



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογές της μικροβιακής ζύμωσης σε φυτικούς σπόρους

**Εισηγητές: Συμεών Κουρουμλίδης (18684042),
Ιωάννης Γεώργιος Ξαϊδάρας (18684091)**

Επιβλέπουσα: Ανθιμία Μπατρίνου

ΑΘΗΝΑ 2023

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2023

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Μέλος επιτροπής

Σπυρίδων Κοντελές

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος επιτροπής

Ειρήνη Στρατή

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαστε οι αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Συμεών Κουρουμλίδης

Σ. Κουρουμλίδης

Ιωάννης Γεώργιος Ξαϊδάρας

Ξαϊδάρας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες, στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μας, κα. Ανθιμία Μπατρίνου, για την μεγάλη συμβολή και καθοδήγηση της κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της ερευνητικής εργασίας.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα, Αικατερίνη Πυροβόλου, για την πολύτιμη βοήθεια και τη συνεχή υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών. Η έρευνα αυτή διεξήχθη ως μέρος της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο: «Αξιοποίηση συστατικών χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων».

Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους τους καθηγητές που συμμετείχαν στην εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο που αφιέρωσαν. Τέλος, δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μας στις οικογένειες και τους φίλους μας, για τη στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.

Συμεών Κουρουμλίδης/Ιωάννης Γεώργιος Ξαϊδάρας

Σεπτέμβριος 2023

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο αυτής της εργασίας αποτελεί η μελέτη των φυτικών σπόρων, των ευεργετικών ιδιοτήτων που προσφέρουν οι μικροβιακές ζυμώσεις και των πιθανών εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων. Οι φυτικές πηγές τροφίμων αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής και εμφανίζουν προοπτικές ως προς την καταπολέμηση διάφορων σημαντικών ζητημάτων που σχετίζονται με την υγεία, το περιβάλλον, την οικονομία και την κοινωνία.

Η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ζήτηση για τροφή, άρα και πρωτεΐνη, καθιστά την εκτενή κτηνοτροφία και αλιεία μη βιώσιμη. Από την άλλη, οι φυτικές πρωτεΐνες αποτελούν μια βιώσιμη εναλλακτική που είναι ικανή να αποσυμφορήσει τον πλανήτη και, σε συνδυασμό με τη δράση των ζυμώσεων, μετατρέπονται σε πηγές πλήρους τροφοδότησης αμινοξέων. Μέσω ελεγχόμενων μικροβιακών ζυμώσεων οι φυτικοί σπόροι εκδηλώνουν νέες ιδιότητες που συντελούν στην ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων καθώς και την παραγωγή νέων προϊόντων. Επίσης, καταστέλλουν τη δράση των αντιδιατροφικών παραγόντων, όπως το φυτικό οξύ, βελτιώνοντας τα χαρακτηριστικά του τροφίμου.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από λοβούς καρπών της χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua* L.), ενός φυτού που υπάρχει σε πλεόνασμα στα μεσογειακά κράτη και εμφανίζει πληθώρα εφαρμογών. Το πειραματικό κομμάτι χωρίστηκε στα εξής δύο μέρη: α) στη μελέτη της πεπτικότητας του χαρουπιού με τη χρήση μικροοργανισμών (καλλιέργειες οξυγαλακτικών και ζυμών) και των κατάλληλων ενζύμων μέσω της μέτρησης pH, και β) στην εξέταση της ποσότητας του φυτικού οξέος μέσω μετρήσεων του ελεύθερου και ολικού φωσφόρου στα δείγματα έπειτα από μικροβιακή ζύμωση (με οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, *A. oryzae*).

Λέξεις - κλειδιά: μικροβιακή ζύμωση, φυτικοί σπόροι, πρωτεΐνες, χαρούπι, πεπτικότητα πρωτεϊνών, φυτικό οξύ

ABSTRACT

The following dissertation concerns the study of plant seeds and the beneficial properties of their microbial fermentation that will lead to potential applications in the food industry. Plant based foods occupy an essential part of human nutrition and their use can confront serious issues concerning healthcare, the environment, the economy and overall, the society.

Due to the increase of the global population and the subsequent increasing demand for food, therefore for protein, intensive animal farming and fishery have become unsustainable. Conversely, a sustainable alternative that is capable of relieving the planet is plant-based proteins. The aforementioned, coupled with the effects of fermentation are converted to complete sources of amino acids. Through controlled microbial fermentations, the plant seeds acquire new beneficiary properties that contribute to the quality and safety of the foods and potentially provide new products. Furthermore, the fermentations limit the anti-nutritional factors, such as the phytic acid, enhancing the profile of the food.

In this paper, the item of examination is the seeds from pods of carob (*Ceratonia siliqua L.*), a plant that exists in abundance in the Mediterranean countries and showcases a wide range of uses. The experimental part was divided into the following two parts: a) the study of carob digestibility using microorganisms (lactic acid cultures and yeasts) and the appropriate enzymes through pH measurement, and b) the examination of the amount of phytic acid through measurements of free and total phosphorus in the samples after microbial fermentation (with lactic acid bacteria, yeasts, *A. oryzae*).

Keywords: microbial fermentation, plant seeds, proteins, carob, protein digestibility, phytic acid

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	6
1 Θεωρητικό μέρος: Εφαρμογές της ζύμωσης σε φυτικούς σπόρους.....	8
1.1 Ζυμώσεις.....	8
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.1.2 Γενικά	10
1.1.3 Λειτουργία και επίδραση στα συστατικά των τροφίμων.....	12
1.1.4 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση.....	22
1.2 Πρωτεΐνες	32
1.2.1 Γενικά	32
1.2.2 Φυτικές πρωτεΐνες	33
1.2.3 Διατροφή και περιβάλλον	34
1.2.4 Οικολογικά προβλήματα βιομηχανίας παραγωγής τροφίμων.....	36
1.2.5 Ζωικές πηγές πρωτεϊνών.....	38
1.2.6 Συστάσεις καταναλωτών.....	41
1.3 Χαρούπι	42
1.3.1 Ιστορική αναδρομή.....	42
1.3.2 Γενικές πληροφορίες/Εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων	43
1.3.3 Διατροφική αξία/Χημική σύσταση	45
1.3.4 Ευεργετικές ιδιότητες/Οφέλη για την υγεία.....	47
1.4 Φυτικό οξύ.....	49
1.4.1 Γενικά	49
1.4.2 Φυτάσες	52
1.4.3 Φυτικό οξύ και μέταλλα	52
1.4.4 Τεχνικές προσδιορισμού/ανίχνευσης	53
1.4.5 Διατροφή.....	54
2 Πειραματικό μέρος: εφαρμογή μικροβιακής ζύμωσης σε σπόρους χαρουπιού	55
2.1 Σκοπός του πειράματος.....	55
2.2 Υλικά και μέθοδοι	56
2.2.1 Υλικά και εξοπλισμός.....	56
2.2.2 Προκατεργασία/Προετοιμασία δειγμάτων (Dordević et al, 2010).....	58
2.2.3 Πειραματικό μέρος.....	59
3 Αποτελέσματα	63
4 Συζήτηση.....	106
5 Συμπεράσματα	112
6 Βιβλιογραφία.....	113

1 Θεωρητικό μέρος: Εφαρμογές της ζύμωσης σε φυτικούς σπόρους

1.1 Ζυμώσεις

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Οι ζυμωτικές διεργασίες εκτελούνταν από τον άνθρωπο αυθόρμητα προτού γίνουν κατανοητές η βιοχημική προσέγγιση και τα πλεονεκτήματά τους στην ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων και την υγεία των καταναλωτών (Maicas, 2020). Η ζύμωση αποτελεί μια από τις παλαιότερες τεχνολογίες παρασκευής, επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων, η οποία πρωτοεμφανίστηκε χιλιάδες χρόνια πριν. Χρονολογείται μάλιστα από την Προϊστορία όπου οι άνθρωποι αποθήκευαν φρούτα και λαχανικά σε δοχεία και ζυμώνονταν φυσικά από ζύμες. Εμφανίστηκε ύστερα στην Αρχαία Μεσοποταμία (σημερινό Ιράκ), πριν από περίπου 8000 χρόνια στους ποταμούς Τίγρη και Ευφράτη της Μέσης Ανατολής, όπου χρησιμοποιήθηκε στην τυροκομία και την παραγωγή μπίρας από τους Σουμέριους χρησιμοποιώντας γάλα και κριθάρι που είχαν υποστεί αυθόρμητη ζύμωση από βακτήρια και ζύμες. Αυτό αποδεικνύεται από συνταγές χαραγμένες σε πήλινες πλάκες που βρέθηκαν (Katz, 2013). Στην Αρχαία Αίγυπτο (4000 – 2000 π.Χ.) ζυμώσεις εφαρμόζονταν για την παρασκευή ψωμιού και αλκοολούχων ποτών, κυρίως μπίρα, με τη χρήση μείγματος δημητριακών και νερού και την μεσολάβηση «άγριων» ζυμών του περιβάλλοντος (Ross et al., 2002). Η μπίρα μάλιστα αποτελούσε σημαντικό μέρος της κουλτούρας των αρχαίων Αιγύπτιων και καταναλώνονταν τόσο από ενήλικες όσο και παιδιά.

Οι ζυμώσεις σόγιας με σκοπό την παραγωγή της διάσημης σάλτσας σόγιας όπως και οι ζυμώσεις ρυζιού (παραγωγή κρασιού ρυζιού) χρονολογούνται από τον αρχαίο κινέζικο πολιτισμό (περίπου 3000 π.Χ.), παίζοντας σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αυτών των προϊόντων τα οποία καταναλώνονται μαζικά μέχρι και σήμερα (McGovern et al., 2004). Στην Αρχαία Ελλάδα και Ρώμη, οι πληθυσμοί ήταν εξοικειωμένοι με τις τεχνικές και τις ευεργετικές ιδιότητες της ζύμωσης στην υγεία. Πιο συγκεκριμένα, ο Ιπποκράτης (460 – 377 π.Χ.) ερεύνησε τις επιπτώσεις και αναγνώρισε τα οφέλη των ζυμωμένων τροφίμων στην βελτίωση της πέψης. Από την άλλη, ο Ρωμαίος φυσιοδίφης Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (23 – 79 μ.Χ.) μελέτησε την παραγωγή ξυδιού μέσω ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα, τα μοναστήρια έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση και ανάπτυξη των τεχνικών ζύμωσης, κυρίως για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών (Katz, 2013).

Με βάση τα παραπάνω, η ζύμωση αποτελούσε το κλειδί για την δημιουργία πληθώρας τροφίμων και ποτών ασφαλών για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς ωστόσο να ήταν γνωστός ο ακριβής τρόπος παρασκευής τους, η βιοχημική διαδικασία και οι υπεύθυνοι οργανισμοί. Η παρουσία και η επίδραση των μικροοργανισμών αποκαλύφθηκε μόνο στο πιο πρόσφατο παρελθόν από τον Αντόνι φαν Λέβενχουκ (Antoine van Leeuwenhoek, 1632 – 1723), ύστερα από οπτικές παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο σε ζυμωμένα τρόφιμα χωρίς, ωστόσο, να αποδείξει ότι ευθύνονται πλήρως για την παρασκευή τους (Rouyan et al., 2015). Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί και η φύση της ζύμωσης ταυτοποιήθηκαν από τον Λουί Παστέρ (1822 – 1895) το διάστημα μεταξύ 1850 – 1860, αναδεικνύοντας τον ως τον πρώτο επιστήμονα που μελέτησε σε βάθος τη ζύμωση και αποδεικνύοντας ότι οι διαδικασίες εκτελούνται από ζωντανά κύτταρα μικροοργανισμών (Maicas, 2020).

Κατά τη διάρκεια της Βιομηχανικής Επανάστασης (1760 – 1840), ακολούθησε ταχεία αναβάθμιση από τα τοπικά εργοστάσια παραγωγής τροφίμων σε βιομηχανίες μεγάλης κλίμακας για κάλυψη των υψηλών διατροφικών απαιτήσεων και αναγκών των αυξανόμενων πληθυσμών κυρίως στη ζυθοποιία και στην παρασκευή οινοπνευματωδών ποτών (Ross et al., 2002). Αλκοολούχα ποτά παράγονταν σε μικρή κλίμακα είτε στα νοικοκυριά είτε σε μικρά ζυθοποιεία ή αποστακτήρια που με το χρόνο αντικαταστάθηκαν από μεγαλύτερες εγκαταστάσεις και την χρήση πιο εξελιγμένου εξοπλισμού με αποτέλεσμα υψηλότερες παραγωγές. Οι μετατροπές αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη παραγωγή και άλλων ζυμωμένων τροφίμων όπως ξύδι, λαχανικά (ξινόλαχανο, kimchi, τουρσί), γαλακτοκομικά, σάλτσες, κρεατοσκευάσματα κ.ά. με καθοριστικό ρόλο τόσο στην βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών όσο και στην συντήρηση (Ross et al., 2002; Xiang et al., 2019).

Η ορθή λειτουργία των εγκαταστάσεων προϋπέθετε την υλοποίηση νέων τεχνικών για την βελτίωση της απόδοσης και της αποτελεσματικότητας τους. Σε αυτά συνέβαλε η ανάπτυξη επεξεργασιών όπως η ανακάλυψη της παστερίωσης από τον Παστέρ, κατά την θερμική επεξεργασία οίνου, και η ένταξη της στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών και η δημιουργία νέων καλλιέργειών εκκινητών ζύμωσης με βελτιωμένες ιδιότητες ως προς την ζυμωτική ικανότητα και τις συνθήκες ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, που προέκυψαν με τις προόδους στη Βιοτεχνολογία (Rouyan et al., 2015). Πλέον, οι σύγχρονες βιομηχανίες εξαρτώνται σχεδόν εξ ολοκλήρου από τη χρήση καθορισμένων εκκινητών στελεχών που έχουν αντικαταστήσει τα ακαθόριστα μείγματα στελεχών που χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά με αποτέλεσμα τόσο τη

βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών όσο και της ποιότητας των τελικών προϊόντων (Ross et al., 2002).

1.1.2 Γενικά

Ζύμωση (fermentation: από την λατινική λέξη *fermentum*) καλείται η φυσική διαδικασία αποσύνθεσης που περιλαμβάνει τη χημική μετατροπή σύνθετων οργανικών ουσιών σε απλούστερες ενώσεις με τη δράση μικροοργανισμών, οι οποίοι είτε υπάρχουν φυσικά είτε προστίθενται σκόπιμα ως εκκινητές στα τρόφιμα - υποστρώματα, και μεταβολιτών τους με σκοπό την παραγωγή μιας σειράς προϊόντων (Xiang et al., 2019). Σύμφωνα με τον ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) ένα ζυμωμένο τρόφιμο θεωρείται ως «ένα τρόφιμο που έχει παρασκευαστεί μέσω κατάλληλης μικροβιακής ανάπτυξης και ενζυματικών μετατροπών συστατικών του τροφίμου» (Samtiya et al., 2021). Από βιοχημική άποψη είναι μια διαδικασία του κεντρικού μεταβολικού συστήματος των μικροοργανισμών κατά την οποία τα μακρομόρια των πρώτων υλών διασπώνται σε απλούστερες ενώσεις ή άλλους μεταβολίτες όπως αλκοόλη, οξέα, διοξείδιο του άνθρακα, βιοενεργά πεπτίδια και ένζυμα (Maicas, 2020). Με λίγα λόγια, οι μικροοργανισμοί λειτουργούν ως «μικροβιακά εργοστάσια» για την παραγωγή επιθυμητών θρεπτικών και βιοδραστικών ενώσεων ενώ καταναλώνουν ανεπιθύμητες ουσίες.

Τα ζυμωμένα τρόφιμα αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 1/3 (πάνω από το 30% κατά μέσο όρο) της παγκόσμιας κατανάλωσης τροφίμων με τα περισσότερα να παράγονται από τοπικές πηγές σύμφωνα με τις πολιτιστικές προτιμήσεις κάθε έθνους διατηρώντας τα παραδοσιακά στοιχεία και προσδίδοντας, έτσι, μοναδικές οργανοληπτικές ιδιότητες. Γενικότερα, αποτελούν μέρος της διατροφικής κουλτούρας σε πολλές κοινότητες εδώ και πολλούς αιώνες όπου, λόγω της απουσίας προηγμένου εξοπλισμού και εκσυγχρονισμένων τεχνικών, η συντήρηση ευπαθών προϊόντων πραγματοποιούνταν με τη χρήση άλατος κ.ά. καρυκευμάτων σε συνδυασμό με τους εγγενείς μικροοργανισμούς οδηγώντας σε μεγαλύτερες διάρκειες ζωής (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Λόγω της ποικιλομορφίας της μικροχλωρίδας, των πρώτων υλών και των διαφορετικών τύπων ζύμωσης υπάρχει διαθέσιμο ένα ευρύτατο φάσμα τροφίμων και ποτών στη σημερινή παγκόσμια αγορά με τον αριθμό να ξεπερνά τα 3500 προϊόντα, στα οποία περιλαμβάνονται προϊόντα γαλακτοκομικών, δημητριακών/οσπρίων, λαχανικών, ψαριών, κρέατος, τσάι, καφές κ.ά. (Xiang et al., 2019).

Η ζύμωση αποτελεί μια παραδοσιακή μέθοδο για τη συντήρηση και τη βελτίωση της ποιότητας και των αισθητηριακών χαρακτηριστικών των προϊόντων προσδίδοντας ξεχωριστές γεύσεις, αρώματα και υφές. Οι πρώτες ύλες μετατρέπονται σε νέα προϊόντα με αυξημένη θρεπτική αξία (παραγωγή ή και εμπλουτισμός με βιοδιαθέσιμα θρεπτικά συστατικά), ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία (παραυσία και δράση προβιοτικών στο έντερο, αντιοξειδωτικές ιδιότητες κ.ά.) και ειδικές βιολογικές λειτουργίες λόγω της υψηλής ποικιλίας και ποσότητας βιοδραστικών ενώσεων που σχηματίζονται (Ross et al., 2002; Xiang et al., 2019). Η σχέση μεταξύ συντήρησης και ζύμωσης έγκειται στη βιοσυντήρηση δηλαδή την παράταση του χρόνου παραμονής στο ράφι (shelf life) με τη χρήση μικροοργανισμών ή/και μεταβολιτών τους. Ορισμένοι εκκινητές μπορούν να παράγουν ένα μεγάλο εύρος αντιμικροβιακών ενώσεων και πεπτιδίων με ανασταλτική ή θανατηφόρο δράση έναντι της ανεπιθύμητης χλωρίδας στα τρόφιμα. Παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή βακτηριοσινών από την πλειοψηφία των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB), οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, και οξέων (Ross et al., 2002).

Οι καλλιέργειες - εκκινητές που χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες στην παρασκευή των ζυμομένων προϊόντων περιλαμβάνουν σχεδόν όλες τις κύριες ομάδες των μικροοργανισμών (πλην των ιών) δηλαδή βακτήρια και διάφορα γένη από το βασίλειο των μυκήτων και ζυμομυκήτων (Xiang et al., 2019). Οι κυριότερες ομάδες ζυμοτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν κυρίως οξυγαλακτικά βακτήρια για την παρασκευή των βασικότερων προϊόντων ζύμωσης αλλά και γένη *Bacillus* (*Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* κλπ.) που εμφανίζονται σε αλκαλικές ζυμώσεις, Ακτινοβακτήρια (*Kocuria spp.*, *Micrococcus spp.*), *Staphylococcus spp.* σε ζυμώσεις γαλακτοκομικών, κρέατος και ψαριών, βακτήρια προπιονικού οξέος (*Propionibacterium freudenreichii* στη ζύμωση τυριών όπως το Emmental) και άλλα γένη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται σε μικρότερη κλίμακα (*Pseudomonas spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* κ.ά.) (Tamang et al., 2016).

Η χρήση ζυμών στηρίζεται ως επί το πλείστον στη χρήση *Saccharomyces cerevisiae* που αποτελεί το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο σε ζυμώσεις είδος μικροοργανισμού για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών και ψωμιού και προϊόντων του εδώ και δεκαετίες. Άλλες καλλιέργειες “non – *Saccharomyces*” ζυμών που προστίθενται στις διαδικασίες της ζύμωσης περιλαμβάνουν *Candida spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Kloeckera spp.* κ.ά. (Maicas, 2020). Σε αντίθεση με τα βακτήρια και τις ζύμες όπου κύρια λειτουργία αποτελεί η παραγωγή προϊόντων μέσω βιοχημικών κύκλων, ο ρόλος της προσθήκης καλλιεργειών

νηματοειδών μυκήτων στα τρόφιμα έγκειται στην παραγωγή ενζύμων και την αποδόμηση αντιθρεπτικών παραγόντων. Είδη μυκήτων που εφαρμόζονται περιλαμβάνουν κυρίως γένη *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* σε ασιατικής προέλευσης ζυμωμένα τρόφιμα και αλκοολούχα ποτά (Tamang et al., 2016).

Στις σύγχρονες βιομηχανίες τροφίμων οι ζυμωτικές διεργασίες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη φύση του υποστρώματος σε διεργασίες ζύμωσης σε υγρή φάση (submerged fermentation, SMF) και σε στερεά φάση (solid state fermentation, SSF). Η διαφορά τους βρίσκεται στο μέσο που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί καθώς στις πρώτες διεργασίες τόσο το υπόστρωμα όσο και οι καλλιέργειες βρίσκονται σε υγρή μορφή ενώ στις τελευταίες ο πολλαπλασιασμός των ζυμωτικών οργανισμών και ο σχηματισμός του προϊόντος εκτελούνται στην επιφάνεια στερεού και αδιάλυτου στο νερό υποστρώματος. Οι SMF διαδικασίες χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, ξυδιού και κιτρικού οξέος ενώ πλέον εφαρμόζονται και στην ανάπτυξη και απομόνωση μικροβιακών καλλιεργειών (κυρίως μαγιά) και ταξινομούνται περαιτέρω με βάση την λειτουργία τους ως διαδικασίες κατά παρτίδες (batch fermentation), τροφοδοσίας παρτίδας (fed batch fermentation) και συνεχούς λειτουργίας (continuous) (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Από την άλλη, οι SSF εφαρμόζονται στην παραγωγή ζυμωμένων λαχανικών και κρέατος όπως ξινολάχανο, kimchi, τουρσιά, miso, tempeh, λουκάνικα κ.ά. Τη τελευταία δεκαετία έχει αποκτηθεί μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τις SSF διαδικασίες δεδομένου ότι επιτρέπουν την εκτέλεση των διεργασιών σε μικρότερους ζυμωτήρες με λιγότερες ενεργειακές απαιτήσεις και επιπτώσεις στο περιβάλλον (de Carvalho, 2016a).

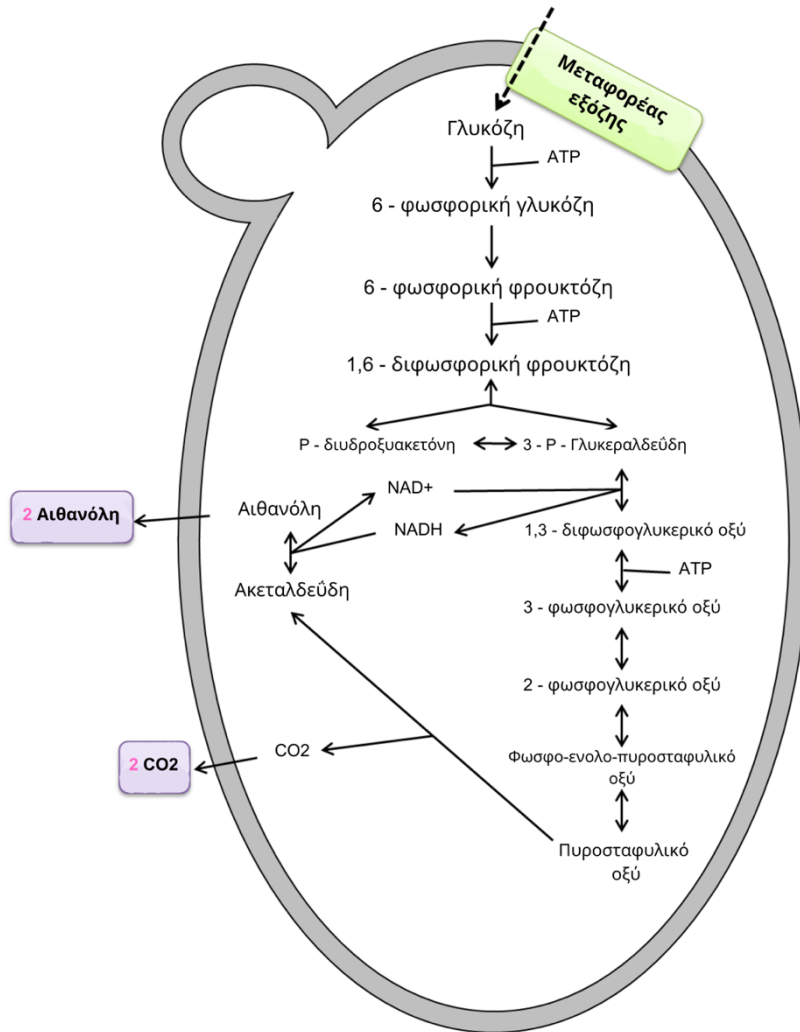
Με βάση τη κυρίαρχη καλλιέργεια μικροοργανισμών που προστίθεται, οι διαδικασίες της ζύμωσης ταξινομούνται ως βακτηριακές (γαλακτική και αλκοολική ζύμωση), ζυμώσεις μαγιάς και μούχλας και μικτές ζυμώσεις όπου εμπλέκονται τόσο μύκητες όσο και βακτήρια (κυρίως LAB) για την παραγωγή κεφίρ, τυριών, σάλτσας σόγιας και ψωμιού με προζύμι (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

1.1.3 Λειτουργία και επίδραση στα συστατικά των τροφίμων

1.1.3.1 Βιοχημεία της ζύμωσης

Από βιοχημική άποψη, η ζύμωση αποτελεί έναν τύπο αναερόβιας κυτταρικής αναπνοής όπου τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται κατά την οξείδωση/αναγωγή των θρεπτικών συστατικών μεταφέρονται σε οργανικές ή μη ενώσεις, δηλαδή σε μόρια εκτός του οξυγόνου (όπως συμβαίνει κατά την αερόβια κυτταρική αναπνοή). Συνοπτικά, είναι διαδικασία κατά την οποία παράγεται ενέργεια με την μορφή ATP σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Σε αντίθεση με την αερόβια όπου μέρος της εκτελείται και στα μιτοχόνδρια (κύκλος Krebs, οξειδωτική φωσφορυλίωση), η αναερόβια αναπνοή συμβαίνει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και χωρίζεται σε δύο μεταβολικά στάδια, την αναερόβια γλυκόλυση και τη ζύμωση, παράγοντας οργανικά οξέα (γαλακτική ζύμωση) ή αλκοόλη (αλκοολική ζύμωση), διοξείδιο του άνθρακα και ενέργεια (ATP) (Dahal, 2022).

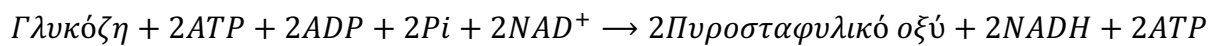
Σε κάθε κατηγορία τροφίμου, από ζωικά μέχρι και φυτικά, η διαδικασία της ζύμωσης περιλαμβάνει αρχικά την υδρόλυση των υδατανθράκων και των άλλων μακρομορίων (Ross et al., 2002). Οι μικροοργανισμοί παράγουν ένα μεγάλο πλήθος ενζύμων (φυτάσες, λιπάσες, πρωτεάσες, αμυλάσες κλπ.) που κατέχουν την ικανότητα αποικοδόμησης των μακροθρεπτικών συστατικών σε απλούστερες και πιο εύπεπτες δομικές μονάδες. Μέσω της ανάπτυξης βέλτιστων συνθηκών (pH, θερμοκρασίας και οξυγόνου), διεγείρεται η παρασκευή ενζύμων όπως η μαλτάση και η α-αμυλάση που διασπούν το άμυλο σε απλά σάκχαρα και μαλτοδεξτρίνες με αποτέλεσμα την αύξηση του συνόλου της γλυκόζης στο υπόστρωμα (Samtiya et al., 2021). Η γλυκόζη εισάγεται στα μικροβιακά κύτταρα και μεταβολίζεται σύμφωνα με την κοινή αντίδραση γλυκόλυσης.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού της γλυκόζης (Γλυκόλυσης) στα μικροβιακά κύτταρα προς παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (Αλκοολική Ζύμωση) (Maicas, 2020).

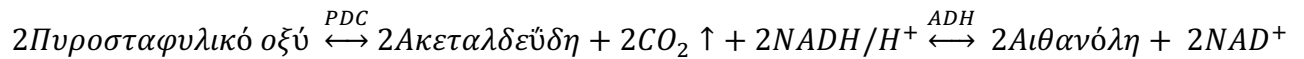
Ή συνοπτικότερα:

1) Γλυκόλυση:

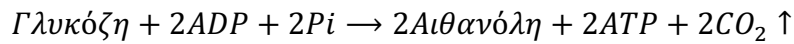


2) Ζύμωση:

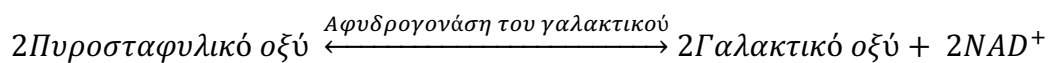
a. Αλκοολική ζύμωση:



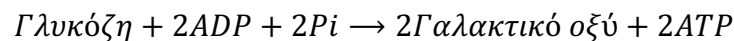
όπου PDC: αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού (pyruvate decarboxylase) και ADH: αλκοολική αφυδρογονάση (alcohol dehydrogenase). Συνεπώς, η τελική αντίδραση είναι:



b. Γαλακτική ζύμωση ή ζύμωση γαλακτικού οξέος:



και η τελική αντίδραση:



Οι αντιδράσεις αυτές δεν είναι ικανοποιητικές για τα κύτταρα καθώς πρέπει να καταναλώσουν υψηλές ποσότητες γλυκόζης για την παραγωγή ενέργειας σε σύγκριση με τις αερόβιες διαδικασίες (Maicas, 2020). Ωστόσο, θεωρείται ταχύτερη διαδικασία παραγωγής ενέργειας και των απαραίτητων τελικών προϊόντων. Εκτός από την συμβολή τους στα παραπάνω στάδια, τα μικροβιακά ένζυμα διαθέτουν και την ικανότητα αποδόμησης αντιθρεπτικών παραγόντων όπως αναστολείς πρωτεασών, τανίνες και φυτικά οξέα βελτιώνοντας την βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Samtiya et al., 2021).

1.1.3.2 Επίδραση στα μικρο- και μακροθρεπτικά συστατικά των τροφίμων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ζυμωτικές διαδικασίες βελτιώνουν τη διατροφική ποιότητα των προϊόντων εμπλουτίζοντας το τρόφιμο με ενώσεις υψηλής θρεπτικής αξίας και βιοδιαθεσιμότητας. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα περισσότερα φυτικά τρόφιμα όπως τα όσπρια και τα δημητριακά που στερούνται απαραίτητα αμινοξέα (στις πλείστες περιπτώσεις λυσίνη) και χαρακτηρίζονται από περιορισμένη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Οι φυσικοχημικές πορείες που λαμβάνουν μέρος στα

κύτταρα, οδηγούν στην μεταχείριση των μακρομορίων που απαρτίζουν τις πρώτες ύλες με αποτέλεσμα τη δημιουργία απλούστερων και βιοδραστικότερων ενώσεων και ουσιών που σχετίζονται με τις αισθητηριακές παραμέτρους του προϊόντος. Συνοπτικότερα, οι διεργασίες της ζύμωσης οδηγούν τόσο σε οφέλη για την υγεία των καταναλωτών όσο και την τελική ποιότητα και ασφάλεια του προς κατανάλωση τροφίμου (Xiang et al., 2019). Κατά την μεταβολική δράση των εκκινητών που εμβολιάζονται στις μήτρες παράγεται ποικιλία ενώσεων με ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία και την ποιότητα του τροφίμου στις οποίες περιλαμβάνονται απλά μόρια (αιθανόλη), πολυπλοκότερα μακρομόρια (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια) και διάφοροι βιοδραστικοί μεταβολίτες (φλαβονοειδή, λακτοφερίνη κ.ά.).

1.1.3.2.1 Ουσίες πρωτεϊνικής φύσης: βιοενεργά πεπτίδια, αμινοξέα και ένζυμα

Με το πέρας της διαδικασίας ζύμωσης, οι μεγάλοι μήκους πρωτεΐνες διασπώνται ενζυμικά (πρωτεόλυση) προς ενεργά πεπτίδια, δηλαδή θραύσματα των αλληλουχιών των πρόδρομων πρωτεϊνών (< 6000 Da) με ισχυρές βιολογικές λειτουργίες και πλεονεκτήματα για τον άνθρωπο, ανάλογα με τη δομή, τη σύνθεση και τη σειρά των αμινοξέων (Xiang et al., 2019). Κύριο παράδειγμα αποτελούν τα πεπτίδια που προκύπτουν κατά τις ζυμώσεις γάλακτος και κατέχουν αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες ενώ είναι γνωστό ότι προλαμβάνει και την αθηροσκλήρυνση. Παραδείγματα αποτελούν ο σχηματισμός λακτοφερίνης από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και πεπτιδίων από τη διάσπαση καζεϊνών και βακτηριοσινών (Sanjukta & Rai, 2016; Xiang et al., 2019b)

Η ζύμωση θεωρείται ένας αποτελεσματικός τρόπος παραγωγής αμινοξέων από πολύπλοκα και δύσπεπτα πολυπεπτίδια. Μικροβιακά στελέχη όπως η *Escherichia coli*, ο *Streptococcus thermophilus* και το *Clostridium glutamicum* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό αμινοξέων κυρίως διακλαδισμένης αλυσίδας (βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη). Το σημαντικότερο, ωστόσο, επίτευγμα της ζύμωσης είναι η παραγωγή του γ – αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) με την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού οξέος που καταλύεται από ορισμένα LAB (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* και *Streptococcus salivarius*). Το GABA χημικά αποτελεί ένα μη πρωτεϊνούχο αμινοξύ και είναι ένας κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του κεντρικού νευρικού συστήματος των θηλαστικών με βασική λειτουργία την μείωση της διέγερσης των νευρώνων (Dhakal et al.,

2012). Σημαντικές ποσότητες GABA βρέθηκαν κυρίως σε τρόφιμα που παράγονται με γαλακτικές ζυμώσεις όπως το kimchi, ζυμωμένο γάλα, τυριά κ.ά. γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα θαλασσινών. Εκτός των παραπάνω, σε μεγάλες ποσότητες βρέθηκαν και D – αμινοξέα σε ζυμωμένα τρόφιμα με ρακεμοποίηση των αντίστοιχων L – ισομερών τους (Xiang et al., 2019).

Η σχέση μεταξύ ζύμωσης και ενζύμων είναι διττή: εφαρμόζεται τόσο για τη διάσπαση των μορίων των πρώτων υλών και παράγει νέες ουσίες μέσω της δράσης των ενζύμων που περιέχονται στους μικροοργανισμούς όσο και ως μέσο σχηματισμού ενζύμων και συμπαραγόντων τους με την επίδραση μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, μέσω SSF ζύμωσης παράγονται αμυλάσες με τη χρήση *Bacillus* spp. σε ελαιούχους σπόρους (Rajshree Saxena & Singh, 2011) ενώ σε κρασιά παρατηρήθηκε η παρουσία γλυκοσιδασών μέσω μηλογαλακτικής ζύμωσης με τη χρήση του στελέχους *Oenococcus oeni* Lalvin EQ54. Τέλος, σχηματισμός φυτάσης αναφέρθηκε σε ζυμώσεις με καλλιέργεια – εκκινήτη στελέχους *Aspergillus oryzae* NRRL 1988 ενώ μετά από ανάλυση ζυμούμενων θαλασσινών όπως το Jeotgal παρατηρήθηκε η ύπαρξη συνενζύμου Q (ουβικινόνη) στο τελικό προϊόν (Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.2 Υδατάνθρακες (ολιγο- και πολυσακχαρίτες)

Οι πλείστες πρώτες ύλες περιέχουν μεγάλο ποσό σακχάρων συμπεριλαμβανομένων μόνο-, δι-, ολιγο- και πολυσακχαριτών τα οποία υφίστανται σημαντικές αλλαγές κατά τη ζύμωση ανάλογα με τον τύπο και την αναλογία τους στο υπόστρωμα (Xiang et al., 2019). Τα περισσότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων συνθέτουν εξωπολυσακχαρίτες (EPS), όπως οι γλυκάνες, φρουκτάνες και άλλοι γλυκο-/φρουκτολιγوسακχαρίτες, που συμβάλλουν στις ρεολογικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων προσδίδοντας αυξημένο ιξώδες και βελτιωμένες υφές και αποτελώντας μια εναλλακτική λύση της χρήσης των βιομηχανικών σταθεροποιητών (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Εκτός της επίδρασης τους στις επιφανειακές ιδιότητες των τροφίμων, παρουσιάζουν πρεβιοτικά αποτελέσματα προάγοντας την υγεία του εντέρου και ισχυροποιώντας την ανοσολογική απόκριση (Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.3 Λιπίδια

Οι μεταβολικές πορείες των μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος κατά τις ζυμωτικές διεργασίες μετατρέπουν τις πηγές άνθρακα των υποστρωμάτων προς λίπη και έλαια με οφέλη ως προς την υγεία, τις βιομηχανίες αλλά και την προστασία του περιβάλλοντος. Οι φυσικοί πόροι και τα βιομηχανικά απόβλητα έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την παραγωγή βιοκαυσίμων (biodiesel) και βιοχημικών χρησιμοποιώντας τα πιο κοινά μικροβιακά στελέχη όπως *Saccharomyces cerevisiae* και LAB (Xiang et al., 2019). Αυξανόμενο ενδιαφέρον υπάρχει για τον σχηματισμό μικροβιακών λιπών και ελαίων (Single Cell Oils, SCO) με την χρήση ελαιούχων μικροοργανισμών όπως φυσικές ή τεχνητές καλλιέργειες στελεχών *Rhodococcus* spp. (*Rhodococcus opacus* PD630, *R. jostii* RHA1 ή RHA VanA⁻) και ελαιωδών ζυμών (*Candida curvata* D, *Cryptococcus albidus* κ.ά.) (Koutinas et al., 2014).

Ορισμένα *Bifidobacteria* spp. και *Lactobacillus* spp. διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής ισομερών συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (CLA) σε ζυμωμένα γάλατα και γαλακτοκομικά προϊόντα ενισχύοντας πολλές από τις λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού (μείωση επιπέδων LDL στο αίμα, πρόληψη ασθενειών και προαγωγή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού και των οστών). Άλλα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται συχνά σε ζυμωμένα τρόφιμα περιλαμβάνουν ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυεξανοϊκό οξύ (DHA) χρησιμοποιώντας στελέχη LAB όπως το *Pediococcus acidilactici* (Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.4 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα, που παράγονται ως τελικά προϊόντα από τους ζυμωτικούς οργανισμούς, παρέχουν ένα όξινο περιβάλλον στο τρόφιμο δημιουργώντας έτσι τις χαρακτηριστικές γεύσεις και οσμές των ζυμωμένων προϊόντων, κυρίως σε αυτά που προκύπτουν από γαλακτικές ζυμώσεις, και δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και ζύμες/μύκητες (Ross et al., 2002). Εκτός του βασικού ρόλου τους ως οξέα, άλλοτε λειτουργούν και ως υποστρώματα, διαλύτες, πηγές πρωτονίων και συμπλοκοποιητές (σχηματισμός συμπλόκων Al και Fe). Όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες χαρακτηρίζονται από

διάφορα οφέλη για την υγεία ρυθμίζοντας την γλυκαιμική απόκριση, την πέψη και τη γαστρική κένωση (Xiang et al., 2019).

Στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση ποικίλλουν αρκετά ανάλογα με το είδος και στέλεχος του μικροοργανισμού, τη φύση της πρώτης ύλης και τη μέθοδο και τις συνθήκες της διαδικασίας. Σε αυτά περιλαμβάνονται οξέα που παράγονται από τους κοινούς τύπους ζύμωσης (γαλακτική, οξική, προπιονική) οδηγώντας στα αντίστοιχα οξέα και χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους μικροοργανισμούς. Αυτά ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση διαταράσσοντας τη φυσιολογία και τις μεταβολικές λειτουργίες ευαίσθητων σε χαμηλές τιμές pH στελεχών (*Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*) με αποτέλεσμα την παράταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος στο ράφι και ασφαλέστερα προϊόντα ζύμωσης (Ross et al., 2002; Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.5 Αντιοξειδωτικά/Βιταμίνες

Οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών με υψηλή αντιοξειδωτική δράση προλαμβάνοντας ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Οι διάφορες επεξεργασίες τροφίμων χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα απελευθέρωσης φαινολικών ουσιών από ένα ευρύ φάσμα φυσικών πόρων και πηγών τροφίμων ενισχύοντας ταυτόχρονα τη βιοδραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητα τους (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Έτσι, τα τρόφιμα και ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις απλών φαινολών (φαινολικά οξέα), και πιο πολύπλοκων φαινολικών ενώσεων (φλαβονοειδή, κατεχίνες, ολιγομερείς φλαβονόλες π.χ. προανθοκυανιδίνες), χαλκόνες, λιγνάνες κ.ά. (Xiang et al., 2019).

Κατά τη ζύμωση φυτικών υποστρωμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες, επαγώγιμα ένζυμα όπως γλυκοσιδάσες, εστεράσες, αποκαρβοξυλάσες, αναγωγή φαινολικών οξέων και ταννάση συντίθενται από τους μικροοργανισμούς για την αντιμετώπιση της τοξικότητας των φαινολικών ουσιών. Με την επίδραση των ενζύμων μετατρέπονται σε προϊόντα αποικοδόμησης με υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και κλάσμα απορρόφησης. Η ζύμωση σε πολτούς ντομάτας με *Pediococcus pentosaceus* και *Lactobacillus sakei* παρατηρήθηκε ότι αυξάνει την συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή σε σύγκριση με μη

ζυμωμένα προϊόντα, καθώς σε μεγαλύτερες αναλογίες βρέθηκαν λυκοπένιο, β – καροτένιο και cis – λυκοπένιο (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

Τα ζυμούμενα τρόφιμα περιέχουν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνες ανάλογα με τη πρώτη ύλη, τα μικροβιακά στελέχη και τις συνθήκες. Για παράδειγμα, γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το κεφίρ και το γιαούρτι βρέθηκαν πλούσια σε βιταμίνες A, B και D κατά τη ζύμωση γάλακτος με LAB ενώ σε ζυμωμένα προϊόντα σόγιας όπως το tempeh και το natto διαπιστώθηκε αύξηση βιταμινών του συμπλέγματος B και K (κυρίως K12). Ωστόσο, σε φυτικές πηγές μπορεί να προκληθεί το αντίστροφο αποτέλεσμα, μειώνοντας το περιεχόμενο βιταμίνης B1 κατά τη ζύμωση με ορισμένα βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus*) ενώ αυξάνεται με τη χρήση ζυμών (Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.6 Μέταλλα/Αλκαλοειδή

Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών στις φυτικές πηγές τροφίμων οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην παρουσία αντιθρεπτικών παραγόντων όπως οι πολυφαινόλες και τα φυτικά οξέα. Η ζύμωση, είτε αυτούσια είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων όπως το μαγείρεμα, το μούλιασμα και τη βλάστηση, αποτελεί αποτελεσματική τεχνική για την ελάττωση και απομάκρυνση αντιδιατροφικών ουσιών έως και αλλεργιογόνων και τοξινών από τα τρόφιμα βελτιώνοντας την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών. Μια ποικιλία μικροοργανισμών διαθέτουν την ικανότητα σύνθεσης φυτασών που αποικοδομούν τα φυτικά οξέα απελευθερώνοντας τα ιόντα από το σύμπλοκο του φυτικού και αυξάνοντας τα επίπεδα μετάλλων όπως ασβέστιο, σίδηρο και ψευδάργυρο, κάλιο, νάτριο κ.ά., τα οποία προσλαμβάνονται αυστηρά με τη διατροφή και είναι απαραίτητα για μεταβολικές διαδικασίες του ανθρώπινου οργανισμού (Samtiya et al., 2021).

Ζυμωμένα κρέατα, κρεατοσκευάσματα (ζυμούμενα λουκάνικα) και όσπρια βρέθηκαν πλούσια σε σίδηρο (αύξηση μέχρι και 127 – 250% σε όσπρια) με ενισχυμένη βιοδιαθεσιμότητα λόγω μετατροπής στην πιο απορροφήσιμη μορφή του (Fe^{3+}), αποτελώντας, έτσι, κατάλληλα τρόφιμα για την αντιμετώπιση της αναιμίας. Σε γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως ώριμα τυριά και γιαούρτη, βρέθηκαν σε αφθονία κυρίως ασβέστιο, κάλιο,

φώσφορος και ψευδάργυρος ενώ σε λαχανικά όπως το kimchi και το ξινολάχανο βρέθηκε μεγάλη ποσότητα βιοδιαθέσιμου σιδήρου (Xiang et al., 2019).

Τα αλκαλοειδή αποτελούν φυσικές ενώσεις με βασικά άτομα αζώτου και χαρακτηριστική πικρή γεύση και ποίκιλες βιολογικές λειτουργίες. Μπορούν να παραχθούν από ευρύ φάσμα οργανισμών όπως φυτά και ζώα ενώ αυξανόμενο ενδιαφέρον υπάρχει για τον σχηματισμό τους από μικροβιακά κύτταρα. Οι τεχνολογίες της ζύμωσης, κυρίως SSF με την συνδυασμένη χρήση κατάλληλων στελεχών όπως η *Escherichia coli*, *Trichoderma harzianum* και *Claviceps fusiformis* επιτρέπουν την παραγωγή σε ικανοποιητικές ποσότητες αλκαλοειδών με χαμηλότερο κόστος και χρόνο από την απομόνωση τους από άλλους οργανισμούς (Xiang et al., 2019).

1.1.3.2.7 Ενώσεις οσμής και γεύσης

Τα ζυμωμένα προϊόντα χαρακτηρίζονται από μοναδικές οργανοληπτικές ιδιότητες λόγω της παραγωγής και συσσώρευσης πτητικών και μη πτητικών ενεργών ενώσεων όπως αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, πτητικά λιπαρά οξέα, οργανικά οξέα, αμίνες κ.ά. Οι μικροοργανισμοί που εισάγονται ως εκκινητές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το γευστικό και αρωματικό προφίλ του τροφίμου (Xiang et al., 2019). Οι οσμές, η γεύση και η υφή που προκύπτουν εξαρτώνται από το υπόστρωμα, τα μικροβιακά στελέχη και από εγγενείς και εξωγενείς παράγοντες (pH, θερμοκρασία και συγκεντρώσεις πρόσθετων) (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

Οι ζυμώσεις με οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών ξινών γεύσεων των γαλακτοκομικών προϊόντων μέσω του σχηματισμού γαλακτικού οξέος. Η μείωση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών γάλακτος σε συνδυασμό με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τα LAB έχουν ως αποτέλεσμα την πήξη των πρωτεϊνών και έτσι την τυπική υφή των γαλακτοκομικών. Σε τυριά η μεσολάβηση των LAB δημιουργεί τις μοναδικές γεύσεις των τυριών από τον σχηματισμό αμινοξέων με κυριότερο το γλουταμινικό οξύ μέσω πρωτεόλυσης και λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (π.χ. βουτυρικό οξύ) μέσω λιπόλυσης. Πρόσθετες καλλιέργειες δημιουργούν ακόμα πιο ιδιαίτερα γευστικά προφίλ γεύσης όπως η γεύση του μπλε τυριού (blue cheese) που οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση μεθυλοκετονών που προκύπτουν από τον μεταβολισμό των λιπαρών

οξέων με την δράση του *Penicillium roqueforti* κατά την ωρίμανση (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

Οι ζύμες και μύκητες παράγουν μεγάλη ποικιλία ενώσεων γεύσης και αρώματος με μεγάλη επίδραση στα πιο κοινά τρόφιμα (Xiang et al., 2019). Οι μεταβολίτες που παράγονται κατά την παρασκευή του ψωμιού συμβάλλουν στην χαρακτηριστική γεύση και άρωμα του και περιλαμβάνουν αιθανόλη, αλκοόλες και αλδεΐδες διακλαδισμένης αλυσίδας και εστέρες ενώ το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται παγιδεύεται στη δομή της ιξωδοελαστικής γλουτένης με αποτέλεσμα την πορώδη δομή του ψωμιού (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

1.1.4 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση

1.1.4.1 Βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB)

Οι περισσότερες διεργασίες ζυμώσεων περιλαμβάνουν την προσθήκη καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για ένα ευρύ φάσμα μικροβιακών μεταβολικών μετατροπών που εντοπίζονται στα πιο κοινά ζυμούμενα τρόφιμα (γιαούρτι, τυρί, λουκάνικα, ξινολάχανο κ.ά.) (Ross et al., 2002). Η βασική λειτουργία τους είναι ο σχηματισμός γαλακτικού οξέος ως κύριος μεταβολίτης κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων του υποστρώματος – τροφίμου. Είναι θετικά κατά Gram, με σχήμα ραβδίου ή κόκκου, μη σπορογόνα, αρνητικά στην καταλάση και με υψηλή ανεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH βακτήρια με ποικίλες χαρακτηριστικές βιολογικές λειτουργίες όταν προστεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα (Wang et al., 2021).

Με βάση τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και τα προϊόντα που προκύπτουν διακρίνονται σε ομοζυμωτικά (γένη *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) τα οποία μετατρέπουν εξόζες (γλυκόζη) και πεντόζες αποκλειστικά σε γαλακτικό οξύ (1 mol γλυκόζης προς 2 mol γαλακτικού οξέος) χρησιμοποιώντας τις μεταβολικές οδούς Embden – Meyhof – Parnas και φωσφορικής πεντόζης, και σε ετεροζυμωτικά (γένη *Leuconostoc*, *Weissella* και μερικά *lactobacilli*) που μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, διοξειδίου του άνθρακα, αιθανόλης και, σπάνια, οξικού οξέος σύμφωνα με τις μεταβολικές οδούς μονοφωσφορικής εξόζης ή πεντόζης με αποτέλεσμα την παραγωγή μισής

ποσότητας ενέργειας από τα ομοζυμωτικά (Ross et al., 2002; Shiferaw Terefe & Augustin, 2020).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από την αποικοδόμηση και την μετατροπή των μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, σε απλά και εύπεπτα μόρια, με την μεσολάβηση των κατάλληλων εκκινητών. Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες αποτελούν, μαζί με τις καλλιέργειες ζυμών, τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους εκκινητές ζύμωσης για τον σκοπό αυτό, διασπώντας τα πολύπλοκα σάκχαρα και πεπτιδικά μόρια με μεγαλύτερη δράση, ωστόσο, στα γαλακτοκομικά παρά σε φυτικές πηγές τροφίμων, που οφείλεται αποκλειστικά στο πλούσιο υπόστρωμα του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες με τα κατάλληλα ένζυμα πρωτεόλυσης των βακτηρίων μετατρέπονται σε πεπτίδια και αμινοξέα οδηγώντας σε βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα, γεγονός που δικαιολογεί τις αυξανόμενες συστάσεις για την κατανάλωση ζυμωμένων τροφίμων, ιδιαίτερα φυτικής προέλευσης. Ο σπουδαιότερος, ωστόσο, ρόλος των οξυγαλακτικών θεωρείται ο εμπλουτισμός και η σύνθεση θρεπτικών ενώσεων και ουσιών που διαμορφώνουν τις αισθητηριακές ιδιότητες του τελικού τροφίμου όπως οξέα, βιταμίνες, πεπτίδια κ.ά. ενώ οι χαρακτηριστικότερες λειτουργίες της κατηγορίας είναι ο σχηματισμός των βακτηριοσινών, εξωπολυσακχαριτών και ικανοποιητικών ποσοτήτων GABA τα οποία τα διαφοροποιούν από άλλους ζυμωτικούς οργανισμούς (Dhakal et al., 2012; Wang et al., 2021).

Εκτός των επιθυμητών οργανοληπτικών και θρεπτικών αποτελεσμάτων στα τρόφιμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν μια σειρά αντιμικροβιακών μεταβολιτών κατά τη διαδικασία της ζύμωσης που δικαιολογεί την συντηρητική δράση τους. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η αιθανόλη, τα οργανικά οξέα που σχηματίζονται (γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ) παρέχοντας ένα δυσμενές όξινο περιβάλλον για την ανάπτυξη επιβλαβών για την υγεία και τα τρόφιμα μικροοργανισμών και οι ποσότητες διακετυλίου (λόγω της περίσσειας πυροσταφυλικού) και υπεροξειδίου υδρογόνου (H_2O_2) με ισχυρή οξειδωτική δράση στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (Ross et al., 2002). Ωστόσο, αυτό που έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες είναι ο σχηματισμός των βακτηριοσινών από τα LAB.

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν πρωτεϊνικούς αναστολείς που δρουν μέσω της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης στόχου ή της αναστολής της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος.

Θεωρούνται ως βιοσυντηρητικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό για την προστασία των τροφίμων από αλλοιώσεις και τον μικροβιακό πολλαπλασιασμό. Η νισίνη αποτελεί την πιο γνωστή και εμπορική βακτηριοσίνη η οποία παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις από τον *Lactococcus lactis* (Ross et al., 2002; Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Είναι αποτελεσματική σε ναοσυγκεντρώσεις επιμηκύνοντας τη διάρκεια ζωής ενός ευρύτερου φάσματος γαλακτοκομικών προϊόντων, αλκοολούχων ποτών και ορισμένων λαχανικών. Άλλες βακτηριοσίνες που εμφανίζονται συχνά σε τρόφιμα μετά την μεσολάβηση οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι οι ενώσεις Reuterin και Reuterocycline που παράγονται από τον *Lactobacillus reuteri* για τις οποίες δεν υπάρχει επαρκής έρευνα ακόμα, η λακτικίνη 3147 (από *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147 σε κεφίρ), εντερολυσίνη (από *Enterococcus faecium*), η Helvetin J (από *Lactobacillus helveticus*) κ.ά. (Ross et al., 2002).

Τα πιο κοινά προϊόντα όπου εφαρμόζεται η γαλακτική ζύμωση περιλαμβάνουν γαλακτοκομικά προϊόντα, κρεατοσκευάσματα και ζυμούμενα λαχανικά. Καλλιέργειες *Lactococcus* spp. (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* κ.ά) προστίθενται ως εκκινητές στις πλείστες βιομηχανίες τυριών συχνά κατά την παραγωγή Cheddar, Gouda και μαλακών τυριών όπως Mozzarella, Brie και Camembert σε συνδυασμό με άλλες καλλιέργειες ενώ εισάγονται και κατά την παραδοσιακή και βιομηχανική παραγωγή ζυμωμένων λαχανικών (*L. lactis* στην παρασκευή ξινολάχανου) και κεφίρ. Η παρασκευή γιαούρτης εδώ και πολλές δεκαετίες περιλαμβάνει την χρήση *Streptococcus salivarius thermophilus* ως βασική καλλιέργεια προσδίδοντας τα επιθυμητά αποτελέσματα υφής και γεύσης στο τελικό προϊόν.

Τα *Lactobacillus* spp. αποτελούν τα πιο διαδεδομένα στη βιομηχανία τροφίμων είδη βακτηρίων λόγω της μεγαλύτερης διαθεσιμότητάς τους στην αγορά και τις συνθήκες που αναπτύσσονται (περισσότερο οξυάντοχα από άλλα LAB). Στο γένος περιλαμβάνονται τουλάχιστον 25 είδη, με βασικότερα τα *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. casei* κ.ά., η πλειοψηφία των οποίων χρησιμοποιείται στη βιομηχανία γαλακτοκομικών (τυριά, γιαούρτι, κεφίρ). Ο *Lactobacillus plantarum* προτιμάται σε ζυμώσεις λαχανικών συμπεριλαμβανομένων των ζυμώσεων ξινολάχανου, πικλών, ελιών, kimchi και την παρασκευή ψωμιού με προζύμι, ζυμώνοντας βέλτιστα τα φυτικά υποστρώματα σε σύγκριση με άλλα είδη. Καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων συχνά εισάγονται και για την

παραγωγή παραδοσιακών αλκοολούχων ποτών (μπύρα, κρασί) (Ross et al., 2002; Wang et al., 2021).

1.1.4.2 Ζύμες (Yeast)

Οι ζυμομύκητες ή ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί και ετερότροφοι μύκητες που εντοπίζονται συχνά στο περιβάλλον όπως το νερό, το έδαφος, τον αέρα και σε επιφάνειες φυτών και καρπών. Στη φύση, μπορούν να πραγματοποιήσουν τον μεταβολισμό τους αν το υπόστρωμα που ζυμώνουν διαθέτει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, επεμβαίνοντας άμεσα στην αποσύνθεση των ώριμων καρπών (Maicas, 2020). Η σχέση μεταξύ ζυμών και ζύμωσης χρονολογείται από τη Προϊστορία όπου οι ζύμες του περιβάλλοντος εκτελούσαν αυθόρμητα ζύμωση των καρπών που φυλάσσονταν ενώ η χρήση τους στην παραγωγή ποτών αποτελεί επίτευγμα που πρωτοεμφανίστηκε επίσης στο μακρινό παρελθόν (7000 π.Χ.), χωρίς να ήταν σαφώς γνωστή η επιστήμη πίσω από αυτές .

Σε επίπεδο ανάπτυξης, δεν θεωρούνται ιδιαίτερα απαιτητικές διατροφικά, σε σύγκριση με άλλες ομάδες μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, αλλά η ανάπτυξη τους υποστηρίζεται από την ύπαρξη βασικών ενώσεων, συγκεκριμένα ζυμώσιμα σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες, μέταλλα και συνήθως οξυγόνο. Μορφολογικά χαρακτηρίζονται από διαφοροποιήσεις στο σχήμα και το μέγεθος με τα στρογγυλά, ελλειψοειδή και οβάλ σχήματα να είναι συνηθέστερα (Maicas, 2020). Το μέγεθος του κυττάρου μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 2 - 50 μm σε μήκος και με διάμετρο από 1 – 10 μm . Τα κύτταρα ζύμης διαθέτουν την ικανότητα αναπαραγωγής τόσο σεξουαλικά όσο και ασεξουαλικά (Tofalo & Suzzi, 2015). Οι πιο κοινοί τύποι αναπαραγωγής των περισσότερων ζυμών θεωρούνται η εκβλάστηση και η διχοτόμηση (ασεξουαλική αναπαραγωγή) κατά την οποία προκύπτει ένα νέο και γενετικά πανομοιότυπο κύτταρο. Εξαιρέση αποτελεί η κυτταρική σχάση που αποτελεί χαρακτηριστικό του γένους *Schizosaccharomyces* (Maicas, 2020).

Κατά την έκθεση τους σε αντίξοες συνθήκες ανάπτυξης, όπως η απουσία αμινοξέων ή σακχάρων στο υπόστρωμα (περίπτωση λιμοκτονίας του κυττάρου) ή διακυμάνσεις στις συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασίας και pH), ορισμένες ζύμες (συμπεριλαμβανομένων *Saccharomyces* spp.) καταφεύγουν στην σπορογένεση για την επιβίωση τους. Παρά την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης τους, τα κύτταρα

υποφέρουν από γενετική μεταβλητότητα, λόγω της τροποποίησης των γενετικών χαρακτηριστικών τους για την προσαρμογή τους στις νέες συνθήκες (Maicas, 2020). Παρόμοιο φαινόμενο συμβαίνει και κατά την σεξουαλική αναπαραγωγή, για αυτόν τον λόγο συνιστάται η σεξουαλική αναπαραγωγή κατά τις ζυμωτικές διεργασίες για να διασφαλιστεί η διατήρηση των γονοτύπων των κυττάρων και η σταθερότητα της ζύμωσης.

Σε μεταβολικό επίπεδο, διαθέτουν την μέγιστη ικανότητα ζύμωσης ποικιλίας σακχάρων, που υπάρχουν τόσο σε ώριμους καρπούς φρούτων όσο και σε επεξεργασμένα δημητριακά, προς σχηματισμό ουσιών που δημιουργούν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά οργανοληπτικά προφίλ (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Αποτελούν τους κυριότερους μικροοργανισμούς που ευθύνονται για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και ψωμιού. Κατά την ζύμωση με στελέχη ζυμομυκήτων από την διάσπαση του πυροσταφυλικού οξέος σχηματίζεται ακεταλδεΐδη, με την επίδραση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (PDC), και στη συνέχεια μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, τα οποία αποτελούν και τα βασικά μεταβολικά προϊόντα με την επίδραση του κατάλληλου ενζύμου (ADH). Ως δευτερεύοντα προϊόντα μπορούν να παραχθούν οξικό οξύ από την περαιτέρω επίδραση της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH) στην αιθανόλη, ενώ από τον μεταβολισμό των αμινοξέων μπορούν να προκύψουν δικετόνες (όπως το διακετύλιο που προσδίδει άρωμα στις μπίρες), άλλες αλκοόλες ευθείας ή διακλαδισμένης αλυσίδας (Ehrlich μεταβολική πορεία), εστέρες και θειούχες ενώσεις. Ιδιαίτερης σημασίας είναι και η μετατροπή των πολυφαινολών σε απλούστερες και λιγότερο τοξικές φαινολικές ενώσεις με υψηλή αντιοξειδωτική δράση από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Dzialo et al., 2017). Εκτός των θετικών οφελών τους στην βιομηχανία τροφίμων, ορισμένες ζύμες (κυρίως non – *Saccharomyces*) προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα ενώ υπάρχει και η πιθανότητα παθογόνου δράσης (λοιμώξεων) ή αλλεργικών αντιδράσεων (Tofalo & Suzzi, 2015).

Οι ζύμες προς βιομηχανική χρήση συχνά διακρίνονται σε *Saccharomyces* και non – *Saccharomyces* όπου τα πρώτα θεωρούνται τα πιο μελετημένα και πιο χρησιμοποιούμενα είδη στις ζυμώσεις κρασιού, μύρας και ψωμιού λόγω της βέλτιστης ικανότητας ζύμωσης, της ταχείας ανάπτυξης και της ευελιξίας τους σε διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών (Maicas, 2020). Στις non – *Saccharomyces* ζύμες περιλαμβάνονται είδη κυρίως του γένους *Candida* συμπεριλαμβανομένων των *Candida milleri* για την παραγωγή ψωμιού με ξινή ζύμη, *Candida versatilis* για την παρασκευή σάλτσας σόγιας και άλλα στελέχη όπως ο *Debaryomyces*

hansenii που προστίθεται κατά τη ζύμωση του κεφίρ (Shiferaw Terefe & Augustin, 2020). Συμπεριλαμβάνονται άλλα χαρακτηριστικά γένη όπως *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Lachancea* και *Kluyveromyces*.

Η πλειοψηφία των ζυμών θεωρούνται μολυσματικές και παθογόνες για τον άνθρωπο, επομένως απαιτείται ο έλεγχος και η διατήρηση τους σε χαμηλά επιθυμητά επίπεδα και τέλος η εξάλειψη τους στα τελικά στάδια της παραγωγής (π.χ. παστερίωση του μούστου, προσθήκη θειωδών, απολύμανση εξοπλισμού). Χρησιμοποιούνται σε έναν μεγάλο αριθμό ζυμωτικών διεργασιών καθώς χαρακτηρίζονται από μεταβολικές διαφορές λόγω της σύνθεσης διαφορετικών τελικών προϊόντων που απουσιάζουν στις επεξεργασίες αποκλειστικά με *Saccharomyces* ζύμες όπως η παραγωγή εστέρων, ανώτερων αλκοολών, τερπένια και λιπαρών οξέων. Για αυτόν τον λόγο προστίθενται μικτές και διαδοχικές καλλιέργειες με *Saccharomyces cerevisiae* ως εκκινήτες για βελτίωση του αισθητηριακού προφίλ των οίνων. Η αυξημένη συγκέντρωση της αιθανόλης (> 4 - 5% v/v) σε συνδυασμό με την εξάντληση του διαλυμένου στο υπόστρωμα οξυγόνου αναστέλλει την ανάπτυξη των ζυμών και την ζύμωση ολοκληρώνουν οι πιο ανθεκτικές *Saccharomyces* ζύμες (Maicas, 2020).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται το πολυτιμότερο εργαλείο της Βιοτεχνολογίας και των βιομηχανιών τροφίμων για την παραγωγή τεράστιας ποικιλίας ζυμούμενων τροφίμων, ποτών και βιοκαυσίμων. Ένας λόγος για την ευρύτερη χρήση του είναι ο τρόπος ζωής του που περιλαμβάνει την στρατηγική του «φτιάχνω-συσσωρεύω-καταναλώνω» («make-accumulate-consume») που βασίζεται στο φαινόμενο του Crabtree που συνιστάται στο γεγονός ότι ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, το είδος έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί και να μεταβολίσει τα σάκχαρα προς σχηματισμό και συσσώρευση αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (αλκοολική ζύμωση), χωρίς να χρησιμοποιήσει τον αερόβιο μηχανισμό (Parapouli et al., 2020). Συνέπεια του φαινομένου είναι η εξάλειψη του ανταγωνισμού με άλλα μικροβιακά είδη λόγω της τοξικότητας της αιθανόλης. Χαρακτηρίζεται από ανοχή σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και θειούχων ενώσεων, όπου τα πλείστα non – *Saccharomyces* στελέχη δεν επιβιώνουν, και την παραγωγή πληθώρας προϊόντων, αρωματικών και μη (Maicas, 2020; Parapouli et al., 2020).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί βασικός μικροοργανισμός για την παρασκευή μεγάλου αριθμού αλκοολούχων ποτών παγκοσμίως, με κυριότερη δράση στην οινοποιία, τη ζυθοποιία

και τη παρασκευή μηλίτη αλλά και σε αποστάγματα όπως ρούμι, βότκα, ουίσκι, σάκε, κονιάκ και λικέρ από την ζύμωση φρούτων, μελιού ή τσαγιού (Paprouli et al., 2020). Η ζύμωση πραγματοποιείται είτε αυθόρμητα από φυσικά περιβαλλοντικά στελέχη του είδους, λόγω της παρουσίας τους στις πρώτες ύλες, είτε με τον εμβολιασμό στο υπόστρωμα μικρής ποσότητας καλλιέργειας. Εκτός των αλκοολικών ζυμώσεων, σημαντική είναι και η συμβολή του στην ζύμωση του ψωμιού επηρεάζοντας την τελική εμφάνιση του, τον όγκο, την υφή και την γεύση του, γεγονός που οφείλεται στο διοξείδιο του άνθρακα και των ουσιών γεύσης και οσμής που συσσωρεύονται. Επιπρόσθετα, σε ζυμώσεις σε καφέ και σοκολάτα, στη φάση μετά τη συγκομιδή, προστίθεται καλλιέργεια ζυμών στους σπόρους για την μετατροπή της πικρής και στυφής γεύσης τους σε πιο γλυκιές και καραμελώδεις, με την ενζυματική διάσπαση των πολυφαινολών, των αμινοξέων και των υδατανθράκων, αυξάνοντας ταυτόχρονα την οξύτητα και προσδίδοντας τα χαρακτηριστικά αρώματα τους (Maicas, 2020).

1.1.4.3 Μύκητες

Οι μύκητες ή μούχλες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Θεωρούνται ωσμοετερότροφοι οργανισμοί, απορροφώντας διαλυμένες ουσίες μέσω της κυτταρικής επιφάνειας, και ο τρόπος ζωής τους είναι είτε σαπροφυτικός είτε παρασιτικός ή συνδυαστικός σε ζώα και φυτά (Raghukumar, 2017). Στη φύση υπάρχουν διάφορα είδη μυκήτων συμπεριλαμβανομένων ζύμες (ή ζυμομύκητες), μανιτάρια και νηματοειδείς μύκητες με διαφορές τόσο στην δομή όσο και τους χρόνους και τα πρότυπα ανάπτυξης. Χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που τα διαφοροποιεί από τα βακτήρια είναι η ευκαρυωτική φύση τους, η παρουσία χιτίνης, χιτοζάνης, μαννάνης και άλλων πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα και ο σχηματισμός διακλαδώσεων ή νηματίων που ονομάζονται υφές, το σύνολο των οποίων δημιουργεί το λεγόμενο μυκήλιο, εξού και το όνομα «νηματοειδείς μύκητες» (Iram et al., 2022; Raghukumar, 2017).

Τα μυκήλια στους περισσότερους μύκητες, κυρίως στους Ασκομύκητες, φέρουν διαφράγματα σε αποστάσεις (πολυκύτταρο μυκήλιο) σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες μυκήτων που περιλαμβάνουν μονοκύτταρο μυκήλιο. Άλλοι μύκητες σχηματίζουν σκληρώτια (στενά συνδεδεμένα μυκήλια) τα οποία υπό δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης μετατρέπονται σε απλούστερα μυκήλια (Kotzekidou, 2016). Κατά την ανάπτυξη των μυκήτων δημιουργούνται

φαινόμενα σπαργής υποβοηθώντας τις υφές να διεισδύσουν με μεγαλύτερη ευκολία στα στερεά υποστρώματα με αποτέλεσμα την εξάπλωση - προέκτασή τους, αντλώντας την απαραίτητη τροφή από το υπόστρωμα. Η ικανότητα διείσδυσης διαφοροποιεί τους μύκητες από το μονοκύτταρα βακτήρια και ζύμες, τα οποία αναπτύσσονται ως επί το πλείστον στην επιφάνεια των στερεών σωμάτων ή σε αιώρηση στα υδατικά μέσα (Raghukumar, 2017).

Οι νηματοειδείς μύκητες αναπαράγονται και διασκορπίζονται στα υποστρώματα παράγοντας σπόρια είτε σεξουαλικά (εγγενή) είτε ασεξουαλικά (αγενή). Ανάλογα με το είδος και την μορφή των σπόρων και τη μορφολογία των κυττάρων, οι μύκητες διακρίνονται σε φυλές (Phyla) και περαιτέρω σε τάξεις και οικογένειες που περιλαμβάνουν τα χαρακτηριστικά γένη της κάθε κατηγορίας. Στην βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 9 φυλές μυκήτων από το Βασίλειο των Μυκήτων (Mycetae Kingdom) ενώ ταυτοποιήθηκαν τουλάχιστον 85000 είδη. Οι κύριες φυλές που περιέχονται στα τρόφιμα περιλαμβάνουν τους Ασκομύκητες που χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό εγγενών σπορίων σε ασκούς (ασκοσπόρια) (γένη *Byssochlamys*, *Eurpenicillium*, *Emericella* κ.ά), τους Ζυγομύκητες που αναπαραγονται με εγγενή σφαιρικά μαύρα σπόρια (ζυγοσπόρια) ή αγενή σπόρια σε σποριαγγεία (σποριαγγειοσπόρια) (γένη *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*), τους Βασιδιομύκητες με εγγενή βασίδια (*Cryptococcus* spp., μανιτάρια) και τους Δευτερομύκητες ή ατελείς μύκητες (fungi imperfectii) με κονίδια (γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Candida* κ.ά) (Kotzekidou, 2016) (Raghukumar, 2017).

Οι περισσότεροι μύκητες θεωρούνται αλλοιογόνοι για μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων ενώ είναι και παθογόνοι για τον άνθρωπο προκαλώντας τροφιμογενείς λοιμώξεις μέσω της παραγωγής μυκοτοξινών στις πρώτες ύλες κατά την αποθήκευση ή και κατά τις διαδικασίες μεταποίησης των τροφίμων. Ανάμεσα στα βασικότερους τοξιγενείς μύκητες συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* και ορισμένα είδη *Alternaria* και *Claviceps* που υπάρχουν σε αφθονία στη φύση και παράγουν την πλειονότητα των τοξινών (Gurban et al., 2017; Perrone et al., 2020). Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι αφλατοξίνες (AF's), ωχρατοξίνες (OT's), ζεαραλενόνη (ZEN), φουμονισίνες (FB), δεοξυνιβαλενόλη (DON) και σε μικρότερο βαθμό στεριγματοκυστίνη (STC), πατουλίνη και CPA (Flores-Flores et al., 2015).

Τα *Aspergillus* spp. με κυριότερα τα είδη *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* αποτελούν τους βασικότερους παραγωγούς αφλατοξινών (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) με την AFB1 και το παράγωγο της, AFM1, να εμφανίζονται συχνότερα

στα τρόφιμα και χαρακτηρίζονται από μεγάλη τοξική και καρκινογόνο δράση για τα ζώα και τον άνθρωπο, ενώ ορισμένα *Aspergillus* spp. είναι υπεύθυνα και για τον σχηματισμό ποσοτήτων στεριγματοκυστίνης (*Asp. versicolor*), πατουλίνης (*Asp. clavatus*) και κυκλοπιαζονικού οξέος (*Asp. flavus*) (CPA) (Montville & Matthews, 2017). Η παρουσία της ωχρατοξίνης A (από *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* κ.ά) είναι επίσης συχνή στα προϊόντα διατροφής και χαρακτηρίζεται από τοξικότητα και θερμοανθεκτικότητα. Τα *Fusarium* spp. συμμετέχουν στην παράγωγή μιας ομάδας μυκοτοξινών που επιμολύνουν τα δημητριακά και το καλαμπόκι, και περιλαμβάνονται ενώσεις όπως οι φουμονισίνες FB1 και FB2, τριχοθεσίνες και ζεαραλενόνη κυρίως από *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. equiseti* κ.ά. Τα *Penicillium* spp. συνήθως δρουν συνεργιστικά με τα *Aspergillus* spp. για τον σχηματισμό ωχρατοξινών, πατουλίνης και CPA από είδη όπως *P. verrucosum*, *P. expansum*, *P. patulum*, *P. camemberti* κ.ά) (Flores-Flores et al., 2015).

Παρά την τοξική δράση τους, ορισμένα είδη και στελέχη μυκήτων θεωρούνται ασφαλή για χρήση και κατανάλωση (GRAS) από τον FDA ενώ αρκετά χρησιμοποιούνται σε διεργασίες ζύμωσης τις τελευταίες δεκαετίες όπως στην παρασκευή ψωμιού, τυριών, σαλτσών, αλκοολούχων ποτών, φαρμακευτικών προϊόντων, προσθέτων τροφίμων, στερολών, οργανικών οξέων, ενζύμων κ.ά (de Carvalho, 2016; Iram et al., 2022). Λόγω της ξηρόφιλης συμπεριφοράς τους, προστίθενται κυρίως σε ζυμώσεις στερεάς φάσης (solid state fermentation), ωστόσο χρησιμοποιούνται για την παρασκευή υγρών προϊόντων και ποτών (Iram et al., 2022). Διαθέτουν την ικανότητα αποικοδόμησης βιοπολυμερών μέσω εξωκυτταρικής ενζυμικής διάσπασης – υδρόλυσης, παράγοντας και συσσωρεύοντας βιοδιαθέσιμα και βιοενεργά μονομερή τα οποία διασκορπίζονται στο υπόστρωμα ενώ απορροφώνται και από τα ίδια τα κύτταρα για τις μεταβολικές τους λειτουργίες. Οι ενδο- και εξωκυτταρικές μεταβολικές πορείες οδηγούν στο σχηματισμό εμπορικά πολύτιμων ουσιών όπως οργανικά οξέα (κιτρικό, οξικό οξύ), αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή), μυκητιακές χρωστικές, ένζυμα και αρωματικές ενώσεις (π.χ. αρωματικά πολυκετίδια). Ένα προτέρημα της χρήσης μυκήτων και ζυμών στις ζυμωτικές διεργασίες αντί για βακτήρια είναι η ευκαρυωτική φύση τους με αποτέλεσμα την κωδικοποίηση περιπλοκότερων και βιοενεργότερων ενζύμων και πρωτεϊνών με τις κατάλληλες αναδιπλώσεις και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (Chai et al., 2022).

Είδη *Aspergillus* όπως τα *Aspergillus niger* και *Aspergillus oryzae* είναι οι πιο διαδεδομένοι και πολύτιμοι ζυμωτικοί μύκητες που χρησιμοποιούνται σε ποικιλία βιοτεχνολογικών

εφαρμογών. Η χρήση του *Asp. oryzae*, σε ζυμώσεις εφαρμόζεται μάλιστα από το μακρινό παρελθόν, ιδιαίτερα στην παραγωγή σάλτσας σόγιας στην Ανατολική Ασία. Αναφέρεται συχνά ως koji λόγω της παραγωγής κοζικού οξέος (kojic acid) με πολλές εφαρμογές στην φαρμακοβιομηχανία και στα καλλυντικά ως λευκαντικός παράγοντας ενώ είναι ο μικροοργανισμός «κλειδί» για την παραγωγή του ρυζιού koji, προϊόντων σόγιας (σάλτσα σόγιας, miso, douche), ξυδιού και sake (σε συνδυασμό με *Saccharomyces cerevisiae*) χάρη στην ισχυρή ικανότητα του να παράγει αμυλάσες και πρωτεάσες και να διασπά τα σάκχαρα και τις πρωτεΐνες προς τα απλούστερα μονομερή (Chai et al., 2022; Daba et al., 2021). Τα ένζυμα που παράγει βελτιώνουν την διαδικασία της πέψης απλοποιώντας την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. Ανάλογα με τις συνθήκες της καλλιέργειας, ο συνθέτει διάφορους δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τερπενοειδή, κουμαρίνες, οξυλιπίνες και λιπαρά οξέα και ενώσεις με αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιυπερτασικές και αντι-υικές δράσεις (Daba et al., 2021).

Σημαντικό επίτευγμα αποτελεί η παραγωγή και η ανάκτηση ενζύμων του *Asp. oryzae* κατά τη ζύμωση με ποικίλες βιοτεχνολογικές και βιομηχανικές εφαρμογές για πολλούς λόγους όπως το χαμηλό κόστος, η μειωμένη τοξικότητα, η φιλικότητα προς το περιβάλλον, οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και ενισχυμένες ποιότητες και αποδόσεις. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από την υψηλή παραγωγή πρωτεασών (προλυλική ενδοπεπτιδάση), βελτιώνοντας την διάσπαση και πέψη των περίπλοκων φυτικών πρωτεϊνών, αμυλάσων (α – αμυλάσες, β – αμυλάσες, γλυκοαμυλάσες) κατά την ζύμωση δημητριακών, λιπάσες με εφαρμογές σε απορρυπαντικά, καλλυντικά, την ιατρική και σε τρόφιμα για την ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης των τυριών και των γαλακτοκομικών, ενώ διαθέτουν και την ικανότητα παραγωγής κυτταρινασών, πηκτινισών, φυτάσης, β – γαλακτοσιδάσης και πολυγαλακτουρονάσης κατά τον μεταβολισμό του (Daba et al., 2021; Iram et al., 2022).

Άλλα είδη μυκήτων χρησιμοποιούνται επίσης αποτελεσματικά στις ζυμωτικές διεργασίες. Το *Trichoderma reesei* εφαρμόζεται συχνά στην παραγωγή ενζύμων και στα βιοδιυλιστήρια και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων λόγω της υψηλής παραγωγής ημικυτταρινάσης και κυτταρινάσης (Chai et al., 2022). Τα *Fusarium* spp. εφαρμόζονται στην παρασκευή εμπορικών μυκοπρωτεϊνών με τις ονομασίες Quorn (*Fusarium venetatum*) και Nature's Fynd (*Fusarium flavolapis*) που καταναλώνονται ως υποκατάστατα των ζωικών πρωτεϊνών, ενώ ο *Fusarium oxysporum* θεωρείται ένας από τους λιγιστούς μύκητες που κατέχει την ικανότητα εκτέλεσης αλκοολικής ζύμωσης αποικοδομώντας λιγνοκυτταρίνη κ.ά. σάκχαρα (Anasontzis et al., 2016;

Chai et al., 2022; de Carvalho, 2016). Καροτενοειδή συντίθενται από μια πλειοψηφία GRAS και μη μυκήτων όπως τα είδη *Blakeslea trispora* (β – καροτένιο, λυκοπένιο) και *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ασταξανθίνη). Άλλα μυκητιακά προϊόντα περιλαμβάνουν βιταμίνες (π.χ. ριβοφλαβίνη από *Eremothecium gossypii*), χρωστικές (Arpink red™ από *Penicillium oxalicum*), σάκχαρα και λιπίδια υψηλής βιολογικής και λειτουργικής αξίας (Chai et al., 2022).

1.2 Πρωτεΐνες

1.2.1 Γενικά

Βασικό στοιχείο κάθε ισορροπημένης διατροφής είναι η κατανάλωση επαρκούς ποσότητας πρωτεϊνών. Τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών ονομάζονται αμινοξέα. Υπάρχουν 20 διαφορετικά αμινοξέα, τα οποία χωρίζονται σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Τα πρώτα, λαμβάνονται αποκλειστικά από τη διατροφή, ενώ τα δεύτερα μπορούν να συντεθούν φυσικά από τον οργανισμό. Μια πηγή πρωτεΐνης διαφέρει διατροφικά ανάλογα με την πεπτικότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα, την καθαρότητα, το αμινικό προφίλ, τους αντιδιατροφικούς παράγοντες που περιέχονται στο τρόφιμο αλλά και τη διαδικασία επεξεργασίας (Clemente, 1998; Han, 2015; Mattila P, 2018; Pires, 2006; Saharan, 1994). Όσον αφορά την προέλευσή τους, οι πρωτεΐνες είναι είτε ζωικές είτε φυτικές. Στις επόμενες παραγράφους θα εξεταστεί η ανάγκη για αναθεώρηση των παγκόσμιων πρωτεϊνικών επιλογών και οι λόγοι που υπάρχει ανάγκη για αλλαγή των προτιμήσεων των καταναλωτών.

Η διατροφική ποιότητα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται κυρίως από τα απαραίτητα αμινοξέα που περιέχει, και κατά πόσο αυτά μπορούν να ανταποκριθούν στα καθιερωμένα πρότυπα (WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007), τα οποία υποδηλώνονται από τις ανάγκες του ανθρώπινου σώματος (Boye, 2012; Gilani & Lee, 2003), αλλά και από την πεπτικότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα τους.

Τα αμινοξέα περιέχουν άζωτο και αποτελούν το βασικό δομικό στοιχείο των πρωτεϊνών (Nenova, 2012) (Vendemiatti, 2008)(Nenova & Drumeva 2012, Vendemiatti et al. 2008). Κάθε αμινοξύ παρουσιάζει συγκεκριμένο ρόλο και βοηθά στη λειτουργία του οργανισμού. Μεταξύ των απαραίτητων αμινοξέων περιλαμβάνονται: ιστιδίνη (His), ισολευκίνη (Ile), λευκίνη (Leu), λυσίνη (Lys), μεθειονίνη (Met), φαινυλαλανίνη (Phe), θρεονίνη (Thr), τρυπτοφάνη (Trp) και βαλίνη (Val). Αυτά τα 9 αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν φυσικά

από τον ανθρώπινο οργανισμό και απαιτείται η πρόσληψη τους από τη διατροφή του (Gavelle et al. 2017, Han et al., 2015, Nenova & Drumeva 2012). Ο οργανισμός διαθέτει την ικανότητα σύνθεσης των μη απαραίτητων αμινοξέων, δηλαδή αλανίνη (Ala), ασπαρτικό οξύ (Asp), κυστεΐνη (Cys), γλουταμινικό οξύ (Glu), γλυκίνη (Gly), προλίνη (Pro), σερίνη (Ser) και τυροσίνη (Tyr) (Boye et al., 2012). Η απαιτούμενη ποσότητα πρόσληψης πρωτεΐνης και η αναλογία των περιεχόμενων αμινοξέων εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται με το γονότυπο και το φαινότυπο, όπως η ηλικία, το σωματικό βάρος, το φύλο, η άσκηση, ο τρόπος ζωής, η κατάσταση υγείας ή η ικανότητα μεταβολισμού (Chongtham et al., 2011; Sun-Waterhouse et al., 2014).

1.2.2 Φυτικές πρωτεΐνες

Σε ένα διαρκώς αναπτυσσόμενο κόσμο η ανάγκη για εύκολα προσβάσιμη, οικονομική και οικολογικά συμφέρουσα πρωτεΐνη είναι υψίστης σημασίας. Ωστόσο, οι ζωικές πρωτεΐνες εμφανίζουν μειονεκτήματα οικολογικής, οικονομικής και ηθικής φύσεως. Έχουν συνδεθεί με την κλιματική αλλαγή, την εξάντληση του γλυκού νερού, τη μείωση της βιοποικιλότητας και προβλήματα υγείας όπως καρδιοαναπνευστικές ασθένειες κλπ. (Alemayehu et al., 2015; Conde et al., 2005; López et al., 2018; Pojić et al., 2018; Sun-Waterhouse et al., 2014; Zhao et al., 2014).

Πολλές φυτικές πηγές πρωτεϊνών αποτελούν βιώσιμες εναλλακτικές, όπως τα όσπρια (σόγια, αρακάς, φασόλι, ρεβίθι, κουκί, φακή) (Coda et al., 2017; Lqari et al., 2002; Vasconcelos et al., 2006), δημητριακά (ρύζι, σιτάρι, κεχρί, σόργο, καλαμπόκι, κριθάρι) (López et al., 2018), ψευδοδημητριακά (αμάρανθος, κινόα και φαγόπυρο) (López et al., 2018), σπόροι (τσία, λιναρόσπορος, σουσάμι, κολοκύθας και ηλίανθος) (Conde et al., 2005; Mattila et al., 2018), αμύγδαλα και ξηρούς καρπούς (Sousa et al., 2011).

Συχνά οι φυτικές πρωτεΐνες θεωρούνται χαμηλότερης ποιότητας από τις ζωικές αν και πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι πολλές πηγές φυτικών πρωτεϊνών είναι ικανές να προσφέρουν την συνιστώμενη ημερήσια ποσότητα απαραίτητων αμινοξέων που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός (López et al., 2018; Sun-Waterhouse et al., 2014). Επίσης, διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας, όπως η θέρμανση, μπορούν να ελαττώσουν τις ενώσεις εκείνες που μειώνουν την πεπτικότητα των πρωτεϊνών. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται αντιδιατροφικοί παράγοντες και εμφανίζονται συχνά στα φυτικά προϊόντα (Boye et al., 2012; Clemente et al., 1998).

Μερικά παραδείγματα αντιδιατροφικών παραγόντων είναι οι αναστολείς πρωτεάσης, πολυφαινόλες, ίνες, αιμοσυγκολλητίνες, μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες και το φυτικό οξύ που θα μας απασχολήσει αργότερα. Αν και επιδρούν αρνητικά στην πεπτικότητα των πρωτεϊνών εμφανίζουν κάποιες πολύτιμες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση, προστασία στο καρδιοαναπνευστικό σύστημα και περιορισμό της δημιουργίας πέτρας στα νεφρά (Aider & Barbana, 2017; Rizzo & Baroni, 2018). Επίσης, η ζύμωση φαίνεται να αυξάνει την ποιότητα της πρωτεΐνης χάρη στη συγκέντρωση περιοριστικών αμινοξέων αλλά και την ελάττωση ορισμένων αντιδιατροφικών παραγόντων (Singh, 1985).

Σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *Lactobacillus plantarum* για ζύμωση αρακά φαίνεται πως παρήχθησαν πρωτεάσες που μερικώς αποικοδόμησαν την πρωτεΐνη, απελευθερώνοντας ελεύθερα αμινοξέα στη μήτρα με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο αριθμός των περιεχόμενων αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εξαιρώντας τα αμινοξέα Trp και Arg (Çabuk et al., 2018). Αντίστοιχα, σε μελέτη σε σπόρους σόγιας φαίνεται να αυξάνεται η ποσότητα όλων των αμινοξέων, με μοναδική εξαίρεση την Arg, βελτιώνοντας σημαντικά το αμινικό προφίλ και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Το φαινόμενο αυτό ίσως να οφείλεται στη δράση του μικροοργανισμού ζύμωσης ο οποίος προκαλεί υδρόλυση της πρωτεΐνης σε πεπτίδια και αμινοξέα (Ojokoh & Yimin, 2011).

1.2.3 Διατροφή και περιβάλλον

Εξετάζοντας υπό το πρίσμα της διατροφής, η υγεία του ανθρώπου και η περιβαλλοντική βιωσιμότητα είναι οι δύο πρωταρχικοί στόχοι. Έχει θεσπιστεί ένα κοινό πλαίσιο για τους δύο κλάδους με κοινό παρονομαστή την ανθρώπινη διατροφή. Συγκεκριμένα, ο στόχος είναι ένας συνδυασμός βιώσιμων συστημάτων τροφίμων που επιτρέπουν την εφαρμογή μιας υγιεινής διατροφής. Μία διατροφή που μπορεί να πετύχει και τους δύο στόχους θεωρείται άκρως πετυχημένη και η επιστημονική κοινότητα οφείλει να την ενθαρρύνει (Willett, Walter et al., 2019).

Με βάση τις τωρινές διατροφικές τάσεις και την προβλεπόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού σε ένα αριθμό κοντά στα 10 δις μέχρι το 2050, η κατάσταση θα επιδεινώσει τους κινδύνους που διατρέχει ο πλανήτης αλλά και οι άνθρωποι. Επίσης, ο αριθμός από μη μεταδιδόμενες ασθένειες ολοένα και μεγαλώνει και οι επιπτώσεις που εμφανίζει η εκτενής

παραγωγή τροφίμων, όπως οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, μόλυνση αζώτου και φωσφόρου, απώλεια βιοποικιλότητας και η εκτεταμένη χρήση γης και υδάτινων πόρων θα θέσει νέα επίπεδα κινδύνου στη σταθερότητα της λειτουργίας της γης (Willett, Walter et al., 2019).

Μια μετάβαση σε υγιεινούς τύπους διατροφής οι οποίοι βασίζονται σε βιώσιμα συστήματα τροφίμων, όπως ορίζει η συμφωνία του Παρισιού, είναι πλέον μονόδρομος. Η αλλαγή αφορά και τις συνήθειες και επιλογές των καταναλωτών, όπως για παράδειγμα την ελάττωση κατανάλωσης κόκκινου κρέατος, κρεατοπαρασκευασμάτων και ζάχαρης και, από την άλλη, την αύξηση κατανάλωσης υγιεινών τροφών, όπως λαχανικά, φρούτα, ξηρούς καρπούς και όσπρια. Οι προτεινόμενες αλλαγές ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή, και εξαρτώνται από παράγοντες όπως τις ήδη υπάρχουσες διατροφικές επιλογές και το περιβάλλον. Οι αλλαγές που θα επέλθουν προβλέπεται να μειώσουν σημαντικά τους παγκόσμιους θανάτους, δείκτης βελτίωσης της υγείας (Agreement, Paris, 2015).

Αναφορικά με τις προτεινόμενες αλλαγές στην παραγωγή τροφίμων για μεγιστοποίηση της βιωσιμότητας, απαιτείται μείωση του χάσματος απόδοσης των καλλιεργειών, παγκόσμιος περιορισμός των λιπασμάτων που περιέχουν άζωτο και φώσφορο, ανακύκλωση φωσφόρου, βελτιώσεις στην αποδοτικότητα των λιπασμάτων, εξυπνότερη χρήση του νερού, εφαρμογή κατάλληλων γεωργικών μέτρων προς περιορισμό της εκπομπής αερίων θερμοκηπίου, υιοθέτηση πρακτικών για καλύτερη διαχείριση της καλλιεργήσιμης γης μεταβάλλοντας την εξάρτηση σε πηγές άνθρακα και εστιάζοντας σε πράσινες εναλλακτικές (Steffen, Will, et al., 2015; Newbold, Tim, et al., 2016).

Μια ανθυγιεινή και περιβαλλοντικά μη βιώσιμη διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες, πλούσια σε σάκχαρα, κορεσμένα λιπαρά, επεξεργασμένα τρόφιμα και κόκκινο κρέας (Garnett, T., 2016). Πέρα από την άμεση επιδείνωση της υγείας που σχετίζεται με τα τρόφιμα που καταναλώνονται, η υγεία του ατόμου επηρεάζεται επίσης από τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που φέρουν αυτά τα τρόφιμα. Παραδείγματα αυτών είναι τα εξής: πρόωροι θάνατοι από χαμηλή ποιότητα αέρα από κάψιμο βιομάζας για τον καθαρισμό της καλλιεργήσιμης γης (Korplitz, Shannon N., et al., 2016), μειωμένη ασφάλεια τροφίμων εξαιτίας περιορισμένων σοδειών που προκύπτουν από περιβαλλοντικές αλλαγές (Springmann, Marco, et al., 2016), χαμηλότερη περιεκτικότητα ορισμένων καλλιεργειών σε θρεπτικά συστατικά εξαιτίας στην αυξημένη περιεκτικότητα του αέρα σε CO₂ (Myers, Samuel S. et al.,

2014), μείωση της βιοποικιλότητας και λιμός σε ορισμένες περιοχές που προκαλείται από ακραία καιρικά φαινόμενα όπως ξηρασία (World Health Organization, 2018).

Πρέπει να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν φιλικές προς το περιβάλλον πρακτικές που βελτιώνουν την κτηνοτροφία και την αλιεία. Έλεγχος των παρασίτων, επικοινωνία, κανονισμοί σχετικοί με το νερό και κυκλική χρήση των θρεπτικών συστατικών είναι μερικές από αυτές που θα αυξήσουν την παραγωγή και την ανθεκτικότητα των σοδειών ενώ ταυτόχρονα θα μειώσουν τις επιβλαβείς επιπτώσεις στην ατμόσφαιρα και το περιβάλλον (DeClerck, Fabrice AJ, et al., 2016). Έμφαση θα δοθεί, επίσης, σε τομείς όπως η διατηρητική και ακριβής γεωργία, αγρο-οικολογικά συστήματα καλλιέργειας, παραγωγή οργανικών προϊόντων και θα εντατικοποιηθεί η χρήση βιώσιμων και εξειδικευμένων τρόπων καλλιέργειας και παραγωγής (Garbach, Kelly et al., 2017; Garnett, Tara et al., 2013; Tilman, David, et al., 2011). Το πεδίο εστίασης αυτών των πρακτικών είναι κυρίως η βιωσιμότητα σε επίπεδο καλλιέργειας, περιλαμβάνοντας βελτιώσεις στη συγκέντρωση άνθρακα του χώματος, ελάττωση της απώλειας θρεπτικών συστατικών από τα χωράφια και μεγαλύτερη αποδοτικότητα στη χρήση του νερού (DeClerck, Fabrice AJ, et al., 2016; Rockström, Johan, et al., 2017). Ακόμα, μέχρι σήμερα η διαχείριση των οικολογικών διαδικασιών που σχετίζονται με την παραγωγή τροφίμων και εστιάζει στο έδαφος είναι η προτεραιότητα καθώς έχει αποτελέσματα σε τοπικό επίπεδο. Το έδαφος ποικίλει ανάλογα με την περιοχή και εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά που εξαρτώνται αλλά και επηρεάζουν το υδάτινο κλίμα και την χλωρίδα και πανίδα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι πρακτικές βελτίωσης της βιωσιμότητας εξαρτώνται από το περιβάλλον και την περιοχή.

1.2.4 Οικολογικά προβλήματα βιομηχανίας παραγωγής τροφίμων

Η βιομηχανία παραγωγής τροφίμων είναι μια τεράστια πηγή περιβαλλοντικής υποβάθμισης και επιβαρύνει σημαντικά τον πλανήτη. Αυτό υποστηρίζεται ολοένα και περισσότερο από την έρευνα, υποδηλώνοντας ότι η στροφή προς βιώσιμες πρακτικές είναι μονόδρομος για την επιβίωση του πλανήτη (Willett et al., 2019).

Ο ορισμός μιας σειράς παραμέτρων που θεσπίζουν την βιώσιμη παραγωγή τροφίμων επιτρέπει την καθολική συνέπεια προς το περιβάλλον, σε τοπικό και παγκόσμιο επίπεδο. Τα συστήματα παραγωγής τροφίμων απελευθερώνουν αέρια του θερμοκηπίου, δηλαδή διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο και υποξείδιο του αζώτου, στην ατμόσφαιρα και η εκτενής χρήση γης για

παραγωγή τροφίμων (πχ για εκτροφή ζώων) απελευθερώνει επίσης διοξείδιο του άνθρακα ενώ ταυτόχρονα μειώνει τις δασικές εκτάσεις, στερεώνει τους υδάτινους πόρους και οργώνει εκτάσεις γης στερώντας τη από θρεπτικά στοιχεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεθάνιο και το υποξείδιο αζώτου έχουν 56 και 280 φορές τη δυνατότητα για υπερθέρμανση του πλανήτη σε βάθος 20 χρόνων συγκριτικά με το διοξείδιο του άνθρακα (Pachauri, Rajendra, et al., 2014).

Πιο συγκεκριμένα, το μεθάνιο παράγεται από μηρυκαστικά, πχ αγελάδες ή πρόβατα, κατά την διαδικασία πέψης ή μέσω αναερόβιας αποσύνθεσης οργανικής ύλης σε ορυζώνες. Το υποξείδιο του αζώτου παράγεται από μικρόβια του χώματος στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις και βοσκοτόπια και επηρεάζεται από τη διαχείριση του γόνιμου εδάφους, πχ με εφαρμογή λιπασμάτων. Το διοξείδιο του άνθρακα απελευθερώνεται από το όργωμα της γης, κατά τη διάρκεια του καψίματος φυτών, οργανικής ύλης και γεωργικών υπολειμμάτων, από το καύσιμο ορυκτών καυσίμων, για την παραγωγή λιπασμάτων και κατά τη μετακίνηση γεωργικών προϊόντων. Επίσης, διοξείδιο του άνθρακα απελευθερώνεται με τη μετατροπή δασικών περιοχών σε γεωργικές εκτάσεις (Willett, Walter, et al., 2019).

Οι εκτιμήσεις των καθαρών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου ποικίλλουν ευρέως ανάλογα με ποιες υποκατηγορίες συμπεριλαμβάνονται: εκπομπές από αέρια που δεν είναι το διοξείδιο του άνθρακα, δηλαδή το μεθάνιο και το υποξείδιο του αζώτου, που προέρχονται από γεωργική παραγωγή εκτιμώνται στους 5,0 – 5,8 Gt ισοδύναμου σε διοξείδιο του άνθρακα ανά έτος (Smith et al., 2014).

Οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα από τη μετατροπή φυσικών οικοσυστημάτων, ειδικά δασικών περιοχών, σε καλλιεργήσιμη γη ή βοσκοτόπια εκτιμάται στους 2,2 – 6,6 Gt ισοδύναμου του διοξειδίου του άνθρακα ετησίως (Vermeulen et al., 2012). Ακόμα, περίπου 0,3 Gt αντιστοιχούν στην καύση βιομάζας και περίπου 1,0 Gt παράγεται από τη χρήση ενέργειας από το γεωργικό εξοπλισμό (Bennetzen et al., 2016).

Η συνολική εκτίμηση όλων των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που προέρχεται από την παραγωγή τροφίμων εκτιμάται στους 8,5-13,7 Gt ισοδύναμου διοξειδίου του άνθρακα. Οι συνολικές εκπομπές είναι γενικά σταθερές από το 1990, μεγαλώνοντας λιγότερο από 1% ανά χρόνο, γιατί οι αυξήσεις στην παραγωγή αντισταθμίζονται από τη μείωση της έντασης των εκπομπών ανά μονάδα παραγωγής (Bennetzen, E. H. et al., 2016; Smith, Pete et al., 2014).

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις, οι δραστηριότητες που σχετίζονται με τα τρόφιμα παράγουν ένα μεγάλο ποσοστό της παγκόσμιας περιβαλλοντικής πίεσης εξαιτίας της αύξησης αφ' ενός του

παγκόσμιου πληθυσμού και αφ' ετέρου του κατά κεφαλήν εισοδήματος (Alexandratos, 2009; Bruinsma, 2009; Evans, 1998). Η αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες και προτιμήσεις στις δυτικές χώρες είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διατροφών πλούσιων σε ζωικές πρωτεΐνες και ταυτόχρονα έθεσε το παράδειγμα για τους κατοίκους αναπτυσσόμενων χωρών να καταναλώνουν το αυξανόμενο εισόδημά τους προσπαθώντας να αντιγράψουν τις συνήθειες των δυτικών (Grigg, 1995). Ενώ ο παγκόσμιος πληθυσμός διπλασιάστηκε κατά το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα (από 2,7 σε 6 δις), η όρεξη για κρέας πενταπλασιάστηκε, από 45 σε 229 δις kg (Steinfeld et al., 2006). Μέχρι και σήμερα, η παραγωγή τροφίμων έχει καταφέρει να συμβαδίσει με την αύξηση του πληθυσμού αυξάνοντας την απόδοση ανά εκτάριο γης (κυρίως με την αύξηση της άρδευσης και τη μεγαλύτερη χρήση λιπασμάτων) και το επίπεδο παραγωγής ζωικών πρωτεϊνών (με την εντατικοποίηση της κτηνοτροφίας). Για να επιτευχθεί το τελευταίο χρειάστηκε ουσιαστική ανάπτυξη στις καλλιέργειες που προορίζονται για την κτηνοτροφία που είχε ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό κοντά στο 40% της παγκόσμιας συγκομιδής σιτηρών να αποτελεί ζωοτροφή (Evans, 1998; USDA, 2007). Ακόμα, τρία τέταρτα του διαθέσιμου γλυκού νερού και περίπου ένα τέταρτο της μη παγωμένης συνολικής έκτασης γης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων (τρία τέταρτα της οποίας αφορούν τη ζωική παραγωγή). Επιπρόσθετα, ένα τρίτο όλων των μεταφορών σχετίζεται με τα τρόφιμα (Smil, 2002). Συνολικά, η κλίμακα και η ένταση της επίδρασης που επιφέρει κάνει εξαιρετικά απίθανη τη διατήρηση αυτού του επιπέδου απόδοσης στο μέλλον, συνυπολογίζοντας τη συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και το επίπεδο διαβίωσης θα πιέσει ακόμα περισσότερο ορισμένους κρίσιμους πόρους (πχ βιοδιαθεσιμότητα, καλλιεργήσιμη γη, γλυκό νερό και ενέργεια), την ανθρώπινη υγεία και την ορθή μεταχείριση των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι το 2050, ο παγκόσμιος πληθυσμός θα φτάσει προσεγγιστικά τα 9,1 δις και αυτό θα απαιτήσει διπλασιασμό της ζωικής παραγωγής, δηλαδή μια αύξηση από 229 σε 465 δις kg κρέατος και από 580 σε 1043 δις kg γαλακτοκομικών (Steinfeld et al., 2006: p. 275; Alexandratos, 2009; Bruinsma, 2009). Μία επιπρόσθετη επιπλοκή φαίνεται να είναι τα βιοκαύσιμα ίσως ανταγωνίζονται τα τρόφιμα για τους ίδιους λιγοστους πόρους γης και γλυκού νερού (Fischer, 2009).

1.2.5 Ζωικές πηγές πρωτεϊνών

Ένας σοβαρός παράγοντας είναι η εκ φύσεως αναποτελεσματική μετατροπή της φυτικής πρωτεΐνης σε ζωική, το οποίο θέτει το κρέας υπεύθυνο για ένα δυσανάλογο ποσοστό της

τροφιμογενούς περιβαλλοντικής πίεσης (Gilland, 2002; Steinfeld et al., 2006). Αν και ο πραγματικός παράγοντας μετατροπής της ζωικής πρωτεΐνης εξαρτάται από το είδος του ζώου, όπως και από τις συνθήκες (διατροφή, κλίμα, κλπ), κατά μέσο όρο ο ζωικός μεταβολισμός απαιτεί 6 kg φυτικής πρωτεΐνης για να παράξει 1 kg ζωικής πρωτεΐνης (Pimentel and Pimentel, 2003; Smil, 2000). Ως αποτέλεσμα, μόνο το 15% της πρωτεΐνης των φυτικών ζωοτροφών μετατρέπεται σε τροφή προς ανθρώπινη κατανάλωση και το υπόλοιπο 85%, όσον αφορά την ανθρώπινη διατροφή, σπαταλάται. Για παράδειγμα, το 2000 χρησιμοποιήθηκαν 942 και 617 εκατομμύρια τόνοι από σπόρους για τροφή και ζωοτροφή αντίστοιχα (Msangi and Rosegrant 2009, p.27). Όσον αφορά το τελευταίο, πάνω από 500 εκατομμύρια τόνοι ουσιαστικά δεν φτάνουν ποτέ τη διατροφή του ανθρώπου και, επιπρόσθετα, μολύνουν την ατμόσφαιρα και το υδάτινο περιβάλλον μέσω του μεταβολισμού των ζώων. Επίσης, περίπου το 40% της συγκομιδής δημητριακών και περίπου το 70% της σόγιας προορίζονται για τροφή ζώων, με παρόμοιες απώλειες πρωτεΐνης της τάξεως του 85%, ενώ σημαντική είναι και η κατανάλωση νερού.

Μια σημαντική διάκριση με βάση τη χρήση γης αποτελεί ο διαχωρισμός μεταξύ της γης που χρησιμοποιείται για βόσκηση και αυτή που δεσμεύεται για εντατική κτηνοτροφία. Χωρίς καμία επέμβαση στο πρώτο (μία πρακτική που εφαρμόζεται για χιλιάδες χρόνια στον πλανήτη), η μείωση ή κατάργηση του δεύτερου θα οδηγούσε σε τεράστια μείωση της απαίτησης για γεωργική γη. Ένας κατά προσέγγιση υπολογισμός δείχνει ότι περίπου 4 εκατομμύρια τετραγωνικά χιλιόμετρα καλλιεργήσιμης γης (όσο περίπου η έκταση της EU-27) παγκοσμίως αφιερώνονται σε ζωοτροφές, κυρίως δημητριακά και ελαιούχους σπόρους. Συνολικά, οι ζωοτροφές αυτές περιέχουν 144 εκατομμύρια τόνους φυτικής πρωτεΐνης. Υποθέτοντας μία σχετικά υψηλή απόδοση μετατροπής της πρωτεΐνης της τάξεως του 20%, όπως ισχύει στα πουλερικά (5 kg φυτικής πρωτεΐνης για την παραγωγή 1 kg ζωικής πρωτεΐνης) η παραπάνω ποσότητα μπορεί να παραγάγει μία μέγιστου ποσότητα των 29 εκατομμυρίων τόνων ζωικής πρωτεΐνης. Αντιθέτως, η ίδια ποσότητα των 29 εκατομμυρίων τόνων φυτικών πρωτεϊνών αν προορίζεται για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση θα απαιτούσε περίπου 0,25 εκατομμύρια τετραγωνικά χιλιόμετρα (όσο το μέγεθος του ΗΒ) σόγιας, απελευθερώνοντας 3,75 εκατομμύρια χιλιόμετρα γης παγκοσμίως. Γίνεται κατανοητό ότι με την κατάργηση της εντατικής κτηνοτροφίας θα απελευθερώνονταν τεράστιες εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης και, ταυτόχρονα, η όλο και μεγαλύτερη πίεση που ασκείται στη βιοποικιλότητα και στις πηγές καθαρού νερού θα ελαττώνονταν σημαντικά (De Boer et al., 2011).

Σε συνδυασμό με την υψηλή χρήση λιπασμάτων και τη εκτενή χρήση καλλιεργήσιμης γης για ζωοτροφές, η κτηνοτροφία εξαρτάται όλο και περισσότερο στην άρδευση σε βαθμό που γρήγορα προσεγγίζει τα φυσικά όρια της διαθεσιμότητας καθαρού νερού. Ισχύει ότι η έμμεση ανάγκη για νερό για την καλλιέργεια ζωοτροφών ξεπερνάει κατά πολύ την άμεση ανάγκη για νερό των εξημερωμένων ζώων, κάνοντας την παραγωγή κρέατος, γενικά, και την εκτροφή βοοειδών, ειδικότερα, από τις πιο απαιτητικές διαδικασίες όσον αφορά τη χρήση νερού (Smil, 2000). Επίσης, το νερό που απαιτείται για την παραγωγή διαφόρων σοδιών ποικίλει από 500 έως και 2000 L/kg και, για αυτό, με βάση και την αναλογία μεταξύ σπόρων και χορτονομής, η παραγωγή 1 kg μοσχαρίσιου κρέατος μπορεί να απαιτεί ακόμα και παραπάνω από 200.000 L νερού (Pimentel and Pimentel, 2003). Συμπεραίνουν ότι για την παραγωγή 1 kg ζωικής πρωτεΐνης απαιτείται 100 φορές περισσότερο νερό συγκριτικά με την παραγωγή 1 kg πρωτεΐνης δημητριακών. Συνολικά, μία χορτοφαγική διατροφή απαιτεί περίπου 1 εκατομμύριο λίτρα νερού ανά άτομο ανά έτος και μία διατροφή που περιέχει κρέας απαιτεί πάνω από 2 εκατομμύρια. Το 2000, υπολογίζεται ότι 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι ασκούσαν κυρίως διατροφή με βάση το κρέας και 4 δις κυρίως χορτοφαγική. Ωστόσο, το γκρουπ που καταναλώνει κρέας αναπτύσσεται διαρκώς, παράλληλα με την ανάπτυξη της οικονομίας, όπως της Βραζιλίας, της Ινδίας και της Κίνας. Αυτό οδηγεί σε όλο και μεγαλύτερη κατανάλωση καθαρού νερού (Liu and Savenije, 2008; Ye and van Ranst, 2009). Είναι επόμενο, έτσι, ότι η άρδευση της γεωργικής γης είναι από τους κύριους παράγοντες εξάντλησης των αποθεμάτων του υδροφόρου ορίζοντα παγκοσμίως καθιστώντας πολύ δύσκολη την περαιτέρω αύξηση της παραγωγής τροφίμων στο μέλλον.

Εκτός από τα προβλήματα που σχετίζονται με την αναποτελεσματική μετατροπή πρωτεΐνης, η εντατικοποίηση της ζωικής παραγωγής εμπεριέχει κι άλλα προβλήματα. Μία βασική αιτία της εξάπλωσης της παχυσαρκίας είναι η κατανάλωση συμπυκνωμένης ενέργειας σε χαμηλές τιμές που προέρχεται από ζωικά προϊόντα (Drewnowski and Damon, 2005). Ακόμα, οι μέθοδοι παραγωγής κρέατος σε “εργοστασιακές φάρμες” (factory farming) μειώνουν την ευημερία των ζώων, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τα προβλήματα υγείας ζώων και κατ’ επέκταση και των ανθρώπων, π.χ. ορμόνες, γρίπη των πτηνών, γρίπη των χοίρων, κλπ (EFSA, 2010). Ακόμα, παρατηρείται αυξημένη ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά εξαιτίας της προσθήκης αντιβιοτικών στις ζωοτροφές (Johnson et al., 2009). Σύνδεση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ αναδυόμενων ασθενειών, όπως η γρίπη των πτηνών, και εντατικής κτηνοτροφίας (Pilcher, 2004). Σε ένα διαρκώς αναπτυσσόμενο κόσμο τα θέματα αυτά πρέπει να πάψουν να αντιμετωπίζονται μεμονωμένα εφόσον είναι στενά συνδεδεμένα.

Μια πιθανή λύση κατά του προβλήματος είναι η βελτίωση του τωρινού συστήματος παραγωγής κρέατος. Για παράδειγμα, οι χοίροι και, ιδιαίτερα, τα ζώα με λευκό κρέας (πουλερικά) μετατρέπουν πολύ πιο αποτελεσματικά την πρωτεΐνη σε σχέση με τα βοοειδή. Τα κόστη, τα πλεονεκτήματα και άλλοι παράγοντες αναλύονται μέσω του Life Cycle Analysis (LCA). Το σύστημα αυτό εξετάζει το περιβαλλοντικό αποτύπωμα ενός προϊόντος σε όλα τα στάδια της παραγωγής, διάθεσης και χρήσης του. Ωστόσο, η απόφαση σχετικά με τα αποτελέσματα για την μετατροπή πρωτεΐνης είναι πολύπλοκη. Τα βοοειδή που τρέφονται με χόρτο (grass-fed cattle) δεν καταναλώνουν τις φυτικές καλλιέργειες, όπως οι χοίροι και τα πουλερικά. Επίσης, τα πολλά στομάχια τους δεν μπορούν να πέσουν καλά το καλαμπόκι. Έτσι, ένα μοναδικό πλεονέκτημα είναι ότι τα grass-fed cattle δεν ανταγωνίζονται τους ανθρώπους για φυτικές καλλιέργειες (Garnett, 2009). Επίσης, τα βοοειδή είναι σημαντικά για την ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών εντός φάρμας αλλά και για την βιοποικιλότητα σε κάποιες περιοχές (MacDonald et al., 2000). Κρίνοντας από αυτά, το λευκό κρέας ίσως να μην έχει τόσο μεγάλη διαφορά από το κόκκινο εν τέλει. Άρα, το πρόβλημα της υπερβολικής κτηνοτροφίας παραμένει και η εύνοια σε ένα είδος κρέατος (κόκκινο ή λευκό) να μην είναι πανάκεια. Οι καταναλωτές θα χρειαστεί να επανεξετάσουν τις διατροφικές επιλογές τους δίνοντας περισσότερη βάση στα φυτικά προϊόντα και ιδιαίτερα στις πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης.

1.2.6 Συστάσεις καταναλωτών

Σχετικά με την οπτική των καταναλωτών σε παγκόσμιο επίπεδο πρέπει να εξεταστεί κατά πόσο εκτιμούν τα φυτικά προϊόντα κι αν έχουν διάθεση να αναγνωρίσουν το πρόβλημα των πρωτεϊνών. Στις δυτικές χώρες, οι συνήθειες περιστρέφονται γύρω από ζωικά προϊόντα σούπερ μαρκετ, τα οποία, όμως, αποκόπτουν τη σχέση μεταξύ του ζώου και του προϊόντος (de-animalize). Έτσι, ο ιδιαίτερος χαρακτήρας των ζωικών προϊόντων και η υγεία αποκτά δευτερεύον ρόλο και δίνεται έμφαση στη λειτουργικότητα αυτών των προϊόντων (Vialles, 1994; Grunert, 2006). Ακόμα, σε παραδοσιακά Καθολικές χώρες (π.χ. Ιταλία) μια αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες εκλαμβάνεται ως αλλοίωση της παράδοσης και του χαρακτήρα του τύπου ενώ στις υπόλοιπες χώρες (π.χ. Ολλανδία) δίνεται μείζουσα σημασία στην υγεία (Fischler, 1999). Τέλος, με την άνοδο των διαφόρων οικολογικών κινημάτων ολοένα και περισσότεροι ενδιαφέρονται για «πράσινες» διατροφές και στροφή προς οικολογικές μεθόδους παραγωγής τροφίμων (Jamison, 2003).

Όσον αφορά τον καταναλωτή, χρειάζεται η καθιέρωση ενός διαύλου επικοινωνίας και ενημέρωσης του για τα κοινωνικά και περιβαλλοντικά προβλήματα της γραμμής παραγωγής τροφίμων. Ο ρυθμός ελάττωσης της βιοποικιλότητας, η παρεμβολή στον κύκλο αζώτου και άνθρακα, η κλιματική αλλαγή, η εκτενής χρήση καλλιεργήσιμης γης και πόσιμου νερού αλλά και τα προβλήματα μετατροπής πρωτεΐνης αποτελούν μείζοντα προβλήματα που επηρεάζουν την καθημερινή ζωή των καταναλωτών άμεσα ή έμμεσα (Garnett, 2009).

1.3 Χαρούπι

1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Η χαρουπιά, με επιστημονική ονομασία *Ceratonia siliqua L.*, αποτελεί αειθαλές δέντρο της οικογένειας *Leguminosae* (Basharat et al., 2023). Καλλιεργείται από την αρχαιότητα στην πλειοψηφία των χωρών της Μεσογείου, ύστερα από την μεσολάβηση των αρχαίων Ελλήνων που το έφεραν από την Μέση Ανατολή (πιθανότατα από την Τουρκία ή την Συρία) στην Ελλάδα και την Ιταλία, και των Αράβων που το διέδωσαν στα παράλια της Βόρειας Αφρικής, την Ισπανία και την Πορτογαλία (Tous et al., 2013). Η αξία του είχε αναγνωριστεί ήδη από τα αρχαία χρόνια αντικαθιστώντας τα δημητριακά σε περιόδους ξηρασίας και έλλειψης τροφίμων, λόγω της ανάπτυξης του σε ήπια και ξηρά κλίματα (Tous et al., 2013; Papaefstathiou et al., 2018). Λόγω του υψηλού περιεχόμενου τους σε σάκχαρα, συχνά καταναλωνόταν ως σνακ από παιδιά κατά τη διάρκεια πολέμων ή άλλων έκτακτων καταστάσεων (Owen et al., 2003).

Η περίοδος όπου το χαρούπι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά δεν είναι γνωστή, αλλά στοιχεία από αρχαίες αναφορές δείχνουν ότι οι Αιγύπτιοι μπορούν να θεωρηθούν από τους πρώτους λαούς που το καλλιεργήσαν και το χρησιμοποίησαν σε πολλές εφαρμογές. Αυτό φαίνεται από την χρήση του χαρουπιού ως υλικό για την κατασκευή ναών και τροπαίων (1490 – 1164 π.Χ.), ως συστατικό του υφάσματος για την διαδικασία της μουμιοποίησης, ως ζωοτροφή και σαφώς για ανθρώπινη κατανάλωση. Η ένταξη των καρπών της χαρουπιάς στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων υλοποιήθηκε και από άλλους αρχαίους πολιτισμούς όπως οι Ρωμαίοι και οι Έλληνες. Τον 19^ο αιώνα διαδόθηκε από την Ισπανία και σε άλλες χώρες παγκοσμίως όπως οι ΗΠΑ, το Μεξικό, η Χιλή και η Αργεντινή (Tous et al., 2013).

1.3.2 Γενικές πληροφορίες/Εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων

Η επιστημονική ονομασία της χαρουπιάς (*C. siliqua* L.) προέρχεται από την ελληνική λέξη «κέρας», που συνδέεται με το σχήμα κέρατος του καρπού και τη λατινική λέξη «siliqua» λόγω της σκληρότητας και του σχήματος των σπόρων του (Basharat et al., 2023). Οι ωριμασμένοι λοβοί των καρπών της χαρακτηρίζονται από καφέ χρώμα με ζαρωμένη και δερματώδη επιφάνεια και περιλαμβάνουν δύο μέρη: τη σάρκα ή πολτό ή κροκέτα χαρουπιού (carob pulp or kibble) (80 - 90%), που περιβάλλεται από εξωτερικό δερματώδες στρώμα (περικόρπιο) και εσωτερικά από μαλακό και σακχαρώδες στρώμα (μεσοκάρπιο), και τους σπόρους (seeds) (10 – 20%), τοποθετημένοι εγκάρσια και διαχωρισμένοι από το μεσοκάρπιο (Goulas et al., 2016). Η αναλογία σάρκας – σπόρων διαφοροποιείται ανάλογα με τη φύση των δέντρων (άγρια ή καλλιεργημένα). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των λοβών όπως το χρώμα, η πυκνότητα, οι διαστάσεις, το σχήμα – μέγεθος και η αναλογία σάρκας – σπόρων διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες (Basharat et al., 2023).

Σύμφωνα με τον FAO, οι μεγαλύτερες ποσότητες χαρουπιού παράγονται κυρίως από χώρες της Μεσογείου, με την Ισπανία να είναι η κορυφαία χώρα ενώ ακολουθούν η Ιταλία, η Πορτογαλία, η Ελλάδα και η Κύπρος, και άλλες χώρες όπως το Μαρόκο, ο Λίβανος και η Τουρκία (Papaefstathiou et al., 2018). Η ποιότητα και η απόδοση των χαρουπιών εξαρτάται από παράγοντες όπως η περιοχή, η ποικιλία, οι πολιτιστικές πρακτικές και οι περιβαλλοντικές συνθήκες κάθε τόπου, για αυτό και παρατηρούνται διακυμάνσεις στις ποσότητες και τη σύσταση των καρπών ανά χώρα (Basharat et al., 2023). Τα επιμέρους τμήματα των λοβών χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ποικιλίας προϊόντων. Η υψηλή ποσότητα σακχάρων του μεσοκαρπίου, τα καθιστά κατάλληλα για την εκπόνηση ζυμωτικών διεργασιών και για την παραγωγή παραδοσιακών προϊόντων όπως η σκόνη χαρουπιού ως υποκατάστατο της σκόνης κακάο, η μελάσα (rekmez) στην Τουρκία και το σιρόπι χαρουπιού που πωλείται ως συμπλήρωμα διατροφής λόγω των μεγάλων αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών δράσεων του (Yatmaz et al., 2018).

Οι λοβοί και τα απόβλητα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε ζυμώσεις και βιοτεχνολογικές εφαρμογές λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας ως υπόστρωμα για την παραγωγή οργανικών οξέων όπως κιτρικό (ζύμωση με στελέχη *Aspergillus niger*), γαλακτικό

(με LAB) και ηλεκτρικό οξύ (με *Actinobacillus succinogenes*), βιοαιθανόλης (με τη χρήση ζυμών) μαννιτόλης και άλλων σακχάρων (Yatmaz et al., 2018; Basharat et al., 2023). Μεγάλη σημασία έχει και η παραγωγή SCO (single cell oils) με τη χρήση ελαιούχων μικροοργανισμών όπως τα είδη *Cryptocodinium cohnii* και *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 κατά τη ζύμωση σιροπιού χαρουπιού προς σχηματισμό εικοσιδυοεξανοϊκών οξέων (DHA), λιπαρών οξέων και καροτενοειδών (Mendes et al., 2007; Yatmaz et al., 2018). Μυκητιακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν αποτελεσματικά για την παραγωγή πρωτεϊνών από εκχύλισμα λοβών χαρουπιού με ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, με την δράση του *Aspergillus niger* (Sekerli – Pataryas et al., 1973) και του *Fusarium moniliforme* (Macris & Kokke, 1977), και ενζύμων όπως η β – μαννανάση από *Aspergillus oryzae* κ.ά είδη (Yatmaz et al., 2018).

Τα μέρη των σπόρων περιλαμβάνουν τον φλοιό (30 – 35%), το ενδοσπέρμιο (40 – 50%) και το φύτρο ή έμβρυο (20 – 25%), με διακυμάνσεις αναλόγως με την ποικιλία. Οι σπόροι χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την παραγωγή του κόμμεως χαρουπιού (LBG), μέσω αλκαλικής ή υδατικής εκχύλισης, που χρησιμοποιείται ως πηκτικός παράγοντας, σταθεροποιητής, πηκτωματοποιητής, παράγοντας διασποράς ή και αρωματικό. Συμμετέχει ως πρόσθετο (E410) σε μεγάλο βαθμό στην παρασκευή βρώσιμων επικαλύψεων/μεμβρανών, στις βιομηχανίες αναψυκτικών και ποτών, προϊόντων αρτοποιίας, ζαχαροπλαστικής, κρεατοσκευασμάτων, παγωτών, ζυμαρικών και γαλακτοκομικών αλλά και σε μη edώδιμες εφαρμογές όπως σε βιομηχανίες καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, υφαντουργίας, σε βαφές, σε εξορύξεις, γεωτρήσεις λαδιού και οικοδομικές χρήσεις λόγω των πυκνωτικών και σταθεροποιητικών ιδιοτήτων του (Yatmaz et al., 2018; Basharat et al., 2023). Χημικά αποτελείται κυρίως από γαλακτομαννάνη (έως και 85%), έναν πολυσακχαρίτη μεγάλου μοριακού βάρους που αποτελείται από μια γραμμική αλυσίδα μαννόζης και ομάδες γαλακτόζης ως πλευρικές αλυσίδες σε αναλογία 3:1 – 4:1 (Goulas et al., 2016). Το μοριακό βάρος και η δομή του παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργικές ιδιότητες του όπως στην ικανότητα προσρόφησης νερού, στην ρεολογία, τη διαλυτότητα και τον ικανοποιητικό σχηματισμό γέλης. LBG βρέθηκε επίσης και σε παιδικές τροφές και κατεψυγμένα τρόφιμα (Basharat et al., 2023).

Τα προϊόντα δημητριακών δεν μπορούν να καταναλωθούν από ανθρώπους που πάσχουν από κοιλιοκάκη, μια αυτοανοσολογική διαταραχή που προκαλείται από την λήψη τροφίμων που περιέχουν γλουτένη οδηγώντας σε φλεγμονές του λεπτού εντέρου. Οι ασθενείς με κοιλιοκάκη καταφεύγουν στην κατανάλωση τροφίμων και προϊόντων δημητριακών (ζυμαρικά, ψωμί,

μπισκότα, παξιμάδια) από άλευρα χωρίς γλουτένη, αυξάνοντας το ενδιαφέρον από τις βιομηχανίες τροφίμων για εφαρμογές αλεύρων από όσπρια και συγκεκριμένα δημητριακά με αποτέλεσμα τον σχηματισμό παρόμοιων προϊόντων χωρίς ωστόσο αποδεκτές ιξωδοελαστικές ιδιότητες και υφές και χαμηλότερη θρεπτική αξία (Basharat et al., 2023,). Σύμφωνα με έρευνες, το χαρουπάλευρο από σπόρους χαρουπιού αποτελεί ένα καλό υποκατάστατο του κοινού αλεύρου σίτου, λόγω της παρουσίας ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών (επιστημονική ονομασία Caroubin) με παρόμοιες ρεολογικές ιδιότητες με την γλουτένη του σίτου σε συνδυασμό με ένα πλούσιο διατροφικό και οργανοληπτικό προφίλ λόγω της πληθώρας θρεπτικών ουσιών και της ανάπτυξης ικανοποιητικών και αποδεκτών αρωμάτων, υφών και καστανών χρωμάτων στα τελικά gluten free προϊόντα (Wang et al., 2001; Tsatsaragkou et al., 2014; Basharat et al., 2023).

1.3.3 Διατροφική αξία/Χημική σύσταση

Το πλούσιο διατροφικό προφίλ των χαρουπιών οφείλεται κυρίως στην παρουσία σακχάρων, διαιτητικών ινών, μετάλλων, βιταμινών και ποικιλίας πολυφαινόλων καθιστώντας το ένα λειτουργικό τρόφιμο για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι λοβοί περιέχουν μεγάλο ποσό μόνο- και ολιγοσακχαριτών (40 - 60%) κυρίως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, πρωτεϊνών (3 – 4%) και διαιτητικών ινών (ιδιαίτερα στους σπόρους) και χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (0,2%-0,6%) και αλκαλοειδή. Συγκεκριμένα, ο πολτός αποτελείται από σάκχαρα, πολυφαινόλες όπως τανίνες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα και μέταλλα (κυρίως K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn), ενώ ο σπόρος περιέχει πρωτεΐνες (χωρίς γλουτένη), διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες και μέταλλα (Papaefstathiou et al., 2018).

Η σκόνη χαρουπιού, ανάλογα με την ποικιλία και την επεξεργασία, βρέθηκε ότι περιέχει σημαντικά ποσά βιταμινών E, D, C και βιταμινών της ομάδας B (B₃, B₆, B₉). Ο χρόνος και η θερμοκρασία του ψησίματος παίζει σημαντικό ρόλο στην διατροφική και οργανοληπτική ποιότητα της σκόνης. Η θέρμανση σε θερμοκρασίες αποστείρωσης (121 – 130 °C) έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και προϊόντα αντίδρασης Maillard (HMF κ.ά) αλλά χαμηλότερο ποσό των θερμοευαίσθητων βιταμινών (Yatmaz et al., 2018).

Οι διαιτητικές ίνες των χαρουπιών παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρεολογία των ζυμών όταν χρησιμοποιείται άλευρο ή σκόνη χαρουπιού σε προϊόντα αρτοποιίας. Λαμβάνονται με υδατική

εκχύλιση της κροκέτας (30 – 40% του συνόλου των φυτικών ινών) για απομάκρυνση της πλειοψηφίας των διαλυτών σακχάρων (Goulas et al., 2016) ενώ το υπόλοιπο ποσό ινών λαμβάνεται από τους σπόρους και περιλαμβάνει σχεδόν αποκλειστικά αδιάλυτες ίνες. Πάνω από το 70% του συνόλου των φυτικών ινών των λοβών είναι αδιάλυτες και περιλαμβάνει πολυφαινόλες, λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη (Basharat et al., 2023). Το κλάσμα των διαλυτών ινών περιλαμβάνει απλά σάκχαρα και είναι αρκετά μικρότερο από το αντίστοιχο των αδιάλυτων (με μέγιστο ποσό περίπου 10 g/100 g ινών χαρουπιού) (Goulas et al., 2016).

Η υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινολών στα χαρούπια τα διαφοροποιεί από άλλες φυτικές πηγές αδιάλυτων φυτικών ινών και αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ενδιαφέρον για την ανάκτηση τους. Η συγκέντρωσή τους στους λοβούς εξαρτάται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και το ποσοστό παραλαβής τους διαφοροποιείται ανάλογα με την μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόζεται (Goulas et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, τεχνικές όπως η εκχύλιση ακετόνης – νερού και η εκχύλιση Soxhlet χρησιμοποιώντας μεθανόλη χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερες αποδόσεις σε σύγκριση με άλλες όπως η απλή εκχύλιση νερού (Almanasrah et al., 2015). Οι κυριότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που παρατηρούνται στους καρπούς των χαρουπιών είναι κυρίως φλαβονοειδή, γαλλοταννίνες, απλά φαινολικά οξέα, φλαβονόλες και γλυκοσιδικά τους παράγωγα ενώ σε χαμηλότερες ποσότητες βρέθηκαν φλαβόνες και φλαβονόνες (Basharat et al., 2023; Goulas et al., 2016). Το γαλλικό οξύ και τα παράγωγα του (γαλλικός μεθυλεστέρας κ.ά.) κατέχουν την υψηλότερη θέση των φαινολικών οξέων στους καρπούς των χαρουπιών με μια μέση περιεκτικότητα 24 – 165 mg/100 g. Οι τανίνες αποτελούν άλλη μια χαρακτηριστική ομάδα πολυφαινολών στα χαρούπια που συμβάλλουν στις στυφές γεύσεις τους ενώ ποικίλλουν στα διάφορα μέρη του λοβού (Basharat et al., 2023). Τα φύτρα και οι σπόροι γενικότερα θεωρούνται οι πλουσιότερες πηγές φλαβονοειδών και τανινών.

Μια άλλη ουσία που παράγεται στα χαρούπια είναι η D – πινιτόλη (D – pinitol) με σημαντικές φαρμακευτικές εφαρμογές και ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες όπως η αντιδιαβητική λειτουργία της ως ρυθμιστής της ινσουλίνης (Azab, 2022). Χημικά κατατάσσεται στις κυκλιτόλες και η συγκέντρωσή της ποικίλει ανάλογα με γενετικούς και κλιματικούς παράγοντες (1 – 8,5%). Άλλη βασική εφαρμογή της είναι η βιομηχανική χρήση της για την αναγνώριση πιθανής νοθείας σκόνης χαρουπιού από κακάο (Basharat et al., 2023). Άλλες κυκλιτόλες που έχουν εντοπιστεί σε μικρά ποσά είναι κυρίως ινοσιτόλες όπως η μυοϊνοσιτόλη, βορνεσιτόλη, σεκουοϊτόλη κ.ά. (Goulas et al., 2016).

Το χαρούπι θεωρείται καλή πηγή πρωτεϊνών και αμινοξέων καθώς παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα ξεπερνώντας τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις που ορίζονται από τον WHO για την διατροφή του ανθρώπου (Goulas et al., 2016). Σύμφωνα με μελέτες, μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης βρέθηκαν σε χαρουπάλευρο (σχεδόν 55%), ειδικότερα χειροποίητου λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών και αμινοξέων κατά τη βιομηχανική παραγωγή του, σε σύγκριση με τη μη μεταποιημένη κροκέτα (2 – 3%) και τους σπόρους (1%). Τα ποσοστά της πρωτεΐνης στα διάφορα μέρη του χαρουπιού και τα προϊόντα αυτού κυμαίνονται αναλόγως με την μηχανική και θερμική επεξεργασία και τις τεχνικές απομόνωσης που εφαρμόζονται (Basharat et al., 2023).

1.3.4 Ευεργετικές ιδιότητες/Οφέλη για την υγεία

Σύμφωνα με αρκετές έρευνες, έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση χαρουπιών και προϊόντων τους είναι ύψιστης σημασίας για την ανθρώπινη υγεία προλαμβάνοντας μεγάλο αριθμό χρόνιων ασθενειών. Μια σημαντική λειτουργία τους είναι η αντιπολλαπλασιαστική και προαποπτωτική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων λόγω του πλούσιου περιεχομένου τους σε φυτοχημικές ενώσεις με αντικαρκινικές επιδράσεις (Papaefstathiou et al., 2018; Basharat et al., 2023). Παράδειγμα αποτελεί η παρουσία κουερκετίνης (ή κερκετίνης ή βαλανοκετόνης), ένα φλαβονοειδές στα χαρούπια με αποπτωτική δράση κατά των λευχαιμικών κύτταρων αδρανοποιώντας την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl – xL (Goulas et al., 2016). Άλλες έρευνες έδειξαν ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων εμφάνισης καρκίνου των οστών, γεγονός που οφείλεται στο γαλλικό οξύ που αποτρέπει την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος, και άλλων μορφών καρκίνου όπως του παγκρέατος, μαστού, παχέος εντέρου κ.ά., λόγω της επίδρασης των φυσικών αλκαλοειδών και πολυφαινολών (Basharat et al., 2023).

Οι καρποί των χαρουπιών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, περιέχουν μεγάλα ποσά πολυφαινολών που προάγουν την ομαλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος, εμποδίζοντας την πέψη των υδατανθράκων μέσω αναστολής των αντίστοιχων για την διεργασία ενζύμων, αντιμετωπίζοντας τα συμπτώματα διάρροιας, σε συνδυασμό με το άπεπτο κλάσμα διαιτητικών ινών και τα ποσά σακχάρων και πηκτίνης (Basharat et al., 2023). Το υψηλό περιεχόμενο τανινών προσδίδει μεγάλες αντιδιαρροϊκές ιδιότητες λόγω ρύθμισης του νερού στα εντερικά κύτταρα και προστασία του γαστρεντερικού σωλήνα λόγω ξηραντικής

δράσης που συμβάλλει στην αντιμετώπιση τοξινών και πρόληψη της ανάπτυξης επιβλαβούς μικροχλωρίδας στον εντερικό χώρο, εμποδίζοντας την προσκόλληση τους στα επιθηλιακά κύτταρα (Basharat et al., 2023; Goulas et al., 2016).

Όπως είναι γνωστό, τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων και χοληστερόλης (υπερλιπιδαιμία) στο αίμα και στους ιστούς μπορούν να προκαλέσουν αθηροσκλήρυνση και παχυσαρκία και, έτσι, καρδιαγγειακά νοσήματα και σοβαρά προβλήματα υγείας. Η κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες, όπως το χαρούπι και τα προϊόντα του, έχει σημαντική επίδραση στην μείωση της συγκέντρωσης LDL χοληστερόλης στο αίμα και της εμφάνισης των αντίστοιχων παθήσεων (Goulas et al., 2016). Η αντιυπερλιπιδαιμική δράση των ινών του χαρουπιού οφείλεται κυρίως στην δέσμευση και την απομάκρυνση των χολικών οξέων και την παρεμπόδιση της απορρόφησης των τριγλυκεριδίων από τον οργανισμό, προστατεύοντας έτσι τους ιστούς των οργάνων. Παρόμοια επίδραση παρατηρήθηκε ότι είχαν και τα περιεχόμενα αντιοξειδωτικά. Η χορήγηση πολυφαινολών χαρουπιών (CPPs) σε ποντίκια μετά από δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, διαπιστώθηκε ότι συμμετείχαν ως ενώσεις κατά της παχυσαρκίας αναστέλλοντας την αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων και της συνολικής μάζας του λιπώδους ιστού (Basharat et al., 2023).

Σημαντική θεωρείται η επίδραση του χαρουπιού στην καταπολέμηση του διαβήτη, λόγω της πολύπλοκης φυτοχημικής του σύνθεσης. Μετά από πειράματα σε αρουραίους, διαπιστώθηκε ότι η ενσωμάτωση κόμμεως χαρουπιού (LBG) στη διατροφή τους μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Goulas et al., 2018). Ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης των προϊόντων και εκχυλισμάτων χαρουπιού σε συνδυασμό με τις περιεχόμενες αντιδιαβητικές ενώσεις (φλαβονοειδή, πολυφαινόλες) θεωρούνται οι κύριοι λόγοι για τον χαρακτηρισμό του χαρουπιού ως υπερτροφή (superfood) και την ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής για τη θεραπεία του διαβήτη παρεμποδίζοντας την μεταφορά και απορρόφηση της γλυκόζης στο αίμα (Basharat et al., 2023). Όπως αναφέρθηκε, ο σχηματισμός και η παρουσία της D – pinitol στο χαρούπι είναι ιδιαίτερα συμβολική λόγω της δράσης της ως ρυθμιστής της ινσουλίνης, αποτελώντας έναν ακόμη λόγο για την ενσωμάτωση του στη καθημερινή διατροφή των ασθενών (Azab, 2022).

Άλλες ευεργετικές ιδιότητες των καρπών του χαρουπιού περιλαμβάνουν την δράση τους κατά της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης, μετά από έρευνες σε βρέφη όπου παρατηρήθηκε καταπράυνση των συμπτωμάτων παλινδρόμησης ύστερα από την χορήγηση LBG στη διαίτα

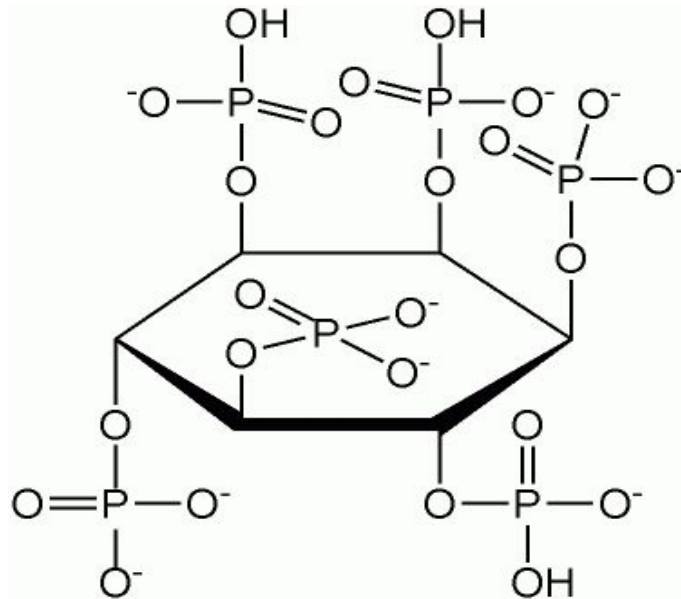
τους (Vivatvakin et al., 2003). Όπως αναφέρθηκε, η σκόνη χαρουπιού χρησιμοποιείται συχνά ως υποκατάστατο της σοκολάτας, η κατανάλωση της οποίας συνδέεται συχνά με την εμφάνιση συμπτωμάτων ημικρανίας, λόγω της παρουσίας τυραμίνης και καφεΐνης. Άλλα τρόφιμα που πυροδοτούν τις ημικρανίες περιλαμβάνουν κυρίως εσπεριδοειδή, καφέ, γαλακτοκομικά προϊόντα, το γλουταμινικό μονονάτριο (MSG), η ισταμίνη, το νιτρικό άλας, η ασπαρτάμη και η γλουτένη. Η αντικατάσταση της σοκολάτας με σκόνη χαρουπιού, χωρίς την παρουσία τυραμίνης και καφεΐνης, προστατεύει αποτελεσματικά από ημικρανίες, με το ίδια οργανοληπτικά αποτελέσματα (Basharat et al., 2023).

Η εκχύλιση με μεθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενός παρασκευάσματος – εκχυλίσματος χαρουπιού με αντιμικροβιακή δράση, αναστέλλοντας κυρίως την βακτηριακή δραστηριότητα ιδιαίτερα των *Enterococcus* spp. και *Listeria monocytogenes* και σπάνια την ανάπτυξη μυκήτων όπως το *Geotrichum candidum* (Basharat et al., 2023). Άλλα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία περιλαμβάνουν αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές επιδράσεις (Azab, 2022; Ayache et al., 2020), δράσεις του LBG κατά της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης, την προστασία από νεφρικές παθήσεις, την επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα κ.ά. (Basharat et al., 2023).

1.4 Φυτικό οξύ

1.4.1 Γενικά

Το φυτικό οξύ (PA, εξακιφωσφορική μυο-ινοσιτόλη, IP6) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1855). Είναι μια φυσική φυτική ένωση με μοναδική δομή που είναι υπεύθυνη για τις χαρακτηριστικές της ιδιότητες. Το φυτικό οξύ έχει 12 αντικαταστάσιμα πρωτόνια, επιτρέποντάς του να συμπλέκεται με πολυσθενή κατιόντα και θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες και έτσι μπορεί να βρεθεί σε πολλές μορφές. Το φυτικό είναι το άλας ασβεστίου του φυτικού οξέος και η φυτίνη το άλας ασβεστίου/μαγνήσιου του φυτικού οξέος. Το φυτικό οξύ μπορεί να υπάρχει ως ελεύθερο οξύ, φυτικό ή φυτίνη σύμφωνα με το φυσιολογικό pH και τα μεταλλικά ιόντα που υπάρχουν. Όλες αυτές οι μορφές έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά στην πλειονότητα της βιβλιογραφίας που σχετίζεται με συστήματα φυτικών οξέων. Η πλήρης υδρόλυση του φυτικού οξέος οδηγεί σε ινοσιτόλη και ανόργανα φωσφορικά (Oatway et al., 2001)



Εικόνα 2: Χημική δομή φυτικού οξέος.

Η παρουσία του φυτικού οξέος είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση και εντοπίζεται στα περισσότερα δημητριακά, όσπρια, ξηρούς καρπούς, ελαιούχους σπόρους, βολβούς, γύρη, σπόρια και στα οργανικά εδάφη. Όσον αφορά τα δημητριακά και τα όσπρια, το φυτικό οξύ είναι το βασικό απόθεμα φωσφόρου τους, φτάνοντας σε ποσοστό του 85% του συνολικού φωσφόρου (Tsao et al., 1997). Στα δημητριακά, τους ελαιούχους σπόρους και τα όσπρια το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού φωσφόρου είναι το φυτικό P (phytate) σε ποσοστά 60-97%, ενώ στους βολβούς και τις ρίζες το 21-25% του συνολικού φωσφόρου αποτελούν τα φυτικά (phytates) (Ravindran, 1994). Επίσης, η συγκέντρωση και η μορφή του φυτικού οξέος ποικίλλει και λαμβάνει τιμές από 0,4 – 10,7% κατά βάρος (Lee, 1995). Ακολουθεί πίνακας που παραθέτει την περιεκτικότητα ορισμένων τροφίμων σε φυτικό οξύ και άλλες φωσφορικές ενώσεις ινοσιτόλης (IP3, IP4, IP5) (Lehrfeld, 1994).

	Phytic Acid (%)	Relative (%)			
		IP ₆	IP ₅	IP ₄	IP ₃
Barley (Betzes)	0.56	69	22	6	3
Beans (Great Northern)	1.12	93	5	2	0
Beans (Lima)	0.84	87	9	4	0
Beans (Navy)	1.09	91	6	4	0
Beans (Pinto)	0.93	90	5	5	0
Buckwheat	1.08	91	8	0.6	0.4
Corn steeped	0.08	74	20	3	3
Corn (dent)	0.72	82	16	2	0
Corn cereal (toasted)	0.07	60	22	10	8
Corn flour	0.10	26	38	25	11
Millet	0.81	87	11	1	1
Oat cereal (toasted)	0.38	51	32	13	5
Oats	0.62	81	16	2	1
Rice bran (0.55% oil)	8.70	93	7	—	—
Rice bran (22% oil)	6.55	92	8	—	—
Rye	0.57	54	31	11	4
Sorghum	0.81	76	19	4	1
Soy concentrate	10.7	88	12	0	0
Soy flakes (defatted)	1.64	92	7	0.5	0.5
Spinach	0.008	100	0	0	0
Wheat (HRW)	0.77	88	11	1	0
Wheat (SWW)	0.65	83	15	2	0
Wheat cereal (toasted)	0.76	70	24	5	1
Wild rice	0.42	60	26	10	4

^a Adapted from Lehrfeld (4).

Εικόνα 3: Περιεκτικότητα φυτικού οξέος σε τρόφιμα, όσπρια και προϊόντα σιτηρών (αποτελέσματα HPLC) (Lehrfeld, 1994).

Το φυτικό οξύ χρησιμοποιείται κατά τη βλάστηση των σπόρων. Καλύπτοντας ορισμένες βιοσυνθετικές ανάγκες των αναπτυσσόμενων ιστών δρα επικουρικά στην ανάπτυξη των φυτών. Τα νέα φυτά που σχηματίζονται χρησιμοποιούν τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης του φυτικού οξέος, ιδιαίτερα της μυο - ινοσιτόλης προς σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος.

Η περιεκτικότητα σε φυτικό οξύ και η διαθεσιμότητα του φωσφόρου στους σπόρους των δημητριακών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα φυτικά είναι το γονιδίωμα, οι αλλαγές στο περιβάλλον, η τοποθεσία, οι συνθήκες άρδευσης, ο τύπος του εδάφους, το έτος και η χρήση λιπάσματος (Reddy, 1989). Επίσης, με την προσθήκη πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅) αυξάνεται το ποσοστό του συνολικού φωσφόρου σε μορφή φυτικού οξέος. Στην περίπτωση που το φυτό δεχτεί μεγαλύτερη ποσότητα φωσφόρου από την απαιτούμενη, φαίνεται πως το πλεόνασμα αποθηκεύεται υπό τη μορφή του οξέος. Το φυτικό οξύ αποθηκεύεται στους σπόρους κατά την ανάπτυξή τους και παρατηρείται μεταβολή στη συγκέντρωσή του κατά την ανάπτυξή τους, όταν ωριμάζουν οι πυρήνες. Η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται όταν οι πυρήνες είναι ώριμοι (Barrier-Guillot, 1996).

1.4.2 Φυτάσες

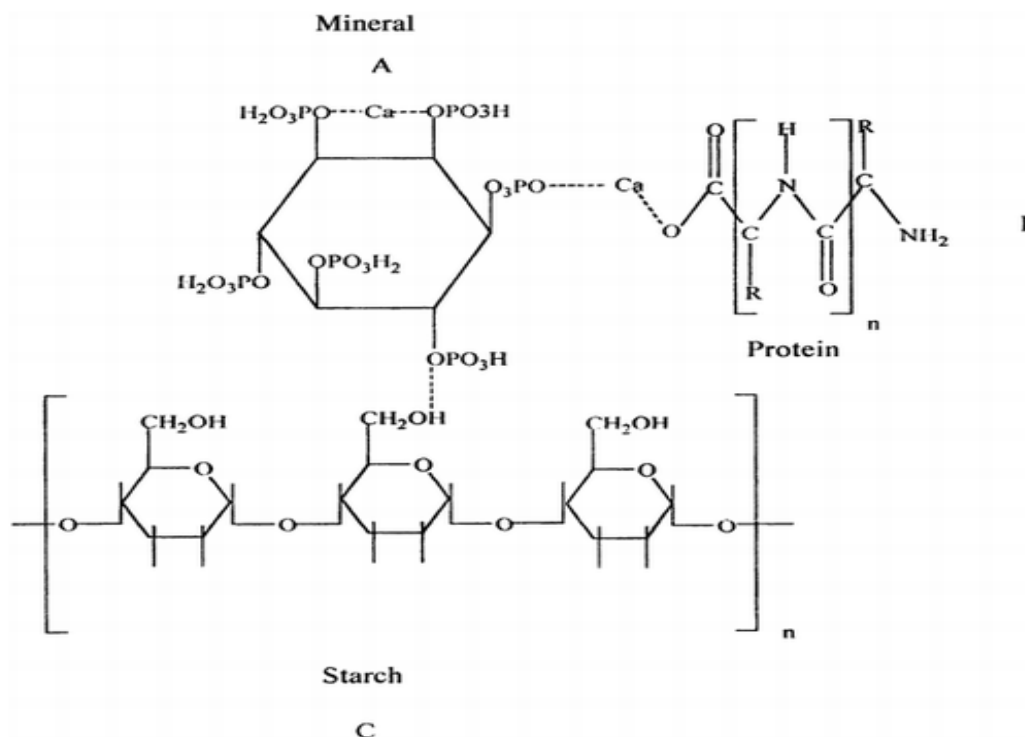
Οι φυτάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν το φυτικό οξύ σε μυο - ινοσιτόλη και φωσφορικές ινοσιτόλες (IP1- IP5). Διακρίνονται σε δύο μορφές: την 3 - φυτάση, χαρακτηριστική των μικροοργανισμών, και η 6 - φυτάση, που εντοπίζεται στους σπόρους φυτών. Η δράση της φυτάσης εξαρτάται κυρίως από το pH όπου δρα βέλτιστα σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (pH 5,1). Οι φυτάσες των κόκκων των δημητριακών, που βρίσκονται κυρίως στα στρώματα αλευρόνης, εξαιτίας της χαμηλής υγρασίας, δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν και, έτσι, παραμένουν ανενεργές. Με τη βλάστηση ενεργοποιείται η φυτάση προκειμένου να αυξηθεί ο διαθέσιμος φώσφορος για το αναπτυσσόμενο φυτό. Η γενετική σύνθεση και η ποσότητα των ενδογενών φυτασών που υπάρχουν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη διαθεσιμότητα του φωσφόρου στο νέο φυτό.

Σε έρευνα που έγινε στο ψωμί υποδεικνύεται ότι υπάρχουν πηγές φυτασών και εκτός του κόκκου (Türk, 1996). Όταν προστίθεται μαγιά στη ζύμη ψωμιού ολικής άλεσης τα φυτικά μειώνονται σημαντικά, υποδεικνύοντας την ύπαρξη φυτασών στη μαγιά. Βέβαια, το pH της ζύμης του ψωμιού (5,5 – 6,0) αναστέλλει τη δράση των φυτασών, ενώ αν το pH προσαρμοστεί περισσότερο στο ιδανικό για τη φυτάση (περίπου 5,1), το φυτικό οξύ μειώνεται κατά 83 – 96%.

1.4.3 Φυτικό οξύ και μέταλλα

Το φυτικό οξύ εμφανίζει έντονες αντιδιατροφικές ιδιότητες. Έχει την ικανότητα να δεσμεύει, με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, μέταλλα, πρωτεΐνες και άμυλο. Τα συστατικά των τροφίμων, εξαιτίας της δέσμευσης, δέχονται μεταβολές στη διαλυτότητα, τη λειτουργικότητα, την πέψη και την απορροφησιμότητά τους. Ουσιαστικά, όταν βρίσκονται σε κανονικό εύρος pH, οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του φυτικού οξέος αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα συστατικά. Τα μεταλλικά ιόντα έχουν την ικανότητα να συνδεθούν με μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες σχηματίζοντας σύμπλοκα, των οποίων η διαλυτότητα μπορεί να διαφέρει (Rickard, 1997). Επιπλέον, το φυτικό οξύ μπορεί να συνδέεται με πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών φορτίων. Από την άλλη, το άμυλο μπορεί να δεσμευτεί μέσω δεσμών υδρογόνου. Το φυτικό οξύ επηρεάζει διάφορα μέταλλα και θρεπτικά συστατικά,

όπως το ασβέστιο, το νάτριο, ο σίδηρος, το μαγνήσιο, το μαγγάνιο και το χλώριο, ενώ ο ψευδάργυρος σχηματίζει το πιο σταθερό και αδιάλυτο σύμπλοκο.



Εικόνα 4: Αλληλεπίδραση φυτικού οξέος με μέταλλα (Α), πρωτεΐνες (Β) και άμυλο (C).

1.4.4 Τεχνικές προσδιορισμού/ανίχνευσης

Γενικά, οι τεχνικές προσδιορισμού του φυτικού οξέος δεν είναι άμεσες καθώς δεν υφίστανται αντιδραστήρια που να ανιχνεύουν το φυτικό οξύ και τις διάφορες μορφές του. Επίσης, το γεγονός ότι το φυτικό οξύ δεν έχει συγκεκριμένο φάσμα απορρόφησης στις περιοχές του υπεριώδους ή του ορατού φωτός δυσκολεύει ακόμα περισσότερο τον προσδιορισμό του. Έτσι, οι αναλυτικές μέθοδοι έχουν ως αρχή τους την εκχύλιση ή απομόνωση του φυτικού.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον είναι η μέθοδος ανταλλαγής ανιόντων ΑΟΑC. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εμφανίζει σαφή μειονεκτήματα, και συγκεκριμένα την υπερεκτίμηση της ποσότητας του φυτικού οξέος καθώς δεν είναι ικανή να διαχωρίσει το φυτικό οξύ (IP6) από άλλες φωσφορικές ενώσεις της ινοσιτόλης (IP1 – IP5) (Lehrfeld, 1992). Άλλη μία μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) που μπορεί να διαχωρίσει το οξύ από τις φωσφορικές ενώσεις της ινοσιτόλης, αλλά και να το

ποσοτικοποιήσει. Ακόμα, εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και, έτσι, μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλές συγκεντρώσεις στα διάφορα προϊόντα. Τα μειονεκτήματά της αφορούν τα αντιδραστήριά της, τα οποία πρέπει να είναι καθαρά χωρίς μέταλλα αφού αυτό θα αλλοίωνε τις μετρήσεις (Lehrfeld, 1994).

Στο πείραμα χρησιμοποιείται μια απλή, ποσοτική μέθοδος (K-PHYT), η οποία μετράει τον συνολικό “ελεύθερο φώσφορο”, είναι απαλλαγμένη από τον ανιόντων ανταλλαγής και θα αναλυθεί περισσότερο σε ξεχωριστό κομμάτι.

1.4.5 Διατροφή

Γενικά, οι διατροφικές συνήθειες του δυτικού κόσμου περιέχουν επεξεργασμένα τρόφιμα και χαμηλή πρόσληψη δημητριακών και οσπρίων. Ωστόσο, παρατηρείται στροφή προς δίαιτες πλούσιες σε φυτικές τροφές, μια κίνηση που συνεπάγεται κι αύξηση στην πρόσληψη φυτικών αλάτων και ορισμένες ανεπιθύμητες επιπτώσεις, όπως η μειωμένη απορρόφηση των μετάλλων (Fredlund, 1997). Αυτή η κίνηση ίσως οδηγήσει σε ανεπάρκεια αυτών των μετάλλων στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα ο προαναφερθείς ψευδάργυρος. Ο φυτικός φώσφορος δεν απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό εκτός αν οι φωσφορικές ομάδες έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί από το μόριο της ινοσιτόλης (Fredlund, 1997). Επίσης, ένα πρόβλημα της επεξεργασίας τροφίμων που περιέχουν φυτικό οξύ είναι η αύξηση της αδιαλυτότητας των συμπλεγμάτων μετάλλων - φυτικού οξέος μετά από ορισμένη επεξεργασία. Ως αποτέλεσμα αυτού, η διαθεσιμότητα των πολύτιμων μετάλλων για τη διατροφή του ανθρώπου μειώνεται περαιτέρω. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης (Kivistö, 1986), ένα μείγμα αμύλου, πίτουρου σιταριού και γλουτένης, που ήταν πλούσιο σε φυτικά και είχε παραχθεί με μαγείρεμα εξώθησης (extrusion cooking), μείωσε τα επίπεδα ψευδαργύρου σε ασθενείς που έπασχαν από ειλεοστομία. Αυτό οφείλεται στην αδρανοποίηση των φυτασών. Από την άλλη, διεργασίες όπως η διαβροχή, η βλάστηση και η ακτινοβολία αποδεδειγμένα δρουν καταλυτικά στην υποβάθμιση του φυτικού οξέος (Sandberg, 1991).

Η συγκέντρωση του φυτικού οξέος στα τρόφιμα ποικίλλει αρκετά ανάλογα με τον τύπο των δημητριακών ή οσπρίων και την επεξεργασία που υποβάλλονται. Αυτή μετρήθηκε σε διάφορα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά (Plaami, 1995) και με βάση τα αποτελέσματα, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε φυτικό οξύ σε δημητριακά «πρωινού» βρέθηκε στις νιφάδες κουάκερ ολικής άλεσης (10 μmol / dry wt), ενώ σε δημητριακά με βάση το ρύζι ή το καλαμπόκι η

συγκέντρωση του οξέος ήταν σταθερά χαμηλή. Σχετικά με τους άρτους, υψηλές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε τραγανά ψωμιά αλλά και σε ψωμιά που περιέχουν συνδυασμό σιταριού και βρώμης, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις εμφάνισαν τα ψωμιά με βάση μόνο το σιτάρι. Ακόμα, χαμηλά επίπεδα βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων διακρίνονται σε πολλούς άρτους, πιθανόν εξαιτίας της περιεκτικότητας σε φυτικό οξύ (Türk, 1996). Το ψήσιμο ενός άρτου ολικής άλεσης μειώνει μέσω υδρόλυσης από φυτάσες την περιεκτικότητα σε φυτικά άλατα κατά 50 – 60%. Ένας ακόμη τρόπος για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων επιτυγχάνεται με αλλαγές στη διαδικασία παρασκευής ψωμιού.

Στην περίπτωση των ζωικών τροφίμων, η προσθήκη φυτικού οξέος προστατεύει τους λιπαρούς ιστούς από την υπεροξειδωση, οδηγώντας, μάλιστα, στο συμπέρασμα ότι το φυτικό οξύ προστατεύει από την οξειδωτική υποβάθμιση των λιπαρών τροφίμων (Lee, 1995). Ιδιότητες όπως αυτή έχουν οδηγεί τη βιομηχανία τροφίμων να αναγνωρίσει το φυτικό οξύ ως μια προστιθέμενη ουσία που λειτουργεί επικουρικά στην ασφάλεια ενός προϊόντος. Για παράδειγμα, εκτός από το κρέας που προαναφέρθηκε, το φυτικό οξύ προστίθεται σε ιχθυάλευρα, κονσερβοποιημένα θαλασσινά, φρούτα, λαχανικά, noodle, miso, σάλτσα σόγιας, χυμούς και αλκοολούχα ποτά. Το οξύ προσφέρει προστασία κατά του αποχρωματισμού, αύξηση της διατροφικής ποιότητας και αύξηση της διάρκειας ζωής. Αποτελεί ένα ευέλικτο συντηρητικό τροφίμων χάρη στις αντιοξειδωτικές και χηλικές ιδιότητές του.

2 Πειραματικό μέρος: εφαρμογή μικροβιακής ζύμωσης σε σπόρους χαρουπιού

2.1 Σκοπός του πειράματος

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία αποσκοπεί στην αναγνώριση των οφελών και αποτελεσμάτων της ζύμωσης σε δείγματα σπόρων των καρπών της χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua L.*), με μεγαλύτερη έμφαση ως προς την επιρροή της στην πεπτικότητα των πολύπλοκων πρωτεϊνών που απαρτίζουν το υπόστρωμα και στην παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων με την μεσολάβηση των κατάλληλων μικροοργανισμών.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Υλικά και εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω:

- Αναλυτικοί ζυγοί ακριβείας (KERN EW και Chyo JR-200)
- Επωαστικοί κλίβανοι (Mettler)
- Υδατόλουτρο (Mettler)
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Λύχνοι Bunsen
- Ηλεκτρόδιο pH και θερμοκρασίας (HANNA Instruments HI 8010)
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Αναδευτήρας σωλήνων Vortex Genie 2
- Αναδευτήρας Multi Vortex Genie Digital
- Blender (Waring)
- Μετρητής αποικιών (Stuart SC6)
- Θάλαμος βιολογικής ασφαλείας – Απαγωγός (Haier)
- Συσκευή φυγοκέντρησης (Heraeus Biofuge Pico)
- Γυάλινες τζάρες αναερόβιωσης
- Φιλμ για την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών (Thermo Scientific: Anaerogen™ 2.5L)
- Πιπέτα
- Tips
- Πλαστικά σιφώνια 5 mL
- Πουάρ
- Ποτήρια ζέσεως (100, 250 και 500 mL)
- Μπουκάλια με βιδωτό καπάκι (100, 250 και 500 mL)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (50, 100 και 500 mL)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πλαστικοί σωλήνες HCPP φυγοκέντρησης (FALCON, BD)
- Πλαστικά σωληνάκια Eppendorf 1,5 mL
- Ορθογώνια σωληνάκια με πλαστικό πώμα (10 mL)
- Τρυβλία Petri
- Μεταλλικά κατσαρολάκια
- Μεταλλικά και πλαστικά κουτάλια – σπάτουλες
- Spreader
- Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- Κόσκινο
- Αλουμινόχαρτο
- Πλαστική λεκάνη

Για την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών ζύμωση, πεπτικότητας και μικροβιολογικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια και υποστρώματα:

- Αραιωτικό υγρό
- α – χυμοθρυψίνη (Fluka BioChemika)

- Καλλιέργεια *Lactobacillus plantarum* (WildBrew Sour Pitch™)
- Καλλιέργεια *Saccharomyces cerevisiae* (Still Spirits™: Turbo Yeast – Classic 8)
- Θρεπτικό υπόστρωμα PCA (Plate Count Agar)
- Θρεπτικό υπόστρωμα MRS
- Θρεπτικό υπόστρωμα Rose-Bengal Agar (RBA)
- Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA
- Petrifilm για την ανάπτυξη ζυμών – μυκήτων
- Παγκρεατίνη
- Δείγμα σπόρων χαρουπιών (αποστειρωμένο και μη)
- Απιονισμένο νερό (αποστειρωμένο και μη)
- Υδροχλωρικό οξύ, 0,1 M/Καυστικό νάτριο, 0,1 M (για τη ρύθμιση της οξύτητας)

Τέλος, για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους ποσοτικού προσδιορισμού φυτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το kit της Megazyme K-PHYT 05/19 το οποίο περιέχει 6 φιαλίδια εκ των οποίων περιλαμβάνονται:

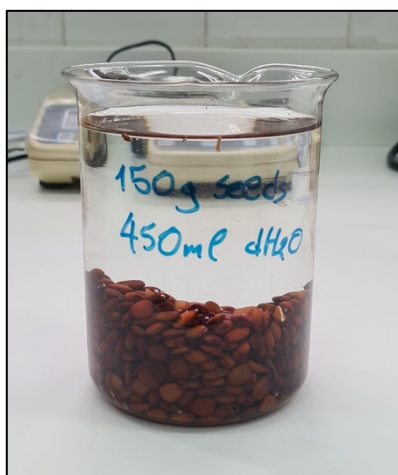
- Φιαλίδιο 1: Buffer 1 (pH 5,5) και υδραζωτικό νάτριο (NaN_3) (0,02 % w/v) (χρήση ως συντηρητικό)
- Φιαλίδιο 2: Εναιώρημα φυτάσης
- Φιαλίδιο 3: Buffer 2 (pH 10,4), MgCl_2 , ZnSO_4 και NaN_3 (0,02% w/v) ως συντηρητικό
- Φιαλίδιο 4: Εναιώρημα αλκαλικής φωσφατάσης (ALP)
- Φιαλίδιο 5: Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και NaN_3 0,02% w/v ως συντηρητικό
- Φιαλίδιο 6: Πρότυπο αλεύρι βρώμης (oat control)

Το πείραμα εκτός από την χρήση του εμπορικού kit περιλάμβανε και την παραγωγή των εξής αντιδραστηρίων:

- Δείκτης, (προϊόν ανάμιξης δύο διαλυμάτων):
 - Διάλυμα A: Ασκορβικό οξύ (10% w/v)/Θειικό οξύ (1 M)
 - Διάλυμα B: Μολυβδαινικό αμμώνιο (5% w/v)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) (0,66 M)
- Καυστικό νάτριο (NaOH) (0,75 M)
- Τριγλωροξικό οξύ (50% w/v)

2.2.2 Προκατεργασία/Προετοιμασία δειγμάτων (Dordević et al, 2010)

Ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν λοβοί χαρουπιών 2 παρτίδων: η μια από χαρουπόδεντρα του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και η άλλη από δέντρα της Κρήτης. Προηγήθηκε πλύσιμο των λοβών και διαχωρισμός των σπόρων από τη σάρκα των λοβών (με τη χρήση πένσας) και συλλογή των σπόρων. Λαμβάνονται 150 γραμμάρια σπόρων και αφήνονται να μουλιάσουν σε απεσταγμένο νερό (αναλογία σπόροι – νερό 1:3) για όλο το βράδυ (overnight). Την επόμενη μέρα ακολουθεί ξήρανση των σπόρων στον κλίβανο επίσης overnight στους 40 °C και την επόμενη ημέρα η άλεση τους στο blender (συσκευή Waring) για την λήψη του χαρουπάλευρου. Το χαρουπάλευρο που προκύπτει μπορεί να συντηρηθεί στην κατάψυξη για μελλοντικές χρήσεις και αναλύσεις. Στην μια εκ των τριών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε δείγμα αλεύρου σπόρων ύστερα από βρασμό για 10 min, και στην 2^η ανάλυση, δείγμα ύστερα από αποστείρωση (121,1 °C, 1h).



Εικόνα 5: Μούλιασμα των σπόρων χαρουπιών (αναλογία σπόρων - νερού 1:3).



Εικόνα 6: Σπόροι χαρουπιών μετά τη ξήρανση.



Εικόνα 7: Σπόροι χαρουπιών πριν την άλεση στο blender (Waring).



Εικόνα 8: Δείγματα σπόρων χαρουπιών μετά την άλεση (δεξιά: αποστειρωμένο δείγμα).

2.2.3 Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει 2 βασικά στάδια:

2.2.3.1 Ζύμωση (Fermentation)

Λαμβάνονται 3 τρυβλία σε καθένα εκ των οποίων προστίθενται μετά από ακριβή ζύγιση 5,0 g αλεύρου σπόρων χαρουπιών. Το αλεύρι είναι προτιμότερο να κοσκινίζεται κατά τη ζύγιση διότι οι εναπομείναντες σπόροι που δεν διαλύθηκαν με την άλεση τους αυξάνονται σε μέγεθος με την προσθήκη του νερού ή των καλλιεργειών όσο παραμένουν στο κλίβανο για την εκπόνηση της ζύμωσης, δυσχεραίνοντας την διαδικασία. Στα τρυβλία προστίθενται:

- Στο πρώτο: 5,0 g δείγματος αλεύρου και 14,0 mL αποστειρωμένου νερού (Control)
- Στο δεύτερο: 5,0 g δείγματος αλεύρου και 14,0 mL καλλιέργειας οξυγαλακτικών (LAB), στην δική μας περίπτωση καλλιέργεια *Lactobacillus plantarum* (προϊόν WildBrew Sour Pitch™) και
- Στο τρίτο: 5,0 g δείγματος αλεύρου και 14,0 mL καλλιέργειας ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*) (προϊόν Turbo Yeast – Classic 8 της Still Spirits™)

- Σε τέταρτο τρυβλίο και για μια δοκιμή προσδιορισμού φυτικού οξέος: 5,0 g δείγματος αλεύρου και 14,0 mL καλλιέργειας *Aspergillus oryzae* (απομόνωση από ρύζι koji)

Οι μικροβιακές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με τον εξής τρόπο:

- Σε δύο FALCON ζυγίζονται με ακρίβεια 0,2 g καλλιέργειας οξυγαλακτικών και ζύμης αντίστοιχα και προστίθενται 20,0 mL αραιωτικού υγρού στο καθένα (0,2 g σε 20,0 mL: αραιώση 10^{-2})
- Ανάδευση στο Vortex
- Συντήρηση προσωρινά σε θερμοκρασία δωματίου ή για μεγαλύτερα διαστήματα στους 4 °C.

Σε ασηπτικές συνθήκες μεταφέρονται οι κατάλληλες ποσότητες νερού και των καλλιεργειών με τη χρήση σιφωνίου, διαβρέχοντας το άλευρο σε κάθε σημείο του τρυβλίου. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο για την διαδικασία της ζύμωσης στους 37 °C για 24h και 48h.

2.2.3.2 Πεπτικότητα (Digestibility)

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο (HSU et al., 1977), λαμβάνονται 50 mL υδατικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που περιέχει 6,25 mg/mL. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς πρέπει να ζυγιστούν με ακρίβεια:

$$\begin{aligned} &6,25 \text{ mg σε } 1 \text{ mL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος} \\ &\underline{\underline{x \text{ mg σε } 50 \text{ mL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος}}} \\ &x = 50 \cdot 6,25 \Leftrightarrow x = \mathbf{312,5 \text{ mg}} \text{ ή } \mathbf{0,3125 \text{ g}} \end{aligned}$$

Συνεπώς, σύμφωνα με τους υπολογισμούς, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,3125 g από τα τρυβλία σε 50 mL dH₂O σε ποτήρια ζέσεως, για κάθε δείγμα. Τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 37 °C και ρυθμίζονται σε pH 8,0 με τη χρήση HCl, 0,1 N και NaOH, 0,1 N υπό συνεχή ανάδευση. Παρασκευάζεται διάλυμα πολυενζύμων 40 mL (συνολική ποσότητα ενζύμων 6,0 mg/mL) χρησιμοποιώντας παγκρεατίνη (pH_{opt} = 8,0 ± 0,1) και χυμοθρυψίνη (pH_{opt} ≈ 8,0) σε αναλογία 1:1 (3,0 mg από το καθένα). Λαμβάνουμε έτσι:

3,0 mg παγκρεατίνης ή χυμοθρυψίνης σε 1 mL διαλύματος

x mg παγκρεατίνης ή χυμοθρυψίνης σε 40 mL διαλύματος

$$x = 120 \text{ mg ή } 0,12 \text{ g από το κάθε ένζυμο}$$

Τα ένζυμα προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως με 40 mL dH₂O και το διάλυμα πολυενζύμων τοποθετείται σε παγόλουτρο όπου και παραμένει σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Όπως και τα δείγματα, το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 8,0 με τη χρήση NaOH/HCl 0,1 N. Αφού ρυθμιστεί σωστά το pH σε κάθε δείγμα, με σιφόνιο ρίχνονται 5,0 mL από το διάλυμα των ενζύμων σε κάθε δείγμα και μετράται το pH κάθε λεπτό για 10 min. Παρατηρείται σταδιακή μείωση του pH που οφείλεται στην απελευθέρωση των καρβοξυλομάδων των αμινοξέων από την πρωτεϊνική αλυσίδα λόγω της δράσης των ενζύμων, τα οποία υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς.

2.2.3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Ταυτόχρονα με τις παραπάνω διαδικασίες εκτελούνται και μικροβιολογικές αναλύσεις των δειγμάτων για κάθε ημέρα ζύμωσης (0h, 24h και 48h) με σκοπό και την επαλήθευση E. Οι αρχικές καλλιέργειες ελέγχονται ως προς τη δράση τους με ενσωμάτωση ή επίστρωση στα κατάλληλα εκλεκτικά υποστρώματα τους και στη συνέχεια επώαση στις ιδανικές για αυτά συνθήκες θερμοκρασίας και για τον κατάλληλο χρόνο. Παρά τις ασηπτικές συνθήκες που πρέπει να τηρούνται, απαιτείται να ελέγχεται η μικροβιολογική κατάσταση (π.χ. η OMX) των αρχικών όσο και των μετά τη ζύμωση δειγμάτων για τον καθορισμό του μικροβιακού φορτίου κατά την διαδικασία της ζύμωσης.

Παρασκευάζονται τα κατάλληλα υποστρώματα για την κάθε μικροβιολογική ανάλυση συμφωνά με τις οδηγίες και τις αναλογίες που αναφέρονται στα δοχεία τους. Παρασκευάζονται, επίσης, σωληνάκια με αραιωτικό υγρό για τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις που απαιτούνται για την ανάλυση και την σαφή αναγνώριση και υπολογισμό του αρχικού αριθμού των μικροοργανισμών που ελέγχονται. Δηλαδή χρησιμοποιούνται σωληνάκια ώστε να έχουμε καταμετρήσιμες αποικίες (30 – 300 αποικίες). Χρησιμοποιούμε δύο τρυβλία για κάθε μία αραιώση για την λήψη αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων.

Για τον έλεγχο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) παρασκευάζεται υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA) στο οποίο χρησιμοποιείται η τεχνική της ενσωμάτωσης: 1,0 mL από κάθε αραιώση τοποθετείται σε κάθε τρυβλίο και στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα σε υγρή μορφή μέχρι να καλυφθεί το τρυβλίο και τα τρυβλία αφήνονται έως ότου να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα. Τέλος, τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση στους 37 °C για 24h.

Για τον έλεγχο της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) παρασκευάζεται υπόστρωμα MRS στο οποίο χρησιμοποιείται επίσης η τεχνική της ενσωμάτωσης. Επειδή τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτελούν μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται κυρίως σε αναερόβιες συνθήκες αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και παρουσία ελάχιστης ποσότητας οξυγόνου (μικροαερόφιλα βακτήρια), τα τρυβλία τοποθετούνται σε ειδικούς θαλάμους αναεροβίωσης στους οποίους τοποθετείται φάκελος αναεροβίωσης. Οι θαλάμοι σφραγίζονται και τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση στους 37 °C για 48h.

Τέλος, για τον έλεγχο της δράσης των ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae*) παρασκευάζεται εκλεκτικό χρωμογόνο υπόστρωμα Rose-Bengal Agar (RBA) στο οποίο χρησιμοποιείται η τεχνική της επίστρωσης: προστίθεται το υπόστρωμα στα τρυβλία μέχρι να επικαλυφθούν όλα και αφήνονται να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα. Αφού στερεοποιηθεί, 0,1 mL από κάθε αραιώση προστίθεται στο κατάλληλο τρυβλίο και επιστρώνονται με τη χρήση σπάτουλας spreader. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση στους 25 °C για 48h.

2.2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φυτικού οξέος

Το ποσό του φυτικού οξέος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με την χρήση κιτ σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Megazyme K-PHYT 05/19. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται το ποσό του φωσφόρου που απελευθερώνεται με την επίδραση των ενζύμων φυτάση και αλκαλική φωσφατάση και με την χρήση εμπειρικών εξισώσεων προσδιορίζεται το ποσό του φυτικού οξέος τόσο στα αρχικά όσο και στα ζυμωμένα δείγματα.

Το κιτ που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει συνολικά έξι φιαλίδια/αντιδραστήρια τα οποία αναφέρονται παραπάνω. Παράλληλα, παρασκευάζονται τα αντιδραστήρια που απαιτούνται και δεν εμπεριέχονται στο κιτ σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει συνολικά 4 στάδια:

1. Εκχύλιση δείγματος: ζυγίζεται ποσότητα δείγματος σε FALCON και προστίθεται υδροχλώριο (0,66 M). Τα δείγματα τίθενται σε συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για όλη τη νύχτα (το ελάχιστο 3 ώρες). Μετά το πέρας της ανάδευσης, μεταφέρεται ποσότητα από το εκχύλισμα κάθε δείγματος σε σωληνάκια Eppendorf 1,5 mL και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά. 0,5 mL από το υπερκείμενο μέρος μεταφέρονται σε νέα σωληνάκια Eppendorf 1,5 mL και εξουδετερώνονται με την προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH).

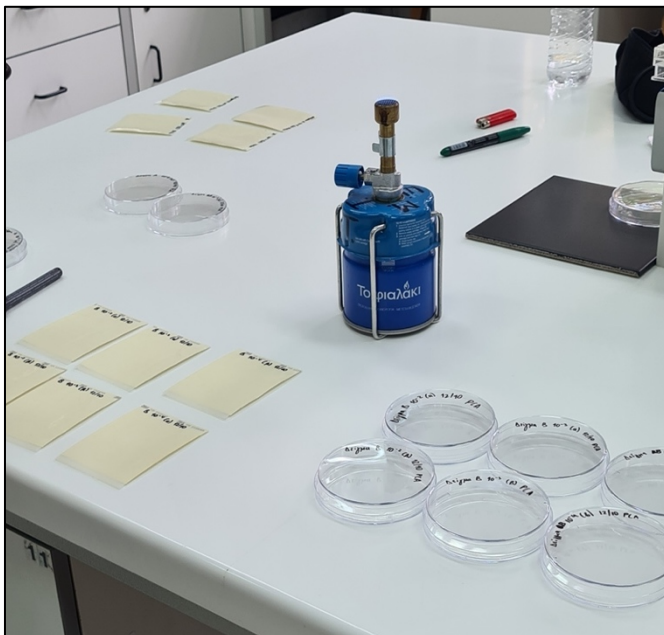
2. Ενζυμική αντίδραση αποφωσφορυλίωσης: προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων με σκοπό τον προσδιορισμό του φωσφόρου στα δείγματα σε δύο μορφές: τον ελεύθερο φώσφορο (Free Phosphorus) και τον ολικό φώσφορο (Total Phosphorus). Παρατηρούνται διαφορές τόσο στις ποσότητες των αντιδραστηρίων που προστίθενται και στις δυο περιπτώσεις όσο και στο γεγονός ότι τα ένζυμα δεν εισάγονται στα δείγματα που αναλύονται για τον ελεύθερο φώσφορο (εφόσον προσδιορίζουμε τον μη συμπλοκοποιημένο στην δομή του φυτικού οξέος φώσφορο). Οι ποσότητες που εισάγονται σε κάθε περίπτωση αναφέρονται αναλυτικά στο πρωτόκολλο της Megazyme K-PHYT 05/19. Χρησιμοποιούνται τα ένζυμα φυτάση και αλκαλική φωσφατάση τα οποία υδρολύουν τους δεσμούς φωσφόρου του φυτικού οξέος με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τόσο φώσφορος όσο και μεταλλικά ιόντα. Τα δείγματα αναδεύονται καλά στο vortex σε κάθε στάδιο, επωάζονται στους 40 °C και εισάγονται για φυγοκέντριση στις 13000 rpm.

3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου: τα δείγματα τοποθετούνται μαζί με τον δείκτη σε κυψελίδες και επωάζονται σε υδατόλουτρο για 1h στους 40 °C. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση στα 655 nm (περιοχή ορατής ακτινοβολίας), υπολογίζονται οι κατάλληλες παράμετροι και συγκρίνονται τα αποτελέσματα με πρότυπες τιμές.

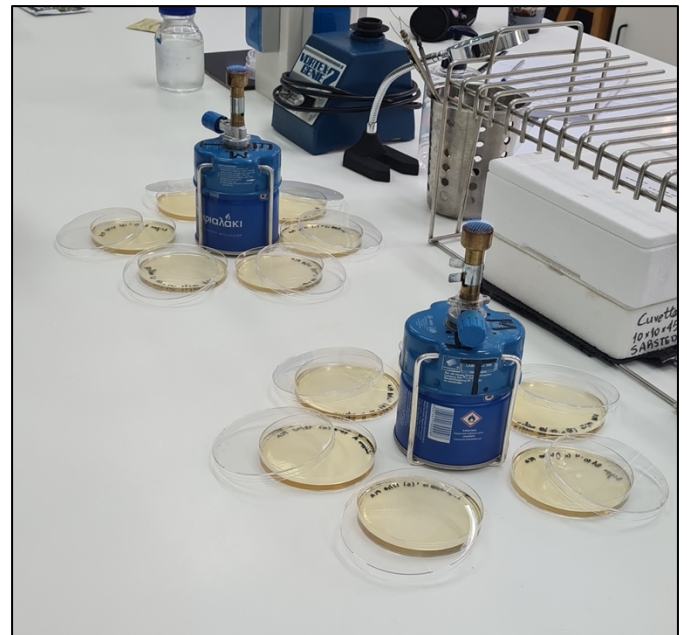
3 Αποτελέσματα

Για την 1^η πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η παρτίδα χαρουπιών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής από τα οποία μετά την απομόνωση των σπόρων από τους λοβούς και με την κατάλληλη προκατεργασία παρασκευάστηκαν δύο δείγματα αλεύρου σπόρου (άλυρο Α και Β), ένα εκ των οποίων υπέστη βρασμό (Β). Ακολούθησε η πειραματική πορεία που αναφέρεται

παραπάνω και δοκιμάστηκε η προσθήκη 5,0 mL dH₂O σε κάθε δείγμα Control (Ctrl A, Ctrl B) και 5,0 mL των κατάλληλων καλλιεργειών σε κάθε δείγμα Yeast (Yeast A, B) και LAB (LAB A, B). Τα δείγματα εισάχθηκαν για επώαση στους 37 °C για την πρώτη ζύμωση των 24h. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις OMX και έλεγχος για ζύμες/μύκητες για τα δείγματα A και B χρησιμοποιώντας υπόστρωμα PCA και Petrifilm (3M Petrifilm) αντίστοιχα αφού προηγήθηκε η παρασκευή υποστρώματος, αραιωτικού υγρού και διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις: 0,1 g δείγματος σπόρου σε 9 mL αραιωτικού υγρού (10^{-2}) και αραιώση έως και 10^{-4} .



Εικόνα 9: Biofilm και τρυβλία για μικροβιολογικές αναλύσεις (0h).



Εικόνα 10: Τρυβλία με PCA μετά την ενσωμάτωση για την ανάλυση OMX.

Εμβολιάζουμε κάθε φιλμ και τρυβλίο με κάθε αραιωμένο δείγμα (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) με την τεχνική της ενσωμάτωσης (λήψη 0,1 mL εμβολίου) και τοποθετούμε τα δείγματα για επώαση (OMX: 37 °C για 24h, Biofilm: 25 °C για 48h). Μετά την επώαση, λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 1: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών του ΠΑΔΑ (αριστερά: Δείγμα Α χωρίς βρασμό, δεξιά: Δείγμα Β με βρασμό) (0h).

Δείγμα Α	OMX	
Αραίωση	Τρυβλίο (α)	Τρυβλίο (β)
10 ⁻²	27	32
10 ⁻³	3	2
10 ⁻⁴	6	1

Δείγμα Β	OMX	
Αραίωση	Τρυβλίο (α)	Τρυβλίο (β)
10 ⁻²	4	3
10 ⁻³	12	1
10 ⁻⁴	2	2

Δείγμα Α	Petrifilm	
Αραίωση	Φιλμ (α)	Φιλμ (β)
10 ⁻²	>300	>300
10 ⁻³	<30	<30
10 ⁻⁴	0	0

Δείγμα Β	Petrifilm	
Αραίωση	Φιλμ (α)	Φιλμ (β)
10 ⁻²	>300	>300
10 ⁻³	<30	<30
10 ⁻⁴	0	0

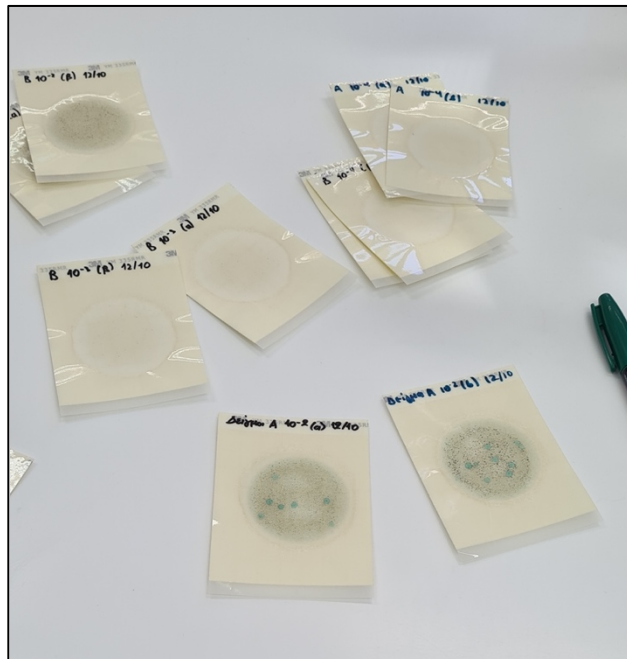
Σύμφωνα με τους κανόνες αρίθμησης της APHA (American Public Health Association) λαμβάνονται υπόψη μόνο τρυβλία που έχουν 30 – 300 αποικίες ή μικρότερες των 30, ενώ αποικίες μεγαλύτερες των 300 θεωρούνται μη μετρήσιμες και δεν συνεχίζεται η καταμέτρηση. Δεδομένου ότι έχουμε 2 τρυβλία. Τα αποτελέσματα για το δείγμα Β στην OMX ανάλυση αποδεικνύουν ότι συνέβη επιμόλυνση κατά τη διαδικασία λόγω λανθασμένων χειρισμών. Λαμβάνοντας τον μέσο όρο μεταξύ των δύο τρυβλίων για την μεγαλύτερη αραιώση, τα αποτελέσματα της OMX ανάλυσης δείχνουν ότι στα αρχικά δείγματα υπήρχαν συνολικά:

$$CFU/g = 29,5 \times 10^2 \approx 3 \cdot 10^3 \text{ cfu/g δείγματος Α}$$

$$CFU/g = 3,5 \cdot 10^2 \text{ cfu/g δείγματος Β}$$

Από τα αποτελέσματα των Petrifilm μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και τα δύο αρχικά δείγματα περιείχαν άνω των $3 \cdot 10^4 \text{ cfu/g}$ ζύμες - μύκητες. Τα ευρήματα αυτά διαβεβαιώνουν την ύπαρξη μεγάλου αριθμού μικροβίων στα μητρικά δείγματα είτε λόγω του υψηλού αρχικού μικροβιακού φορτίου των καρπών είτε λόγω τυχόντων επιμολύνσεων στον εργαστηριακό χώρο που καθιστούν αδύνατη ή δύσκολη την λήψη ορθών αποτελεσμάτων στα επόμενα βήματα. Προσπαθούμε όσο το δυνατόν περισσότερο η ζύγιση της ποσότητας αλεύρου

και η προσθήκη του απεσταγμένου νερού (Control) και των κατάλληλων καλλιεργειών (LAB, Yeast) να γίνονται σε ασηπτικές συνθήκες είτε με τη χρήση λύχνου Bunsen ή απαγωγού για την παρεμπόδιση επιμολύνσεων που δυσχεραίνουν την απόδοση της ζύμωσης.



Εικόνα 11: Biofilm ζυμών/μυκήτων όπου φαίνονται και οι ορατές αποικίες.

Γενικά, μετά την επώαση και για κάθε ημέρα ζύμωσης, ελέγχονται επιφανειακά όλα τα τρυβλία (Control, LAB, Yeast) με το δείγμα αλεύρου σπόρου και τις προστιθέμενες καλλιέργειες για τυχόν αλλοιώσεις ή επιμολύνσεις. Την πρώτη ημέρα ζύμωσης παρατηρήθηκε ξήρανση σε όλα τα τρυβλία λόγω της χαμηλής ποσότητας νερού που περιείχαν ενώ στα τρυβλία με τις καλλιέργειες ζύμης (Yeast A, Yeast B) ήταν εμφανές το αποτέλεσμα της ζύμωσης λόγω της ανάπτυξης ευχαριστών οσμών ζύμωσης. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση του πειράματος της πεπτικότητας, η πορεία της οποίας αναφέρεται παραπάνω. Χρησιμοποιήθηκαν πεψίνη ($pH_{opt.} = 1,2 - 2,5$) και χυμοθρυψίνη ($pH_{opt.} = 7,0 - 9,0$) ως παράγοντες πρωτεόλυσης για την παρασκευή του διαλύματος πολυενζύμων. Με βάση το πρωτόκολλο, το διάλυμα ρυθμίζεται σε $pH = 8$ με NaOH/HCl και τοποθετείται σε



Εικόνα 12: Δείγματα αλεύρου σπόρου μετά την επώαση 24h όπως φαίνονται από τον επωαστικό κλίβανο. Από πάνω αριστερά και δεξιόστροφα φαίνονται:

(α) Yeast B , (β) LAB B, (γ) Control B, (δ) Control A, (ε) LAB A , (στ) Yeast A

παρόλουτρο μέχρι την χρήση του. Μετρήθηκε το αρχικό pH των δειγμάτων και ρυθμίστηκε επίσης στο 8 πριν την εκκίνηση του πειράματος της πεπτικότητας.

Πίνακας 2: Αρχικές τιμές pH των δειγμάτων για 0h και 24h ζύμωσης.

Αρχικές τιμές pH δειγμάτων (0h)				
Δείγμα	pH ₁	pH ₂	pH ₃	pH _{μέσο}
Control A	5,96	6,09	6,05	6,03
Control B	6,05	6,13	6,15	6,11

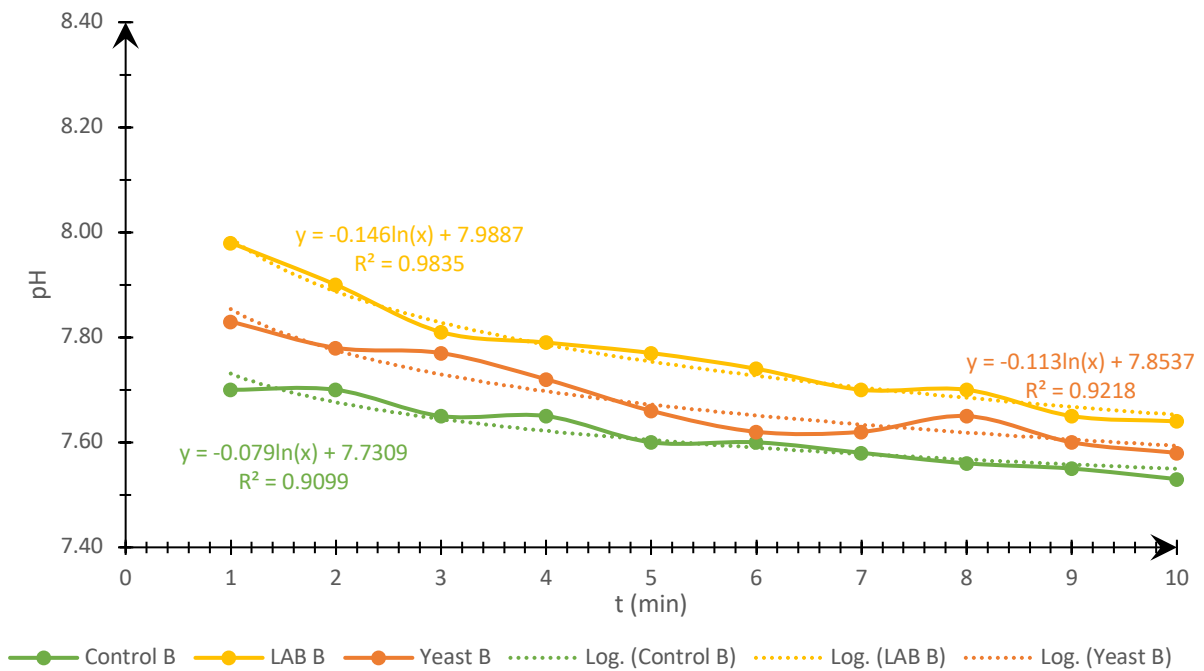
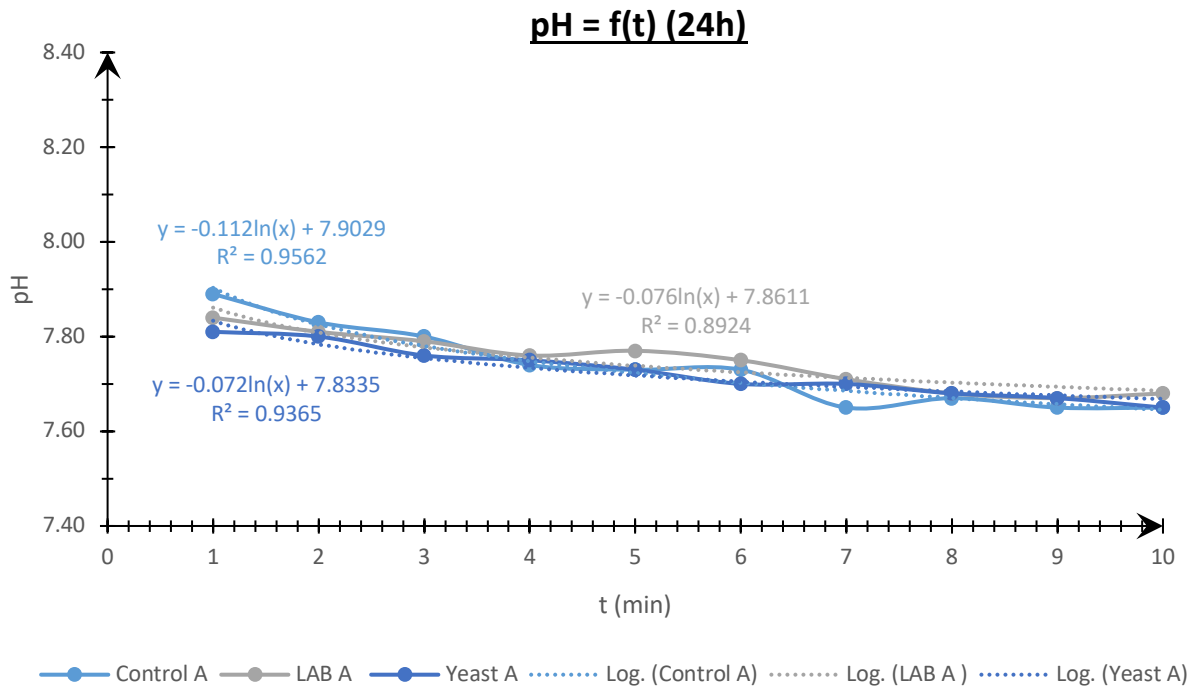
Αρχικές τιμές pH δειγμάτων (24h)	
Δείγμα	pH
Control A	4,80
Control B	6,00
LAB A	6,25
LAB B	6,90
Yeast A	5,63
Yeast B	6,14

Παρατηρείται μείωση του pH των Control δειγμάτων μετά από ζύμωση μίας ημέρας, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στη ζυμωτική ικανότητα ενδογενών ενζύμων των σπόρων των χαρουπιών είτε στη δραστηριότητα ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Μετά τη ρύθμιση του pH των δειγμάτων, τα δείγματα εισάγονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C και προστίθενται 5,0 mL διαλύματος πολυενζύμων (t = 0). Μετράται το pH ανά διάστημα ενός λεπτού και για συνολική διάρκεια 10 λεπτά σε κάθε δείγμα:

Πίνακας 3: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας μετά από ζύμωση 24h.

pH (24h)						
t (min)	Control A	Control B	LAB A	LAB B	Yeast A	Yeast B
0	7,93	7,90	7,90	8,00	7,90	7,95
1	7,89	7,70	7,84	7,98	7,81	7,83
2	7,83	7,70	7,81	7,90	7,80	7,78
3	7,80	7,65	7,79	7,81	7,76	7,77
4	7,74	7,65	7,76	7,79	7,75	7,72
5	7,73	7,60	7,77	7,77	7,73	7,66
6	7,73	7,60	7,75	7,74	7,70	7,62
7	7,65	7,58	7,71	7,70	7,70	7,62
8	7,67	7,56	7,68	7,70	7,68	7,65

9	7,65	7,55	7,67	7,65	7,67	7,60
10	7,65	7,53	7,68	7,64	7,65	7,58



Διάγραμμα 1: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου μετά την επίδραση των ενζύμων στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ μετά από ζύμωση μίας ημέρας (24h).

Βάσει των παραπάνω, πιο ικανοποιητική θεωρείται η πτώση pH των δειγμάτων Yeast B και Control B, το οποίο φαίνεται και από τις μεγαλύτερες κλίσεις των καμπυλών και υποδηλώνει την βελτιωμένη πεπτικότητα των πρωτεϊνών όταν το δείγμα έχει επεξεργαστεί θερμικώς, πιθανότατα λόγω διάσπασης των αρχικών πολύπλοκων πρωτεϊνών κατά τη θερμική μεταποίηση. Μία άλλη πιθανή απάντηση σε αυτό το ερώτημα μπορεί να θεωρηθεί η μετουσίωση της κλάσματος πρωτεϊνών το οποίο είναι μη επιθυμητό στη συγκεκριμένη περίπτωση, εφόσον μελετάται η μεταβολή της πεπτικότητας μετά τη ζυμωτική δραστηριότητα των μικροοργανισμών.



Εικόνα 13: Μέτρηση pH στο υδατόλουτρο.

Παράλληλα, εκτελέστηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για τα δείγματα για την πρώτη ημέρα ζύμωσης. Αφού πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, παρασκευάστηκαν υποστρώματα PCA και MRS Agar σύμφωνα με της οδηγίες που αναγράφονται της συσκευασίες και της ποσότητες που απαιτήθηκαν για τον έλεγχο OMX και την ανάλυση της βιωσιμότητας οξυγαλακτικών αντίστοιχα. Για τον έλεγχο ζυμών/μυκήτων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν Biofilm. Λόγω της συμπεριφοράς των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως μικροαερόφιλα, τα MRS τρυβλία εισάγονται σε γυάλινη τζάρα με φιλμ για την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών (Thermo Scientific: Anaerogen™ 2.5L) και εισάγονται για επώαση της 37 °C για 48h. Μετά το πέρας της επώασης βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών του ΠΑΔΑ (24h).

Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση		
			OMX	LAB (MRS)	Z/M (Petrifilm)
Control A	10 ⁻²	(α)	> 300	-	< 30 (6)
		(β)			< 30 (4)

	10 ⁻³	(α)			0
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Control B	10 ⁻²	(α)	> 300	-	> 300
		(β)			< 30 (3)
	10 ⁻³	(α)			< 30 (4)
		(β)			< 30 (0)
	10 ⁻⁴	(α)			< 30 (0)
		(β)			< 30 (0)
LAB A	10 ⁻²	(α)	-	> 300	< 30 (0)
		(β)			< 30 (7)
	10 ⁻³	(α)			< 30 (1)
		(β)			< 30 (0)
	10 ⁻⁴	(α)			< 30 (0)
		(β)			< 30 (0)
LAB B	10 ⁻²	(α)	-	> 300	< 30 (0)
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Yeast A	10 ⁻²	(α)	> 300	-	> 300
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Yeast B	10 ⁻²	(α)	> 300	-	> 300
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			

	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο συνολικός αριθμός cfu/g αλεύρου σπόρου μετά από ζύμωση της ημέρας για την OMX, τα LAB και της ζύμες ήταν μεγαλύτερος των $3 \cdot 10^5$ CFU/g, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες πολλαπλασιάστηκαν και λειτούργησαν αποτελεσματικά.

Επειδή τα αρχικά δείγματα στα τρυβλία εμφάνισαν πολύ ξηρή επιφάνεια, δοκιμάστηκε η προσθήκη επιπλέον 15,0 mL dH₂O σε κάθε τρυβλίο πριν εισαχθούν στον κλίβανο για την συνέχεια της ζύμωσης. Αυτό οδήγησε σε εμφανές μούχλιασμα των δειγμάτων με δυσάρεστες οσμές και υδαρή υφή, που αποδεικνύει τον αυξημένο αριθμό μικροοργανισμών. Η επιπλέον διαβροχή οδήγησε σε διόγκωση των υπολειμμάτων σπόρων που δυσκόλεψε την ζύγιση των ζυμούμενων δειγμάτων για της μικροβιολογικές αναλύσεις και τη δοκιμασία της πεπτικότητας, γεγονός που οδήγησε στην κοσκίνιση του δείγματος αλεύρου στα μετέπειτα πειράματα.



Εικόνα 14: Δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ μετά από ζύμωση 48h στα οποία παρατηρείται εμφανές μούχλιασμα. Από πάνω αριστερά και δεξιόστροφα φαίνονται:

(α) Yeast A, (β) Control A, (γ) LAB A, (δ) Control B, (ε) Yeast B, (στ) LAB B

Με την δοκιμή της πεπτικότητας βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 5: Αρχικές τιμές pH δειγμάτων αλεύρου σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ μετά από ζύμωση 2 ημερών (48h).

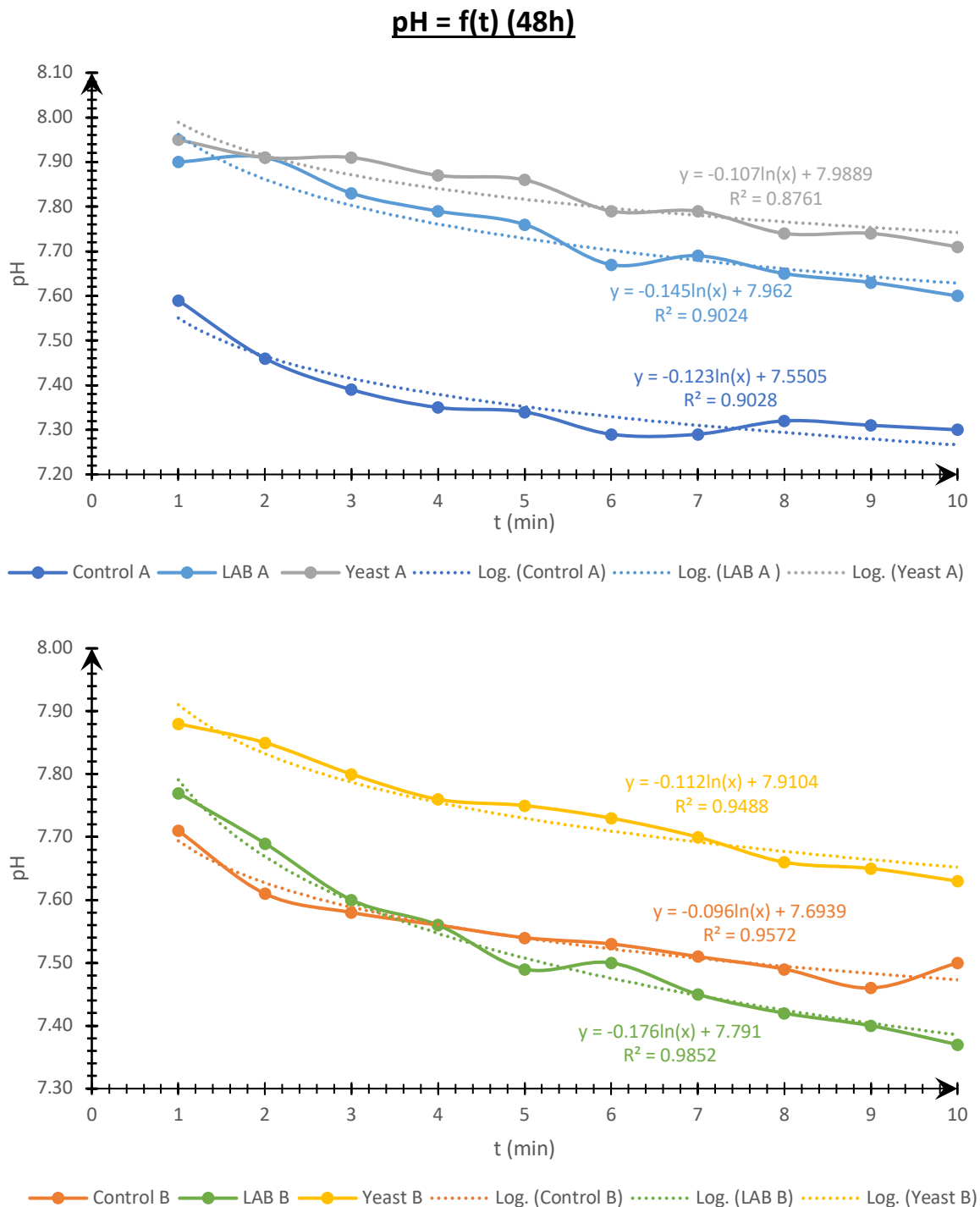
Αρχικές τιμές pH δειγμάτων (48h)	
Δείγμα	pH
Control A	6,91
Control B	5,83
LAB A	5,43
LAB B	6,83
Yeast A	6,36
Yeast B	7,35

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας μετά από ζύμωση 48h.

pH (48h)						
t (min)	Control A	Control B	LAB A	LAB B	Yeast A	Yeast B
0	7,77	7,90	7,90	7,93	8,00	7,89
1	7,59	7,71	7,90	7,77	7,95	7,88
2	7,46	7,61	7,91	7,69	7,91	7,85
3	7,39	7,58	7,83	7,60	7,91	7,80
4	7,35	7,56	7,79	7,56	7,87	7,76
5	7,34	7,54	7,76	7,49	7,86	7,75
6	7,29	7,53	7,67	7,50	7,79	7,73
7	7,29	7,51	7,69	7,45	7,79	7,70
8	7,32	7,49	7,65	7,42	7,74	7,66
9	7,31	7,46	7,63	7,40	7,74	7,65
10	7,30	7,50	7,60	7,37	7,71	7,63

Σε αντίθεση με τη δοκιμή την πρώτη ημέρα ζύμωσης, τα LAB δείγματα (ιδιαίτερα στο δείγμα έπειτα από βρασμό) παρουσίασαν την μεγαλύτερη πτώση pH εντός 10 λεπτών, γεγονός που επαληθεύεται και από τις υψηλότερες κλίσεις των μεταβολών τους συναρτήσει τον χρόνο. Για

τον μικροβιολογικό έλεγχο εκτελέστηκαν οι παρακάτω αναλύσεις με την μόνη διαφορά ότι αντί για Biofilm χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία επιστρωμένα με υπόστρωμα Rose Bengal Agar (RBA), εκλεκτικό για ζύμες/μύκητες:



Διάγραμμα 2: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου μετά την επίδραση των ενζύμων στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ μετά από ζύμωση δύο ημερών (48h).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών του ΠΑΔΑ (48h).

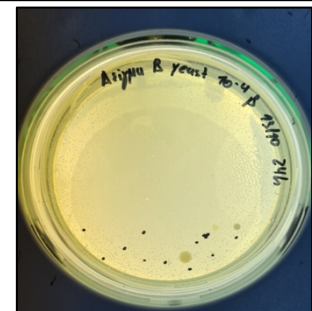
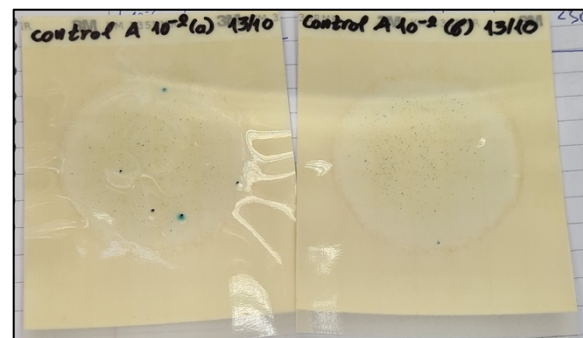
Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση		
			OMX (PCA)	LAB (MRS)	Z/M (RBA)
Control A	10 ⁻²	(α)	> 300	-	-
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Control B	10 ⁻²	(α)	> 300	-	-
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
LAB A	10 ⁻²	(α)	-	> 300	-
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
LAB B	10 ⁻²	(α)	-	> 300	-
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Yeast A	10 ⁻²	(α)	-	-	> 300 * 2 αποικίες μυκήτων
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			

	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Yeast B	10 ⁻²	(α)	-	-	> 300
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			

Οι συνολικές αποικίες βρέθηκαν ξανά μεγαλύτερες των $3 \cdot 10^5$ CFU/g τόσο για την OMX (Control A και B) όσο και για τα οξυγαλακτικά (LAB A, B) και τις ζύμες/μύκητες (Yeast A, B). Στο Yeast A μάλιστα βρέθηκαν και 2 αποικίες μυκήτων από το οποίο γίνεται σαφής η αλλοίωση του δείγματος.



Εικόνα 15: Γυάλινη τζάρα στην οποία περιέχονται τα τρυβλία με MRS και φιλμ ανάπτυξης αναερόβιων συνθηκών.



Εικόνα 16: Ενδεικτικά αποτελέσματα Biofilm του Control A δείγματος για την 10⁻² αραιώση και OMX του δείγματος Yeast B για την 10⁻⁴ αραιώση.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρώτη πειραματική διαδικασία εμφάνισε πολλά μειονεκτήματα, από την ποιότητα της πρώτης ύλης, τους χειρισμούς του δείγματος μέχρι και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Από την εύρεση

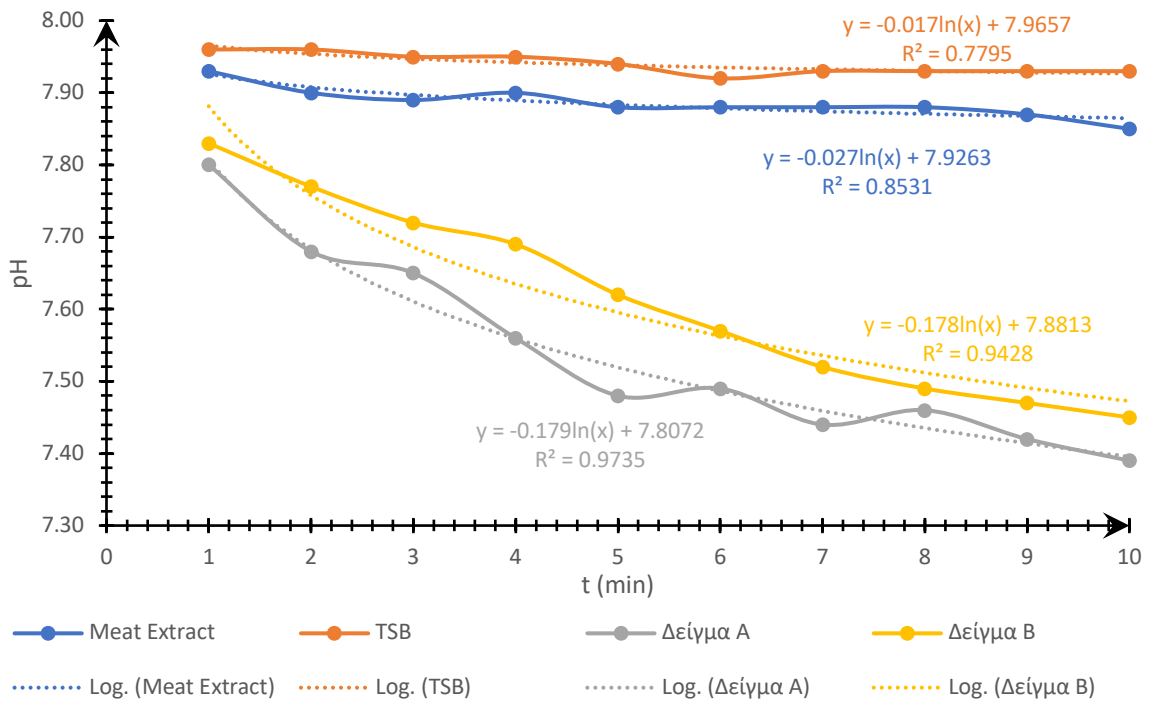
υψηλού μικροβιακού φορτίου την πρώτη κιόλας ημέρα της ανάλυσης (0h) σε συνδυασμό με την εμφανή αλλοίωση των δειγμάτων, μπορούμε να συνειδητοποιήσουμε ότι το δείγμα ήταν εξ αρχής κακής ποιότητας μικροβιολογικά, λόγω της παράλειψης της διαδικασίας αποστείρωσης που θα είχε ως αποτέλεσμα την λήψη ασφαλών δειγμάτων με υποβαθμισμένη, ωστόσο, χημική σύσταση λόγω καταστροφής των πρωτεϊνών μεταβάλλοντας έτσι τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της πεπτικότητας. Παρά την ήπια θερμική μεταχείριση του δείγματος, εφόσον παρατηρήθηκε μεγάλο ποσό μικροβίων συμπεραίνεται ότι ενδεχομένως το δείγμα επιμολύνθηκε κατά τη πειραματική διαδικασία.

Το χαμηλότερο βέλτιστο pH δράσης της πεψίνης (κοντά στο 2,0) καθιστά αδύνατη την σωστή λειτουργία του ενζύμου στις συνθήκες οξύτητας που εκτελείται το πείραμα της πεπτικότητας. Επομένως, στη διεργασία συμμετείχε σχεδόν αποκλειστικά η χυμοθρυψίνη, όπου η χαμηλή ποσότητα της στο διάλυμα πολυενζύμων είχε ως αποτέλεσμα την λήψη μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων. Για την αντιμετώπιση του ζητήματος, προτάθηκε η χρήση παγκρεατίνης από πάγκρεας χοίρων, που περιλαμβάνει ένα σύνολο ενζύμων μεταξύ των οποίων αμυλάσες, λιπάσες και πρωτεάσες όπως θρυψίνη και χυμοθρυψίνη με βέλτιστο pH δράσης $8,0 \pm 0,1$. Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα πεπτικότητας με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητας της παγκρεατίνης έναντι των δειγμάτων σπόρου και προτύπων δειγμάτων εκχυλίσματος κρέατος, (Meat Extract), σόγιας (Tryptic Soy Broth, TSB) και ασπραδιού αυγού. Κατά την πρώτη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιώντας αποκλειστικά παγκρεατίνη στα δείγματα σπόρου και τα πρότυπα δείγματα βρέθηκαν:

Πίνακας 8: Επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ και πρότυπα δείγματα (Meat Extract, TSB).

pH				
t (min)	Δείγμα σπόρου Α (χωρίς βρασμό)	Δείγμα σπόρου Β (με βρασμό)	Meat Extract	TSB
0	7,88	8,06	7,98	8,01
1	7,80	7,83	7,93	7,96
2	7,68	7,77	7,90	7,96
3	7,65	7,72	7,89	7,95
4	7,56	7,69	7,90	7,95
5	7,48	7,62	7,88	7,94
6	7,49	7,57	7,88	7,92

7	7,44	7,52	7,88	7,93
8	7,46	7,49	7,88	7,93
9	7,42	7,47	7,87	7,93
10	7,39	7,45	7,85	7,93



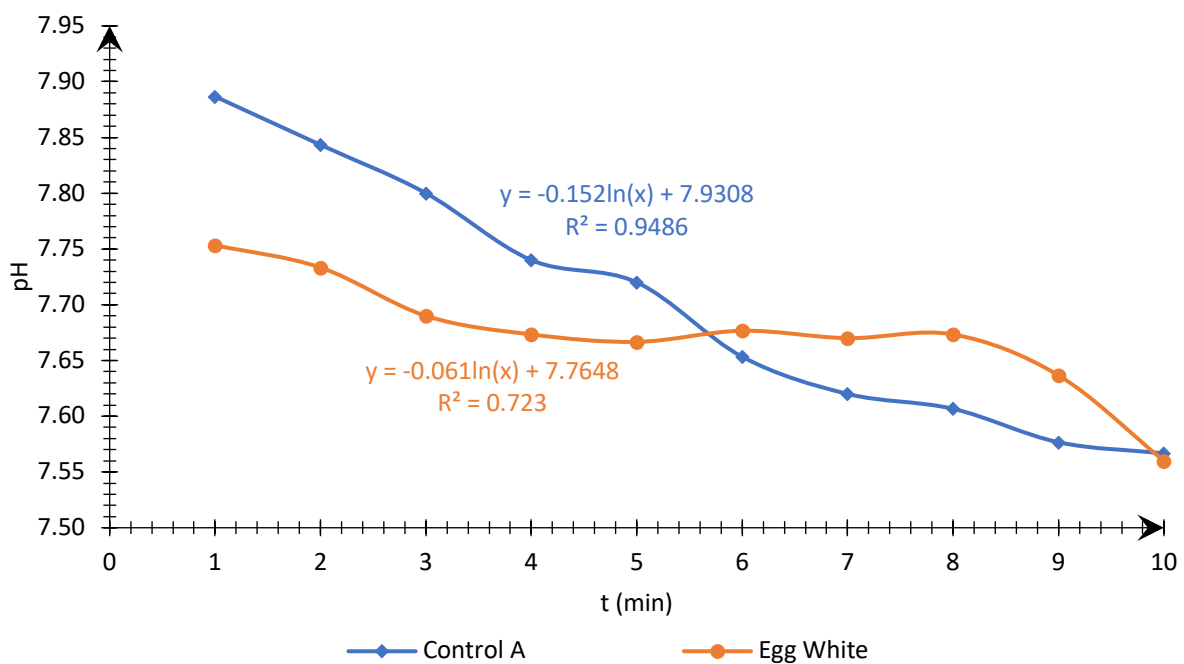
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση pH συναρτήσει του χρόνου μετά την επίδραση παγκρεατίνης στα αρχικά δείγματα σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ και πρότυπα δείγματα (Meat Extract, TSB).

Κατά τον δεύτερο πειραματικό έλεγχο, εφαρμόστηκε η χρήση παγκρεατίνης και συνδυασμός χυμοθρυψίνης – παγκρεατίνης (σε αναλογία 1:1) στα δείγματα σπόρου A και ασπραδιού αυγού για τρεις πειραματικές σειρές. Προέκυψαν:

Πίνακας 9: Επίδραση παγκρεατίνης στο δείγμα A σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ και πρότυπου δείγματος ασπραδιού αυγού.

pH								
t (min)	Δείγμα A (1)	Δείγμα A (2)	Δείγμα A (3)	Δείγμα A (Average)	Egg White (1)	Egg White (2)	Egg White (3)	Egg White (Average)

0	7,98	8,02	7,98	7,99	7,96	7,96	8,02	7,98
1	7,96	7,83	7,87	7,89	7,81	7,63	7,82	7,75
2	7,96	7,74	7,83	7,84	7,78	7,58	7,84	7,73
3	7,89	7,71	7,80	7,80	7,75	7,53	7,79	7,69
4	7,85	7,64	7,73	7,74	7,72	7,52	7,78	7,67
5	7,82	7,61	7,73	7,72	7,68	7,50	7,82	7,67
6	7,75	7,55	7,66	7,65	7,68	7,49	7,86	7,68
7	7,71	7,53	7,62	7,62	7,70	7,48	7,83	7,67
8	7,69	7,50	7,63	7,61	7,72	7,46	7,84	7,67
9	7,66	7,47	7,60	7,58	7,69	7,45	7,77	7,64
10	7,64	7,47	7,59	7,57	7,66	7,46	7,56	7,56

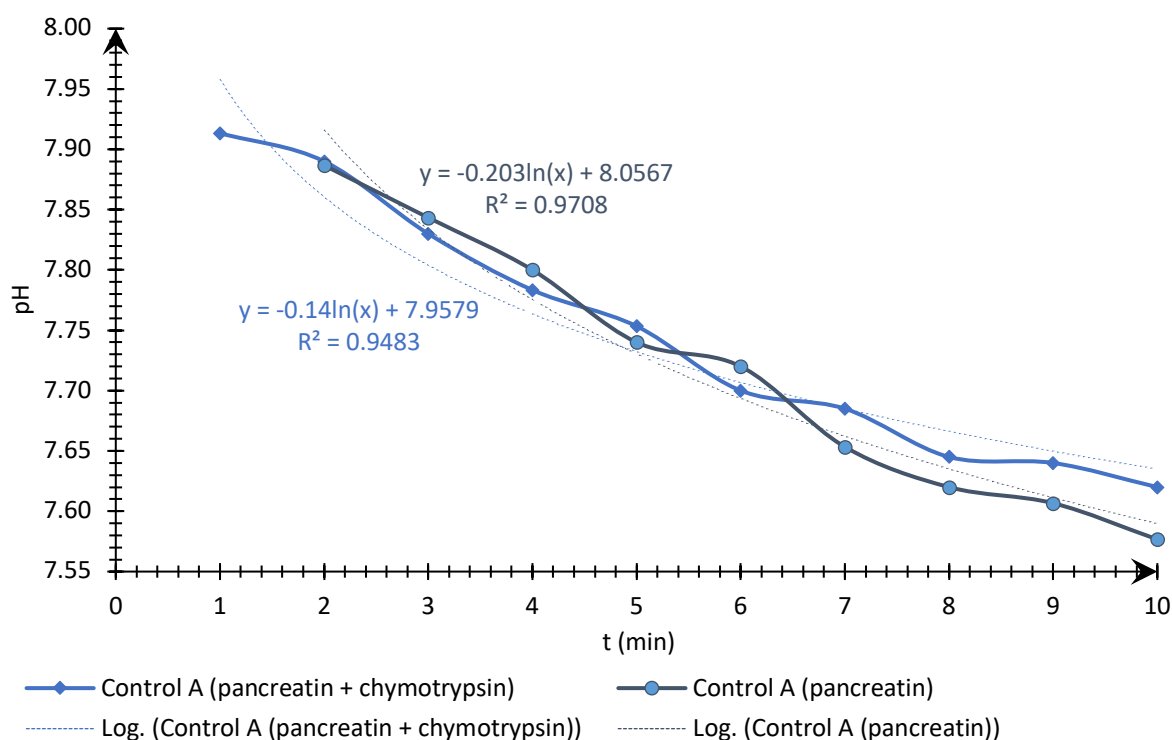


Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση pH συναρτήσει του χρόνου μετά την επίδραση παγκρεατίνης στο αρχικό δείγμα A σπόρων χαρουπιών του ΠΑΔΑ και δείγμα ασπραδιού αυγού.

Πίνακας 10: Επίδραση διαλύματος παγκρεατίνης + χυμοθρυψίνης στο δείγμα A σπόρου χαρουπιών του ΠΑΔΑ.

pH				
t (min)	Δείγμα σπόρου A (1)	Δείγμα σπόρου A (2)	Δείγμα σπόρου A (3)	Δείγμα σπόρου A (Average)
0	8,05	8,00	7,95	8,00

1	7,95	7,93	7,86	7,91
2	7,92	7,89	7,86	7,89
3	7,83	7,85	7,81	7,83
4	7,80	7,80	7,75	7,78
5	7,77	7,77	7,72	7,75
6	7,71	7,70	7,69	7,70
7	7,68	7,69	7,69	7,69
8	7,65	7,66	7,63	7,65
9	7,66	7,64	7,62	7,64
10	7,63	7,63	7,60	7,62



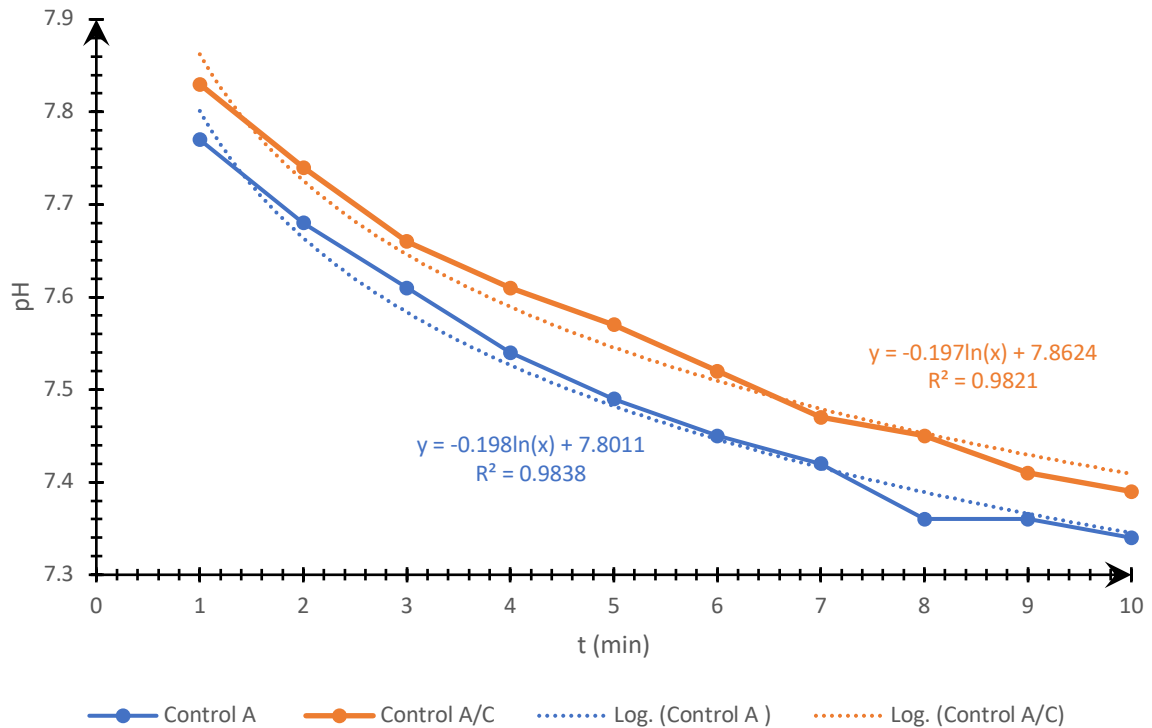
Διάγραμμα 5: Σύγκριση γραφικών παραστάσεων pH συναρτήσει του χρόνου για το δείγμα A σπόρων χαρουπιών του ΠΑΔΑ με την επίδραση παγκρεατίνης και μίγματος παγκρεατίνης - χυμοθρυψίνης.

Από τον έλεγχο αποδείχτηκε ότι η αποκλειστική χρήση παγκρεατίνης χαρακτηρίστηκε ευνοϊκότερη έναντι της εφαρμογής του συνδυασμού παγκρεατίνης – χυμοθρυψίνης όπως φαίνεται από την πιο ικανοποιητική πτώση και τη μεγαλύτερη κλίση της δεύτερης καμπύλης στο Διάγραμμα 5.

Για την δεύτερη πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν δύο δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών εκ των οποίων το ένα υπέστη αποστείρωση (autoclave, 121.1 °C για 1 ώρα). Χρησιμοποιήθηκαν χαρούπια από την Κρήτη από τα οποία απομονώθηκαν οι σπόροι και ακολούθησε η σωστή προκατεργασία του δείγματος, όπως προαναφέρθηκε. Πριν την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της ζύμωσης, προηγήθηκε μια δοκιμασία πεπτικότητας και μικροβιολογικές αναλύσεις για την επίγνωση της ποιοτικής κατάστασης των δειγμάτων.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης πριν την εκκίνηση της ζύμωσης (0h).

pH (0h)		
t (min)	Δείγμα A	Δείγμα A/C
0	8,00	8,00
1	7,77	7,83
2	7,68	7,74
3	7,61	7,66
4	7,54	7,61
5	7,49	7,57
6	7,45	7,52
7	7,42	7,47
8	7,36	7,45
9	7,36	7,41
10	7,34	7,39



Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης πριν την εκκίνηση της ζύμωσης (0h).

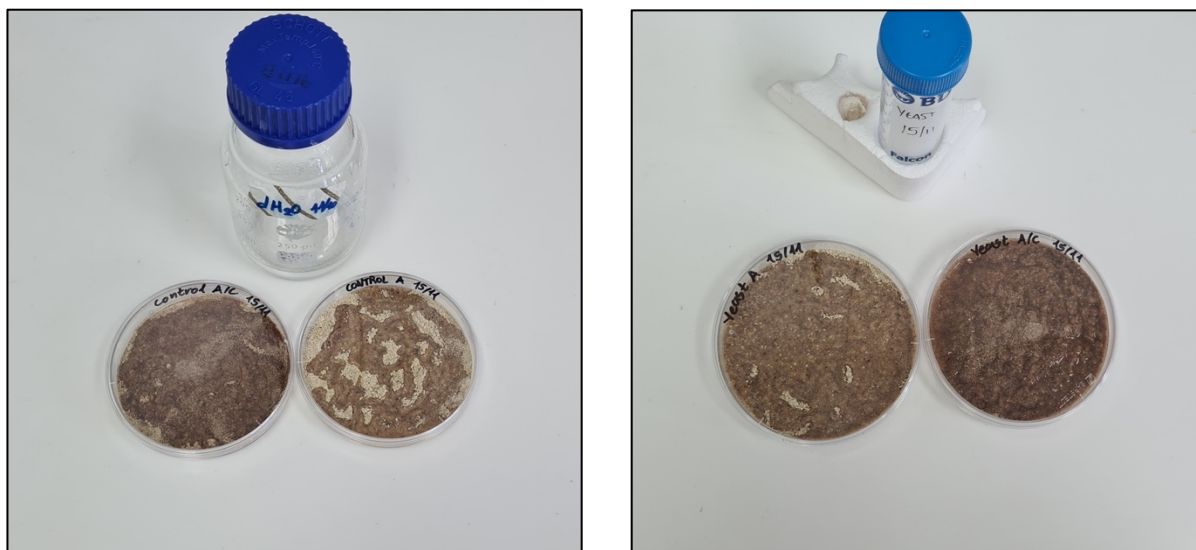
Όπως φαίνεται, η πτώση του pH είναι σαφώς μεγαλύτερη με την επίδραση της παγκρεατίνης και τη χρήση των δειγμάτων της νέας παρτίδας ακόμα και όταν δεν είχε πραγματοποιηθεί η ζύμωση των δειγμάτων. Για την εκτίμηση της μικροβιολογικής κατάστασης των δειγμάτων και τον υπολογισμό των αρχικών πληθυσμών των καλλιεργειών που παρασκευάστηκαν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση OMX και εμβολιασμός των εκκινητών στα κατάλληλα υποστρώματα (MRS, RBA) αφού προηγήθηκαν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις που επιλέχθηκαν, όπως φαίνονται παρακάτω. Μετά την επώαση στις χαρακτηριστικές για κάθε έλεγχο συνθήκες προέκυψε:

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης OMX δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης και πληθυσμού μικροοργανισμών των εμβολίων LAB και ζύμης (0h).

Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση		
			OMX (PCA)	LAB (MRS)	Z/M (RBA)
Control A	10 ⁻²	(α)	< 30	-	0
		(β)			
	10 ⁻³	(α)			

		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
Control A/C	10 ⁻²	(α)	< 30 (0)	-	0
		(β)			
	10 ⁻³	(α)	< 30 (1)		
		(β)	< 30 (0)		
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (0)		
		(β)			
LAB (εμβόλιο)	10 ⁻⁶	(α)	-	> 300	-
		(β)			
	10 ⁻⁷	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁸	(α)			
		(β)			
10 ⁻⁹	(α)				
	(β)				
Yeast (εμβόλιο)	10 ⁻⁶	(α)	-	-	< 30 (7)
		(β)			< 30 (5)
	10 ⁻⁷	(α)			< 30 (0)
		(β)			
	10 ⁻⁸	(α)			
		(β)			
10 ⁻⁹	(α)				
	(β)				

Όπως φαίνεται από τον μικροβιολογικό έλεγχο της OMX, τα δείγματα θεωρούνται κατάλληλα για χρήση παρουσιάζοντας χαμηλό μικροβιακό φορτίο. Οι καλλιέργειες που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά θεωρούνται αποτελεσματικές για εφαρμογή ως εκκινητές για τη ζυμωτική δράση τους. Ζυγίστηκαν οι ίδιες ποσότητες δειγμάτων και ακολούθησε η ίδια πειραματική πορεία με την παρτίδα χαρουπιών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, με την διαφορά ότι προστέθηκαν εξ αρχής 14,0 mL απεσταγμένου νερού (Control A, A/C) και καλλιεργείων στα αντίστοιχα τρυβλία.



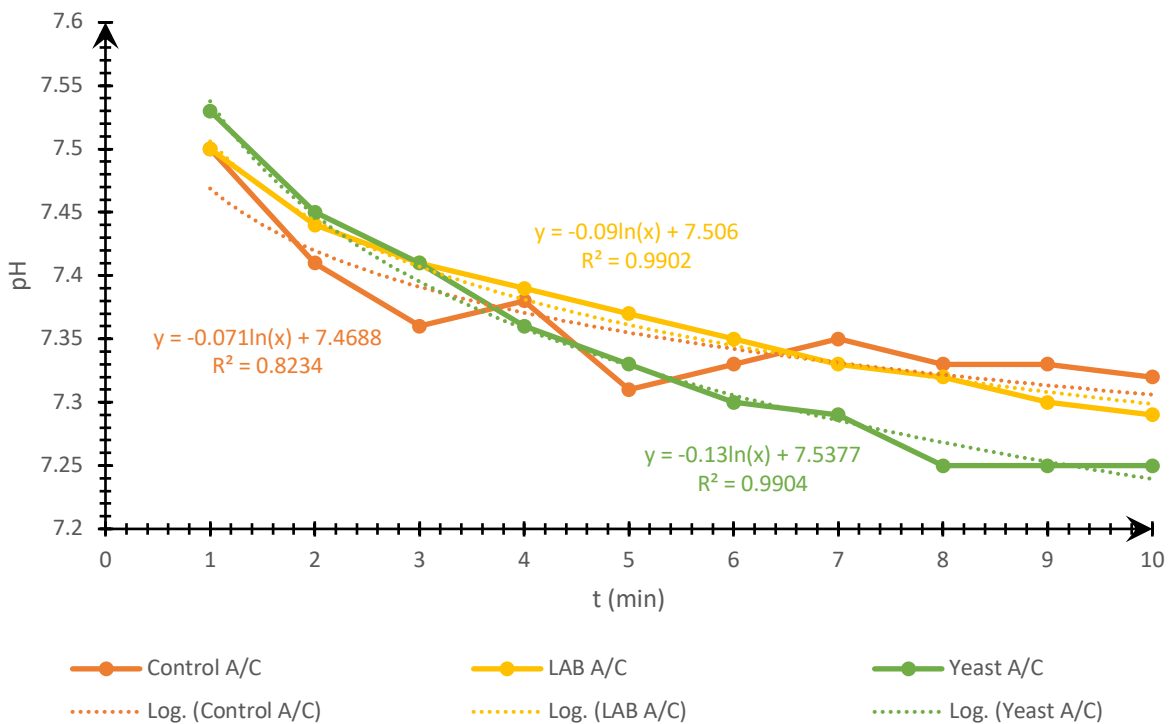
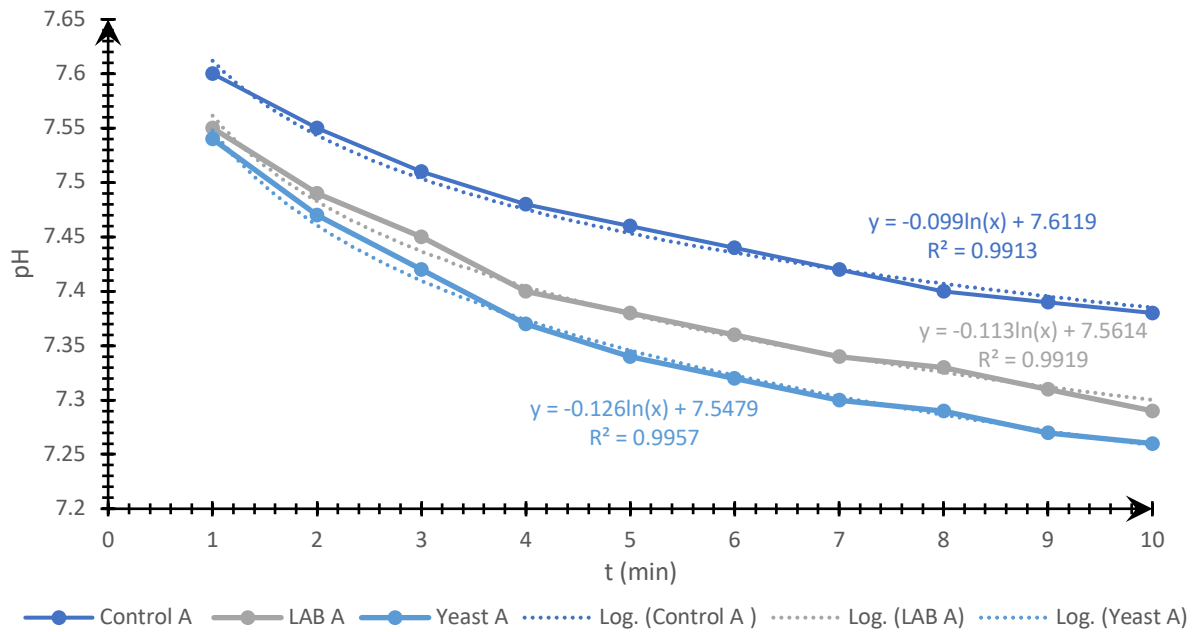
Εικόνα 17: Διαβροχή των δειγμάτων με απεσταγμένο νερό (Control A, A/C) και με καλλιέργεια ζύμης (Yeast A, A/C).

Μετά την επώαση στις ίδιες συνθήκες (37 °C), τα δείγματα βρίσκονταν σε καλύτερη κατάσταση όσον αφορά το περιεχόμενο ποσοστό υγρασίας, με αποτέλεσμα να μην ήταν αναγκαία η επιπλέον διαβροχή τους. Μορφολογικά ήταν εμφανή τα αρχικά σημάδια της ζύμωσης, παρουσιάζοντας ευχάριστές οσμές και ικανοποιητικές υφές χωρίς να είναι ευδιάκριτη κάποια τυχούσα επιμόλυνση των δειγμάτων. Προηγήθηκε δοκιμή πεπτικότητας με την ίδια διαδικασία και προέκυψαν τα εξής:

Πίνακας 13: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης μετά το πέρας μίας ημέρας ζύμωσης (24h).

pH (24h)						
t (min)	Control A	Control A/C	LAB A	LAB A/C	Yeast A	Yeast A/C
0	8,01	8,00	7,99	8,04	8,04	8
1	7,6	7,5	7,55	7,5	7,54	7,53
2	7,55	7,41	7,49	7,44	7,47	7,45
3	7,51	7,36	7,45	7,41	7,42	7,41
4	7,48	7,38	7,4	7,39	7,37	7,36
5	7,46	7,31	7,38	7,37	7,34	7,33
6	7,44	7,33	7,36	7,35	7,32	7,3
7	7,42	7,35	7,34	7,33	7,3	7,29
8	7,4	7,33	7,33	7,32	7,29	7,25

9	7,39	7,33	7,31	7,3	7,27	7,25
10	7,38	7,32	7,29	7,29	7,26	7,25



Διάγραμμα 7: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης την πρώτη ημέρα ζύμωσης (24h).

Τα ευρήματα ήταν σαφώς καλύτερα από την προηγούμενη πειραματική διαδικασία, εμφανίζοντας πιο απότομες μεταβολές του pH άρα και πιο ικανοποιητική πέψη των δειγμάτων.

Παρόλο που μεγαλύτερες πτώσεις διαπιστώθηκαν στα δείγματα Yeast (υψηλότερες κλίσεις των καμπυλών), η επίδραση της καλλιέργειας *Lactobacillus plantarum* στην νέα παρτίδα χαρουπιών και η δραστηριότητα της παγκρεατίνης οδήγησαν επίσης σε πιο αποδεκτά αποτελέσματα. Για την μελέτη του μικροβιολογικού υπόβαθρου των δειγμάτων εκτελέστηκαν οι εξής αναλύσεις:

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης (24h).

Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση		
			OMX (PCA)	LAB (MRS)	Z/M (RBA)
Control A	10 ⁻³	(α)	< 30 (0)	-	< 30 (0)
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (0)		
		(β)			
	10 ⁻⁵	(α)	<30 (4)		
		(β)	<30 (0)		
	10 ⁻⁶	(α)	< 30 (0)		
		(β)			
10 ⁻⁷	(α)	<30 (0)			
	(β)	< 30 (3)			
Control A/C	10 ⁻³	(α)	< 30 (0)	-	< 30 (0)
		(β)			
	10 ⁻⁴	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁵	(α)			
		(β)			
	10 ⁻⁶	(α)			
		(β)			
10 ⁻⁷	(α)				
	(β)				
LAB A	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (0)	34	-
		(β)		31	
	10 ⁻⁵	(α)		< 30 (5)	

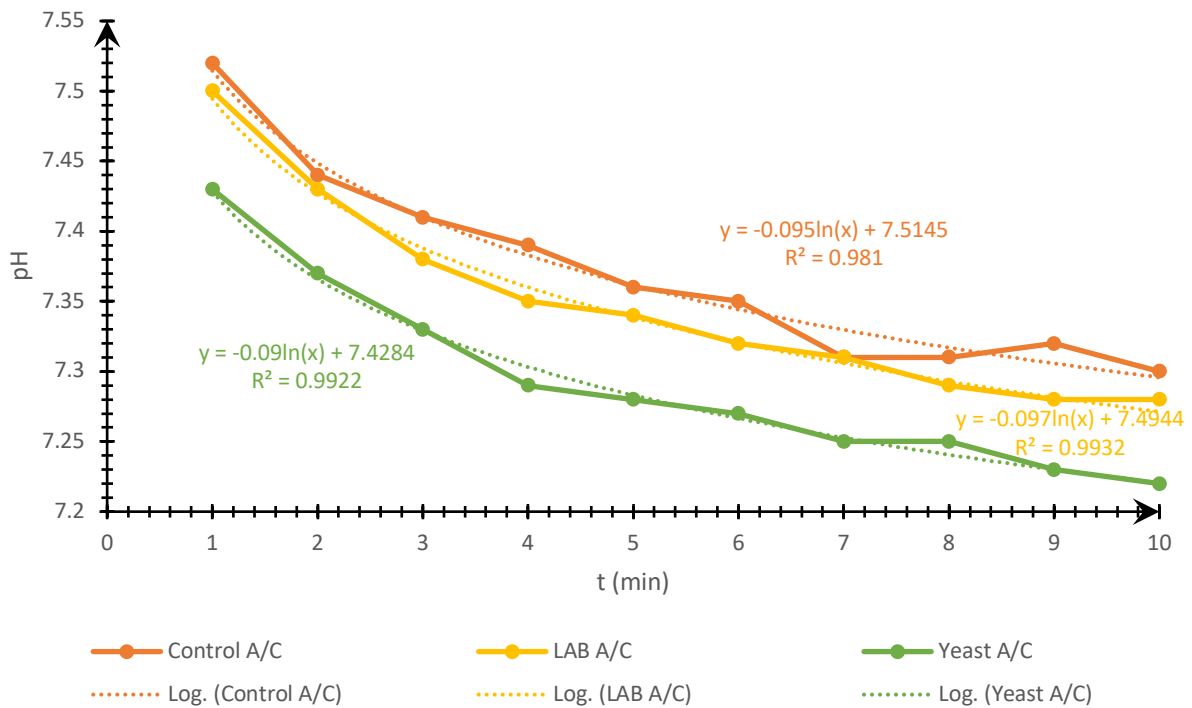
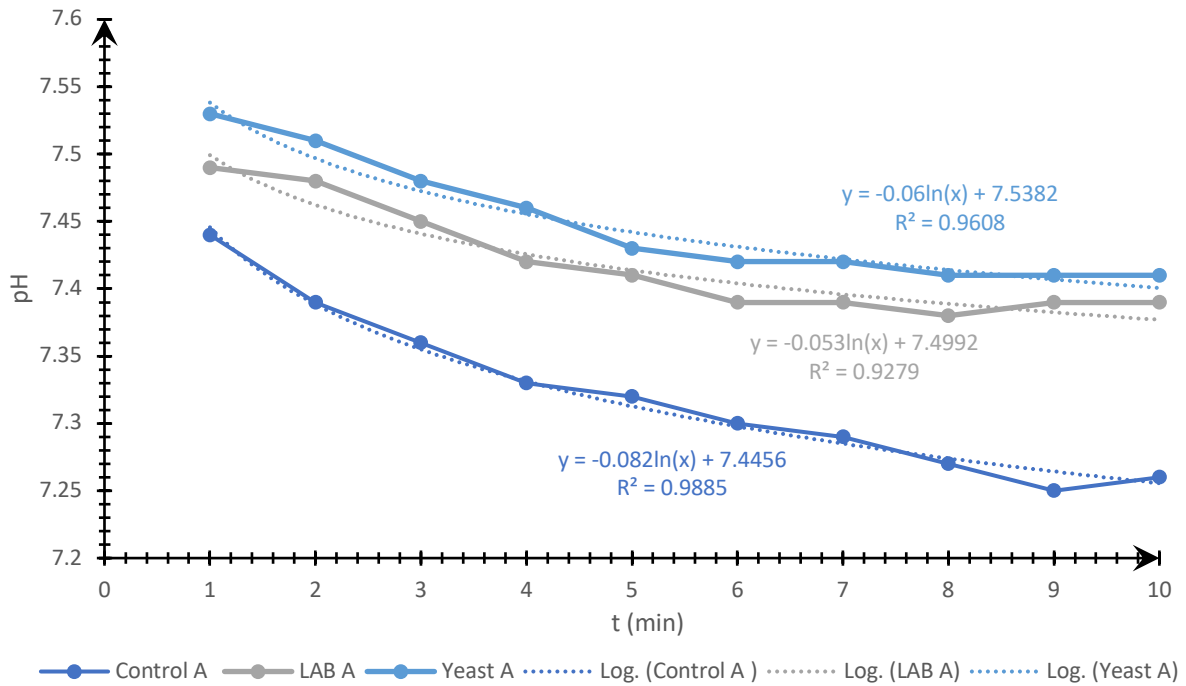
	10 ⁻⁶	(β)		< 30 (5)		
		(α)		< 30 (3)		
		(β)		< 30 (1)		
	10 ⁻⁷	(α)		< 30 (0)		
		(β)		< 30 (2)		
LAB A/C	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (0)	215	-	
		(β)		224		
	10 ⁻⁵	(α)		< 30 (21)		
		(β)		< 30 (20)		
	10 ⁻⁶	(α)		< 30 (3)		
		(β)		< 30 (2)		
	10 ⁻⁷	(α)		< 30 (0)		
		(β)		< 30 (24)		
Yeast A	10 ⁻⁴	(α)	> 300	-	289	
		(β)			> 300	
	10 ⁻⁵	(α)			136	
		(β)			128	
	10 ⁻⁶	(α)			160	< 30 (18)
		(β)			146	< 30 (7)
	10 ⁻⁷	(α)			< 30 (12)	< 30 (0)
		(β)			< 30 (15)	
Yeast A/C	10 ⁻⁴	(α)	> 300	-	> 300	
		(β)			52	
	10 ⁻⁵	(α)			< 30 (18)	
		(β)			< 30 (11)	
	10 ⁻⁶	(α)			62	< 30 (0)
		(β)			61	< 30 (7)
	10 ⁻⁷	(α)			< 30 (9)	< 30 (0)
		(β)			< 30 (11)	

Παρατηρείται απότομη πτώση από το αρχικό pH των δειγμάτων, ειδικά για τα Yeast δείγματα υποδηλώνοντας ότι εκτελέστηκε αποτελεσματικά η διεργασία της ζύμωσης και η σωστή

λειτουργία της παγκρεατίνης. Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα από την άλλη εκτός από συγκεκριμένες εξαιρέσεις, έδειξαν ότι τα δείγματα ήταν μικροβιολογικά αποδεκτά. Επιπλοκές που διαπιστώθηκαν αποτελούσαν από τη μία η παρουσία αποικιών στην OMX ανάλυση του δείγματος Control A , που είναι αποδεκτό εφόσον είναι το μη αποστειρωμένο δείγμα, και από την άλλη το μεγάλο μικροβιακό περιεχόμενο των δειγμάτων Yeast A και A/C ($> 3 \cdot 10^5$ CFU/g). Ακολούθησε επανάληψη των παραπάνω διαδικασιών και για τις επόμενες ημέρες, προσθέτοντας ακόμη μία ημέρα για επιπλέον μελέτη της αποτελεσματικότητας ζύμωσης:

Πίνακας 15: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης μετά το πέρας δύο ημερών ζύμωσης (48h).

pH (48h)						
t (min)	Control A	Control A/C	LAB A	LAB A/C	Yeast A	Yeast A/C
0	7,98	7,99	8,02	8,02	7,98	8,02
1	7,44	7,52	7,49	7,50	7,53	7,43
2	7,39	7,44	7,48	7,43	7,51	7,37
3	7,36	7,41	7,45	7,38	7,48	7,33
4	7,33	7,39	7,42	7,35	7,46	7,29
5	7,32	7,36	7,41	7,34	7,43	7,28
6	7,30	7,35	7,39	7,32	7,42	7,27
7	7,29	7,31	7,39	7,31	7,42	7,25
8	7,27	7,31	7,38	7,29	7,41	7,25
9	7,25	7,32	7,39	7,28	7,41	7,23
10	7,26	7,30	7,39	7,28	7,41	7,22



Διάγραμμα 8: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης την δεύτερη ημέρα ζύμωσης (48h).

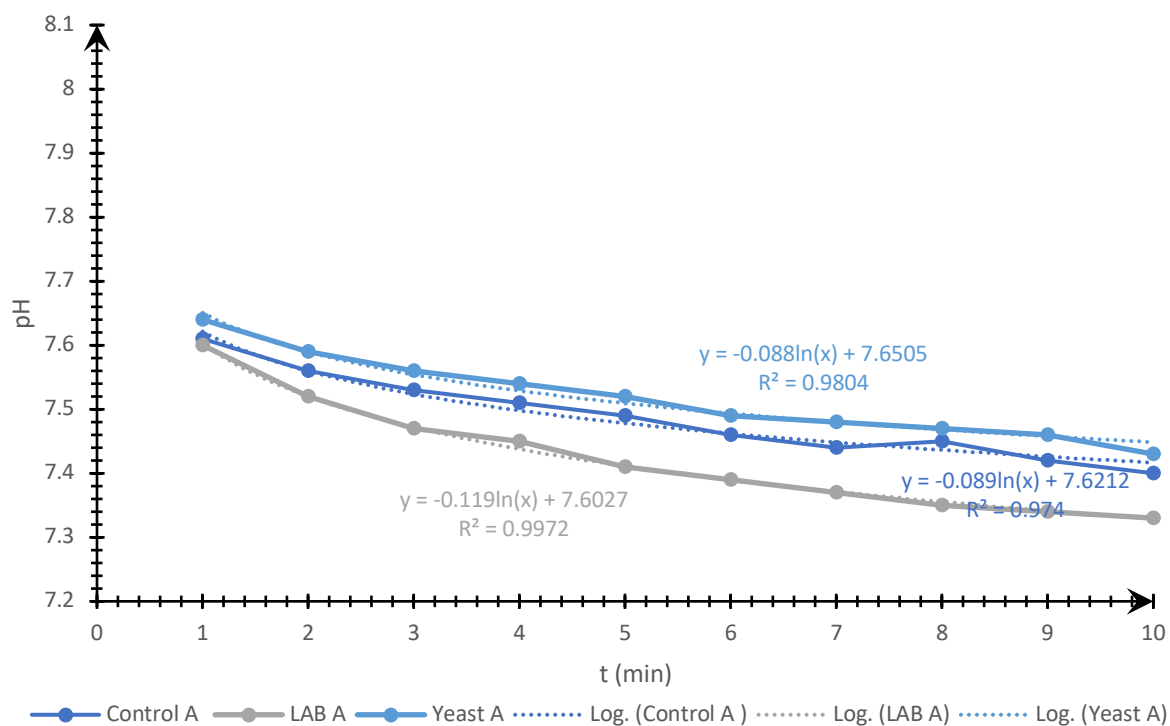
Πίνακας 16: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης (48h).

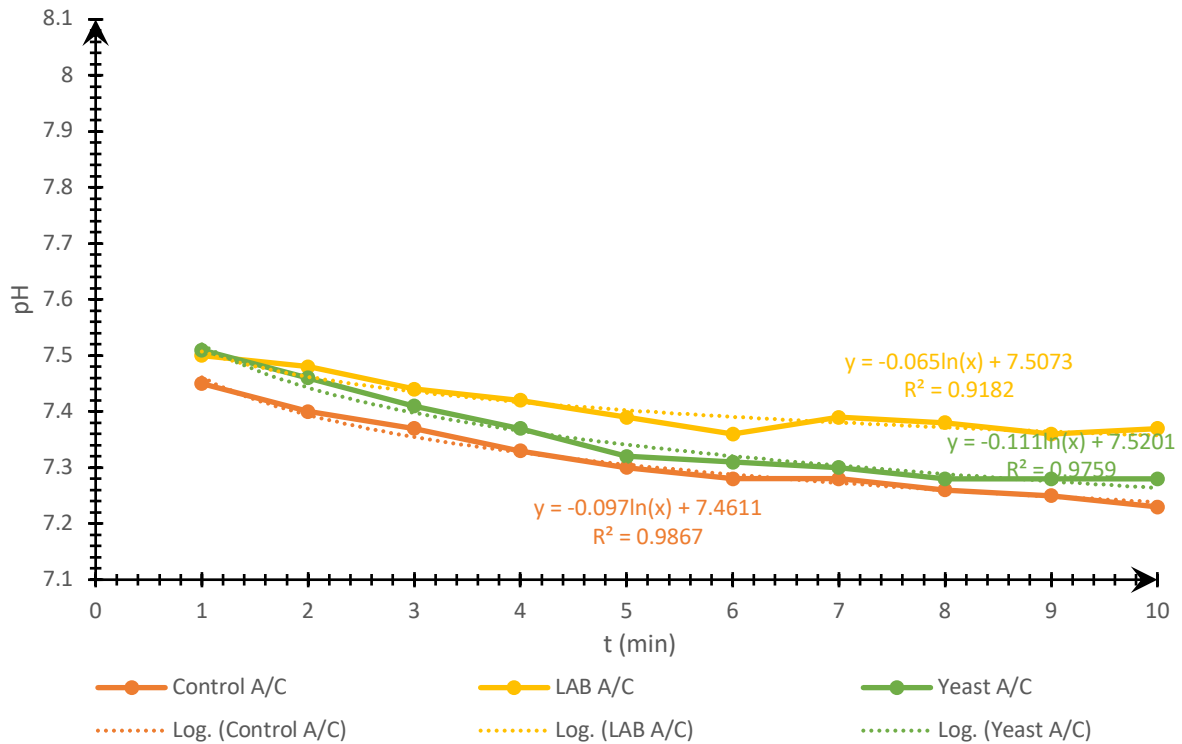
Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση			
			OMX (PCA)	LAB (MRS)	Z/M (RBA)	
Control A	10 ⁻³	(α)	< 30 (0)	-	< 30 (0)	
		(β)				
	10 ⁻⁴	(α)				
		(β)				
	10 ⁻⁵	(α)				< 30 (1)
		(β)				< 30 (0)
10 ⁻⁶	(α)	< 30 (0)				
	(β)					
Control A/C	10 ⁻³	(α)	< 30 (0)	-	< 30 (0)	
		(β)				
	10 ⁻⁴	(α)				
		(β)				
	10 ⁻⁵	(α)				
		(β)				
10 ⁻⁶	(α)					
	(β)					
LAB A	10 ⁻³	(α)	205	-	-	
		(β)	205			
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (18)			
		(β)	< 30 (27)			
	10 ⁻⁵	(α)	< 30 (5)			
		(β)	< 30 (0)			
	10 ⁻⁶	(α)	-			< 30
		(β)				
	10 ⁻⁷	(α)				
		(β)				
10 ⁻⁸	(α)					
	(β)					

LAB A/C	10 ⁻³	(α)	< 30	-	-		
		(β)					
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (4)				
		(β)	< 30 (0)				
	10 ⁻⁵	(α)	< 30 (0)				
		(β)					
	10 ⁻⁶	(α)	-			< 30	
		(β)					
	10 ⁻⁷	(α)					
		(β)					
	10 ⁻⁸	(α)					
		(β)					
Yeast A	10 ⁻⁵	(α)		> 300	-		< 30 (0)
		(β)					< 30 (7)
	10 ⁻⁶	(α)		87			< 30 (3)
		(β)		93			< 30 (5)
	10 ⁻⁷	(α)		< 30 (10)			< 30 (3)
		(β)		< 30 (14)			< 30 (9)
	10 ⁻⁸	(α)	< 30 (0)	< 30 (0)			
		(β)					
	Yeast A/C	10 ⁻⁵	(α)	> 300		-	< 30 (8)
			(β)				< 30 (5)
		10 ⁻⁶	(α)	69			< 30 (0)
			(β)	85			
10 ⁻⁷		(α)	< 30 (5)				
		(β)	< 30 (4)				
10 ⁻⁸		(α)	< 30 (1)				
		(β)	< 30 (2)				

Πίνακας 17: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας με την επίδραση παγκρεατικής στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης μετά το πέρας τριών ημερών ζύμωσης (72h).

pH (72h)						
t (min)	Control A	Control A/C	LAB A	LAB A/C	Yeast A	Yeast A/C
0	8,04	7,96	8,06	7,97	7,98	8,03
1	7,61	7,45	7,6	7,5	7,64	7,51
2	7,56	7,4	7,52	7,48	7,59	7,46
3	7,53	7,37	7,47	7,44	7,56	7,41
4	7,51	7,33	7,45	7,42	7,54	7,37
5	7,49	7,3	7,41	7,39	7,52	7,32
6	7,46	7,28	7,39	7,36	7,49	7,31
7	7,44	7,28	7,37	7,39	7,48	7,3
8	7,45	7,26	7,35	7,38	7,47	7,28
9	7,42	7,25	7,34	7,36	7,46	7,28
10	7,4	7,23	7,33	7,37	7,43	7,28





Διάγραμμα 9: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης την τρίτη ημέρα ζύμωσης (72h).

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων δειγμάτων αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης (72h).

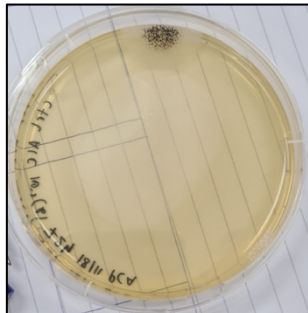
Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τρυβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση		
			OMX (PCA)	LAB (MRS)	Z/M (RBA)
Control A	10 ⁻³	(α)	< 30 (13)	-	< 30 (0)
		(β)	< 30 (7)		
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (2)		
		(β)	< 30 (3)		
	10 ⁻⁵	(α)	< 30 (1)		
		(β)	< 30 (0)		
10 ⁻⁶	(α)	< 30 (1)			
	(β)	< 30 (1)			
Control A/C	10 ⁻³	(α)	< 30 (0)	-	< 30 (0)
		(β)	< 30 (1)		
	10 ⁻⁴	(α)	< 30 (2)		
		(β)			

	10 ⁻⁵	(α)	< 30 (1)			
		(β)				
	10 ⁻⁶	(α)	< 30 (1)			
		(β)	< 30 (5)			
LAB A	10 ⁻³	(α)	> 300		-	
		(β)				
	10 ⁻⁴	(α)				
		(β)				
	10 ⁻⁵	(α)				> 300
		(β)				
	10 ⁻⁶	(α)				61
		(β)				66
	10 ⁻⁷	(α)				< 30 (15)
		(β)				< 30 (7)
	10 ⁻⁸	(α)				< 30 (1)
		(β)				< 30 (3)
LAB A/C	10 ⁻³	(α)	> 300		-	
		(β)				
	10 ⁻⁴	(α)				
		(β)				
	10 ⁻⁵	(α)				> 300
		(β)				
	10 ⁻⁶	(α)				228
		(β)				236
	10 ⁻⁷	(α)				< 30 (24)
		(β)				< 30 (29)
	10 ⁻⁸	(α)				< 30 (3)
		(β)				< 30 (2)
Yeast A	10 ⁻⁵	(α)	> 300	-	274	
		(β)			268	
	10 ⁻⁶	(α)			< 30 (23)	
		(β)			39	

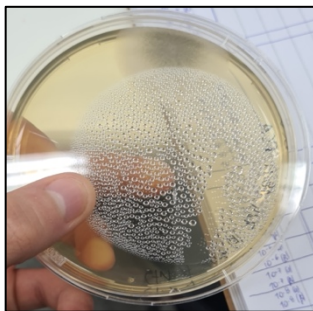
	10 ⁻⁷	(α)	128		< 30 (5)
		(β)	158		< 30 (3)
	10 ⁻⁸	(α)	< 30 (12)		< 30 (0)
		(β)	< 30 (8)		< 30 (1)
Yeast A/C	10 ⁻⁵	(α)	> 300	-	< 30 (0)
		(β)			< 30 (21)
	10 ⁻⁶	(α)			< 30 (15)
		(β)			< 30 (0)
	10 ⁻⁷	(α)	58		
		(β)	62		
	10 ⁻⁸	(α)	< 30 (5)		
		(β)			

Τα ευρήματα της δεύτερης ημέρας ζύμωσης έδειξαν ότι παρατηρήθηκε μεγαλύτερη και πιο απότομη μεταβολή της καμπύλης του αποστειρωμένου δείγματος με την επίδραση *Saccharomyces cerevisiae*, του δείγματος Control A και του αποστειρωμένου δείγματος με την επίδραση της καλλιέργειας LAB. Την τρίτη ημέρα ζύμωσης μεγάλη μεταβολή διαπιστώθηκε και στο μη αποστειρωμένο δείγμα που ζυμώθηκε από τον *L. plantarum*. Τα συμπεράσματα αυτά δείχνουν ότι η εκπόνηση της ζύμωσης προκάλεσε επιθυμητά αποτελέσματα στη πέψη των δειγμάτων αλεύρου σπόρου, στο οποίο σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε και η εφαρμογή του ενζυμικού περιεχομένου της παγκρεατίνης. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με την δεύτερη ημέρα ζύμωσης της πρώτης πειραματικής διαδικασίας, παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στα ζυμωμένα δείγματα, γεγονός που οφείλεται και στην μικρότερη επίδραση της χυμοθρυψίνης στα δείγματα.

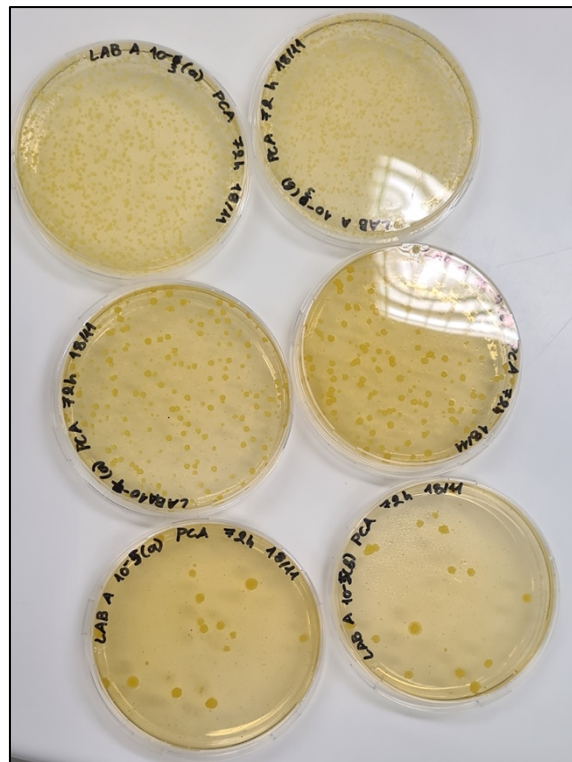
Οι μικροβιακές αναλύσεις της δεύτερης ημέρας ζύμωσης (48h) έδειξαν ξανά υψηλό μικροβιακό φορτίο OMX στα δείγματα σπόρου και ζύμης, με αρχικό αριθμό αποικιών μεγαλύτερο από $3 \cdot 10^7$, υπονοώντας ότι τα δείγματα υπέστησαν επιμόλυνση κατά τη πειραματική πορεία. Τα αποτελέσματα MRS και RBA έδειξαν ότι οι εκκινητές λειτούργησαν αποτελεσματικά στην ζύμωση των υποστρωμάτων. Την τρίτη ημέρα ζύμωσης τα αποτελέσματα της OMX ανάλυσης εμφάνισαν μεγάλο αριθμό βακτηρίων και στα δείγματα LAB, ενώ αποικίες μυκήτων βρέθηκαν στα δείγματα Control A και A/C, που κατά ανεξήγητο τρόπο απουσίαζαν από την ανάλυση ζυμών/μυκήτων στα τρυβλία με υπόστρωμα RBA.



Εικόνα 18: Αποικία μυκητιακής προέλευσης σε τρυβλίο μετά από OMX ανάλυση στο αποστειρωμένο δείγμα A/C, αραιώση 10^{-3} , την τρίτη ημέρα ζύμωσης.



Εικόνα 19: Αποικία μυκητιακής προέλευσης σε τρυβλίο μετά από OMX ανάλυση στο μη αποστειρωμένο δείγμα A, αραιώση 10^{-6} , την τρίτη ημέρα ζύμωσης.

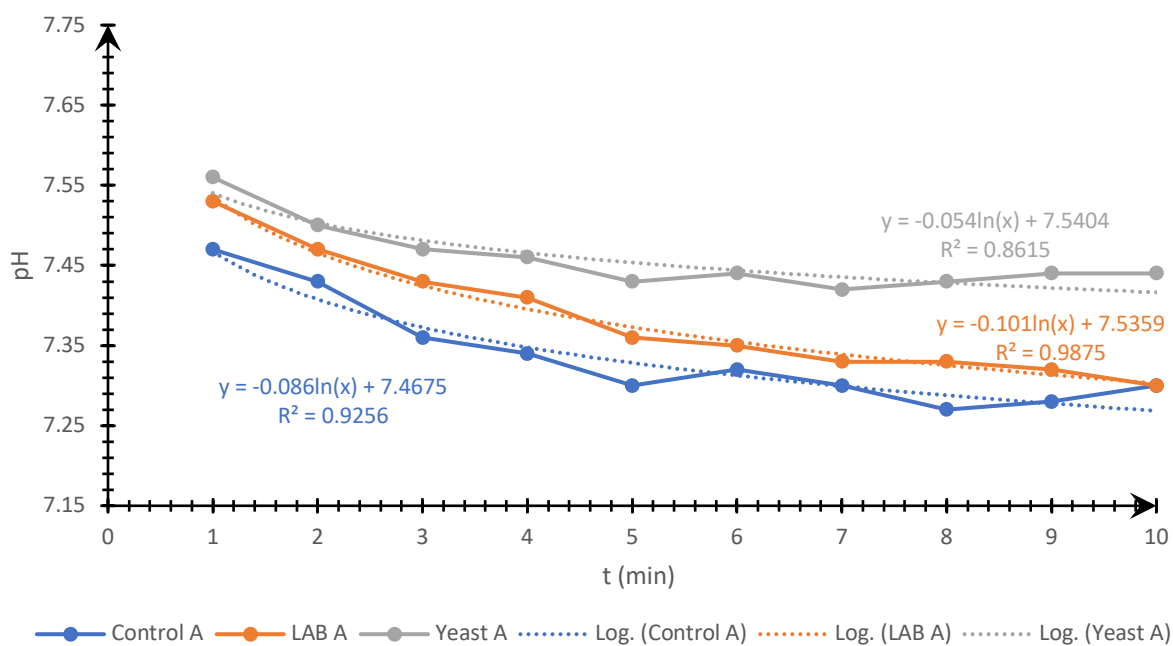


Εικόνα 20: Αποτελέσματα της OMX ανάλυσης των δειγμάτων σπόρου με την επίδραση καλλιέργειας *Lactobacillus plantarum* την τρίτη ημέρα ζύμωσης.

Για την λήψη περισσότερων και αντιπροσωπευτικότερων αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση της ζύμωσης στην πεπτικότητα του σπόρου, πραγματοποιήθηκε ακόμη μια ανάλυση με τη χρήση του μη αποστειρωμένου δείγματος A, όπου μετρήθηκε η πεπτικότητα πριν και μετά από τρεις ημέρες ζύμωσης (72h). Πραγματοποιήθηκε μικροβιακή ανάλυση μόνο ζυμών με τη χρήση υποστρώματος Yeast Extract Agar και RBA, αφού σαφώς προηγήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις από 10^{-4} μέχρι 10^{-7} . Τα αποτελέσματα πεπτικότητας και μικροβιολογικής κατάστασης των δειγμάτων έδειξαν:

Πίνακας 19: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας με την επίδραση παγκρεατίνης κατά την δεύτερη πειραματική πορεία στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης πριν την διαδικασία ζύμωσης (0h).

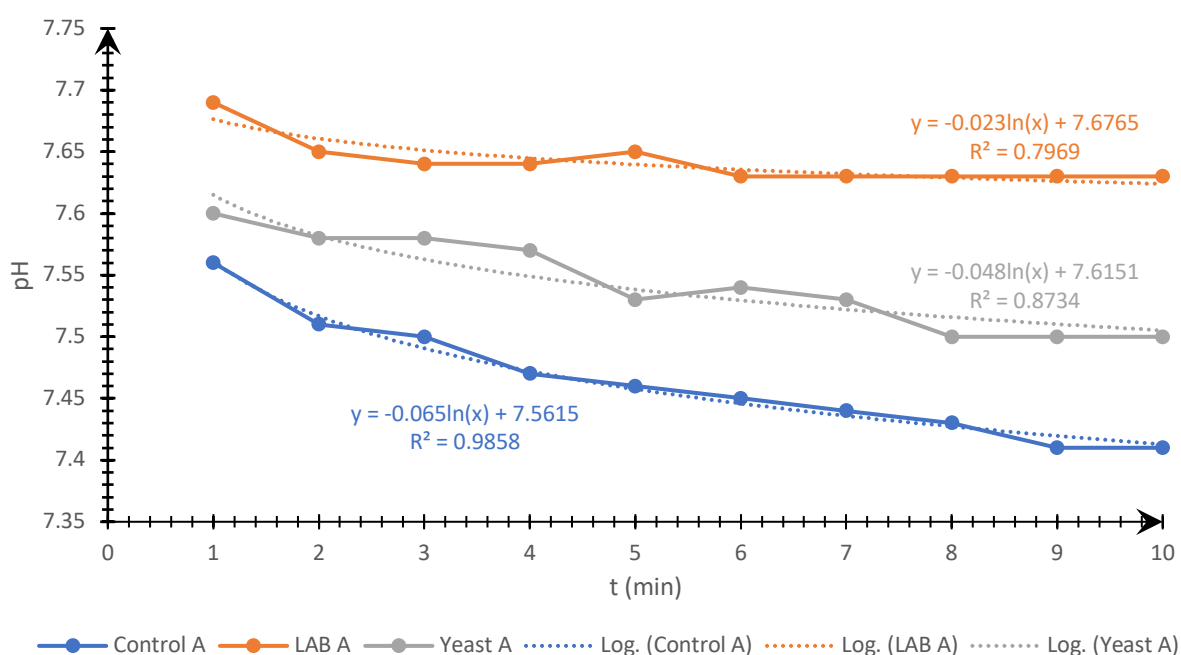
pH (0h)			
t (min)	Control A	LAB A	Yeast A
0	7,96	7,97	7,95
1	7,47	7,53	7,56
2	7,43	7,47	7,5
3	7,36	7,43	7,47
4	7,34	7,41	7,46
5	7,3	7,36	7,43
6	7,32	7,35	7,44
7	7,30	7,33	7,42
8	7,27	7,33	7,43
9	7,28	7,32	7,44
10	7,30	7,30	7,44



Διάγραμμα 10: Γραφική παράσταση pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης κατά τη δεύτερη πειραματική πορεία στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης πριν την εκκίνηση της ζύμωσης (0h).

Πίνακας 20: Αποτελέσματα δοκιμής πεπτικότητας με την επίδραση παγκρεατίνης κατά την δεύτερη πειραματική πορεία στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης την τρίτη ημέρα ζύμωσης (72h).

pH (72h)			
t (min)	Control A	LAB A	Yeast A
0	7,96	7,96	8,01
1	7,56	7,69	7,6
2	7,51	7,65	7,58
3	7,5	7,64	7,58
4	7,47	7,64	7,57
5	7,46	7,65	7,53
6	7,45	7,63	7,54
7	7,44	7,63	7,53
8	7,43	7,63	7,50
9	7,41	7,63	7,50
10	7,41	7,63	7,50

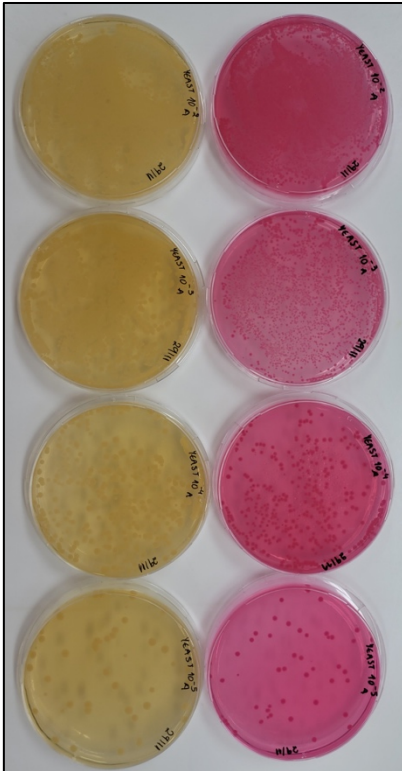


Διάγραμμα 11: Γραφική παράσταση pH συναρτήσει του χρόνου με την επίδραση παγκρεατίνης κατά τη δεύτερη πειραματική πορεία στα δείγματα αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης την τρίτη ημέρα ζύμωσης (72h).

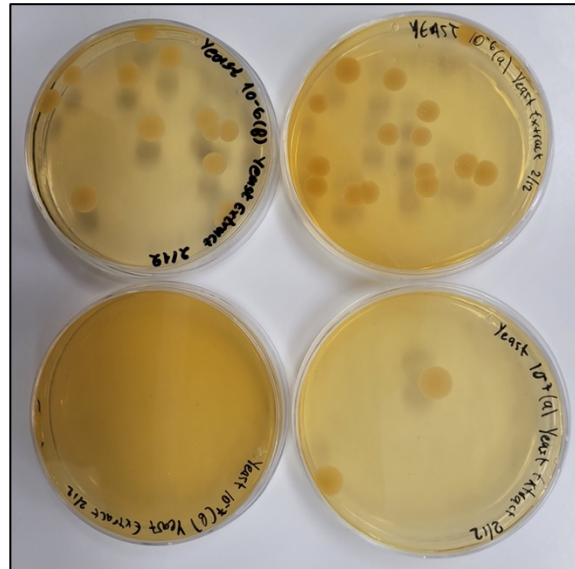
Πίνακας 21: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων του εμβολίου ζύμης και του δείγματος αλεύρου σπόρων χαρουπιών Κρήτης την τρίτη ημέρα ζύμωσης με *Saccharomyces cerevisiae* (72h).

Δείγματα	Αραίωση	Αριθμός τροβλίου	Μικροβιολογική ανάλυση	
			Z/M (RBA)	Z/M (Yeast Extract)
Yeast (εμβόλιο) (0h)	10 ⁻⁴	(α)	> 300	> 300
		(β)		
	10 ⁻⁵	(α)		
		(β)		
	10 ⁻⁶	(α)		
		(β)		
10 ⁻⁷	(α)	47		
	(β)	51		
Yeast (εμβόλιο) (72h)	10 ⁻⁴	(α)	> 300	-
		(β)		
	10 ⁻⁵	(α)		
		(β)		
	10 ⁻⁶	(α)		
		(β)		
10 ⁻⁷	(α)	72		
	(β)	67		
Yeast A (72h)	10 ⁻⁶	(α)	-	< 30 (15)
		(β)		
	10 ⁻⁷	(α)		< 30 (2)
		(β)		< 30 (0)

Τα ευρήματα που προέκυψαν δεν ήταν, ωστόσο, τόσο ικανοποιητικά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος. Παρόλαυτα, την μεγαλύτερη πτώση εμφάνισε το δείγμα Control και το δείγμα μετά την επίδραση ζύμης, μετά από τρεις ημέρες ζύμωσης. Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι έδειξαν ότι οι ζύμες έδρασαν αποτελεσματικά κατά τη ζύμωση, το οποίο φαίνεται από τον αρχικό πληθυσμό του εμβολίου ζύμης ($\approx 5 \cdot 10^8$ cfu/g πριν τη ζύμωση και $7 \cdot 10^8$ cfu/g την τρίτη ημέρα ζύμωσης), ενώ μετά τη ζύμωση το περιεχόμενο των ζυμών στο δείγμα βρέθηκε περίπου $2 \cdot 10^7$ cfu/g.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων εμβολίου *Saccharomyces cerevisiae* (Oh).



Εικόνα 22: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης του δείγματος αλεύρου σπόρου μετά την επίδραση ζύμης την τρίτη ημέρα ζύμωσης σε υπόστρωμα Yeast Extract Agar (72h).

Για τον πειραματικό προσδιορισμό φυτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα άλευρο σπόρου χαρουπιών από την Κρήτη. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις πειραματικές διαδικασίες είναι τα ακόλουθα:

- a) Αλεύρι από σπόρο χαρουπιού Κρήτης (**Cb0**) (Carob seed control)
- b) Χαρουπάλευρο εμπορίου (**Cb205**) (Carob flour control)
- c) Δείγμα βρώμης (**OAT0**) (Oat control)
- d) Σπόρος χαρουπιού και αποστειρωμένο νερό (**Cb1**)
- e) Σπόρος χαρουπιού και καλλιέργεια LAB (**CbLAB**)
- f) Σπόρος χαρουπιού και καλλιέργεια Yeast (**CbYeast**)
- g) Σπόρος χαρουπιού και καλλιέργεια *Aspergillus oryzae* (**CbMold**)

Όσον αφορά την παραγωγή των δειγμάτων d, e, f και g σε 5,0 g δείγματος αλεύρου προστίθενται σε ασηπτικές συνθήκες 14,0 mL αποστειρωμένου νερού, 14,0 mL καλλιέργειας

Lactobacillus plantarum (LAB), 14,0 mL καλλιέργειας ζύμης *S. cerevisiae* (Yeast) και 14,0 mL καλλιέργειας *Aspergillus oryzae*, αντίστοιχα. Ακολούθησε ζύμωση για 24 ώρες και έπειτα ξήρανση στον κλίβανο για επιπλέον 24 ώρες. Τα δείγματα έτσι αποκτούσαν ξηρή και σκληρή υφή με έντονη κρούστα. Οι μικροβιακές καλλιέργειες παρήχθησαν με τον προαναφερθέντα τρόπο.

Το ποσό του φυτικού οξέος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με την χρήση κιτ σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Megazyme K-PHYT 05/19. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται το ποσό του φωσφόρου που απελευθερώνεται με την επίδραση των ενζύμων φυτάση και αλκαλική φωσφατάση και με την χρήση εμπειρικών εξισώσεων προσδιορίζεται το ποσό του φυτικού οξέος τόσο στα αρχικά όσο και στα ζυμωμένα δείγματα. Το κιτ που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει συνολικά έξι φιαλίδια/αντιδραστήρια τα οποία αναφέρονται παραπάνω. Παράλληλα, παρασκευάζονται τα αντιδραστήρια που απαιτούνται και δεν εμπεριέχονται στο κιτ σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

Αρχικά, προσδιορίζεται η πρότυπη καμπύλη φωσφόρου χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα φωσφόρου τα οποία κατασκευάζονται από το αρχικό διάλυμα (εντός του κιτ) με τις ακόλουθες αναλογίες:

Πίνακας 22: Ποσότητες νερού και αρχικού πρότυπου διαλύματος φωσφόρου για την παρασκευή των πρότυπων δειγμάτων.

	STD 0 (0 µg)	STD 1 (0,5 µg)	STD 2 (2,5 µg)	STD 3 (5 µg)	STD 4 (7,5 µg)
Απιονισμένο νερό	5,00 mL	4,95 mL	4,75 mL	4,50 mL	4,25 mL
Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου N.5	-	0,05 mL	0,25mL	0,50 mL	0,75 mL
Συνολικός όγκος	5,00 mL	5,00 ml	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL

Κατασκευάζεται πίνακας όπου αναγράφονται οι απορροφήσεις, οι διαφορές τους ανά δείγμα και τα µg φωσφόρου διαιρεμένα με τη διαφορά των απορροφήσεων (συμβολίζεται με M). Από εκεί θα προκύψει και το μέσο M που θα βοηθήσει στον υπολογισμό των υπόλοιπων αποτελεσμάτων.

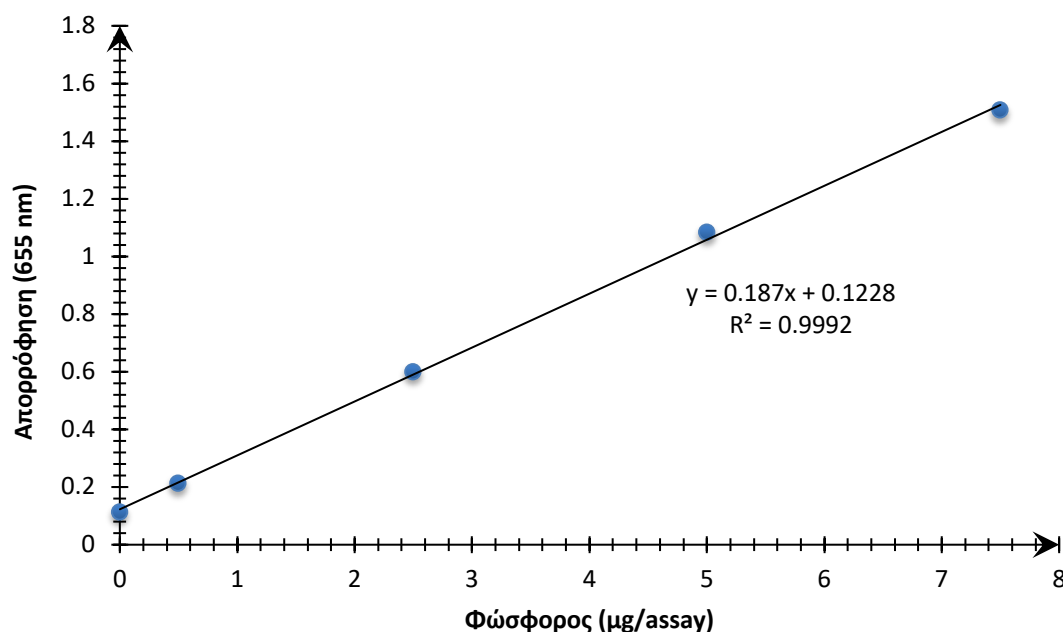
Κατά τον πρώτο πειραματικό κύκλο χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δείγματα:

- a) Cb0
- b) OAT0
- c) Cb1
- d) CbLAB
- e) CbYeast

Παρακάτω παρατίθενται οι πρότυπες μετρήσεις φωσφόρου, η πρότυπη καμπύλη και οι λοιποί υπολογισμοί:

Πίνακας 23: Αποτελέσματα απορροφήσεων προτύπων δειγμάτων φωσφόρου (πρώτη πειραματική διαδικασία).

Phosphorus Standards	P (μg)	A (655 nm)	Δαφphosphorus	(μg/Δαφphosphorus)
STD 0	0	0,113	0	-
STD 1	0,5	0,212	0,099	5,051
STD 2	2,5	0,599	0,486	5,144
STD 3	5	1,082	0,969	5,16
STD 4	7,5	1,507	1,394	5,38
Mean M	-	-	-	5,184



Διάγραμμα 12: Πρότυπη καμπύλη φωσφόρου (πρώτη πειραματική διαδικασία).

Πίνακας 24: Αποτελέσματα απορροφήσεων και συγκεντρώσεων φωσφόρου και φυτικού οξέος στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης (πρώτη πειραματική διαδικασία).

Samples		A (655nm)	ΔAphosphorus	c (Phosphorus)	c (Phytic Acid)
Cb0	Cb0 (FP)	0,205	0,604	0,348	1,234
	Cb0 (TP)	0,809			
Cb1	Cb1 (FP)	0,209	0,106	0,061	0,216
	Cb1 (TP)	0,315			
OAT0	OAT0 (FP)	0,223	0,617	0,356	1,262
	OAT0 (TP)	0,840			
CbLAB	LAB (FP)	0,207	0,108	0,062	0,220
	LAB (TP)	0,315			
CbYeast	Yeast (FP)	0,280	0,193	0,111	0,394
	Yeast (TP)	0,473			

με Mean M= 5,184.

Όπως φαίνεται κι από τις μετρήσεις, τα δείγματα Cb0 και OAT0, τα οποία έχουν υποστεί και τη λιγότερη επεξεργασία, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φυτικού οξέος (1,234 g/100 g και 1,262 g/ 100 g). Η υψηλή συγκέντρωση των μη επεξεργασμένων δειγμάτων μειώνεται σημαντικά με τη ζύμωση, όπως φαίνεται στα δείγματα Cb1, CbLAB και CbYeast. Οι μετρήσεις του δείγματος που έχει υποστεί ζύμωση μόνο με νερό (Cb1) εμφανίζουν και τη μεγαλύτερη πτώση στην τιμή του φυτικού οξέος (0,216 g/100g), ενώ ακολουθεί το δείγμα που περιέχει την καλλιέργεια οξυγαλακτικού (CbLAB) (0,220 g/100g). Μικρότερη πτώση φαίνεται να έχει το δείγμα που περιέχει την καλλιέργεια ζύμης (CbYeast) (0,394 g/100g). Κρίνοντας με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου κύκλου, οι μικροοργανισμοί που περιέχονται φυσικά στα χαρούπια λειτουργούν επικουρικά στη μείωση της συγκέντρωσης του αντιδιατροφικού παράγοντα εφόσον αναπτυχθούν κατά την περίοδο ζύμωσης. Ακόμα, πειραματικά αποδεικνύεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται να έχουν την ικανότητα να μειώσουν παραπάνω τη συγκέντρωση του οξέος σε σχέση με τη ζύμη.

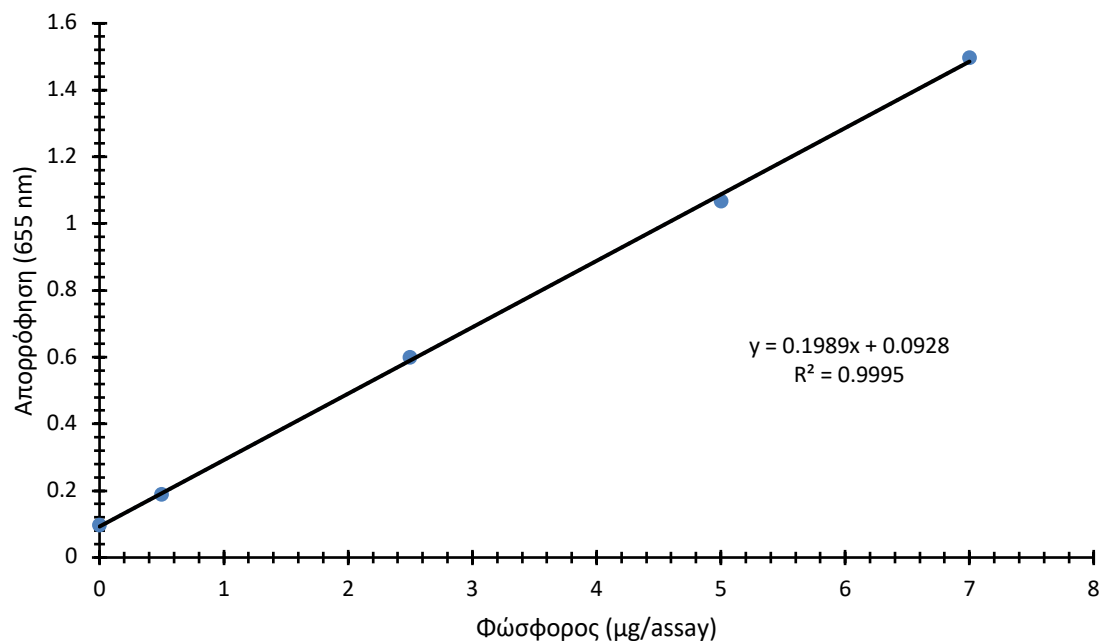
Κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα με την πρώτη προσθέτοντας σε αυτά το δείγμα του αλεύρου του εμπορίου. Συνολικά, εξετάστηκαν τα κάτωθι δείγματα και προέκυψαν τα εξής ευρήματα:

- a) Cb0
- b) Cb205

- c) OAT0
- d) Cb1
- e) CbLAB
- f) CbYeast

Πίνακας 25: Αποτελέσματα απορροφήσεων προτύπων δειγμάτων φωσφόρου (δεύτερη πειραματική διαδικασία).

Phosphorus Standards	P (μg)	A (655 nm)	ΔAphosphorus	(μg/ΔAphosphorus)
STD 0	0	0,096	0	-
STD 1	0,5	0,189	0,093	5,376
STD 2	2,5	0,599	0,503	4,970
STD 3	5	1,067	0,0971	5,149
STD 4	7	1,497	1,401	5,353
Mean M	-	-	-	5,212



Διάγραμμα 13: Πρότυπη καμπύλη φωσφόρου (δεύτερη πειραματική διαδικασία).

Πίνακας 26: Αποτελέσματα απορροφήσεων και συγκεντρώσεων φωσφόρου και φυτικού οξέος στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης (δεύτερη πειραματική διαδικασία).

Samples		A (655 nm)	ΔAphosphorus	c (Phosphorus)	c (Phytic Acid)
Cb0	Cb0 (FP)	0,156	0,410	0,238	0,844
	Cb0 (TP)	0,541			
OAT0	OAT0 (FP)	0,131	0,538	0,312	1,106
	OAT0 (TP)	0,694			
Cb205	Cb205 (FP)	0,158	0,025	0,014	0,050

	Cb205 (TP)	0,183			
Cb1	Cb1 (FP)	0,331	0,428	0,248	0,879
	Cb1 (TP)	0,759			
CbLAB	CbLAB (FP)	0,376	0,632	0,366	1,298
	CbLAB (TP)	1,008			
CbYeast	CbYeast (FP)	0,436	0,680	0,394	1,397
	CbYeast (TP)	1,116			

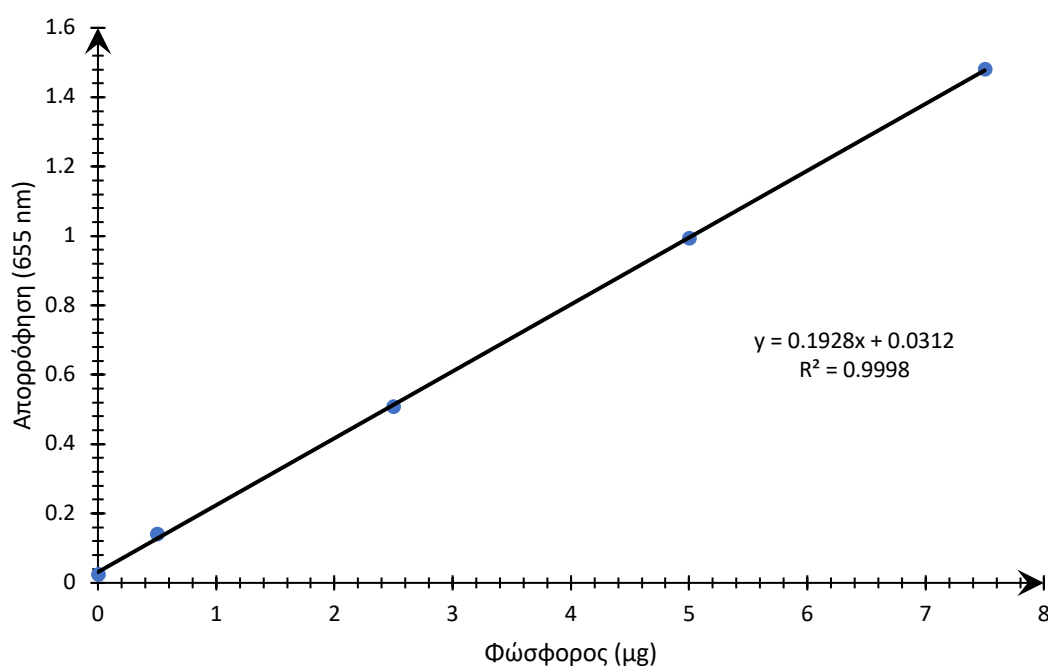
με **Mean M = 5,212**.

Παρατηρούνται σφάλματα τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα που μπορεί να οφείλονται είτε σε λανθασμένους χειρισμούς κατά την προσθήκη των αντιδραστηρίων και επεξεργασία των δειγμάτων είτε σε σφάλματα κατά τις μετρήσεις και το χειρισμό των οργάνων. Οι μετρήσεις των Cb0, OAT0, Cb205 φαίνονται φυσιολογικές και με βάση το προηγούμενο πείραμα αναμενόμενες (για Cb0, OAT0). Το Cb205, χαρουπάλευρο εμπορίου, εμφανίζει πολύ χαμηλές τιμές φυτικού οξέος. Αυτό οφείλεται σε προηγούμενες κατεργασίες που έχει υποστεί πιθανώς κατά την παραγωγή του στο εργοστάσιο έτσι ώστε να είναι πιο εύπεπτο από τον καταναλωτή. Ταυτόχρονα, οι μετρήσεις των δειγμάτων που έχουν υποστεί ζύμωση (Cb1, CbLAB, CbYeast) είναι λανθασμένες καθώς ο ολικός και ο ελεύθερος φώσφορος που περιέχουν είναι μεγαλύτεροι απ' ό,τι στο αρχικό δείγμα (Cb0).

Κατά την τρίτη και τελευταία πειραματική πορεία εξετάστηκε και η δράση του *Aspergillus oryzae* σε συνδυασμό με τα παραπάνω.

Πίνακας 27: Αποτελέσματα απορροφήσεων προτύπων δειγμάτων φωσφόρου (τρίτη πειραματική διαδικασία).

Phosphorus Standards	P (μg)	A (655 nm)	Δaphosphorus	(μg/Δaphosphorus)
STD 0	0	0,023	0	-
STD 1	0,5	0,141	0,118	4,237
STD 2	2,5	0,508	0,485	5,155
STD 3	5	0,993	0,970	5,155
STD 4	7,5	1,48	1,457	5,148
Mean M	-	-	-	4,924



Διάγραμμα 14: Πρότυπη καμπύλη φωσφόρου (τρίτη πειραματική διαδικασία).

Πίνακας 28: Αποτελέσματα απορροφήσεων και συγκεντρώσεων φωσφόρου και φυτικού οξέος στα δείγματα αλεύρου σπόρου χαρουπιών Κρήτης (τρίτη πειραματική διαδικασία).

Samples		A (655 nm)	ΔAphosphorus	c (Phosphorus)	c (Phytic Acid)
Cb0	Cb0 (FP)	0,096	0,466	0,255	0,9047
	Cb0 (TP)	0,562			
Cb205	Cb205 (FP)	0,111	0,032	0,018	0,0621
	Cb205 (TP)	0,143			
OAT0	OAT0 (FP)	0,113	0,581	0,318	1,1280
	OAT0 (TP)	0,694			
Cb1	Cb24h (FP)	0,120	0,148	0,081	0,2873
	Cb24h (TP)	0,268			
CbLAB	CbLAB (FP)	0,322	0,077	0,042	0,1495
	CbLAB (TP)	0,399			
CbYeast	CbYeast (FP)	0,484	0,175	0,096	0,3398
	CbYeast (TP)	0,659			
CbMold	CbMold (FP)	0,076	0,197	0,108	0,3825
	CbMold (TP)	0,273			

με Mean M = 4,924.

Τα τελικά συμπεράσματα η συγκέντρωση φυτικού οξέος φαίνεται να μειώνεται στα δείγματα παρόμοια με το πρώτο πείραμα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ελαττώνουν δραστικά τη συγκέντρωση φυτικού οξέος ενώ η ζύμη και ο *A. oryzae* έχουν παρόμοια δράση, με το CbMold να φαίνεται πως δεν έχει την ίδια αποτελεσματικότητα διάσπασης του φυτικού σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα ζυμώσεων. Αυτό ίσως οφείλεται στον περιορισμένο χρόνο ζύμωσης ή στο προφίλ του χαρουπιού ως υπόστρωμα για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Από την άλλη, το δείγμα Cb1 εμφανίζει ξανά μεγάλη πτώση στις τιμές του αντιδιατροφικού παράγοντα, επιβεβαιώνοντας ότι οι μικροοργανισμοί που περιέχει φυσικά είναι ικανοί να μειώσουν τις τιμές του.

4 Συζήτηση

Με βάση τα παραπάνω, προέκυψαν ευρήματα τα οποία χρήζουν περαιτέρω διευκρινίσεις και συζήτηση. Η συζήτηση θα χωριστεί στα δύο πειραματικά τμήματα: α) Πεπτικότητα και β) Φυτικό οξύ.

a. Πεπτικότητα

Αρχικά, κατά την έκβαση των πειραματικών διαδικασιών σχετικά με την πεπτικότητα σημειώθηκαν μερικές αλλαγές πρωτοκόλλου, οι οποίες βοήθησαν στην εξασφάλιση πιο ομαλών διαδικασιών και ακριβέστερων αποτελεσμάτων. Η αλλαγή της πρώτης ύλης και των ενζυμικών συστημάτων οδήγησε εμφανώς σε πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως φαίνεται τόσο από τους μικροβιολογικούς ελέγχους όσο και από τις δοκιμές πεπτικότητας. Συγκεκριμένα, οι αλλοιώσεις που προέκυψαν στα αρχικά δείγματα σπόρου χαρουπιών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής δυσχέραιναν τη ζυμωτική διεργασία των προστιθέμενων καλλιεργειών – εκκινητών, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην ανάπτυξη και την επικράτηση της αναπτυσσόμενης ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Με την αλλαγή της προέλευσης του χαρουπιού, επιφέρονται αλλαγές και στα βασικά χαρακτηριστικά του, όπως το μικροβιακό φορτίο και το ενζυμικό προφίλ που παρουσιάζει φυσικά ο σπόρος αλλά και ο βαθμός ωριμότητας του φυτού. Συνολικά, οι μεταβολές συντελούν στη διακύμανση των αποτελεσμάτων μεταξύ του πρώτου πειράματος (χαρούπια ΠΑΔΑ) και των επομένων (χαρούπια Κρήτης).

Μετά από τον πρώτο πειραματικό κύκλο, επίσης, άλλαξε η επεξεργασία του δείγματος Control B και η ποσότητα νερού για τη διαβροχή των δειγμάτων. Οι μεταβολές αυτές βοήθησαν στην ομαλότερη διαχείριση των δειγμάτων και αποτέλεσαν μια σημαντική ανακατεύθυνση των πειραμάτων. Το δείγμα B χρησιμοποιείται ως άμεση σύγκριση του δείγματος A, με το A να αποτελεί το αλεύρι του σπόρου χωρίς κάποια θερμική επεξεργασία ενώ το B είναι το δείγμα που δέχεται επεξεργασία προκειμένου να μειωθεί η αρχική, φυσική μικροχλωρίδα των σπόρων. Η διαδικασία του βρασμού που εφαρμόστηκε κατά τον πρώτο πειραματικό κύκλο δεν φαίνεται να δρα αρκετά καταλυτικά στο μικροβιακό φορτίο των σπόρων. Με την αντικατάσταση του βρασμού με αποστείρωση επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απομόνωση των υπό εξέταση μικροβιακών καλλιεργειών (LAB και yeast) στο δείγμα, καθώς δεν υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ μικροοργανισμών και η σύγκριση για την αποτελεσματικότερη δράση τους είναι πιο ξεκάθαρη όπως και η σύγκριση ανεπεξέργαστου (Δείγμα A) και μη (Δείγμα B).

Πίνακας 27: Μικροβιολογικές αναλύσεις στο δείγμα B (βρασμός).

Δείγμα B	OMX		Δείγμα B	Biofilm	
	Τρυβλίο (α)	Τρυβλίο (β)		Φιλμ (α)	Φιλμ (β)
10 ⁻²	4	3	10 ⁻²	>300	>300
10 ⁻³	12	1	10 ⁻³	<30	<30
10 ⁻⁴	2	2	10 ⁻⁴	0	0

Πίνακας 28: Μικροβιολογικές αναλύσεις στο δείγμα B (αποστείρωση) στις 0h.

Δείγμα B	OMX		Ζύμες/Μύκητες (RBA)	
	Τρυβλίο (α)	Τρυβλίο (β)	Τρυβλίο (α)	Τρυβλίο (β)
10 ⁻²	0	0	0	0
10 ⁻³	1	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0

Σχετικά με την ποσότητα νερού που προστίθεται στα δείγματα, παρατηρείται και πάλι αλλαγή μετά τον πρώτο κύκλο. Αρχικά, προστίθεται ποσότητα 5 mL απεσταγμένου νερού και αφού παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα ήταν υπερβολικά ξηρά και το περιβάλλον δεν ευνοούσε την

ανάπτυξη των επιθυμητών μικροοργανισμών, προστέθηκαν ακόμα 15,0 mL, φτάνοντας συνολικά στα 20,0 mL. Ωστόσο, η διαβροχή αυτή οδήγησε σε «λασπώδη» τρυβλία, με υπερβολική υγρασία. Με βάση αυτό, στους επόμενους κύκλους προστέθηκαν εξ αρχής 14,0 mL απεσταγμένου νερού, επιτυγχάνοντας την κατάλληλη υγρασία.

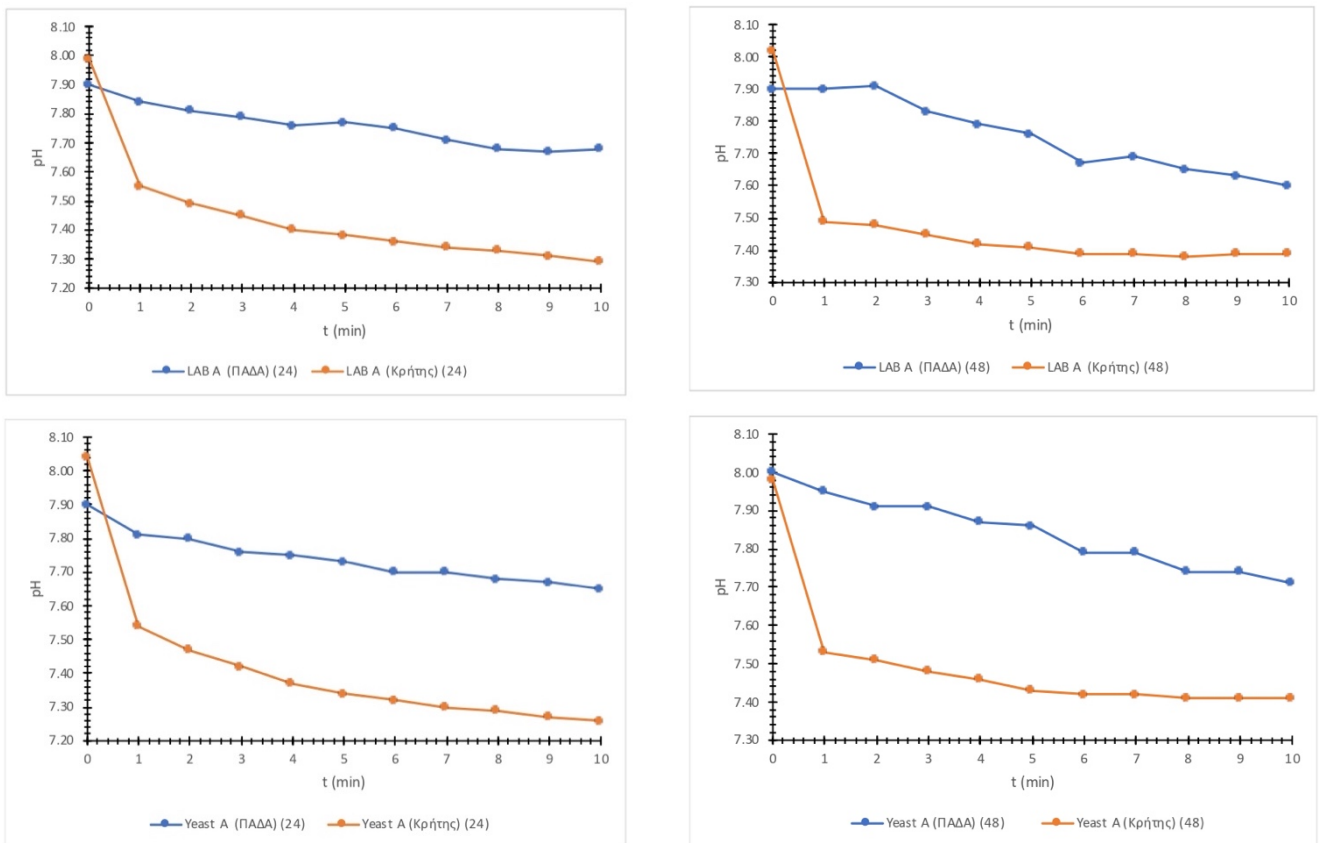


Εικόνα 23: Τρυβλία μετά από προσθήκη επιπλέον 15,0 mL απεσταγμένου νερού (24 h). Είχε προηγηθεί προσθήκη 5,0 mL στις 0h.

Εικόνα 24: Τρυβλία έπειτα από διαβροχή με 14,0 mL (0 h).

Όσον αφορά τα ένζυμα που προστίθενται κατά τη μέτρηση του pH, μετά το πρώτο πείραμα η σύσταση αλλάχθηκε. Ο συνδυασμός πεψίνης και χυμοθρυψίνης στο διάλυμα πολυενζύμων δεν είναι ιδανικός για το εύρος pH που πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Η πεψίνη εμφανίζει μέγιστα επίπεδα δράσης στο εύρος pH 1,2 – 2,5, ενώ η χυμοθρυψίνη στο 7,0 – 9,0. Πριν την προσθήκη ενζύμου, το προς μέτρηση διάλυμα σταθεροποιείται σε pH = 8,0 κι έτσι το διάλυμα των πολυενζύμων δεν μπορεί να δράσει στο μέγιστο βαθμό καθώς απέχει από το ιδανικό εύρος εξαιτίας της πεψίνης. Ακολούθησε διαδικασία δοκιμών όπου εισήχθη η παγκρεατίνη ($pH_{opt} = 8,0 \pm 0,1$) είτε σε συνδυασμό με τη χυμοθρυψίνη είτε ως το μοναδικό πολυένζυμο. Διαπιστώθηκε ότι η χρήση παγκρεατίνης χωρίς τη συμμετοχή άλλου πολυενζύμου προκαλούσε μεγαλύτερη πτώση του pH και γι' αυτό προτιμήθηκε για τα επόμενα πειράματα. Αυτό φαίνεται συγκρίνοντας τα αποτελέσματα πεπτικότητας των δύο πειραματικών

διαδικασιών στα ζυμωμένα δείγματα, όπου φαίνεται ο μεγαλύτερος μεταβολισμός των θρεπτικών συστατικών των σπόρων από τα ένζυμα του συνόλου της παγκρεατικής. Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι το ενζυμικό περιεχόμενο της παγκρεατικής αποτελείται εκτός από πρωτεάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη) και από αμυλάσες και λιπάσες, διασπώντας ταυτόχρονα, έτσι, και το ελάχιστο ποσό αμύλου του σπόρου (περίπου 0,1%) και το περιεχόμενο λίπος (1,0 – 1,1%). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι μέρος της πτώσης του pH των δειγμάτων κατά την πειραματική διαδικασία οφείλεται στα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των σύνθετων λιπιδικών συστατικών του σπόρου, μέσω των εκτεθειμένων καρβοξυλομάδων. Η ζύμωση με καλλιέργεια *Lactobacillus plantarum* με τη χρήση παγκρεατικής χαρακτηρίστηκε από ομαλή πτώση του pH και στις δύο ημέρες της ζύμωσης, ωστόσο η μεγαλύτερη πτώση παρατηρήθηκε την πρώτη ημέρα ζύμωσης με τη χορήγηση εκκινητή



Διάγραμμα 15: Γραφικές παραστάσεις pH συναρτήσει του χρόνου για την σύγκριση των αποτελεσμάτων πεπτικότητας μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου πειραματικού κύκλου μετά την επίδραση καλλιέργειας *Lactobacillus plantarum* (πάνω) και *Saccharomyces cerevisiae* (κάτω) μετά τη ζύμωση 24 και 48 ωρών.

Saccharomyces cerevisiae. Παρόλο που φαίνεται μια ικανοποιητική μείωση του pH την δεύτερη ημέρα της ζύμωσης και συγκρίνοντας τις δύο ημέρες ζύμωσης, μπορεί να διαπιστωθεί ότι μια ημέρα ζύμωσης ήταν ιδανική για την απελευθέρωση των απλούστερων πρωτεϊνικών μορίων. Την δεύτερη ημέρα ζύμωσης, όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα, από τη

δοκιμή πεπτικότητας μετά τη ζύμωση με την οξυγαλακτική καλλιέργεια μπορεί να παρατηρηθεί ελάχιστα καλύτερη και ομαλότερη πτώση του pH.

Συνολικά, αν και τα δείγματα Control παρουσιάζουν μεγάλη πτώση pH, η ζύμωση δε φαίνεται να επηρεάζει την μείωση του pH αφού σχεδόν σε κάθε μέτρηση παραμένει περίπου σταθερή ανεξαρτήτου χρόνου. Τα δείγματα LAB A και Yeast A, επίσης, δρουν αποτελεσματικά αλλά με τη διαφορά ότι οι ζυμομύκητες εμφανίζουν τη μέγιστη δράση τους το πρώτο 24ωρο ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν πρακτικά σταθερή πτώση. Είναι πιθανό οι ζυμομύκητες να επηρεάζονται από την ανάπτυξη ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας στο αλεύρι χαρουπιού A που δεν έχει δεχτεί επεξεργασία και εκεί να οφείλεται η μείωση της δράσης τους. Αντίθετα, τα LAB, με την εξαίρεση μιας μικρής πτώσης στις 48h ζύμωσης, φαίνεται να μην επηρεάζονται από την ανάπτυξη άλλων αποικιών ή να δρουν συνεργατικά. Τα αντίστοιχα δείγματα που περιέχουν αλεύρι που έχει υποστεί αποστείρωση, LAB A/C και Yeast A/C, φαίνεται να δρουν πιο αποτελεσματικά σε συγκεκριμένες ώρες ζυμώσεως. Πιο συγκεκριμένα, τα οξυγαλακτικά επιτυγχάνουν μέγιστη μείωση κατά τα πρώτα δύο εικοσιτετράωρα, με φανερή ελάττωση της δράσης τους στις 72h. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην κατανάλωση μέρους των σακχάρων και επόμενο περιορισμό της δράσης τους. Αντίθετα, οι σακχαρομύκητες προκαλούν σταθερά, μεγάλη πτώση του pH, με κορύφωση της πτώσης του pH στις 48 h ζύμωσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποτελούν μέρος μια προκαταρκτικής έρευνας στους σπόρους χαρουπιού. Ως αποτέλεσμα, κατά την πορεία των πειραμάτων παρατηρήθηκαν σφάλματα. Αυτά μπορεί να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες, όπως την επιλογή του σπόρου (ωριμότητα καρπού – πιθανές επιμολύνσεις κατά το διαχωρισμό του σπόρου), τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του pH, την επεξεργασία του σπόρου (αποστείρωση, βρασμός, κλπ.), τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, οι διεργασίες προσαρμόζονταν κατά την εξέλιξη των πειραμάτων ώστε να επιτραπεί μια πιο ομαλή διαδικασία.

b. Φυτικό οξύ

Αρχικά, κατά τον προσδιορισμό του φυτικού οξέος εξετάστηκαν διαφορετικά δείγματα σε σχέση με το πείραμα της πεπτικότητας. Εκτός από το αλεύρι χαρουπιού (Cb0), το δείγμα με αλεύρι που υπέστη ζύμωση με αποστειρωμένο νερό (Cb1) και τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με καλλιέργειες οξυγαλακτικών (CbLAB) και ζυμομύκητα (CbYeast), εξετάστηκαν και άλλα

τρία δείγματα που βοήθησαν στη σύγκριση: το χαρουπάλευρο εμπορίου (Cb205), το δείγμα βρώμης (OAT0) και, τέλος, εξετάστηκε η δράση του μικροοργανισμού *A. oryzae* (CbMold) που συμμετέχει σε ζυμώσεις αρκετών φυτικών τροφίμων. Το χαρουπάλευρο εμπορίου χρησιμοποιήθηκε ως συγκριτικό μέσο για το ανεπεξέργαστο χαρουπάλευρο καθώς είναι ένα προϊόν που έχει υποστεί βιομηχανική επεξεργασία και το περιεχόμενο φυτικό οξύ είναι μειωμένο, επιτυγχάνοντας καλύτερα διατροφικά χαρακτηριστικά για τον καταναλωτή. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με τις μετρήσεις όπου η περιεκτικότητα σε φυτικό οξύ ήταν χαμηλή. Το δείγμα βρώμης ήταν κομμάτι του kit και οι μετρήσεις του υποδείκνυαν τις αναμενόμενες τιμές ενός άλλου υπό εξέταση φυτικού αλεύρου. Το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με *A. oryzae* αποτέλεσε ακόμα μία καλλιέργεια μικροοργανισμών που δυνητικά θα μπορούσε να μειώσει τη συγκέντρωση του φυτικού οξέος. Συγκεκριμένα, ο *A. oryzae* (kōji) είναι ένας μικροοργανισμός που συμμετέχει σε πολλά ζυμούμενα τρόφιμα ασιατικής προέλευσης, όπως σάλτσα σόγιας, miso και αλκοολούχα ποτά, όπως sake και shōchū.

Σχετικά με το δεύτερο πειραματικό κύκλο, οι μετρήσεις του φωσφόρου, και η ποσότητα του οξέος, που υπολογίστηκε αργότερα αποκλίνουν αρκετά από τα άλλα δύο πειράματα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είχαν επέλθει λάθος χειρισμοί κατά την εκτέλεση του συγκεκριμένου πειράματος οδηγώντας σε αλλοιωμένα αποτελέσματα που δεν πρέπει να ληφθούν υπόψιν για τα τελικά συμπεράσματα.

Αναλύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, το χαρούπι φαίνεται πως περιέχει φυσικά περιεκτικότητα σε φυτικό οξύ παρόμοια με αυτή της βρώμης. Όταν, όμως, υποστεί ζύμωση υπό τις κατάλληλες συνθήκες, η φυσική χλωρίδα που αναπτύσσεται είναι ικανή να μειώσει το φώσφορο, άρα και το φυτικό οξύ, που περιέχεται, όπως φαίνεται από το δείγμα Cb1. Βέβαια, η μείωση που επέρχεται δεν φτάνει το επίπεδο του χαρουπάλευρου εμπορίου (Cb205), το οποίο είναι ασφαλές να υποθέσουμε ότι έχει υποστεί περαιτέρω επεξεργασία για τη μείωση της συγκέντρωσης του οξέος. Σχετικά με τους μικροοργανισμούς που προστέθηκαν, τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν τη μεγαλύτερη πτώση, ενώ ακολουθούν ο ζυμομύκητας και, τέλος, ο kōji. Με βάση αυτά, το χαρούπι ως υπόστρωμα φαίνεται να επηρεάζεται αρκετά περισσότερο από τα LAB, με τη τιμή του φυτικού οξέος να προσεγγίζει αυτή που έχει το δείγμα του εμπορίου αλλά και από τη φυσικά αναπτυσσόμενη μικροχλωρίδα. Συνολικά, η ζυμωτική διεργασία δρα αποτελεσματικά στη μείωση του φυτικού οξέος.

Πίνακας 29: Μετρήσεις συγκεντρώσεως φυτικού οξέος

Δείγματα	C (Phytic Acid)				
	Πρώτο πείραμα	Δεύτερο πείραμα	Τρίτο πείραμα	Μέσος όρος πρώτου και τρίτου	Μέσος όρος
Cb0	1,234	0,844	0,905	1,069	0,994
Cb1	0,216	0,879	0,287	0,251	0,461
Cb205	-	0,050	0,062	0,062	0,056
OAT0	1,262	1,106	1,128	1,195	1,165
CbLAB	0,220	1,298	0,149	0,184	0,556
CbYeast	0,394	1,397	0,340	0,367	0,710
CbMold	-	-	0,382	0,382	0,382

5 Συμπεράσματα

Κατά τη μελέτη των εφαρμογών των μικροβιακών ζυμώσεων στο χαρούπι εξετάστηκαν δύο σημαντικοί παράμετροι των φυτικών σπόρων, η πεπτικότητα και το φυτικό οξύ. Και οι δύο αποτελούν σημαντικά κομμάτια μιας μεγαλύτερης μελέτης για τις φυτικές πηγές τροφίμων και τα συμπεράσματα που αντλούνται είναι ένα πρώτο βήμα προς την καλύτερη κατανόησή τους. Η βιβλιογραφία σχετικά με τους σπόρους της χαρουπιάς είναι αρκετά περιορισμένη, γεγονός που δυσκόλεψε την έρευνα για το φυτό και την επεξεργασία του. Όπως προαναφέρθηκε, οι μικροβιακές ζυμώσεις είναι ένα αρχαίο και βασικό «εργαλείο» στα πλαίσια της ανθρώπινης διατροφής και είναι ζωτικής σημασίας να εξεταστεί επιπλέον.

Πρώτα, στην εργασία μελετήθηκε η πεπτικότητα των σπόρων χαρουπιού. Ο εμβολιασμός με καλλιέργειες μικροοργανισμών επιτρέπει την απομονωμένη αξιολόγηση των επιμέρους καλλιεργειών σε συνθήκες που εκείνοι δρουν βέλτιστα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, λοιπόν, η προσθήκη ζυμομυκήτων (*S. cerevisiae*) φαίνεται να προκαλεί τη μεγαλύτερη ελάττωση του pH και, συγκεκριμένα, κατά το πρώτο 24ωρο ζύμωσης όταν ακόμα θα υπάρχει μεγάλη ποσότητα σακχάρων, υποδηλώνοντας ότι θα έχει και τη μεγαλύτερη επίδραση στην πέψη των σπόρων. Βέβαια, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και η φυσική μικροχλωρίδα των σπόρων μπορεί να προκαλέσουν πτώση του pH, γεγονός που συνεπάγεται πως, γενικά, οι

ζυμώσεις δρουν καταλυτικά ως προς την πεπτικότητα των σπόρων του χαρουπιού. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για την εξακρίβωση των συμπερασμάτων.

Έπειτα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του φυτικού οξέος σε διάφορα δείγματα χαρουπιού και, έτσι, έγινε εφικτή η σύγκρισή τους. Αντίθετα, με την μελέτη της πεπτικότητας, σε αυτή την περίπτωση τη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης του φυτικού οξέος προκαλούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Στα δείγματα που περιέχονται καλλιέργειες οξυγαλακτικών, η συγκέντρωση του φυτικού μειώνεται σε βαθμό που προσεγγίζει αυτή του αλεύρου εμπορίου. Επίσης, αποτελεσματική φαίνεται να είναι η φυσική μικροχλωρίδα του χαρουπιού, καθώς προκαλεί τη δεύτερη μεγαλύτερη μείωση μετά από ζύμωση. Τα δείγματα που περιέχουν *S. cerevisiae* και *A. oryzae* δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην ελάττωση του φυτικού οξέος.

Γενικά, μέσα από τα πειράματα αποδεικνύεται ότι το χαρούπι, χωρίς την προσθήκη επιπλέον μικροοργανισμών, αποτελεί μια εξαιρετική πρώτη ύλη, καθώς οι ανεπιθύμητες ιδιότητές του περιορίζονται μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης. Από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι τα πιο αποτελεσματικά, αφού και στις δύο πειραματικές διεργασίες έχουν θετικό αποτέλεσμα.

6 Βιβλιογραφία

1. Anasontzis, G. E., Kourtoglou, E., Villas-Boas, S. G., Hatzinikolaou, D. G., & Christakopoulos, P. (2016). Metabolic engineering of *Fusarium oxysporum* to improve its ethanol-producing capability. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY).
2. Chai, K. F., Ng, K. R., Samarasiri, M., & Chen, W. N. (2022). Precision fermentation to advance fungal food fermentations. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 47). Elsevier Ltd.
3. Daba, G. M., Mostafa, F. A., & Elkhateeb, W. A. (2021). The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. In *Bioresources and Bioprocessing* (Vol. 8, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
4. Dahal, P. (2022). Anaerobic Respiration- Definition, Types, Steps, Equation, Products, Uses. *Microbe Notes*.
5. de Carvalho, C. C. C. R. (2016a). *Fungi in Fermentation and Biotransformation Systems* (pp. 525–541).
6. Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K.-H. (2012). PRODUCTION OF GABA (γ -AMINOBUTYRIC ACID) BY MICROORGANISMS: A REVIEW. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1230–1241.
7. Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, pp. S95–S128). Oxford University Press.

8. Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., López de Cerain, A., & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163–176.
9. Gurban, A. M., Epure, P., Oancea, F., & Doni, M. (2017). Achievements and prospects in electrochemical-based biosensing platforms for aflatoxin M1 detection in milk and dairy products. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 17, Issue 12). MDPI AG.
10. Iram, A., Özcan, A., Yatmaz, E., Turhan, İ., & Demirci, A. (2022). Effect of Microparticles on Fungal Fermentation for Fermentation-Based Product Productions. In *Processes* (Vol. 10, Issue 12). MDPI.
11. Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 43, Issue 8, pp. 2587–2627). Royal Society of Chemistry.
12. Maicas, S. (2020a). The role of yeasts in fermentation processes. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 8, pp. 1–8). MDPI AG.
13. McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C. (2004). *Fermented beverages of pre-and proto-historic China*.
14. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. In *AIMS Microbiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–31). AIMS Press.
15. Perrone, G., Ferrara, M., Medina, A., Pascale, M., & Magan, N. (2020). Toxigenic fungi and mycotoxins in a climate change scenario: Ecology, genomics, distribution, prediction and prevention of the risk. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1–20). MDPI AG.
16. Pouyan, N., Mohammad, S., & Sarmadi, T. (2015a). *A Peer Reviewed International Journal of Asian Academic Research Associates AARJMD ASIAN ACADEMIC RESEARCH JOURNAL OF MULTIDISCIPLINARY PASTEUR AND THE OTHER RESEARCHERS WHO PROVIDED THE SIGNIFICANT PROOF FOR THE FERMENTATION BY LIVING ORGANISMS* (Vol. 2, Issue 4).
17. Raghukumar, S. (2017). *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems*.
18. Rajshree Saxena, B. S., & Singh, R. (2011). AMYLASE PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES USING. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1334–1342.
19. Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). *Preservation and fermentation: past, present and future*.
20. Samtiya, M., Aluko, R. E., Puniya, A. K., & Dhewa, T. (2021). Enhancing micronutrients bioavailability through fermentation of plant-based foods: A concise review. In *Fermentation* (Vol. 7, Issue 2). MDPI AG.
21. Sanjukta, S., & Rai, A. K. (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 1–10.
22. Shiferaw Terefe, N., & Augustin, M. A. (2020). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 17, pp. 2887–2913). Bellwether Publishing, Ltd.
23. Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue MAR). Frontiers Research Foundation.
24. Tofalo, R., & Suzzi, G. (2015). Yeasts. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 593–599). Elsevier Inc.
25. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A.
26. Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019a). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 203–243.

27. Sá, Amanda Gomes Almeida, Yara Maria Franco Moreno, and Bruno Augusto Mattar Carciofi. "Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet." *Trends in Food Science & Technology* 97 (2020): 170-184.
28. Clemente, Alfonso, et al. "Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds." *Food Chemistry* 62.1 (1998): 1-6.
29. López, Débora N., et al. "Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties." *International journal of biological macromolecules* 109 (2018): 152-159.
30. (Han, 2015). "Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein." *Food chemistry* 172 (2015): 766-769.
31. Mattila, Pirjo, et al. "Nutritional value of commercial protein-rich plant products." *Plant foods for human nutrition* 73.2 (2018): 108-115.
32. Pires, Christiano Vieira, et al. "Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas." *Food Science and Technology* 26 (2006): 179-187.
33. Pires, Christiano Vieira, et al. "Digestibilidade in vitro e in vivo de proteínas de alimentos: estudo comparativo." *Alim Nutr* 1 (2006): 01-09.
34. Saharan, K., and N. Khetarpaul. "Protein quality traits of vegetable and field peas: Varietal differences." *Plant Foods for Human Nutrition* 45 (1994): 11-22.
35. Boye, J. R.-B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 183 - 211.
36. Clemente, A. S.-V. (1998). Effect of Cooking on Protein Quality of Chickpea (*Cicer arietinum*) Seeds. In *Food Chemistry* 62.1 (pp. 1-6).
37. Gilani, G., & Lee, N. (2003). PROTEIN | Quality. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 4847 - 4854.
38. Han, S.-W. K.-M.-J. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. In *Food chemistry* 172 (pp. 766 - 769).
39. Katz, S. E. (2013). *The Art Of Fermentation: An In-Depth Exploration of Essential Concepts and Processes from Around the World*. Chelsea Green Publishing Co.
40. Kotzekidou, P. (2016). *Food Microbiology & Microbiological Analysis of Foods*. Thessaloniki: S. Giahoudis & Co.
41. Mattila P, M. S. (2018). Nutritional value of commercial protein - rich plant products. *Plant foods for human nutrition* 73.2, 108 - 115.
42. Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2017). *Food Microbiology: An Introduction*. ASM Press
43. Nenova, N. D. (2012). Investigation on protein content and amino acid composition in the kernels of some sunflower lines. *Helia* 35.56, 41 - 46.
44. Pires, C. V. (2006). Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Food Science & Technology* 26, 179 - 187.
45. Saharan, K. a. (1994). Protein quality traits of vegetable and field peas: Varietal differences. *Plant Foods for Human Nutrition* 45, 11 - 22.
46. Vendemiatti, A. (2008). Nutritional Quality of Sorghum Seeds: Storage Proteins and Amino Acids. *Food Biotechnology* 22.4, 377 - 397.
47. De Gavelle, Erwan, et al. "Protein adequacy is primarily a matter of protein quantity, not quality: Modeling an increase in plant: Animal protein ratio in French adults." *Nutrients* 9.12 (2017): 1333.
48. Chongtham, Nirmala, Madho Singh Bisht, and Sheena Haorongbam. "Nutritional properties of bamboo shoots: potential and prospects for utilization as a health food." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10.3 (2011): 153-168.
49. Alemayehu, F. Reta, M. A. Bendevis, and S-E. Jacobsen. "The potential for utilizing the seed crop amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an alternative crop to support food

- security and climate change mitigation." *Journal of Agronomy and Crop Science* 201.5 (2015): 321-329.
50. Conde, José Miñones, et al. "Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity." *Journal of agricultural and food chemistry* 53.20 (2005): 8038-8045.
 51. Pojić, Milica, Aleksandra Mišan, and Brijesh Tiwari. "Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin." *Trends in Food Science & Technology* 75 (2018): 93-104.
 52. Sun-Waterhouse, Dongxiao, Mouming Zhao, and Geoffrey IN Waterhouse. "Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition." *Food and Bioprocess Technology* 7 (2014): 1853-1893.
 53. Coda, Rossana, et al. "Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition." *LWT-Food Science and Technology* 82 (2017): 296-302.
 54. Lqari, H., et al. "Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization." *Food chemistry* 76.3 (2002): 349-356.
 55. de Oliveira Sousa, Amanda Goulart, et al. "Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut." *Food Research International* 44.7 (2011): 2319-2325.
 56. Aider, Mohammed, and Chockry Barbana. "Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity—A practical and critical review." *Trends in food science & technology* 22.1 (2011): 21-39.
 57. Rizzo, Gianluca, and Luciana Baroni. "Soy, soy foods and their role in vegetarian diets." *Nutrients* 10.1 (2018): 43.
 58. Çabuk, Burcu, et al. "Effect of fermentation on the protein digestibility and levels of non-nutritive compounds of pea protein concentrate." *Food technology and biotechnology* 56.2 (2018): 257.
 59. Ojokoh, Anthony O., and Wei Yimin. "Effect of fermentation on chemical composition and nutritional quality of extruded and fermented soya products." *International Journal of Food Engineering* 7.4 (2011).
 60. Willett, Walter, et al. "Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems." *The lancet* 393.10170 (2019): 447-492.
 61. Steffen, Will, et al. "Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet." *Science* 347.6223 (2015): 1259855.
 62. Vermeulen, Sonja J., Bruce M. Campbell, and John SI Ingram. "Climate change and food systems." *Annual review of environment and resources* 37 (2012): 195-222.
 63. Alexandratos, Nikos. "World food and agriculture to 2030/50." *Highlights and views from MID-2009: Paper for the Expert Meeting on "How to Feed the World in. Vol. 2050. 2009.*
 64. Bruinsma, Jelle. "The resource outlook to 2050." *Expert meeting on how to feed the world in. Vol. 2050. 2009.*
 65. Evans, Lloyd T. *Feeding the ten billion: plants and population growth.* Cambridge University Press, 1998.
 66. Grigg, David. "The nutritional transition in Western Europe." *Journal of historical geography* 21.3 (1995): 247.
 67. Grigg, David. "The pattern of world protein consumption." *Geoforum* 26.1 (1995): 1-17.
 68. Steinfeld, Henning. *Livestock's long shadow: environmental issues and options.* Food & Agriculture Org., 2006.
 69. Schaefer, Garry L., Michael H. Cosh, and Thomas J. Jackson. "The USDA natural resources conservation service soil climate analysis network (SCAN)." *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology* 24.12 (2007): 2073-2077.
 70. Smil, Vaclav. "Nitrogen and food production: proteins for human diets." *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 31.2 (2002): 126-131.

71. Smil, Vaclav. "Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins." *Enzyme and Microbial technology* 30.3 (2002): 305-311.
72. Fischer, R. A., Derek R. Byerlee, and Gregory O. Edmeades. *Can technology deliver on the yield challenge to 2050?*. No. 138-2016-2032. 2009.
73. Gilland, Bernard. "World population and food supply: can food production keep pace with population growth in the next half-century?." *Food policy* 27.1 (2002): 47-63.
74. Pimentel, David, and Marcia Pimentel. "Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment." *The American journal of clinical nutrition* 78.3 (2003): 660S-663S.
75. Smil, Vaclav. "Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences." *Annual review of energy and the environment* 25.1 (2000): 53-88.
76. Smil, Vaclav. "Energy in the twentieth century: resources, conversions, costs, uses, and consequences." *Annual Review of Energy and the Environment* 25.1 (2000): 21-51.
77. Msangi, Siwa, and Mark Rosegrant. "World agriculture in a dynamically-changing environment." *FAO Expert Meeting on How to feed the World in*. 2009.
78. Liu, Junguo, and Hubert HG Savenije. "Food consumption patterns and their effect on water requirement in China." *Hydrology and Earth System Sciences* 12.3 (2008): 887-898.
79. Liu, Junguo, Hong Yang, and H. H. G. Savenije. "China's move to higher-meat diet hits water security." *Nature* 454.7203 (2008): 397-397.
80. Ye, Liming, and Eric Van Ranst. "Production scenarios and the effect of soil degradation on long-term food security in China." *Global Environmental Change* 19.4 (2009): 464-481.
81. EFSA Guidance for Those Carrying out Systematic Reviews European Food Safety Authority. "Application of systematic review methodology to food and feed safety assessments to support decision making." *EFSA journal* 8.6 (2010): 1637.
82. Gregory, Peter J., et al. "Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate." *Journal of experimental botany* 60.10 (2009): 2827-2838.
83. Drewnowski, Adam, and Nicole Darmon. "The economics of obesity: dietary energy density and energy cost-." *The American journal of clinical nutrition* 82.1 (2005): 265S-273S.
84. MacDonald, Donald D., C. G. Ingersoll, and T. A. Berger. "Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems." *Archives of environmental contamination and toxicology* 39 (2000): 20-31.
85. Vialles, Noëlie. *Animal to edible*. Cambridge University Press, 1994.
86. Grunert, Klaus G. "Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption." *Meat science* 74.1 (2006): 149-160.
87. Jamison, Andrew. "The making of green knowledge: the contribution from activism." *Futures* 35.7 (2003): 703-716.
88. Pachauri, Rajendra K., et al. *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ipcc, 2014.
89. Agreement, Paris. "Paris agreement." *report of the conference of the parties to the United Nations framework convention on climate change (21st session, 2015: Paris)*. Retrived December. Vol. 4. HeinOnline, 2015.
90. Smith, Pete, et al. "Agriculture, forestry and other land use (AFOLU)." *Climate change 2014: mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, 2014. 811-922.
91. Bennetzen, Eskild H., Pete Smith, and John R. Porter. "Decoupling of greenhouse gas emissions from global agricultural production: 1970–2050." *Global change biology* 22.2 (2016): 763-781.
92. Newbold, Tim, et al. "Has land use pushed terrestrial biodiversity beyond the planetary boundary? A global assessment." *Science* 353.6296 (2016): 288-291.

93. Garnett, Tara. "Plating up solutions." *Science* 353.6305 (2016): 1202-1204.
94. Koplitz, Shannon N., et al. "Public health impacts of the severe haze in Equatorial Asia in September–October 2015: demonstration of a new framework for informing fire management strategies to reduce downwind smoke exposure." *Environmental Research Letters* 11.9 (2016): 094023.
95. Springmann, Marco, et al. "Global and regional health effects of future food production under climate change: a modelling study." *The Lancet* 387.10031 (2016): 1937-1946.
96. Myers, Samuel S., et al. "Increasing CO₂ threatens human nutrition." *Nature* 510.7503 (2014): 139-142.
97. World Health Organization. *The state of food security and nutrition in the world 2018: building climate resilience for food security and nutrition*. Food & Agriculture Org., 2018.
98. DeClerck, Fabrice AJ, et al. "Agricultural ecosystems and their services: the vanguard of sustainability?." *Current opinion in environmental sustainability* 23 (2016): 92-99.
99. Garbach, Kelly, et al. "Examining multi-functionality for crop yield and ecosystem services in five systems of agroecological intensification." *International Journal of Agricultural Sustainability* 15.1 (2017): 11-28.
100. Garnett, Tara, et al. "Sustainable intensification in agriculture: premises and policies." *Science* 341.6141 (2013): 33-34.
101. Tilman, David, et al. "Global food demand and the sustainable intensification of agriculture." *Proceedings of the national academy of sciences* 108.50 (2011): 20260-20264.
102. Rockström, Johan, et al. "Sustainable intensification of agriculture for human prosperity and global sustainability." *Ambio* 46 (2017): 4-17.
103. De Boer, Joop, and Harry Aiking. "On the merits of plant-based proteins for global food security: Marrying macro and micro perspectives." *Ecological economics* 70.7 (2011): 1259 – 1265
104. Pilcher, Helen. "Increasing virulence of bird flu threatens mammals." *Nature* 430.6995 (2004), 4-5
105. Johnson, James R., et al. "Molecular analysis of *Escherichia coli* from retail meats (2002 – 2004) from the United States national antimicrobial resistance monitoring system. *Clinical Infectious Diseases*, 49.2: 195 – 201.
106. Garnett, Tara. "Livestock-related greenhouse gas emissions: impacts and options for policy makers. *Environmental science & policy*, 12(4),(2009): 491-503.
107. Fischler, C. "The McDonaldization of Culture, published in *Food: a Culinary History from Antiquity to the Present*, edited by: Flandarin, Montanari and Sonnenfeld." (1999).
108. Oatway, Lori, Thava Vasanthan, and James H. Helm. "Phytic acid." *Food Reviews International* 17.4 (2001): 419-431.
109. Tsao, George T., et al. "Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63 (1997): 731-741.
110. Ravindran, V., G. Ravindran, and S. Sivalogan. "Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin." *Food Chemistry* 50.2 (1994): 133-136.
111. Lee, Beom Jun, and Deloy G. Hendricks. "Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation." *Journal of Food Science* 60.2 (1995): 241-244.
112. Lehrfeld, Jacob. "HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42.12 (1994): 2726-2731.
113. Reddy, N. R., et al. *Phytates in cereals and legumes*. CRC Press, 1989.
114. Barrier-Guillot, B., et al. "Wheat phosphorus availability: I-In vitro study; factors affecting endogenous phytase activity and BIOAVAILABILITY OF PHOSPHORUS IN PIGS biological availability of feed phosphates in pig feeding." *Neth. J. Agric. Sci* 38 (1996): 555-566.

115. Türk, Maria, Nils-Gunnar Carlsson, and Ann-Sofie Sandberg. "Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; effect of yeast and wheat phytases." *Journal of cereal science* 23.3 (1996): 257-264.
116. Rickard, E. S., and L. U. Thompson. "Interactions and effects of phytic acid, Antinutrients and Phytochemicals in Food." (1997): 294-313.
117. Lehrfeld, Jacob, and Eugene R. Morris. "Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40.11 (1992): 2208-2210.
118. Fredlund, Kerstin, et al. "Phytate reduction in whole grains of wheat, rye, barley and oats after hydrothermal treatment." *Journal of Cereal Science* 25.1 (1997): 83-91.
119. Kivistö, Barbro, et al. "Extrusion cooking of a high-fibre cereal product: 2. Effects on apparent absorption of zinc, iron, calcium, magnesium and phosphorus in humans." *British Journal of Nutrition* 55.2 (1986): 255-260.
120. Sandberg, Ann-Sofie. "The effect of food processing on phytate hydrolysis and availability of iron and zinc." *Nutritional and toxicological consequences of food processing* (1991): 499-508.
121. Plaami, Sirkka, and Jorma Kumpulainen. "Inositol phosphate content of some cereal-based foods." *Journal of Food Composition and Analysis* 8.4 (1995): 324-335.
122. Consultation, UNU Expert. "Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation; [Geneva, 9-16 April 2002]." (2007).
123. Vasconcelos, Ilka M., et al. "Cultivares brasileiras de soja *Glycine max* (L.) Merr. adaptadas ao cultivo em baixas latitudes: composição da semente e conteúdo de proteínas bioativas." *Brazilian Journal of Botany* 29 (2006): 617-625.
124. Singh, U. "Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs." *Plant Foods for Human Nutrition* 35 (1985): 339-351.