυξη. Μια μεγαλύτερη κλίμακα παραγωγής μπορεί να επιτευχθεί με ψεκασμό σε σύγκριση με ξήρανση με κατάψυξη. Είναι επίσης ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την παραγωγή καλλιεργειών χρησιμοποιώντας προστατευτικά συστατικά για την ενίσχυση της αντοχής κατά την αποθήκευση ή την πέψη. Στην ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται ένα γρήγορο ρεύμα ζεστού αέρα ώστε να αφυδατωθούν μικρά ψεκασμένα σταγονίδια βακτηριακών κυττάρων. Η ξήρανση με ψεκασμό θα μπορούσε να έχει τα ακόλουθα οφέλη για τους κατασκευαστές προβιοτικών:

- Είναι λιγότερο δαπανηρή από την ξήρανση με κατάψυξη
- Δυνατότητα ενθλάκωσης κατά τη διάρκεια της ίδιας της ξήρανσης με ψεκασμό (Vinderola *et al.* 2019).

3.2.4 Επανενεργοποίηση παγωμένων ή αφυδατωμένων καλλιεργιών

Μπορεί να συμβεί σημαντικός κυτταρικός θάνατος λόγω διαδικασιών κατάψυξης και απόψυξης. Πολλοί κυτταρικοί τραυματισμοί μπορεί να λάβουν χώρα οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης. Μια καλλιέργεια που επιβίωσε επιτυχώς από την κατάψυξη, την ξήρανση και την αποθήκευση μπορεί να εξακολουθήσει να χάνει μερικώς τη βιωσιμότητά της εάν δεν ενυδατωθεί σωστά. Η ανασύσταση των αποξηραμένων καλλιεργειών μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο την επιβίωση αλλά και τη δραστηριότητα των βακτηρίων. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση στην επανυδάτωση είναι η ωσμωτικότητα, το pH και η σύνθεση του διαλύματος ενυδάτωσης, καθώς και η θερμοκρασία και ο ρυθμός επανυδάτωσης (Vinderola *et al.* 2019).

3.3 Προβιοτικά

3.3.1 Ορισμός

Η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) όρισαν ως προβιοτικά "τους ζωντανούς μικροοργανισμούς που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν θετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή" (FAO/WHO, 2001). Οι ζύμες (το γένος *Saccharomyces*), τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (μέλη των γενών *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*) και τα βακτήρια του μη γαλακτικού οξέος μπορούν να χαρακτηριστούν ως προβιοτικά. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κυρίως ως προβιοτικά ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Για να μπορέσει ένας προβιοτικός μικροοργανισμός να προκαλέσει θετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή, πρέπει να λαμβάνεται σε μια δόση της τάξεως των 5 δισεκατομμυρίων CFU/ ημέρα, για μια περίοδο τουλάχιστον 5 ημερών (Rajilić-Stojanović *et al.* 2019).

3.3.2 Επίδραση των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό

Παραδείγματα θετικών αντιδράσεων που μπορούν να έχουν οι προβιοτικοί οργανισμοί στον καταναλωτή είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης και η πέψη των τροφών, η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, ο έλεγχος των εντερικών λοιμώξεων ρυθμίζοντας την εντερική χλωρίδα, οι αντιμυκητιακές επιδράσεις, οι αντικαρκινικές ιδιότητες, η ενίσχυση του ανοσολογικού συστήματος, η ικανότητα μείωσης της χοληστερόλης, ο ρυθμιστικός ρόλος σε αλλεργίες, η προστασία από κολπικές και ουροποιητικές μολύνσεις καθώς και η διατήρηση της ακεραιότητας των επιθηλιακών κυττάρων (Rajilić-Stojanović *et al.* 2019).

3.3.3 Κριτήρια επιλογής του ιδανικού προβιοτικού

- Να έχει ακριβή ταξινόμηση.
- Να προέρχεται από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του ξενιστή – στόχου.
- Να μην είναι παθογόνος και να είναι αναγνωρισμένο ως 'GRAS' (Generally Recognized As Safe).
- Να είναι ανθεκτικό απέναντι στα χολικά άλατα, στο υδροχλωρικό οξύ και στα παγκρεατικά υγρά.
- Να επιβιώνει στις όξινες συνθήκες του στομάχου και στις αλκαλικές συνθήκες του εντερικού

σωλήνα.

- Να μπορεί να ανταγωνιστεί με τους παθογόνους μικροοργανισμούς (ανθεκτικότητα στις βακτηριοσίνες, και στις αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου).
- Να έχει ανοσοδιεγερτική δράση.
- Να προσκολλάται στο επιθήλιο του εντέρου.
- Να διατηρεί υψηλή βιωσιμότητα και μεταβολική δραστηριότητα στο σημείο - στόχο του ξενιστή.
- Να έχει σταθερότητα των επιθυμητών χαρακτηριστικών του κατά την διάρκεια της επεξεργασίας, της διατήρησης και της κατανάλωσης από τον ξενιστή.
- Να έχει γενετική σταθερότητα (Rajilić-Stojanović *et al.* 2019).

4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΩΝ LAB ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

4.1 Βακτηριοσίνες

Οι μεταβολίτες που παράγονται από τα LAB από τη διάσπαση του αρχικού υποστρώματος μεταβάλλουν τις ιδιότητες του προϊόντος και δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροβίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του τροφίμου. Μια σειρά αντιμικροβιακών μεταβολιτών παράγονται από τα LAB, κυρίως με τη μορφή οργανικών οξέων, όπως το γαλακτικό οξύ, αναστέλλοντας την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροβίων. Πολλά LAB έχουν επίσης αποδειχθεί ότι παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια γνωστά ως βακτηριοσίνες που στοχεύουν και σκοτώνουν ευαίσθητα ανταγωνιστικά μικρόβια. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργηθεί μια τάση για την παραγωγή τροφίμων απαλλαγμένων από χημικές ενώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το αυξημένο ενδιαφέρον για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα μεταβολικά τους προϊόντα. Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ουσίες οι οποίες ποικίλλουν σε σχέση με το αντιμικροβιακό φάσμα, το μοριακό βάρος, τη γενετική τους προέλευση και τις βιοχημικές ιδιότητες τους. Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι επικίνδυνες ουσίες λόγω της προέλευσής τους και έτσι μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα του τροφίμου με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά. Οι ομοιότητες που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια, αλλά και οι μεταξύ τους διαφορές, έχουν οδηγήσει στην κατηγοριοποίηση τους σε 4 κλάσεις σύμφωνα με τον Klaenhammer (1993) και την τροποποίηση που επέφερε σε αυτήν οι Nés *et al.* (1996) (METAXOPOULOS *et al.* 2002).

4.1.1 Κατηγοριοποίηση βακτηριοσίνων

Κλάση Ι. (λαντιβιοτικά) Αυτά είναι μικρού MB πεπτίδια (<3,5 kDa), ανθεκτικά στη θέρμανση και χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο μόριο τους αμινοξέων, όπως είναι η λανθειονίνη και η 3-μεθυλο-λανθειονίνη.

Κλάση ΙΙ. (μη- λαντιβιοτικά). Είναι μικρού MB βακτηριοσίνες (<10 kDa) με 30-100 αμινοξέα στο μόριο τους, ανθεκτικές στη θέρμανση και οι οποίες δεν περιέχουν λανθειονίνη στο μόριο τους. Η κλάση αυτή χωρίζεται σε 3 υποκατηγορίες:

- Πα. Περιλαμβάνει πεπτίδια τα οποία είναι δραστικά έναντι του γένους *Listeria*. Οι βακτηριοσίνες αυτές δεν είναι τόσο δραστικές έναντι των σπορίων, αλλά είναι πιο αποτελεσματικές από τη νισίνη σε ορισμένα τρόφιμα, όπως στο κρέας.
- Πβ. Περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που σχηματίζονται από 2 πεπτίδια (λακτοκοκκίνη G).
- Πγ. Περιλαμβάνει πεπτίδια που απαιτούν ανηγμένα μόρια κυστεΐνης για την εκδήλωση της

δραστικότητα (λακτοκοκκίνη Β).

Κλάση III. Είναι βακτηριοσίνες μεγάλου ΜΒ (>30 kDa), οι οποίες δεν είναι τόσο σταθερές στη θέρμανση και αδρανοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (ελβετισίνη J).

Κλάση IV. Αυτές οι βακτηριοσίνες έχουν ένα υδατανθρακικό ή λιπαρό τμήμα στο μόριο τους, το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης (λακτοσίνη 27) (METAXOPOULOS *et al.* 2002).

4.1.2 Ανθεκτικότητα στη θέρμανση

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικές στη θέρμανση. Η ευαισθησία τους στη θέρμανση εξαρτάται από την καθαρότητα τους, το pH, το ΜΒ και την παρουσία προστατευτικών ενώσεων. Η αντοχή των βακτηριοσινών στη θέρμανση υποδεικνύει ότι το βιολογικά ενεργό τμήμα του μορίου στερείται τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής. Εξαιρεση αποτελούν οι βακτηριοσίνες της τρίτης κλάσης καθώς δεν είναι ανθεκτικές στη θέρμανση (Μεταξόπουλος *et al.* 2002).

4.1.3 Επίδραση του pH

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι γενικά σταθερές σε όξινο ή ουδέτερο pH (pH 2,0-8,0). Οι περισσότερες βακτηριοσίνες αδρανοποιούνται σε αλκαλικές τιμές pH (METAXOPOULOS *et al.* 2002).

4.1.4 Βιοσύνθεση των βακτηριοσινών

Η σύνθεση των κατιονικών αυτών πεπτιδίων κωδικοποιείται από τέσσερα γονίδια:

- Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της προβακτηριοσίνης (πρόδρομη ουσία).
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανοσία στο παράγωγο-στέλεχος.
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λειτουργία ενός μηχανισμού μεταφοράς έξω από το κύτταρο της πρόδρομης ουσίας (ABC-transporter).
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας συμπληρωματικής βοηθητικής πρωτεΐνης (accessing protein), της οποίας η παρουσία είναι σημαντική για τη μεταφορά της βακτηριοσίνης έξω από το κύτταρο, αλλά ακόμα δεν έχει εξηγηθεί ο ακριβής της ρόλος (METAXOPOULOS *et al.* 2002).

4.1.5 Τρόπος δράσης των βακτηριοσινών

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών αποτελείται από δυο φάσεις:

Η πρώτη φάση έγκειται στην προσρόφηση της βακτηριοσίνης πάνω σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών. Σε αυτή τη φάση οι βακτηριοσίνες δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στο κύτταρο. Η φάση αυτή είναι αναστρέψιμη και καθώς απομακρύνεται η βακτηριοσίνη διατηρείται η δομή της μεμβράνης. Η δεύτερη φάση είναι μη αναστρέψιμη και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στα ευαίσθητα κύτταρα (METAXOPOULOS *et al.* 2002).

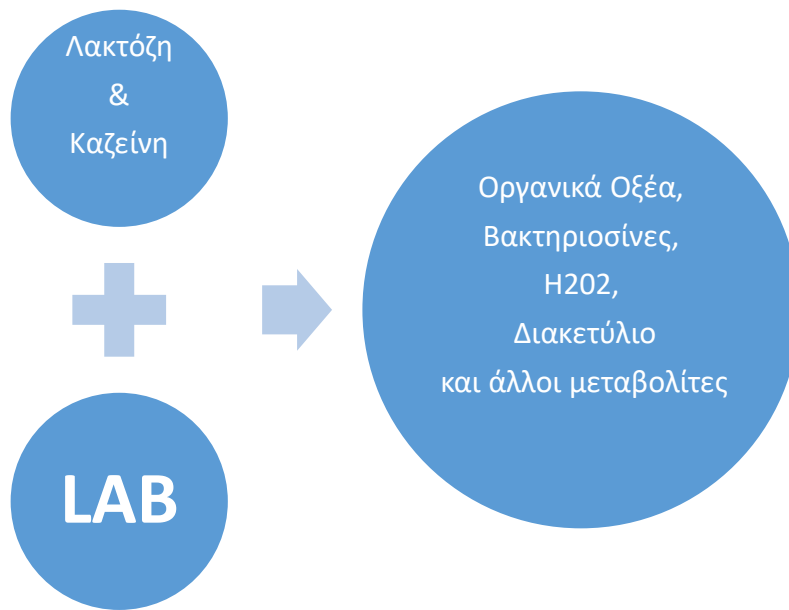
Πίνακας 4: Βακτηριοσίνες που παράγονται από τα LAB (Collins *et al.* 2019).

Όνομα	Παραγωγός μικροοργανισμός
ABP-118	<i>L. salivarius subsp. salivarius UCC118</i>
Enterocin 1071	<i>E. faecalis BFE 1071</i>
Enterocin L50	<i>E. faecium L50</i>
Lactacin F	<i>L. johnsonii VPI11088</i>
Lactocin 705	<i>Lb. casei CRL 505</i>
Lactococcin G	<i>Lc. lactis LMG 2081</i>
Lactococcin MN	<i>Lc. lactis subsp. cremoris 9B4</i>
Leucocin H	<i>Leuconostoc MF215B</i>
Mutacin IV	<i>Str. mutans UAI40</i>
Plantaricin EF	<i>L. plantarum C-11</i>
Plantaricin JK	<i>L. plantarum C-11</i>
Plantaricin S	<i>L. plantarum LPCO10</i>
Thermophilin 13	<i>Str. thermophilus SFi13</i>
Acidocin X	<i>L. acidophilus DSM 20079</i>
Muricin	<i>L. murinus DSM 20452</i>
Salivaricin P	<i>L. salivarius DPC6005</i>
Plantaricin NC8	<i>L. plantarum NC8</i>
Brevicin 174	<i>L. brevis 174A</i>
Acidocin LF221	<i>L. gasseri LF221</i>
Gasericin T	<i>L. gasseri SBT2055</i>

Sakacin T	<i>Lb. sakei</i> CTC372
Salivaricin CLR 1328	<i>L. salivarius</i> CLR1328
Salivaricin T	<i>L. salivarius</i> DPC6488
Lactococcin Q	<i>Lc. lactis</i> QU 4
Enterocin X	<i>E. faecium</i> KU-B5
SpbMN	<i>Str. pyogenes</i> MGAS8232
Carnobacteriocin XY	<i>C. maltaromaticum</i> C2
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48
Uberolysin	<i>Str. uberis</i> strain 42
Lactocyclicin Q	<i>Lc. sp.</i> Strain QU 12
Carnocyclin A	<i>C. maltaromaticum</i> UAL307
Garvicin ML	<i>Lc. garvieae</i> DCC43
Leucocyclicin Q	<i>Leuc. mesenteroides</i> TK41401
NKR-5-3B	<i>E. faecalis</i> NKR-5-3
Gassericin A	<i>L. gasseri</i> LA39
Acidocin B	<i>L. acidophilus</i> M46
Reuterin 6	<i>L. reuteri</i> LA6
Plantaricyclin	<i>L. plantarum</i> NI326
Paracyclin	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM5622

4.2 Αντιμικροβιακοί Μεταβολίτες

Οι μεταβολίτες και τα ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται από το LAB κατά τη ζύμωση μπορούν από μόνα τους να εμφανίσουν αντιμικροβιακή δράση. Αυτοί οι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των τροφίμων περιορίζοντας την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων μικροβίων. Τέτοια παραδείγματα είναι: (Collins *et al.* 2019):



Εικόνα 1: Τα LAB παράγουν μια ποικιλία αντιμικροβιακών ενώσεων που μπορούν να αναστείλουν και να σκοτώσουν ευαίσθητα μικρόβια. Ενώσεις όπως το γαλακτικό οξύ και το διακετύλιο είναι μεταβολικά απόβλητα που μπορούν επίσης να δράσουν ως αντιμικροβιακά. Οι βακτηριοκίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που παράγονται από LAB που στοχεύουν στο να αναστέλλουν τις δραστηριότητες των ανταγωνιστικών βακτηρίων (Collins et al. 2019).

4.3 Οργανικά οξέα – Μηχανισμός Δράσης

Τα οργανικά οξέα είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των LAB και έχουν αντιμικροβιακή δράση. Τα πρωτογενή οξέα που παράγονται από αυτά τα κύτταρα είναι το γαλακτικό οξύ και το αιθανικό οξύ, αλλά μπορούν να παραχθούν και άλλα όπως το μυρμηκικό οξύ. Η αντιμικροβιακή τους δράση μπορεί να οφείλεται κυρίως στη μείωση του εσωτερικού pH των ευαίσθητων κυττάρων. Τα οξέα αυτά είναι διαπερατά από τα λιπίδια και έτσι μπορούν ελεύθερα να διαχυθούν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, προκαλώντας μια συσσώρευση ανιόντων η οποία στη συνέχεια προκαλεί μείωση του εσωτερικού pH του κυττάρου (pHi). Η μείωση του pHi μπορεί να επηρεάσει πολυάριθμες διεργασίες στα κύτταρα και μπορεί να οδηγήσει σε εσωτερική μετουσίωση ενζύμων. Η αυξημένη συγκέντρωση ανιόντων στο κύτταρο μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αύξηση της μεταφοράς ιόντων καλίου στο κύτταρο. Το γλουταμινικό οξύ μεταφέρεται στη συνέχεια έξω από το κύτταρο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ωσμωτικότητας του κυττάρου και έτσι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Η πτώση του pH μπορεί επίσης να προκαλέσει αλλαγές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων στη μεμβράνη των κυττάρων. Το γαλακτικό οξύ είναι το κύριο οργανικό οξύ που παράγεται από το LAB. Κατά την έκθεση σε γαλακτικό οξύ, ο *Bacillus cereus* εμφάνισε 196 τροποποιημένα γονίδια. Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ και το αιθανικό οξύ μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες μέσα στα κύτταρα (Collins et al. 2019).

4.3.1 Χρήση οργανικών οξέων

Τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά για την απολύμανση των σφαγίων. Επίσης μπορούν να προστεθούν σε χυμούς και ποτά ως βιοσυντηρητικά και ρυθμιστές οξύτητας. Μέσα από την εξουδετέρωση των οργανικών οξέων παράγονται άλατα τα οποία είναι χρήσιμα διότι δρουν έναντι σε παθογόνους και μικρόβια τα οποία είναι υπεύθυνα για αλλοιώσεις τροφίμων, όπως *E. coli O157*, *MRSA* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τα LAB εμπλέκονται στη ζύμωση ενός ευρέος φάσματος τροφίμων, όπως π.χ. κρέατα που έχουν υποστεί ζύμωση (σαλάμι), λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση (kimchi, ξινόλαχανο) και γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (κεφίρ, γιαούρτι). Η ζύμωση με LAB παρέχει μια φθηνή και οικονομικά αποδοτική μέθοδο για τη διατήρηση των τροφίμων, ενώ συχνά ενισχύει τη γεύση και τις θρεπτικές ιδιότητες (Collins *et al.* 2019).

4.3.2 3-hydroxypropionaldehyde (Reuterin)

Είναι μια αντιμικροβιακή ένωση που είναι ένα ενδιάμεσο στο μεταβολισμό της γλυκερόλης σε συγκεκριμένα είδη. Το όνομα προέρχεται από τον πιο αξιοσημείωτο παραγωγό του, *L. reuteri*, ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι αρκετά είδη *Lactobacillus* παράγουν αυτή την ένωση καθώς και στελέχη από άλλα γένη όπως ορισμένα στελέχη της *Klebsiella*. Αυτή η οργανική ένωση αναστέλλει τη δράση ενός ευρέος φάσματος θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηρίων, μαζί με ζύμες, μούχλες και πρωτόζωα (Collins *et al.* 2019).

4.3.2.1 Χρήση του 3HPA

Λόγω του ευρέος φάσματος δράσης του, είναι ένα χρήσιμο αντιμικροβιακό. Λόγω της χαμηλής δυννητικής τοξικότητάς του στο σώμα, μαζί με το ανασταλτικό του φάσμα έναντι των παθογόνων και βακτηριδίων που αλλοιώνουν τα τρόφιμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες ως συντηρητικό τροφίμων. Έχει αποδειχθεί ότι επιβιώνει από τη γαστρική διέλευση και έχει την ικανότητα να αποικίζει στο έντερο. Μοντέλα του επιθηλίου του παχέος εντέρου έχουν δείξει ότι η παραγωγή 3 HPA βελτιώνει την προστασία έναντι της προσκόλλησης, της εισβολής και της ενδοκυττάριας επιβίωσης του *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Collins *et al.* 2019).

4.3.3 Υπεροξειδίο του Υδρογόνου

Πολλά LAB παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου κατά την παρουσία οξυγόνου. Ο ακριβής τρόπος δράσης για την αντιμικροβιακή δράση του H_2O_2 δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ωστόσο, είναι πιθανότατα ένας συνδυασμός βλάβης DNA, οξειδωσης πρωτεΐνης και διαταραχής της μεμβράνης του κυττάρου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή αντιδραστικών ριζών υδροξυλίου που σχηματίζονται από την αντίδραση του Φέντον. Αυτές οι ρίζες υδροξυλίου προκαλούν σπασίματα στο DNA εξαιτίας της αντίδρασης τους με τις ομάδες μεθυλίου θυμίνης. Το μικρό μοριακό μέγεθος του μορίου, του επιτρέπει να εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα όπου μπορεί να αντιδράσει με τις πρωτεΐνες και το DNA. Η δραστηριότητα του H_2O_2 μπορεί επίσης να επηρεαστεί από το αν η ένωση είναι σε υγρή ή αέρια μορφή. Ακόμα θεωρείται πιο αποτελεσματικό έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η δραστηριότητα του H_2O_2 ενισχύεται όταν δρά μαζί με το γαλακτικό οξύ, το οποίο παράγεται φυσικά από τα βακτήρια. Η βλάβη που προκαλείται από το γαλακτικό οξύ στη μεμβράνη του κυττάρου κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στη δραστηριότητα του H_2O_2 (Collins *et al.* 2019).

4.3.3.1 Χρήση του Υπεροξειδίο του Υδρογόνου

Η αντιμικροβιακή δράση του H_2O_2 το καθιστά χρήσιμο προβιοτικό το οποίο βοηθάει στην αντιμετώπιση της μόλυνσης της κοιλιακής μικροχλωρίδας (Collins *et al.* 2019).

4.3.4 Αιθανόλη

Η αιθανόλη είναι ένα άλλο αντιμικροβιακό προϊόν που προκύπτει από τις μεταβολικές αντιδράσεις ορισμένων LAB. Οι αλκοόλες όπως η αιθανόλη χρησιμοποιούνται συνήθως ως απολυμαντικά λόγω δράσης τους, καθώς αναστέλλουν βακτηριακά κύτταρα, μύκητες και ιούς. Η αιθανόλη θεωρείται ότι βλάπτει τις κυτταρικές μεμβράνες και τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες διαταράσσουν τις κυτταρικές διαδικασίες. Είναι πολύ αποτελεσματική όταν συνδυάζεται με άλλα αντιμικροβιακά, όπως το γαλακτικό οξύ, το οποίο επίσης παράγεται από αυτά τα στελέχη (Collins *et al.* 2019).

4.3.5 Διακετύλιο

Το διακετύλιο είναι ένα μεταβολικό προϊόν των LAB που έχει επίσης αποδειχθεί ότι εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση. Ο σχηματισμός διακετυλίου από τα LAB είναι ευεργετικός για ζυμωμένα

τρόφιμα και άλλα προϊόντα λόγω του αρώματος που μοιάζει με βούτυρο. Αν και η δραστηριότητά του δεν είναι τόσο ισχυρή όσο άλλα αντιμικροβιακά, μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα θετικά κατά gram στελέχη ωστόσο, τείνουν να είναι λιγότερο ευαίσθητα στο διακετύλιο. Ωστόσο το άρωμα βουτύρου που σχετίζεται με το μόριο, μειώνει τη πιθανή χρήση ως πρόσθετο τροφίμων σε πολλά τρόφιμα για συντήρηση (Collins *et al.* 2019).

4.4 Μύκητες

Οι μύκητες συνήθως είναι η αιτία της αλλοίωσης των γαλακτοκομικών τροφίμων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες για τη γαλακτοβιομηχανία καθώς και τη δυσαρέσκεια των καταναλωτών. Λόγω των εγγενών τους χαρακτηριστικών (όξινο pH, θρεπτική σύνθεση και ενδιάμεση ενεργότητα νερού), τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ζύμης και μούχλας. Σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των τροφίμων έχουν οι μύκητες *Aspergillus*, και *Fusarium*. Οι πιο συνηθισμένοι μύκητες που εμπλέκονται στην αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Mucor* και *Cladosporium* για μούχλα και *Candida*, *Kluyveromyces* και *Yarrowia* για ζύμες. Τα πιο σημαντικά είδη μυκήτων που ευθύνονται για τη διαφθορά των τυριών στα οποία δεν έχει γίνει προσθήκη συντηρητικών είναι ο *Penicillium commune* και *P. Nalgiovense*. Η ικανότητα των ζυμομυκήτων να επιβιώνουν σε όξινα περιβάλλοντα, ευνοεί την αερόβια ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (Garnier *et al.* 2020).

5 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ LAB ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

5.1 LAB σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Ο μετασχηματισμός και η συντήρηση που διευκολύνεται από τη μοναδική βιολογική διαδικασία που ονομάζεται ζύμωση έχει πολλαπλασιάσει τους πιθανούς συνδυασμούς βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) και των μεταβλητών ανάπτυξης τους (όπως θερμοκρασία, αλατότητα, υγρασία). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών τύπων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το γιαούρτι, το κεφίρ, το τυρί και άλλα, καθιστώντας έτσι τον ζυμωμένο γαλακτοκομικό κόσμο γεμάτο επιλογές. Από τα αρχαία χρόνια οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν τα LAB τυχαία. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να αναπτυχθούν και να μεταμορφώσουν φυσικά το γάλα. Η ζύμωση γάλακτος είναι ένας φυσικός τρόπος για να αυξηθεί η διάρκεια ζωής του και ταυτόχρονα να διατηρηθούν τα θρεπτικά συστατικά του (Binda *et al.* 2019).

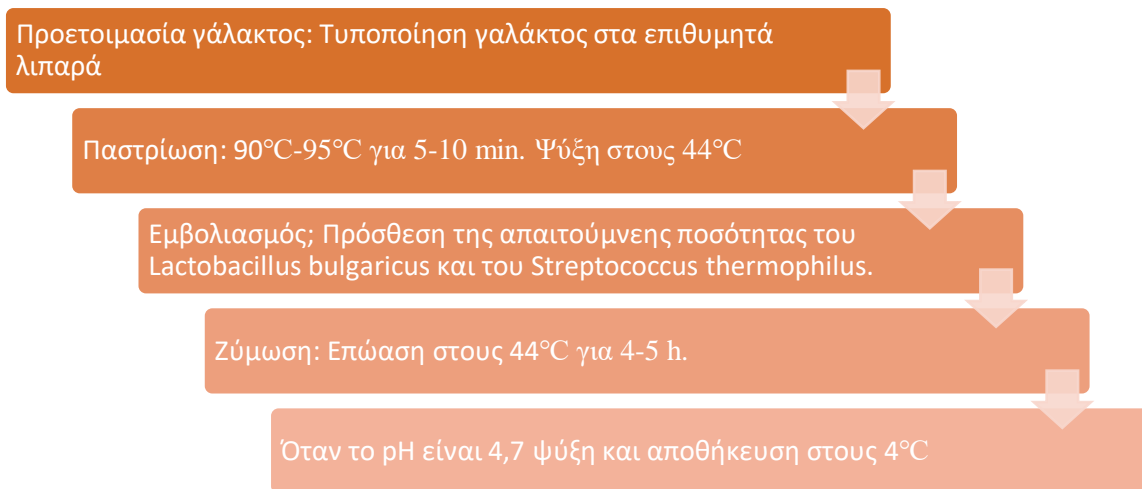
5.1.1 Γιαούρτι

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, για να ονομάζεται ένα προϊόν γιαούρτι πρέπει να διαθέτει δύο συγκεκριμένα LAB. Αυτά είναι τα *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (*L. bulgaricus*) και *Streptococcus thermophiles*. Είναι ενδιαφέρον ότι το τελευταίο είναι το μόνο είδος *Streptococcus* που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και είναι ένα από τα κορυφαία βακτήρια που καταναλώνεται από τους ανθρώπους. Το γιαούρτι, με αυτόν τον μοναδικό συνδυασμό ζωντανών μικροοργανισμών και θρεπτικών συστατικών, είναι μια ενδιαφέρουσα τροφή που μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί σε μια υγιεινή διατροφή (Binda *et al.* 2019).

5.1.1.1 Παραγωγή

Το γιαούρτι λαμβάνεται με τη ζύμωση γαλακτικού οξέος του γάλακτος μέσω της δράσης των χαρακτηριστικών βακτηριακών καλλιεργείων *L. bulgaricus* και *S. thermophilus*. Η σημασία του *S. thermophilus* στη ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων είναι αναγνωρισμένη λόγω της ταχείας ικανότητας οξίνισής του καθώς και της σύνθεσης άλλων μεταβολιτών όπως του μυρμηκικού, που συνεργιστικά ενισχύει την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων. Σε καλλιέργειες εκκίνησης γιαουρτιού, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ *S. thermophilus* και *L. bulgaricus* είναι γνωστές ως μια βασική απεικόνιση συνεργασίας, της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ αυτών των δύο ειδών. Συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια υδρόλυσης της λακτόζης, ο *S. thermophilus* παράγει CO₂ και μυρμηκικό οξύ που

διεγείρουν την ανάπτυξη του *L. bulgaricus*, ο οποίος με τη σειρά του υδρολύει τις πρωτεΐνες του γάλακτος, απελευθερώνοντας πεπτίδια και αμινοξέα που βελτιώνουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα του *S. thermophilus*. Κατά τη διαδικασία, το γαλακτικό οξύ παράγεται από τη ζύμωση της λακτόζης και συμβάλλει στην ξινή γεύση του γιαουρτιού μειώνοντας το pH και επιτρέπει την χαρακτηριστική υφή ενεργώντας στις πρωτεΐνες του γάλακτος. Όταν το pH πέσει κάτω από το 5, τα μικκύλια καζεΐνης, χάνουν την τριτοταγή δομή τους λόγω της πρωτονίωσης των αμινοξέων τους. Η μετουσιωμένη πρωτεΐνη ανασυντίθεται, αλληλεπιδρώντας με άλλα υδρόφοβα μόρια και αυτή η αλληλεπίδραση των καζεϊνών δημιουργεί μια δομή που επιτρέπει την ημιστερεή υφή του γιαουρτιού. Το γιαούρτι μπορεί να παρασκευαστεί από αγελαδινό, αιγοπρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα και πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 8,25% μη λιπαρά στερεά. Για να ονομαστεί γιαούρτι πρέπει επίσης να περιέχει τουλάχιστον 107 CFU/g ζωντανών *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* (Binda *et al.* 2019).



Εικόνα 2: Στάδια διαδικασίας δημιουργίας γιαουρτιού (Binda *et al.* 2019).

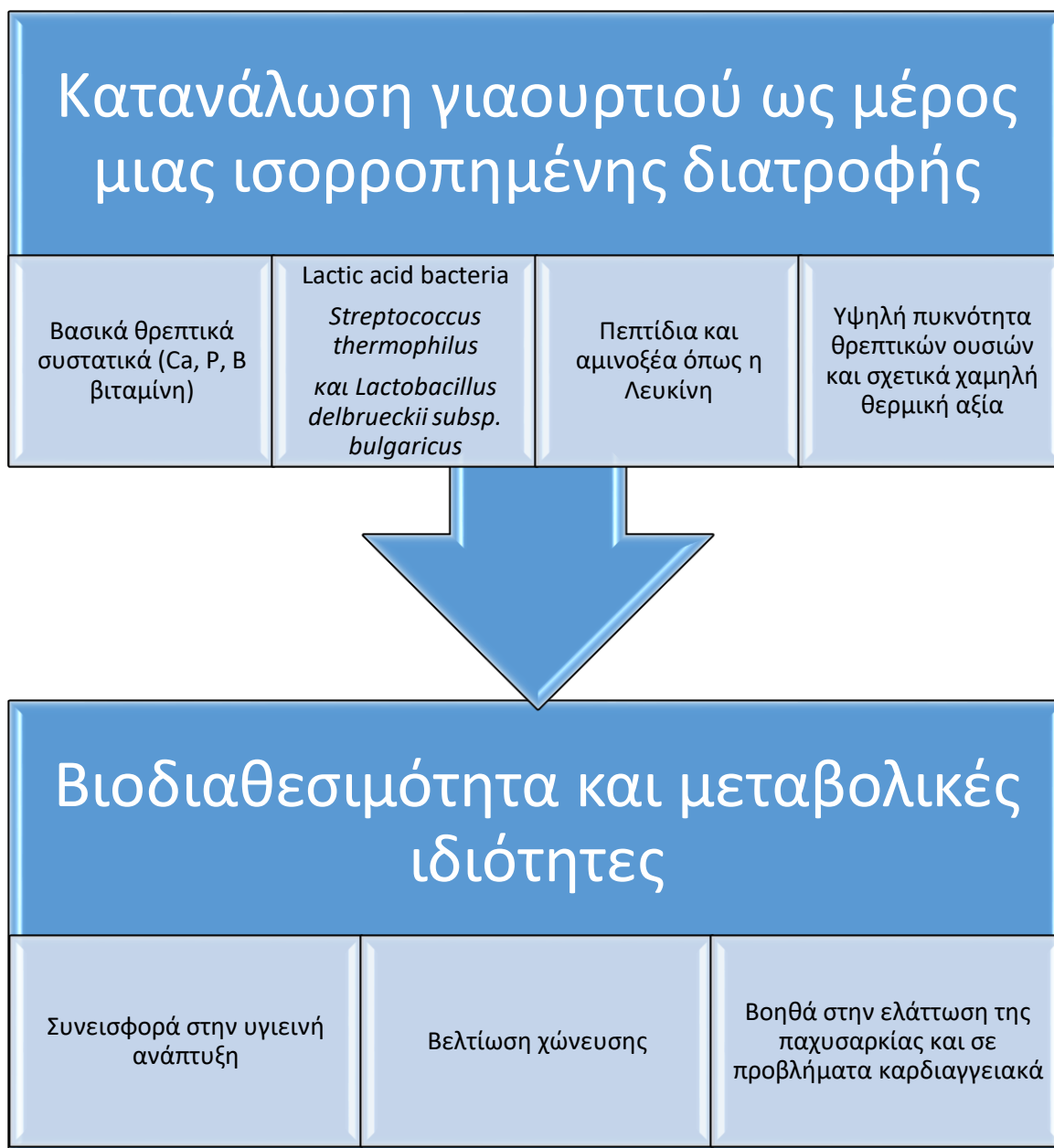
5.1.1.2 Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία

Το γιαούρτι έχει αποδείχθει ότι έχει πολλές υποσχόμενες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Βοηθά στη δυσπεψία λακτόζης, η οποία προκύπτει από γενετική διάθεση ή επίκτητη ανεπάρκεια στο ένζυμο λακτάση, που απαιτείται για την υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη στο λεπτό έντερο. Εάν η λακτόζη φτάσει στο παχύ έντερο, ζυμώνεται γρήγορα, οδηγώντας σε σχηματισμό αερίου.

Η δυσανεξία στη λακτόζη είναι μια κατάσταση στην οποία οι άνθρωποι βιώνουν την ατηνικά συμπτώματα κατά την πέψη, όπως φούσκωμα, διάρροια, αέρια και έμετος, μετά το φαγητό ή την κατανάλωση γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, η κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ειδικά γιαουρτιού, αν και περιέχουν λακτόζη, είναι ανεκτική από άτομα που πάσχουν από κακοήθειες λακτόζης. Αυτό οφείλεται στη παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, που μοιάζει με τη λακτάση, των βακτηρίων *S. thermophilus* και *L. bulgaricus*. Αυτό το βακτηριακό ένζυμο μπορεί να αντισταθμίσει την έλλειψη λακτάσης, υδρολύοντάς την στο λεπτό έντερο εμποδίζοντας έτσι τη ζύμωση της λακτόζης στο παχύ έντερο, δηλαδή την διαδικασία αυτή η οποία είναι υπεύθυνη για τα ανεπιθύμητα συμπτώματα. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση γιαουρτιού βοηθά στον διαβήτη τύπου 2. Τέλος βοηθά στον κίνδυνο που δημιουργείται από υψηλή αρτηριακή πίεση.

Η αγγειοτενσίνη I (δεκαπεπτιδίο) προκύπτει από το αγγειοτενσινογόνο με τη δράση της ρενίνης. Η αγγειοτενσίνη δεν φαίνεται να παίζει κάποιο βιολογικό ρόλο και μάλλον υπάρχει μόνο ως πρόδρομη μορφή της αγγειοτενσίνης II (οκταπεπτιδίο).

Η αγγειοτενσίνη II προκύπτει από το καρβοξυτελικό άκρο της αγγειοτενσίνης I με τη βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, (ACE, (angiotensin-converting enzyme), που βρίσκεται κυρίως στα τριχοειδή των πνευμόνων. Η αγγειοτενσίνη II δρά ως ορμόνη που προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, σύσπαση των αγγείων με αποτέλεσμα αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνή λήψη και η τακτική κατανάλωση ζυμωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων μειώνει τον κίνδυνο υψηλής αρτηριακής πίεσης χάρη στον μεγάλο αριθμό και τη μεγάλη ποικιλία πεπτιδίων με δράση αναστολής της ACE I (Binda *et al.* 2019).



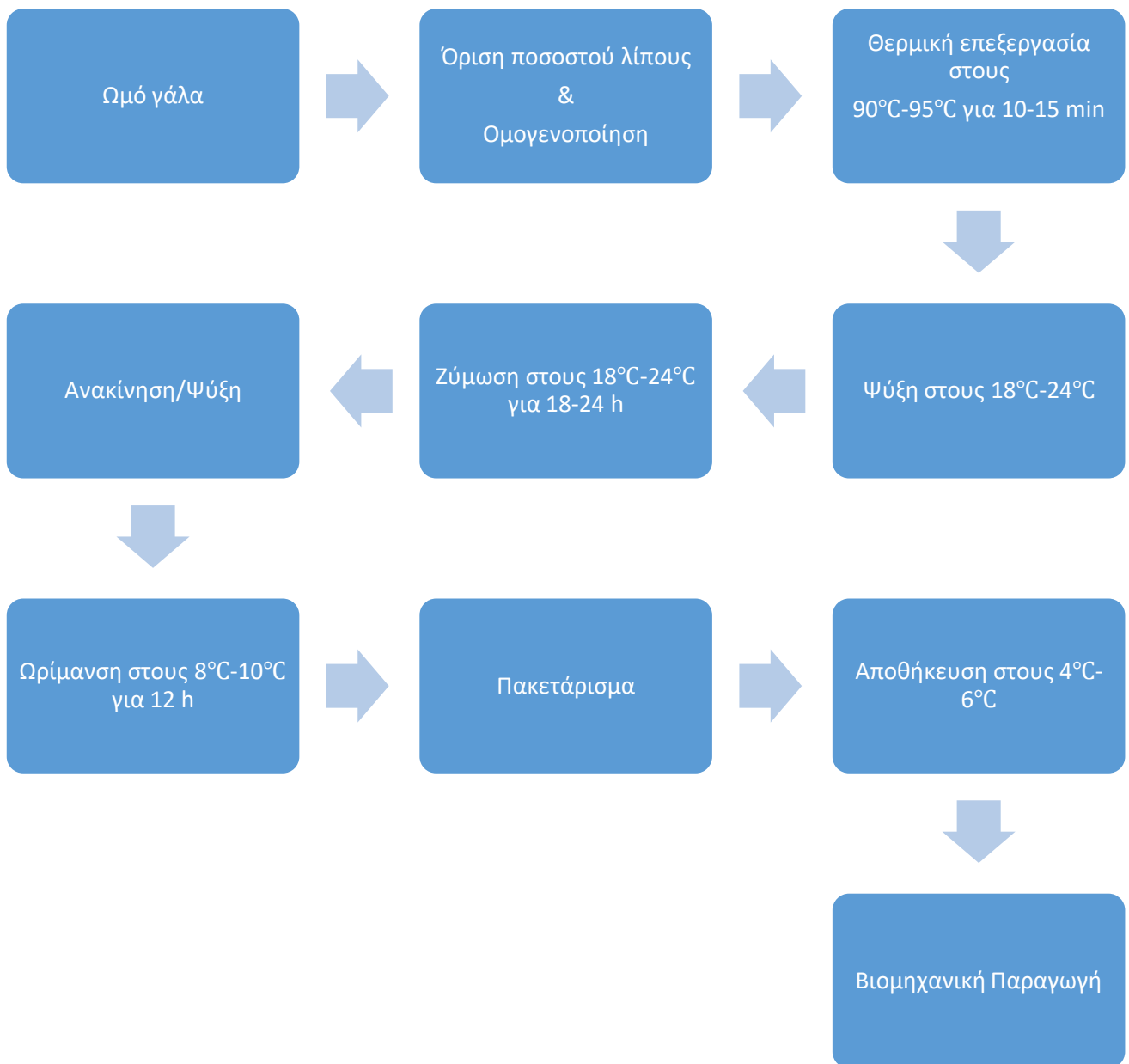
Εικόνα 3: Μηχανισμοί με τους οποίους η κατανάλωση γιαουρτιού είναι μέρος μιας ισορροπημένης διατροφής και ασκεί ευεργετική επίδραση στην υγεία (Binda et al. 2019).

5.1.2 Kefir

Παραδοσιακά, το φρέσκο γάλα (από αγελάδα, κατσικάκι ή πρόβατο και φυτικά «γάλατα», όπως από καρύδα, ρύζι ή σόγια) αποθηκευόταν σε θερμοκρασία δωματίου σε σακούλες από δέρμα κατσίκας ή προβάτου. Στη συνέχεια προστίθεντο κόκκοι μιας προηγούμενης καλλιέργειας κεφίρ πριν η σακούλα κρεμαστεί και εκτεθεί στον ήλιο για όλη τη διάρκεια της ημέρας. Όταν ο ήλιος έπεφτε, η σακούλα τοποθετούνταν μέσα και ακολουθούσε η διαδικασία της ανακίνησης του μείγματος ώστε να εξασφαλιστεί ότι το γάλα και οι κόκκοι κεφίρ παρέμεναν καλά αναμειγμένοι καθώς γινόταν η ζύμωση του γάλακτος. Καθώς καταναλωνόταν το κεφίρ, περισσότερο γάλα προστίθετο στην σακούλα έτσι ώστε η διαδικασία να μπορεί να συνεχιστεί αδιάκοπα (Binda *et al.* 2019).

5.1.2.1 Παραγωγή

Το κεφίρ είναι ένα ζυμωμένο γάλα που δημιουργείται από τη δραστηριότητα των κόκκων κεφίρ οι οποίοι αποτελούνται από LAB, βακτήρια οξικού οξέος (AAB) και ζύμες. Οι κόκκοι κεφίρ περιέχουν τις καλλιέργειες εκκίνησης μαζί με καζεΐνη και σύμπλοκα σακχαρόζης. Οι κόκκοι ζυμώνουν το γάλα ώστε να πραγματοποιηθεί η δημιουργία του καλλιεργημένου προϊόντος. Οι κόκκοι συνήθως αφαιρούνται με ένα φίλτρο πριν από την κατανάλωση του κεφίρ. Οι καλλιέργειες κεφίρ είναι μικροοργανισμοί που παρασκευάζονται από κόκκους κεφίρ. Ο Διατροφικός κώδικας ορίζει την καλλιέργεια εκκίνησης ως ένα μείγμα βακτηρίων *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Acetobacter spp.*, τις ζύμες ζύμωσης λακτόζης *Kluyveromyces marxianus* και τις ζύμες που δεν ζυμώνουν λακτόζη *Saccharomyces unisporus*, *S. cerevisiae* και *S. exiguus* (Binda *et al.* 2019).



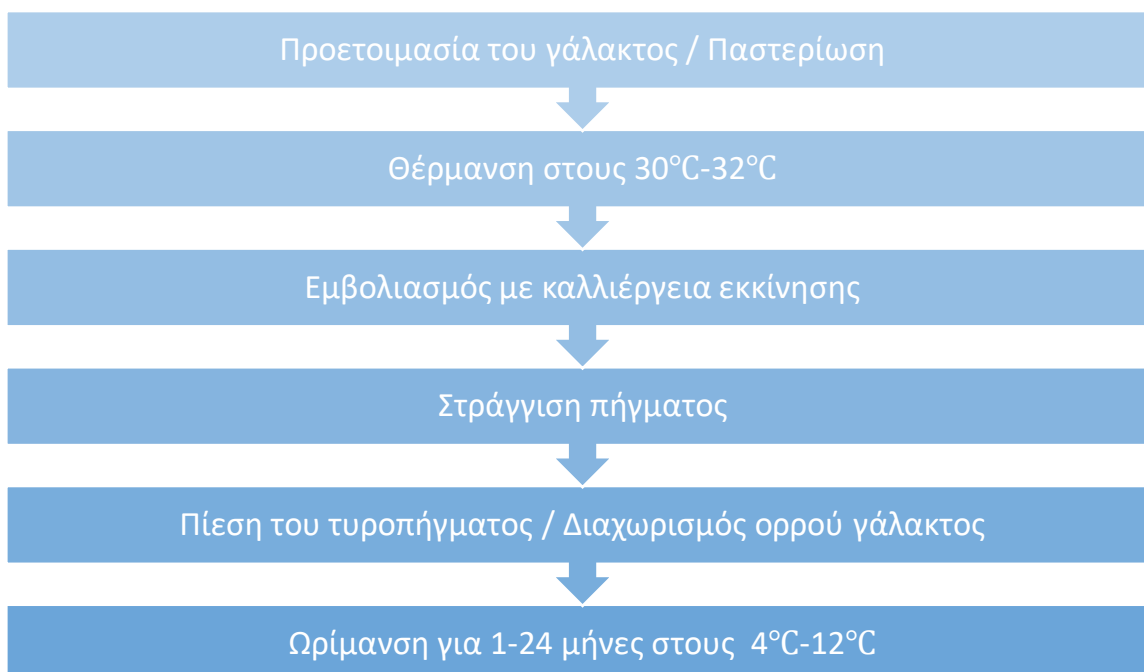
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής κεφίρ (Binda et al. 2019).

5.1.2.2 Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία

Το κεφίρ είναι ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα η κατανάλωση κεφίρ βοηθάει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην αναστολή των παθογόνων μικροοργανισμών (Binda *et al.* 2019).

5.1.3 Τυρί

Τα τυριά έρχονται σε πολλές παραλλαγές, και ειδικά στην Ευρώπη υπάρχει πληθώρα τοπικών τυριών. Παρά τη διαφορετικότητα αυτή, η βασική διαδικασία παραγωγής είναι η ίδια. Αυτό που διαφοροποιεί τα τυριά είναι η χρήση διαφορετικών καλλιιεργειών εκκίνησης, η παρουσία ή η απουσία μούχλας και οι μέθοδοι διαχωρισμού ορού γάλακτος (καταπόνηση, πίεση, θέρμανση). Διαφορές στις μεθόδους ωρίμανσης (χρόνοι και περιβαλλοντικές συνθήκες, χρήση καλλιιεργειών ωρίμανσης, επάλειψη της επιφάνειας του τυριού με διάφορα παρασκευάσματα κ.λπ.) και επίσης η χρήση διαφορετικών τύπων γάλακτος (παστεριωμένο ή μη παστεριωμένο) επηρεάζει έντονα το τελικό προϊόν. Μια άπειρη ποικιλία τυριών προκύπτει από τις παραπάνω διαφορές ως παραλλαγές στο μέγεθος, το σχήμα και τα πρόσθετα συστατικά (ειδικά βότανα και μπαχαρικά) (Binda *et al.* 2019).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της γενικής διαδικασίας παραγωγής τυριού (Binda *et al.* 2019).

5.1.3.1 Παραγωγή

Η βασική διαδικασία παραγωγής του τυριού έχει ως εξής: προστίθενται αρχικές καλλιέργειες στο γάλα. Το γάλα πήζει, το πήγμα κόβεται και ο ορός γάλακτος αποστραγγίζεται. Το υπόλοιπο τυρόπηγμα πιέζεται σε μια φόρμα και αφήνεται να ωριμάσει. Οι μεσοφιλικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην παραγωγή τυριού cottage αποτελούνται από τους: *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. Cremoris* και *Lc. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*. Σε σκληρά τυριά όπως το Gouda, χρησιμοποιούνται συνήθως μεσοφιλικές καλλιέργειες που αποτελούνται από *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, και *Leuconostoc spp* που είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό διακετυλίου και CO₂ (Binda *et al.* 2019).

5.1.3.2 Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία

Η πρόσληψη τυριού τύπου Gouda έχει συσχετιστεί με μειωμένη συστολική αρτηριακή πίεση και παρατηρείται ότι μειώνει τη χοληστερόλη. Αυτά τα οφέλη στην καρδιαγγειακή υγεία σχετίζονται με δύο διαφορετικές δράσεις: την παρουσία αντιυπερτασικών πεπτιδίων που υπάρχουν σε ορισμένα τυριά και την παρουσία μενακινόνων, οι οποίες είναι υψηλές σε ιδιαίτερα ολλανδικού τύπου ημίσκληρων τυριών (Binda *et al.* 2019).

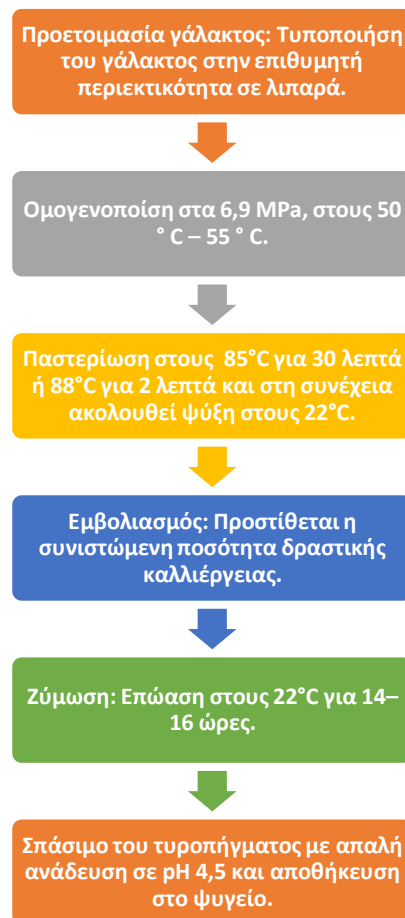
5.1.4 Βουτυρόγαλα

Το βουτυρόγαλα είναι ένα παχύρρευστο υγρό γαλακτοκομικό προϊόν με πλούσια γεύση (Binda *et al.* 2019).

5.1.4.1 Παραγωγή

Παραδοσιακά, το βουτυρόγαλα είναι η υδατική φάση που απελευθερώνεται κατά την ανάδευση της κρέμας σε βούτυρο. Περιέχει τα συστατικά: πρωτεΐνη, λακτόζη και μέταλλα, καθώς και το υλικό από τη διαταραγμένη μεμβράνη του λίπους γάλακτος και επομένως περιέχει περισσότερα φωσφολιπίδια από το πλήρες γάλα. Υπάρχουν τρία είδη παραγωγής βουτυρόγαλου τα οποία είναι: γλυκό βουτυρόγαλα, βουτυρόγαλα από καλλιέργεια και γάλα βουτύρου ορού γάλακτος. Αν το γάλα/κρέμα δεν έχει υποστεί ζύμωση ή είναι ξινισμένο με φυσικό τρόπο, το προϊόν αναφέρεται ως γλυκό βουτυρόγαλα. Αν το γάλα/κρέμα ξινίζεται ή ζυμώνεται με ελεγχόμενο τρόπο, το προϊόν που

προκύπτει αναφέρεται ως βουτυρόγαλα από καλλιέργεια. Σήμερα, το μεγαλύτερο μέρος του εμπορίου βουτυρόγαλα παράγεται με απευθείας καλλιέργεια γάλακτος χαμηλών λιπαρών. Τέλος το βουτυρόγαλα ορού γάλακτος παράγεται από κρέμα ορού γάλακτος. Οι κύριοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση του βουτυρογάλακτος είναι μεσόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης οι οποίες μπορεί να αποτελούνται από *Lactococcus lactis subsp. lactis* (παραγωγή οξέος), *Lc. lactis subsp. cremoris* (οξύ και παραγωγή γεύσης), *Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* (παραγωγή οξέος και γεύσης), και *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (παραγωγή οξέος και γεύσης). Το κιτρικό μπορεί να προστεθεί στο γάλα, και μετατρέπεται σε διακετύλιο, παρέχοντας στο βούτυρο τη γεύση (Binda *et al.* 2019).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγικής διαδικασίας καλλιέργειας βουτυρογάλακτος (Binda *et al.* 2019).

5.1.4.2 Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία

Οι κύριοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή καλλιεργημένου βουτυρογάλακτος είναι ο *Lc. lactis subsp. Lactis* και *Lc. lactis subsp. cremoris*. Αυτοί είναι επίσης είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος που είναι οι υψηλότεροι παραγωγοί βιταμίνης K2. Το βουτυρόγαλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση περιέχουν λακτόκοκκο ο οποίος παρέχει πολλά οφέλη στην υγεία των οστών και του καρδιαγγειακού συστήματος. Η κατανάλωση βουτυρογάλακτος έχει πράγματι παρατηρηθεί ότι έχει ευεργετικές επιδράσεις στην αρτηριακή πίεση και στα επίπεδα LDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Αυτό οφείλεται στη μενακινόνη που προέρχεται από τον λακτοκόκκο. Ωστόσο, η επιδημιολογική έρευνα υποδηλώνει ότι η κατανάλωση βουτυρογάλακτος συσχετίστηκε θετικά με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (Binda *et al.* 2019).

5.2 LAB και παραγωγή ψωμιού

Το προζύμι ζυμώνεται από ζυμομύκητες και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ιστορικά, η διόγκωση της ζύμης επιτυγχάνονταν κυρίως από τη δράση του προζυμιού κατά το ψήσιμο. Η χρήση του προζυμιού ως διογκωτικό παράγοντα αντικαταστάθηκε μόνο αφού ο *Saccharomyces cerevisiae* παρήχθη βιομηχανικά ως διογκωτικό στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα. Η διαθεσιμότητα τυποποιημένης και μεταβολικά ενεργής μαγιάς αρτοποιίας και η σημαντική μείωση του χρόνου που απαιτείται για τη διόγκωση ευνόησαν τη χρήση της μαγιάς ως κυριότερου οργανισμού ζύμωσης στο ψήσιμο του σιταριού. Η αξιοσημείωτη σταθερότητα των προζυμιών που διατηρούνται υπό προσεκτικά ελεγχόμενες συνθήκες εξηγεί γιατί οι εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης που αποτελούνται από ένα ή περισσότερα καλά καθορισμένα είδη ή στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, οι οποίες διατίθενται ως λυοφιλωμένα σκόνες ή ταμπλέτες, δεν έχουν βρει σημαντική αγορά στη βιομηχανία αρτοποιίας (Salovaara 2011).

5.2.1 Χρήση και λειτουργία του προζυμιού

Καθ' όλη τη διάρκεια του εικοστού αιώνα, η χρήση του προζυμιού ως διογκωτικό παράγοντα στα προϊόντα σιταριού περιοριζόταν σε σπεςιαλιτέ, όπως Panettone (Ιταλία), εξειδικευμένες μαπακέτες (Γαλλία) ή ψωμί προζύμι Σαν Φρανσίσκο (Ηνωμένες Πολιτείες). Σε αυτά τα προϊόντα, το προζύμι είναι απαραίτητο για να αποκτήσουν την τυπική εμφάνιση και γεύση. Το προζύμι επηρεάζει όλες τις πτυχές της ποιότητας του ψωμιού, συμπεριλαμβανομένης της υφής, της γεύσης και της διάρκειας ζωής του ψωμιού. Τα οφέλη της γαλακτικής ζύμωσης είναι εμφανή σε όλα τα ψωμιά, αλλά ιδιαίτερα

έντονα στο ψήσιμο της σίκαλης. Η υπερβολική ξινίλα στο άσπρο σταρένιο ψωμί θεωρείται από τους περισσότερους καταναλωτές δυσάρεστη γεύση, ενώ η ξινότητα του ψωμιού σίκαλης είναι ένα επιθυμητό γευστικό χαρακτηριστικό και προτιμάται. Η διόγκωση της ζύμης με σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα επιτυγχάνεται με τη συνδυασμένη δράση ζυμομυκήτων και ετεροζυμωτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Η διόγκωση της ζύμης επιτυγχάνεται από τον σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα. Αυτός ο σχηματισμός οφείλεται στη συνδυαστική δράση των ζυμομυκήτων και των ετεροζυμωτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το γαλακτικό και το οξικό οξύ μεσολαβούν στη χαρακτηριστική γεύση του ψωμιού με προζύμι. Η μετατροπή της γλουταμίνης που απελευθερώνεται από τις πρωτεΐνες των δημητριακών σε γλουταμικό συμβάλλει επίσης στη γεύση του ψωμιού με προζύμι. Εκτός από τα τεχνολογικά οφέλη και τη γεύση, το ζυμωτό ψωμί χαρακτηρίζεται από καλύτερη αντοχή στη μικροβιολογική αλλοίωση από μούχλα και βακίλλους. Η κύρια αντιμικροβιακή ένωση στο προζύμι είναι το οξικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ μειώνει το pH και αυξάνει την αναλογία του αδιάσπαστου οξικού οξέος. Διάφορες ενώσεις από *Limosilactobacillus reuteri* παράγουν ρετερικυκλίνη, ένα θερμοσταθερό παράγωγο τετραμικού οξέος με αντιβακτηριακή δράση κατά του σχηματισμού βακίλλων. Αν και ειδικές καλλιέργειες εκκίνησης αποδείχθηκαν ότι καθυστερούν αποτελεσματικά τη μυκητιακή αλλοίωση του ψωμιού, η συμβολή των περισσότερων αντιμυκητιασικών μεταβολιτών για την πρόληψη της αλλοίωσης των μυκήτων παραμένει ασαφής. Προπιονικό που παράγεται από μικτή καλλιέργεια *L. buchneri* και *L. diolivorans* έχει αποδειχθεί ότι καθυστερεί την ανάπτυξη μυκήτων στο ψωμί σίκαλης (Salovaara 2011).

5.2.2 Ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία

Η κατανάλωση κατάλληλων ολιγοσακχαριτών ή πολυσακχαριτών μπορεί να προσφέρει πολλά οφέλη στην υγεία. Αυτό επιτυγχάνεται διεγείροντας τη ζύμωση του παχέος εντέρου σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας και διεγείροντας τα ευεργετικά μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας (Salovaara 2011).

5.3 LAB στη ζυθοποιία

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι αναπόφευκτα παρόντα όταν παρασκευάζονται μύρες. Η μετατροπή των κόκκων δημητριακών σε μύρα είναι αναμφίβολα μια διαδικασία αλκοολικής/γαλακτικής ζύμωσης στην αρχική της μορφή. Στη βιομηχανία της ζυθοποιίας, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος θεωρούνται συνήθως ρυπαντές, αλλά η ζύμωση γαλακτικού οξέος χρησιμοποιείται πολλές φορές σκόπιμα για την βιομηχανική παραγωγή ορισμένων σπесиαιτέ μύρας (Salovaara 2011).

5.4 LAB στη ζύμωση σταφυλιών (Κρασί 🍷)

Η παρουσία των βακτηρίων και ο ρόλος που παίζουν στην οينوποίηση είναι γνωστή από τα μέσα έως τα τέλη του 18ου αιώνα. Τα βακτήρια που σχετίζονται με το σταφύλι και το κρασί ανήκουν στις ομάδες των βακτηρίων οξικού οξέος (AAB) και LAB. Ο κύριος ρόλος στη ζύμωση των τροφίμων με AAB είναι η παραγωγή οξικού οξέος από αιθανόλη. Υπάρχουν τέσσερα γένη LAB που σχετίζονται με το κρασί: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, και *Pediococcus*. Τα είδη *Lactobacillus* που σχετίζονται με τη ζύμωση του κρασιού είναι *Oenococcus oeni*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *L. cellobiosus*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Fructilactobacillus fructivorans*, *Liquorilactobacillus oeni*, *Apilactobacillus kunkeei*, *Liquorilactobacillus mali*, *Liquorilactobacillus vini*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. damnosus (P. cerevisiae)*, *P. inopinatus*, και *P. parvulus*. Όλα τα είδη LAB που σχετίζονται με το κρασί σχηματίζουν δευτερογενείς μεταβολίτες καθώς αναπτύσσονται στο κρασί (Bartowsky 2011).

5.5 LAB στη βιομηχανία κρεάτων

Τα δύο είδη *Lactobacillus* που θεωρούνται ως μέρος της βασικής λειτουργικής μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρέατος είναι ο *Lb. sakei* και *L. curvatus*. Τα τελευταία 30 χρόνια, πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον *Lb. sakei* λόγω του σημαντικού του ρόλου στη τεχνολογία κρέατος, πιο συγκεκριμένα στην ανταγωνιστικότητά του για παραγωγή οξέος, στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών και στη βιοσυντήρηση. Άλλα επίσης LAB τα οποία έχουν απομονωθεί από λουκάνικα είναι οι *L. plantarum* και *Pediococcus spp*. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης κρέατος, εντερόκοκκοι, ιδιαίτερα ο *Enterococcus faecium*, βρέθηκαν σε υψηλούς αριθμούς, συμβάλλοντας στη ζύμωση μαζί με τους γαλακτοβάκιλλους. Η αντιβακτηριακή δράση των οργανικών οξέων που παράγονται από τα LAB και η ικανότητα μείωσης του pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό για τη βιοσυντήρηση των τροφίμων. Η χρήση στελεχών LAB τα οποία είναι ικανά να παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια εκτός από το γαλακτικό οξύ, με αντίκτυπο στην ποιότητα και ασφάλεια κατά τη ζύμωση, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στη βιομηχανία των κρεάτων (Fontana *et al.* 2011).

5.5.1 Λουκάνικα – Ζύμωση

Τα λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση μπορούν να οριστούν ως προϊόντα κρέατος που παρασκευάζονται από μείγμα κυρίως χοιρινού ή χοιρινού/βοδινού κρέατος, λίπος, αλάτι, σκληρυντικά, ζάχαρη, κα μπαχαρικά. Σε πολλές περιπτώσεις προστίθενται και καλλιέργειες εκκίνησης. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε διαπερατά περιβλήματα, υποβάλλεται σε ζύμωση και ξήρανση μέσω της διαδικασίας καπνίσματος (Fontana *et al.*2011).

5.5.1.1 Συστατικά και πρόσθετα

Κρέας από διαφορετικά είδη ζώων (κυρίως βοδινό και χοιρινό) και λίπος χρησιμοποιούνται γενικά σε αναλογία 2:1. Προστίθενται επίσης αλάτι (NaCl, 2%–4%) και νιτρώδη/νιτρικά (150–250 ppm). Η καταστολή της μικροβιακής ανάπτυξης, η μείωση του aw, η απελευθέρωση διαλυτών πρωτεϊνών και η ανάπτυξη κόκκινου χρώματος είναι από τα κύρια γεγονότα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρέατος. Επίσης γίνεται χρήση ασκορβικών για τη βελτίωση της σταθερότητας της κόκκινης χρωστικής και την πρόληψη της οξείδωσης των λιπιδίων, καθώς και χρήση σακχάρων (δεξτρόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη/λακτόζη, σιρόπι καλαμποκιού και άμυλα) για τη διασφάλιση της ταχείας οξίνισης. Τέλος γίνεται προσθήκη μπαχαρικών (πιπέρι, πάπρικα, σκόρδο, μοσχοκάρυδο και γαρύφαλλο) τα οποία κατηγοριοποιούν τα λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση σε διαφορετικά είδη και έχουν αποδειχθεί επίσης ότι δρουν ως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά και ενισχυτικός παράγοντας στην ανάπτυξη των LAB (Fontana *et al.*2011).

5.5.1.2 Καλλιέργειες εκκίνησης

Η ανάγκη τυποποίησης της επεξεργασίας και της ποιότητας οδήγησε στη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Μελέτες για την οικολογία των λουκάνικων που έχουν υποστεί ζύμωση έδειξαν ότι τα LAB, κυρίως ο *Lactobacillus* είναι ο κύριος παράγοντας για τη ζύμωση και την ωρίμανση των αλλαντικών. Τα LAB ως καλλιέργεια εκκίνησης πρέπει να προστεθούν για να επιτευχθεί συγκέντρωση 107–108 UFC/g στο κρέας (Fontana *et al.*2011).

5.5.1.3 Τεχνολογία επεξεργασίας

Παρακάτω περιγράφονται τα βασικά διαδοχικά βήματα για την παρασκευή τυπικών

ξηρών/ημίξηρων λουκάνικων που έχουν υποστεί ζύμωση. Εν συντομία, το κρέας και το λίπος ψύχονται και θρυμματίζονται στο επιθυμητό μέγεθος. Στη συνέχεια, το ψιλοκομμένο κρέας και η λιπαρή μάζα αναμειγνύονται καλά με αλάτι, πρόσθετα ωρίμανσης, μπαχαρικά και καλλιέργειες εκκίνησης, και το κουρκούτι κρέατος συσκευάζεται σφιχτά ώστε να απομακρυνθεί όλος ο αέρας. Ανάλογα με το είδος, τα λουκάνικα τοποθετούνται σε θαλάμους ωρίμανσης υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία (RH), και ταχύτητα αέρα) και υποβάλλονται σε ζύμωση. Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο πιο γρήγορα γίνεται η παραγωγή του γαλακτικού οξέος από τα LAB που οδηγεί στην ανάπτυξη χρώματος. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, δύο μικροβιακές αντιδράσεις συμβαίνουν ταυτόχρονα: η μείωση του pH μέσω γλυκόλυσης από τα LAB και η μετατροπή του νιτρικού σε νιτρώδη από *Staphylococcus* και/ή *Micrococcus* (Fontana *et al.*2011).

5.5.2 *Lb. SAKEI* ως το κύριο LAB στα κρέατα

Το *Lactobacillus sakei* είναι ένα πανταχού παρόν βακτήριο γαλακτικού οξέος που συνδέεται συνήθως στο περιβάλλον των τροφίμων. Αν και έχει απομονωθεί από πολλά ωμά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση φυτικής προέλευσης βρέθηκε κυρίως σε προϊόντα κρέατος. Ο πολύπλευρος μεταβολισμός του και η υψηλή ικανότητα προσαρμογής του τον βοήθησαν στο να αποικίσει σε πολλές διαφορετικές οικολογικές θέσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια. Η ικανότητα του *Lb. sakei* να αναπτύσσεται στο κρέας εξαρτάται κυρίως από τη χρήση των θρεπτικών συστατικών. Ανάμεσα στα λίγα διαθέσιμα σάκχαρα, ο *Lb. sakei* χρησιμοποιεί γλυκόζη και ριβόζη για ανάπτυξη (Fontana *et al.*2011).

5.6 LAB στα λαχανικά

Η ζύμωση λαχανικών με αλάτι είναι μια ευρέως διαδεδομένη παραδοσιακή πρακτική για τη συντήρηση και βελτίωση των χαρακτηριστικών γεύσης και υφής συνήθως χωρίς τη προσθήκη συντηρητικών. Τα πιο κοινά ζυμωμένα λαχανικά είναι το ξυνολάχανο, οι πίκλες και οι ελιές. Πολλά θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στα λαχανικά και στα τελικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Τα λαχανικά περιέχουν βιταμίνες, καροτενοειδή, χλωροφύλλη, φλαβονοειδή, διαιτητικές ίνες και είναι πλούσια σε μέταλλα, συμπεριλαμβανομένων των K, Mg και Se, τα οποία παρουσιάζουν προστατευτικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η υπέρταση. Λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση LAB μπορεί να εμφανίζουν καλύτερες λειτουργικότητες από τα ίδια τα ωμά λαχανικά. Τα LAB έχουν αυξηθεί σε

δημοτικότητα λόγω του ρόλου τους ως προβιοτικών που βελτιώνουν την υγεία του παχέος εντέρου. Τα λαχανικά συνήθως ζυμώνονται φυσικά από βακτήρια που υπάρχουν ήδη στο περιβάλλον, ωστόσο, απομονωμένα LAB μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης για την ανάπτυξη λειτουργικών φυτικών προϊόντων με βελτιωμένη λειτουργικότητα (Park *et al.*2019).

5.6.1 Είδη LAB στα λαχανικά

Υπάρχουν δύο είδη LAB στα λαχανικά. Το ένα είναι ομοζυμωτικό LAB που παράγει κυρίως γαλακτικό οξύ μετά τη ζύμωση. Το άλλο είναι ετεροζυμωτικό LAB που παράγει γαλακτικό οξύ, CO₂, και οξικό/αιθανόλη σε αναλογία 1:1:1. Τα κύρια LAB που βρίσκονται στα ζυμωμένα λαχανικά είναι τα εξής: *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. leichmanii*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, τα οποία ταξινομούνται ως ομοζυμωτικά LAB και τα *Leuconostoc mesenteroides*, *Ln. paramesenteroides*, *Ln. dextrani-cum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. confuses*, *L. fermentum*, τα οποία ταξινομούνται ως ετεροζυμωτικά LAB. Τα λαχανικά συνήθως περιέχουν gram αρνητικά αερόβια βακτήρια, ζύμες και gram θετικά LAB. Όταν προστίθεται αλάτι υπό αναερόβιες συνθήκες, τα LAB μπορεί να υπεραναπτύξουν τα αερόβια βακτήρια και τις ζύμες. Η ανάπτυξη των LAB εξαρτάται από τις αλλαγές στο χημικό και φυσικό περιβάλλον, όπως διακυμάνσεις στις πρώτες ύλες, διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, συγκέντρωση αλατιού, συγκέντρωση O₂, θερμοκρασία, pH και άλλους παράγοντες. Τα gram αρνητικά βακτήρια, οι ζυμομύκητες και οι μούχλες καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης ζύμωσης με την προσθήκη αλατιού ή κατά την άλμη (Park *et al.*2019).

5.6.2 Ξινολάχανο

5.6.2.1 Επεξεργασία

Το οξύ παράγεται από τη ζύμωση βακτηρίων γαλακτικού οξέος στα αλατισμένα ψιλοκομμένα λάχανα. Το λάχανο είναι κομμένο σε λεπτές φέτες 0,08–0,16 cm (μακριές και ψιλοκομμένες φέτες) και αλάτι (2%–2,5%) πασπαλίζεται πάνω στο ψιλοκομμένο λάχανο. Το αλατισμένο λάχανο συσκευάζεται σε μια δεξαμενή και καλύπτεται με ένα φύλλο πλαστικού. Η ιδανική θερμοκρασία και η συγκέντρωση αλατιού (NaCl) είναι 18°C και 1,8%–2,25%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθεί η ζύμωση για μερικές εβδομάδες έως ένα χρόνο και στη συνέχεια το προϊόν συσκευάζεται σε κουτιά, γυάλινα βάζα ή πλαστικές σακούλες (Park *et al.*2019).

5.6.2.2 Μικροοργανισμοί στη ζύμωση του ξινολαχάνου

Συστατικά της μικροχλωρίδας του εμπορικού ξινολάχανου είναι οι *Weissella*, *Ln. citreum*, , *L. plantarum*, *P. pentosaceus* και *L. brevis*. Τα είδη των LAB που βρίσκονται σε εμπορικές ζυμώσεις ξινολάχανου και ανιχνεύθηκαν με αποτύπωση DNA είναι οι *Ln. citreum*, *Ln. argentinum*, *L. paraplantarum*, *L. coryniformis*, *Weissella sp.*, and *Ln. fallax*. Μεμονωμένες ή μικτές καλλιέργειες εκκίνησης των *Ln. mesenteroides*, *L. brevis*, και *L. plantarum* αποδείχθηκε ότι βελτίωσαν την ποιότητα του ξινολάχανου έναντι της μη εμβολιασμένης φυσικής ζύμωσης (Park *et al.*2019).

5.6.3 Πίκλες

Τα αγγούρια τουρσί συλλέγονται ενώ είναι ανώριμα. Τα πλήρως ωριμασμένα αγγούρια είναι ακατάλληλα γιατί γίνονται πολύ μεγάλα, αλλάζουν χρώμα, έχουν ώριμους σπόρους και είναι πολύ μαλακά για εμπορικές χρήσεις. Τα τουρσιά αγγουριού διατηρούνται με ζύμωση, παστερίωση και ψύξη (Park *et al.*2019).

5.6.3.1 Επεξεργασία Πικλών

Τα τουρσιά είναι προϊόντα βακτηριακής ζύμωσης και αρωματίζονται με διάφορα μπαχαρικά και αλάτι. Καλύπτονται με αλατόνερο και υφίστανται ζύμωση γαλακτικού οξέος. Τα αγγούρια τοποθετούνται σε άλμη με αρχική συγκέντρωση αλατιού 5%-8% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η άλμη συχνά οξινίζεται με οξικό οξύ σε pH 4,5 για την απομάκρυνση του CO₂ και την ενίσχυση της ανάπτυξης των LAB. Σορβικό κάλιο (0,035%) ή οξικό οξύ (0,16%) μπορούν να προστεθούν στην άλμη για να αποτρέψουν την ανάπτυξη μυκήτων που μπορεί να προκαλέσουν την μαλάκωση των αγγουριών. Η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε συγκέντρωση αλατιού 5%, στους 20°C–27°C για 2–3 εβδομάδες. Το pH γίνεται 3,3–3,5 και η οξύτητα 1,1%, μετά τη ζύμωση. Τα τουρσιά που έχουν υποστεί ζύμωση στη συνέχεια αφαλατώνονται και μεταποιούνται σε διάφορα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων γλυκών και ξινών τουρσιών, ανάμεικτα τουρσιά, ή τουρσιά σε φέτες. Τέλος μπορούν να παστεριωθούν στους 74°C για 15 λεπτά για να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους (Park *et al.*2019).

5.6.3.2 Μικροοργανισμοί στη ζύμωση πικλών

Οι κύριες ομάδες LAB που συμμετέχουν στη ζύμωση του αγγουριού με αλάτι είναι οι *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Ln. mesenteroides* *P. cerevisiae*, *L. brevis*, and *L. plantarum* και *Pediococcus* (Park *et al.*2019).

5.6.4 Ελιές

Το κύριο συστατικό του καρπού της ελιάς είναι η ελευρωπαΐνη. Η ελευρωπαΐνη είναι μια χημική ουσία που υπάρχει στην ελιά, το παρθένο ελαιόλαδο και τα φύλλα της ελιάς, η οποία είναι πολύ σημαντική για τη γεύση, το άρωμα και τις επιδράσεις του ελαιολάδου στην υγεία και ανήκει στην κατηγορία των γλυκοζιτών και των πολυφαινολικών ουσιών του ελαιολάδου. Η ελευρωπαΐνη αφαιρείται κατά το μούλιασμα των ελιών σε νερό ή άλμη ή μέσω υδρόλυσης σε διάλυμα NaOH 1%–2% κατά την επεξεργασία. Το πράσινο χρώμα των ελιών αλλάζει σε μαύρο κατά την ωρίμανση. Υπάρχουν τρία είδη διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας της ελιάς τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω (Park *et al.*2019):

5.6.4.1 Μαύρες ελιές επεξεργασμένες σε άλμη (Μαύρες ώριμες ελιές τύπου Καλιφόρνιας)

Αυτή η μέθοδος παραγωγής μαύρων ώριμων ελιών σε κονσέρβα αναπτύχθηκε στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Αρχικά πράσινες και κόκκινες ελιές συγκομίζονται. Στη συνέχεια προστίθεται αλάτι σε διαστήματα μιας έως αρκετές ημέρες για να αυξηθεί η συγκέντρωση του NaCl σε 7,5%-9,0%. Η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος είναι 0,4%-0,45% μετά από 4-6 εβδομάδες. Αντί για άλμη, ένα οξινιστικό διάλυμα που περιέχει 0,7% γαλακτικό οξύ, 1,0% οξικό οξύ, 0,3% βενζοϊκό νάτριο, και 0,3% σορβικό κάλιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Οι φρέσκες ή οι αποθηκευμένες ελιές υποβάλλονται σε επεξεργασία κατά την οποία εφαρμόζεται τρεις έως πέντε φορές 0,5%-2,0% NaOH (αλυσίβια) και στη συνέχεια οι ελιές αερίζονται. Οι φυσικές φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και πολυμερίζονται, σχηματίζοντας μια μαύρη χρωστική ουσία. Η αλυσίβια αφαιρείται αλλάζοντας το νερό δύο φορές την ημέρα για 3-4 ημέρες. Το νερό πλύσης αντικαθίσταται από αραιή άλμη (0,8%-2,5% NaCl) για άλλες 2-4 ημέρες. Τέλος οι ελιές ταξινομούνται, κονσερβοποιούνται και υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία (Park *et al.*2019).

5.6.4.2 Πράσινες ελιές επεξεργασμένες με αλισίβα (πράσινες ελιές ισπανικού στυλ)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πράσινες και κίτρινες ελιές. Οι ελιές επεξεργάζονται με αλισίβα ώστε να φύγει η πικρία, πλένονται για την απομάκρυνση του NaOH, και στη συνέχεια τοποθετούνται σε άλμη για να ξεκινήσει η ζύμωση γαλακτικού οξέος. Οι επεξεργασμένες ελιές αλατίζονται με NaCl σε ποσοστό 10%-13%. Προστίθεται αλάτι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να διατηρηθεί η συγκέντρωση NaCl στο 5%-6%. Αυτό μπορεί να αυξηθεί σε περισσότερο από 7% στο τέλος της ζύμωσης για την πρόληψη της ανάπτυξης μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 24°C–27°C και η ζύμωση συνεχίζεται για 3–4 εβδομάδες. Το pH είναι 3,8–4,4 με οξύτητα 0,8%–1,2% μετά τη ζύμωση. Τέλος οι ελιές συσκευάζονται σε γυάλινα βάζα γεμάτα με άλμη 7% και σφραγίζονται (Park *et al.* 2019).

5.6.4.3 Μη επεξεργασμένες φυσικά ώριμες μαύρες ελιές (ελιές ελληνικού τύπου)

Αυτή η διαδικασία είναι δημοφιλής στην Ελλάδα, την Τουρκία και τις χώρες της Βόρειας Αφρικής. Οι ελιές που χρησιμοποιούνται είναι πλήρως ωριμασμένες μωβ ή μαύρες πριν την υπερωρίμανση. Δεν χρησιμοποιείται θεραπεία με αλισίβα και έτσι η πικρία παραμένει στην άλμη. Αυτές οι ελιές μπορεί να έχουν φρουτώδη γεύση και ελαφρώς πικρή γεύση. Οι ελιές μπαίνουν σε δεξαμενές και καλύπτονται με 6%-10% άλμη. Η μικτή μικροχλωρίδα κολοβακτηριδίων, ζυμομυκήτων και *Lactobacillus sp.* εμπλέκονται στη ζύμωση. Η τελική οξύτητα της άλμης είναι μικρότερη από 0,5% με pH 4,3–4,5 (Park *et al.* 2019).

5.6.4.4 Μικροοργανισμοί στη ζύμωση των ελιών

Η επεξεργασία με αλισίβα των ελιών μειώνει τους αρχικούς πληθυσμούς μικροοργανισμών και αυξάνει το αρχικό pH σε 7,5–8,5. Οι επεξεργασίες με αλισίβα και οι πλύσεις με νερό αφαιρούν τα σάκχαρα από τις ελιές, μειώνοντας τα θρεπτικά συστατικά και τα διαθέσιμα σάκχαρα. Οι ελιές ζυμώνονται από μια παρόμοια ομάδα βακτηρίων που ζυμώνουν το ξινολάχανο και τα τουρσιά, (*L. brevis*, και *L. plantarum*). Ωστόσο, άλλα είδη αεροβακτηρίων, *Escherichia*, *Bacillus* και ζυμομυκήτων παραμένουν περισσότερο στις ελιές από ό,τι στο ξινολάχανο και τα τουρσιά, επομένως, μπορεί εύκολα να προκληθεί αλλοίωση (Park *et al.* 2019).

5.7 LAB στα ψάρια

Τα ψάρια και τα προϊόντα αλιείας συγκαταλέγονται στα πιο εμπορεύσιμα προϊόντα διατροφής παγκοσμίως. Βέβαια είναι ένα εξαιρετικά ευπαθές προϊόν με σύντομη διάρκεια ζωής που δεν υπερβαίνει τις 1-2 εβδομάδες για φρέσκα ψάρια και 3–4 εβδομάδες για ελαφρώς διατηρημένα. Οι απώλειες ψαριών μετά το ψάρεμα αποτελούν σημαντική ανησυχία και συμβαίνουν στις περισσότερες αλυσίδες διανομής ψαριών. Εκτιμάται ότι το 27% των εκφορτωμένων ψαριών χάνεται ή σπαταλάται λόγω μικροβιακής δραστηριότητας. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι βακτήρια που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον ή βακτήρια που είναι ως αποτέλεσμα μεταμόλυνσης κατά την επεξεργασία ευθύνονται για πολλές περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών λόγω κατανάλωσης ψαριών. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν επαρκείς τεχνολογίες συντήρησης για τη διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας των ψαριών (Gómez-Sala *et al.* 2019).

5.7.1 Φρέσκα ψάρια

Παρά την υψηλή μεταβλητότητα στη μικροχλωρίδα των ψαριών, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία LAB στα ψάρια και στο περιβάλλον τους. Τα ψάρια περιέχουν γαλακτοβάκιλλους στο δέρμα, στα βράγχια και στο έντερο. Η παρουσία LAB στο έντερο διαφόρων ειδών ψαριών που κατοικούν σε λίμνες σε στάδια προνύμφης, γόνου και δακτυλίου έχει διαπιστωθεί ότι περιέχουν πληροφορίες για τις αλλαγές στη σύνθεσή τους ως συνάρτηση της εποχής του έτους και του σταδίου ζωής του ψαριού. Έχει αναφερθεί σημαντική ποικιλία LAB που σχετίζονται με τα ψάρια αν και το *Carnobacterium spp.* έχει αναγνωριστεί ως το κυρίαρχο γένος στις περισσότερες μελέτες. Άλλα γένη που ανοίκουν στην οικογένεια των LAB που μπορεί να βρεθούν στα ψάρια είναι τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* και *Weissell* (Gómez-Sala *et al.* 2019).

5.7.2 Εφαρμογή καλλιεργειών LAB και των βακτηριοσινών τους σε ψάρια και αλιευτικά προϊόντα

Το ψάρι είναι ένα πολύ ευρέως εμπορεύσιμο προϊόν, παρέχοντας άφθονες ευκαιρίες για μικροβιακή ανάπτυξη και μόλυνση από διαφορετικές πηγές, γεγονός που καθιστά δυσκολότερη τη διατήρηση της υγιεινής ποιότητας του. Για τον λόγο αυτό η τεχνολογία της βιοσυντήρησης αναδεικνύεται ως μια ενδιαφέρουσα και οικονομικά αποδοτική εναλλακτική. Τα LAB μπορούν να θεωρηθούν ως βιοσυντηρητικός παράγοντας επειδή παράγουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών μεταβολιτών, αλλά κυρίως λόγω της παραγωγής οργανικών οξέων και βακτηριοσινών. Τα πιθανά προστατευτικά

βακτήρια για τα ψάρια και τα προϊόντα αλιείας εξακολουθούν να αποτελούν πρόκληση, καθώς πρέπει να είναι σε θέση να :

- (i) επιβιώνουν στα στάδια της επεξεργασίας τροφίμων
- (ii) προσαρμόζονται και αναπτύσσονται σε ένα συγκεκριμένο μέσο όπως τα ψάρια, με χαμηλή συγκέντρωση υδατανθράκων
- (iii) παράγουν ενεργούς ανταγωνιστικούς μεταβολίτες αλλά οι μεταβολικές τους δραστηριότητες δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.



Πολυάριθμοι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε διαφορετικά γένη και είδη (*Bacillus spp.*, *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Lc. lactis*, *Le. mesenteroides*, *Carnobacterium spp.*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*, *Vg. fluvialis*, *Roseobacter spp.*, *Phaeobacter gallaeciensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguous*, και *Phaffia rhodozyma*), έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων στα ψάρια (Gómez-Sala *et al.* 2019).

Πίνακας 5: Βιοσυντήρηση ψαριών και προϊόντων αλιείας με χρήση βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) (Gómez-Sala et al. 2019).

Γένος LAB	Βακτηριοσίνη που παράγεται	Πηγή απομόνωσης	Προϊόν στο οποίο εφαρμόζεται	Αποτέλεσμα
<i>Lactobacillus spp. : L. curvatus BCS35</i>	Sakacins P and X	Ξηρός-αλατισμένος γάδος	Νεαρός μερλούκιος	Βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αναστολή του <i>Listeria Monocytogenes</i> και υψηλότερη αξία στην αγορά
<i>Lactobacillus spp.: L. rhamnosus ATCC 53103</i>	-	-	Φιλέτα λαβράκι	Αναστολή αλλοίωσης από βακτήρια
<i>Enterococcus spp. : E. faecium BNM58</i>	Enterocin L50	Μακρυπτέρυγος τόνος	Νεαρός μερλούκιος	Βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αναστολή του <i>Listeria Monocytogenes</i> και υψηλότερη αξία στην αγορά
<i>Lactococcus spp. : L. lactis PSY2</i>	Bacteriocin PSY2	Θαλάσσια πέρκα	Φιλέτα μπακαλιάρου υφάλου	Παράταση διάρκειας ζωής και καλύτερη προστασία κατά της αλλοίωσης από βακτήρια
<i>Lactococcus spp. : L. lactis ATCC 19257</i>	-	-	Λυκόψαρο	Επέκταση διάρκειας ζωής στο ψυγείο

<i>Carnobacterium spp.</i> : <i>C. piscicola A9b</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Περιορισμός ανάπτυξης του <i>L. monocytogenes</i>
<i>Carnobacterium spp.</i> : <i>C. piscicola A10a</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Περιορισμός ανάπτυξης του <i>L. monocytogenes</i>
<i>Carnobacterium spp.</i> : <i>C. piscicola A9b</i>	Carnobacteriocin B2	Σολομός κρύου καπνίσματος σε συσκευασία κενού αέρος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>Carnobacterium spp.</i> : <i>C. piscicola V1</i>	Piscicocin V1a and V1b	Έντερο πέστροφας	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>Carnobacterium spp.</i> : <i>C. piscicola SF668</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος σε συσκευασία κενού αέρος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Βακτηριδιακή δράση κατά του <i>L. monocytogenes</i>
<i>C. piscicola SF668</i>	Piscicolin 126	Σολομός κρύου καπνίσματος σε συσκευασία κενού αέρος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>C. piscicola Sal3</i>	-	Καπνιστό σολομός	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>C. divergens V41</i>	Divercin V41	Έντερο πέστροφας	Σολομός κρύου καπνίσματος	Βακτηριδιακή δράση κατά του <i>L. monocytogenes</i>
<i>C. divergens M35</i>	Divergicin M35	Παγωμένα καπνιστά μύδια	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>C. maltaromaticum</i> CS526	Piscicocin CS526	Σουρίμι	Σολομός κρύου καπνίσματος	Μείωση του πληθυσμού του <i>L. monocytogenes</i>

<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>Lb. sakei LKE5</i>	-	Πατέ ψαριού	Σολομός κρύου καπνίσματος	Ισχυρό θείο, δυσάρεστες γεύσεις
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>Lb. sakei Lb790</i>	Sakacin P	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>Lb. sakei LTH5754</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Μείωση του <i>L. monocytogenes</i> και <i>Listeria ivanovii</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. delbrueckii</i>	-	Σαρδέλλα	Σαρδέλλα	Αναστολή Κολοβακτηριδίων, <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> και <i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. delbrueckii ET32</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. curvatus ET06</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. curvatus ET30</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. plantarum 3</i>	-	Θαλασσινά προϊόντα	Λαυράκι σε συσκευασία κενού αέρος	Καταστολή παραγωγής ολικού πτητικού βασικού αζώτου και τριμεθυλαμίνης
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. plantarum Pe2</i>	-	Φρέσκο ψάρι	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Lactobacillus spp . :</i> <i>L. pentosus 7</i>	-	Θαλασσινά προϊόντα	Λαυράκι σε συσκευασία κενού αέρος	Καταστολή παραγωγής ολικού πτητικού βασικού αζώτου, τριμεθυλαμίνης

<i>Lactobacillus spp.</i> : <i>Lb. casei T3</i>	-	Γαλακτοκομικά προϊόντα	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Lactococcus spp.</i> : <i>Lc. piscium EU2241</i>	-	Θαλασσινά προϊόντα	γαρίδες  σε συσκευασία κενού αέρος	Μείωση του αριθμού <i>L. monocytogenes</i> και <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Leuconostoc spp.</i> : <i>Le. gelidum EU2247</i>	-	Θαλασσινά προϊόντα	γαρίδες  σε συσκευασία κενού αέρος	Μείωση του αριθμού <i>L. monocytogenes</i> και <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pediococcus spp.</i> : <i>P. acidilactici ET34</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>
<i>Pediococcus spp.</i> :	-	λουκάνικα	φιλέτο σκουμπρί	Καλύτερη αισθητική ποιότητα
<i>Enterococcus spp.</i> : <i>E. faecium ET05</i>	-	Σολομός κρύου καπνίσματος	Σολομός κρύου καπνίσματος	Αναστολή του <i>L. innocua</i>

6 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

6.1 1^η ΈΡΕΥΝΑ

6.1.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν ενεργά υπερκείμενα κατά των *Penicillium corylophilum* και *Aspergillus niger* για να ταυτοποιήσουν και να ποσοτικοποιήσουν τις αντιμυκητιακές ενώσεις που σχετίζονται με την παρατηρούμενη δράση. Οι διάφορες επεξεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν (εξουδετέρωση, θέρμανση και προσθήκη πρωτεΐνης K), έδειξαν ότι τα οργανικά οξέα έπαιζαν τον πιο σημαντικό ρόλο στην αντιμυκητιακή δράση κάθε εξεταζόμενου υπερκειμένου. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν διαφορετικές μέθοδοι (HPLC, φασματομετρία μάζας, χρωματομετρικές και ενζυμικές δοκιμασίες) για την ανάλυση των υπερκειμένων και αποδείχθηκε ότι οι κύριες αντιμυκητιακές ενώσεις αντιστοιχούσαν σε γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ, αιθανόλη και υπεροξειδίο του υδρογόνου, καθώς και άλλες ενώσεις που υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα όπως το φαινυλαιθανικό, hydroxyphenyllactic, αζελαϊκό και εξανικό οξύ. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, διάφοροι συνδυασμοί των ταυτοποιημένων ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασής τους στη βλάστηση των κονιδίων και στην ανάπτυξη των *P. corylophilum* και *Eurotium repens*. Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το οξικό οξύ ήταν κυρίως υπεύθυνο για την αντιμυκητιακή δράση έναντι του *P. corylophilum* και έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αναστολή του *E. Repens* (Le Lay et al. 2016).

Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας:

Επιλέχθηκαν 6 βακτήρια, 4 LAB (*L.citreum* L123, *Levilactobacillus brevis* Lu35, *Limosilactobacillus reuteri* 5529 και *Levilactobacillus spicheri* O15) και 1 προπιονιβακτήριο (*Propionibacterium freudenreichii* LSaci68), όλα από αυτά εμφάνισαν αντιμυκητιακές δράσεις in vitro και in situ. Ένας αρνητικός μάρτυρας, το οποίο ήταν ένα LAB χωρίς αντιμυκητιακή δράση (*Lacticaseibacillus casei* Lu53), δοκιμάστηκε παράλληλα. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε ζυμό υδρολυμένου αλεύρου σίτου (WFH). Μετά από επώαση στους 30 °C για 48 ώρες ή 72 ώρες για τα LAB και τα προπιονοβακτήρια, αντίστοιχα, τα υπερκείμενα λήφθηκαν μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 8422 g και ακολούθησε διήθηση σε φίλτρο PTFE μεγέθους πόρων 0,2 μm (VWR, Γαλλία) (Le Lay et al. 2016).

Φύση των αντιμυκητιασικών ενώσεων:

Η αντιμυκητιακή δράση του υπερκειμένου επιβεβαιώθηκε με έκχυση σε τρυβλία Petri ενός μίγματος υπερκειμένων που ελήφθη μετά από φυγοκέντρηση και διήθηση με ένα 4x πυκνό διάλυμα άγαρ (75%/25%, v/v). Μετά τον πολυμερισμό, προστέθηκε ένα ανώτερο στρώμα μέσου PDA (Potato Dextrose Broth συμπληρωμένο με 0,7% άγαρ). Στη συνέχεια, 50 κονίδια *Penicillium corylophilum* UBOCC-A-112081 ή *Aspergillus niger* UBOCC-A-112064 (UBO Culture Collection, Plouzané, Γαλλία), και τα δύο απομονωμένα από χαλασμένα προϊόντα αρτοποιίας, εμβολιάστηκαν στη μέση των τρυβλίων Petri και επώαστηκαν στους 25 °C για 7 ημέρες. Η ακτινική ανάπτυξη μυκήτων μετρήθηκε κάθε μέρα, με 2 κάθετες μετρήσεις (Le Lay *et al.* 2016).

Ποσοτικοποίηση γαλακτικού, οξικού και προπιονικού οξέος:

Τα υπερκείμενα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 7500 g στους 4 °C και αραιώθηκαν κατά το ήμισυ με θειικό οξύ (0,02 N) και στη συνέχεια καταψύχθηκαν στους -20 °C κατά τη διάρκεια τουλάχιστον 2 ωρών για καθίζηση πρωτεΐνης. Το οξικό, το γαλακτικό και το προπιονικό οξύ αναλύθηκαν μετά από ένεση 10 μL του ληφθέντος διαλύματος σε σύστημα HPLC Dionex με στήλη Aminex-A (Bio-Rad). Η ανίχνευση οργανικού οξέος πραγματοποιήθηκε στα 210 nm χρησιμοποιώντας ανιχνευτές UV/Visible και διαθλασίμετρο (Le Lay *et al.* 2016).

Ποσοτικοποίηση αιθανόλης:

Η αιθανόλη προσδιορίστηκε ποσοτικά με αέρια χρωματογραφία. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, τα πρότυπα αιθανόλης 0,02%, 0,05% και 0,2% παρασκευάστηκαν και αναμείχθηκαν με ισοπροπανόλη στην ίδια συγκέντρωση. Το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στα δείγματα που δοκιμάστηκαν. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 1 μL από κάθε μείγμα. Πραγματοποιήθηκαν τρία βιολογικά αντίγραφα και 3 τεχνικά αντίγραφα ανά βιολογικό αντίγραφο (Le Lay *et al.* 2016).

Ποσοτικοποίηση υπεροξειδίου του υδρογόνου

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το OxiSelect Hydrogen Peroxide Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την όλη διαδικασία τα αποτελέσματα διαβάστηκαν στα 595 nm χρησιμοποιώντας φωτόμετρο Multiskan FC Microplate (Thermo Scientific). Οι απορροφήσεις δειγμάτων συγκρίθηκαν με μια τυπική καμπύλη και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις H₂O₂ (Le Lay *et al.* 2016).

Ποσοτικοποίηση Reuterin

Το Reuterin μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη χρωματομετρική μέθοδο των Circle *et al.* (1945). Πρότυπα διαλύματα Acrolein (Aldrich) που κυμαίνονται από 0,05 έως 6 mM παρασκευάστηκαν σε μέσο ζωμού WFH. Σε 1 mL από κάθε δείγμα και πρότυπο διάλυμα, προστέθηκαν 0,75 mL ενός διαλύματος τρυπτοφάνης 10 mM (διαλυμένο σε 0,05 M HCl). Μετά την ομογενοποίηση, το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 20 λεπτά. Η απορρόφηση καταγράφηκε στα 560 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific). Οι συγκεντρώσεις του δείγματος προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας γραμμική απόκριση της προπενάλης (Le Lay *et al.* 2016).

Ταυτοποίηση αντιμυκητιασικών ενώσεων από LC-QToF

Χρησιμοποιήθηκαν 26 ενώσεις οι οποίες είναι γνωστές για τις αντιμυκητιακές τους ιδιότητες. Αρχικά παρασκευάστηκαν αποθέματα διαλυμάτων 2 mg/mL και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Παράλληλα, ένα διάλυμα το οποίο αντιστοιχούσε σε ένα μείγμα των 26 ενώσεων (100 µg/mL το καθένα) παρασκευάστηκε με αραιώση των διαλυμάτων με H₂O/(ACN) (90/10, v/v). Μίγματα διαλυμάτων παρασκευάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, δηλ. 1, 5, 10, 30 και 50 ppm, από αραιώσεις του διαλύματος H₂O/ACN (90/10, v/v). Στη συνέχεια τα βακτηριακά υπερκείμενα εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας το QuEChERS διασποράς SPE (dSPE) (Agilent Technologies), (Le Lay *et al.* 2016).

Επικύρωση μεθόδου

Πραγματοποιήθηκαν 3 δοκιμές βαθμονόμησης για να τονιστεί το αποτέλεσμα του μέσου και να προσδιοριστεί η ανάκτηση εκχύλισης και δύο τύποι καμπυλών βαθμονόμησης. Ο πρώτος τύπος αντιστοιχούσε σε ένα μείγμα αντιμυκητιασικών ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 5, 10, 30 και 50 ppm, όλες οι ενώσεις ήταν στην ίδια συγκέντρωση σε κάθε μείγμα), H₂O/ACN (90/10, v/v). Ο δεύτερος αντιστοιχούσε στα ίδια τυπικά μείγματα αραιωμένα σε μέσο WFH με pH ρυθμισμένο στο 3,5 με γαλακτικό οξύ (Fluka). Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης, δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας το ίδιο πρότυπο μίγμα 26 αντιμυκητιασικών ενώσεων σε μέσο WFH, χρησιμοποιώντας αιθύλιο οξικό και το kit QuEChERS dSPE όπως χρησιμοποιείθηκε για το υπερκείμενο. Ένας έλεγχος για το μέσο WFH λήφθηκε με εκχύλιση στις ίδιες συνθήκες μη εμβολιασμένου μέσου WFH αμέσως μετά την οξίνιση σε pH 3,5 με γαλακτικό οξύ. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των αντιμυκητιασικών ενώσεων. Για την καλύτερη αναγνώριση των ενώσεων που υποστηρίζουν την αντιμυκητιακή δράση, επιλέχθηκε ένα υψηλά αντιμυκητιακό υπερκείμενο που ελήφθη μετά από 48 ώρες ανάπτυξη του *L. citreum* L123 σε μέσο WFH (Le Lay *et al.* 2016).

Πίνακας 6: Όνομα, χημικός τύπος, θεωρητική μάζα ([M-H]–theoretical m/z) και ανιχνευόμενη μάζα για κάθε ελεγχόμενο αντιμυκητιασικό πρότυπο ([M-H]–found m/z) (Le Lay et al. 2016).

D-Glucuronic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	193.03468	193.0356
Cytidine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	242.07726	242.0786
2-Deoxycytidine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	226.08263	226.9658
Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	117.09	117.0901
DL-ρ-Hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.04997	181.059
1,2-Dihydroxybenzene	C ₆ H ₆ O ₂	109.02908	109.0294
4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0238	137.0245
3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.05	181.0509
Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	167.03443	167.035
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.03436	179.0348
(S)-(-)-Hydroxyisocaproic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	131.07086	131.0712
3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.05513	165.056
Phenyllactic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	165.05517	165.0556
ρ-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	163.03952	163.04
3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) propanoic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195.06554	195.066
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.02387	137.0243
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.05008	193.0509
Methylcinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	161.06025	161.0453
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	121.02895	121.0296
Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.09703	187.0975
Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	149.06025	149.0609
3-Hydroxydecanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	187.13342	187.1339
DL-β-Hydroxylauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	215.16472	215.1654
2-Hydroxydodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	215.16472	215.1653
Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	171.1385	171.1391
DL-β-Hydroxymyristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	243.19602	243.1965

6.1.2 Αποτελέσματα:

Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν μετά από μια διαδοχική διαδικασία διαλογής για αυτή τη μελέτη (*L. citreum* L123, *L. brevis* Lu35, *L. reuteri* 5529, *L. spicheri* O15 και *Propionibacterium freudenreichii* LSaci68) ήταν εκείνα που εμφάνισαν αντιμυκητιακές δράσεις έναντι διαφορετικών μυκήτων των προϊόντων αρτοποιίας. Η διαδικασία διαλογής αντιστοιχούσε σε έναν *in vitro* έλεγχο της αντιμυκητιακής δράσης 270 βακτηρίων γαλακτικού οξέος και 50 προπιονοβακτηρίων, μετά από *in situ* δοκιμές. Στη συνέχεια ακολουθούσε η εφαρμογή των πιο αποτελεσματικών βακτηρίων με τη μέθοδο του ψεκασμού στην επιφάνεια των ψωμιών και των παντεσπάνι, ή η ενσωμάτωσή τους στο προζύμι ψωμιού. *Aspergillus niger* (UBOCC-A-112064), *Cladosporium sphaerospermum* (UBOCC-A-112116), *Eurotium repens* (UBOCC-A-112075), *Penicillium corylophilum* (UBOCC-A-112081) και *Wallemia sebi* (UBOCC-A-112090). Ωστόσο, οι αντιμυκητιακές δράσεις παρατηρήθηκαν για ολόκληρη την βακτηριακή καλλιέργεια, δηλαδή και των βακτηριακών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό έγινε στη συνέχεια αξιολόγηση του κατά πόσο τα υπερκείμενα (καλλιέργειες χωρίς τα βακτηριακά κύτταρα) είχαν ακόμη αντιμυκητιακές δραστηριότητες. Η αξιολόγηση έγινε στους *P. corylophilum* UBOCC-A-112081 και *A. niger* UBOCC-A-112064 καθώς αυτοί οι μικροοργανισμοί αποδείχθηκε ότι πολύ λίγα προϊόντα απομόνωσης ήταν σε θέση να αναστείλουν αυτά τα στελέχη. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα υπερκείμενα εξακολουθούσαν να παρουσιάζουν αντιμυκητιασικές δράσεις έναντι και των δύο μυκήτων σε σύγκριση με τους 2 αρνητικούς μάρτυρες και το υπερκείμενο *L. casei* Lu53 (χωρίς αντιμυκητιακή δράση). Τα πιο ενεργά υπερκείμενα έναντι των δύο μυκητιακών στόχων ήταν αυτά του *L. brevis* Lu35 και του *L. citreum* L123. Τα λιγότερο ενεργά υπερκείμενα ήταν αυτά του *P. freudenreichii* LSaci68 και του *L. reuteri* 5529. Οι αντιμυκητιακές δράσεις του *Fructilactobacillus sanfranciscensis* CB1 και του *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 οφείλονται σε οργανικά οξέα που παράγονται στο μέσο (Le Lay *et al.* 2016).

Φύση ενεργών μορίων

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντιμυκητιακή δράση προκύπτει από ένα μεγάλο εύρος ενεργών μορίων διαφόρων χημικών ενώσεων όπως (π.χ. οργανικά οξέα συμπεριλαμβανομένων των καρβοξυλικών οξέων, πρωτεϊνικές ενώσεις, λιπαρά οξέα κ.λπ.). Προκειμένου να χαρακτηριστεί η φύση των μορίων που φέρουν την αντιμυκητιακή δράση στα υπερκείμενα που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές επεξεργασίες. Η πρωτεΐνάση K χρησιμοποιείται κλασικά για να προσδιοριστεί εάν μια αντιμικροβιακή ένωση είναι πρωτεϊνικής φύσης. Η θερμική επεξεργασία χρησιμοποιείται επίσης για την αξιολόγηση της θερμικής σταθερότητας των μορίων. Τέλος η διαδικασία της εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί εάν η δραστηριότητα σχετίζεται

με επίδραση pH ή οργανικού οξέος. Η αντιμυκητιακή δράση κάθε βακτηριακού υπερκείμενου που είχε υποβληθεί σε επεξεργασία ή όχι με πρωτεΐνάση K, ήταν η ίδια, υποδηλώνοντας έτσι ότι οι πρωτεΐνες δεν εμπλέκονται στην αντιμυκητιακή δράση. Όσον αφορά τις θερμικές επεξεργασίες, όλες οι υπερκείμενες αντιμυκητιακές δραστηριότητες επηρεάστηκαν από τη θέρμανση. Τέλος, μετά την εξουδετέρωση, όλα τα επεξεργασμένα υπερκείμενα ήταν ανενεργά έναντι των 2 μυκητιακών στόχων. Συνολικά, τα ληφθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα οργανικά οξέα υποστήριξαν την πλειοψηφία της παρατηρούμενης αντιμυκητιακής δράσης κατά των *P. corylophilum* UBOCC-A-112081 και *A. niger* UBOCC-A-112064. Τα οργανικά οξέα, τα οποία παράγονται από LAB και προπιονοβακτήρια, περιλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα ενώσεων αρκετές από τις οποίες είναι γνωστό ότι είναι αποτελεσματικές έναντι διάφορων αντιμυκητιακών ενώσεων (Le Lay *et al.* 2016).

Ποσοτική ανάλυση αντιμυκητιασικών μορίων σε υπερκείμενα

Πέρα από τα οργανικά οξέα, άλλα μόρια που παρουσιάζουν αντιμυκητιακές δράσεις και παράγονται από LAB ή προπιονοβακτήρια και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι οι ενώσεις reuterin, H₂O₂ και η αιθανόλη. Αξιοσημείωτο, φάνηκε ότι η ένωση reuterin δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα αντιμυκητιακά υπερκείμενα καθώς και σε 4 στελέχη γαλακτοβακίλλων (συμπεριλαμβανομένου ενός στελέχους *L. reuteri*) που παρουσίαζαν αντιμυκητιακές δράσεις έναντι των *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* και *Epidermophyton floccosum*. Όσον αφορά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων στον αρνητικό έλεγχο. Οι παρατηρούμενες ποσότητες ήταν παρόμοιες και κυμαίνονταν από 0,5181 έως 0,5799 μM, με το *L. citreum* L123 να είναι ο υψηλότερος παραγωγός. Παρουσία αιθανόλης παρατηρήθηκε σε κάθε δείγμα με εξαίρεση του δείγματος του αρνητικού μάρτυρα (*L. casei* Lu53 και *P. freudenreichii* LSaci68). Στα θετικά υπερκείμενα, οι συγκεντρώσεις αιθανόλης κυμαίνονταν από 0 έως 0,16%, η υψηλότερη συγκέντρωση προερχόταν από το *L. spicheri* O15 ενώ το *L. citreum* L123, ένα από τα πιο ενεργά αντιμυκητιακά στελέχη παρουσίασαν σχετικά χαμηλή παραγωγή. Όπως ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε γαλακτικό οξύ σε κάθε υπερκείμενο LAB που δοκιμάστηκε. Το γαλακτικό οξύ ποσοτικοποιήθηκε σε ένα εύρος από 2,47 έως 8,51 g/L για τα υπερκείμενα με αντιμυκητιακή δράση. Αξιοσημείωτο είναι ότι το υπερκείμενο του αρνητικού μάρτυρα *L. casei* Lu53 παρουσίασε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος $5,07 \pm 1,62$ g/L. Αυτό έδειξε ότι το γαλακτικό οξύ από μόνο του είχε ασθενή ανασταλτική δράση έναντι των ίδιων μυκητιακών στελεχών. Οξικό οξύ ανιχνεύθηκε σε κάθε βακτηριακό υπερκείμενο και η συγκέντρωσή του κυμαινόταν μεταξύ $0,005 \pm 0,005$ g/L και $2,35 \pm 0,255$ g/L για τον αρνητικό μάρτυρα και το πιο ενεργό στέλεχος (*L. citreum* L123), αντίστοιχα. Σε αντίθεση με το γαλακτικό οξύ, η απόδοση της παραγωγής οξικού οξέος φάνηκε να συσχετίζεται με

την παρατηρούμενη αντιμυκητιακή δραστηριότητα. Η ταυτόχρονη παρουσία του οξικού και γαλακτικού οξέος αποδείχθηκε ότι έχει συνεργατική δράση έναντι του *P. corylophilum* και *E. Repens*. Το προπιονικό οξύ βρέθηκε μόνο στο *P. freudenreichii* LSaci68 με συγκέντρωση 2,14 g/L που ήταν σύμφωνη με την ικανότητά του *P. freudenreichii* LSaci68 να ζυμώνει τη ζάχαρη και το γαλακτικό οξύ για να παράγει προπιονικό και οξικό οξύ (Le Lay et al. 2016).

Αντιμυκητιακές ενώσεις

Σε αυτή τη μελέτη, αναζητήθηκαν επίσης 26 αντιμυκητιακές ενώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Πρότυπα μείγματα παρασκευάστηκαν σε μέσο WFH και επικυρώθηκε μια μέθοδος HPLC για την ανίχνευσή τους. Η μέθοδος καθαρισμού QuEChERS που χρησιμοποιήθηκε στα αντιμυκητιακά υπερκείμενα και η ταχεία μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυσή τους (LC-QToF) επέτρεψαν τη διερεύνηση μεγάλου εύρους αντιμυκητιακών ενώσεων. Παρατηρήθηκε επίσης η παραγωγή του phenyllactic acid σε αντιμυκητιακούς γαλακτοβάκιλλους που απομονώθηκαν από διαφορετικές πηγές. Αυτή η ένωση είναι δραστική έναντι πολλών ειδών *Aspergillus*, *Eurotium* και *Penicillium*. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η προσθήκη phenylpyruvic οξέος, ενός προδρόμου του phenyllactic οξέος, στο μέσο ανάπτυξης συνέβαλε στη βελτίωση της αντιμυκητιακής δράσης των στελεχών των LAB. Phenyllactic acid, azelaic acid, DL- ρ -hydroxyphenyllactic acid, (S)-(-)-2-hydroxyisocaproic acid και vanillic acid έχουν ταυτοποιηθεί στο υπερκείμενο *L. reuteri* το οποίο είναι ικανό να αναστέλλει τα μυκητιακά δερματόφυτα καθώς και τους *Aspergillus niger* και *Aspergillus fumigatus*. Η κυτιδίνη η οποία παρήχθη επίσης από ένα αντιμυκητιακό LAB *Lactobacillus amylovorus*., βρέθηκε να είναι ελάχιστα αποτελεσματική έναντι του *A. Fumigatus*. Επίσης ο σχηματισμός 6, 2-hydroxy acids από τα στελέχη *L. paracasei* σε συνδυασμό με την κατανάλωση γλυκόζης και της οξίνισης από το γαλακτικό οξύ, ήταν κυρίως υπεύθυνη για την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης του *Penicillium spp* (Le Lay et al. 2016).

6.2 2^η ΕΡΕΥΝΑ

6.2.1 Εισαγωγή

Σε αυτή την έρευνα, εξετάστηκε ο *Lacticaseibacillus casei* *AST18*, και πιο συγκεκριμένα οι αντιμυκητιακές ιδιότητες των cell- free culture filtrate (CCF) του. Μέσω της επεξεργασίας της υπερδιήθησης και της ημι-παρασκευαστικής HPLC υπήρξαν δύο μέρη των CCF που παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση (μέρος 1 και μέρος 4). Το γαλακτικό οξύ αναγνωρίστηκε ως η κύρια αντιμυκητιακή ένωση στο μέρος 1 και στο μέρος 4, τρεις μικρές μοριακές ουσίες ανιχνεύθηκαν μέσω αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας (GC-MS). Αυτές ήταν οι, cyclo-(Leu-Pro), 2,6-diphenyl-piperidine, και 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrrolo[1,2-a;10, 20-d]pyrazine. Τέλος αποδείχθηκε ότι η αντιμυκητιακή δράση του *L. casei* *AST18* ήταν μια συνεργιστική επίδραση του γαλακτικού οξέος και των κυκλοπεπτιδίων. Οι στόχοι αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση των αντιμυκητιασικών ιδιοτήτων του CCF και ο προσδιορισμός των αντιμυκητιασικών ενώσεων που παράγονται από το *L. casei* *AST18* (Li *et al.* 2012).

Προετοιμασία του *Lacticaseibacillus casei* *AST18*

Ο *L. casei* *AST18* καλλιεργήθηκε σε άγαρ deMan Rogosa και Sharpe (MRS) ή σε ζωμό MRS στους 37 °C για 24 ώρες και διατηρήθηκε για μεγαλύτερη αποθήκευση στους -80 °C σε MRS συμπληρωμένο με 25 % (v/v) γλυκερόλη. Ο *Penicillium* *sp.* απομονώθηκε από αλλοιωμένο τυρί χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μύκητας. Στη συνέχεια διατηρήθηκε σε potato dextrose agar (PDA) στους 30 °C για 4 ημέρες και φυλάχτηκε στους 4 °C (Li *et al.* 2012).

Παρασκευή του διαλύματος σπορίων

Οι μύκητες αναπτύχθηκαν σε PDA στους 30 °C για 7 ημέρες μέχρι τον σχηματισμό σπορίωσης. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα σπόρια. Τέλος οι μύκητες μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο και προσαρμόστηκαν στα 10⁶ mL/L (Li *et al.* 2012).

Παρασκευή του CCF

Ο *Lacticaseibacillus casei* *AST18* αρχικά εμβολιάστηκε σε ζωμό MRS στο 37 °C για 72 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση στα 4,000g για 10 min. Τέλος το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε και μετά ακολούθησε η λυοφιλοποίηση του. Μετά από τη λυοφιλοποίηση του, η συγκέντρωση του

υπερκειμένου ήταν 15 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το αρχικό του όγκο. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε και το υπερκείμενο χρησιμοποιηήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα (Li *et al.* 2012).

Δοκιμασίες Αντιμυκητιακής Δράσης

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος τροποποιημένης διάχυσης άγαρ για την ανίχνευση αντιμυκητιασικών δραστηριοτήτων. Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *penicillium sp.* Στη συνέχεια 15 ml PDA προστέθηκαν σε ένα τριβλύο. Στη συνέχεια 100 μ L διαλύματος σπορίων ψεκάστηκαν στο PDA και 200 μ L καλλιέργειας προστέθηκαν. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 48 ώρες και στη συνέχεια εξετάστηκαν. Ο στείρος ζωμός MRS προσαρμόστηκε στο χαμηλότερο pH της καλλιέργειας του υπερκειμένου που χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος (Li *et al.* 2012).

Επιδράσεις της θερμοκρασίας, του pH και των πρωτεολυτικών ενζύμων στις αντιμυκητιακές δραστηριότητες

Το CCF χωρίστηκε σε τέσσερα δείγματα και θερμάνθηκαν στους 50, 70, 100 και 121 °C για 10 λεπτά, αντίστοιχα. Μετά την ψύξη, ανιχνεύθηκε η αντιμυκητιακή δράση κάθε δείγματος. Η τιμή pH του CCF ρυθμίστηκε σε 2.5, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 και 10.0 με πυκνό HCl και NaOH. Το CCF υποβλήθηκε σε επεξεργασία με θρυψίνη ή πεψίνη. Τα δείγματα προσαρμόστηκαν στις βέλτιστες τιμές pH για κάθε ένζυμο, δηλ. 7,6 και 2,0 για θρυψίνη και πεψίνη, αντίστοιχα. Μετά τη ρύθμιση του pH, το CCF υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 100 μ g του αντίστοιχου ενζύμου ανά mL και επώαστηκε στους 37 °C για 1 ώρα. Πριν από την αξιολόγηση της αντιμυκητιακής δράσης, η τιμή του pH του CCF αναπροσαρμόστηκε στο αρχικό pH. Ο ζωμός MRS χωρίς την προσθήκη πρωτεολυτικών ενζύμων και με τις ίδιες τιμές pH χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου (Li *et al.* 2012).

Ανάλυση Οργανικών οξέων

Τα οργανικά οξέα αναλύθηκαν από ένα σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας (Li *et al.* 2012).

Ταυτοποίηση των Αντιμυκητιασικών Ενώσεων με GC/MS

Για την αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS), δείγματα κλασμάτων τα οποία λήφθηκαν από HPLC, εξατμίστηκαν με N₂ και διαλύθηκαν μέσα CH₃OH (Li *et al.* 2012).

6.2.2 Αποτελέσματα

Αντιμυκητιακές ιδιότητες του CCF

Η αντιμυκητιακή δράση χάθηκε εν μέρει κατά τη θερμική επεξεργασία και δεν παρατηρήθηκε ανασταλτική δραστηριότητα μετά την επεξεργασία στους 121 °C, για 10 min. Η μέγιστη αποτελεσματικότητα της αντιμυκητιακής δράσης παρατηρήθηκε όταν οι τιμές του pH ήταν μεταξύ 2,5 και 4,0, αλλά μειώθηκε γρήγορα όταν οι τιμές του pH ήταν μεταξύ 4,0 και 7,0. Αυτό έδειξε ότι είτε οργανικά οξέα ή άλλες αντιμυκητιακές ενώσεις που εξαρτώνται από το pH ήταν υπεύθυνα για την αντιμυκητιακή δράση. Η αντιμυκητιακή δράση δεν ήταν ευαίσθητη στη θρυψίνη και στην πεψίνη (Li *et al.* 2012).

Ταυτοποίηση

Το συμπυκνωμένο CCF του *L. casei* AST18 υπερδιηθήθηκε από μεμβράνη 10, 3 και 1 KDa. Περαιτέρω κλασματοποιήσεις της υγρής διήθησης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ανακύκλωση HPLC. Για να προσδιοριστεί εάν η αντιμυκητιακή δράση οφειλόταν σε παραγωγή οργανικού οξέος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση IC των οργανικών οξέων στα κλάσματα. Το γαλακτικό οξύ έδειξε ότι ήταν στην υψηλότερη ποσότητα ακολουθούμενο από το τρυγικό οξύ, το κιτρικό οξύ και το οξικό οξύ (Li *et al.* 2012).

6.2.3 Συμπεράσματα

Βρέθηκαν δύο μέρη στο CCF που συνέβαλαν στην αντιμυκητιακή δράση. Ένα μέρος ήταν το γαλακτικό οξύ, το οποίο ήταν ο κύριος μεταβολίτης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Μεγάλη ποσότητα γαλακτικού οξέος μπορεί να μειώσει το pH και να δημιουργήσει ακατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης για τους μύκητες. Τα οργανικά οξέα μπορούν μόνο να διεισδύσουν στο μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα στην αδιάσπαστη μορφή τους. Αυτό υποδηλώνει ότι τα οργανικά οξέα είναι εν μέρει υπεύθυνα για τις αντιμυκητιακές δραστηριότητες. Το άλλο μέρος ήταν ένα μίγμα το οποίο περιείχε τρεις πιθανές αντιμυκητιακές ενώσεις: cyclo-(Leu-Pro), 2,6-diphenyl-piperidine και 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrrolo[1,2-a;10,20-d]pyrazine. Ο καθαρισμός ήταν αρκετά δύσκολος επειδή η συγκέντρωση των ενώσεων ήταν χαμηλή και ήταν δύσκολο να διαχωριστούν με ακρίβεια. Μέχρι τώρα, πέντε είδη κυκλικών διπεπτιδίων με αντιμυκητιακή δράση έχουν απομονωθεί από τα LAB. Αυτά περιλαμβάνουν cyclo(Gly-Leu), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro), cyclo(Leu-Pro), και cyclo(Leu-Leu). Έχει αναφερθεί η απομόνωση του cyclo (L-Leu-LPro) από το μέσο

καλλιέργειας του *Achromobacter xylosoxidans*. Διαπιστώθηκε ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις αυτού του κυκλικού διπεπτιδίου είναι υπεύθυνες για την αναστολή της παραγωγής αφλατοξίνης, αν και απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση για την αναστολή της ανάπτυξης του *Aspergillus parasiticus*. Η απομόνωση του cyclo(L-Leu-L-Pro) έγινε από τον *Lactiplantibacillus plantarum*. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει την απομόνωση του cyclo (L-Leu-L-Pro) από τον *L. casei* και την αντιμυκητιακή δράση αυτού του κυκλοδιπεπτιδίου. Τα 2,6-diphenyl-piperidine and 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrolo[1,2-a;10,20-d]pyrazine εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στην καλλιέργεια του LAB με αντιμυκητιακές δράσεις (Li *et al.* 2012).

6.3 3η ΈΡΕΥΝΑ

6.3.1 Εισαγωγή

Σε αυτή την έρευνα επιλέχθηκαν διάφορες ζυμώσεις οι οποίες λήφθηκαν από 2 γαλακτοκομικά μέσα που είχαν υποστεί ζύμωση: ανασυσταμένο γάλα χαμηλής θερμοκρασίας 10% συμπληρωμένο με 45% άνυδρο λίπος γάλακτος (για τα στελέχη των *Lactocaseibacillus rhamnosus* CIRM-BIA1952 και *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109193) και ένα διήθημα υπερδιήθησης συμπληρωμένο με 1% εκχύλισμα μαγιάς (για το στέλεχος *Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA1774). Διατηρήθηκαν λυοφιλοποιημένα για τους *A. jensenii* CIRM-BIA1774 και *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 και ως διηθημένο υπερκείμενο καλλιέργειας 0,45 μm για τον *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109193. Για κάθε πείραμα, αναλύθηκαν τρία βιολογικά αντίγραφα κάθε προϊόντος ζύμωσης. Ερευνήθηκαν τριάντα μία ενώσεις με γνωστή αντιμυκητιακή δράση και προστέθηκαν άλλα 5 επιπλέον μόρια 4-di-tert-butylphenol, mevalonolactone, N-acetyl-D-glucosamine, phenyl acetate και ricinoleic acid (Garnier *et al.* 2020).

6.3.2 Αποτελέσματα

Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση πιθανών αντιμυκητιασικών ενώσεων

Οργανικά και λιπαρά οξέα

Συνολικά, 31, 32 και 22 ενώσεις μεταξύ των 56 στοχευόμενων οργανικών και λιπαρών οξέων ανιχνεύθηκαν στους *A. jensenii* CIRM-BIA1774, *L.rhamnosus* CIRM-BIA1952 και *M. lanceolatus* UBOCC-A-109193. Όσον αφορά τα οργανικά οξέα, 11 από αυτά ανιχνεύθηκαν συστηματικά και στα

3 προϊόντα ζύμωσης. Όσον αφορά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ανιχνεύθηκαν 21. Μεταξύ αυτών, 12 ενώσεις (butyric, caproic, hydroxyisocaproic, nonanoic, capric, lauric, myristic, pentadecanoic, palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids) βρέθηκαν στα 3 ζυμώματα σε διάφορες συγκεντρώσεις (Garnier *et al.*2020).

Ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων από head-space trap GC-MS

Χρησιμοποιήθηκε μια μη στοχευμένη προσέγγιση για την αναζήτηση πιθανών αντιμυκητιασικών πτητικών ενώσεων χρησιμοποιώντας head-space trap συνδεδεμένη με αέρια χρωματογραφία. Τριάντα έξι πτητικές ενώσεις ανιχνεύθηκαν στο δείγμα. Μεταξύ αυτών, 15, 11 και 10 πτητικές ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων propionic και acetic acids, και butyric, caproic και caprylic acids τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν με ακρίβεια χρησιμοποιώντας HPLC και GC-FID, αντίστοιχα) ανιχνεύθηκαν με την υψηλότερη σχετική συγκέντρωση σε ζυμώσεις στα οποία υπήρχαν οι *A. jensenii* CIRM-BIA1774, *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 και *M. lanceolatus* UBOCC-A-109193 (Garnier *et al.*2020).

Προσδιορισμός πιθανών αντιμυκητιασικών πεπτιδίων

Όσον αφορά την ανάλυση nano-LC-MS/MS ταυτοποιήθηκαν συνολικά 1040 πεπτίδια στα 3 εξεταζόμενα δείγματα. Μεταξύ αυτών των πεπτιδίων, 22, 253 και 853 αναγνωρίστηκαν στις ζυμώσεις από τους *A. jensenii* CIRM-BIA1774, *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 και *M. lanceolatus* UBOCC-A-103193 (Garnier *et al.*2020).

Αντιμυκητιακή δράση αναγνωρισμένων πεπτιδίων

Από τα 16 πεπτίδια που αξιολογήθηκαν για αντιμυκητιακή δράση με τη μέθοδο διάχυσης άγαρ έναντι των *M. racemosus* και *R. mucilaginosa*, μόνο το pep4c177 το οποίο ανιχνεύθηκε στη ζύμωση από τον *L. rhamnosus* έδειξε σημαντική δραστηριότητα (Garnier *et al.*2020).

6.3.3 Συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη, 3 προϊόντα ζύμωσης ελήφθησαν από τους *L. rhamnosus*, *A. Jensenii* και

M.lanceolatus, που προηγουμένως είχαν δείξει ότι εμφανίζουν πολλές υποσχόμενες αντιμυκητιασικές δραστηριότητες στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Μεγάλη ποικιλία οργανικών και λιπαρών οξέων, πτητικών ενώσεων και ενός αντιμυκητιασικού πεπτιδίου αποδείχθηκαν ότι παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τους τύπους μορίων που εμπλέκονται στις αντιμυκητιακές δραστηριότητες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για βιοσυντήρηση. Όπως ήταν αναμενόμενο, το γαλακτικό και το οξικό οξύ ήταν τα πιο άφθονα προϊόντα ζύμωσης για το *L. rhamnosus* ενώ το προπιονικό και το οξικό οξύ συνδέονταν με τον *A. Jensenii*. Αξίζει να αναφερθεί ότι το γαλακτικό οξύ από μόνο του δεν θεωρείται ως ένωση με αντιμυκητιακή δράση, δεδομένου του σχετικά χαμηλού pKa (3,9). Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι σε συνδυασμό με το οξικό οξύ, και τα δύο δρούν συνεργατικά. Σε αντίθεση με το γαλακτικό οξύ, το οξικό και το προπιονικό οξύ έχουν υψηλότερες τιμές pKa (pKa =4,75 και 4,87, αντίστοιχα). Δεδομένου των υψηλών συγκεντρώσεών τους στα βακτηριακά προϊόντα ζύμωσης, πιθανότατα συνέβαλαν στην παρατηρούμενη αντιμυκητιακή δραστηριότητα. Οι συγκεντρώσεις οργανικού οξέος στο προϊόν ζύμωσης του *M.lanceolatus* ήταν ουσιαστικά χαμηλότερες από τα άλλα δύο, με εξαίρεση το κιτρικό οξύ που ποσοτικοποιήθηκε σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα ζυμωμένα προϊόντα. Αν και έχει αναφερθεί η αντιμυκητιακή δράση αυτού του οξέος, η αποτελεσματικότητά του είναι περιορισμένη σε σύγκριση με άλλα οργανικά οξέα όπως το οξικό και το βενζοϊκό. Ωστόσο, λειτουργεί και ως πρόδρομος για άλλες ενώσεις όπως το διακετύλιο το οποίο είναι πολύ γνωστό για τις αντιμυκητιασικές του δραστηριότητες. Το προϊόν ζύμωσης του *A. jensenii*, και σε μικρότερο βαθμό ο *L. rhamnosus* περιείχαν πολυάριθμες υδροξυλιωμένες ενώσεις. Η ομάδα υδροξυλίου βελτιώνει τη βιοδραστικότητα του οξέος ενισχύοντας το ιζώδες και παρέχοντας ένα ευκολότερο διαχωρισμό στη μεμβράνη. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα υδροξυλιωμένα οξέα που προέρχονται από δεκανοϊκό οξύ ανέστειλαν την ανάπτυξη του *R. mucilaginosa*. Αυτή η ένωση θα μπορούσε επομένως να συμβάλει στην αντιμυκητιακή δράση του *A. Jensenii*. Το φαινυλακτικό οξύ, το οποίο βρισκόταν στο προϊόν ζύμωσης από τον *A. jensenii*, έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική αντιμυκητιακή ένωση. Τέλος τα πεπτίδια μπορούν επίσης να εμπλέκονται στην αντιμυκητιακή δράση των παραγόντων βιοελέγχου (Garnier et al.2020).

7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων μέσω των μεταβολιτών τους καθώς και τη χρήση τους στα τρόφιμα με σκοπό την ενίσχυση της βιωσιμότητάς τους. Η συντηρητική δράση αυτών των βακτηρίων οφείλεται στην παραγωγή ενός ή περισσότερων ενεργών μεταβολιτών, όπως οργανικών οξέων (γαλακτικό, οξικό, μυρμηκικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ), που εντείνουν τη δράση τους μειώνοντας το pH των μέσων, και άλλων ουσιών, όπως αιθανόλη, λιπαρά οξέα, ακετοΐνη, υπεροξειδίο του υδρογόνου, διακετύλιο, αντιμυκητιακές ενώσεις (προπιονικό, φαινυλογαλακτικό, υδροξυφαινυλογαλακτικό, κυκλικά διπεπτίδια και 3-υδροξυ λιπαρά οξέα), βακτηριοσίνες (νισίνη, reuterin, πεντιοσίνη, λακτασίνη, εντεροσίνη και άλλες), κυκλικά διπεπτίδια και πρωτεϊνικές ενώσεις που δυνητικά εμπλέκονται σε αντιμυκητιασικές δραστηριότητες, δρώντας συνεργατικά.

Η κύρια ένωση που μεταβολίζεται από αυτές τις καλλιέργειες είναι η λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, το οποίο μειώνει την τιμή του pH και αλλάζει το περιβάλλον κάνοντας ένα δυσμενές μέσο για την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων και μικροοργανισμών που αλλοιώνουν.

Η παραγωγή οργανικών οξέων είναι αναμφίβολα ο καθοριστικός παράγοντας αύξησης της διάρκειας ζωής και της ασφάλειας του τελικού προϊόντος. Η οξίνιση είναι μια ιδιαίτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης κατά την παραγωγή πολλών ειδών τροφίμων, όπως το γάλα και τα λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση και τα λουκάνικα. Η αναστολή της παθογόνου μικροχλωρίδας και της αλλοίωσης εξαρτάται επίσης από τον γρήγορο και επαρκή σχηματισμό αυτών των οργανικών οξέων.

Το γαλακτικό οξύ και η παραγωγή του από τα LAB έχουν μακρά ιστορία στη βιομηχανία τροφίμων. Υπάρχει σε πολλά τρόφιμα τόσο φυσικά είτε ως προϊόν μικροβιακής ζύμωσης *in situ*, όπως στο ξινολάχανο, τις ελιές και τα τουρσί, το γιαούρτι, το βουτυρόγαλα και άλλα γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα ψωμιά με προζύμι και πολλά άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Χρησιμοποιείται ως όξινο, αρωματικό, ρυθμιστικό pH και αναστολέας της βακτηριακής αλλοίωσης σε μεγάλη ποικιλία επεξεργασμένων τροφίμων. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος επικεντρώνεται στη βακτηριακή ζύμωση.

Ο μηχανισμός αναστολής του γαλακτικού οξέος σχετίζεται με τη διαλυτότητα του μη διασπασμένου γαλακτικού οξέος εντός της μεμβράνης του κυτταροπλάσματος και τη μη διαλυτότητα του διασπασμένου γαλακτικού, που προκαλεί οξίνιση του κυτταροπλάσματος. Έτσι επηρεάζεται η διαμεμβρανική κλίση του pH και μειώνεται η ποσότητα της διαθέσιμης ενέργειας για την ανάπτυξη των κυττάρων.

Το οξικό οξύ χρησιμοποιείται σε διάφορα τρόφιμα για την αναστολή της ανάπτυξης και τη μείωση

της βιωσιμότητας των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μυκήτων. Η οξίνιση και η παραγωγή οξικού οξέος από ετεροζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους συμβάλλει στο άρωμα και αποτρέπει την αλλοίωση των μυκήτων στο προζύμι.

Το βενζοϊκό οξύ είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων. Το βενζοϊκό οξύ και το βενζοϊκό νάτριο χρησιμοποιούνται κυρίως ως αντιμυκητιασικοί παράγοντες. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να περιέχουν φυσικό βενζοϊκό οξύ, καθώς ορισμένα βακτήρια γαλακτικού οξέος μπορούν να μετατρέψουν ορισμένα οξέα που υπάρχουν φυσικά στο γάλα, σε βενζοϊκό οξύ. Τα στελέχη *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus helveticus* που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση γάλακτος μπορούν να παράγουν βενζοϊκό οξύ στο γάλα που έχει υποστεί ζύμωση σε παρόμοιες συγκεντρώσεις.

Τα βακτήρια προπιονικού οξέος είναι γνωστά για την ικανότητά τους να μετατρέπουν το γαλακτικό σε προπιονικό, οξικό και CO₂. Το προπιονικό οξύ χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως μυκητοστατικός παράγοντας, αλλά είναι επίσης αποτελεσματικό στον έλεγχο της ανάπτυξης και στη μείωση της βιωσιμότητας τόσο των Gram-θετικών όσο και των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Τα ετεροζυμωτικά LAB παράγουν προπιονικό οξύ. Τα προπιονικά οξέα αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες για να εξουδετερώσουν την ηλεκτροχημική βαθμίδα πρωτονίων.

Η παραγωγή H₂O₂ από βακτήρια γαλακτικού οξέος μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη τροφιμογενών παθογόνων. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που παράγουν H₂O₂ έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη ψυχοτρόφων και παθογόνων μικροοργανισμών σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα περισσότερα είδη *Lactobacilli* μπορούν να σχηματίσουν υπεροξειδίου του υδρογόνου με την οξειδωση του γαλακτικού.

Οι βακτηριοσίνες ταξινομούνται ως πεπτίδια ριβοσωμικής σύνθεσης, ως βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες ή σύμπλοκα πρωτεϊνών με αντιμικροβιακή δράση έναντι στενά συγγενών ειδών και παράγονται από διαφορετικές ομάδες βακτηρίων. Ορισμένα γένη προβιοτικών LAB που παράγουν βακτηριοσίνες είναι: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weisella*.

Τα βακτηριοκινογόνα στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης, ως συμπληρωματικές ή συγκαλλιέργειες σε συνδυασμό με καλλιέργεια εκκίνησης ή ως προστατευτικές καλλιέργειες (ειδικά στην περίπτωση των μη ζυμωμένων τροφίμων). Η καλλιέργεια θα αναπτυχθεί κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των τροφίμων και παράγει αρκετή βακτηριοσίνη για να αναστέλλει τα παθογόνα βακτήρια-στόχους ή τα βακτήρια που αλλοιώνουν ώστε να προσφέρει προστασία. Ενδεικτικά θα αναφέρω τις πιο διαδεδομένες βακτηριοσίνες τη νισίνη και το Reuterin.

Η νισίνη είναι η πιο χαρακτηριστική βακτηριοσίνη που παράγεται από τα LAB. Η σημασία αυτής της βακτηριοσίνης οφείλεται σε ένα ευρύ φάσμα δραστικότητας έναντι Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *L. lactis subsp. lactis* and *subsp. cremoris*, *L. bulgaricus*, *S. aureus* και *L. monocytogenes*. Ο τρόπος δράσης της νισίνης είναι μέσω της διαταραχής της λειτουργίας της μεμβράνης που προκαλείται από το σχηματισμό πόρων στην βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη που ακολουθείται από διαρροή του κυτταρικού υλικού.

Το Reuterin είναι μια ανασταλτική ένωση που παράγεται από τον *Limosilactobacillus reuteri*. Γενικά, τα θετικά κατά Gram και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια καθώς και αρκετοί μύκητες και ζυμομύκητες είναι ευαίσθητα σε αυτή την ένωση.

Πέρα από τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ευεργετικοί μικροοργανισμοί καθώς ορισμένα στελέχη τους είναι ακόμη και προαγωγικά για την υγεία (προβιοτικά βακτήρια). Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης. Η αναστολή της ανάπτυξης μούχλας και μυκοτοξίνης από βακτήρια γαλακτικού οξέος και τους μεταβολίτες τους φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική βιοελέγχου στα ευπαθή τρόφιμα που συχνά μολύνονται από τοξικά στελέχη μυκήτων.

Εν κατακλείδι, η χρήση των LAB ως παραγωγοί αντιμικροβιακών ουσιών, ιδιαίτερα βακτηριοσινών, είναι μια πολλά υποσχόμενη πρόοδος για τη βιομηχανία τροφίμων, για τη βελτίωση της ασφάλειας των προϊόντων διατροφής, την παράταση της διάρκειας ζωής και τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών. Το φάσμα της αντιβακτηριακής δράσης των στελεχών LAB έχει τη δυνατότητα να καλύψει ένα πολύ ευρύ πεδίο εφαρμογής στη βιομηχανία τροφίμων. Η χρήση ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας ως βιοτεχνολογικού εργαλείου για τη συντήρηση τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στη βελτίωση και τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων διατροφής, διατηρώντας ταυτόχρονα τις αισθητηριακές ιδιότητες του προϊόντος όπως χρώμα, γεύση, υφή και θρεπτική αξία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arevalo-Villena, M., Bartowsky, E. J., Capone, D., & Sefton, M. A. (2010). Production of indole by wine-associated microorganisms under oenological conditions. *Food microbiology*, 27(5), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.011>
2. Bae, S., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 712–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x>
3. Bartowsky E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in applied microbiology*, 48(2), 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x>
4. Bartowsky, Eveline. (2011). Lactic Acid Bacteria (LAB) in Grape Fermentations—An Example of LAB as Contaminants in Food Processing. 10.1201/b11503-18
5. Becker, M., & Tickner, J. A. (2020). Driving safer products through collaborative innovation: Lessons learned from the green chemistry & Commerce Council’s collaborative innovation challenge for safe and effective preservatives for consumer products. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100330>
6. Berenjian, A., Mahanama, R., Kavanagh, J., & Dehghani, F. (2015). Vitamin K series: current status and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 35(2), 199–208. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.832142>
7. Bifidobacteria and Yogurt cultures. *J Dairy Sci*, 85 (5), 1058. Binda, Sylvie & Ouwehand, Arthur. (2019). Lactic Acid Bacteria for Fermented Dairy Products. 10.1201/9780429057465-12.
8. Capozzi, V., Fiocco, D., Amodio, M. L., Gallone, A., & Spano, G. (2009). Bacterial stressors in minimally processed food. *International journal of molecular sciences*, 10(7), 3076–3105. <https://doi.org/10.3390/ijms10073076>

9. Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International journal of food microbiology*, 243, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025>
10. Clark, S., & Winter, C.K. (2015). Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 634-643.
11. Circle, S.J., Stone, L., Boruff, C.S., 1945. Acrolein determination by means of tryptophan. A colorimetric micromethod. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 17, 259–262.
12. Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., & Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC microbiology*, 7, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-101>
13. Collins, Fergus & Rea, Mary & Hill, Colin & Ross, R.. (2019). Antimicrobials from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Applications. 10.1201/9780429057465-11.
14. Conway, V., Couture, P., Gauthier, S., Pouliot, Y., & Lamarche, B. (2014). Effect of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(1), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.07.021>
15. Costello, P. J., & Henschke, P. A. (2002). Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(24), 7079–7087. <https://doi.org/10.1021/jf020341r>
16. Cretenet, M., Le Gall, G., Wegmann, U., Even, S., Shearman, C., Stentz, R., & Jeanson, S. (2014). Early adaptation to oxygen is key to the industrially important traits of *Lactococcus*

- lactis* ssp. *cremoris* during milk fermentation. *BMC genomics*, 15(1), 1054.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1054>
17. Fitch, S. E., Payne, L. E., van de Ligt, J. L. G., Doepker, C., Handu, D., Cohen, S. M., An-yangwe, N., & Wikoff, D. (2021). Use of acceptable daily intake (ADI) as a health-based benchmark in nutrition research studies that consider the safety of low-calorie sweeteners (LCS): a systematic map. *BMC Public Health*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10934-2>
 18. Fontana, Cecilia & Fadda, Silvina & Coconcelli, Pier Sandro & Vignolo, Graciela. (2011). Lactic Acid Bacteria in Meat Fermentations. 10.1201/b11503-14.
 19. Fox, P. F. & Mcsweeney, P. L. H. 2004. Cheese: An overview. In: Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (eds.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. London, UK: Elsevier
 20. Garnier, L., Penland, M., Thierry, A., Maillard, M. B., Jardin, J., Coton, M., Leyva Salas, M., Coton, E., Valence, F., & Mounier, J. (2020). Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108574>
 21. Gómez-Sala, Beatriz & Feito, Javier & Hernandez, Pablo & Cintas, Luis. (2019). Lactic Acid Bacteria in Aquatic Environments and Their Applications. 10.1201/9780429057465-35.
 22. Hemu, X., Qiu, Y., Nguyen, G. K., & Tam, J. P. (2016). Total Synthesis of Circular Bacteriocins by Butelase 1. *Journal of the American Chemical Society*, 138(22), 6968–6971.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b04310>
 23. Henney, J. E., Taylor, C. Lewis., & Boon, C. S., Institute of Medicine (U.S.). Committee on Strategies to Reduce Sodium Intake (2010). *Strategies to reduce sodium intake in the United States*. National Academies Press. DOI: <https://doi.org/10.17226/12818>
 24. Hertzler, S. R. & Clancy, S. M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc*, 103 (5), 582–587.

25. Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C. & Ross, R. P. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6, 751 <https://doi.org/10.1201/b11503>
26. Lamoureux, L., Roy, Y. D. & Gauthier, S. 2002. Production of oligosaccharides in Yogurt containing
27. le Lay, C., Coton, E., le Blay, G., Chobert, J. M., Haertlé, T., Choiset, Y., van Long, N. N., Meslet-Cladière, L., & Mounier, J. (2016).
28. Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J. M., Haertlé, T., Choiset, Y., Van Long, N. N., Meslet-Cladière, L., & Mounier, J. (2016). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International journal of food microbiology*, 239, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020>
29. Leroy, F., & de Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
30. Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Anti-fungal microbial agents for food biopreservation—a review. In *Microorganisms* (Vol. 5, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
31. Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., & Lv, J. (2012). Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current microbiology*, 65(2), 156–161. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0135-2>
32. METAXOPOYLOS (I. ΜΕΤΑΞΟΠΟΥΛΟΣ), J., MATARAGAS (M. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑΣ), M., & DROSINOS (E. X. ΔΡΟΣΙΝΟΣ), E. (2018). Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action. (I). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 53(4), 335-344. doi: <https://doi.org/10.12681/jhvms.15390>
33. Mols, J. M., van Kranenburg, R., Tempelaars, M. H., van Schaik, W., Moezelaar, R., & Abee, T. (2010). Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus*

- cereus to organic and inorganic acid shocks. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.027>
34. Morishita, T., Tamura, N., Makino, T., & Kudo, S. (1999). Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 82(9), 1897–1903. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75424-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75424-X)
35. Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., & Hattori, M. (2008). Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 15(3), 151–161. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn009>
36. Msagati, T. A. M. (2012). *The chemistry of food additives and preservatives*. Wiley-Blackwell. Chichester, UK.
37. Oh, D. H., & Marshall, D. L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 20(4), 239–246. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90168-g](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90168-g)
38. Park, Kun-Young & Kim, Boh. (2019). Lactic Acid Bacteria in Vegetable Fermentations. 10.1201/9780429057465-16.
39. Rajilić-Stojanović, Mirjana & Dimitrijević, Suzana & Golić, Natasa. (2019). Lactic Acid Bacteria in the Gut. 10.1201/9780429057465-24.
40. Rohde, B. H., & Quadri, L. E. (2006). Functional characterization of a three-component regulatory system involved in quorum sensing-based regulation of peptide antibiotic production in *Carnobacterium maltaromaticum*. *BMC microbiology*, 6, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-93>

41. Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00174-5)
42. Salovaara, Hannu. (2011). Lactic Acid Bacteria in Cereal-Based Products. 10.1201/b11503-13.
43. Saltmarsh, M. (2013). *Essential guide to food additives, 4th Edition*. Leatherhead, Surrey: Leatherhead Food International.
44. SOBOLOV, M., & SMILEY, K. L. (1960). Metabolism of glycerol by an acrolein-forming lactobacillus. *Journal of bacteriology*, 79(2), 261–266. <https://doi.org/10.1128/jb.79.2.261-266.1960>
45. Surono, I. S. & Hosono, A. 2011. Fermented milks: Types and standards of identity. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 470–476
46. Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in applied microbiology*, 57, 131–175. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)57005-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57005-9)
47. Thakkar, P. N., Patel, A. R., Modi, H. A. & Prajapati, J. B. 2018. Evaluation of antioxidative, proteolytic, and ace inhibitory activities of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food products
48. Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2019). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>
49. Vinderola, Gabriel & Champagne, Claude & Desfossés-Foucault, Émilie. (2019). The Production of Lactic Acid Bacteria Starters and Probiotic Cultures. 10.1201/9780429057465-20.

50. Von Wright, A. and Axelsson, L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Von Wright, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton, 1-15.
51. Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M. C. (2017). Lactobacillus sakei: A starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. In *Microorganisms* (Vol. 5, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030056>
52. Zourari, A., Accolas, J.P., & Desmazeaud, M.J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review [Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus]. DOI: <https://doi.org/10.1051/lait:199211>