



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ταυτοποίηση μεταβολιτών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοντέλα εξομοίωσης
ζυμωμένων τροφίμων.

Δέσποινα Βουγιουκλάκη

A.M 193001

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

**SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

PhD THESIS

Identification of lactic acid bacteria metabolites in simulated fermented food
models.

DESPINA VOUGIOUKLAKI

A.M 193001

EGALEO JUNE 2024

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ταυτοποίηση μεταβολικών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοντέλα εξομοίωσης ζυμομένων τροφίμων.

Δέσποινα Ρ. Βουγιουκλάκη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: **Δήμητρα Χούχουλα**, Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Δήμητρα Χούχουλα, Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Θεοφάνια Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Διατροφής του Ανθρώπου, ΓΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

(Υπογραφή)

Δήμητρα Χούχουλα,
Καθηγήτρια, ΠΑΔΑ

(Υπογραφή)

Θεοφάνια Τσιρώνη,
Επίκουρη Καθηγήτρια, ΓΠΑ

(Υπογραφή)

Χαράλαμπος Σταμάτης,
Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

(Υπογραφή)

Ευσταθία Τσάκαλη,
Επίκουρη Καθηγήτρια, ΠΑΔΑ

(Υπογραφή)

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς,
Καθηγητής, ΕΚΠΑ

(Υπογραφή)

Αρχοντούλα Χατζηλαζάρου,
Καθηγήτρια, ΠΑΔΑ

(Υπογραφή)

Ανθιμία-Αικατερίνη Μπατρίνου,
Επίκουρη Καθηγήτρια, ΠΑΔΑ

Ημερομηνία εξέτασης 25/06/2024

DOCTORAL THESIS

Identification of lactic acid bacteria metabolites in simulated fermented food models.

Despina R. Vougiouklaki

SUPERVISOR: Dimitra Houhoula, Professor of Food Science and Technology, UniWA.

THREE-MEMBER MONITORING COMMITTEE:

Dimitra Houhoula, Professor, Department of Food Science and Technology, UniWA

Iosif Papaparaskevas, Professor, Department of Medicine, NKUA

Tsironi Theofania, Assistant Professor, Department of Science and Human Nutrition, AUA

SEVEN-MEMBER EXAMINATION COMMITTEE

(Signature)

Dimitra Houhoula,
Professor, UniWA

(Signature)

Theofania Tsironi,
Assistant Professor, AUA

(Signature)

Haralampos Stamatis,
Professor, UOI

(Signature)

Efstathia Tsakali,
Assistant Professor, UniWA

(Signature)

Iosif Papaparaskevas,
Professor, NKUA

(Signature)

Archontoula Chatzilazarou,
Professor, UniWA

(Signature)

Anthimia-Aikaterini Batrinou,
Assistant Professor UniWA

Examination Date 25/06/2024

Copyright © Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ και Δέσποινα Βουγιουκλάκη, Ιούνιος, 2024

Η παρούσα διδακτορική διατριβή καλύπτεται από τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons «Αναφορά Δημιουργού Μη Εμπορική Χρήση Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές» (CCBY-NC-ND 4.0). Συνεπώς, το έργο είναι ελεύθερο για διανομή (αναπαραγωγή, διανομή και παρουσίαση του έργου στο κοινό), υπό τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α. Αναφορά δημιουργού: Ο χρήστης θα πρέπει να κάνει αναφορά στο έργο με τον τρόπο που έχει οριστεί από το δημιουργό ή τον χορηγούντα την άδεια.
- β. Μη εμπορική χρήση: Ο χρήστης δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει το έργο αυτό για εμπορικούς σκοπούς.
- γ. Όχι Παράγωγα Έργα: Ο χρήστης δεν μπορεί να αλλοιώσει, να τροποποιήσει ή να δημιουργήσει νέο υλικό που να αξιοποιεί το συγκεκριμένο έργο (πάνω από το έργο αυτό).

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τους συγγραφείς.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον/τη συγγραφέα του και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις θέσεις του επιβλέποντος, της επιτροπής εξέτασης ή τις επίσημες θέσεις του Τμήματος και του Ιδρύματος.

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δέσποινα Βουγιουκλάκη του Ρένου, υποψήφια διδάκτορας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας και δικαιούχος των πνευματικών δικαιωμάτων επί της διατριβής και δεν προσβάλω τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων. Για τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής δεν χρησιμοποίησα ολόκληρο ή μέρος έργου άλλου δημιουργού ή τις ιδέες και αντιλήψεις άλλου δημιουργού χωρίς να γίνεται αναφορά στην πηγή προέλευσης (βιβλίο, άρθρο από εφημερίδα ή περιοδικό, ιστοσελίδα κ.λπ.). Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Δέσποινα Ρ. Βουγιουκλάκη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός των μεταβολιτών τους είναι περιορισμένος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήσαμε το δυναμικό τεσσάρων οξυγαλακτικών βακτηρίων, πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα στελέχη *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* και *Lactobacillus gasseri*.

Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράση των CFS μετά από επώαση 1^{ης}, 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας των LAB έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων (*Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922). Η αναστολή των ενεργών αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται από διαφορετικά είδη LAB μετά από επώαση 5 ημερών στους 37 °C έναντι παθογόνων βακτηρίων φάνηκε να είναι παρόμοια. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες LAB ανέστειλαν την ανάπτυξη των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών παθογόνων με επιτυχία, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη τους σε εμπορικά τρόφιμα μπορεί να παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από τα συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια.

Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση των μεταβολιτών τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση υπεριώδους/συστοιχίας διόδων (HPLC-UV/DAD). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η ένωση OH-PLA ταυτοποιήθηκε και στα τέσσερα στελέχη έχοντας και την υψηλότερη συγκέντρωση από τις υπόλοιπες φαινολικές ουσίες. Η υψηλότερη συγκέντρωση (253.0 ppm) βρέθηκε στο στέλεχος *L. gasseri* και η χαμηλότερη (103.4 ppm) στο *L. brevis*. Παρόμοια ποσότητα vanillic acid (2.6 – 3.4 ppm) εντοπίστηκε σε *L. brevis* και *L. plantarum* αντίστοιχα. Το ferulic acid απομονώθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε *L. rhamnosus* και *L. plantarum* από 4.9 έως 6.4. Παρατηρήθηκε ότι οι μεταβολίτες που παρήχθησαν από τα LAB παρέμειναν οι ίδιοι σε διάστημα 30 ημερών, ενώ οι συγκεντρώσεις κατά το πέρασ των ημερών αυξανόντουσαν. Έτσι, οι μεταβολίτες μπορούσαν να αναγνωριστούν από την πρώτη ημέρα της επώασης του μικροοργανισμού. Αυτή η μελέτη παρέχει εναλλακτικές προσεγγίσεις για τους μεταβολίτες που εμπλέκονται στην αντιμικροβιακή δράση της ζύμωσης μικροοργανισμών τροφίμων. Αυτές οι ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά συστατικά στη βιομηχανία τροφίμων αντί για συμβατικά χημικά συντηρητικά.

Μετέπειτα προσδιορίστηκε η ικανότητά των LAB να επιβιώσουν στο ανθρώπινο έντερο. Αξιολογήθηκε με βάση την ανοχή τους στα οξέα, την αντίστασή τους σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις, την αντίσταση στα αντιβιοτικά και την ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή βακτηριοσινών. Παρατηρήθηκε ότι και τα τέσσερα στελέχη έδειξαν υψηλή ανοχή στο προσομοιωμένο γαστρικό υγρό μετά από 3 ώρες και οι μετρήσεις των αποικιών έδειξαν μειώσεις στις κυτταρικές συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 log κύκλου. Το *L. plantarum* έδειξε το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης στις προσομοιώσεις του ανθρώπινου εντέρου, με μετρήσεις 7.09 log CFU/mL. Για τα είδη *L. rhamnosus* και *L. brevis*, οι τιμές ήταν 6.97 και 6.52, αντίστοιχα. Το *L. gasseri*, μετά από 12 ώρες, έδειξε πτώση κατά 3.96 log CFU/mL. Όσον αφορά τα γονίδια βακτηριοσίνης, τα γονίδια PlnA και Brevicin174A δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα στέλεχος. Αντίθετα, γονίδιο Pediocin PA ανιχνεύθηκε στα στελέχη *L. plantarum*, *L. rhamnosus* και *L. gasseri*. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η παρουσία του γονιδίου plnEF στο στέλεχος *L. plantarum* και *L. rhamnosus*.

Παράλληλα αξιολογήθηκε η ευαισθησία των LAB σε οκτώ αντιβιοτικά για καθεμία από τις ακόλουθες ουσίες: αμικιλίνη, γενταμυκίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η MIC των αντιμικροβιακών ουσιών που εκφράζεται σε µg/mL με την μέθοδο ETEST Gradient strip. Οι μικροβιολογικές οριακές τιμές καθορίζονται από τον EFSA. Κανένα από τα αξιολογηθέντα στελέχη δεν ανέστειλε την αντίσταση στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά.

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έγινε προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *in vitro* των LAB με τη μέθοδο Scavenging of a, a-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl (DDPH) Free Radical. Η αποτελεσματικότητα των CFSs των οξυγαλακτικών βακτηρίων μελετήθηκε και με τη μέθοδο κοπής DNA που προκαλείται από τη ρίζα υπεροξυλίου. Όλα τα στελέχη έδειξαν αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση επιτεύχθηκε από τα *L. brevis* (94.47%) και *L. gasseri* (91.29%) στα 210 λεπτά. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική δράση των μεταβολιτών των LAB.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε εκτενώς τα προαναφερθείσα στελέχη LAB από την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που παράγουν, την αντιμικροβιακή δράση, το προβιοτικό και αντιοξειδωτικό δυναμικό τους. Στο τέλος, αφού ελέγχθηκε ότι είναι ασφαλής η χρήση τους στα τρόφιμα λόγω της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά (δεν περιέχουν γονίδια

αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο), χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές καλλιέργειες εκκίνησης στην ελληνικού τύπου ζύμωση σε μαύρες ελιές τύπου καλαμών (*L. rhamnosus*, *L. brevis*, και *L. plantarum*). Έγινε προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας που βρέθηκε στην ελιά, στο τελικό στάδιο της ζύμωσης (150 ημέρες) με τη μέθοδο αλληλούχησης της επόμενης γενιάς (NGS). Σύμφωνα με τα ευρήματα, τα πιο άφθονα γένη ήταν οι *Lactobacillus* και *Leuconostoc*. Όσον αφορά δε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της ζύμωσης, δεν εντοπίστηκαν δυσάρεστες οσμές που υποδεικνύουν ανώμαλη ζύμωση (abnormal fermentation) (δηλαδή βουτυρική, σάπια ζύμωση) ή άλλα ελαττώματα από τους συμμετέχοντες σε οποιαδήποτε ομάδα ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση. Συγκεκριμένα, η ζύμωση με την προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας *L. rhamnosus* και εναρκτήριας καλλιέργειας *L. brevis* έδειξε την υψηλότερη βαθμολογία στην αξιολόγηση αλατότητας (salty) σε σύγκριση με τη φυσική ζύμωση της ενδογενής μικροχλωρίδας της ελιάς (control) ($p < 0.05$). Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση των γευστικών αισθήσεων έδειξε ότι οι ζυμώσεις με την προσθήκη *L. rhamnosus* και *L. brevis* σημείωσε υψηλότερη βαθμολογία σε πικρία (bitter) από τη ζύμωση με την προσθήκη *L. plantarum* και τη φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς ($p < 0.05$ αντίστοιχα). Όσον αφορά την αξιολόγηση της όξινης γεύσης (Acid), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις ζυμώσεις. Περαιτέρω, η ομάδα που υποβλήθηκε σε ζύμωση με την προσθήκη *L. Rhamnosus*, σημείωσε υψηλότερη βαθμολογία στην αξιολόγηση των ινώσεων (fibrousness) σύμφωνα με τους συμμετέχοντες σε σύγκριση με τη φυσική ζύμωση της ενδογενής μικροχλωρίδας της ελιάς (control) ($p < 0.05$). Προσθέτω επίσης στο σημείο αυτό ότι, η ζύμωση με την προσθήκη *L. plantarum* είχε υψηλότερες βαθμολογίες στην κιναισθητική αίσθηση σκληρότητας (hardness) και τραγανότητας (crunchiness) σε σύγκριση με τα άλλα είδη ζυμώσεων ($p < 0.05$).

Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά αυτά τα συγκεκριμένα στελέχη για τη ζύμωση της ελιάς. Αυτή η μελέτη παρέχει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη δράση αυτών των LAB και τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Οι κύριοι μεταβολίτες σε κάθε διαδικασία ζύμωσης αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια μέθοδο HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση των μεταβολιτών αυξήθηκε σταδιακά, αναπτύσσοντας ένα σταθερό πρότυπο μετά την 90^η ημέρα της ζύμωσης. Καθώς επίσης, το OH-PLA αναγνωρίστηκε ως το φαινολικό οξύ με την υψηλότερη συγκέντρωση, ανεξάρτητα από την επιλεγμένη καλλιέργεια εκκίνησης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αντιμικροβιακα; μεταβολίτες; ασφάλεια τροφίμων; LAB; αντιοξειδωτική δράση; γαστρεντερικός σωλήνας; προβιοτικά; βακτηριοσίνη; καλλιέργειες εκκίνησης; ζύμωση ελιάς; ελληνικού τύπου ζύμωση; NGS.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role as natural food preservatives. However, the characterization of the variety of their metabolites is limited. In this PhD thesis, we studied the potential of four lactic acid bacteria, more specifically *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus gasseri*.

The present study investigated the antimicrobial activity of CFSs after 1th, 3th and 5th days incubation of LAB against four pathogenic bacteria (*Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922). The inhibition of active antimicrobial substances produced by different LAB species after 5 days incubation at 37 °C against pathogenic bacteria appeared to be similar. The specific LAB cultures inhibited the growth of Gram-negative and Gram-positive pathogens successfully, indicating that their addition to commercial foods can provide effective protection against infections caused by the specific pathogenic bacteria.

Subsequently, their metabolites were identified by an optimized liquid chromatography with an ultraviolet/diode detection (HPLC-UV/DAD) method. The results of this study showed that the compound OH-PLA was identified in all four strains having the highest concentration of the rest of the phenolic substances. The highest concentration (253.0 ppm) was found in *L. gasseri* strain and the lowest (103.4 ppm) in *L. brevis*. A similar amount of vanillic acid (2.6 – 3.4 ppm) was detected in *L. brevis* and *L. plantarum* respectively. Ferulic acid was isolated at different concentrations in *L. rhamnosus* and *L. plantarum* from 4.9 to 6.4. It was observed that the metabolites produced by the tested LAB species remained the same over a period of 30 days while the concentrations increased. Thus, metabolites could be identified from the first day of incubation of the microorganism. This study provides alternative approaches for the molecules involved in the antimicrobial activity of food microorganism fermentation. These molecules may be used as antimicrobial ingredients in the food industry instead of conventional chemical preservatives.

Subsequently, the ability of LAB to survive in the human intestine was determined. They were evaluated based on their tolerance to acids, resistance to simulated gastrointestinal conditions, antibiotic resistance, and the identification of genes encoding bacteriocin production. All four tested strains demonstrated high resistance to simulated gastric juice

after 3 h, and the viable counts revealed declines in cell concentrations of less than 1 log cycle. *L. plantarum* showed the highest level of survival in the human gut, with counts of 7.09 log CFU/mL. For the species *L. rhamnosus* and *L. brevis*, the values were 6.97 and 6.52, respectively. *L. gasseri*, after 12 h, showed a 3.96 log cycle drop in viable counts. Regarding bacteriocin genes, PlnA and Brevicin 174A genes were not detected in any bacteria. On the contrary, Pediocin PA gene was identified in *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *L. gasseri*. The PlnEF gene was detected in *L. plantarum* and *L. rhamnosus*.

At the same time, the sensitivity of LAB to eight antibiotics was evaluated for each of the following substances: ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol. In addition, the MIC of the antimicrobial substances expressed in $\mu\text{g/mL}$ was determined by the ETEST Gradient strip method. Microbiological limit values are set by EFSA. None of the evaluated strains inhibited resistance to the aforementioned antibiotics.

In the context of this PhD thesis, the in vitro antioxidant activity of LAB was determined using the free radical DDPH^{*} and then evaluated with regard to their radical scavenging activity and inhibition against peroxy radical induced DNA scission. All strains showed antioxidant activity. However, the best antioxidant activity was obtained by *L. brevis* (94.47%) and *L. gasseri* (91.29%) at 210 min. In addition, the potential antioxidant activity of LAB metabolites was evaluated.

This PhD thesis extensively studied the aforementioned LAB strains from the identification of the metabolites they produce, their antimicrobial activity, probiotic and antioxidant potential. In the end, after it was checked that they are safe to use in food due to their sensitivity to antibiotics (they do not contain resistance genes that can be transferred to humans), they were used as initial starter cultures in the Greek-type fermentation of black olives (kalamon) (*L. rhamnosus*, *L. brevis*, and *L. plantarum*). The microbial community found in the olive, at the final stage of fermentation (150 days), was determined by the next generation sequencing (NGS) method. According to the findings, the most abundant genera were *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Regarding the organoleptic characteristics of fermentation, there were no off odors that indicate abnormal fermentation (i.e., butyric, putrid fermentation) or other defects detected by the panelists in any group of the fermented olives.

In particular, the fermentations with the addition of *L. rhamnosus* and *L. brevis* showed the higher score for saltiness compared to the natural fermentation of the endogenous microflora of the olive (control) ($p < 0.05$). In addition, the gustatory sensation evaluation showed that the *L. rhamnosus*- and *L. brevis*-fermented groups scored higher in bitterness than the *L. plantarum*-fermented group and the control group ($p < 0.05$, respectively). In the evaluation of the acidic taste, no significant differences were observed. However, the *L. rhamnosus*-fermented group scored higher in fibrousness evaluation according to the panelists compared to the control group ($p < 0.05$). Additionally, the *L. plantarum*-fermented group had higher scores in the kinesthetic sensation of hardness and crunchiness compared to the other fermented groups ($p < 0.05$).

To our knowledge, this is the first study exploring these particular starters with probiotic potential for the fermentation of olives. This study provides a comprehensive approach to the action of these LAB and their use in the food industry. The main metabolites in each fermentation process were identified using an HPLC method. The results showed that the concentration of metabolites increased gradually, developing a stable pattern after the 90th day of fermentation. Also, OH-PLA was identified as the phenolic acid with the highest concentration, regardless of the selected starter culture.

KEYWORDS: antibacterials; metabolites; food safety; LAB; antioxidant activity; gastrointestinal tract; probiotics; bacteriocin; starter cultures; olive fermentation; greek-style fermentation; NGS.

*Αφιερώνεται στο στήριγμα μου,
τη μητέρα μου.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το μακρινό ταξίδι της εκπόνησης και της συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής, συνειδητοποίησα ότι ήταν αποτέλεσμα προσωπικού αγώνα αλλά συνάμα και συνδρομής πολλών σημαντικών ανθρώπων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Θέλω αρχικά να ευχαριστήσω από καρδιάς την Καθηγήτρια Χημείας, κα Δήμητρα Χούγουλα, που επέβλεπε τη διατριβή όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, αρχικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή, καθώς αποτελούσε ένα όνειρο για εμένα από τα προπτυχιακά μου χρόνια. Την ευχαριστώ επίσης, για τη συμπαράσταση, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την απεριόριστη αγάπη που μου προσέφερε σε όλα τα στάδια της προσπάθειας αυτής. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω ιδιαίτερος για τις πολύτιμες συμβουλές της, καθώς και για τις καίριες παρατηρήσεις της για την επίβλεψη της διατριβής. Τα σχόλια και η εποικοδομητική κριτική της, βοήθησαν καθοριστικά στην ποιότητα της διατριβής και με καθοδηγούσαν μέχρι την τελική διόρθωση του κειμένου. Τέλος, την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στις ερευνητικές μου δραστηριότητες.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Ιωσήφ Παπαπαρασκευά και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Θεοφανία Τσιρώνη, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, οι οποίοι με τις πολύτιμες συμβουλές τους, τις σημαντικές επισημάνσεις τους, αλλά και την υποστήριξή τους καθ' όλη την πορεία της διδακτορικής μου διατριβής, με βοήθησαν να την ολοκληρώσω.

ΔΙΑΧΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΔΗΜΟΣΙΟΤΗΤΑ

Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της διδακτορικής διατριβής, μέρος των αποτελεσμάτων έχει δημοσιευτεί σε έγκυρα διεθνή επιστημονικά περιοδικά με σύστημα κριτών και έχει παρουσιαστεί σε πανελλήνια και διεθνή συνέδρια.

Δημοσιεύσεις:

1. **Despina Vougiouklaki**, Theofania Tsironi, Joseph Papaparaskevas, Panagiotis Halvatsiotis and Dimitra Houhoula (2022). Characterization of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactiplantibacillus plantarum* Metabolites and Evaluation of Their Antimicrobial Activity against Food Pathogens., *Applied sciences*, 12, 660.
2. **Despina Vougiouklaki**, Klaudio Loka, Aliko Tsakni and Dimitra Houhoula (2022). “Characterization of Metabolites production by *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 and Antioxidant Activity”., *Nutrition & Food Science*, 11 (3), 1–8.
3. **Despina Vougiouklaki**, Klaudio Loka, Archontoula Chatzilazarou, Theofania Tsironi, Joseph Papaparaskevas, Panagiotis Halvatsiotis and Dimitra Houhoula (2022). “Characterization of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus gasseri* metabolites and evaluation of their antimicrobial activity against food pathogens”., *Public Health Toxicol*, 2, A155.
4. **Despina Vougiouklaki**, Theofania Tsironi, Andreas G. Tsantes, Efstathia Tsakali, Jan F. M. Van Impe and Dimitra Houhoula (2023). Probiotic Properties and Antioxidant Activity In Vitro of Lactic Acid Bacteria., *Microorganisms*, 11, 1264.
5. **Despina Vougiouklaki**, Sophia Letsiou, Iliana Mavrokefalidou, Efstathia Tsakali, Simen Akkermans, Jan F. M. Van Impe and Dimitra Houhoula (2024). Fermentation of Kalamata Natural Black Olives Using Selected Lactic Acid Bacteria as Starters., *Fermentation*, 10, 53.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

1. **Despina Vougiouklaki**, Klaudio Loka, Archontoula Chatzilazarou, Theofania Tsironi, Joseph Papaparaskevas, Panagiotis Halvatsiotis and Dimitra Houhoula. “Characterization of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus gasseri* metabolites and evaluation of their antimicrobial activity against food pathogens”. 1^ο Διεθνές Συνέδριο Επιστημών Διατροφής και Διαιτολογίας (1st CONSD 2022) που διεξήχθη 27-29 Μαΐου 2022 στη Θεσσαλονίκη (Poster).

Πίνακας περιεχομένων

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	20
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	22
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	24
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	25
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ –ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	38
1.1 ΟΞΥΓΑΛΑΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)	38
1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ LACTOBACILLUS	40
1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ LAB	41
1.3.1 Υποχρεωτικός ομοζυμωτικά	41
1.3.2. Υποχρεωτικός ετεροζυμωτικά	41
1.3.3. Προαιρετικός ετεροζυμωτικά	42
1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	44
1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΪΩΝ	45
1.6 Άλλες Μεταβολικές Δραστηριότητες των LAB	46
1.6.1 Οργανικά οξέα	47
1.6.2 Διοξείδιο του άνθρακα (CO ₂)	48
1.6.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂) και οι ελεύθερες ρίζες	49
1.6.4 Ακεταλδεΰδη	49
1.6.5 Διακετύλιο	50
1.6.6 Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες	51
1.6.7 Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής	52
1.7 ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	54
1.8 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	55

1.9 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΪΝΕΣ.....	57
1.9.1 Εφαρμογή των βακτηριοσινών στη βιομηχανία τροφίμων.....	58
1.10 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ.....	62
1.11 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	64
1.12 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	66
1.13 ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΪΜΩΝ.....	68
1.14 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΈΟΥΣ ΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΈΣ ΚΑΛΛΪΈΡΓΕΙΕΣ ΕΚΚΪΝΗΣΗΣ.....	68
1.14.1 <i>Lactobacillus gasser</i>	72
1.14.2 <i>Levilactobacillus brevis</i>	73
1.14.3 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	74
1.14.4 <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	75
1.15 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	76
1.16 ΣΚΟΠΟΣ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΚΌΤΗΤΑ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	87
2.1 ΠΡΌΤΥΠΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΈΧΗ.....	87
2.2 ΣΤΕΛΈΧΗ ΠΑΘΟΓΌΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΌΝ.....	87
2.3 ΠΡΌΤΥΠΕΣ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΈΣ-ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΈΣ ΕΝΨΕΙΣ.....	87
2.3.1 Προετοιμασία προτύπων.....	87
2.4 Διαδικασίες εκχύλισης.....	89
2.4.1 Υγρή εκχύλιση (<i>Liquid liquid extraction - LLE</i>).....	89
2.4.2 Χρωματογραφικές συνθήκες (<i>HPLC-UV/DAD</i>).....	89
2.4.3 Ακρίβεια τυπικών καμπυλών βαθμονόμησης.....	90
2.5 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ‘ΦΥΣΙΚΗΣ’ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	91
2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΌΤΗΤΑΣ <i>IN VITRO</i> ΤΩΝ LAB.....	92
2.6.1 Ικανότητα σάρωσης ριζών ελεύθερων ριζών <i>a, a-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl (DDPH)</i>	92

2.6.2 Αναστολή της κοπής DNA που προκαλείται από τη ρίζα υπεροξυλίου.....	93
2.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ.....	94
2.7.1 Ανοχή σε οξέα.....	94
2.7.2 Αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις.....	94
2.7.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	94
2.8 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA.....	95
2.9 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΪΝΗΣ.....	96
2.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	97
2.11 ΖΥΜΩΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΜΑΥΡΩΝ ΕΛΙΩΝ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΩΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ.....	98
2.11.1 Συγκομιδή ελιών - Βακτηριακό στέλεχος και συνθήκες καλλιέργειας.....	98
2.11.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	98
2.12 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	100
2.12.1 Μέτρηση pH και αλατιού.....	100
2.13 ΌΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	100
2.13.1 Χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV/DAD).....	100
2.14 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 16S rRNA (NANOPORE MINION™).....	101
2.15 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	102
2.16 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ (SENSORY EVALUATION).....	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	104
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΤΩΝ CFS ΤΩΝ LAB.....	104
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	107
3.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	111
3.4.1 Αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις.....	119
3.4.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	121
3.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ IN VITRO ΤΩΝ LAB.....	122

3.7 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΪΝΗΣ	125
3.8 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ	128
3.8.1 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου στον καρπό και στην άλμη	128
3.8.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις	129
3.9 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ (SENSORY EVALUATION) ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΖΥΜΩΣΗ	129
3.10 ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ	133
3.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΙΣ ΕΛΙΕΣ ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ RRNA	137
3.12 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ	144
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	146
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	148

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΟΜΑΔΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ LAB	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΟΝΟΜΑΣΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ 14 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΜΑΖΑΣ ΤΗΣ ΚΑΘΕ ΈΝΩΣΗΣ.	88
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ.	97
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΑΠΟ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ <i>LEVILACTOBACILLUS BREVIS</i> ΚΑΙ <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i>	105
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΑΠΟ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> ATCC 33323 ΚΑΙ <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i>	105
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 Η ΜΕΓΙΣΤΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (ΑΜΑΧ) ΚΑΙ Ο ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΛΟΥΣΗΣ ΤΩΝ 14 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ HPLC-UV/DAD.	108
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ΣΕ PPM) ΤΩΝ 14 ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ <i>L. BREVIS</i> , <i>L. PLANTARUM</i> , <i>L. RHAMNOSUS</i> ΚΑΙ <i>L. GASSERI</i> ΜΕΤΑ ΑΠΟ 30 ΜΕΡΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ.	112
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (ΣΕ PPM) ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ <i>LEVILACTOBACILLUS BREVIS</i> , <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> , <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> ΚΑΙ <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> ΣΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 5, 10, 15, 20, 25 ΚΑΙ 30 ΗΜΕΡΩΝ.	113
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LAB ΣΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΜΕΝΟ ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΥΓΡΟ.	119
ΠΙΝΑΚΑΣ 10 ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LAB ΣΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΜΕΝΟ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΥΓΡΟ.	120
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ MIC ΤΩΝ ΕΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LAB (N= 4).	121
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΤΕΣΣΕΡΑ LAB.	125
ΠΙΝΑΚΑΣ 13 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ΣΕ PPM) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΜΑΥΡΩΝ ΕΛΙΩΝ, ΟΙ ΑΚΟΛΟΥΘΕΣ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ.	135
ΠΙΝΑΚΑΣ 14 Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ NANOPORE MINION ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ <i>LEVILACTOBACILLUS BREVIS</i> ATCC8287.	140
ΠΙΝΑΚΑΣ 15 Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ NANOPORE MINION ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> ATCC14917.	141
ΠΙΝΑΚΑΣ 16 Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ NANOPORE MINION ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΖΥΜΩΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG ATCC53103.	142
ΠΙΝΑΚΑΣ 17 Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ NANOPORE MINION ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (ΕΛΕΓΧΟΣ).	143

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1 Χρωματογράφημα στα 255 nm ενός μίγματος από τις 14 πρότυπες ενώσεις (50 ppm; 10 mL injection). 109
- Σχήμα 2 Χρωματογράφημα στα 280 nm ενός μίγματος από τις 11 πρότυπες ενώσεις (50 ppm, 10 mL ένεση). 110
- Σχήμα 3 Χρωματογραφικό προφίλ του *Levilactobacillus brevis* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min) (J) vanillic acid (21.3 min). 114
- Σχήμα 4 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactocaseibacillus rhamnosus* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16,3 min), (L) ferulic acid (28,7 min). 115
- Σχήμα 5 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactiplantibacillus plantarum* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min), (J) Vanillic acid (21.3 min), (O) 4-Hydrocinnamic acid (27.4 min), (L) ferulic acid (28.7 min), (M) Benzoic acid, (G) Salicylic Acid (36 min). 116
- Σχήμα 6 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactobacillus gasseri* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min), (H) 1, 2-Dihydroxybenzene (15.7 min); (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (16.3 min); (M) Benzoic acid (34.2 min). 116
- Σχήμα 7 Αντιοξειδωτική δράση των LABs (μετά από επώαση 5 ημερών). 122
- Σχήμα 8 Αντιοξειδωτική δράση πρότυπων ουσιών που εντοπίσαμε στα LABs 123
- Σχήμα 9 Οι βαθμολογίες στην αισθητηριακή αξιολόγηση των ζυμωμένων επιτραπέζιων ελιών Καλαμάτας. 130
- Σχήμα 10 Αισθητηριακά δεδομένα που εκφράζονται σε γράφημα ράβδων με βάση τις βαθμολογίες σε μια αδόμητη κλίμακα 1–10. Οι πειραματικές συνθήκες (a,b,c,d) είναι: έλεγχος, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*. 132
- Σχήμα 11 Χρωματογράμμα στα 280 nm από τα διάφορα είδη ζυμώσεων φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (control) (A), ζύμωση με προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *L. brevis* (B), ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* (C) και ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. rhamnosus* (D). 136
- Σχήμα 12 Τα περισσότερα κυρίαρχα είδη σε κάθε δείγμα με την αλληλουχία 16S rRNA. A: φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (έλεγχος). B: ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. plantarum* ATCC14917 C: ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. rhamnosus* GG ATCC53103 D: ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. brevis* ATCC8287 139

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει ομάδες της οικογένειας *Lactobacillaceae*. 39
- Εικόνα 2 Τα κύρια μονοπάτια ζύμωσης της γλυκόζης. (α) Ομογαλακτική ζύμωση, (β) Ετερογαλακτική ζύμωση 43
- Εικόνα 3 Επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών 54
- Εικόνα 4 Τρόπος ανάπτυξης της μικροβιακής αντοχής (ΕΕΣ, βάσει στοιχείων των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων των Ηνωμένων Πολιτειών (CDC)). 56
- Εικόνα 5 Μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών των gram θετικών βακτηρίων 61
- Εικόνα 6 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των CFSs (μετά από 5 μέρες επώασης) των *L.brevis*, *L. plantarum* και *L.rhamnosus* ενάντια στα παθογόνα βακτήρια *Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922. 106
- Εικόνα 7 Αναστολή της κοπής του πλασμιδίου που προκαλείται από τη ρίζα υπερτυλιγμένου χάρη τα CFSs of LAB. 124
- Εικόνα 8 Ανίχνευση του γονιδίου Pediocin PA (1220bp) στα τέσσερα LAB. Line 1: *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287; line 2: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917; line 3: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103; line 4: *Lactobacillus gasseri* ATCC 3332;3 line 5: negative; line 6: ladder 126
- Εικόνα 9 Ανίχνευση του γονιδίου plnEF (616 bp) στα τέσσερα LAB. Line 1: *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287; line 2: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917; line 3: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103; line 4: *Lactobacillus gasseri* ATCC 3332;3; line 5: negative; line 6: ladder 127

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Liquid Chromatography-MassSpectrometry	Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μαζών
High Pressure Liquid Chromatography- Diode Array Detector	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης-Ανιχνευτής Συστοιχίας Διόδων
Next generation sequencing	Αλληλουχία επόμενης γενιάς
Supercoiled	Υπερτυλιγμένου
Irritable bowel syndrome	Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου
Antibiotic-associated diarrhea	Διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά
Heterofermenters	Ετεροζυμωτικά
Homofermenters	Ομοζυμωτικά
Abnormal fermentation	Ανώμαλη ζύμωση
Salty	Αλατότητας
Bitter	Πικρία
Acid	Οξινής γεύσης
Fibrousness	Ινώσεων
Hardness	Σκληρότητας
Crunchiness	Τραγανότητας
GRAS	Γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλές

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

EFSA	Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Ασφάλεια των Τροφίμων
ECDC	Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων
EOX	Ευρωπαϊκό Οικονομικό Χώρο
EE	Ευρωπαϊκή Ένωση
FDA	Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
FAO	Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
LAB	Βακτήρια του γαλακτικού οξέος
NaOH	Καυστικό νάτριο
EtBr	βρωμιούχου αιθιδίου
H ₂ O ₂	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
CO ₂	Διοξειδίο του άνθρακα
CLA	Συζευγμένο λινολεϊκό οξύ
aw	Ενεργότητα νερού
pKa	Σταθερά διαστάσεως
DMSO	διμεθυλοσουλφοξειδίου
MIC	ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης
RSA	Ικανότητα σάρωσης ριζών
EPS	εξωπολυσακχαριτών
LDH	γαλακτική αφυδρογονάση
NGS	Next generation sequencing
QPS	Qualified Presumption of Safety
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
DDPH	a-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl
MRS	Mann Rogosa and Sharpe
QPS	Qualified Presumption of Safety
GRAS	Generally Recognized as safe
ROS	Reactive Oxygen Species
AAS	Antibiotic-associated diarrhea
IBS	Irritable bowel syndrome
CFU	Colony Forming Units
CFSs	cell-free supernatant
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC-/DAD	High Pressure Liquid Chromatography- Diode Array Detector

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Οξυγαλατικά βακτήρια (LAB)

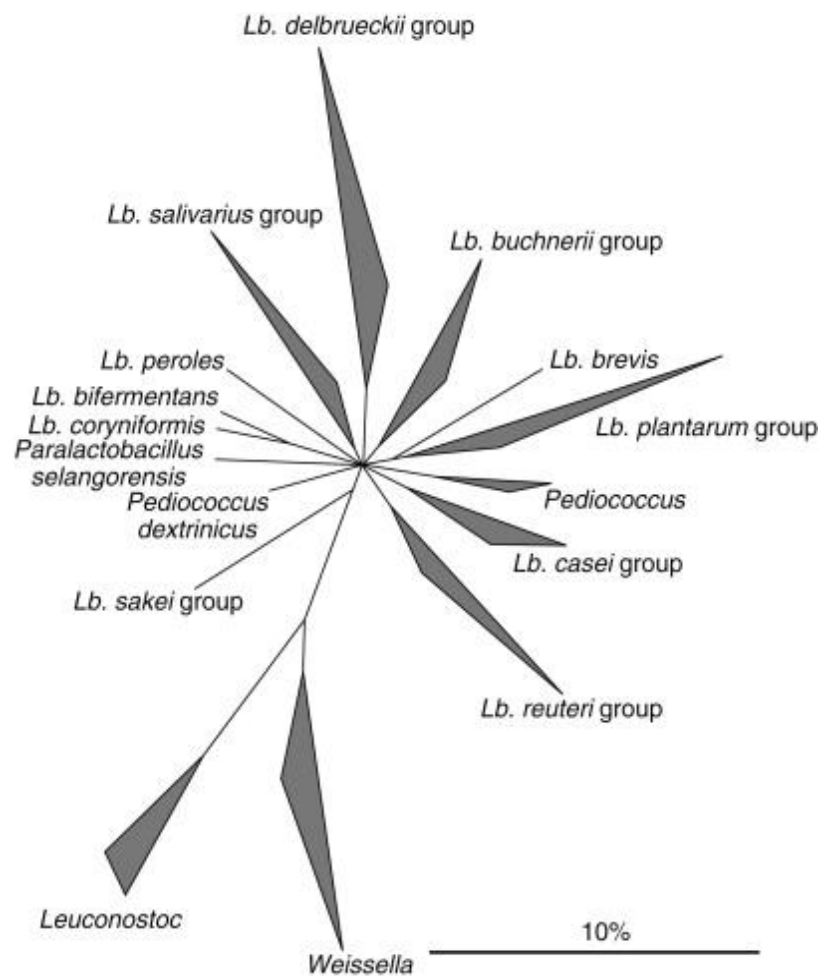
Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά ως προς την καταλάση, μικροαερόφιλα, δηλαδή αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλον με απουσία αέρα, δεν παράγουν σπόρια και το κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης τους είναι το γαλακτικό οξύ.

Σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση, τα περισσότερα LAB ανήκουν στη φυλή *Firmicutes*, κατηγορία *Bacilli* και τάξη *Lactobacillales* στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Οι διαφορετικές οικογένειες περιλαμβάνουν τα γένη *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella* (Duar et al., 2017). Το *Lactobacillus* είναι το μεγαλύτερο γένος αυτής της ομάδας, που περιλαμβάνει περίπου 80 αναγνωρισμένα είδη (Kockoná and Valík, 2011; Hutkins, 2006; Kirilov et al., 2009; Reddy et al., 2008; Morelli et al., 2011). Αν και το γένος *Bifidobacterium* είναι στην πραγματικότητα μέλος της φυλής *Actinobacteria* και είναι φυλογενετικά διαφορετικό από τα LAB, που ανήκει στην υψηλή περιεκτικότητα σε G+C (που κυμαίνεται από 42 έως 67%) θετικά κατά Gram βακτήρια (Bianvati, 2001), συχνά περιλαμβάνεται σε αυτή η ομάδα, λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος (Pokusaeva et al., 2011). Η φυλογενετική σχέση μεταξύ ορισμένων από τα κύρια γένη της σειράς *Lactobacillales* απεικονίζεται στο Σχήμα 1.

Η χρήση LAB στη ζύμωση τροφίμων είναι μια από τις γνωστές αρχαίες τεχνικές συντήρησης τροφίμων. Μπορεί να απομονωθούν από τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέατα, λαχανικά τύπου τουρσι, ψωμί, κρασί. Ακόμη βρίσκονται σε ζωοτροφές, στο έδαφος, τα φυτά, ζώα και ανθρώπους (Duar et al. 2017; Ruiz et al., 2019) και έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων ως εμπόδιο ελέγχου για αλλοιώσεις και παθογόνους μικροοργανισμούς, καλλιέργειες εκκίνησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα και ζυμωμένα τρόφιμα, προβιοτικά, παραγωγοί θρεπτικών ουσιών, αντιμυκητιασικοί και αντιμυκητοτοξινικοί παράγοντες και παραγωγοί βακτηριοσινών (Von

et al. 2019; Duar et al., 2017; Ruiz et al., 2019; Ahmed et al., 2019; Venegas et al., 2019). Πολλά LAB έχουν αναγνωριστεί γενικά ως ασφαλή σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ή έχουν χορηγήσει το αναγνωρισμένο τεκμήριο ασφάλειας από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) (Von Wright A et al., 2019).

Στελέχη LAB είναι επίσης γνωστά ως ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί που μπορούν να εξερευνήσουν διαφορετικές μεταβολικές δραστηριότητες. Οι μεταβολικές δραστηριότητες συνδέονται με την παραγωγή πολλών ευεργετικών ενώσεων όπως οργανικά οξέα και αντιμικροβιακές ενώσεις, μοναδικά ένζυμα που μπορούν να διασπάσουν σύνθετες οργανικές ενώσεις σε απλές λειτουργικές ενώσεις (Bringel, 1998; Letort and Juillard, 2001; Hébert et al., 2004; Vera et al., 2009; Hébert EM, Raya RR and Giori GS, 2004).



Εικόνα 1 Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει ομάδες της οικογένειας *Lactobacillaceae* (De Angelis, M and Gobbetti, M. 2011).

Τα τρία κύρια μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της γεύσης στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση είναι η γλυκόλυση (ζύμωση σακχάρων), η λιπόλυση (αποδόμηση του λίπους) και η πρωτεόλυση (αποικοδόμηση πρωτεϊνών). Διακρίνονται με βάση τα προϊόντα που παράγουν από την μεταβολική τους δραστηριότητα σε ομοζυγωτικά (homofermentative) (π.χ *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Lactobacillus casei*) και ετεροζυμοτικά (heterofermentative) (π.χ *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus reuteri*, and *Lactobacillus manihotivorans*, *Weisella*, *Leuconostoc*) (Duar et al., 2017; Ruiz et al., 2019).

Ο τύπος της ζύμωσης του κάθε βακτηρίου είναι ένα σημαντικό ταξινομικό κριτήριο. Το πρώτο επίπεδο διαφοροποίησης των LAB βασίζεται στη σύνθεση τελικού προϊόντος. Όλα τα LAB παράγουν γαλακτικό οξύ από εξόζες. Το παραγόμενο γαλακτικό οξύ μπορεί να είναι είτε L (+), ή D (-) ή να είναι μίγμα (DL) και των δύο ισομερών. Το D (-) γαλακτικό οξύ δεν μπορεί να μεταβολιστεί από τον άνθρωπο και δεν συνιστάται για κατανάλωση από βρέφη και μικρά παιδιά (WHO, 1974).

1.2 Χαρακτηριστικά του Γένους *Lactobacillus*

Οι γαλακτοβάκιλλοι περιγράφονται ως θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά ως προς την καταλάση, μη σπορογόνοι ράβδοι, των οποίων το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 1.5 μm και 5 μm. Μπορεί επίσης να έχουν μια λεπτή, κυρτή ή λυγισμένη εμφάνιση και συχνά σχηματίζουν αλυσίδες. Η μορφολογία των αποικιών είναι επίσης μεταβλητή σε πλάκες άγαρ, με ορισμένα στελέχη να παράγουν μεγάλες στρογγυλές αποικίες και άλλα να παράγουν μικρές ή ακανόνιστες (Hutkins, 2006; Görner F and Valík, 2004). Οι περισσότεροι από τους γαλακτοβάκιλλους είναι μεσόφιλοι, αλλά το γένος περιέχει επίσης είδη ψυχροτροφά, μεσόφιλα και θερμόφιλα. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους κυμαίνεται από 30 έως 45 °C. Ορισμένα είδη παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στο αλάτι, την οσμωτική πίεση και τη χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w). Η αντοχή στα οξέα είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των γαλακτοβακίλλων και τα περισσότερα από τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε $pH < 4,4$. Η βέλτιστη τιμή pH για την ανάπτυξή τους είναι 5,5 έως 6,5. Ορισμένα στελέχη είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη και στα χολικά άλατα. Τα περισσότερα από τα είδη είναι ανθεκτικά στα αερόβια συνθήκες, αλλά μερικά από αυτά απαιτούν αυστηρά αναερόβια συνθήκες (Hutkins, 2006; Reddy et al., 2008).

1.3 Μεταβολισμός των LAB

Η ζύμωση είναι ο μεταβολισμός του σακχάρου στον οποίο η ενέργεια προέρχεται από μερική οξείδωση μιας οργανικής ένωσης χρησιμοποιώντας οργανικά ενδιάμεσα ως δότες ηλεκτρονίων και δέκτες ηλεκτρονίων (Axelsson, 2004; Von AW and Axelsson, 2011). Δεν εμπλέκονται εξωτερικοί δέκτες ηλεκτρονίων, δεν απαιτείται σύστημα μεταφοράς μεμβράνης ή ηλεκτρονίων και όλα τα ATP παράγονται από τη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Σύμφωνα με τον τρόπο διάσπασης του σκελετού άνθρακα που οδηγεί σε διαφορετικά σύνολα τελικών προϊόντων, οι τρεις κύριες οδούς ζύμωσης εξόζων περιγράφονται. Τα LAB διαιρούνται σε ομάδες από πλευράς μεταβολισμού:

1.3.1 Υποχρεωτικός ομοζυμωτικά (homofermenters) γαλακτικά βακτήρια, τα οποία μετατρέπουν ένα μόριο εξόζης κατά την γαλακτική ζύμωση σχεδόν στοιχειομετρικά σε 2 μόρια γαλακτικού οξέος (85%) και δυο μόρια ATP. Τα ομοζυμωτικά βακτήρια συνθέτουν το ένζυμο φρουκτοζο-διφωσφορο-αλδολάση ή αλλιώς FDA αλδολάση (όπως οι ζύμες και οι ιστοί του ανθρώπου) με την παρέμβαση του οποίου διασπών τη διφωσφορυλιωμένη φρουκτόζη προς δύο τριόζες κατά την ακόλουθη γενική αντίδραση:

Αλδολάση

1,6-διφωσφορική Φρουκτόζη \longrightarrow 3-φωσφογλυκεριναλδεΐδη + 1-φωσφοροδιοξυακετόνη.

Στη συνέχεια η 3-φωσφορική-γλυκεριναλδεΐδη με τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (NADH₂) ζυμώνεται αρχικά προς πυροσταφυλικό οξύ και στο τέλος ανάγεται σε CH₃-CHOH-COOH (γαλακτικό οξύ) το οποίο είναι και το μοναδικό τελικό προϊόν αυτής της διάσπασης κατά Embdaen-Mayerhof. Δεν έχουν την δυνατότητα ζύμωσης πεντόζων λόγω έλλειψης του ενζύμου φωσφοκετολάση (Ayivi et al., 2020; Von Wright A et al., 2019).

1.3.2. Υποχρεωτικός ετεροζυμωτικά (heterofermenters) γαλακτικά βακτήρια τα οποία μετατρέπουν ένα μόριο εξόζης προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέους, αιθανόλης και CO₂ ή γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος με παραγωγή ενός μορίου ATP (Axelsson, 2004). Οξειδώνουν την 6-φωσφογλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ και στην συνέχεια με αποκαρβυλίωση και διάσπαση της παραγόμενης πεντόζης, παράγουν ισομοριακές ποσότητες των προαναφερθέντων τελικών προϊόντων. Η δυνατότητα ζύμωσης της πεντόζης

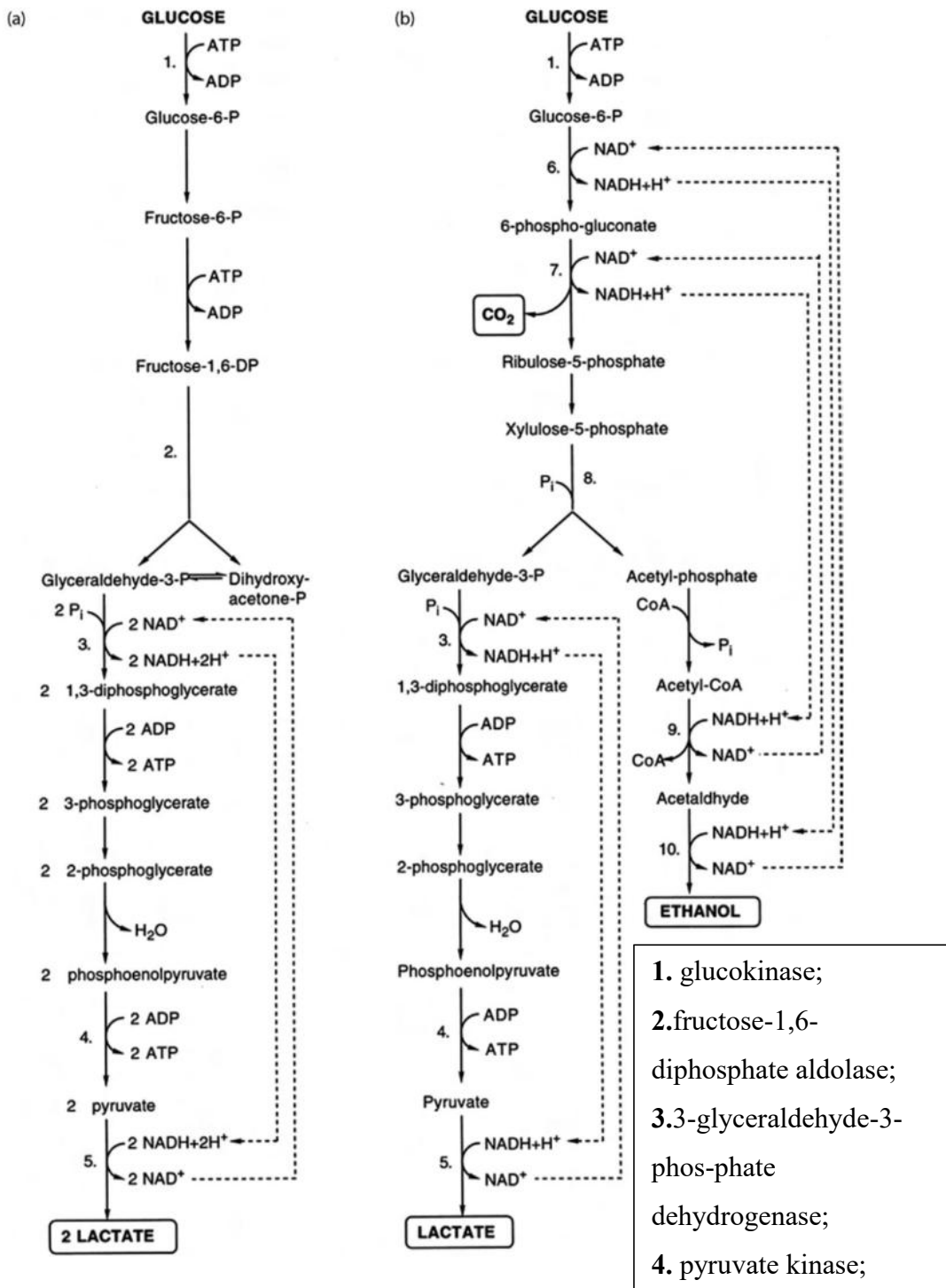
γίνεται εφικτή λόγω της παραγωγής του ενζύμου φωσφοκετολάση. Η αναλογία παραγωγής αιθανόλης-οξικού οξέος εξαρτάται από το δυναμικό οξειδοαναγωγής του συστήματος, ενώ με την παρουσία O₂ ή φρουκτόζης δε σχηματίζεται αιθανόλη αλλά H₂O₂ ή μαννιτόλη (C₆H₁₄O₆) αντίστοιχα (Barboza & Usaga, 2020; Pasolli et al., 2020).

1.3.3. Προαιρετικός ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια τα οποία ζυμώνουν τις εξόζες όπως τα ομοζυμωτικά αλλά και τις πεντόζες λόγω της ύπαρξης μιας επαγωγίμης φωσφοκετολάσης που ενεργοποιείται με την παρουσία πεντόζης. Όταν υπάρχει περιορισμός της διαθεσιμότητας της γλυκόζης τα προαιρετικός ετεροζυμωτικά βακτήρια κινούνται προς τις ετεροζυμωτικές οδούς μεταβολισμού (Von Wright A et al., 2019; Salvetti et al., 2018).

Πίνακας 1 Ομάδες κατηγοριοποίησης των LAB

Ομοζυμωτικοί	Υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
<i>Lactococcus. lactis subsp. lactis</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. cellobiosus</i>
<i>Lb. leichmannii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Weissela confusa</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>
<i>Pedicoccus damnosus</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Pediococcus pentocacus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Lb. bavaricus</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Leuconostoc dextranicum</i>
	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	

Πηγή: Stiles & Holzapfel 1997



γλυκόλυση, οδός Embden-Mayerhof-Parnas

(οδός 6-φωσφογλυκονικού/φωσφοκετολάσης)

Εικόνα 2 Τα κύρια μονοπάτια ζύμωσης της γλυκόζης. (α) Ομογαλακτική ζύμωση, (β) Ετερογαλακτική ζύμωση

(Πηγή: Axelsson, 2004; Kandler, 1983).

1.4 Μεταβολισμός πρωτεϊνών

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν κερδίσει μεγάλη προσοχή λόγω των πρωτεολυτικών τους δράσεων, οι οποίες είναι ιδιαίτερης σημασίας για την επιταχυνόμενη ωρίμανση και την τροποποίηση ενζύμων διαφορετικών προϊόντων διατροφής όπως είναι το τυρί. Η πρωτεόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία οι πρωτεΐνες διασπώνται από πρωτεολυτικά ένζυμα όπως είναι οι πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες σε αμινοξέα και πεπτίδια (Bintsis et al., 2003; Savijoki, Ingmer and Varmanen, 2006). Οι πρωτεϊνάσες και οι πεπτιδάσες μπορούν να βρεθούν ως εξωκυτταρικές και εκκρίνονται ως ελεύθερα ένζυμα έξω από το κύτταρο ή ενδοκυτταρικά μέσα στο κύτταρο.

Τα πρωτεολυτικά συστήματα των LAB είναι σημαντικά ως μέσα για τη διάθεση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων για την ανάπτυξη βακτηρίων, αλλά αυτά τα συστήματα μπορούν επίσης να σχηματίσουν τις ρεολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση (Bintsis et al., 2003; Liu et al., 2010). Η πρωτεόλυση έχει τεκμηριωθεί καλά σε σχέση με την ανάπτυξη γαλακτοβακίλλων και γαλακτόκοκκων στο γάλα, όπου ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την ανάπτυξη της γεύσης κατά τη διάρκεια της παραγωγής τυριού (Bintsis et al., 2003; Liu et al., 2010). Η πρωτεϊνάση βοηθά επίσης στη μείωση των αλλεργικών ιδιοτήτων του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στα βρέφη (Yuan and Furuta, 2003). Από τα στελέχη LAB που παράγουν τυριά, οι *Lactobacillus helveticus* και *Lactococcus lactis* έχουν μελετηθεί με τη μεγαλύτερη λεπτομέρεια (Savijoki, Ingmer and Varmanen, 2006). Πολλές πεπτιδάσες (π.χ. Aminopeptidase C, Aminopeptidase N, Aminopeptidase A, X-prolyldipeptidyl-aminopeptidase, Prolidase) έχουν ταυτοποιηθεί και ταξινομηθεί (Savijoki, Ingmer and Varmanen, 2006).

Τα πρωτεολυτικά συστήματα βακτηρίων γαλακτικού οξέος αποτελούνται από τρία συστατικά: 1) πρωτεϊνάση δεσμευμένη στο κυτταρικό τοίχωμα που ξεκινά την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής πρωτεΐνης σε ολιγοπεπτίδια, 2) μεταφορείς πεπτιδίων που προσλαμβάνουν τα πεπτίδια στο κύτταρο και 3) ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που αποικοδομούν τα πεπτίδια σε μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα (Liu et al., 2010). Τα αμινοξέα μπορούν περαιτέρω να μετατραπούν σε διάφορες γευστικές ενώσεις, όπως αλδεΐδες, αλκοόλες και εστέρες (Liu et al., 2008). Το πλεονέκτημα της άμεσης μεταφοράς πεπτιδίων στο κύτταρο πριν από την υδρόλυση έγκειται στη μείωση της ποσότητας της

μεταβολικής ενέργειας που χρησιμοποιείται για την πρόσληψη αμινοξέων. Ο καταβολισμός αμινοξέων από τα LAB πιστεύεται επίσης ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα λήψης ενέργειας σε περιβάλλοντα περιορισμένα σε θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, η πρωτεΐνάση, το σύστημα μεταφοράς ολιγοπεπτιδίου και οι πεπτιδάσες αποδείχθηκε ότι κατανέμονται άνισα μεταξύ των στελεχών βακτηρίων γαλακτικού οξέος, τα οποία πιθανώς ήταν αποτέλεσμα της παρουσίας ή της απουσίας πλασμιδίων που τα κωδικοποιούν (Liu et al., 2010)

1.5 Μεταβολισμός λιπιδίων

Ο μεταβολισμός των λιπιδίων είναι η διάσπαση των λιπιδίων από τις λιπάσες σε λιπαρά οξέα και γλυκερίνη. Τα LAB διαθέτουν ενδοκυτταρικές είτε εξωκυτταρικές λιπάσες (Meyers, Currett and Hutkins, 1996; Katz et al., 2002). Επιπλέον, στελέχη LAB εκτελούν μοναδικές αντιδράσεις μετασχηματισμού λιπαρών οξέων που περιλαμβάνουν ισομερισμό, ενυδάτωση, αφυδάτωση και κορεσμό (Ogawa et al., 2005). Αυτές οι λειτουργίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και στα προβιοτικά. Για παράδειγμα, οι λιπολύσεις του λίπους του γάλακτος από τα LAB αποτελούν τις κύριες βιοχημικές αλλαγές στην ανάπτυξη της γεύσης του τυριού (Meyers, Currett and Hutkins, 1996; Katz et al., 2002). Ωστόσο, δεν μπορούν όλα τα στελέχη να μεταβολίζουν τα λιπίδια. Οι Meyers et al., 1996 εξέτασαν πάνω από 100 διαφορετικά στελέχη LAB για την παραγωγή λιπάσης και εντόπισαν ότι μόνο 29 στελέχη έχουν την ικανότητα να παράγουν.

Η δραστηριότητα του ένζυμου λιπάσης των LAB έχει αποδειχθεί ότι παρέχει διάφορα οφέλη για την υγεία στον ξενιστή. Οι λιπάσες είναι χρήσιμες στην παρασκευή διαιτητικών σκευασμάτων για βρέφη, στην γηριατρικοί και σε άτομα τα οποία αναρρώνουν (Ogawa et al., 2005; Taranto et al., 1998). Στοιχεία από ποντίκια, προκλινικές και κλινικές δοκιμές έχουν αποκαλύψει ότι οι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν επίσης να διασπάσουν τη χοληστερόλη σε λιπίδια ορού (Taranto et al., 1998).

Η υπολιπαιμική δράση του *Lactobacillus* μπορεί να οφείλεται στην χαμηλότερη εντερική απορρόφηση λιπιδίων ή σε υψηλότερο καταβολισμό λιπιδίων (Taranto et al., 1998). Προτείνεται ότι η υποχοληστερολαιμική επίδραση του *Lactobacillus reuteri* θα μπορούσε να

σχετίζεται με τη δραστηριότητα υδρολάσης των χολικών αλάτων από τα κύτταρα. Επιπλέον, τα LAB μπορούν να παράγουν συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA) από το λινολεϊκό οξύ (Ogawa et al., 2005). Τα συζευγμένα λιπαρά οξέα όπως το CLA έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή ως νέος τύπος βιολογικά ευεργετικού λειτουργικού λιπιδίου. Το καστορέλαιο, το οποίο είναι πλούσιο στη μορφή τριακυλογλυκερόλης του ρικινελαϊκού οξέος, βρέθηκε επίσης ότι δρα ως υπόστρωμα για παραγωγή CLA από LAB με τη βοήθεια υδρόλυσης τριακυλογλυκερόλης που καταλύεται από λιπάση. Έτσι, ορισμένα ισομερή του CLA μειώνουν την καρκινογένεση, την αθηροσκλήρωση και το σωματικό λίπος.

1.6 Άλλες Μεταβολικές Δραστηριότητες των LAB

Τα στελέχη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος εκφράζουν πολλές άλλες μεταβολικές δραστηριότητες που συμβάλλουν σημαντικά στις αισθητηριακές αλλαγές στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως η γεύση, η στυπτικότητα και το χρώμα, διασπώντας διαφορετικές οργανικές ενώσεις στη μήτρα των τροφίμων (Rodrigues et al., 2011). Αυτά τα ένζυμα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στα προβιοτικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων συμβάλλοντας σε μια ποικιλία οφελών για την υγεία του ανθρώπου (Chen et al., 2012). Τα LAB μεταβολίζουν διαφορές απλές και σύνθετες λειτουργικές ενώσεις όπως τερπενοειδή, καρτενοειδή, στερόλες και πολυφαινόλες (Song, Ibrahim and Hayek, 2012). Γενικά, αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές για τα οφέλη τους στην υγεία, αλλά δεν είναι διαθέσιμες για απορρόφηση από το έντερο. Η μεταβολική διαδικασία των LAB θα αποικοδομήσει αυτές τις ενώσεις σε μικρότερους μεταβολίτες όπου θα μπορούν να απορροφηθούν και να ωφελήσουν τον οργανισμό ξενιστή (Chen et al., 2012).

Ο όρος μεταβολίτης χρησιμοποιείται για μικρά μόρια που αποτελούν ένα ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν του μεταβολισμού. Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν διάφορες λειτουργίες μεταξύ των οποίων είναι και η αντιμικροβιακή τους δράση. Ουσίες, οι οποίες αποτελούν μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, είναι οι εξής (Lindgren 1990; Ashenafi, M 1991; Axelsson 2004; Von and Axelsson 2019; Barboza and Usaga 2020):

- 1) Οργανικά οξέα
- 2) Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)

- 3) Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και οι ελεύθερες ρίζες
- 4) Ακεταλδεΐδη
- 5) Διακετύλιο
- 6) Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες
- 7) Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής

Οι μεταβολίτες αυτοί παρέχουν σταθερότητα και ασφάλεια στα ζυμωμένα τρόφιμα, και οξυγαλακτική ζύμωση ως μια διεργασία συντήρησης βασίζεται μερικά σ' αυτούς τους μεταβολίτες, οι οποίοι συναθροίζονται σε παρεμποδιστικά επίπεδα έναντι παθογόνων βακτηρίων στα διάφορα τρόφιμα και ποτά (Ashenafi et al., 1991). Η αντιμικροβιακή δράση όλων των παραπάνω παραγόντων είναι συνήθως συνεργετική (Von and Axelsson 2019; Barboza and Usaga 2020). Οι μεταβολίτες αυτοί συγκεντρώνονται σε παρεμποδιστικά επίπεδα για την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων στα διάφορα τρόφιμα. Η αντιμικροβιακή δράση όλων των παραπάνω ουσιών είναι συνήθως συνεργατική (Lindgren 1990; Ashenafi, M 1991; Axelsson 2004).

Ορισμένοι από τους παραπάνω μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν ήδη γίνει δεκτοί στα τρόφιμα ως συντηρητικά τροφίμων πχ το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το διακετύλιο (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Επιπλέον, η βακτηριοσίνη “νισίνη” που παράγεται από το στέλεχος *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες ως ένα αντιμικροβιακό βιολογικό συντηρητικό σε πολλά γαλακτοκομικά τρόφιμα (Ramya, S et al., 2010; Reis, J et al., 2012). Παρακάτω αναλύονται ορισμένες πληροφορίες για τους πιο πάνω μεταβολίτες.

1.6.1 Οργανικά οξέα

Το γαλακτικό, το προπιονικό και το οξικό οξύ αποτελούν τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους και αποτελεσματικότερους παράγοντες στα όξινα τρόφιμα (Axelsson, L. 2004). Τα οργανικά οξέα εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με τη μείωση του pH και με την παρουσία της αδιάστατης μορφής τους. Η αδιάστατη μορφή του ασθενούς γαλακτικού οξέος, επειδή είναι λιπόφιλη, διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αποδίδοντας ιόντα H⁺, τα οποία οξινίζουν το κυτόπλασμα (Lado and Yousef., 2007). Επιπρόσθετα με την

επίδραση του pH, η αδιάστατη μορφή του μορίου λειτουργεί ως διαμεσολαβητής στην αντιμικροβιακή δράση προκαλώντας πτώση του ηλεκτροχημικού δυναμικού πρωτονίων, προκαλώντας έτσι βακτηριόσταση και τελικά το θάνατο των ευαίσθητων βακτηρίων (Ni et al, 2015). Το αποτέλεσμα είναι σημαντικότερο σε τιμές pH κάτω από την τιμή του pKa του οξέος π.χ. όταν το οξύ είναι στην αδιάστατη του μορφή (Lado and Yousef., 2007). Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι 0,75% συγκέντρωση γαλακτικού οξέος μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus*, ενώ αντίθετα συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος μεγαλύτερες του 2% ενίσχυσαν την ανάπτυξη του μύκητα (Magnusson et al., 2003). Με τη μείωση του pH δημιουργούνται μη ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των παθογόνων και τοξινογόνων βακτηρίων (πχ *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*). Ο βαθμός ανάπτυξης του εκάστοτε βακτηρίου εξαρτάται από τον βαθμό ευαισθησίας του στο χαμηλό pH. Γενικότερα τα βακτήρια προτιμούν ένα pH γύρω στην ουδέτερη περιοχή, δηλαδή 6.5 - 7.5, ενώ παρουσιάζουν ανοχή σε ένα εύρος pH 4 - 9. Οι ζύμες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον σε σύγκριση με τα βακτήρια, ενώ οι μύκητες αναπτύσσονται σε ευρύτερα αποδεκτό εύρος pH (Barboza and Usaga 2020; Ni et al., 2015; Sharma et al., 2020; Zheng et al., 2020).

Η παρεμπόδιση των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως το είδος του οργανικού οξέος, η συγκέντρωση του και ο χρόνος επαφής του με τον παθογόνο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί επιδεικνύουν μια διαφορετική ανοχή στα διάφορα οργανικά οξέα. Η αδιάστατη μορφή των οργανικών οξέων μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, λόγω της ικανότητας που τους δίνει η μορφή αυτή να διέλθουν εύκολα δια μέσου της λιπόφιλης κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται το pH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η παρεμποδιστική ικανότητα ενός οργανικού οξέος εξαρτάται από τη σταθερά διαστάσεως (pKa). Όσο πιο χαμηλή είναι αυτή, τόσο πιο χαμηλό το ποσοστό του οξέος που παραμένει αδιάστατο για δεδομένη τιμή pH, άρα τόσο χαμηλότερη και η δραστηριότητα του (Lado and Yousef, 2007).

1.6.2 Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)

Το CO₂ παράγεται κυρίως από ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια κατά τη ζύμωση των εξόζων. Η συσσώρευση του συμβάλλει στη συντήρηση του τροφίμου με δύο διαφορετικούς

τρόπους (Genigeorgis,1985). Ο πρώτος τρόπος αφορά την δημιουργία ενός αναερόβιου περιβάλλοντος αντικαθιστώνοντας το O₂ στο προϊόν, βοηθώντας έτσι και στη μείωση ενζυμικών αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης, ενώ η συσσώρευση του CO₂ στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, δημιουργεί πρόβλημα στη διαπερατότητά της (Axelsson, L. 2004). Ο δεύτερος τρόπος είναι ότι αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών ή να αναστέλλοντας την ανάπτυξη πολλών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα τροφίμων ιδιαίτερα τους Gram αρνητικά ψυχρότροφα (Lado and Yousef, 2007).

1.6.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και οι ελεύθερες ρίζες

Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια κατέχουν οξειδάσες φλαβοπρωτεϊνών (και NADH υπεροξειδάσες) που τους επιτρέπουν να παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου υπό την παρουσία οξυγόνου (Pridmore et al., 2008). Το H₂O₂ και οι ελεύθερες ρίζες δρουν συνεργιστικά, προσβάλλουν ειδικές περιοχές του DNA (μεθυλική ομάδα της θυμίνης, μόρια γουανίνης) και προκαλούν αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές βλάβες (Korshunov and Imlay, 2010). Η αντιμικροβιακή δράση του H₂O₂ οφείλεται στην ισχυρή οξειδωτική δράση του πάνω στο βακτηριακό κύτταρο και στην καταστροφή βασικών μοριακών δομών των κυτταρικών πρωτεϊνών (Martin and Suarez, 2010; Pridmore et al., 2008; Thomas and Pera, 1983).

Η παραγωγή H₂O₂ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου στο μέσο ανάπτυξης και το είδος των στελεχών. Οι Price and Lee (1970) έδειξαν ότι το H₂O₂ μπορούσε να εμποδίσει την ανάπτυξη των στελεχών των γενών *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* και *Proteus sp.* από τον *Lactobacillus plantarum*. Σύμφωνα με μελέτες, ο *L. delrueckii subsp. bulgaricus* μπορεί να εμποδίσει την *Pseudomonas fluorescens*, μέσω της παραγωγής υπεροξειδάσης, σε θερμοκρασία ψύξης (Villegas and Gilliland, 2006).

1.6.4 Ακεταλδεΰδη

Η ακεταλδεΰδη δρα ανασταλτικά στους Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς. Παράγεται κατά τη παρασκευή γιαουρτιού μέσω της μετατροπής της θρεονίνης σε ακεταλδεΰδη και

γλυκίνη, με τη δράση του ενζύμου αλδολάση από το μείγμα δυο LAB, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* (Chaves et al., 2002; Liu et al., 2019). Οι κύριοι ρόλοι της προσθήκης των συγκεκριμένων καλλιεργειών στην παραγωγή γιαουρτιού είναι (i) η οξίνιση μέσω της μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ, (ii) η δημιουργία της παχύρρευστης υφής με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και (iii) η ανάπτυξη της τυπικής γεύσης του γιαουρτιού (Cintas et al., 2001; Lonvaud, 1999; Jussier, Morneau and Orduña, 2006). Το άρωμα του γιαουρτιού οφείλεται στην ακεταλδεΐδη και η συγκέντρωσή της στο τελικό προϊόν περίπου στα κυμαίνεται περίπου 225 ppm (Markakiou et al., 2020; Wasilewska et al., 2018).

Τα LAB παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή κρασιών σταφυλιού όπου η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός τους μπορεί να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά την ποιότητα του κρασιού (Lonvaud, 1999). Μπορούν επίσης να μεταβολίσουν το διακετύλιο και ακεταλδεΐδη κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση στο κρασί και να αφαιρέσουν την ωχρατοξίνη Α από τα κρασιά (Jussier, Morneau and Orduña, 2006). Τα LAB μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τη διασφάλιση της σωστής ρεολογίας, υφής και αίσθησης στο στόμα των τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση (Welman and Maddox, 2003). Οι εξωπολυσακχαρίτες θα μπορούσαν να είναι ένα εναλλακτικό συστατικό χαμηλών θερμίδων και χαμηλού κόστους που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λείου και κρεμώδους γιαουρτιού αντί για λίπος, πρωτεΐνη, σάκχαρα ή σταθεροποιητές (Petry et al., 2000). Ωστόσο, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τα LAB μπορεί να επηρεαστεί από το οξυγόνο, το pH, τη θερμοκρασία και τα συστατικά του μέσου, όπως το οροτικό οξύ και η πηγή άνθρακα (Jussier, Morneau and Orduña, 2006).

1.6.5 Διακετύλιο

Το διακετύλιο αποτελεί το πιο γνωστό τελικό μεταβολικό προϊόν που συντίθεται από το πυροσταφυλικό οξύ τόσο αναερόβια όσο και αερόβια. Διάφορα στελέχη των LAB, από τη ζύμωση των κιτρικών, όπως *Pediococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. και *Lactococcus* sp., παράγουν το διακετύλιο (Hoefnagel et al., 2002). Αυτά τα στελέχη μπορούν να μετατρέψουν το κιτρικό σε αρωματικές ενώσεις (C4) και διοξείδιο του άνθρακα, ουσίες που βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση (García-Quintáns et al., 2008). Επιπλέον, το διακετύλιο είναι απαραίτητο συστατικό

πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς καθορίζει ένα κρεμώδες και βουτυρώδες άρωμα όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις και είναι υπεύθυνο για τα τυπικά χαρακτηριστικά συγκεκριμένων τυριών, όπως το Camembert, το Cheddar και το Emmental (García-Quintáns et al., 2008; Curioni and Bosset, 2002). Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά, το *L. lactis subsp. lactis* bv. *To diacetylactis* αναμειγνύεται συχνά με άλλα LAB κατά την παραγωγή τυριού, σε μια συνήθη αναλογία 20% του συνόλου του πληθυσμού της καλλιέργειας εκκίνησης (Leroy and De Vuyst L et al., 2004; Urbach, 1997; Smit et al., 2005). Εκτός από αυτά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, το διακετύλιο θεωρείται επίσης ότι είναι μια αντιμικροβιακή ένωση που ενισχύει την ασφάλεια του προϊόντος (Cotter et al., 2013; Deegan et al., 2006)

Σύμφωνα με μελέτες, το διακετύλιο λειτουργεί έντονη παρεμποδιστική δράση έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως *Yersinia enterocolytica*, *Salmonella anatum*, *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium tuberculosis*. Σε σύγκριση με τα Gram θετικά, καθώς τα πρώτα αναχαιτίζονται με συγκέντρωση διακετυλίου 200 µg/ml ενώ τα δεύτερα αναχαιτίζονται με συγκέντρωση διακετυλίου 300 µg/ml (Fusieger et al., 2020). Καθώς η παραγωγή του διακετυλίου κατά τη διάρκεια της γαλακτικής ζύμωσης είναι πολύ μικρή, π.χ. 4µg/ml παράγονται από το στέλεχος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* και τα αποδεκτά οργανοληπτικά όρια του διακετυλίου είναι στα 2-7µg/ml, είναι περιορισμένη η πρακτική του εφαρμογή ως συντηρητικό στα τρόφιμα. Παρόλα αυτά το διακετύλιο μπορεί να δράσει συνεργιστικά με άλλες ουσίες αντιμικροβιακής φύσης και έτσι να συνεισφέρει σε συστήματα όπου η συντήρηση γίνεται συνεργιστικά, σε ζυμούμενα κυρίως τρόφιμα (Nicosia et al., 2023).

1.6.6 Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν αντιβακτηριακές ενώσεις, οι οποίες παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η παραγωγή τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στο χώρο ανάπτυξης των βακτηρίων, όπως τα θρεπτικά συστατικά, το pH και η θερμοκρασία. Μερικοί από τους διαχωρισμούς, που γίνονται ως προς τις βακτηριοσίνες, αφορούν το μοριακό τους βάρος, τη δομή τους και τη θερμοανθεκτικότητά τους (Altena et al., 2000; Deegan et al., 2006). Επίσης, οι βακτηριοσίνες, που βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης, παρουσιάζουν μικρότερη

βακτηριοκτόνο δράση από αυτά που βρίσκονται στη λογαριθμική φάση (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Abbasiliasi et al., 2017; Elyass et al., 2017; Karim et al., 2008).

Γενικότερα, αυτό που ισχύει για τις βακτηριοσίνες που παράγονται από τα LAB, είναι ότι η δράση τους περιορίζεται μόνο στα στελέχη της ίδιας οξυγαλακτικής χλωρίδας. Τον ισχυρισμό αυτό έρχονται να διαψεύσουν ορισμένες βακτηριοσίνες, η παρεμποδιστική δράση των οποίων επεκτείνεται και σε αρκετούς Gram θετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (Gao et al., 2010; Klaenhammer, 1993). Γίνεται, επομένως, κατανοητό ότι οι επιστήμονες στοχεύουν στο να εκμεταλλευτούν την ιδιότητα αυτή των βακτηριοσινών για την παραγωγή τροφίμων συντηρούμενων με φυσικό τρόπο. Αυτό συνεπάγεται τη χρήση των LAB, ως προστατευτικές καλλιέργειες ή των μεταβολικών τους προϊόντων, κυρίως βακτηριοσινών (Morac'anin et al., 2012; Ramya & Mythili, 2010; Reis et al., 2012; Silvia et al., 2018).

Οι βακτηριοσίνες που χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία τροφίμων, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα LAB. Ορισμένα από τα γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες είναι τα εξής: *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Lactococcus sp.* και *Lactobacillus sp.* Η παρεμποδιστική δράση των περισσότερων περιορίζεται σε συγκεκριμένη μικροχλωρίδα (Zhang et al., 2020; Zhou & Zhang, 2018).

1.6.7 Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται ορισμένοι εξωπολυσακχαρίτες και η reuterin, που παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη και χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης (Nava et al., 2005). Οι σημαντικότερες από αυτές είναι η reuterin, η οποία παράγεται από το *Limosilactobacillus reuteri* και παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Η παρεμποδιστική της δράση προσδιορίζεται τόσο σε Gram θετικά όσο και Gram αρνητικά βακτήρια, καθώς και σε ζύμες και μύκητες. Λόγω του ευρύ φάσματος στο οποίο επεκτείνεται η παρεμποδιστική δράση της συγκεκριμένης ένωσης έχει προταθεί η χρήση της ως φυσικό συντηρητικό στα τρόφιμα.

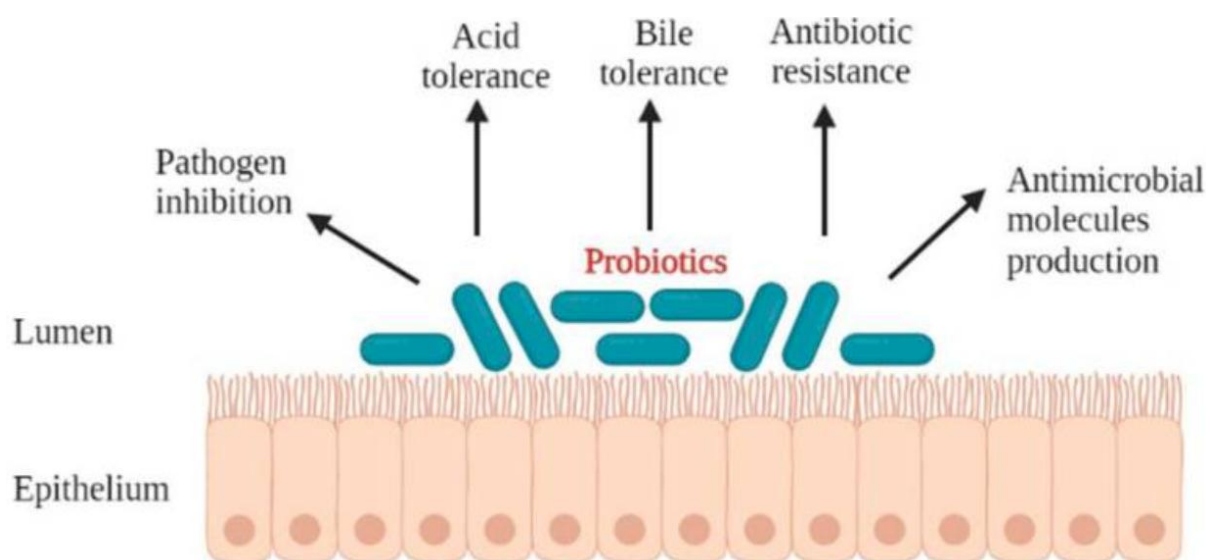
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το *L. reuteri* είναι ένα αποτελεσματικό προβιοτικό με προληπτική δράση στην υπερχοληστερολαιμία (Taranto et al., 2000), αντιμικροβιακή δράση

έναντι παθογόνων (Spinler et al., 2008) και αντιφλεγμονώδη δράση (Backhed et al., 2005). Αρκετές μελέτες σε τρωκτικά έχουν επίσης δείξει ότι το *L. reuteri* θα μπορούσε να αποτρέψει την παχυσαρκία και τον διαβήτη και να βελτιώσει την υγεία και τη φυσιολογία των οργανισμών (Hsieh et al., 2013; Fak and Backhed, 2012; Poutahidis et al., 2013; Qiao et al., 2015). Συγκεκριμένα, το *L. reuteri* μειώνει το σωματικό βάρος, την περιεκτικότητα σε λίπος και τη χοληστερόλη σε μοντέλα παχύσαρκων τρωκτικών που προκαλούνται από τροφή υψηλής ενέργειας (Hsieh et al., 2013; Poutahidis et al., 2013; Jones et al., 2012). Η μελέτη των Hye-Yeon et al., 2023 αξιολόγησε τις αντιγηραντικές επιδράσεις του *L. reuteri* στη διάρκεια ζωής και στη φυσιολογία της μύγας *Drosophila melanogaster*. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το προβιοτικό *L. reuteri* παρατείνει τη διάρκεια ζωής του *D. melanogaster* μειώνοντας τη σηματοδότηση ινσουλίνης/IGF-1. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το προβιοτικό *L. reuteri* μπορεί να είναι εξαιρετικός υποψήφιος ως συμπλήρωμα αντιγήρανσης.

1.7 Επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών

Για να μπορέσει ένα προβιοτικό να αποικίσει και να ασκήσει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή, πρέπει να εμφανίσει τις περισσότερες από τις επιθυμητές ιδιότητες. Αυτά περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε αυτά, την ικανότητα: αντοχές σε οξέα και χολικά άλατα (Gardiner et al., 2000; Pereira et al., 2002; Huang et al., 2003; Bernet-Carnard et al., 2012; Alshammari et al., 2019; Kong et al., 2019; Roselli et al., 2017) παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (Servin et al., 2004; Alshammari et al., 2019), αναστολή παθογόνων και την προσκόλληση του προβιοτικού στο εντερικό επιθήλιο και ο αποικισμός του στον εντερικό σωλήνα (Bernet-Carnard et al., 1997; Huang et al., 2003; Ranadheera et al., 2012; Alshammari et al., 2019). Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας για την επιλογή του προβιοτικού, είναι το να μην περιέχει μεταφερόμενα γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά (Salys et al., 2004; Senok et al., 2005; Wang et al., 2015).

Η βιωσιμότητα ενός προβιοτικού στέλεχους στην ανώτερη γαστρεντερική οδό επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το όξινο pH του στομάχου και των γαστρικών συνθηκών (pH 1-4), από τα χολικά άλατα και τα πεπτικά ένζυμα (Shah, 2000; Mathipa-Mdakane and Thantsha, 2022) συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής οξύτητας του στομάχου (Holzapfel et al., 1998; Corcoran et al., 2005; Caballero-Franco et al., 2007; Dykstra et al., 2011).



Εικόνα 3 Επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών

Πηγή: (Mathipa-Mdakane and Thantsha, 2022).

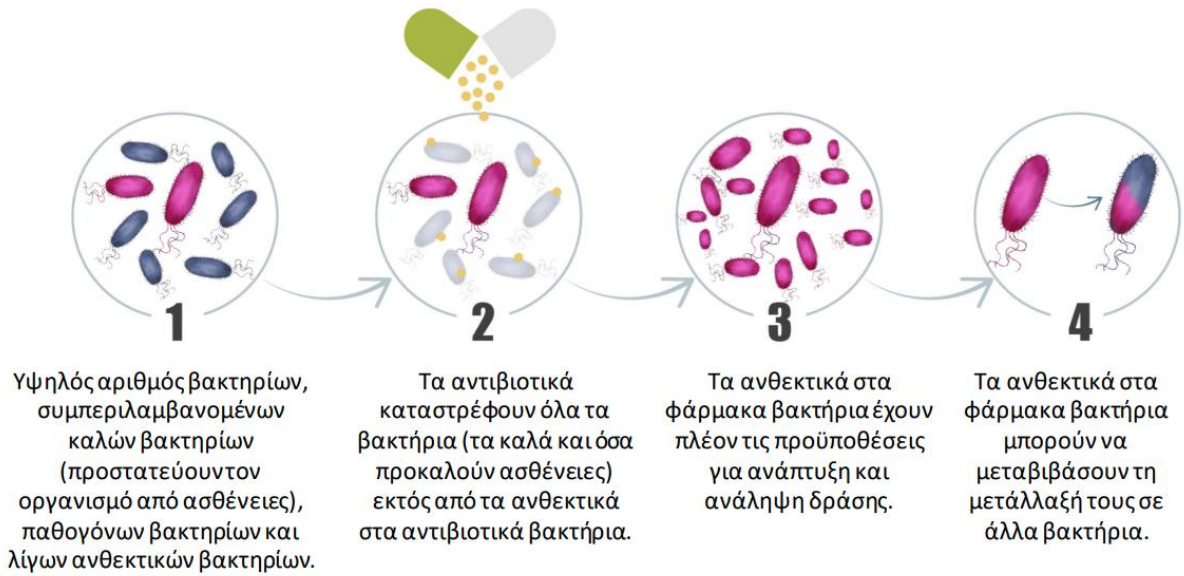
1.8 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, κατηγοριοποιούνται σε φυτικά, συνθετικά ή ημισυνθετικά εάν παράγονται από μικροοργανισμούς. Η εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών, έχει οδηγήσει τα βακτήρια στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι φαρμάκων που προηγούμενος είχαν την ικανότητα να τα καταπολεμήσουν.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και FAO (2002) περιέγραψε το πρόβλημα των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε προβιοτικά στελέχη. Η ικανότητα των προβιοτικών βακτηρίων να μεταφέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά είναι μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους για την επιλογή τους (Tenover, 2006) και η χρήση τους δεν πρέπει να είναι η επιτρεπτή (D'Aimmo, 2007). Σήμερα, η κύρια αιτία της εμφάνισης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, είναι η εκτεταμένη χρήση τους για την προαγωγή της ανάπτυξης των ζώων στις κτηνοτροφικές μονάδες.

Ο WHO και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC) αναγνώρισε τη μικροβιακή αντοχή ως σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία. Cassini et al., 2019 ανέφεραν ότι το με βάση δεδομένα του 2015 του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC), 33 000 άτομα πεθαίνουν ετησίως στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και στον Ευρωπαϊκό Οικονομικό Χώρο (ΕΟΧ) από λοιμώξεις που έχουν προκληθεί από ανθεκτικά στα φάρμακα βακτήρια.

Στην ΕΕ τον ΕΟΧ, τα 2/3 περίπου της συνολικής χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών αφορούν τα ζώα παραγωγής τροφίμων. Σχεδόν το 40 % της μικροβιακής αντοχής προκαλείται από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην τελευταία γραμμή (καρβαπενέμες και η κολιστίνη). Όταν τα αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής δεν είναι πλέον αποτελεσματικά, είναι δύσκολο, ενδεχομένως και αδύνατο, να θεραπευθούν οι μολυσμένοι ασθενείς. Η αντοχή σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων χωρών και του είδους των μικροοργανισμών.



Εικόνα 4 Τρόπος ανάπτυξης της μικροβιακής αντοχής (ΕΕΣ, βάσει στοιχείων των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων των Ηνωμένων Πολιτειών (CDC)).

Όταν τα προβιοτικά εισέρχονται στο έντερο, αλληλεπιδρούν με την εγγενή μικροχλωρίδα και μπορεί να συμβεί μεταφορά γονιδίων, συμβάλλοντας στη μεταφορά γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά σε κοινά ή παθογόνα βακτήρια που υπάρχουν στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Ο προσδιορισμός της αντοχής στα αντιβιοτικά σε προβιοτικά στελέχη θα μπορούσε να γίνει με φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους: i) τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των πιο σχετικών αντιβιοτικών για κάθε στέλεχος βακτηρίων (Flórez et al., 2007) και ii) τη χρήση τεχνικών που βασίζονται σε PCR και ανάλυση μικροσυστοιχείων (Klare et al., 2007; Ammor et al., 2008; Korhonen et al., 2010).

1.9 Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιβακτηριακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες παράγονται από Gram (+) και Gram (-) μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους (Morac̄anin et al., 2012; Zhang et al., 2020). Διακρίνονται για την μεγάλη ετερογένεια τους ως προς τις φυσικοχημικές και γενετικές τους ιδιότητες, την δομή τους και τον τρόπο δράσης τους (Ramya et al., 2010; Reis et al., 2012).

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν θεωρούνται επικίνδυνες ουσίες λόγω της προέλευσης τους από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και συγκαταλέγονται στις λεγόμενες GRAS (Generally Regarded As Safe) ουσίες και έτσι μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα του τροφίμου χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά στη βιομηχανία ζύμωσης (Deegan et al., 2006; Karim et al., 2008 Alvarez-Sieiro et al., 2016; Silva et al., 2018). Η χρήση αυτών των αντιμικροβιακών πεπτιδίων προσφέρει έναν αριθμό πλεονεκτικών χαρακτηριστικών, όπως υψηλή αποτελεσματικότητα, χαμηλή πιθανότητα μη ειδικής τοξικότητας ή επαγωγής αντίστασης και απουσία δημιουργίας υπολειμμάτων. Η βιοσύνθεση των βακτηριοσινών ελέγχεται από βακτηριακό γονιδίωμα (Abbasiliasi et al., 2017).

Οι βακτηριοσίνες των LAB κατηγοριοποιήθηκαν στους ακόλουθους τέσσερις τύπους με βάση το συνιστώμενο πρωτόκολλο ταξινόμησης για τις βακτηριοσίνες:

Class I. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μικρά, θερμοσταθερά πεπτίδια που περιέχουν λανθειονίνη (<5 kDa) (Klaenhammer et al., 1993; Altena et al., 2000; Gao et al., 2010).

Class II. Είναι μικρά, θερμοσταθερά πεπτίδια που δεν περιέχουν λανθειονίνη (<10 kDa) (Morac̄anin et al., 2012).

Class III. Μεγάλες, θερμοευαίσθητες πρωτεΐνες (>30 kDa) που αδρανοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (Gao et al., 2010).

Class IV. σύνθετες πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν ένα υδατανθρακικό ή λιπαρό τμήμα στο μόριο τους, το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης (Klaenhammer et al., 1993; Gao et al., 2010).

Οι βακτηριοσίνες της κατηγορίας I και της κατηγορίας II εφαρμόζονται κατάλληλα ως βιοσυντηρητικά στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων και ως μερική αντικατάσταση των χημικών συντηρητικών (Zhou et al., 2018). Διατηρούν τη δραστικότητα τους σε διάφορες θερμοκρασίες και για ποίκιλα χρονικά διαστήματα επεξεργασίας, όπως στους 100 °C ακόμα και σε θερμοκρασία αποστείρωσης (Klaenhammer et al., 1993; Altana et al., 2000; Gao et al., 2010). Εξάιρεση αποτελούν οι βακτηριοσίνες κλάσης III, οι οποίες δεν είναι ανθεκτικές στη θέρμανση, γεγονός που δείχνει την ύπαρξη μιας πιο περίπλοκης πρωτεϊνικής δομής (Gao et al., 2010). Συνάμα, οι βακτηριοσίνες των LAB είναι γενικά σταθερές σε όξινο ή ουδέτερο pH (pH 2.0-8.0)(Alvarez-Sieiro et al., 2016; Silva et al., 2018).

Οι βακτηριοσίνες των LAB είναι πολλά υποσχόμενα αντιβακτηριακά και μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά βιοσυντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων, όπως ασφαλείς ενώσεις, pH και αντοχή στη θερμότητα (Zhou et al., 2018). Κατά συνέπεια, ο εντοπισμός πιθανών στελεχών που παράγουν βακτηριοκίνη και ο καθαρισμός βακτηριοσινών εξαιρετικής προσαρμοστικότητας στο περιβάλλον είναι εξαιρετικά σημαντικές διαδικασίες για την ανάπτυξη φυσικού βιοσυντηρητικού στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων.

1.9.1 Εφαρμογή των βακτηριοσινών στη βιομηχανία τροφίμων

Στις μέρες μας, οι καταναλωτές ζητούν ασφαλή, υγιεινά, γευστικά, με μεγάλη διάρκεια ζωής και ελάχιστα ‘επεξεργασμένα’ τρόφιμα. Τα LAB έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση και πολλά από αυτά έχουν αναγνωρισθεί ως GRAS (generally recognized as safe) και QPS (Qualified Presumption of Safety). Ως αποτέλεσμα, οι βακτηριοσίνες και άλλοι μεταβολίτες που παράγονται από το LAB θεωρούνται επίσης γενικά ως ασφαλείς ενώσεις με ενδιαφέρουσες ιδιότητες (π.χ. σταθερότητα, αντιμικροβιακή δράση, έλλειψη τοξικότητας, καμία αλλαγή γεύσης) (Carr et al. 2002; Cotter et al. 2005). Μέχρι τώρα, μόνο η nisin και η pediocin PA-1 έχουν διατεθεί στο εμπόριο ως πρόσθετα τροφίμων. Ωστόσο, άλλες βακτηριοσίνες LAB προσφέρουν επίσης υποσχόμενες προοπτικές για χρήση ως βιοσυντηρητικά στα τρόφιμα, όπως για παράδειγμα η enterocin AS-48 (Sánchez-Hidalgo et al. 2011) ή η lacticin 3147 (Suda et al. 2012).

Οι βακτηριοσίνες μπορούν να προστεθούν ως παρασκευάσματα βακτηριοσίνης ή με άμεσο εμβολιασμό του στελέχους που παράγει βακτηριοκίνη. Το παρασκεύασμα βακτηριοσίνης μπορεί να είναι μια καθαρισμένη ή ημι-καθαρισμένη βακτηριοσίνη που προστίθεται ως συντηρητικό τροφίμων, όπως η νισίνη που χρησιμοποιείται συνήθως με την ονομασία Nisaplin™ (Danisco, E234) (Cotter et al. 2005). Στην πραγματικότητα, η νισίνη είναι η μόνη βακτηριοκίνη που έχει λάβει άδεια ως βιοσυντηρητικό σε περισσότερες από 50 χώρες. Οι βακτηριοσίνες μπορούν επίσης να προστεθούν με τη μορφή συμπυκνωμένου ζυμώματος που παράγεται από ένα στέλεχος που παράγει βακτηριοκίνη. Για παράδειγμα, το ALTA 2431™ (Quest) είναι ένα προϊόν ζύμωσης από ένα στέλεχος που παράγει πεδιοκίνη PA-1 (Rodríguez et al. 2002). Τα βακτηριοκινογόνα στελέχη μπορούν να ενοφθαλμιστούν απευθείας στο τρόφιμο όπως οι καλλιέργειες εκκίνησης, συμπληρωματικές ή προστατευτικές. Στην πραγματικότητα, το LAB και, επομένως, οι βακτηριοσίνες τους, έχουν εφαρμοστεί εμπειρικά ως καλλιέργειες εκκίνησης στην παραγωγή παραδοσιακών τροφίμων (Leroy et al. 2006; Alegría et al. 2010).

Πρόσφατα, οι βακτηριοσίνες έχουν επίσης ενσωματωθεί σε μεμβράνες συσκευασίας για τον έλεγχο των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων διασφαλίζοντας τη σταδιακή απελευθέρωση βακτηριοσινών στα τρόφιμα και αποφεύγοντας την αδρανοποίηση της βακτηριοσίνης μέσω αλληλεπίδρασης με συστατικά τροφίμων (Guerra et al. 2005). Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιμικροβιακή δράση της βακτηριοκίνης ενισχύεται έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όταν συνδυάζεται με φυσικοχημικές θεραπείες (τεχνολογία εμποδίων) όπως η υψηλή πίεση (Pérez Pulido et al. 2015), τα οργανικά οξέα (Ukuku and Fett 2004), φαινολικές ενώσεις (Grande et al. 2007), και παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Martínez Viedma et al. 2008).

Οι βακτηριοσίνες συντίθενται σε ριβοσώματα και τα γενετικά στοιχεία που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και την έκκριση μπορεί να περιλαμβάνουν συζευγτικά μετατιθέμενα στοιχεία, γονιδίωμα, πλασμίδιο και κινητά γενετικά υλικά ως συστάδες οπερονίου (Kumariya et al., 2019).

Αρχικά, η σύνθεση μικρών πεπτιδίων (βακτηριοκινών) από το LAB λαμβάνει χώρα ως πρόδρομες μορφές και η περαιτέρω επεξεργασία και η μετα-μεταφραστική τροποποίηση στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα εντός των κυττάρων. Η εκθετική φάση ανάπτυξης (κατά τη διάρκεια ή στο τέλος της περιόδου) των LAB είναι κρίσιμη για την παραγωγή βακτηριοσίνης. Η παραγωγή βακτηριοσινών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των συντιθέμενων πεπτιδίων ή

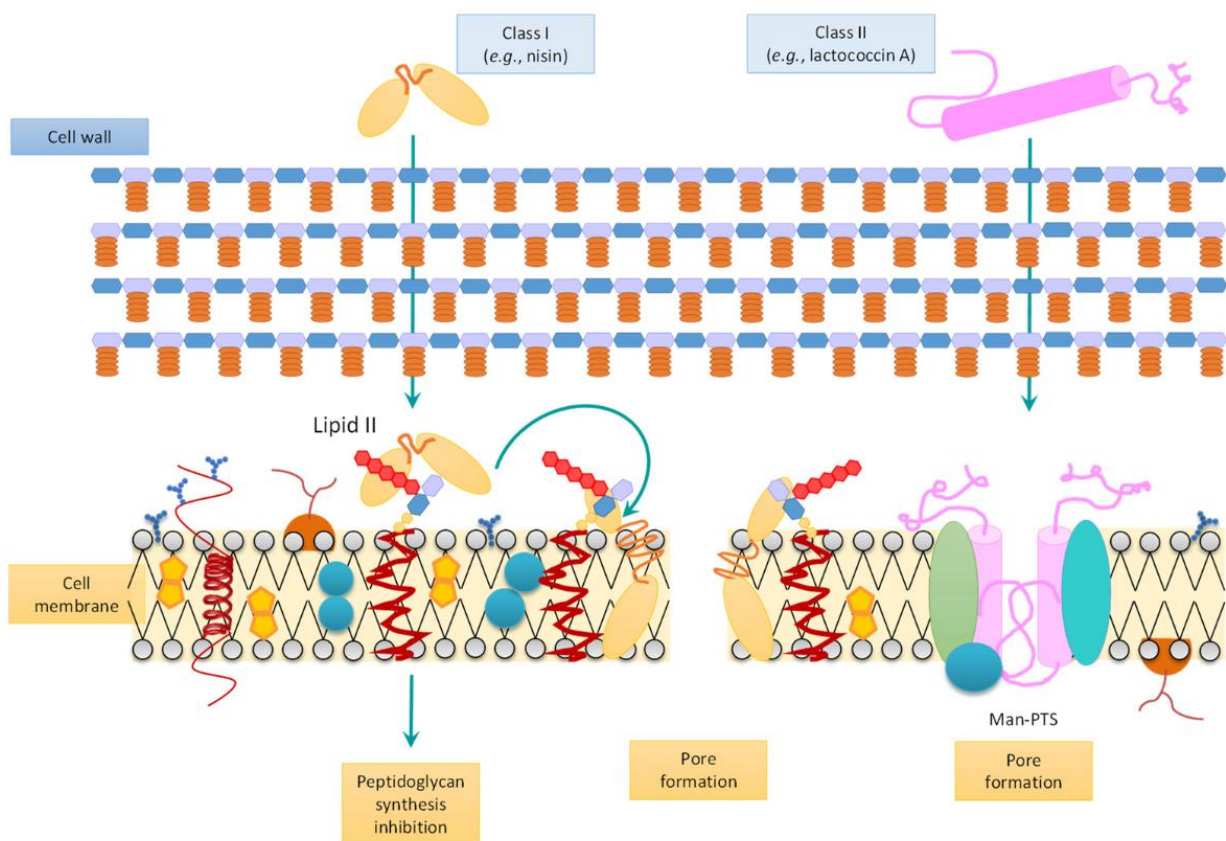
φερομονών. Αυτά τα πεπτίδια ενεργοποιούν κανονικά την έκκριση όταν φτάσουν σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσής. Στη συνέχεια, η αυτοφωσφορυλίωση του υπολείμματος ιστιδίνης λαμβάνει χώρα λόγω της ενεργοποίησης της διαμεμβρανικής κινάσης ιστιδίνης από βακτηριοσίνες, οδηγώντας στη μεταφορά φωσφορικού σε μια πρωτεΐνη ρυθμιστή απόκρισης (response regulator) (Morton et al., 2015). Κατά συνέπεια, οι βακτηριοσίνες αποκτούν την ώριμη μορφή τους αφού μεταφερθούν και διασπαστούν.

Οι Mignolet et al., 2018 έδειξε ότι απουσία του BIpAB, του συστήματος μεταφοράς βακτηριοσίνης στο *Streptococcus salivarius*, το ComRS-ρυθμισμένο ComA, το οποίο ήταν ομόλογο με το BIpA, θα μπορούσε να αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενος υποψήφιος για έκκριση βακτηριοσίνης. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην έκφραση και την εξαγωγή τους βρίσκονται κοντά στο γονίδιο βιοσύνθεσης βακτηριοκίνης. Μεταξύ αυτών των γονιδίων, το πρώτο παράγει το βιολογικά ανενεργό προπεπτίδιο, ενώ το δεύτερο προσδίδει μια ειδική πρωτεΐνη ανοσίας προς το κύτταρο παραγωγό. Η τρίτη είναι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν γονίδια του μεταφορέα ABC, υπεύθυνες για την εξωτερίκευση της βακτηριοσίνης και η τελευταία βοηθά στην εξωτερίκευση της βακτηριοσίνης (Kumariya et al., 2019). Γενικά, οι βακτηριοσίνες κατηγορίας II αναφέρθηκε ότι απαιτούν τουλάχιστον τέσσερα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων για το προπεπτίδιο βακτηριοσίνης (π.χ. pedA στην περίπτωση της πεδιοκίνης PA-1/AcH), τη συγγενή πρωτεΐνη ανοσίας (pedB), ένα ABC - πρωτεΐνη μεταφοράς τύπου (pedD) και μια βοηθητική πρωτεΐνη δεσμευμένη στη μεμβράνη (pedC) που είναι απαραίτητη για την εξαγωγή (Field et al., 2007). Η νισίνη δρα ως αυτοεπαγωγέας για τις εκφράσεις της επηρεάζοντας τα δύο συστατικά ρυθμιστικά συστήματα (Morton et al., 2015). Μετά την αφαίρεση της αλληλουχίας σήματος με ενζυματικό ψαλίδι, τα πρόωρα προπεπτίδια μεταφέρονται στον εξωκυτταρικό χώρο ως ώριμες βακτηριοσίνες.

Οι βακτηριοσίνες (ειδικά κατιονικές) στοχεύουν σε ανιονικά συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας όπως φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη, λιποπολυσακχαρίτη, λιποτεϊχοϊκό οξύ και καρδιολιπίνη (Rashid et al., 2016; López et al., 2017). Επιπλέον, συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων-στόχων και στη συνέχεια είτε τους σκοτώνουν είτε μειώνουν την παθογένειά τους με διαφορετικούς επικουρικούς μηχανισμούς (Gonzales et al., 2021). Έχουν συνήθως θετικά φορτισμένα πεπτίδια με υδρόφοβες περιοχές που συνήθως αλληλοεπιδρούν

ηλεκτροστατικά με την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή κυτταρική επιφάνεια, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές διασχίζουν τη λιπιδική διπλή στιβάδα.

Στην περίπτωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων, οι βακτηριοσίνες μπορεί να λειτουργούν με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς (Εικόνα 5). Στην περίπτωση του μοντέλου κατηγορίας I, οι βακτηριοσίνες αναστέλλουν τη σύνθεση συστατικών που σχετίζονται με το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και το λιπίδιο II στην κυτταρική μεμβράνη. Ενώ στην κατηγορία II, ο σχηματισμός ιοντοεκλεκτικών πόρων στην κυτταρική μεμβράνη λαμβάνει χώρα μέσω υποδοχέων που σχηματίζουν πόρους στο σύστημα μαννόζης-φωσφοτρανσφοράσης, που προκαλεί διάχυση της κινητήριας δύναμης πρωτονίων και εξάντληση του ενδοκυτταρικού ATP, διαρροή ενδοκυτταρίου υποστρώματος που οδηγεί στον θάνατο (Kumariya et al. (2019).



Εικόνα 5 Μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών των gram θετικών βακτηρίων

Πηγή: (Bhattacharya et al., 2022)

Η βακτηριοστατική δράση των βακτηριοσινών εξαρτάται από τη δόση, τον βαθμό καθαρισμού, την φάση ανάπτυξης, το pH, τη θερμοκρασία ή άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που υπάρχουν για να αλλοιώσουν το κυτταρικό τοίχωμα. Μεταξύ πολλών, η νισίνη και η πεδιοκίνη είναι ευρέως γνωστές βακτηριοσίνες με αντιμικροβιακή δράση. Αναστέλλουν την ανάπτυξη και την δραστηριότητα των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Αν και η χρήση τους είναι εγκεκριμένη από την αρμόδια αρχή για τους τομείς των τροφίμων και τους φαρμακευτικούς τομείς, δεν είναι τόσο πολλά υποσχόμενοι για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που προκαλούν τροφιμογενείς ασθένειες.

Έχει αναφερθεί ότι η χρήση χημικών ουσιών (π.χ. οργανικά οξέα, αιθέρια έλαια, EDTA) ή στρεσογόνων μεθόδων (π.χ. θερμοκρασία, παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, pH, υψηλή υδροστατική πίεση, αιθέρια έλαια), βοηθούν στην αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος, βοηθώντας τη δραστηριότητα των βακτηριοσινών για Gram αρνητικά βακτήρια (Da Costa et al., 2019; Cotter et al., 2013).

1.10 Μικροβιακή Αντίσταση

Τα στελέχη LAB που παράγουν βακτηριοσίνες αναπτύσσουν έναν ανοσοποιητικό μηχανισμό έναντι των δικών τους μεταβολιτών, οδηγώντας σε αντίσταση στη βακτηριοσίνη. Ωστόσο, η αντίσταση ενάντια στην αυτομολυσματικότητα επιτυγχάνεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης (De Freire Bastos et al., 2015; Gonzales et al., 2021).

Διάφοροι τύποι ή κατηγορίες βακτηριοσινών δρουν προσδένοντας ένα σημαντικό πρόδρομο, το λιπίδιο II που υπάρχει στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, διαφορετικά ένζυμα (φωσφοτρανσφεράση περμεάσης μαννόζης, πρωτεάσες που εξαρτώνται από τη μεμβράνη) και μεταφορείς όπως ο μεταφορέας ABC μαλτόζης (Gabrielsen et al., 2012).

Ασκούν την επίδρασή τους επηρεάζοντας πρώτα τους υποδοχείς της μεμβράνης, οι οποίοι χρησιμεύουν ως μόριο πρόσδεσης για τις βακτηριοσίνες. Οποιαδήποτε εναλλαγή στη χημική σύνθεση του τείχοϊκού οξέος (πολυμερή φωσφορικής ριβιτόλης ή φωσφορικής γλυκερόλης) μειώνει το αρνητικό φορτίο του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Είναι γνωστό ότι το τείχοϊκό οξύ είναι υπεύθυνο για το αρνητικό φορτίο στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram

θετικών βακτηρίων, αλλά η σύζευξη της D-αλανίνης με το λιποτεϊχοϊκό οξύ (D-αλανυλιωμένο) έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των αρνητικών φορτίων με θετικά φορτία και αυτή η αλλαγή πιθανώς αποτρέπει τις βακτηριοσίνες να προσδένουν το λιπίδιο II στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Shiraishi et al., 2016)

Η αντίσταση στη δαπτομυκίνη (φυσικό προϊόν κυκλικού λιποπεπτιδίου) του *Staphylococcus aureus* οφείλεται εν μέρει στην παραπάνω επίδραση σύζευξης της D-αλανίνης με το τείχοϊκό οξύ (Kjos et al., 2011; Gradisteanu Pircalabioru et al., 2021). Οι αναφορές έδειξαν επίσης ότι η D-αλανυλίωση του λιποτεϊχοϊκού οξέος του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος παρέχει προστασία έναντι βακτηριοσινών και άλλων διαφορετικών αντιβακτηριακών πεπτιδίων.

Η ενσωμάτωση της D-αλανίνης στο λιποτεϊχοϊκό οξύ ενός βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος διευκολύνεται από το σύστημα οπερονίων *dltABCD*. Ακόμη και πολλά βακτηριακά κύτταρα θα μπορούσαν να αλλάξουν τα ανιονικά φωσφολιπίδια με L-λυσίνη για να δώσουν ένα βασικό φωσφολιπίδιο γνωστό ως λυσοφωσφατιδυλογλυκερόλη και να αναπτύξουν ένα καθαρό θετικό φορτίο στη βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη, το οποίο μπορεί να προστατεύσει από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια ή τις βακτηριοσίνες, συμπεριλαμβανομένης της λιποποκινομυϊκής. Η υψηλή αναλογία αλλοιωμένου και αποκορεσμένου οξέος, καθώς και λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας ακυλίου στις ανθεκτικές στη βακτηριοκίνη παραλλαγές ή μικροοργανισμό, αποδίδεται στην αυξημένη ακαμψία της μεμβράνης και στη λιγότερη ρευστότητα, περιορίζοντας τη διείσδυση της μεμβράνης από βακτηριοσίνες στο κύτταρο (Sun et al., 2012; De Freire Bastos et al., 2015). Αντίσταση μπορεί επίσης να αποκτηθεί με φυσικό μετασηματισμό με ελεύθερο DNA που κωδικοποιεί γονίδια ανοσίας που υπάρχουν στο γονιδιωματικό πλαίσιο των βακτηριοσινών (O'Connell et al., 2022).

1.11 Αντιοξειδωτικές δράσεις των προβιοτικών

Αρκετές μελέτες έχουν παρουσιάσει ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών στελεχών στην προστασία κατά του οξειδωτικού στρες και τη δυνατότητα που έχουν να μειώσουν τον κίνδυνο συσσώρευσης των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) που οδηγεί σε οξείδωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και βλάβης στο DNA (Fenster et al., 2002; Jeon et al., 2012; Lai et al., 2012; Zhang et al., 2013; Carocho et al., 2013; Kim et al., 2022). Τα LAB έχουν μελετηθεί εκτενώς για την αντιοξειδωτική τους δράση χρησιμοποιώντας διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις. Η αντιοξειδωτική δράση πολλών στελεχών έχει αποδειχθεί από την ικανότητα που έχουν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, την ικανότητα αναστολής της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Nakagawa and Miyazaki, 2017; Tang et al., 2018; Kim et al., 2022). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Kullisar et al., 2002 φάνηκε ότι τα προβιοτικά στελέχη *L. fermentum* E-3 και *L. fermentum* E-18 παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση με την έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου και παρουσίασαν επίσης αυξημένη αντίσταση σε διάφορες μορφές ROS, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τις ρίζες υδροξυλίου.

Ακόμα ένα παράδειγμα ήταν η μελέτη των Martarelli et al., 2011, όπου προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική δράση των προβιοτικών στελεχών, *L. rhamnosus* IMC 501 και *L. paracasei* IMC 502 in vitro σε αθλητές σε περίοδο τεσσάρων εβδομάδων έντονης σωματικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έντονη σωματική δραστηριότητα οδήγησε τους αθλητές σε οξειδωτικό στρες και ότι η χορήγηση των στελεχών *L. rhamnosus* IMC 501 και *L. paracasei* IMC 502 αύξησε τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα, εξουδετερώνοντας έτσι τις δραστικές μορφές οξυγόνου.

Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί σε επιλεγμένα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Li et al., 2012; Pieniz et al., 2014; Song et al., 2020; Cizeikiene and Jagelaviciute, 2021; Kim et al., 2022). Για παράδειγμα στη μελέτη των Wang et al., 2006 εξετάστηκαν οι αντιοξειδωτικές δράσεις στο γάλα σόγιας που είχε υποστεί ζύμωση με LAB (*L. acidophilus* CCRC 14079 ή *S. thermophilus* CCRC 14085) καθώς και με *Bifidobacteria* (*B. infantis* CCRC 14633 ή *B. longum* B6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ζυμωμένου γάλακτος σόγιας ήταν υψηλή. Παρόμοια μελέτη ήταν των Zanoni et al., 2008 όπου εξετάσαν την αντιοξειδωτική δραστηριότητα των

προβιοτικών στελεχών *L. plantarum* LP1, *S. thermophilus* Z 57 και *B. lactis* B 933. Τα προβιοτικά στελέχη έδειξαν βιωσιμότητα στο γαστρικό υγρό και στα χολικά άλατα και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Σε μια μελέτη ανασκόπησης παρουσιάστηκε η ενίσχυση των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων σε φυσιολογικά κύτταρα του βλεννογόνου που εκτίθενται σε ιοντίζουσα ακτινοβολία ως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των προβιοτικών βακτηρίων. Ειδικότερα, παρουσιάστηκαν πειραματικές μελέτες και κλινικές δοκιμές που υποδεικνύουν το πιθανό αντιοξειδωτικό όφελος των προβιοτικών μικροοργανισμών στην προκαλούμενη από ακτινοβολία εντερίτιδα και κολίτιδα (Spygroulos et al., 2011).

Η χρησιμοποίηση προβιοτικών στελεχών με αντιοξειδωτικές δράσεις μπορεί να συνδράμει θετικά στην παρασκευή προβιοτικών ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων που βελτιώνουν την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση όπως παρουσιάστηκε και στη μελέτη των Virtanen et al., 2007, όπου αποδείχθηκε ότι αρκετά προβιοτικά στελέχη παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση και τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Οι μεταβολικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των προβιοτικών βακτηρίων, μπορεί να οφείλονται επίσης στην εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου και την μείωση της δραστηριότητας ή την αναστολή της αυτο-οξειδωσης του ασκορβικού στο έντερο μέσω εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Baldwin et al., 2010). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν συνδεθεί με την παθογένεση διάφορων γαστρεντερικών παθήσεων καθώς και τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Zhong et al., 2014). Αρκετές in vitro μελέτες κατέδειξαν ότι διάφορα προβιοτικά στελέχη παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αδρανοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου μέσω ενζυματικών μηχανισμών όπως το συζευγμένο σύστημα οξειδάσης/υπεροξειδάσης NADH και της καταλάσης (Amanatidou et al., 2001; Bruno-Bárcena et al., 2004; Kullisaar et al., 2003; Lee et al., 2005). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη καταδείχτηκε η πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης του DNA σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HT29, μέσω των προβιοτικών στελεχών (Koller et al., 2008). Συνολικά, εξετάστηκαν 55 βακτήρια γαλακτικού οξέος και τα ισχυρότερα αποτελέσματα (μέχρι και 60% μείωση στις βλάβες του DNA) παρατηρήθηκαν από τα είδη *L. plantarum* και *S. thermophilus*.

1.12 Βοτανικά Στοιχεία

Η *Olea europaea* L. (Ευρωπαϊκή ελιά) ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae*, είναι αιθαλές δέντρο και το ύψος του φτάνει 3-5 m. Θεωρείτε σημαντικό προϊόν ζύμωσης στη μεσογειακή διατροφή λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε μονοακόρεστα λίπη, κυρίως ελαϊκό οξύ, καθώς και φαινολικές ενώσεις που είναι γνωστό ότι αποτελούν πηγή αντιοξειδωτικών για τον ανθρώπινο οργανισμό (Ghanbari et al., 2012). Αν και η καλλιέργεια της ελιάς έχει πλέον επεκταθεί σε πολλά μέρη του κόσμου, η Μεσόγειος εξακολουθεί να είναι η κύρια περιοχή παραγωγής, με το ποσοστό της να αντιπροσωπεύει περίπου το 98% της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας (Ryan and Robards, 1998).

Η Ελλάδα είναι σημαντικός παράγοντας στον κλάδο της επιτραπέζιας ελιάς καθώς η ετήσια παραγωγή 55.000 τόνων είναι η δεύτερη υψηλότερη στην Ευρώπη, μετά την Ισπανία (DOEPEL, 2020). Ο κλάδος έχει αναπτυχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, συμβάλλοντας σημαντικά στην ελληνική οικονομία, καθώς το 85% της παραγωγής εξάγεται.

Οι επιτραπέζιες ελιές Καλαμών καλλιεργούνται κυρίως στην Πελοπόννησο και τη Στερεά Ελλάδα (DOEPEL, 2020). Ο συγκεκριμένος τύπος επιτραπέζιας ελιάς χαρακτηρίζεται από το σκούρο χρώμα, την τραγανή υφή του και την υψηλή ζήτηση της για εξαγωγή στο εξωτερικό. Προβλέπεται ότι η παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς Καλαμών, κυρίως στους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Λακωνίας και Φθιώτιδας, θα ξεπεράσει τους 100.000 τόνους μέσα στα επόμενα 10 χρόνια (DOEPEL, 2020; Kazou et al., 2020). Το βάρος των ελιών είναι περίπου 3 - 6 g/καρπό (Bonatsou et al., 2018). Συλλέγονται από τις αρχές Νοεμβρίου μέχρι τις αρχές του χειμώνα, όταν έχουν σχηματίσει το επιθυμητό βαθύ μαύρο χρώμα αλλά δεν έχουν ωριμάσει πλήρως. Αφού υποβληθούν σε φυσική ζύμωση, διατηρούνται σε άλμη όπου ολοκληρώνεται η ωρίμανση, με αποτέλεσμα τα εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Grounta et al., 2016; Grounta et al., 2017).

Γενικά, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση αναπτύσσονται μέσω μιας αυθόρμητης διαδικασίας που έχει βελτιωθεί με τα χρόνια, διασφαλίζοντας την ασφάλεια και την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Corsetti et al., 2012; Argyri et al., 2020). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι πιο συνηθισμένοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν είναι: *Enterobacteriaceae*,

Leuconostoc, *Pseudomonadas*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* και μύκητες (Sisto and Lavermicocca, 2012; Portilha-Cunha et al., 2020).

Η ελληνική τύπου ζύμωση μειώνει ή ακόμα και εξαλείφει την περιεκτικότητα τις ελευρωπεΐνης. Η ελευρωπεΐνη, είναι μια πολυφαινολική ένωση που είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση της ελιάς κατά τη συγκομιδή. Η συγκέντρωση αυτής της ένωσης μειώνεται με το χρόνο ωρίμανσης του καρπού. Είναι υδατοδιαλυτή ουσία γι' αυτό και δεν δημιουργεί προβλήματα κατά την ελαιοποίηση, αφού απομακρύνεται με τα φυτικά υγρά. Αντίθετα οι ελιές που προορίζονται για βρώση πρέπει να δεχτούν διαφορετικούς χειρισμούς για την απομάκρυνση της ελευρωπεΐνης όπως συνεχή πλυσίματα με νερό ή την προσθήκη διαλύματος NaOH (καυστικό νάτριο). Η αφαίρεση της ελευρωπαΐνης βοηθά επίσης στην παραγωγή ενός προϊόντος με μοναδικές και υψηλής ποιότητας οργανοληπτικές ιδιότητες (Argyri et al., 2014; Omar, 2010; Panagou et al., 2003; Hurtado et al., 2012).

Η διαδικασία ζύμωσης, η οποία διαρκεί 8-12 μήνες, εξαρτάται από τη συνύπαρξη LAB και ζυμομυκήτων και την ικανότητά τους να παράγουν οξέα που μειώνουν το pH (De Bellis et al., 2010; De Angelis et al., 2015) και παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις (π.χ. βακτηριοσίνες) (Azizi et al., 2017), τα οποία σχετίζονται και τα δύο με την πρόληψη ανεπιθύμητων παθογόνων (π.χ. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7) (Azizi et al., 2017; Blana et al., 2016). Πρέπει να σημειωθεί ότι σωστός εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη βοηθάει τη βελτίωση της συνολικής ποιότητας (Doulgeraki et al., 2012).

1.13 Ανάγκη για συντήρηση τροφίμων

Όσο περνάνε τα χρόνια και δημιουργούνται καινούριες καινοτόμες ιδέες και δεδομένα στη τεχνολογία τροφίμων, οι καταναλωτές αλλά και οι προμηθευτές είναι πιο ευαισθητοποιημένοι ως προς την αναγκαιότητα για την ασφάλεια των συστατικών και των συντηρητικών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα. Οι μοντέρνες τάσεις των καταναλωτών, οι οποίοι θέλουν να καταναλώνουν όσο το δυνατόν λιγότερο ‘επεξεργασμένα’ τρόφιμα, χωρίς πρόσθετα, τα οποία όμως να παρέχουν απόλυτη μικροβιολογική ασφάλεια, έχει οδηγήσει τη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων στην αντικατάσταση των υπάρχοντων παραδοσιακών μεθόδων ελέγχου της μικροβιολογικής αλλοίωσης και του κινδύνου για την ασφάλεια των τροφίμων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να δημιουργείται μια νέα έννοια στον χώρο συντήρησης των τροφίμων η οποία ονομάζεται βιοπροστασία (Monica Becker et al 2020).

Ως βιοπροστασία, ορίζεται η επέκταση του χρόνου ζωής και η ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση φυσικών μικροοργανισμών και των αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγουν στα τρόφιμα. Τέτοιες μοντέρνες τεχνολογίες περιλαμβάνουν βιολογικά αντιμικροβιακά συστήματα, όπως τα LAB και οι δευτερογενής μεταβολίτες που παράγουν κατά τη ζύμωση. Η χρήση των LAB και των μεταβολιτών τους ως φυσικά πρόσθετα, είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την επέκταση του χρόνου ζωής και της ασφάλειας ενός τροφίμου. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η δράση των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς όμως να μεταβάλλονται τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η θρεπτική αξία του τροφίμου (Coton et al 2016; Garnier et al 2020).

1.14 Βακτήρια γαλακτικού οξέος ως λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης

Μία καλλιέργεια εκκίνησης μπορεί να οριστεί ως ένα μικροβιακό παρασκεύασμα μεγάλου αριθμού κυττάρων ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού που θα προστεθεί σε μια πρώτη ύλη για να παραχθεί μια τροφή που έχει υποστεί ζύμωση επιταχύνοντας και καθοδηγώντας τη διαδικασία ζύμωσής της. Τα LAB κατέχουν κεντρικό ρόλο σε αυτές τις διαδικασίες ζύμωσης και έχουν μακρά και ασφαλή ιστορία εφαρμογής και κατανάλωσης στην παραγωγή

τροφίμων και ποτών (Caplice and Fitzgerald, 1999). Προκαλούν ταχεία οξίνιση της πρώτης ύλης μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων, κυρίως του γαλακτικού οξέος. Παράγουν επίσης οξικό οξύ, αιθανόλη, αρωματικές ενώσεις, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες και αρκετά ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύουν τη διάρκεια ζωής και τη μικροβιακή ασφάλεια, βελτιώνουν την υφή και συμβάλλουν στο ευχάριστο αισθητηριακό προφίλ του τελικού προϊόντος.

Παλαιότερα η ζύμωση στη βιομηχανία βασιζόταν στην αυθόρμητη ζύμωση λόγω της ανάπτυξης της μικροχλωρίδας που υπάρχει φυσικά στην πρώτη ύλη και η ποιότητα του τελικού προϊόντος εξαρτιόταν από το μικροβιακό φορτίο της πρώτης ύλης. Η αυθόρμητη ζύμωση βελτιστοποιήθηκε μέσω οπισθοδρόμησης (backslopping), δηλ. εμβολιασμού της πρώτης ύλης με μια μικρή ποσότητα μιας προηγούμενως επιτυχούς ζύμωσης. Ως εκ τούτου, η οπίσθια κλίση έχει ως αποτέλεσμα την κυριαρχία των καλύτερα προσαρμοσμένων στελεχών. Αντιπροσωπεύει έναν τρόπο, είτε ασυνείδητα, χρήσης μιας επιλεγμένης καλλιέργειας εκκίνησης για να συντομεύσει τη διαδικασία ζύμωσης και να μειώσει τον κίνδυνο αποτυχίας της ζύμωσης. Το backslopping εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, για παράδειγμα στην παραγωγή ξινολάχανου, στο προζύμι και σε προϊόντα για τα οποία ο ρόλος του μικροβιακού πληθυσμού δεν είναι καλά γνωστός (Oberman and Libudzisz, 1998). Η παραγωγή τροφίμων και ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση μέσω αυθόρμητης και οπισθοδρόμησης ζύμωσης αντιπροσωπεύει μια φθηνή και αξιόπιστη μέθοδο συντήρησης σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, ενώ στις δυτικές χώρες η μεγάλη κλίμακα παραγωγής τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση έχει γίνει από τους σημαντικότερους κλάδους στη βιομηχανία τροφίμων (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Η άμεση προσθήκη επιλεγμένων καλλιεργειών εκκίνησης σε πρώτες ύλες ήταν μια σπουδαία ανακάλυψη στην επεξεργασία τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση, με αποτέλεσμα υψηλό βαθμό ελέγχου στη διαδικασία και τυποποίηση του τελικού προϊόντος. Στελέχη που έδωσαν επιθυμητά χαρακτηριστικά στα τελικά προϊόντα απομονώθηκαν από φυσική χλωρίδα ή από προϊόντα που είχαν υποστεί επιτυχή ζύμωση (Oberman and Libudzisz, 1998).

Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα μειονεκτήματα. Γενικά, η αρχική επιλογή καλλιεργειών εκκίνησης του εμπορίου δεν έγινε με ορθολογικό τρόπο, αλλά βασίστηκε στην ταχεία οξίνιση. Αυτοί οι εκκινητές δεν είναι πολύ ευέλικτοι όσον αφορά τις επιθυμητές ιδιότητες και λειτουργικότητα του τελικού προϊόντος. Αρχικά, οι βιομηχανικές καλλιέργειες

εκκίνησης διατηρήθηκαν με καθημερινό πολλαπλασιασμό. Αργότερα, έγιναν διαθέσιμα ως κατεψυγμένα συμπυκνώματα και αποξηραμένα ή λυοφιλοποιημένα παρασκευάσματα, τα οποία παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα, ορισμένα από αυτά επιτρέπουν τον άμεσο ενοφθαλμισμό σε δεξαμενή (Sandine, 1996).

Οι αρχικές καλλιέργειες εκκίνησης ήταν μείγματα πολλών απροσδιόριστων μικροβίων. Η καθημερινή διάδοση πιθανώς οδήγησε σε μετατοπίσεις του οικοσυστήματος με αποτέλεσμα την εξαφάνιση ορισμένων στελεχών. Επιπλέον, ορισμένα σημαντικά μεταβολικά χαρακτηριστικά στα LAB είναι κωδικοποιημένα με πλασμίδια και υπάρχει κίνδυνος να χαθούν κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού. Είναι επίσης πιθανό ότι η απώλεια γενετικού υλικού συνέβη λόγω προσαρμογής στη μήτρα τροφίμων. Ως εκ τούτου, η βιοποικιλότητα των εμπορικών εκκινητών έχει περιοριστεί. Αυτό συχνά οδηγεί σε απώλεια της μοναδικότητας του αρχικού προϊόντος και απώλεια των χαρακτηριστικών που έχουν κάνει το προϊόν δημοφιλές. Αντίθετα, η ζύμωση των παραδοσιακών τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση προκαλείται συχνά από φυσικά, άγριου τύπου LAB που προέρχονται από την πρώτη ύλη ή το περιβάλλον και που εκκινούν τη διαδικασία ζύμωσης με απουσία πρόσθετου εμπορικού εκκινητή. Επιπλέον, πολλά παραδοσιακά προϊόντα λαμβάνουν την ένταση της γεύσης τους από τα non starter-LAB (NSLAB), τα οποία δεν αποτελούν μέρος της κανονικής χλωρίδας εκκίνησης αλλά αναπτύσσονται στο προϊόν, ιδιαίτερα κατά την ωρίμανση, ως δευτερεύουσα χλωρίδα (Beresford et al., 2001).

Οι καθαρές καλλιέργειες που απομονώνονται από πολύπλοκα οικοσυστήματα παραδοσιακά ζυμωμένων τροφίμων, παρουσιάζουν ποικιλία μεταβολικών δραστηριοτήτων που αποκλίνουν έντονα από εκείνες των συγκρίσιμων στελεχών που χρησιμοποιούνται εκκινητές χύμα. Αυτές περιλαμβάνουν διαφορές στον ρυθμό ανάπτυξης και ανταγωνιστική συμπεριφορά ανάπτυξης σε μικτές καλλιέργειες, προσαρμογή σε συγκεκριμένο υπόστρωμα ή πρώτη ύλη, αντιμικροβιακές ιδιότητες και χαρακτηριστικά γεύσης, αρώματος και ποιότητας. Τα άγρια στελέχη πρέπει να αντέχουν τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών για να επιβιώσουν στο εχθρικό φυσικό τους περιβάλλον, έτσι ώστε συχνά να παράγουν αντιμικροβιακά όπως οι βακτηριοσίνες. Υπάρχει μια τάση στην απομόνωση στελεχών άγριου τύπου από παραδοσιακά προϊόντα που θα χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση τροφίμων (Beukes, Bester and Mostert, 2001).

Ο καταναλωτής δίνει μεγάλη προσοχή στη σχέση μεταξύ τροφής και υγείας. Κατά συνέπεια, η αγορά τροφίμων με ιδιότητες προαγωγής της υγείας, τα λεγόμενα λειτουργικά τρόφιμα, έχει παρουσιάσει αξιοσημείωτη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Επίσης, η χρήση χημικών πρόσθετων τροφίμων θεωρείται αφύσικη και επικίνδυνη. Ωστόσο, χρειάζονται πρόσθετα για τη διατήρηση των τροφίμων από αλλοίωση και για τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Η ζήτηση για μειωμένη χρήση πρόσθετων και επεξεργασίας φαίνεται αντιφατική με την προτίμηση της αγοράς για προϊόντα που είναι φρέσκα, ασφαλή, νόστιμα, χαμηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη, λιπαρά και αλάτι. Στην τυροκομία, για παράδειγμα, η χρήση νωπού γάλακτος επιτρέπει την παραγωγή παραδοσιακών ποικιλιών υψηλής αξίας, αλλά εγκυμονεί κινδύνους για την ασφάλεια, π.χ. την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*. Από την άλλη πλευρά, η παστερίωση του γάλακτος οδηγεί σε απώλεια γεύσης και δίνει τελικά προϊόντα που γίνονται αντιληπτά από τον καταναλωτή ως «βαρετά». Αυτές οι τάσεις της αγοράς βάζουν τη βιομηχανία τροφίμων υπό πίεση να αναζητήσει εναλλακτικές λύσεις.

Στη ζύμωση των τροφίμων, ένα από τα βασικά σημεία για παρέμβαση φαίνεται να είναι στο επίπεδο της καλλιέργειας εκκίνησης. Δυστυχώς, οι βιομηχανικές καλλιέργειες εκκίνησης δεν διαθέτουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για τη διαφοροποίηση των προϊόντων και η εμπορική διαθεσιμότητα νέων ενδιαφερόσων καλλιεργειών εκκίνησης είναι περιορισμένη. Η αυξημένη κατανόηση της γονιδιωματικής και του μεταβολισμού των μικροβίων των τροφίμων ανοίγει προοπτικές για αρχική βελτίωση. Μέσω της μοριακής βιολογίας είναι πλέον δυνατή η έκφραση επιθυμητών και η καταστολή των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων της κάθε καλλιέργειας εκκίνησης (Law, 2001).

Η χρήση λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης στη βιομηχανία ζύμωσης τροφίμων διερευνάται (De Vuyust, 2000). Οι λειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης είναι εκκινητές που διαθέτουν τουλάχιστον μία εγγενή λειτουργική ιδιότητα. Να μπορούν να συνεισφέρουν στην ασφάλεια των τροφίμων και/ή προσφέρουν ένα ή περισσότερα οργανοληπτικά, τεχνολογικά, διατροφικά ή πλεονεκτήματα υγείας.

Η εφαρμογή προσεκτικά επιλεγμένων στελεχών ως καλλιέργειες εκκίνησης ή συγκαλλιέργειες σε διαδικασίες ζύμωσης, μπορεί να βοηθήσει στην επί τόπου έκφραση της επιθυμητής ιδιότητας, διατηρώντας ένα απόλυτα φυσικό και υγιεινό προϊόν. Παραδείγματα

είναι τα LAB που μπορούν να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, πολυμερή σακχάρων, γλυκαντικά, αρωματικές ενώσεις, χρήσιμα ένζυμα ή θρεπτικά συστατικά ή βακτήρια γαλακτικού οξέος με ιδιότητες προαγωγής της υγείας, τα λεγόμενα προβιοτικά στελέχη. Αυτό αντιπροσωπεύει έναν τρόπο αντικατάστασης των χημικών πρόσθετων από φυσικές ενώσεις, παρέχοντας ταυτόχρονα στον καταναλωτή νέα, ελκυστικά προϊόντα διατροφής. Οδηγεί επίσης σε ευρύτερη περιοχή εφαρμογής και μεγαλύτερη ευελιξία των καλλιεργειών εκκίνησης.

1.14.1 *Lactobacillus gasseri*

Το βακτήριο *Lactobacillus gasseri*, πήρε το όνομά του από τον Francis Gasser, Γάλλο βακτηριολόγο. Τα στελέχη *Lactobacillus gasseri* είναι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί οργανισμοί, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35-38 °C. Κατά τη ζύμωση της γλυκόζης, μαννόζης, γαλακτόζης, μαλτόζης, σακχαρόζης και φρουκτόζης παράγουν dl-γαλακτικό οξύ. Αντίθετα, δεν ζυμώνουν τη ριβόζη, τη μαννιτόλη και τη ραφινόζη (Fujisawa T et al., 1992; Lauer E and Kandler O, 1980; Lauer E and Kandler O, 1980). Το μέγεθος του γονιδιώματος του είναι 1.89 Mbp και η περιεκτικότητα σε G+C είναι 35.3% (Azcarate-Peril et al., 2008; Zheng et al., 2020).

Θεωρείται ένα από τα κυρίαρχα είδη στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Βρίσκεται επίσης σε πηγές, ούρα, αίμα, οδοντίνη (τερηδόνα) και σε πύον ασθενών που πάσχουν από σηπτικές λοιμώξεις. Το *L. gasseri* έχει επίσης απομονωθεί από το μικροβίωμα του ανθρώπινου στόματος (Smith et al., 2001; Munson et al., 2004) και έχει προταθεί ότι η στοματική κοιλότητα δρα ως 'δεξαμενή' και πηγή γαλακτοβακίλλων για την εντερική οδό (Dal Bello & Hertel, 2006; Selle & Klaenhammer, 2013).

Η δομή και η σύνθεση του μικροβιώματος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (human gastrointestinal tract, GIT) αντικατοπτρίζει τη συμβιωτική σχέση μεταξύ του ανθρώπινου μικροβιώματος του εντέρου και του ξενιστή, κατά την οποία τόσο ο ξενιστής όσο και οι μικροοργανισμοί έχουν κοινή ωφέλεια. Έχει προταθεί από έρευνες ότι συμβάλλει σε βασικές ανθρώπινες λειτουργίες, όπως η ανοσορύθμιση και η πέψη (Wall et al., 2007). Ανάλογα με τις καταναλωτικές συνήθειες και τη γεωγραφική θέση, το *L. gasseri* έχει προσδιοριστεί ότι είναι ένα από τα είδη *Lactobacillus* που βρίσκονται εγγενή στον

ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα των νεογνών (Mukai et al., 2003) και των ενηλίκων (Reuter, G. 2001).

Το GIT είναι στείρο κατά τη γέννηση, αλλά ο αποικισμός αρχίζει αμέσως και επηρεάζεται από τη διατροφή του βρέφους, το επίπεδο υγιεινής κλπ (Reuter, 2001). Ο αποικισμός του στομάχου και του λεπτού εντέρου είναι περιορισμένος λόγω της παρουσίας εκκρίσεων οξέος, χολής και παγκρέατος, με τον αριθμό των βακτηρίων να κυμαίνεται από 10^1 - 10^3 CFU/ml. Η βακτηριακή πυκνότητα αυξάνεται στο άνω λεπτό έντερο (10^4 έως 10^7 CFU/ml) για να φτάσει στο μέγιστο στο κόλον (10^{11} έως 10^{12} CFU/ml) (O'Hara & Shanahan, 2006).

Το *L. gasseri* θεωρείται ως ένας κοινός αυτόχθονος γαλακτοβάκιλλος στη νήστιδα, καθώς και στον ειλέο (Reuter, 2001). Πριν από το 1980, το *L. gasseri* ταξινομούταν συνήθως ως «*L. acidophilus*», καθώς μορφολογικά διαφέρουν ελάχιστα και δεν μπορούν να διακριθούν με τα κλασικά ταξινομικά χαρακτηριστικά, όπως τη μεταβολική τους δραστηριότητα, η παραγωγή ισομερών γαλακτικού οξέος κ.λπ. (Lauer & Kandler, 1980). Το 1980, το *L. gasseri* διαφοροποιήθηκε με πρότυπα υβριδισμού DNA/DNA από το *L. acidophilus* και πήρε το όνομά του από τον Francis Gasser, ο οποίος μελέτησε τις γαλακτικές αφυδρογονάσες (LDH) των ειδών *Lactobacillus* (Gasser & Mandel., 1968).

Η αλληλουχία του γονιδιώματος του *L. gasseri* ATCC 33323 έγινε από το Department of Energy- Joint Genome Institute σε συνεργασία με το Lactic Acid Bacteria Genomics Consortium (LABGC) (Klaenhammer et al., 2002).

NCBI Reference Sequence: NC_008530.

1.14.2 *Levilactobacillus brevis*

Το βακτήριο *Levilactobacillus brevis* είναι ετεροζυμωτικός οργανισμός, αρνητικό καταλάσης, με θερμοκρασία ανάπτυξης 4 – 30 °C (Teixeira, 2014). Είναι ανθεκτικό στα οξέα, αναπτύσσεται σε pH 4.0-7.0 και παράγει ένα μείγμα dl-γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, οξικού οξέος και CO₂. Το μέγεθος του γονιδιώματος του στελέχους είναι 2.47 Mbp και η περιεκτικότητα σε G + C είναι 46.0% (Zheng et al., 2020).

Εμφανίζονται ευρέως σε ζυμώσεις λαχανικών και δημητριακών και ως αλλοιογόνος μικροοργανισμός σε αλοολούχα ποτά. Απομονώνεται από γάλα, τυρί, ξινολάχανο (τύπου τουρσί) και γενικά σε διάφορες ζυμώσεις λαχανικών, στο προζύμι κλπ (Fraunhofer et al., 2019). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η ανάπτυξη του *L. brevis* παρουσία φρουκτόζης επάγει τη σύνθεση ενός συστήματος φωσφοτρανσφοράσης και γλυκολυτικών ενζύμων που επιτρέπουν τη φρουκτόζη να μεταβολιστεί μέσω της οδού Embden-Meyerhof. Τα στελέχη του γένους γενικά φιλοξενούν γονίδια που κωδικοποιούν την τρανσαλδολάση/τρανσκετολάση τα οποία μεσολαβούν στο μεταβολισμό των πεντόζων σε πυροσταφυλικό (Vancanneyt et al., 2006; Fraunhofer et al., 2019). Τα τελευταία χρόνια το *Levilactobacillus brevis* χρησιμοποιείται εμπορικά ως καλλιέργεια εκκίνησης σε εφαρμογές τροφίμων και ζωοτροφών.

NCBI Reference Sequence: AZCP00000000 (Zheng et al., 2020).

1.14.3 *Lactiplantibacillus plantarum*

Το βακτήριο *Lactiplantibacillus plantarum* είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικός μικροοργανισμός, ζυμώνοντας τις εξόζες με ομοζυμωτικό τρόπο ενώ τις πεντόζες με ετεροζυμωτικό. Το κύριο προϊόν ζύμωσης σακχάρων είναι το dl-γαλακτικό οξύ. Η θερμοκρασία ανάπτυξης 15 - 40 °C. Αναπτύσσεται σε pH 3.5 - 8.8. Το μέγεθος του γονιδιώματος του στελέχους είναι 3.45 Mbp και η περιεκτικότητα σε G+C είναι 44.47 % (Praet et al., 2015; Gänzle, 2019; Hutkins, 2019).

Απομονώνεται από γαλακτοκομικά προϊόντα, ξινολάχανο (τύπου τουρσί) και γενικά σε διάφορες ζυμώσεις λαχανικών, στο προζύμι κλπ (Nilchian et al., 2016; Fraunhofer et al., 2019). Επίσης απομονωθεί από το μικροβίωμα του ανθρώπινου στόματος και από την εντερική οδό. Έχει βρεθεί σε κόπρανα και λύματα ζώων (Bintis, 2018; Zheng et al., 2020).

Το στέλεχος *plantarum* είναι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο προζύμι και σε πολλά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση με βάση τα δημητριακά. Κυριαρχεί λόγω της χρήσης δεξτρινών καλαμποκιού μετά από την εξάντληση των ζυμώσιμων σακχάρων (Mathara et al., 2008; Bintis, 2018).

Πρόσφατα οι αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες έχουν ερευνηθεί (Oliveira, 2014). Οι πλανταρισίνες είναι βακτηριοσύνες μεγάλης σημαντικότητας στα τρόφιμα (κρεατικά, ψάρια και γαλακτοκομικά) λειτουργώντας ως συντηρητικά τροφίμων και παράλληλα

παρατείνουν την διάρκεια ζωής στο ράφι (Abdulhussain Kareem & Hadi Razavi, 2019). Δρουν εναντίον αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium porphyrinogens*, και *Bacillus cereus*, που ως γνωστών σε περίπτωση κατανάλωσής τους προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο (Thakur, 2017). NCBI Reference Sequence: AZEJ000000000.

1.14.4 *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Το βακτήριο *Lacticaseibacillus rhamnosus* είναι ένας προαιρετικά ομοζυμωτικός οργανισμός με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 6 - 41 °C. Το κύριο προϊόν ζύμωσης σακχάρων είναι το dl-γαλακτικό οξύ. Το μέγεθος του γονιδιώματος του τύπου στελέχους είναι 2.95 Mbp και η περιεκτικότητα σε G+C είναι 46.7% (Dal Bello & Hertel, 2006; Duar et al., 2017).

Έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα, ζυμώσεις από κρέατα, ψάρια, λαχανικά και δημητριακά (Nilchian et al., 2016; Fraunhofer et al., 2019). Επίσης έχει απομονωθεί από το μικροβίωμα του ανθρώπινου στόματος, από κολπικά και εντερικά υγρά. Έχει βρεθεί σε κόπρανα και λύματα ζώων (Bintis, 2018; Zheng et al., 2020).

Το στέλεχος *L. rhamnosus* GG (Gorbach–Goldin), ένας από τους πιο καλά τεκμηριωμένους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, που αρχικά απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων ενός υγιούς ενήλικα ανθρώπου, έχει αναγνωριστεί ως πιθανό προβιοτικό στέλεχος (Moslem et al., 2017) έχει θεωρηθεί προβιοτικό λόγω της αντοχής του στο οξύ και τη χολή καθώς και των καλών αναπτυξιακών του χαρακτηριστικών που του επιτρέπουν να επιβιώσει και να παραμείνει εντός του γαστρεντερικού σωλήνα (De Champs et al., 2003). Έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στις τεχνολογικές διεργασίες και έχει μεγάλη ικανότητα προσκόλλησης στο εντερικό επιθηλιακό στρώμα για να αναστέλλει στη συνέχεια την ανάπτυξη και την προσκόλληση πολλών παθογόνων (Forestier et al., 2001; Doron et al., 2005; Huang et al., 2009).

NCBI Reference Sequence: AZCQ000000000.

1.15 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Τα στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέος είναι επίσης γνωστά ως ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί που μπορούν να εξερευνήσουν διαφορετικές μεταβολικές δραστηριότητες. Οι μεταβολικές δραστηριότητες συνδέονται με την παραγωγή πολλών ευεργετικών ενώσεων όπως οργανικά οξέα και αντιμικροβιακές ενώσεις, μοναδικά ένζυμα που μπορούν να διασπάσουν σύνθετες οργανικές ενώσεις σε απλές λειτουργικές ενώσεις, μεταξύ άλλων (Von AW and Axelsson, 2011). Έτσι, τα ταχέως αναπτυσσόμενα χαρακτηριστικά και οι ποικίλες μεταβολικές δραστηριότητες είναι τα κλειδιά των πλεονεκτημάτων και των εφαρμογών των βακτηρίων γαλακτικού οξέος.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν μακρά ιστορία εφαρμογής σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση λόγω της ευεργετικής τους επίδρασης στη διατροφική, οργανοληπτική βελτίωση και στη διάρκεια ζωής (Wood and Holzapfel, 1995; Leroy and De Vuyst, 2004). Προκαλούν ταχεία οξίνιση της πρώτης ύλης μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων, κυρίως γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, η παραγωγή τους σε οξικό οξύ, αιθανόλη, αρωματικές ενώσεις, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες και πολλά ένζυμα είναι υψηλής διατροφικής σημασίας. Ενώ μια διαδικασία ζύμωσης τροφίμων με βακτήρια γαλακτικού οξέος βασίζεται παραδοσιακά σε αυθόρμητη ζύμωση ή οπίσθια κλίση, η βιομηχανική ζύμωση τροφίμων πραγματοποιείται με τη σκόπιμη προσθήκη βακτηρίων γαλακτικού οξέος ως καλλιέργειες εκκίνησης στη μήτρα τροφίμων.

Αυτό ήταν μια σημαντική ανακάλυψη στην επεξεργασία τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση, με αποτέλεσμα υψηλό βαθμό ελέγχου της διαδικασίας ζύμωσης και τυποποίησης των τελικών προϊόντων. Η χρήση λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης, μια νέα γενιά καλλιεργειών εκκίνησης που προσφέρει λειτουργικότητες πέρα από την οξίνιση, διερευνάται (De Vuyst, Avonts and Makras, 2004; Leroy, Verluyten and De Vuyst, 2006). Για παράδειγμα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι ικανά να αναστέλλουν διάφορους μικροοργανισμούς σε περιβάλλον τροφίμων και να επιδεικνύουν κρίσιμες αντιμικροβιακές ιδιότητες όσον αφορά τη συντήρηση και την ασφάλεια των τροφίμων.

Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέος διαθέτουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες προαγωγής της υγείας γνωστές ως προβιοτικά. Ένα από τα

χαρακτηριστικά αυτών των προβιοτικών είναι η δυνατότητα καταπολέμησης των γαστρεντερικών παθογόνων βακτηρίων όπως το *Helicobacter pylori*, το *Escherichia coli* και η *Salmonella*.

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των προβιοτικών στη θεραπεία της διάρροιας σχετιζόμενης με αντιβιοτικά (Antibiotic-associated diarrhea - AAS). Σε μια κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σε 78 παιδιά, που λάμβαναν την κλασική θεραπεία με αντιβιοτικά, μαζί με ένα συμπλήρωμα διατροφής που περιείχε 10^8 CFU (Colony Forming Units) των προβιοτικών στελεχών *B. longum* PL03, *L. rhamnosus* KL535A και *L. plantarum* PL02, ή λάμβαναν ένα εικονικό φάρμακο (placebo), παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ο συνδυασμός των τριών προβιοτικών στελεχών, εμφάνισαν μειωμένη συχνότητα των κενώσεων ανά ημέρα σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν το εικονικό φάρμακο (Szymanski et al., 2008).

Επιπλέον, στην μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Hempel et al., 2012, παρουσιάστηκαν 82 μελέτες που αποδεικνύουν την προβιοτική αποτελεσματικότητα για την θεραπεία της AAS. Οι μικροοργανισμοί που συμπεριλήφθηκαν στις παραπάνω μελέτες ανήκαν κυρίως στα είδη των *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, και *Bacillus*.

Η διάρροια που σχετίζεται με το στέλεχος *Clostridium difficile*, αποτελεί μια από τις πιο κοινές νοσοκομειακές λοιμώξεις και αποτελεί συχνή αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας μεταξύ των ηλικιωμένων που νοσηλεύονται στο νοσοκομείο. Στην μελέτη των Hickson et al., 2007, αναφέρθηκε ότι η κατανάλωση ενός προβιοτικού ποτού που περιείχε τα στελέχη *L. casei*, *L. bulgaricus* και *S. Thermophilus* μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης της διάρροιας λόγω του παθογόνου στελέχους *C. difficile*. Στη μελέτη των McFarland et al., 2008, διερευνήθηκε η δυνατότητα πρόληψης της διάρροιας που σχετίζεται με το παθογόνο στέλεχος *C. difficile* μέσω της κατανάλωσης των προβιοτικών. Η μετα-ανάλυση περιείχε πάνω από 3000 ασθενείς και διαπιστώθηκε ότι τα προβιοτικά συμβάλλουν σημαντικά στην πρόληψη διάρροιας που προκαλείται από το εν λόγω παθογόνο στέλεχος. Τα πιο αποτελεσματικά στελέχη ήταν το *S. bouardii* και το L.GG, καθώς και μίγματα στελεχών.

Το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (Irritable bowel syndrome - IBS) ορίζεται ως μια λειτουργική διαταραχή του εντέρου, που εκδηλώνεται από συμπτώματα κοιλιακού άλγους ή

δυσφορία που σχετίζεται με διαταραγμένη αφόδευση. Είναι μια κοινή διαταραχή που επηρεάζει εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Αρκετοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου συμπεριλαμβανομένων των ψυχοκοινωνικών παραγόντων, της αλλοιωμένης κινητικότητας του εντέρου, της ανισορροπίας σε νευροδιαβιβαστές και της μόλυνσης.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάγονται σε ζωικά μοντέλα και σε εντερικές βιοψίες από άνθρωπο αναδύεται ο θεραπευτικός ρόλος των προβιοτικών στελεχών. Το προβιοτικό στέλεχος *L. plantarum* 299v έχει μελετηθεί ως προς την δράση του για την θεραπεία των συμπτωμάτων του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Nobaek et al., 2000, στους ασθενείς που χορηγήθηκε σκεύασμα που περιείχε το στέλεχος *L. plantarum* 299v, το κοιλιακό άλγος μειώθηκε, ενώ στην δωδεκάμηνη παρακολούθηση που ακολούθησε, οι ασθενείς διατήρησαν μια καλύτερη συνολική λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Παρόμοια αποτελέσματα για το παραπάνω στέλεχος παρουσιάστηκαν στη μελέτη των Niedzielin et al., 2001.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ως προς την θεραπεία του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου, προκύπτει από τη μελέτη των Kajander et al., 2007, όπου διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση ενός συνδυασμού προβιοτικών στελεχών είναι πιο αποτελεσματική από ότι η χρησιμοποίηση ενός μόνο στελέχους, για τη θεραπεία του συνδρόμου.

Το προβιοτικό σκεύασμα VSL#3 έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία των συμπτωμάτων του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου. Το σκεύασμα VSL#3 περιέχει ένα μίγμα προβιοτικών στελεχών συμπεριλαμβανομένων των στελεχών που ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis*, and *B. breve*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, και *L. plantarum*) και *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Η πρώτη κλινική δοκιμή αναφέρεται στη μελέτη των Kim et al., 2003, όπου αξιολογήθηκε η επίδραση του προβιοτικού σκευάσματος VSL#3 στη γαστρεντερική διέλευση και στα συμπτώματα της διάρροιας σε ασθενείς με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου.

Είκοσι πέντε ασθενείς έλαβαν το σκεύασμα VSL#3 ή το εικονικό φάρμακο για 8 εβδομάδες. Στους ασθενείς που χορηγήθηκε το σκεύασμα VSL#3 παρατηρήθηκε μείωση στο μετεωρισμό, αλλά δεν υπήρξε καμία επίδραση στη γαστρεντερική διέλευση ή σε κάποιο

άλλο σύμπτωμα του ευερέθιστου εντέρου. Οι παραπάνω συγγραφείς επανέλαβαν λίγα χρόνια αργότερα μια δεύτερη μελέτη με το σκεύασμα VSL#3 και τις επιπτώσεις του σε 48 ασθενείς με κοιλιακό μετεωρισμό. Στους ασθενείς που έλαβαν το προβιοτικό σκεύασμα VSL#3 σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο παρατηρήθηκε μείωση του μετεωρισμού και καθυστέρηση της γαστρεντερικής διέλευσης.

Επιπλέον στη μελέτη των Kajander et al., 2007, εξετάστηκε η επίδραση των προβιοτικών συμπληρωμάτων ως προς τα κοιλιακά συμπτώματα, την ποιότητα ζωής, την εντερική μικροχλωρίδα και τους δείκτες φλεγμονής σε ασθενείς με σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου. Τα προβιοτικά συμπληρώματα περιλάμβαναν αρκετά βακτηριακά στελέχη: *L.GG*, *L. rhamnosus* LC705, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS και *B. animalis* ssp. *lactis* BB12. Μετά από 5 μήνες προβιοτικής θεραπείας η ομάδα που έλαβε το προβιοτικό σκεύασμα παρουσίασε μείωση των συμπτωμάτων του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο και ιδίως όσον αφορά τη σταθεροποίηση της μικροχλωρίδας και τη μείωση της διάτασης και του κοιλιακού άλγους.

Στη μελέτη των Ford et al., 2014, πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση για να προσδιοριστεί η συνολική αποτελεσματικότητα των προβιοτικών στελεχών στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από 35 μελέτες και αφορούσε 3452 ασθενείς. Δεκαεννέα μελέτες χρησιμοποίησαν ένα συνδυασμό προβιοτικών βακτηρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα προβιοτικά βακτήρια ήταν αποτελεσματικά για τη θεραπεία του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου και είχαν ευεργετικές επιδράσεις στο κοιλιακό άλγος, το φούσκωμα και τον μετεωρισμό. Σε μια παρόμοια μελέτη μετα-ανάλυσης των Didari et al., 2015, στην οποία συμπεριλήφθηκαν δεκαπέντε κλινικές δοκιμές και συνολικά 1793 ασθενείς, διαπιστώθηκε ότι τα προβιοτικά βακτήρια μείωσαν τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και το κοιλιακό άλγος.

Ανάμεσα στις ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών βακτηρίων αρκετές μελέτες έχουν παρουσιάσει τον ρόλο των προβιοτικών στελεχών στην προστασία κατά του οξειδωτικού στρες και τη δυνατότητα να μειώσουν τον κίνδυνο της συσσώρευσης των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Martarelli et al., 2011, προσδιορίστηκε in vitro η αντιοξειδωτική δράση δύο προβιοτικών στελεχών, *L. rhamnosus* IMC 501 και *L. paracasei* IMC 502, σε αθλητές κατά τη διάρκεια μιας περιόδου τεσσάρων εβδομάδων έντονης σωματικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα

κατέδειξαν ότι η έντονη σωματική δραστηριότητα οδήγησε σε οξειδωτικό στρες και ότι η χορήγηση των προβιοτικών στελεχών αύξησε τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα, εξουδετερώνοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Σε άλλη μελέτη, δείχτηκε ότι τα προβιοτικά στελέχη *L. fermentum* E-3 και E-18 παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση με την έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου και παρουσίασαν επίσης αυξημένη αντίσταση σε διάφορες μορφές ROS, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τις ρίζες υδροξυλίου (Kullisar et al., 2002).

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει ότι επιλεγμένα στελέχη λακτοβακίλλων καθώς και bifidobacteria παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα στη μελέτη των Wang et al., 2006 εξετάστηκαν οι αντιοξειδωτικές δράσεις στο γάλα σόγιας που είχε υποστεί ζύμωση με βακτήρια γαλακτικού οξέος (*L. acidophilus* CCRC 14079 ή *S. thermophilus* CCRC 14085) καθώς και με bifidobacteria (*B. infantis* CCRC 14633 ή *B. longum* B6). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ζυμωμένου γάλακτος σόγιας ήταν σημαντικά υψηλή. Παρόμοια, στη μελέτη των Zanoni et al., 2008 εξετάστηκαν οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες, η παραγωγή γλουταθειόνης και η ανοχή στα οξέα και στα χολικά άλατα των προβιοτικών στελεχών *L. plantarum* LP1, *S. thermophilus* Z 57 και *B. lactis* B 933. Τα προβιοτικά στελέχη επέδειξαν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και βιωσιμότητα στο γαστρικό υγρό και στα χολικά άλατα. Σε μια μελέτη ανασκόπησης παρουσιάστηκε η ενίσχυση των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων σε φυσιολογικά κύτταρα του βλεννογόνου που εκτίθενται σε ιοντίζουσα ακτινοβολία ως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των προβιοτικών βακτηρίων. Ειδικότερα, παρουσιάστηκαν πειραματικές μελέτες και κλινικές δοκιμές που υποδεικνύουν το πιθανό αντιοξειδωτικό όφελος των προβιοτικών μικροοργανισμών στην προκαλούμενη από ακτινοβολία εντερίτιδα και κολίτιδα (Spyropoulos et al., 2011).

Οι μεταβολικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των προβιοτικών βακτηρίων, μπορεί να οφείλονται επίσης στην εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου και την μείωση της δραστηριότητας ή την αναστολή της αυτο-οξείδωσης του ασκορβικού στο έντερο μέσω εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Balwin et al., 2010). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν συνδεθεί με την παθογένεση διάφορων γαστρεντερικών παθήσεων καθώς και τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Zhong et al., 2014). Αρκετές in vitro μελέτες κατέδειξαν ότι διάφορα προβιοτικά στελέχη παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αδρανοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου μέσω ενζυματικών μηχανισμών όπως το συζευγμένο σύστημα

οξειδάσης/υπεροξειδάσης NADH και της καταλάσης (Amanatidou et al., 2001; Bruno-Bárcena et al., 2004; Kullisaar et al., 2003; Lee et al., 2005). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη καταδείχτηκε η πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης του DNA σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HT29, μέσω των προβιοτικών στελεχών (Koller et al., 2008). Συνολικά, εξετάστηκαν 55 βακτήρια γαλακτικού οξέος και τα ισχυρότερα αποτελέσματα (μέχρι και 60% μείωση στις βλάβες του DNA) παρατηρήθηκαν από τα είδη *L. plantarum* και *S. thermophilus*.

Ο στόχος αυτής της μελέτης των Azizi et al., (2017) ήταν η ταυτοποίηση των δεκαεννέα διαφορετικών ειδών *Lactobacillus spp.* (*L. brevis* M1-M13, *L. buchneri* M14, *L. casei* M15, *L. plantarum* M16-M19) που απομονώθηκαν από το ιρανικό τυρί 'Motal' και η ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων βακτηριοκίνης στα απομονωμένα στελέχη *Lactobacillus* που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Για το σκοπό αυτό, 6 δείγματα τυριού Motal από την περιοχή Dasht-e-Moghan στο Ιράν, υποβλήθηκαν σε μικροβιακό χαρακτηρισμό. Δεκαεννέα *Lactobacillus spp.* απομονώθηκαν και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους. Σύμφωνα με την αλληλουχία των απομονώσεων, *Lactobacillus spp.* αποτελούνταν κυρίως από *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus buchneri*. Τα αναγνωρισθέντα στελέχη στη συνέχεια αξιολογήθηκαν για αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Escherichia coli* ATCC 25922, της *Listeria innocua* ATCC 33090 και του *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν βακτηριοσίνες, έδειξαν ότι μόνο τα *L. plantarum* M16-M19 περιείχαν τα γονίδια PlnA και PlnEF. Ωστόσο, κανένα θραύσμα DNA δεν ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τον ειδικό εκκινητή Pediocin PA-1. Επίσης, το γονίδιο Bre174A ταυτοποιήθηκε στα *L. brevis* M1, *L. brevis* M7, *L. brevis* M8, *L. brevis* M10 και *L. brevis* M12. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία του γονιδίου plnEF στο στέλεχος *Lactobacillus plantarum*, το οποίο αντιστοιχεί και στα αποτελέσματα των Chaalel et al. (2015). Ως εκ τούτου, συνάγεται το συμπέρασμα ότι τα βακτηριοκινογόνα προϊόντα απομόνωσης θα μπορούσαν να προταθούν ως κατάλληλα υποψήφια για χρήση ως εναρκτήρια, συμπληρωματικά εκκινητές ή αντιμικροβιακά μέσα για την παραγωγή ζυμωμένων και μη ζυμωμένων προϊόντων.

Η μελέτη των Kim et al., 2022 ερευνήσε την αντιοξειδωτική δράση και τις προβιοτικές ιδιότητες από 15 LAB που απομονώθηκαν από τρόφιμα, στο να αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό στρες και να παρέχουν οφέλη για την υγεία. Αρχικά, η μελέτη εξετάζει την

αντιοξειδωτική δράση των βακτηρίων με μεθόδους όπως η αποκατάσταση των ριζών DPPH και ABTS. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ορισμένα στελέχη έχουν υψηλή ικανότητα αποκατάστασης ριζών, υποδεικνύοντας ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) μειώνεται σημαντικά με την παρουσία ορισμένων στελεχών, υποδεικνύοντας την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη φλεγμονή. Τέλος, τα στελέχη που επιλέχθηκαν με ισχυρή αντιοξειδωτική και προβιοτική δράση ήταν *Leuconostoc mesenteroides* MG860, *Leu. citreum* MG210, *Pediococcus acidilactici* MG5001, *P. pentosaceus* MG5078, *Weissella cibaria* MG5090, *Levilactobacillus brevis* MG5306, *Latilactobacillus curvatus* MG5020 και *Latilactobacillus sakei* MG5048.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε η σταθερότητα και η ικανότητα προσκόλλησης των οκτώ στελεχών LAB στο γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτά τα στελέχη δείχνουν δυναμικό ως νέα προβιοτικά με ισχυρές αντιοξειδωτικές επιδράσεις, που μπορούν να συμβάλουν στην προστασία της υγείας.

Η μελέτη των Fang et al., 2014 αξιολογεί τις προβιοτικές ιδιότητες από 27 στελέχη *Lactobacillus* που απομονώθηκαν από παραδοσιακό κινέζικο τυρί (Xinjiang, Κίνα). Οι ερευνητές εξετάσαν την ικανότητά τους να παρέχουν οφέλη για την υγεία μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αρχικά, έγινε αξιολόγηση της αντοχής των στελεχών *Lactobacillus* στο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα και στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν παθογόνους οργανισμούς, όπως *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecium* CICC 22264, *Enterococcus faecalis* CICC 23215, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Flavobacterium odoratum* CICC 23245 και *Pseudomonas fluorescens* CICC 23250. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητά παραγωγής θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη B12, καθώς και ενζύμα που βοηθούν στην υδρόλυση των τροφίμων. Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι μόνο τέσσερις στελέχη *Lactobacillus* (BJFU 10256, BJFU 10041, BJFU 10205 και BJFU 10025) που προέρχονται από το παραδοσιακό κινέζικο τυρί διαθέτουν ισχυρές προβιοτικές ιδιότητες και μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου και θεωρούνται ασφαλή για την χρήση τους στα τρόφιμα (δεν περιέχουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση των τεχνολογικών χαρακτηριστικών τους, όπως η ανάπτυξη και η επιβίωση στα τρόφιμα.

Το Kimchi είναι μία από τις κύριες πηγές υψηλής περιεκτικότητας σε νάτριο στην κορεατική διατροφή. Το kimchi χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο κατασκευάζεται στο εμπόριο για να

ελαχιστοποιήσει τις επιπτώσεις στην υγεία από το υψηλό ποσοστό σε αλάτι που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία. Η Choi et al., 2021 ερευνήσαν την επίδραση των LAB ως καλλιέργεια εκκίνησης σε συνδυασμό με 1% ή 2.5% χλωριούχο νάτριο στην επιβίωση του εντεροπαθογόνου *E. coli* EPEC (ATCC 11229; NCCP 13715), του εντεροτοξιγόνου *E. coli* ETEC (NCCP 13717, 13718) και του *E. coli* O157:H7 (NCTC 12079 fereTocces, γνωστές για την παραγωγή οξινών από τον άνθρωπο VT2) και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του kimchi κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στους 10 °C και 25 °C. Μεταξύ δέκα στελεχών LAB που απομονώθηκαν από kimchi, τα στελέχη *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 13374) και *Lactobacillus plantarum* (KCTC 33133) εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση κατά του *E. coli* (EPEC, ETEC, και *E. coli* O157:H7) και ισχυρής ανοχής σε 0.3% χολικών αλάτων.

Έτσι, τα *L. mesenteroides* και *L. plantarum* χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης για kimchi που περιείχαν 1% και 2.5% αλάτι. Όλα τα παθογόνα στελέχη *E. coli* επέζησαν στο kimchi ανεξάρτητα από τις καλλιέργειες εκκίνησης ή τη συγκέντρωση αλάτος για περισσότερες από 15 ημέρες στους 10 °C, ενώ μέσα σε 4 ημέρες στους 25 °C πέθαναν. Η επιβίωση του *E. coli* ήταν μεγαλύτερη στα φυσικά ζυμωμένα kimchi (οξύτητα: 0,65%) από το kimchi που ζυμώθηκε με καλλιέργειες εκκίνησης (οξύτητα: 1.0%). Στους 10 °C, η μέση τιμή d του *E. coli* O157:H7 (16.15 d) ήταν μικρότερη από εκείνη των EPEC (20.76 d) και ETEC (20.20 d) σε φυσικά ζυμωμένα kimchi. Συνολικά, η ικανότητα επιβίωσης του *E. coli* O157:H7 ήταν χαμηλότερη από το EPEC και το ETEC, αν και οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές. Η μειωμένη συγκέντρωση αλατιού από 2.5% σε 1% στο kimchi δεν επηρέασε την ανάπτυξη του LAB και την περίοδο ζύμωσης. Το *E. coli* πέθανε με ταχύτερο ρυθμό σε kimchi που είχε υποστεί ζύμωση με καλλιέργειες εκκίνησης και 1% αλάτι από ότι σε φυσικά ζυμωμένο kimchi με 2.5% αλάτι. Αυτή η μελέτη αναδεικνύει τη σημασία της χρήσης προβιοτικών στελεχών και του χλωριούχου νατρίου στον έλεγχο των παθογόνων στελεχών *E. coli* στην παραγωγή και τη διατήρηση του kimchi.

Οι Millette M., Luquet F.M and Lacroix M (2006) διερεύνησαν την αντιμικροβιακή δράση της ζύμωσης του γάλακτος υπό ελεγχόμενες συνθήκες pH, με την προσθήκη μείγματος καλλιεργειών *L. acidophilus* και *L. casei* ενάντια σε διάφορα παθογόνα που αναπτύσσονται στο γάλα συμπεριλαμβανομένων των *Salmonella sero-type Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis* αξιολογήθηκε για 48 ώρες στους 37°C σε ελεγχόμενες συνθήκες in vitro. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση την ανάπτυξη των παθογόνων με το στέλεχος

Staphylococcus aureus να ήταν το πιο ευαίσθητο στέλεχος με αύξηση του χρόνου παραγωγής κατά 210%. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το βακτήριο *L. innocua* ήταν το πιο ευαίσθητο βακτήριο στην οξίνιση του μέσου καλλιέργειας (BHI) σε pH 4.5, εμφανίζοντας αναστολή ανάπτυξης 41.2%. *Enterococcus faecium*, *Ent. faecalis* και *Staph. aureus* ήταν τα πιο ανθεκτικά βακτήρια στην οξύτητα με ποσοστά αναστολής 6.4%, 23.9% και 17.2% αντίστοιχα. Η *Listeria monocytogenes* και το *E. coli* εμφάνισαν αναστολή ανάπτυξης 25.8% και 27.8%, αντίστοιχα. Στον ορό γαλακτος που λαμβάνεται από το μείγμα των *Lact. acidophilus* και *Lact. casei* που έχει υποστεί ζύμωση με pH 4.5, η αναστολή ανάπτυξης των παθογόνων που αξιολογήθηκαν παρουσία όξινων μεταβολιτών κυμαινόταν από 73.5% για το *Ent. faecium* έως 85.9% για το *L. innocua* μετά από 12 ώρες επώασης στους 35°C.

Η βακτηριακή ευαισθησία, με φθίνουσα σειρά είναι: *L. innocua* (86%) > *Staph. aureus* (85%) > *L.monocytogenes* (78%) > *E. coli* O157:H7 (77%) > *Ent. faecalis* (75%) > *Ent. faecium* (74%).

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν τη δυνατότητα του ζυμωμένου γάλακτος με *L. acidophilus* και *L. casei* να λειτουργήσει ως φυσικός μηχανισμός ελέγχου της ανάπτυξης παθογόνων στελεχών στη διατροφή. Αυτή η εργασία προσφέρει περαιτέρω ενδείξεις για τη χρήση προβιοτικών για την υποστήριξη της υγείας και τη μείωση του κινδύνου μετάδοσης ασθενειών μέσω των τροφίμων.

1.16 ΣΚΟΠΟΣ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Από την ανασκόπηση της σύγχρονης βιβλιογραφίας προκύπτει πως, παρά την ύπαρξη πολλών μεμονωμένων *in vitro* και *in vivo* μελετών στον τομέα των προβιοτικών προϊόντων, υπάρχει έλλειψη ολοκληρωμένων και συστηματικών μελετών που να συνδυάζουν τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* πειραματικά δεδομένα. Παράλληλα, οι μελέτες που αφορούν την αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση διάφορων μεταβολιτών, έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης. Από τη μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας και των πρόσφατων ερευνητικών δεδομένων έχουν εντοπιστεί ορισμένα κενά που αφορούν το εξεταζόμενο θέμα. Τα κενά αυτά και οι ανησυχίες που προκύπτουν συνιστούν ευκαιρίες προς διερεύνηση, που θα καταστήσουν την έρευνα πρωτότυπη, θα ενισχύσουν την παραγωγή νέας γνώσης, και θα καθορίσουν τη συμβολή της στο υπό διερεύνηση θέμα.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός αυτό, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο συνδυασμός *in vitro* πειραμάτων για την επιλογή οξυγαλακτικών βακτηρίων με βάση το προβιοτικό, αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό δυναμικό τους με *in vivo* πειράματα που εξετάζουν την επίδραση της χορήγησης επιλεγμένων στελεχών σε συγκεκριμένα μοντέλα ζύμωσης τροφίμων.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η απομόνωση και η ταυτοποίηση καθαρών καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων μέσω *in vitro* δοκιμών. Πιο συγκεκριμένα ερευνηθηκε η αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις. Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά.

Παράλληλα ερευνηθηκε η συνεργική τους δράση μέσω μίξης των LAB με διαφορετικά είδη μικροοργανισμών που υπάρχουν στη φυσιολογική χλωρίδα μέσα σε μοντέλο ζύμωσης μαύρων ελίων, για την ανίχνευση μορίων σημάτων (μεταβολιτών) οι οποίοι παρήχθησαν από τα διάφορα στελέχη.

Η μέθοδος που αναπτυχθείκε ήταν η HPLC-UV/DAD, η οποία με την υψηλή ευαισθησία και την εκλεκτικότητα που έχει, επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών. Έγινε προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας που βρέθηκε στην ελιά, στο

τελικό στάδιο της ζύμωσης (150 ημέρες) με τη μέθοδο αλληλούχισης της επόμενης γενιάς (NGS). Εγινε αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των διάφορων ζυμώσεων. Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή έχει βοηθήσει στην ενίσχυση της βιβλιογραφίας για ζητήματα που αφορούν τα είδη μεταβολιτών που παράγονται από ταυτοποιημένα στελέχη LAB, έχει ταυτοποιήσει φυσικούς αντιμικροβιακούς – αντιμυκητιακούς μεταβολίτες, σύγκρινε τα αποτελέσματα της με τις μελέτες που υπήρχαν έως τώρα και ελέγξε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πρότυπα βακτηριακά στελέχη

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων:

- ⇒ *Levilactobacillus brevis* ATCC8287
- ⇒ *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917
- ⇒ *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103
- ⇒ *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323

Τα προαναφερθείσα LAB αναπτύχθηκαν σε ζωμό MRS (De Man Rogosa Sharp) και επώαστηκαν στους 37 °C για 48 hours κάτω από αναερόβιες. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν στους -80 °C σε ζωμό MRS που περιέχει 20% (v/v) γλυκερόλη.

2.2 Στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών

Τα παθογόνα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών των προαναφερόμενων οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα εξής: *Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 και *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

2.3 Πρότυπες αντιμικροβιακές-αντιμικροβιακές ενώσεις

2.3.1 Προετοιμασία προτύπων

Όλες οι πρότυπες ενώσεις (Πίνακας 2) παρασκευάστηκαν με γνωστή συγκέντρωση (100ppm) σε 90/10 (H₂O/ Methanol). Τα πρότυπα της καμπύλης βαθμονόμησης (#1-5) παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm και 20 ppm και φυλάχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια (1.5mL) που συμπληρωθήκαν με 90/10 (H₂O / Methanol). Η επιλογή των προτύπων έγινε μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση (Hawaz, 2014; Jabbari et al., 2017; Ström et al., 2002; Valerio et al., 2004; Brosnan et al., 2012; Brosnan et al., 2014).

Πίνακας 2 Ονομαστική περιγραφή των 14 πρότυπων ενώσεων, περιγραφή μοριακού τύπου και μάζας της κάθε ένωσης.

Πρότυπες ενώσεις	Μοριακή Μάζα	Μοριακός Τύπος
(A) 4-Hydroxybenzoic acid,	138.12	C ₇ H ₆ O ₃
(B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid	182.17	C ₉ H ₁₀ O ₄
(C) Phenyllactic acid	166.17	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
(D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	166.17	C ₉ H ₁₀ O ₃
(E) Hydrocinnamic acid	150.17	C ₉ H ₁₀ O ₂
(F) Methylcinnamic acid	162.18	C ₁₀ H ₁₀ O ₂
(G) Salicylic acid	138.121	C ₇ H ₆ O ₃
(H) 1,2-Dihydroxybenzene	110.1	C ₆ H ₆ O ₂
(I) 3,4-Dihydrocinnamic acid	180.16	C ₉ H ₈ O ₄
(J) Vanillic acid	168.14	C ₈ H ₈ O ₄
(K) 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	180.16	C ₉ H ₁₀ O ₄
(L) Ferulic acid	194	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
(M) Benzoic acid	122.12	C ₇ H ₆ O ₂
(O) 4- Hydrocinnamic acid	164.04	C ₉ H ₈ O ₃

2.4 Διαδικασίες εκχύλισης

Τα στελέχη LAB αναπτύχθηκαν σε ζωμό MRS στους 37°C για 48 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες. Ο ζωμός στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 g για 7 λεπτά και το υπερκείμενο διηθήθηκε (μέγεθος πόρων φίλτρου 0,22 μm) για να παρασκευαστούν υπερκείμενα χωρίς κύτταρα (cell-free supernatant- CFSs). Ένα μη εμβολιασμένος ζωμός MRS (χωρίς προσθήκη βακτηρίων) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

2.4.1 Υγρή εκχύλιση (Liquid liquid extraction - LLE)

Δέκα mL CFSs προστέθηκαν σε 10 mL ethyl acetate, 1 g NaCl και 4 g Na₂SO₄ σε κωνικούς σωλήνες των 50 mL και φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν 5 mL της οργανικής φάσης προσθέτοντας 100 μl διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator). Στη συνέχεια ακολουθεί ανασύσταση της ξηράς φάσης σε 90/10 (H₂O / Methanol). Τα δείγματα διηθήθηκαν (φίλτρο 0,22 μm) και κατανεμήθηκαν σε δύο διαφορετικά φιαλίδια. Τα 14 πρότυπα γνωστής συγκέντρωσης προστέθηκαν στο πρώτο κλάσμα ως εσωτερικοί έλεγχοι προκειμένου να προσδιοριστεί ακριβώς ο χρόνος κατακράτησης και το μήκος κύματος κάθε κορυφής. Και τα δύο δείγματα (με και χωρίς τους εσωτερικούς μάρτυρες, αντίστοιχα) αναλύθηκαν με HPLC-UV/DAD. Οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού περιγράφονται παρακάτω. Ένας κενός ζωμός MRS ετοιμάστηκε με τις ίδιες συνθήκες ως αρνητικός μάρτυρας (Ström et al., 2002; Valerio et al., 2004; Brosnan et al., 2012; Brosnan et al., 2014).

2.4.2 Χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV/DAD)

Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με ένα σύστημα σε σύστημα HPLC με ανιχνευτή διάταξης διόδων (L-2455) (Hitachi LaChrom Elite). Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε σε στήλη SVEA C18 Gold (150x4,6 mm 5μm, Σουηδία). Η στήλη διατηρήθηκε στους 30°C. Ο όγκος της ένεσης ήταν 20μl με λ_{max}=255 nm και 280 nm. Η έκλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή ροή με νερό που περιείχε 0,1% μυρμηκικό οξύ

(διαλύτης A) και μεθανόλη που περιέχει 0,1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης B). Οι συνθήκες ήταν οι εξής: 0 λεπτά - 10% (B), 10 λεπτά - 30% (B), 20 λεπτά - 40% (B), 25 λεπτά - 40% (B), 40 λεπτά - 100% (B), 45 min – 100% (B), 50 min – 90% (B), 55 min – 10% (B). Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν στα 60 λεπτά και η ταχύτητα ροής ήταν 0.500 mL/min⁻¹. Το μήκος κύματος για την παρακολούθηση των μετρήσεων ορίστηκε στα 255 και 280nm, ενώ η ποσοτικοποίηση των κορυφών έγινε στο μήκος κύματος όπου εμφανιζόταν η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας. Ο χρόνος συγκράτησης κάθε ένωσης και τα μήκη κύματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. (Brosnan et al., 2012).

2.4.3 Ακρίβεια τυπικών καμπυλών βαθμονόμησης

Οι καμπύλες γραμμικής βαθμονόμησης προσδιορίστηκαν με τη δημιουργία μιας τυπικής καμπύλης, στην οποία αναλύθηκαν σειριακές διπλάσιες αραιώσεις προτύπων. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε σχεδιάζοντας την απορρόφηση κάθε αραιώσης έναντι των γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων. Η κλίση που προέκυψε έδειξε μια γραμμική σχέση πάνω από 5 τάξεις μεγέθους, που κυμαίνεται από 1.25 έως 20 mg/mL με συντελεστή συσχέτισης $R^2 > 0.99$. Ο ρυθμός ανίχνευσης ήταν 100 % για έως και 1 mg/mL.

2.5 Δοκιμασία ‘φυσικής’ αντιμικροβιακής δράσης

Τέσσερα ταυτοποιημένα στελέχη ATCC από εργαστηριακές μητρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των CFCs, όπως *Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.) Mueller-Hinton Agar (MHA) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης.

Η αντιμικροβιακή δράση του διηθήματος CFC προσδιορίστηκε έναντι των οργανισμών του παθογόνου. Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) μετρήθηκαν με την ευαισθησία του ζωμού μικροαραίωσης (microdilution broth susceptibility) (Ming et al.,2016). Εκατό μικρολίτρα μικροβιακής καλλιέργειας ενός κατά προσέγγιση μεγέθους εμβολίων $1,0 \times 10^8$ CFU/mL προστέθηκαν σε όλα τα φρεάτια. Πενήντα μL των CFC φορτώθηκαν στην πλάκα μικροτιτλοδότησης, που περιείχε καθένα από τα ελεγμένα μικροβιακά στελέχη. Η πλάκα στη συνέχεια επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Η τελευταία σειρά, που περιείχε μόνο τις σειριακές αραιώσεις του δείγματος χωρίς μικροοργανισμούς, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας και αποστειρωμένο/ απεσταγμένο νερό ως θετικός έλεγχος.

Οι τιμές MIC προσδιορίστηκαν ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του δείγματος δοκιμής που αναστέλλει πλήρως τη μικροβιακή ανάπτυξη. Ως εκ τούτου, προσδιορίστηκε η χαμηλότερη αποτελεσματική δόση κάθε επιλεγμένου υπερκειμένου, το οποίο ακόμη ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη των παθογόνων στόχων, και αυτή η δόση χρησιμοποιήθηκε σε ένα επόμενο πείραμα χρονικής πορείας για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (Ming et al.,2016).

2.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *IN VITRO* των LAB

2.6.1 Ικανότητα σάρωσης ριζών ελεύθερων ριζών α, α-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl (DDPH)

Το DDPH[•] είναι μια ελεύθερη ρίζα με μωβ χρώμα (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) η οποία ανάγεται σε 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (ωχροκίτρινο) αντιδρώντας με ένα αντιοξειδωτικό. Ο μηχανισμός της μεθόδου στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και ατόμων υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό στη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH[•] (Lobo et al., 2010; Lin et al., 2018; Vougiouklaki et al, 2022). Η στερεή μορφή του DDPH[•] διαλύθηκε σε μεθανόλη και παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 6×10^{-5} M. Σε πλαστικές κυψελίδες, για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε 1.0 mL των CFSs από το κάθε στέλεχος και προστέθηκε σε 2.5 mL διαλύματος ρίζας DPPH (A_{sample}). Το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στο σκοτάδι για 30 λεπτά μετά από ανάμιξη. Η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 517 nm εις τριπλούν, και μετρήθηκε επίσης η ελεύθερη ρίζα DDPH χωρίς την προσθήκη των CFSs (A_{control}). Η συνολική αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε σε $\mu\text{g/mL}$ γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να προκαλέσει 50% μείωση στην απορρόφηση DDPH (IC50). Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα κάθε φορά. Για τον υπολογισμό της ικανότητας σάρωσης ριζών (RSA), χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Ικανότητα σάρωσης ριζών (RSA) (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

όπου A_{sample} = απορρόφηση δείγματος; A_{control} = απορρόφηση ελέγχου.

2.6.2 Αναστολή της κοπής DNA που προκαλείται από τη ρίζα υπεροξυλίου

Η αποτελεσματικότητα των CFSs των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά της κοπής DNA προσδιορίστηκε σύμφωνα με την τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Brown et al. (2019). Οι θραυσματοποίηση του DNA προκλήθηκε με 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) και εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε ένα μείγμα βάσης Tris, οξικού οξέος και EDTA (ρυθμιστικό διάλυμα TAE, pH 8.5) σε συγκέντρωση 25 µg/mL χρησιμοποιήθηκε για την εναιώρηση του DNA. Ένας όγκος 4 µL υπερτυλιγμένου (supercoiled) DNA pBR322, 4 µL AAPH συγκέντρωσης 30 mM και 2 µL δείγματος αραιωμένου σε PBS συγκέντρωσης 10 mM (αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικά) αναμίχθηκαν και επώαστηκαν στους 37 °C για 30 λεπτά και ένα τυφλό (χωρίς δείγμα) και control (χωρίς AAPH ή δείγμα). Σε κάθε μείγμα προστέθηκε 1 µL χρωστικής φόρτωσης (gel loading dye purple (6×), no SDS, (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)) πριν τα δείγματα φορτωθούν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8 % με 15 µL βρωμιούχο αιθίδιο. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα 100 V για περίπου 70 λεπτά και οι ζώνες έγιναν ορατές στο υπεριώδες φως (UV light). Η ένταση των ζωνών DNA μετρήθηκε με τη χρήση της συσκευής MiniBIS Pro με υπεριώδη ακτινοβολία (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Modi'in-Maccabim-Re'ut, Ισραήλ). Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως το ποσοστό του DNA που παρέμεινε άθικτο στο διατηρημένο DNA που κανονικοποιήθηκε έναντι του ελέγχου (Brown et al., 2019).

% αναστολή της κοπής του DNA =

Ένταση του υπερτυλιγμένοDNA με την οξειδωτική ρίζα και το δείγμα

Ένταση του υπερτυλιγμένο DNA στον έλεγχο

2.7 Αξιολόγηση Προβιοτικού Δυναμικού

2.7.1 Ανοχή σε οξέα

Ένας όγκος 10 mL PBS (pH 2.5) αναμίχθηκε με το κάθε LAB (10^8 CFU/mL) και επώαστηκαν στους 37 °C για 1, 2 και 3 ώρες. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι βιώσιμες μετρήσεις του κάθε οξυγαλακτικού βακτηρίου σε τρυβλία πετρί με MRS agar. Η βιομάζα (CFU/mL) κάθε καλλιέργειας έγινε εις τριπλούν και απαριθμήθηκε σε MRS άγαρ που επώαστηκε αναερόβια στους 37 °C για 3 ημέρες (Fang et al., 2015). Ο παρακάτω τύπος χρησιμοποιήθηκε για να ληφθεί το ποσοστό επιβίωσης (%).

Ποσοστό επιβίωσης (%) = Βιομάζα μετά από τον εμβολτισμό στο οξύ (C1) / Βιομάζα στον αρχικό χρόνο (C0) × 100

2.7.2 Αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις

Τα προσομοιωμένα γαστρικά και εντερικά υγρά παρασκευάστηκαν σύμφωνα με δημοσιευμένες έρευνες (Fang et al., 2015; Kim et al., 2022). Συνολικά, 1 g πεψίνη (πεψίνη, από γαστρικό βλεννογόνο χοίρου, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ΗΠΑ), 1.5 g γαστρική βλεννίνη (βλεννίνη από στομάχι χοίρου Τύπου II, Sigma- Aldrich), 8.7 g NaCl και 5 g χολικά άλατα (χολικό εκχύλισμα χοίρου, Sigma-Aldrich) διαλύθηκαν σε 1 L νερού. Μετά από 3 ώρες σε PBS (pH 2.5), 1 mL του εναιωρήματος εμβολιάστηκε σε 9 mL προσομοιωμένου εντερικού υγρού (pH 8.0 και επώαστηκε στους 37 °C). Η βιωσιμότητα (log cfu/mL) των LAB δοκιμάστηκε μετά από 3, 6, 9 και 12 ώρες επώασης σε pH 8 (HCl 2M) με την παρουσία 0.5% (w/v) χολικών αλάτων που προέρχονται από αποξηραμένη χολή χοίρου. Τα δείγματα επώαστηκαν αναερόβια στους 37 °C και καλλιεργήθηκαν για απαρίθμηση.

2.7.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Για καθεμία από τις ακόλουθες ουσίες: αμπικιλίνη, γενταμικίνη, καναμικίνη, στρεπτομικίνη, ερυθρομικίνη, κλινδαμικίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη, προσδιορίστηκε η MIC των αντιμικροβιακών ουσιών που εκφράζεται σε $\mu\text{g/mL}$ με την μέθοδο ETEST Gradient strip (Etest, bioMérieux, Craponne, Γαλλία) (Comunian et al., 2010).

Τα αντιβιοτικά ήταν σε μορφή λεπτής ταινίας, χωρίς πόρους. Σε κάθε ταινία αναγράφεται βαθμονομημένη κλίμακα διαδοχικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού που αντιστοιχεί στην MIC (μg/mL), δηλαδή στη μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού και καλείται ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Επειδή οι τιμές της MIC από το E-test ορίζονται από μια προκαθορισμένη και συνεχή σταθερά συγκέντρωσης του αντιβιοτικού, είναι πολύ πιο ακριβής από τη συμβατική MIC η οποία στηρίζεται σε δυο σειρές διαδοχικών αραιώσεων.

Αρχικά, τα στελέχη LAB αναπτύχθηκαν σε ζωμό MRS στους 37°C για 24 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες ώστε να επιτευχθεί η πυκνότητα 10^8 CFU/mL. Στη συνέχεια, 100 μl του προς μελέτη μικροοργανισμού καλλιεργήθηκαν σε στερεό μέσο MRS στους 37 °C για 24 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης τσιμπίδας τοποθετείται σε κάθε τρυβλίο για κάθε οξυγαλακτικό βακτήριο ένα είδος αντιβιοτικού. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C μέχρι την επόμενη μέρα. Αυτά τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του καθενός προς μελέτη μικροοργανισμού έναντι του αντιβιοτικού.

2.8 Εκχύλιση γονιδιωματικού DNA

Τα LAB καλλιεργήθηκαν αναερόβια για 48 ώρες σε ζωμό MRS στους 37 °C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις $14.000 \times g$ για 15 λεπτά. Ακολουθώντας τη συνιστώμενη διαδικασία του προμηθευτή, το DNA εξήχθη χρησιμοποιώντας ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα εκχύλισης (ZYBIO Corporation, Chongqing, Κίνα). Το εκχυλισμένο DNA που συλλέχθηκε, ελέγχθηκε ως προς τη συγκέντρωση και την καθαρότητά του χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο Epoch από την Biotek Winooski, Winooski, VT, ΗΠΑ, υπολογίζοντας την αναλογία OD260/OD280 (Vougiouklaki et al., 2022).

2.9 Ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή βακτηριοσίνης

Για την ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή τεσσάρων βακτηριοσινών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με τους Azizi et al., (2017) μετά από ορισμένες τροποποιήσεις στη μεθοδολογία. Η ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας θερμικό κυκλοποιητή Veriti Dx Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Αυστρία.

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες για την ενίσχυση των γονιδίων *rlnA*, *rlnEF* και *pediocin PA-1*: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια για 30 κύκλους στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα αποδιάταξης, υβριδοποίηση για 1 λεπτό στις διάφορες θερμοκρασίες που αναφέρονται στον Πίνακα 3, επιμήκυνση για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά. Η PCR για την ταυτοποίηση του γονιδίου *Brevicin 174A* διεξήχθη ως εξής: αρχική αποδιάταξη στους 96 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια για 29 κύκλους στους 96 °C για 1 λεπτό, υβριδοποίηση για 15 δευτερόλεπτα στους 58°C και τελικές επιμηκύνσεις στους 72 °C για 7 λεπτά.

Ο Πίνακας 3 παραθέτει τους συγκεκριμένους εκκινητές που εφαρμόστηκαν σε αυτήν την έρευνα. Τα προϊόντα PCR εξετάστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2.0% (w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 g/mL) από τη Sigma, Kanagawa, Ιαπωνία. Ως σημείο αναφοράς για το μοριακό βάρος, χρησιμοποιήθηκε ladder 100 bp (Invitrogen, Paisley, UK). Η συσκευή MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Neve Yamin, Ισραήλ) χρησιμοποιήθηκε για την τεκμηρίωση πηκτωμάτων υπό υπεριώδη ακτινοβολία μετά τη λειτουργία τους για περίπου 1 ώρα στα 120 V (Azizi et al., 2017).

Πίνακας 3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή βακτηριοσίνης.

	Sequence (5' → 3')	Size amplico n	Annealing temperature	References
Brevicin 174A-F	GTCTTAAATGCTAGGCTTGTCA	766	58	Azizi et al., (2017)
Brevicin 174A-R	CTGGCAAGACAAACGGTTAG			
PlnA-F	TAGAAATAATTCCTCCGTTACTTC	573	57	
PlnA-R	ATTAGCGATGTAGTGTTCATCCA			
pInEF-F	TATGAATTGAAAGGGTCCGT	616	56	
pInEF-R	GTTCCAAATAACATCATAACAAGG			
Pediocin PA-1-F	AAAGATACTGCGTTGATAGG	1220	50	
Pediocin PA-1-R	GAGAAGCCATGCTGAAAG			

2.10 Στατιστική ανάλυση

Η αντιοξειδωτική δράση των δοκιμασμένων προβιοτικών αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) με επίπεδο σημαντικότητας 95% (STATISTICA® 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Η δοκιμή πολλαπλών εύρους του Duncan « $p = 0,05$ » χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των σημαντικών διαφορών. Για τη στατιστική προσαρμογή εκθετικών μοντέλων (διάσπαση δύο φάσεων) στα πειραματικά δεδομένα του ρυθμού σάρωσης DPPH, χρησιμοποιήθηκε μη γραμμική παλινδρόμηση (XLSTAT 2023.1.1).

2.11 Ζύμωση Φυσικών Μαύρων Ελιών Καλαμάτας χρησιμοποιώντας επιλεγμένα βακτήρια γαλακτικού οξέος ως εκκινητές

2.11.1 Συγκομιδή ελιών - Βακτηριακό στέλεχος και συνθήκες καλλιέργειας

Οι ελιές καλαμών συλλέχθηκαν σε κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης, (δηλαδή τα $\frac{3}{4}$ του ελαιόκαρπου έχουν αποκτήσει μαύρο χρώμα) το πρώτο εικοσαήμερο του Νοεμβρίου. Μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 20 kg εντός 24 ωρών από τη συγκομιδή τους. Κατά την παραλαβή, οι ελιές ξεπλύθηκαν με πόσιμο νερό για την απομάκρυνση ξένων υλών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας για την αφαίρεση ελαττωματικών, κατεστραμμένων και μολυσμένων από έντομα καρπών. Στη συνέχεια οι ελιές τοποθετήθηκαν σε δοχεία ζύμωσης των 10 λίτρων που περιείχαν 5 κιλά ελιές και περίπου 3 λίτρα άλμη (6% NaCl w/v) το καθένα, υποβάλλοντας τις σε αυθόρμητη ζύμωση (Ελληνικού τύπου). Η διάρκεια της ζύμωσης κυμαίνεται από 8 έως 12 μήνες για να επιτευχθεί η εκπίκριση. Ο σκοπός αυτού του χειρισμού ήταν να δημιουργηθεί ένα προϊόν που θα παρουσίαζε προβιοτικό δυναμικό και θα επιτάχυνε τη διαδικασία της ζύμωσης μέσω του ενοφθαλμισμού των καλλιιεργειών εκκίνησης. Για να μελετηθεί η επίδραση της καλλιέργειας εκκίνησης βακτηρίων γαλακτικού οξέος στη φυσική ζύμωση μαύρων ελιών, σχεδιάστηκαν οι ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (control)
2. Προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103
3. Προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας *Levilactobacillus brevis* ATCC8287
4. Προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917

2.11.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.11.2.1 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου στον καρπό

Για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου, αφαιρέθηκαν από την άλμη 10 g ελιάς, κόπηκαν ασηπτικά και ομογενοποιήθηκαν σε 90 mL αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (Stomacher 400 circulator, Seward Limited, Norfolk, Ηνωμένο Βασίλειο) για 90 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:10

όπου 1 ml δείγματος μεταφέρθηκε σε 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (0.9% w/v NaCl).

2.11.2.2 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου στην άλμη

Για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου της άλμης, 1 mL άλμης μεταφέρθηκε ασηπτικά σε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και συλλέχθηκε για κάθε μία από τις διαφορετικές ζυμώσεις. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 όπου 1 ml δείγματος μεταφέρθηκε σε 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (0.9% w/v) NaCl). Τέλος, οι δεκαδικές αραιώσεις έγιναν για τον εμβολιασμό μιας διπλής σειράς τρυβλίων για κάθε μικροβιολογικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση κάθε μικροοργανισμού.

Για τον προσδιορισμό του LAB, ποσότητα 1 ml από μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων ενός ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο εκλεκτικό υπόστρωμα de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), ακολουθούμενη από επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 72 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες. Για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη ζυμών, προστέθηκε 0.05% w/v κυκλοεξιμίδιο (cycloheximide, Sigma) στο υπόστρωμα μετά την αποστείρωση.

Για τον προσδιορισμό των ζυμομυκήτων, ποσότητα 0.1 ml από τη σειρά διαδοχικών αραιώσεων ενός ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική επιφανειακής επικάλυψης στο εκλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) που περιέχει το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (chloramphenicol, sigma) για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων. Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 3 ημέρες και καταμέτρηση των αποικιών.

Τέλος, τα *Enterobacteriaceae* τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικό άγαρ για 24 ώρες στους 37 °C. Για τον προσδιορισμό του τελικού πληθυσμού επιλέχθηκαν τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες και χρησιμοποιήθηκαν για την απαρίθμηση. Ο πληθυσμός στην ελιά ή την άλμη εκφράστηκαν ως log CFU/g (ελιές) ή mL (άλμη) αντίστοιχα.

Ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάζεται με την αραίωση που είχε χρησιμοποιηθεί και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε \log_{10} CFU/g ($N = \frac{C1+C2}{n1+(\frac{n2}{10})} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{d1}$),

όπου:

N= CFU/g ή CFU/mL

C1= Το άθροισμα των αποικιών CFU στα n1 τρυβλία της αραίωσης d1,

C2= Το άθροισμα των αποικιών CFU στα n2 τρυβλία της αραίωσης,

V= ο όγκος του εμβολίου (g)

2.12 Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.12.1 Μέτρηση pH και αλατιού

Για τη μέτρηση του pH και του αλατιού χρησιμοποιήθηκε ψηφιακός μετρητής (PC 80 + DHS Stirrer). Συγκεκριμένα, το pH για τα δείγματα άλμης μετρήθηκε απευθείας στα δείγματα ενώ για το pH της ελιάς μετρήθηκε με χρήση ομοιογενούς υγρού πολτού. Τα ευρήματα παρουσιάστηκαν ως ποσοστό (w/v) NaCl.

2.13 Όργανα και αναλυτικές συνθήκες

2.13.1 Χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV/DAD)

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα HPLC με ανιχνευτή διάταξης διόδων (L-2455) (Hitachi LaChrom Elite). Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη SVEA C18 Gold (150 × 4.6 mm 5 μm, Σουηδία) χρησιμοποιώντας ρυθμό ροής 0.500 mL/min⁻¹ (Ghanbari et al., 2012). Η έκλουση διεξήχθη χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή ροή στους 30 °C. Η κινητή φάση αποτελείτο από νερό που περιείχε 0.1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης A) και μεθανόλη που περιέχει 0.1% μυρμηκικό οξύ (διαλύτης B). Οι αρχικές συνθήκες ήταν 10% B για 0 min, 30% B για 10 λεπτά, 40% B για 20 λεπτά, 40% B για 25 λεπτά, 100% B για 40 λεπτά, 100% B για 45 λεπτά, 90% B για 50 λεπτά, 10% B για 55 λεπτά. Ο όγκος της ένεσης ήταν 20 μL (Vougiouklaki et al., 2022; Vougiouklaki et al., 2023).

Τα δείγματα αποτελούνταν από υπερκείμενα χωρίς κύτταρα (CFSs) της άλμης κάθε ζύμωσης. Το παρασκεύασμα περιελάμβανε φυγοκέντρηση στα $13.000 \times g$ για 10 λεπτά ακολουθούμενη από διήθηση των υπερκειμένων (μέγεθος πόρων φίλτρου 0,22 μm). Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών υπολογίστηκαν μέσω τυπικών καμπυλών. Διαφορετικές συγκεντρώσεις προτύπων 4-hydroxybenzoic acid, DL-p-hydroxyphenyllactic acid, phenyllactic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, hydrocinnamic acid, methylcinnamic acid, salicylic acid, 1,2-dihydroxybenzene, 3,4-dihydrocinnamic acid, vanillic acid, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid, ferulic acid, benzoic acid, and 4-hydrocinnamic acid) σε νερό:μεθανόλη (90:10), που κυμαίνεται από 125-2000 ppm. Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) όλων των καμπυλών ήταν πάνω από 0.99.

2.14 Αλληλουχία 16S rRNA (Nanopore MinION™)

Το συνολικό DNA εξήχθη απευθείας από τον καρπό της ελιάς χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin Food (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Γερμανία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η καθαρότητα και η ποσότητα του απομονωμένου DNA αξιολογήθηκε φασματοφωτομετρικά με υπολογισμό του OD260/OD280 (Fluorometer Qubit™ 4 με το κιτ Qubit™ dsDNA BR). Το εκχυλισμένο DNA που συλλέχθηκε αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ μέχρι τη χρήση.

Το κιτ μεταγονιδιωματικής MinION™ (Oxford Nanopore Kits 16S Barcoding Kit) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του σχεδόν πλήρους μήκους (περιοχή V1-V9) του 16S rRNA. Από το κιτ γραμμωτού κωδικοποίησης 16S, χρησιμοποιήθηκε 1 μL από κάθε εκκινητή (10 μM) που καλύπτει το πλήρες μήκος γονίδιο 16S (~1,5 kb). Πραγματοποιήθηκε PCR χρησιμοποιώντας 10 μL δείγματος DNA (1 ng/ μL) ανά αντίδραση, 25 μL Taq 2X (Taq DNA Polymerase, QIAGEN) και 14 μL νερού χωρίς νουκλεάση (nuclease free water).

Η γονιδιακή ενίσχυση πραγματοποιήθηκε υπό τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική μετουσίωση στους $95\text{ }^\circ\text{C}$ για 1 λεπτό, ακολουθούμενη από 35 κύκλους μετουσίωσης στους $95\text{ }^\circ\text{C}$ για 20 δευτερόλεπτα, ανόπτηση στους $55\text{ }^\circ\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους $72\text{ }^\circ\text{C}$ για 2 min και τελική επέκταση στους $72\text{ }^\circ\text{C}$ για 10 λεπτά.

Τα αμπλικόνια καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας τα μαγνητικά σφαιρίδια AMPure XP 30 μl (NGS Clean-up and Size Select, Macherey-Nagel, Duren, Γερμανία), ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το φθορόμετρο Qubit™ 4 με το κιτ ανάλυσης Qubit™ dsDNA BR (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, MA, MA., Η.Π.Α.), και συγκέντρωσε όλες τις βιβλιοθήκες με γραμμωτό κώδικα με σύνολο 50-100 ng.

Η αλληλουχία πραγματοποιήθηκε με το σύστημα R9.4.1 MinION™ για 4 ώρες (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) και τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό MinKNOW (v.18.01.6). Τα δεδομένα που δημιουργήθηκαν από το MinKNOW αναλύθηκαν σε πραγματικό χρόνο στο λογισμικό της Nanopore EPI2ME (Beloborodova et al., 2012; Medina et al., 2016).

2.15 Στατιστική και Πολυμεταβλητή Ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (mean values) ± τυπική απόκλιση (standard deviation) (%). Για όλα τα δεδομένα, η κανονικότητα αξιολογήθηκε με τη δοκιμή Kolmogorov-Smirnov και γραφικά μέσω διαγραμμάτων Q-Q. Συγκεκριμένα, τα αισθητηριακά δεδομένα για την αλμύρα και το τραγανό κατανεμήθηκαν κανονικά, ενώ για την πικράδα, την οξύτητα, τη σκληρότητα δεν κατανεμήθηκαν κανονικά. Για να αξιολογηθεί η σύγκριση των αισθητηριακών δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών τύπων ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση, εφαρμόστηκε Μονόδρομη Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA) μετά από δοκιμή για την υπόθεση της ισότητας των διακυμάνσεων (ομοσκεδαστικότητα) χρησιμοποιώντας το τεστ Levene. Για τα δεδομένα με λοξή κατανομή χρησιμοποιήθηκε ANOVA στις τάξεις (δοκιμή Kruskal-Wallis). Χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με το τεστ Tukey για να εξηγηθεί η αύξηση της πιθανότητας σφάλματος τύπου I. Στην περίπτωση του μη παραμετρικού τεστ, χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με το τεστ Dunn. Όλες οι αναφερόμενες τιμές P βασίστηκαν σε δοκιμές διπλής όψης και συγκρίθηκαν με το επίπεδο σημαντικότητας 5%. Το Prism 8 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) για macOS.

2.16 Οργανοληπτική Αξιολόγηση (Sensory Evaluation)

Η οργανοληπτική αξιολόγηση αφορούσε τους ακόλουθους παράγοντες: εκτροπή από τη φυσιολογική πορεία της ζύμωσης: ανώμαλη ζύμωση (βουτυρική ζύμωση, zapateria, δυσοσμία), γευστικά χαρακτηριστικά (αλμυρό, πικρό, ξινό), ιδιότητες που σχετίζονται με την υφή (σκληρότητα, τραγανότητα, ινώδες). Δέκα εκπαιδευμένα άτομα σύμφωνα με τη μέθοδο της αισθητηριακής ανάλυσης των επιτραπέζιων ελιών που καθιέρωσε η ΔΟΕΠΕΛ αξιολόγησαν το γευστικό πάνελ. Τα ευρήματα βασίζονται σε βαθμολογίες της κλίμακας 1–10 (DOEPEL, 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα- Συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής των CFS των LAB.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος απαντώνται φυσικά σε διάφορα τρόφιμα ή προστίθενται σκόπιμα για την παραγωγή μιας σειράς τροφών. Αυτά περιλαμβάνουν ψάρια, κρέας, διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, δημητριακά, φρούτα και λαχανικά, συμπεριλαμβανομένων των οσπρίων. Αυτή η σημαντική ομάδα καλλιεργειών εκκίνησης χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση. Συμβάλλουν στην ενίσχυση των χαρακτηριστικών των τροφίμων και έχουν αναγνωριστεί ότι συμβάλλουν στη μικροβιακή ασφάλεια των τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση (Wakil et al., 2014 ; Leroy et al., 2004). Τα LAB έχουν σημαντική αντιμικροβιακή λειτουργία, λόγω της παραγωγής ορισμένων μεταβολιτών όπως τα οργανικά οξέα (Klaenhammer et al., 1999; Lavermicocca et al., 2010). Ορισμένα στελέχη *L. Plantarum*, τα οποία έχουν βρεθεί στο προζύμι, έχουν αναφερθεί ότι παράγουν 3-(4-υδροξυφαινυλ)γαλακτικό οξύ (HPLA) και PLA και έχουν αναφερθεί ότι είναι αντιμυκητιακές ενώσεις. Πολλές αναφορές έχουν προτείνει ότι η αντιμυκητιακή δράση είναι ένας συνδυασμός οργανικών οξέων όπως γαλακτικό, οξικό και φαινυλλακτικό οξύ ή βακτηριοσίνες και χαμηλού μοριακού βάρους αντιμικροβιακούς παράγοντες και πεπτίδια (Valerio et al., 2004; Lavermicocca et al., 2010).

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την αντιμικροβιακή δράση των CFS μετά από επώαση 1^{ης}, 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας των *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323 και *Lacticaseibacillus rhamnosus* έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων (*Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922). Η αναστολή των ενεργών αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται από διαφορετικά είδη LAB μετά από επώαση 5 ημερών στους 37 °C έναντι παθογόνων βακτηρίων φάνηκε να είναι παρόμοια, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4 και 5 και στις Εικόνες 1 και 2. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες LAB ανέστειλαν την ανάπτυξη των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών παθογόνων με επιτυχία, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη τους σε εμπορικά τρόφιμα μπορεί να παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από τα συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια (Barcenilla et al., 2022; Choi et al., 2021; Messens and De, 2002).

Πίνακας 4 Η αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων από δραστικές αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τους *Levilactobacillus brevis* και *Lactiplantibacillus plantarum*.

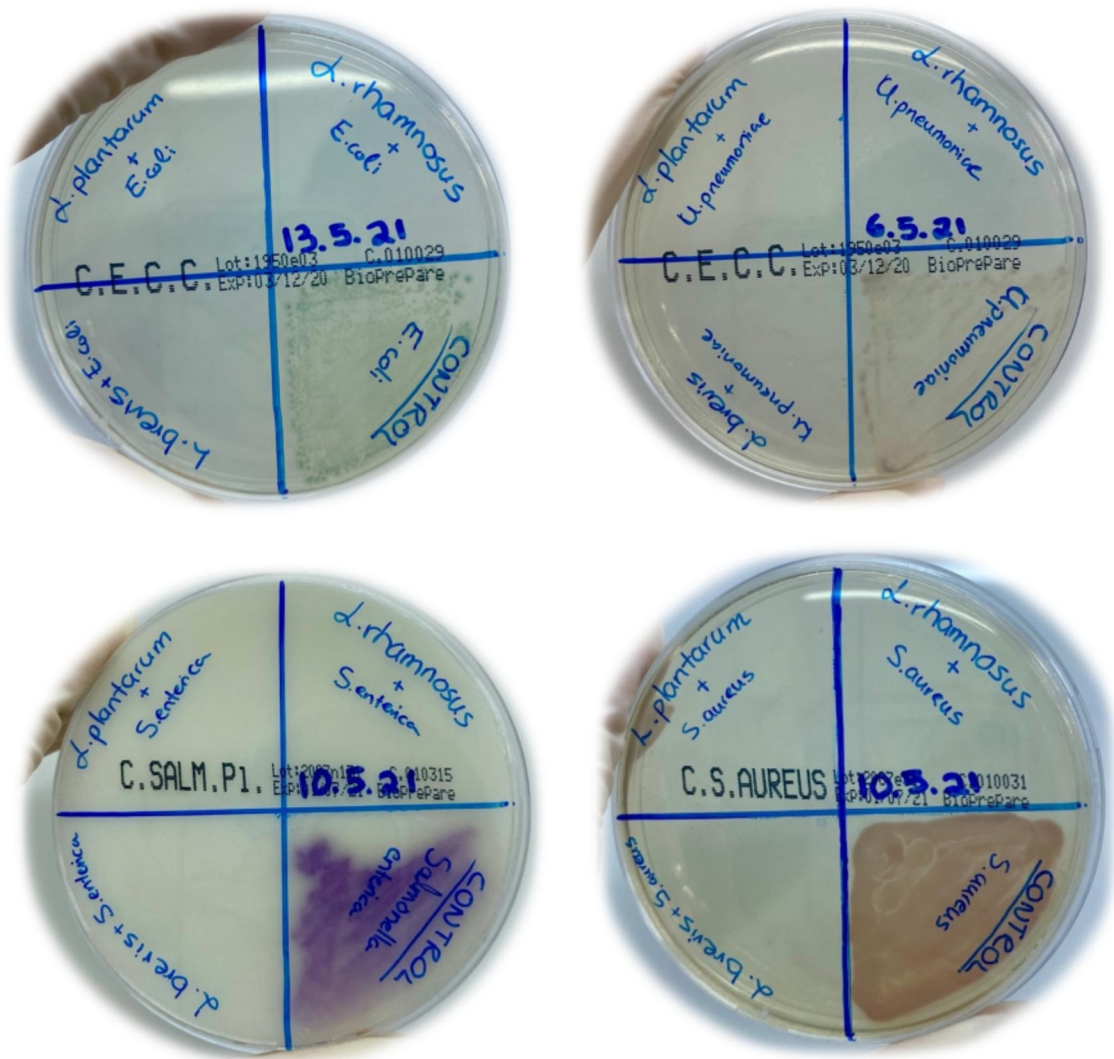
Name of Pathogen Strain	Metabolites of <i>L. brevis</i>			Metabolites of <i>L. plantarum</i>		
	1	2	3	1	2	3
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ²	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ²	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ²	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ²	0

1. Χρόνος επώασης (1 μέρα); 2. Χρόνος επώασης (3 μέρες); 3. Χρόνος επώασης (5 μέρες).

Πίνακας 5 Η αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων από δραστικές αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τους *Lactobacillus gasseri* και *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Name of Pathogen Strain	Metabolites of <i>L. gasseri</i>			Metabolites of <i>L. rhamnosus</i>		
	1	2	3	1	2	3
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ³	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ²	0	10 ⁸	10 ³	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ²	0	10 ⁸	10 ³	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (cfu/mL)	10 ⁸	10 ³	0	10 ⁸	10 ³	0

1. Χρόνος επώασης (1 μέρα); 2. Χρόνος επώασης (3 μέρες); 3. Χρόνος επώασης (5 μέρες).



Εικόνα 6 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των CFSs (μετά από 5 μέρες επόασης) των *L.brevis*, *L. plantarum* και *L. rhamnosus* ενάντια στα παθογόνα βακτήρια *Salmonella enterica* ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ο στόχος της μελέτης ήταν η βελτιστοποίηση της μεθόδου HPLC-UV/DAD για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό 14 διαφορετικών μεταβολιτών LAB. Η προετοιμασία του δείγματος (εξαγωγή και καθαρισμός) είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση της πλειοψηφίας των μητρών τροφίμων και στον τομέα του LAB αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη.

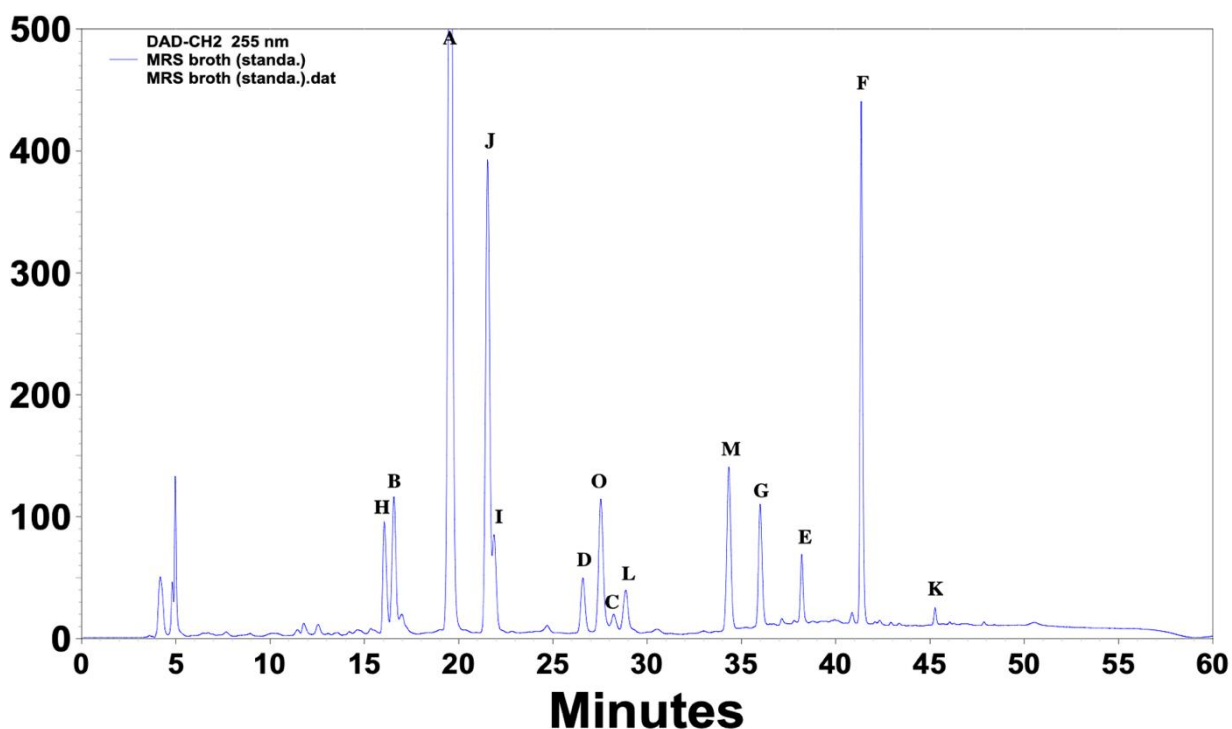
Η υψηλή ακρίβεια, ο χρόνος και το κόστος της μεθόδου μας σε αυτό το άρθρο ήταν τα ίδια σε σύγκριση με μια προηγούμενη μελέτη που είχε αναλάβει ο Brosnan et al., 2012 και 2014. Σύμφωνα με τους Brosnan et al., 2014 HPLC-UV / DAD, GC-MS, LC-MS χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό ενώσεων που παράγουν LAB.

Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν τον προσδιορισμό των ενώσεων σε μία μόνο χρωματογραφική δοκιμή. Ο χρόνος διατήρησης των μεθόδων είναι περίπου 40 λεπτά. Η έκλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή ροή νερού που περιέχει μυρμηκικό οξύ (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο που περιέχει μυρμηκικό οξύ (διαλύτης B). Το κόστος ανάλυσης για όλες τις μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω κυμαίνεται στην ίδια τιμή για κάθε εκτέλεση. Οι διαλύτες είναι αρκετά οικονομικοί αλλά οι τυποποιημένες ενώσεις είναι δαπανηρές.

Ο χρόνος συγκράτησης κάθε ένωσης και τα μήκη κύματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Επίσης στα Σχήματα 1 και 2 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα στα 255 και στα 280 nm του ζωμού MRS μετά από την προσθήκη των 14 πρότυπων ενώσεων γνωστής συγκέντρωσης (50 ppm) από την κάθε ουσία. Με βάση τα αποτελέσματα, οι τρεις από τις πρότυπες ενώσεις (phenyllactic acid (28 λεπτά), hydrocinnamic acid (38 λεπτά), 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (45.3 λεπτά)) ανιχνεύονται μόνο στα 255 nm (Σχήμα 1) . Ωστόσο στο χρωματογράφημα στα 280 nm όλα οι υπόλοιπες ενώσεις έχουν υψηλότερη ένταση απορρόφησης σε σχέση με τα 255nm.

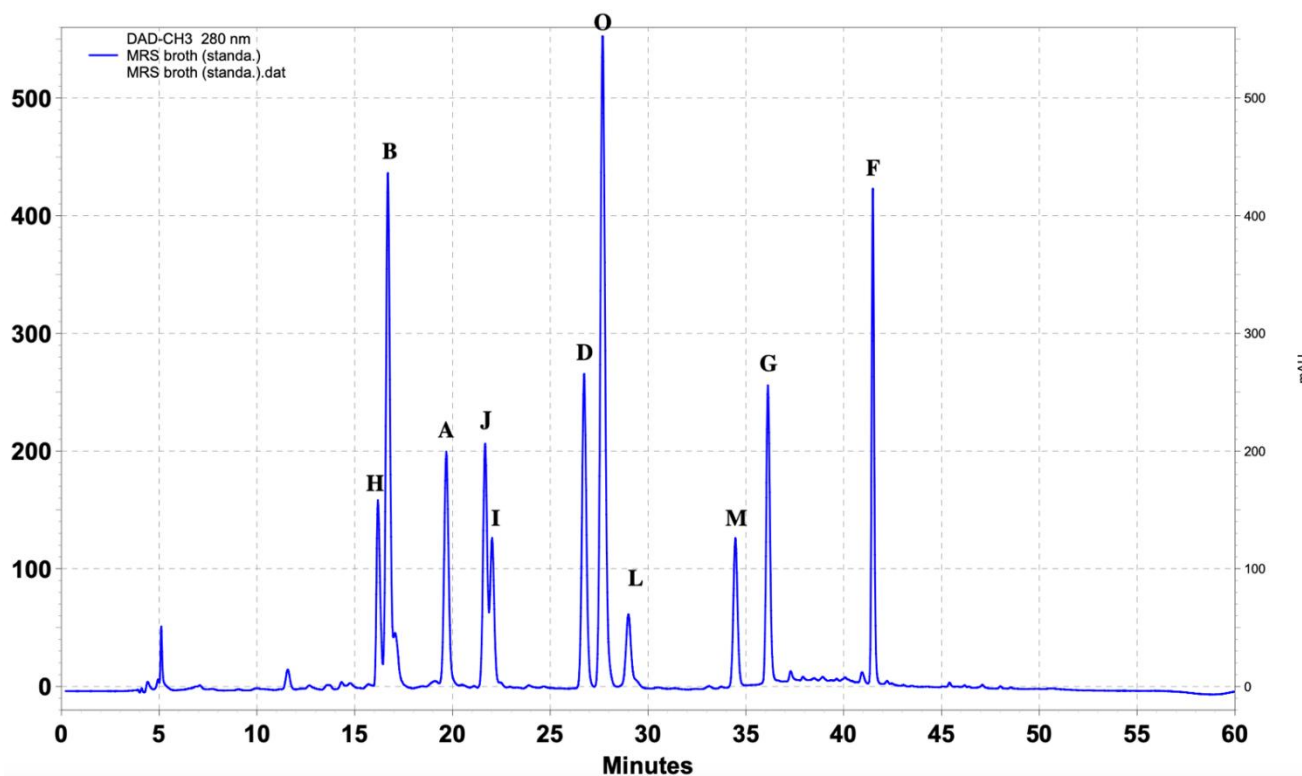
Πίνακας 6 Η Μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) και ο χρόνος έκλουσης των 14 πρότυπων ενώσεων με την μέθοδο HPLC-UV/DAD.

Πρότυπες ενώσεις	UV (nm)	Χρόνος συγκράτησης (min)
(A) 4-Hydroxybenzoic acid,	251, 269, 344	19.3
(B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid	228, 274, 395	16.3
(C) Phenyllactic acid	216, 255, 394	28
(D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	235, 277, 342	26.4
(E) Hydrocinnamic acid	220, 255, 315	38
(F) Methylcinnamic acid	251, 270, 293	41.3
(G) Salicylic acid	235, 302, 386	36
(H) 1,2-Dihydroxybenzene	229, 271, 390	15.7
(I) 3,4-Dihydrocinnamic acid	222, 324, 314	21.7
(J) Vanillic acid	253, 268, 294	21.3
(K)3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	222, 255, 323	45.3
(L) Ferulic acid	225, 234, 322	28.7
(M) Benzoic acid	230, 273, 388	34.2
(O) 4-Hydrocinnamic acid	227, 239, 310	27.4



Σχήμα 1 Χρωματογράφημα στα 255 nm ενός μίγματος από τις 14 πρότυπες ενώσεις (50 ppm; 10 mL injection).

Παρασκευάστηκαν σε H₂O / Methanol (90/10) και προστέθηκαν σε ζωμό MRS (διηθημένο 0.22 μm; εκχύλιση LLE; 20 μl όγκος έκχυσης). (A) 4-hydroxybenzoic acid (19.3 min); (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (16.3 min); (C) Phenyllactic acid (28 min); (D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid (26.4 min); (E) Hydrocinnamic acid (38 min); (F) Methylcinnamic acid (41.3 min); (G) Salicylic acid (36 min); (H) 1,2-Dihydroxybenzene (15.7 min); (I) 3,4-Dihydrocinnamic acid (21.7 min); (J) Vanillic acid (21.3 min); (K) 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid (45.3 min); (L) Ferulic acid (28.7 min); (M) salicylic acid (34.2 min); (O) 4-Hydrocinnamic acid (27.4 min).



Σχήμα 2 Χρωματογράφημα στα 280 nm ενός μίγματος από τις 11 πρότυπες ενώσεις (50 ppm, 10 mL ένεση).

Παρασκευάστηκαν σε H₂O / Methanol (90/10) και προστέθηκαν σε ζωμό MRS (διηθημένο 0.22 μm; εκχύλιση LLE; 20 μl όγκος έκχυσης). (A) 4-hydroxybenzoic acid (19.3 min); (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (16.3 min); (D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid (26.4 min); (F) Methylcinnamic acid (41.3 min); (G) Salicylic acid (36 min); (H) 1,2-Dihydroxybenzene (15.7 min); (I) 3,4-Dihydrocinnamic acid (21.7 min); (J) Vanillic acid (21.3 min); (L) Ferulic acid (28.7 min); (M) salicylic acid (34.2 min); (O) 4-Hydrocinnamic acid (27.4 min).

3.3 Διαδικασίες εκχύλισης

Για την προετοιμασία του δείγματος, όπου αρχικά ξεκινάει με τη διαδικασία εκχύλισης και τη συλλογή των μεταβολιτών από τα CFSs από το κάθε οξυγαλακτικό βακτήριο είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετέπειτα διαδικασία ανάλυσης με HPLC-UV/DAD. Μια προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Brosnan et al., 2012 και 2014 ανέπτυξε δύο μεθόδους για την εξαγωγή και ταυτόχρονα την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας πρότυπων ενώσεων που ενδεχομένως να παράγονται από LAB.

Οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Στο στέλεχος *Levilactobacillus brevis* ανιχνεύθηκαν δυο ενώσεις (Πίνακας 7 και 8, Σχ. 3). Στο στέλεχος *Lacticaseibacillus rhamnosus* ανιχνεύθηκαν δυο ενώσεις (Πίνακας 7 και 8, Σχ. 4). Στο στέλεχος *Lactiplantibacillus plantarum* ανιχνεύθηκαν έξι ενώσεις (Πίνακας 7 και 8, Σχ. 5). Στο στέλεχος *Lactobacillus gasseri* ανιχνεύθηκαν τρεις ενώσεις (Πίνακας 7 και 8, Σχ. 6).

Η ένωση OH-PLA ταυτοποιήθηκε και στα τέσσερα στελέχη έχοντας και την υψηλότερη συγκέντρωση από τις υπόλοιπες ουσίες. Η υψηλότερη συγκέντρωση (253.0 ppm) βρέθηκε στο στέλεχος *Lactobacillus gasseri* και η χαμηλότερη (103.4 ppm) στο *Levilactobacillus brevis*. Παρόμοια ποσότητα vanillic acid (2.6 – 3.4 ppm) εντοπίστηκε σε *Levilactobacillus brevis* και *Lactiplantibacillus plantarum* αντίστοιχα. Το ferulic acid απομονώθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε *Lacticaseibacillus rhamnosus* και *Lactiplantibacillus plantarum* από 4.9 έως 6.4 (Πίνακας 7).

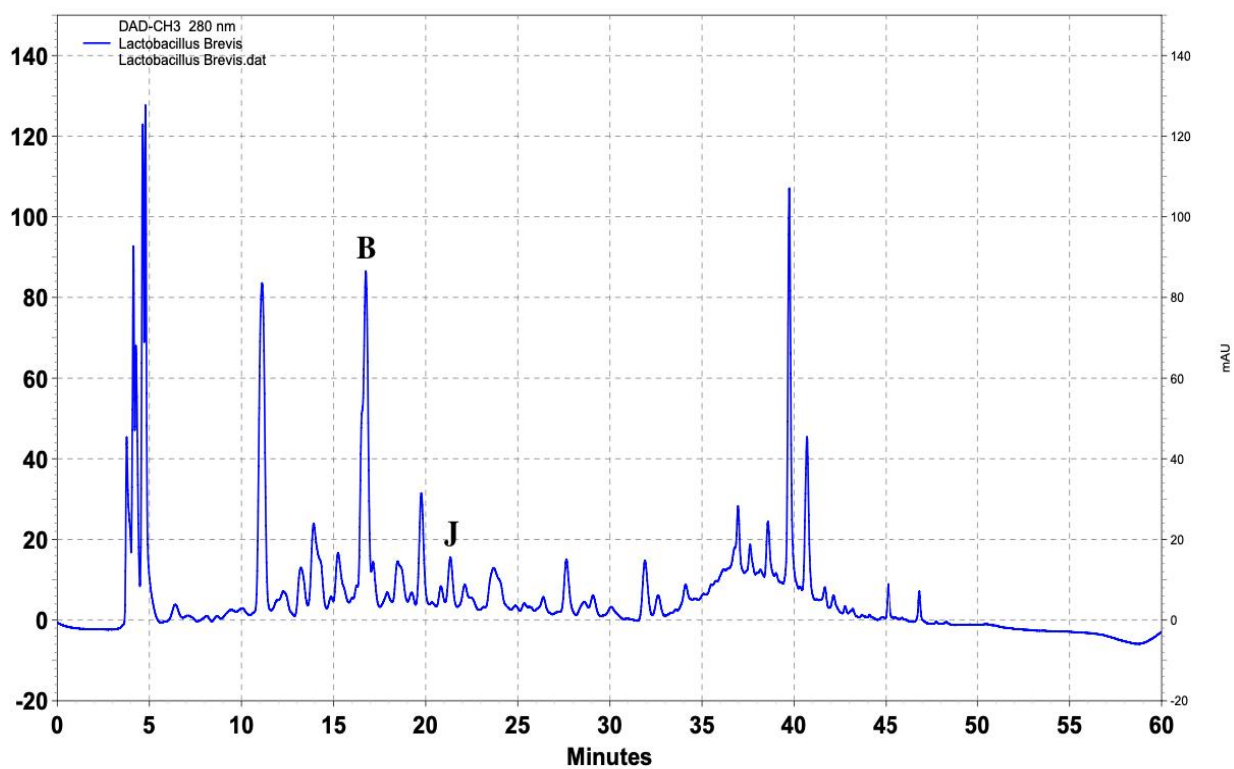
Παρατηρήθηκε ότι οι μεταβολίτες που παρήχθησαν από τα LAB στον ζωμό παρέμειναν οι ίδιοι σε διάστημα 30 ημερών, ενώ οι συγκεντρώσεις κατά το πέρας των ημερών αυξήθηκαν (πίνακα 8). Έτσι, οι μεταβολίτες μπορούσαν να αναγνωριστούν από την πρώτη ημέρα της επώασης του μικροοργανισμού.

Πίνακας 7 Η συγκέντρωση (σε ppm) των 14 πρότυπων ενώσεων που ανιχνεύθηκε στις καλλιέργειες *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* και *L. gasseri* μετά από 30 μέρες επώασης.

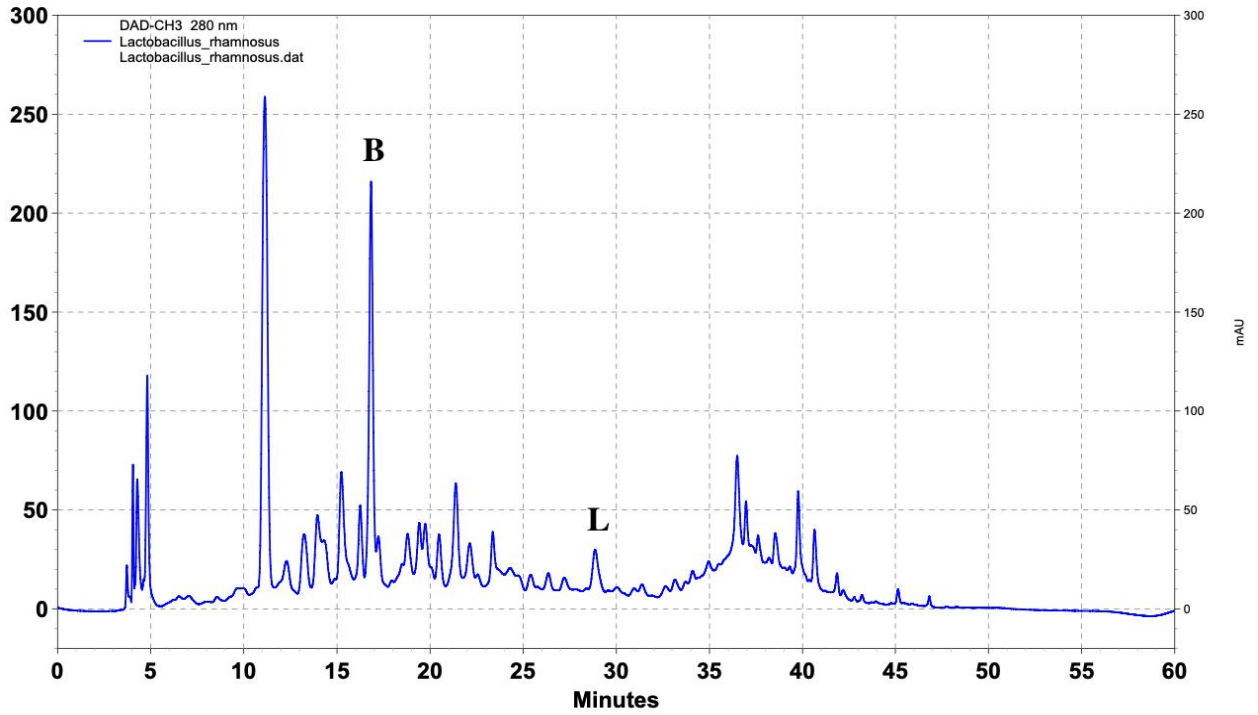
Πρότυπες ενώσεις	<i>Levilactobacillus brevis</i> (ppm)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (ppm)	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (ppm)	<i>Lactobacillus gasseri</i> (ppm)
(A) 4-Hydroxybenzoic acid,	-	-	-	-
(B)DL-p-Hydroxyphenyllactic acid	103.4	217.8	147.6	253.0
(C) Phenyllactic acid	-	-	-	-
(D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	-	-	-	-
(E) Hydrocinnamic acid	-	-	-	-
(F) Methylcinnamic acid	-	-	-	-
(G) Salicylic acid	-	1.8	-	-
(H) 1,2-Dihydroxybenzene	-	-	-	12.68
(I) 3,4-Dihydrocinnamic acid	-	-	-	-
(J) Vanillic acid	2.6	3.4	-	-
(K)3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	-	-	-	-
(L) Ferulic acid	-	6.4	4.9	-
(M) Benzoic acid	-	4.6	-	7.83
(O) 4-Hydrocinnamic acid	-	1.4	-	-

Πίνακας 8 Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης (σε ppm) των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν στις καλλιέργειες *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* και *Lactobacillus gasseri* σε διάστημα 5, 10, 15, 20, 25 και 30 ημερών.

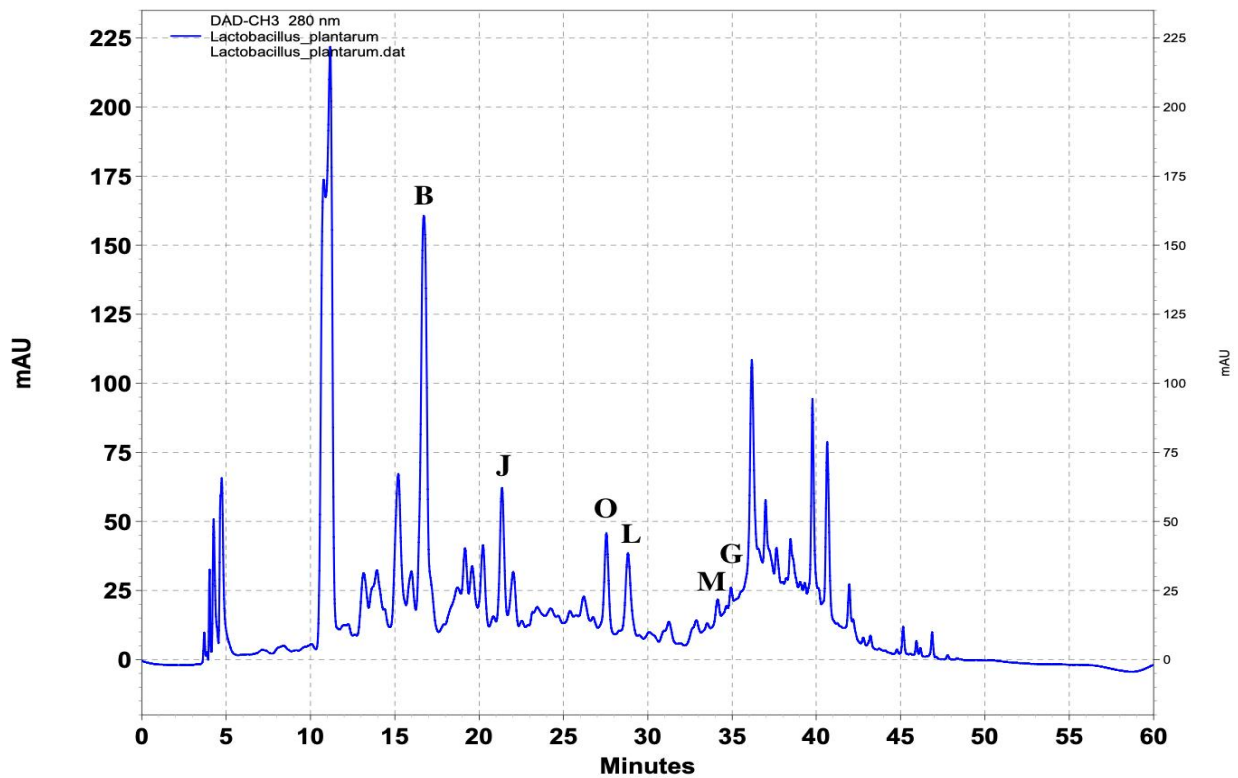
Name strain	Incubation time (days)	OH-PLA	Salicylic acid	Vanillic acid	Ferulic acid	Benzoic acid	4-Hydro-cinnamic acid	1,2-Dihydroxy-benzene
<i>Levilactobacillus brevis</i> (ppm)	5	80.2	-	1.5	-	-	-	-
	10	98.3	-	2.4	-	-	-	-
	15	100.2	-	2.4	-	-	-	-
	20	102.3	-	2.5	-	-	-	-
	25	103.4	-	2.6	-	-	-	-
	30	103.4	-	2.6	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (ppm)	5	150.3	1.0	2.2	4.8	3.2	1.0	-
	10	200.10	1.6	3.2	6.05	3.8	1.25	-
	15	214.3	1.6	3.3	6.35	3.9	1.3	-
	20	216.8	1.72	3.35	6.40	4.4	1.35	-
	25	217.5	1.8	3.4	6.40	4.55	1.40	-
	30	217.8	1.8	3.4	6.4	4.6	1.4	-
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (ppm)	5	123.2	-	-	3.85	-	-	-
	10	138.0	-	-	4.45	-	-	-
	15	142.3	-	-	4.55	-	-	-
	20	145.4	-	-	4.85	-	-	-
	25	147.6	-	-	4.90	-	-	-
	30	147.6	-	-	4.90	-	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ppm)	5	6.0	-	-	-	2.31	-	3.73
	10	200.0	-	-	-	7.32	-	9.84
	15	247.2	-	-	-	7.65	-	10.23
	20	251.6	-	-	-	7.65	-	11.42
	25	252.7	-	-	-	7.82	-	11.47
	30	253.0	-	-	-	7.83	-	12.68



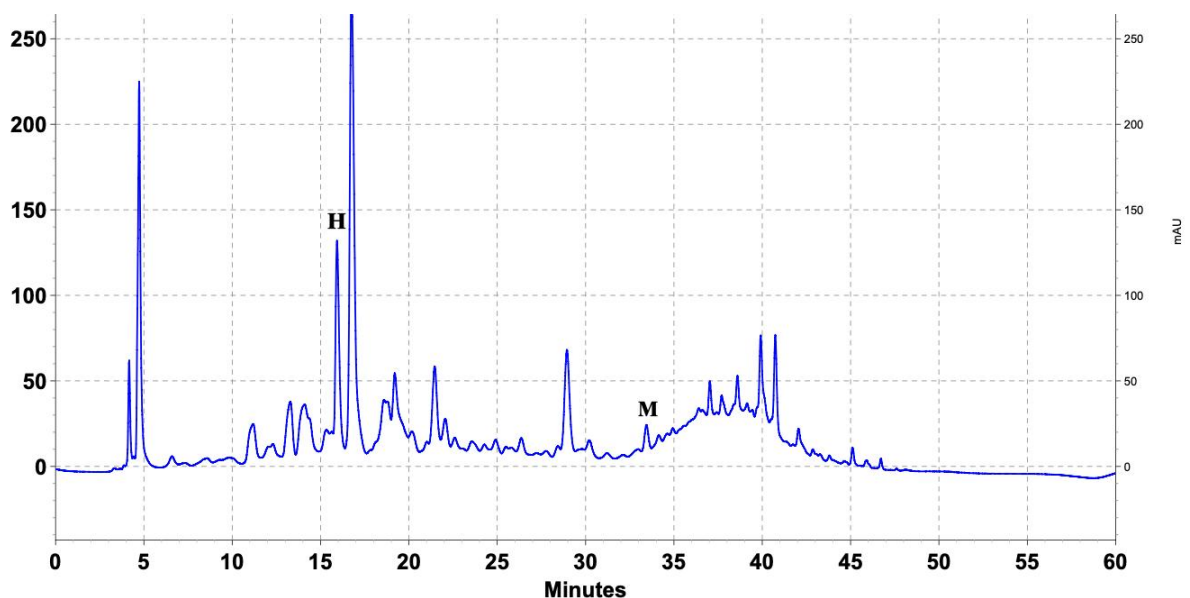
Σχήμα 3 Χρωματογραφικό προφίλ του *Levilactobacillus brevis* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min) (J) vanillic acid (21.3 min).



Σχήμα 4 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactobacillus rhamnosus* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min), (L) ferulic acid (28.7 min).



Σχήμα 5 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactiplantibacillus plantarum* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min), (J) Vanillic acid (21.3 min), (O) 4-Hydrocinnamic acid (27.4 min), (L) ferulic acid (28.7 min), (M) Benzoic acid, (G) Salicylic Acid (36 min).



Σχήμα 6 Χρωματογραφικό προφίλ του *Lactobacillus gasseri* που παρουσιάζει τις πρότυπες ουσίες που ανιχνεύθηκαν (I) φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας των ενώσεων (B) OH-PLA (16.3 min), (H) 1, 2-Dihydroxybenzene (15.7 min); (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (16.3 min); (M) Benzoic acid (34.2 min).

Οι Brosnan et al., (2014), μελέτησαν την περίπτωση του *Lactiplantibacillus plantarum* για την πιθανή παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταβολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο *L. plantarum* ήταν 4,8 mg/mL OH-PLA, 1,03 mg/mL 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, 0,04 mg/mL καφεϊκού οξέος, 43 mg/mL φαινυλακτικού οξέος, 0,46 mg / mL κουμαρικού οξέος, 0,13 mg / mL 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ) προπανοϊκού οξέος 0,29 mg / mL βενζοϊκού οξέος και 1,2 mg / mL φερουλικού οξέος.

Οι Axel et al., (2015), ερεύνησαν την αντιμυκητιακή δράση του *L. reuteri* R29 και την παραγωγή αντιμυκητιασικών καρβοξυλικών οξέων σε προζύμι σιταριού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το *L. brevis* R2D παράγαγε φερουλικό οξύ (22 mg / mL), σαλικυλικό οξύ (1 mg / mL), βανιλικό οξύ (8 mg / mL) και 3-φαινυλοξικό οξύ (8 mg / mL) .

Σε μελλοντικές μελέτες, θα ήταν επιθυμητό να διεξάγονται στοχευμένες αναλύσεις για ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αντιμυκητιασικών μορίων, με συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης και ανάλυσης, όπως LC-MS/MS ή GC-MS.

3.4 Αξιολόγηση προβιοτικού δυναμικού

Τη σημερινή εποχή το καταναλωτικό ενδιαφέρον και οι τάσεις στην αγορά των τροφίμων έχουν μεταβληθεί σημαντικά. Τρόφιμα που μπορεί να είναι ωφέλιμα για την υγεία και βοηθούν στην ευζωία εμφανίζουν αυξημένη ζήτηση και για το λόγο αυτό οι βιομηχανίες τροφίμων καθώς και η έρευνα επικεντρώνονται προς αυτή την κατεύθυνση. Μεγάλη μερίδα της αγοράς των λειτουργικών προϊόντων, κατέχουν τα προβιοτικά προϊόντα και ο συγκεκριμένος τομέας φαίνεται να επεκτείνεται.

Προκειμένου να παρέχουν την ευεργετική τους δράση, τα προβιοτικά είδη θα πρέπει να είναι βιώσιμα μετά την κατανάλωση και να παραμένουν ανθεκτικά στις εχθρικές συνθήκες του γαστρεντερικού συστήματος. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν ορισμένα κριτήρια επιλογής προβιοτικών στελεχών με βάση την αντοχή τους στα χολικά άλατα και το περιβάλλον χαμηλού pH. Επιπλέον, τα κριτήρια που σχετίζονται με την ασφάλεια για ανθρώπινη χρήση και την αντοχή των στελεχών στα αντιβιοτικά είναι ιδιαίτερα σημαντικά.

Με βάση τα αποτελέσματα της έρευνάς μας επιλέξαμε τέσσερα είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος με αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών τροφίμων. Ωστόσο, αν και αυτή η αντιμικροβιακή δράση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το προβιοτικό τους δυναμικό, δεν τα καθιερώνει ως προβιοτικά στελέχη. Για τον λόγο αυτόν, αξιολογήθηκαν αρκετές ιδιότητες όπως η αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις, η αντίστασή αυτών των στελεχών στα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη, γενταμυκίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη) για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των ειδών που χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετα (EFSA, 2012) και η αντιοξειδωτική τους δράση για να διερευνηθεί περαιτέρω η χρήση τους ως προβιοτικά στελέχη.

3.4.1 Αντοχή σε προσομοιωμένες γαστρεντερικές καταστάσεις

Το pH του στομάχου κυμαίνεται από 1.5 – 4.5 και η πεπτική διαδικασία διαρκεί περίπου 3 ώρες. Για να επιβιώσουν οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί κατά τη διέλευση από το στομάχι, η ανοχή σε οξύ είναι ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό. Σε αυτήν τη μελέτη, τα στελέχη LAB εμβλαπτίστηκαν σε όξινες συνθήκες (pH 2.5 για 3 ώρες).

Και τα τέσσερα στελέχη που δοκιμάστηκαν έδειξαν υψηλή αντοχή στο προσομοιωμένο γαστρικό υγρό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9. Μετά από 3 ώρες, όλα τα στελέχη ήταν ακόμα βιώσιμα και έγινε προσδιορισμός στις συγκεντρώσεις των κυττάρων λιγότερο από 1 log CFU/mL. Επομένως και τα τέσσερα στελέχη επιλέχθηκαν για πρόσθετη έρευνα. Ένα πιθανό προβιοτικό πρέπει να είναι σε θέση να επιβιώσει μέσω του πεπτικού συστήματος και να αποικίσει επαρκώς στο κόλον.

Πίνακας 9 Ποσοστό επιβίωσης των στελεχών LAB σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό.

Species	Initial Log (CFU/mL)	Gastric juice		
		1h	2h	3h
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	7.97	7.96 (99.87%)	7.89 (99.0%)	7.83 (98.24%)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917	7.94	7.92 (99.75%)	7.86 (98.99%)	7.84 (98.74%)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	8.00	7.99 (99.86%)	7.99 (99.86%)	7.91 (98.86%)
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 8287	8.02	8.00 (99.75%)	7.91 (98.63%)	7.88 (98.25%)

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, τα τρία στελέχη (*Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 και *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287) επιβίωσαν μετά από έκθεση στο προσομοιωμένο εντερικό υγρό. Για αυτόν τον λόγο, τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 έδειξε το υψηλότερο επίπεδο επιβίωσης με 7.09 log CFU/mL μετά από 12 ώρες. Για τα στελέχη *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 και *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287, το ποσοστό επιβίωσης ήταν 6.97 log CFU/mL και 6.52 log CFU/mL αντίστοιχα, σε αντίθεση με το στέλεχος *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, όπου μετά από 12 ώρες το ποσοστό επιβίωσης ήταν 3.96 log CFU/mL. Σε αντίθεση με το γαστρικό υγρό, ο *Lactobacillus gasseri* ήταν ευαίσθητος στο εντερικό υγρό.

Πίνακας 10 Ποσοστό επιβίωσης των στελεχών LAB σε προσομοιωμένο εντερικό υγρό.

Species	Initial Log (CFU/mL)	Intestinal juice			
		3h	6h	9h	12h
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	7.83	7.02 (89.65%)	6.15 (78.55%)	5.82 (74.33%)	3.87 (49.43%)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917	7.84	7.56 (96.42%)	7.39 (94.26%)	7.24 (92.35%)	7.09 (90.43%)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	7.91	7.67 (96.97%)	7.42 (93.81%)	7.13 (90.14%)	6.97 (88.12%)
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 8287	7.88	7.53 (95.56%)	7.13 (90.48%)	6.87 (87.18%)	6.52 (82.74%)

3.4.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

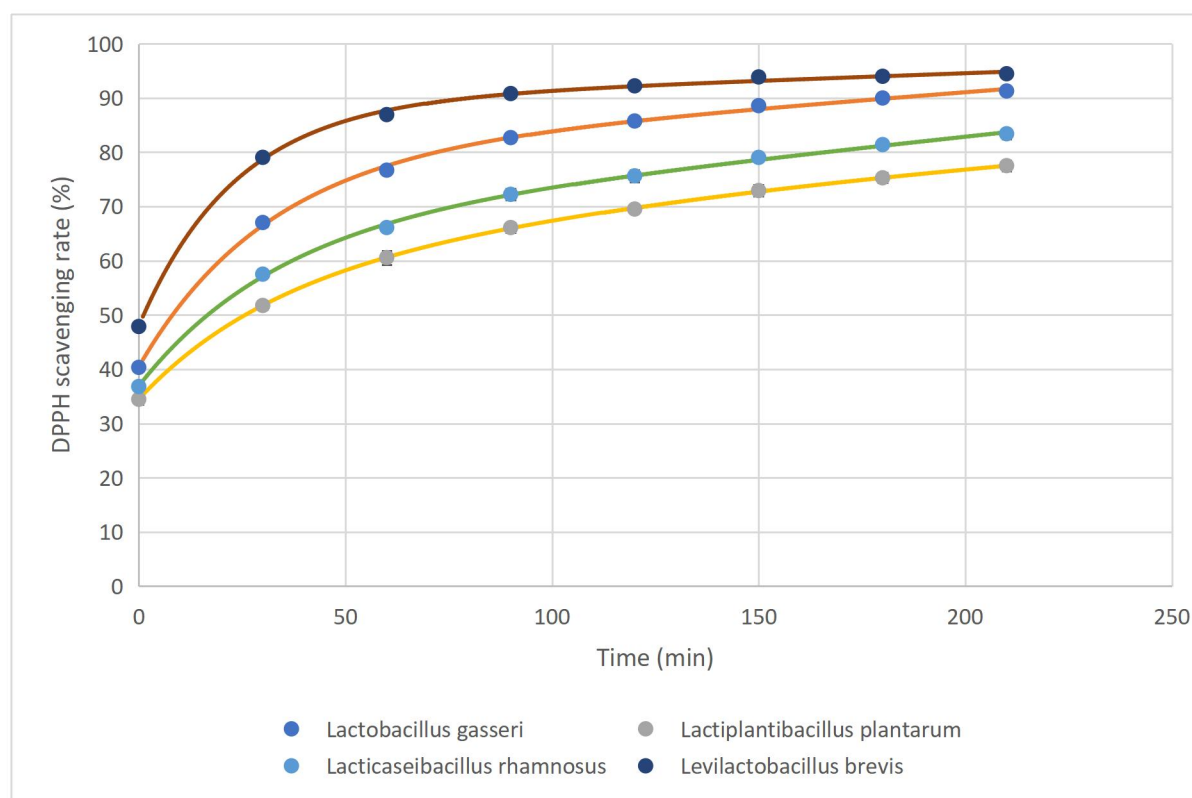
Κάθε προβιοτικό στέλεχος για να θεωρηθεί κατάλληλο προς κατανάλωση από τον άνθρωπο εκτός από το προβιοτικό δυναμικό, πρέπει να ελεγχθεί για την αντίστασή του σε 8 αντιβιοτικά. Τα γονίδια που προκαλούν αντίσταση στα αντιβιοτικά βρίσκονται συνήθως στα πλασμίδια. Παθογόνα βακτήρια με υψηλό επίπεδο αντοχής στα αντιβιοτικά μπορεί να αναπτύξουν εάν τέτοια πλασμίδια συζευχθούν με άλλα βακτήρια. Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήθηκε η ευαισθησία τεσσάρων στελεχών LAB σε οκτώ αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 11. Οι μικροβιολογικές τιμές αποκοπής που καθορίστηκαν από την ομάδα της EFSA για τα πρόσθετα και τα προϊόντα ή τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές (EFSA, 2012) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των ειδών. Η έρευνα έγινε τρεις φορές. Με βάση τα αποτελέσματα, αυτά τα προβιοτικά είδη είναι ασφαλή για κατανάλωση.

Πίνακας 11 Κατανομή των MIC των ελεγμένων αντιβιοτικών μεταξύ φαινοτυπικά ανθεκτικών στελεχών LAB (n= 4).

Species	MIC (µg/mL)							
	GM	K	TE	CH	A	E	CL	S
Μικροβιολογικές οριακές τιμές (µg/mL) που προτείνονται από την EFSA για υποχρεωτικό ετεροζυμωτικό γαλακτοβάκιλλο								
	16	32	8	4	2	1	1	64
<i>Lactobacillus gasseri</i>	14	28	6	3	1	1	1	64
<i>Levilactobacillus brevis</i>	1	16	3	2	0.125	0.50	0.32	32
Μικροβιολογικές οριακές τιμές (µg/mL) που προτείνει η EFSA για τον <i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>								
	16	64	32	8	2	1	2	n.r
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4	12	4	3	0.25	0.75	0.25	-
Μικροβιολογικές οριακές τιμές (µg/mL) που προτείνει η EFSA για τον <i>Lactobacillus rhamnosus</i>								
	16	64	8	4	4	1	4	32
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	8	42	0.75	0.38	2	0.75	2	24

3.5 Αντιοξειδωτική δράση in vitro των LAB

Η γέφυρα αζώτου περιέχει ένα άτομο της ελεύθερης ρίζας DPPH, μια σταθερή ρίζα με ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο σθένους. Η δημοφιλής αντιοξειδωτική δοκιμασία DPPH βασίζεται στη σάρωση των ριζών DPPH. Μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών δράσεων προκαλεί οξειδωτικό στρες. Στη μελέτη μας, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική καθαρισμού ριζών DPPH για την αξιολόγηση της in vitro αντιοξειδωτικής δράσης των CFS από τα LAB, μετά από 5 ημέρες επώασης και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα είδη έχουν αντιοξειδωτική δράση. Η απορρόφηση των CFS μετρήθηκε σε διάφορους χρόνους (0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min). Συγκριτικά η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση επιτεύχθηκε από τον *L. brevis* (94.47%) και τον *L. gasseri* (91.29%) στα 210 λεπτά (Σχήμα 7).

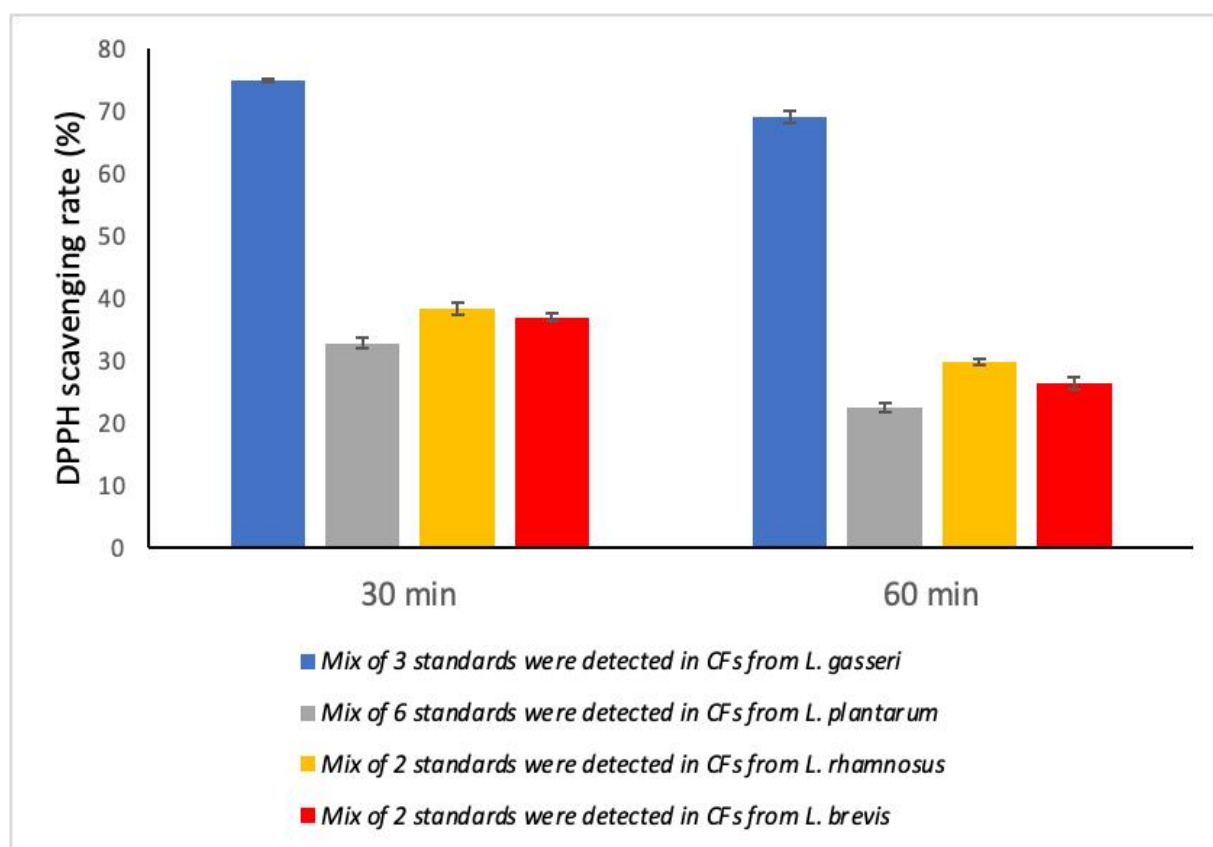


Σχήμα 7 Αντιοξειδωτική δράση των LABs (μετά από επώαση 5 ημερών).

(Πειραματικά δεδομένα και στατιστική προσαρμογή εκθετικών εξισώσεων - Αποσύνθεση δύο φάσεων = $pr1 \cdot \exp(-pr2 \cdot X1) + pr3 \cdot \exp(-pr4 \cdot X1) + pr5$).

Στη συνέχεια φτιάχτηκαν πρότυπα διαλύματα από τους μεταβολίτες που προσδιορίσαμε σε κάθε LAB ξεχωριστά με τις ποσότητες που παράγονται από το κάθε βακτήριο μετά από 5 ημέρες επώασης (Βλ. Πίνακα 8) και μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των προτύπων που ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στο CFS από κάθε βακτήριο γαλακτικού οξέος.

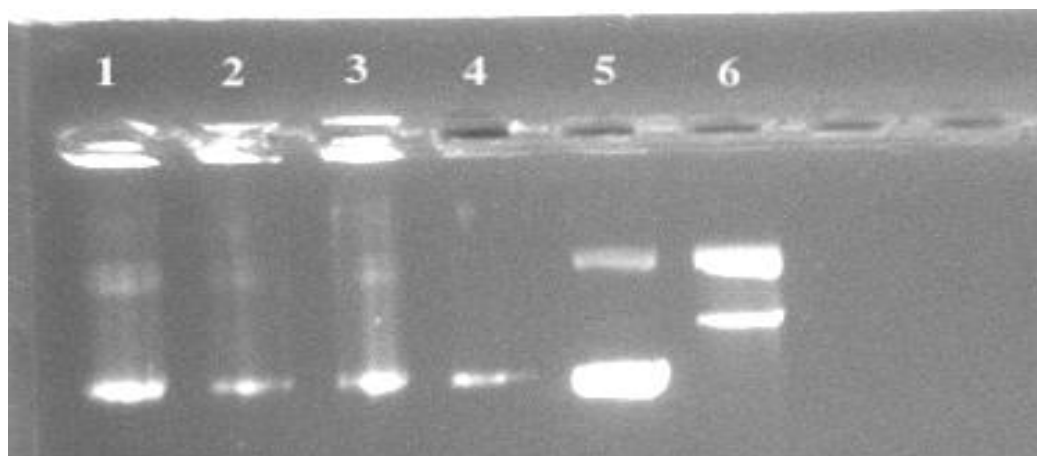
Ο ρυθμός σάρωσης της DPPH του μείγματος τριών προτύπων που ανιχνεύθηκαν στο CFS του *L. gasseri* (OH-PLA, 1,2-dihydroxybenzene, benzoic acid) ήταν 74.82% (Εικόνα 13). Από την άλλη πλευρά, τα 6 τυπικά μείγματα OH-PLA, salicylic acid, vanillic acid, ferulic acid, benzoic acid and 4-hydrocinnamic acid που ανιχνεύθηκαν στο CFS του *L. plantarum* παρουσίασαν ρυθμό σάρωσης 32.82%. Τα 2 τυπικά μείγματα OH-PLA και ferulic acid που ανιχνεύθηκαν στο CFS του *L. rhamnosus* παρουσίασαν ρυθμό σάρωσης 38.35%. Τα 2 τυπικά μείγματα OH-PLA και το vanillic acid που ανιχνεύθηκαν στο CFS του *L. brevis* παρουσίασε ρυθμό σάρωσης 36.94%. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, υπάρχουν και άλλοι αντιοξειδωτικοί μεταβολίτες στο CFS των 4 LABs που αυξάνουν τον ρυθμό σάρωσης.



Σχήμα 8 Αντιοξειδωτική δράση πρότυπων ουσιών που εντοπίσαμε στα LABs

3.6 Αναστολή της κοπής DNA που προκαλείται από τη ρίζα υπεροξυλίου

Η δοκιμασία αναστολής της κοπής του κλώνου DNA υπερτυλιγμένου πλασμιδίου μετράει πόσο καλά προστατεύονται τα δείγματα από τις ρίζες υδροξυλίου (HO[•]) που κόβουν τους κλώνους DNA. Το Σχήμα 3 δείχνει τα αποτελέσματα για την αναστολή διάσπασης του DNA. Η αναστολή της διάσπασης του DNA ακολούθησε σε μεγάλο βαθμό το προβλεπόμενο πρότυπο. Η υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε στο CFS του *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, το οποίο είχε ποσοστό αναστολής 97,38%. Επόμενοι στη σειρά ήταν οι CFS των *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 και *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, με 94,15%, 89,21% και 88,29%. Ο έλεγχος (μόνο DNA) αποκάλυψε περίπου 15% διασπασμένο DNA, ενώ το τυφλό (μόνο DNA και AAPH) δεν εμφάνισε καμία αναστολή.



Εικόνα 7 Αναστολή της κοπής του πλασμιδίου που προκαλείται από τη ρίζα υπερτυλιγμένου χάρης τα CFSs of LAB.

Γραμμή 1: CFS του *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287, Γραμμή 2: CFS του *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, Γραμμή 3: CFS του *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, Γραμμή 4: CFS του *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, Γραμμή 5: έλεγχος (DNA), Γραμμή 6: Blank (DNA και AAPH).

3.7 Ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή βακτηριοσίνης

Προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν βακτηριοσίνη, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τέσσερις ομάδες ειδικών εκκινητών. Προϊόντα PCR μοριακού βάρους 616bp και 1220 bp ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τα γονίδια PlnEF και Pediocin PA-1, αντίστοιχα. Ωστόσο, κανένα προϊόν δεν ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές για τα γονίδια PlnA και Brevicin174A (Πίνακας 3). Σύμφωνα με την Εικόνα 8, το γονίδιο Pediocin PA ανιχνεύθηκε στα στελέχη *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 και *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η παρουσία του γονιδίου plnEF στο στέλεχος *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 και *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (Εικόνα 9).

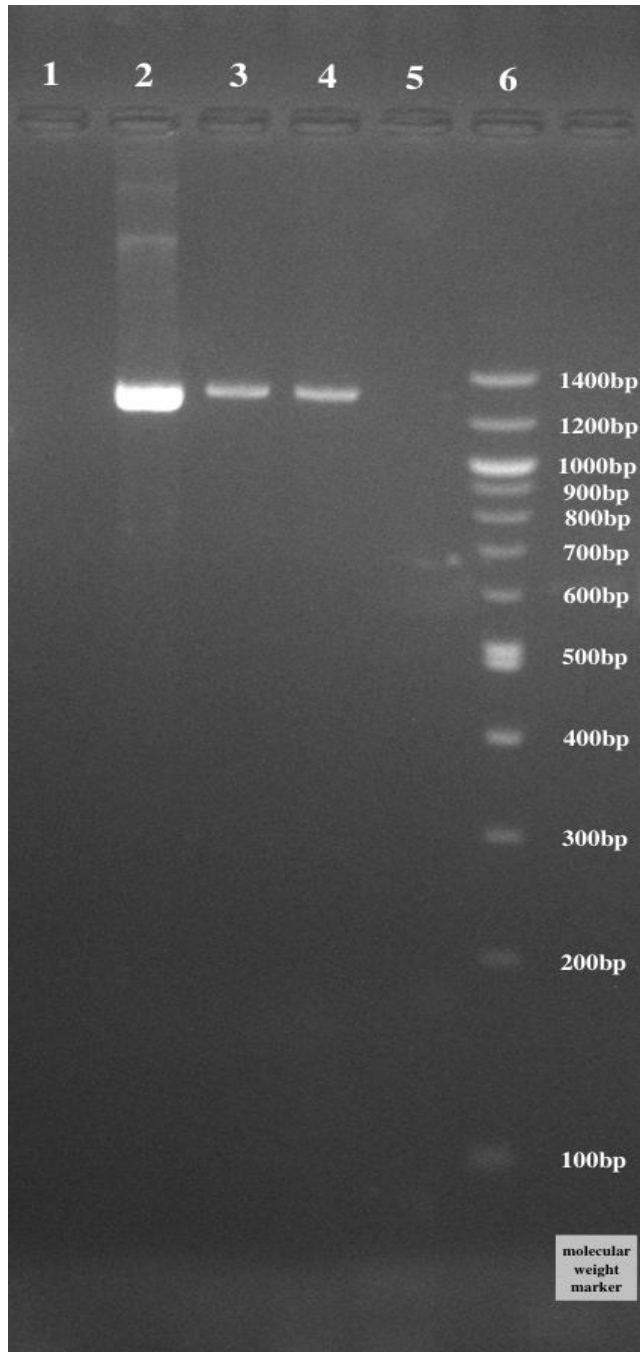
Πίνακας 12 Ταυτοποίηση γονιδίων βακτηριοσίνης που ανιχνεύθηκαν στα τέσσερα LAB.

Bacteriocinogenic isolates	Bacteriocin gene			
	PlnA	PlnEF	Pediocin PA-1	Bre174A
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 8287	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917	-	+	+	-
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	-	+	+	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	-	-	+	-

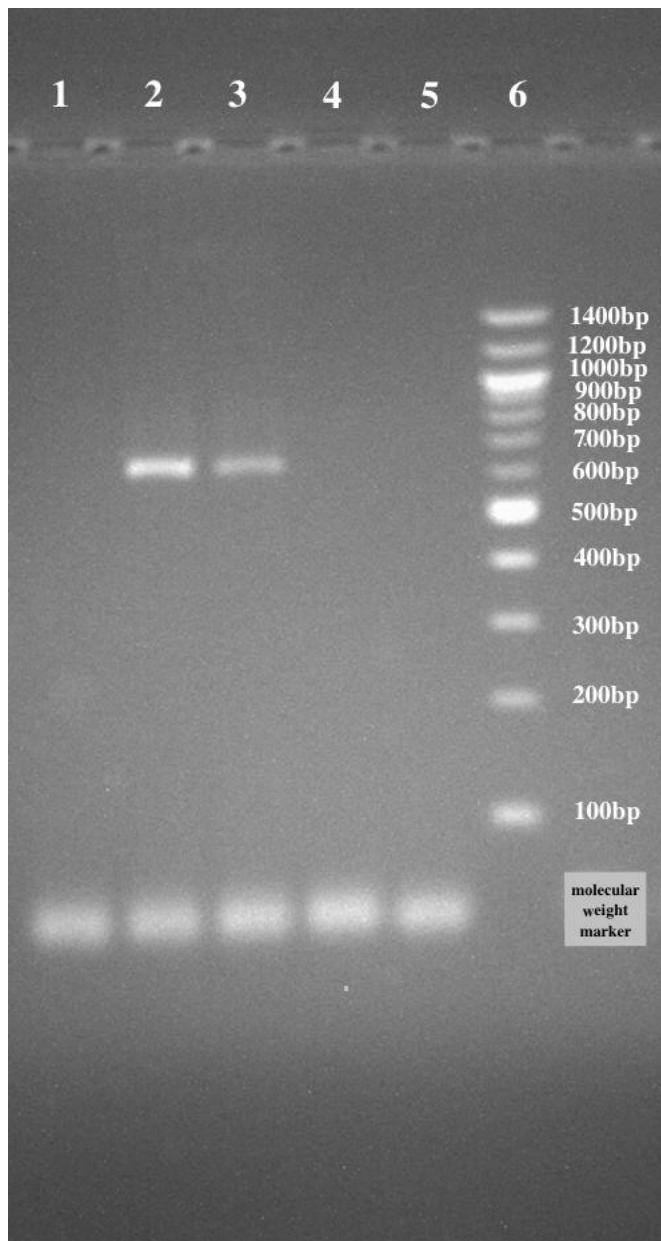
(+) παρουσία γονιδίου (-) απουσία γονιδίου.

Οι Azizi et al., (2017), ερεύνησαν την παρουσία των παραπάνω γονιδίων σε 11 διαφορετικά είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος (*L. plantarum* M16, *L. plantarum* M17, *L. plantarum* M18, *L. plantarum* M19, *L. brevis* M1, *L. brevis* M2, *L. brevis* M6, *L. brevis* M7, *L. brevis* M8, *L. brevis* M10 και *L. brevis* M12). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι μόνο τα *L. plantarum* M16, *L. plantarum* M17, *L. plantarum* M18 και *L. plantarum* M19 περιείχαν τα γονίδια PlnA και PlnEF. Ωστόσο, κανένα θραύσμα DNA δεν ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας

τον ειδικό εκκνητή Pediocin PA-1. Επίσης, το γονίδιο Bre174A ταυτοποιήθηκε στα *L. brevis* M1, *L. brevis* M7, *L. brevis* M8, *L. brevis* M10 και *L. brevis* M12. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία του γονιδίου rlnEF στο στέλεχος *Lactobacillus plantarum*, το οποίο αντιστοιχεί και στα αποτελέσματα των Chaalel et al. (2015) και Azizi et al. (2017).



Εικόνα 8 Ανίχνευση του γονιδίου Pediocin PA (1220bp) στα τέσσερα LAB. Line 1: *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287; line 2: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917; line 3: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103; line 4: *Lactobacillus gasseri* ATCC 3332;3 line 5: negative; line 6: ladder



Εικόνα 9 Ανίχνευση του γονιδίου *plnEF* (616 bp) στα τέσσερα LAB. Line 1: *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287; line 2: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917; line 3: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103; line 4: *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323; line 5: negative; line 6: ladder

3.8 Μικροβιακή και φυσικοχημική ποιότητα ζυμωμένων επιτραπέζιων ελιών

3.8.1 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου στον καρπό και στην άλμη

Σύμφωνα με τις πειραματικές συνθήκες, ο μικροβιακός πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* μειώθηκε σε όλα τα είδη ζύμωσης (<1 log CFU/ml) μετά τη 16^η μέρα στην άλμη σε αντίθεση με τη ζύμωση ελέγχου (control) που μειώθηκε μετά την 28^η μέρα. Στην περίπτωση του πληθυσμού στον καρπό της ελιάς, ο πληθυσμός μειώθηκε <1 log CFU/g μετά την 7^η μέρα σε όλες τις ζυμώσεις αντίστοιχα. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Corsetti et al., 2012; Sisto and Lavermicocca, 2012; Argyri et al., 2020; Kazou et al., 2020; Bonatsou et al., 2018; Grounta, Tasou and Panagou, 2017) καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια μετά την οξίνιση της άλμης λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος δεν επιτρέπουν την επιβίωση των εντεροβακτηρίων παρά μόνο στην αρχή της ζύμωσης (τις πρώτες 15 μέρες).

Στην περίπτωση των μικροβιακών αναλύσεων στον καρπό της ελιάς, τα LAB κυριαρχούσαν σε όλα τα είδη ζυμώσεων, με τον πληθυσμό τους να κυμαίνεται αρχικά σε 8.0 ± 0.5 log CFU/g και να σταθεροποιείται στους 7.0 log CFU/g στο τέλος της ζύμωσης. Στην περίπτωση της άλμης, ο πληθυσμός των LAB είχε ανοδική τάση και τελικά σταθεροποιήθηκε στους 6.0 ± 0.1 log CFU/mL.

Από την άλλη, ο πληθυσμός των ζυμών στην άλμη, αρχικά παρουσίασε αύξηση και στη συνέχεια μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε στους 4.0 ± 0.1 log/mL μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με την προσθήκη καλλιέργειας του *L. brevis*, η ποσότητα του πληθυσμού των ζυμών στην άλμη έφτασε τους 7.0 ± 0.1 log CFU/mL και με την προσθήκη καλλιέργειας του *L. rhamnosus* στους 6.0 ± 0.1 log CFU/mL, σε όλη τη διαδικασία ζύμωσης. Επιπρόσθετα, η ποσότητα του πληθυσμού των ζυμών στον καρπό κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα σε όλα τα είδη ζύμωσης (στον έλεγχο, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*) και δεν φάνηκε να υπερβαίνει τους 3.0 log CFU/g.

3.8.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για να ελέγχουμε την ομαλή πορεία της ζύμωσης του ελαιόκαρπου είναι η μεταβολή της οξύτητας (pH) της άλμης, το ποσοστό NaCl και η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Όσον αφορά τις μετρήσεις του pH, οι τιμές του pH στην άλμη της ελιάς δεν ξεπέρασαν το 4.30, εύρημα που συνάδει με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για την ασφάλεια του τελικού προϊόντος (Beloborodova et al., 2012). Συγκεκριμένα, η τιμή pH της άλμης από φυσική ζύμωση της ενδογενής μικροχλωρίδας της ελιάς (control) στην αρχή της ζύμωσης (5η ημέρα) ήταν 5.33, 5.43 για ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103, pH=5.40 για ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Levilactobacillus brevis* ATCC8287, pH= 5.60 από ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917 και μετά από 15η ημέρα το pH μειώθηκε σε αποδεκτά όρια (pH < 4.3) [IOOC, International Olive Oil Council. Trade Standard Applying to Table Olives; International Olive Oil Council: Madrid, Spain, 2004]. Καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης το ποσοστό του αλατιού ρυθμιζόταν στο 6% με κάποιες προσθήκες χοντρού αλατιού στην άλμη και τα βαρέλια διατηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου.

3.9 Οργανοληπτική Αξιολόγηση (Sensory Evaluation) επιτραπέζιων ελιών Καλαμάτας που έχουν υποστεί ζύμωση

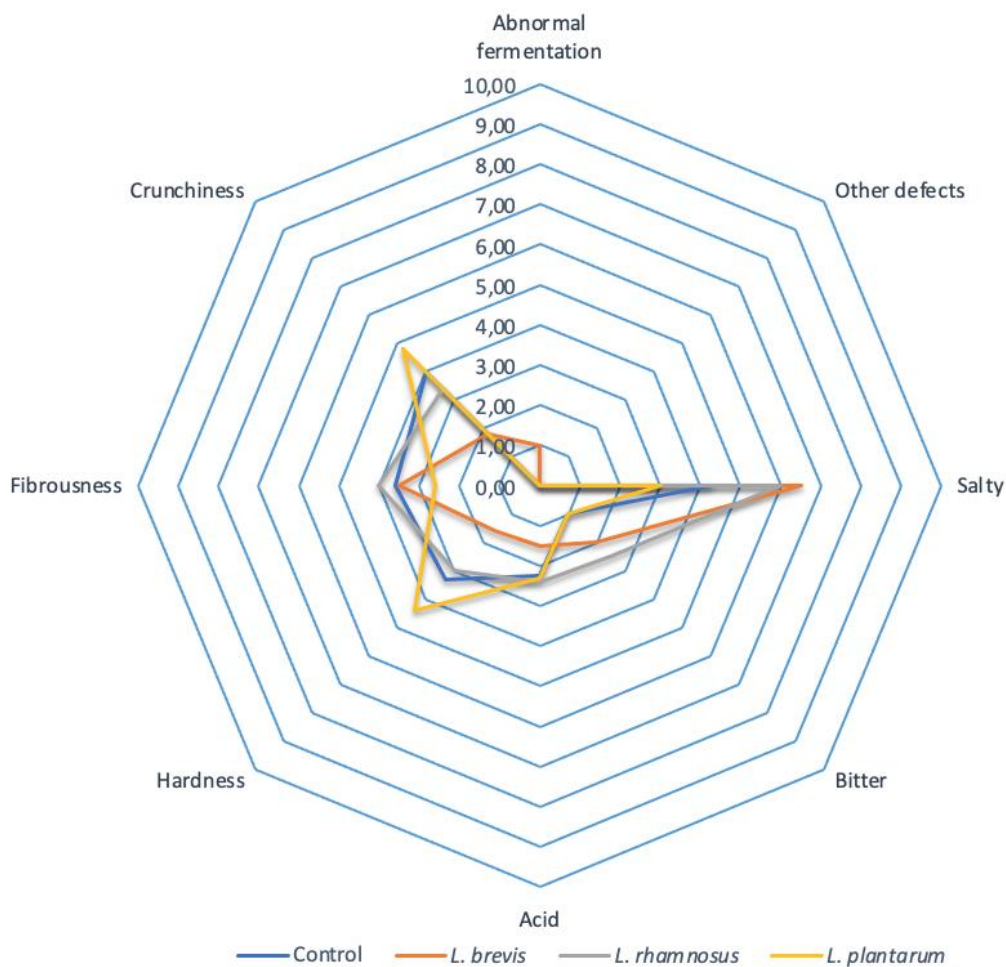
Δεν εντοπίστηκαν δυσάρεστες οσμές, που υποδεικνύουν ανώμαλη ζύμωση (abnormal fermentation) (δηλαδή βουτυρική, σάπια ζύμωση) ή άλλα ελαττώματα από τους συμμετέχοντες σε οποιαδήποτε ομάδα ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση. Συγκεκριμένα, η ζύμωση με την προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας *L. rhamnosus* και εναρκτήριας καλλιέργειας *L. brevis* έδειξε την υψηλότερη βαθμολογία στην αξιολόγηση αλατότητας (salty) σε σύγκριση με τη φυσική ζύμωση της ενδογενής μικροχλωρίδας της ελιάς (control) ($p < 0.05$).

Επιπλέον, η αξιολόγηση των γευστικών αισθήσεων έδειξε ότι οι ζυμώσεις με την προσθήκη *L. rhamnosus* και *L. brevis* σημείωσε υψηλότερη βαθμολογία σε πικρία (bitter) από τη ζύμωση με την προσθήκη *L. plantarum* και τη φυσική ζύμωση με την ενδογενή

μικροχλωρίδα της ελιάς ($p < 0.05$ αντίστοιχα). Όσον αφορά την αξιολόγηση της όξινης γεύσης (Acid), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις ζυμώσεις.

Ακόμα, η ομάδα που υποβλήθηκε σε ζύμωση με την προσθήκη *L. rhamnosus*, σημείωσε υψηλότερη βαθμολογία στην αξιολόγηση των ινώσεων (fibrousness) σύμφωνα με τους συμμετέχοντες σε σύγκριση με τη φυσική ζύμωση της ενδογενούς μικροχλωρίδας της ελιάς (control) ($p < 0.05$). Επιπλέον, η ζύμωση με την προσθήκη *L. plantarum* είχε υψηλότερες βαθμολογίες στην κιναισθητική αίσθηση σκληρότητας (hardness) και τραγανότητας (crunchiness) σε σύγκριση με τα άλλα είδη ζυμώσεων ($p < 0.05$).

Το Σχήμα 9 και Σχήμα 10 αντιπροσωπεύει τις βαθμολογίες στην αισθητηριακή αξιολόγηση των ζυμωμένων επιτραπέζιων ελιών καλαμών



Σχήμα 9 Οι βαθμολογίες στην αισθητηριακή αξιολόγηση των ζυμωμένων επιτραπέζιων ελιών Καλαμάτας.

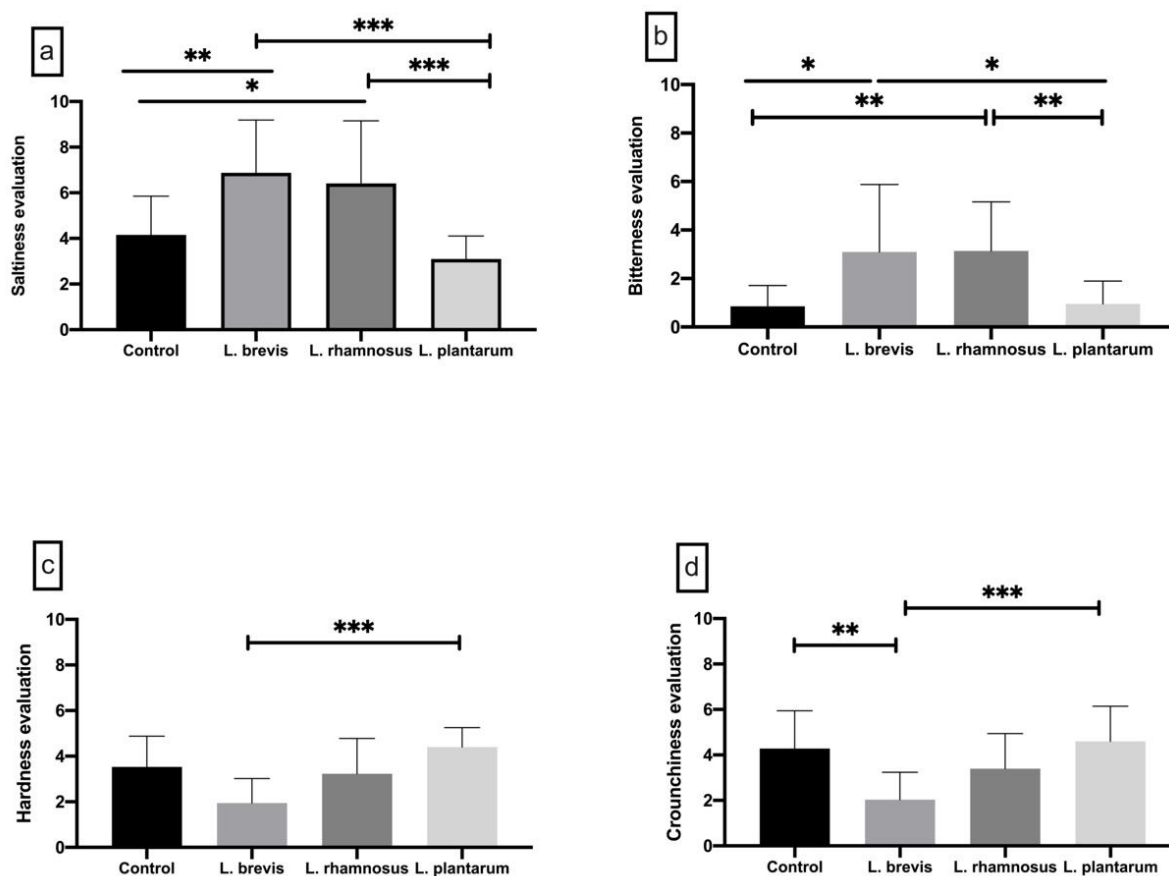
Σύμφωνα με το Σχήμα 9, η αισθητηριακή αξιολόγηση για την αλμυρότητα, την πικρία, τη σκληρότητα και την τραγανότητα, έδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών τύπων ζυμώσεων ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση. Ωστόσο, οι αισθητηριακές περιγραφές για την ινώδη υφή καθώς και για την όξινη γεύση, δεν έδειξαν καμία στατιστική σημαντική διαφορά.

Συγκεκριμένα, η φυσική ζύμωση (control) είχε στατιστικά σημαντικές χαμηλότερες βαθμολογίες στην αξιολόγηση για την αλατότητα σε σύγκριση με τις ζυμωμένες ελιές με την προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* ($p < 0.05$) και *L. rhamnosus* ($p < 0.01$). Επιπλέον, οι ζυμωμένες ελιές με προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* ($p < 0.05$) και *L. rhamnosus* ($p < 0.01$) είχαν υψηλότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές για την αλμύρα σε σύγκριση με τις ζυμωμένες ελιές με την προσθήκη καλλιέργειας *L. plantarum* ($p < 0.001$) (Σχήμα 10a).

Στην περίπτωση αξιολόγησης πικράδας, η φυσική ζύμωση (control) είχε χαμηλότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πικράδα σε σύγκριση με τις ζυμωμένες ελιές με την προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* ($p < 0.05$) και *L. rhamnosus* ($p < 0.01$), ενώ παράλληλα αυτές οι δυο ζυμώσεις σημείωσαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη διαφορά στην πικράδα σε σύγκριση με τις ζυμωμένες ελιές που σχετίζονται με την προσθήκη καλλιέργειας *L. plantarum* ($p < 0.001$ για ζυμωμένες ελιές με *L. rhamnosus* $p < 0.001$ και $p < 0.01$ για τις ζυμωμένες ελιές με *L. brevis*) (Σχήμα 10b).

Στην αξιολόγηση σκληρότητας, οι βαθμολογίες των ζυμωμένων ελιών που σχετίζονται με την προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες από τις ζυμωμένες ελιές που σχετίζονται με την προσθήκη καλλιέργειας *L. plantarum* ($p < 0.001$) (Σχήμα 10c).

Επιπλέον, στην περίπτωση αξιολόγησης τραγανότητας, η φυσική ζύμωση (control) είχε στατιστικά σημαντικές υψηλότερες βαθμολογίες σε σύγκριση με τις ζυμωμένες ελιές που σχετίζονται με την προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* ($p < 0.01$), ενώ οι ζυμωμένες ελιές που σχετίζονται με την προσθήκη καλλιέργειας *L. brevis* είχαν στατιστικά σημαντικές χαμηλότερες βαθμολογίες σε σύγκριση με την προσθήκη καλλιέργειας *L. plantarum* που έχουν υποστεί ζύμωση ($p < 0.001$) (Σχήμα 10d).



Σχήμα 10 Αισθητηριακά δεδομένα που εκφράζονται σε γράφημα ράβδων με βάση τις βαθμολογίες σε μια αδόμητη κλίμακα 1–10. Οι πειραματικές συνθήκες (a,b,c,d) είναι: έλεγχος, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*.

*P < 0.05 χρησιμοποιώντας ANOVA και μετά από πολλαπλές συγκρίσεις διορθώσεις χρησιμοποιώντας τον κανόνα Tukey ή Dunn.

**P < 0.01 χρησιμοποιώντας ANOVA και μετά από πολλαπλές συγκρίσεις διορθώσεις χρησιμοποιώντας τον κανόνα Tukey ή Dunn.

***P < 0.001 χρησιμοποιώντας ANOVA και μετά από πολλαπλές συγκρίσεις διορθώσεις χρησιμοποιώντας τον κανόνα Tukey ή Dunn

3.10 Φαινολικό περιεχόμενο

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι προϊόν μεγάλης οικονομικής σημασίας παγκοσμίως και ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου. Λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας και της περιεκτικότητάς τους σε φυτικές ίνες, αμινοξέα, ακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι επιτραπέζιες ελιές κατέχουν σημαντική θέση στη μεσογειακή διατροφή. Για τη ζύμωση των φυσικών μαύρων ελιών, το LAB και οι ζύμες ανταγωνίζονται για την κυριαρχία. Παρά την οικονομική σημασία της επιτραπέζιας ελιάς, η τεχνολογία ζύμωσης είναι εμπειρική και πολλές φορές μπορεί να οδηγήσει σε διακυμάνσεις στο οργανοληπτικό και φυσικοχημικό της προφίλ στο τελικό προϊόν. Για τη βελτίωση της διαδικασίας ζύμωσης και την παραγωγή σταθερής υψηλής ποιότητας προϊόντος, ο έλεγχος της διαδικασίας είναι απαραίτητος.

Αυτή η εργασία διερεύνησε τη χρήση τριών καλλιέργειών εκκίνησης με προβιοτικό δυναμικό ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά τη διαδικασία ζύμωσης ελληνικού τύπου σε επιτραπέζιες ελιές Καλαμάτας, επιτυγχάνοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση και την ανάπτυξη ενός τελικού προβιοτικού προϊόντος.

Πριν από την ανάλυση NGS προσδιορίσαμε τους μεταβολίτες στις τέσσερις πειραματικές ζυμώσεις:

- 1) φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (control),
- 2) ζύμωση με προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *Levilactobacillus brevis* ATCC8287,
- 3) ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103,
- 4) ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917.

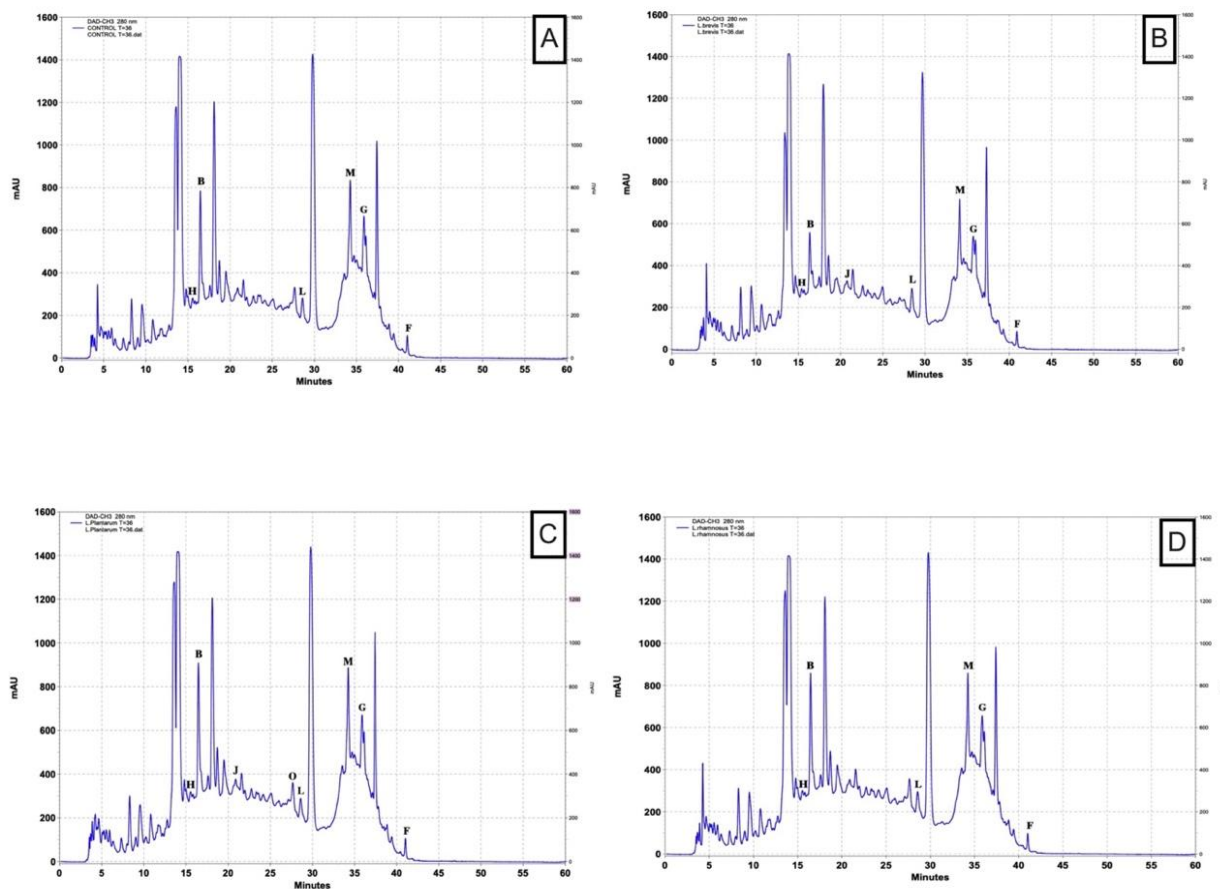
Η δειγματοληψία για την ανάλυση της άλμης από κάθε είδος ζύμωσης πραγματοποιήθηκε σε τυχαία μέρα (36^η). Στον Πίνακα 13, απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν σε κάθε ομάδα ζύμωσης, ενώ το Σχήμα 19 δείχνει το χρωματογράφημα στα 280 nm για κάθε ομάδα ζύμωσης. Μετά από προηγούμενες έρευνες σχετικά με την

παραγωγή των μεταβολιτών φάνηκε ότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυξάνεται σταδιακά αναπτύσσοντας ένα σταθερό πρότυπο κατά τη διαδικασία ζύμωσης. Οι μεταβολίτες μπορούσαν να ταυτοποιηθούν από την πρώτη ημέρα της επώασης των μικροοργανισμών. Επιπλέον, το DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA) είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλες τις διαφορετικές ζυμώσεις. Η υψηλότερη συγκέντρωση (1194.7 ppm) ανιχνεύθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* και η χαμηλότερη (426.8 ppm) με την προσθήκη καλλιέργεια *L. brevis* (Πίνακας 13). Ακόμη, παρόμοια ποσότητα vanillic acid (18.8 – 20 ppm) εντοπίστηκε στη ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια *L. brevis* και με την προσθήκη καλλιέργεια *L. plantarum*, ενώ συγκρίσιμη ποσότητα Benzoic acid (145.5- 150.6 ppm) εντοπίστηκε στα τρία είδη ζυμώσεων με την προσθήκη καλλιέργεια *L. brevis*, *L. plantarum* και *L. rhamnosus* (Πίνακας 13). Παρόμοια ποσότητα 1,2-Dihydroxybenzene (19.5 – 20.8 ppm) καθώς και Ferulic acid (66.6 – 69.4 ppm) βρέθηκε σε όλες τις ζυμώσεις. Επίσης, η ουσία Methylcinnamic acid απομονώθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε όλες τις ζυμώσεις από 182.7 έως 350.4 ppm ενώ το Salicylic acid απομονώθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στη φυσική ζύμωση (control), *L. plantarum*, *L. brevis* και *L. rhamnosus* που κυμαίνονται από 35.9 έως 65. Η ουσία 4-Hydrocinnamic acid ανιχνεύθηκε μόνο στη ζύμωση του *L. plantarum*.

Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, τα αποτελέσματα στον Πίνακα 13 καταδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η προσθήκη των εξεταζόμενων καλλιεργειών εκκίνησης αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (Beloborodova et al., 2012), το Methylcinnamic acid (Natella et al., 1999), το Salicylic acid (El-Esawi et al., 2017), το Ferulic acid (Kikuzaki et al., 2002) και το Benzoic acid (Velika and Kron, 2012) αυξάνουν τη συγκέντρωση και έχουν συνδεθεί με αντιοξειδωτική δράση. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει την επιτυχή χρήση αυτών των ορεκτικών ως προβιοτικών που οδηγούν σε αύξηση της περιεκτικότητας σε φαινολικές ουσίες και ως εκ τούτου σε αύξηση των αντιοξειδωτικών.

Πίνακας 13 Συγκέντρωση (σε ppm) μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στη φυσική ζύμωση μαύρων ελιών, οι ακόλουθες τέσσερις περιπτώσεις.

Name of Standard	Control (ppm)	<i>L. plantarum</i> (ppm)	<i>L. rhamnosus</i> (ppm)	<i>L. brevis</i> (ppm)
(A) 4-Hydroxybenzoic acid	-	-	-	-
(B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid	573.5	1194.7	761.7	426.8
(C) Phenyllactic acid	-	-	-	-
(D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	-	-	-	-
(E) Hydrocinnamic acid	-	-	-	-
(F) Methylcinnamic acid	182.7	288.43	350.4	316.6
(G) Salicylic acid	35.9	46.3	65	58.31
(H) 1,2-Dihydroxybenzene	20.2	19.6	19.5	20.8
(I) 3,4-Dihydrocinnamic acid	-	-	-	-
(J) Vanillic acid	-	18.8	-	20
(K) 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	-	-	-	-
(L) Ferulic acid	27.2	68.7	69.4	66.6
(M) Benzoic acid	63.5	150.6	146.5	145.5
(O) 4-Hydrocinnamic acid	-	82.2	-	-



Σχήμα 11 Χρωματογράμματα στα 280 nm από τα διάφορα είδη ζυμώσεων φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (control) (A), ζύμωση με προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *L. brevis* (B), ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* (C) και ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. rhamnosus* (D).

Φάσμα υψηλής ακρίβειας μάζας της ένωσης, (H) 1,2-Dihydroxybenzene (15.7 λεπτά); (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (16.3 λεπτά); (L) Ferulic acid (28.7 λεπτά); (M) Benzoic acid (34.2 λεπτά); (G) Salicylic acid (36 λεπτά); (F) Methylcinnamic acid (41.3 λεπτά); (J) Βανιλικό οξύ (21.3 λεπτά); (O) 4-Hydrocinnamic acid (27.8 λεπτά).

3.11 Προσδιορισμός της μικροβιακής χλωρίδας στις ελιές με προσδιορισμό αλληλουχίας 16S rRNA

Για την αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας στις πειραματικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας 16S rRNA με nanopore MinION™. Συνολικά, τα δείγματά μας εμφάνισαν αντίστοιχα αποτελέσματα μεταξύ της αλληλουχίας Nanopore και της συμβατικής καλλιέργειας.

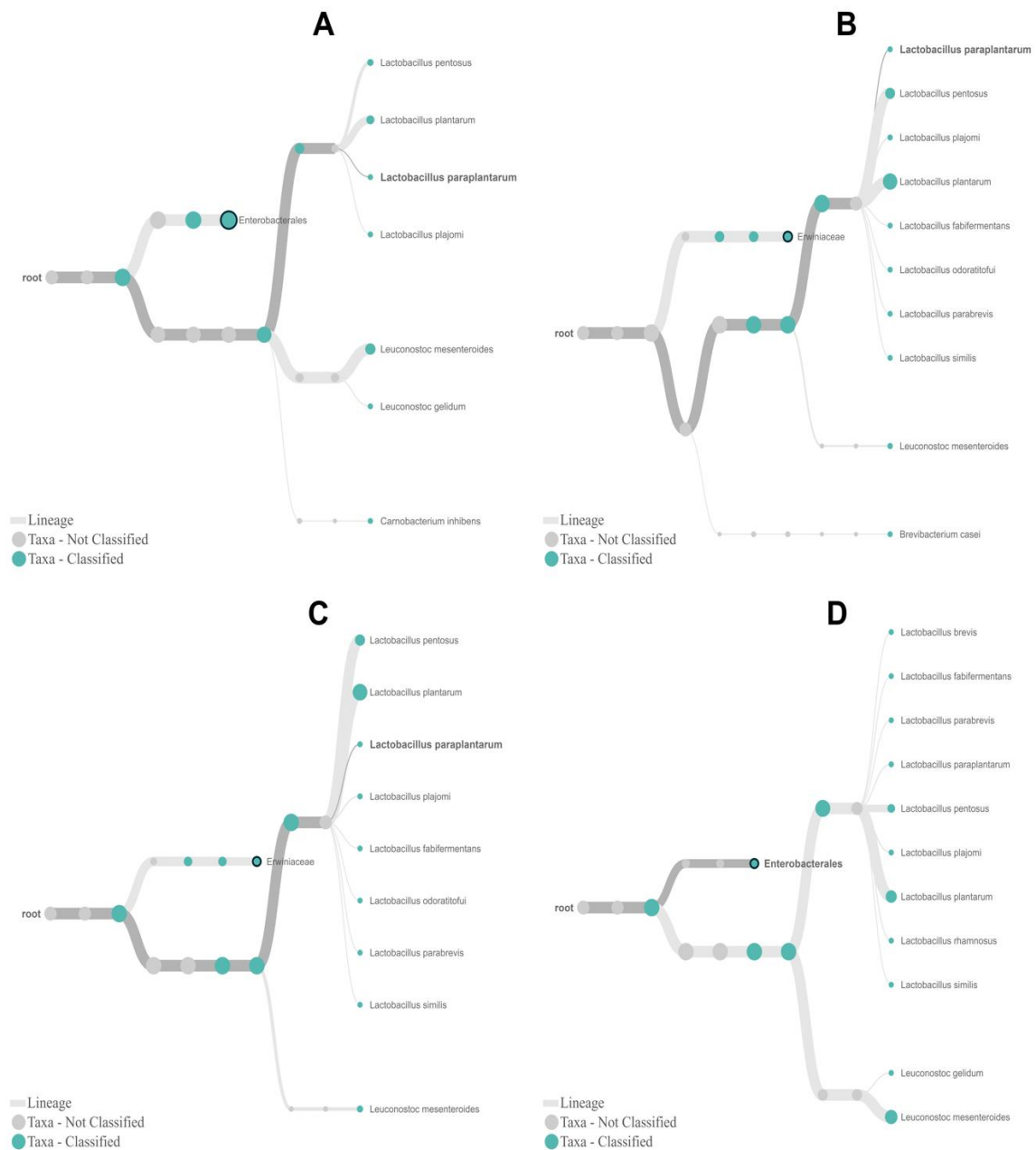
Συγκεκριμένα, ως προς το γένος, ανιχνεύθηκαν *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp και *Enterobacter* spp σε όλα τα δείγματά μας. Τα πιο άφθονα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* συνήθως αναγνωρίζονται τόσο σε ζυμωμένες μαύρες όσο και σε πράσινες ελιές χρησιμοποιώντας είτε την κλασική μικροβιολογία είτε τη μεταγονιδιωματική ανάλυση (Medina et al., 2016; De Castro et al., 2018; Randazzo et al., 2017). Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με έρευνα που βασίζεται στη ζύμωση της ποικιλίας Καλαμάτας (Kazou et al., 2020).

Επιπλέον, η παρουσία του γένους *Enterobacter* spp είναι αρκετά γνωστή και μάλλον συνηθισμένη στη ζύμωση των ελιών. Ωστόσο, πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο πληθυσμός των Εντεροβακτηριδίων ήταν χαμηλότερος από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (<1 log CFU/g) κατά την κλασική μικροβιολογική ανάλυση. Έτσι, η ανίχνευση της οικογένειας *Enterobacteriaceae* στα δείγματα υπογραμμίζει δυνητικά το μειονέκτημα των τεχνικών μεταγονιδιωματικής που βασίζονται στο DNA, που είναι η ενίσχυση του DNA που μπορεί να προέρχεται από νεκρά κύτταρα (Cocolin and Ercolini, 2015).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα πιο κυρίαρχα είδη σε όλα τα δείγματά μας ήταν οι *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus plajomi*, *Lactiplantibacillus paraplantarum* (Σχήμα 4 και Πίνακας 2-5). Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα για τα LAB στις επιτραπέζιες ελιές, τα είδη *L. plantarum* και *L. pentosus* και *L. brevis* ήταν τα πιο άφθονα, ενώ τα είδη *L. coryniformis*, *L. paraplantarum* και *Lc. mesenteroides* ήταν σε μικρότερη έκταση (Portilha-Cunha et al., 2020). Ωστόσο, στην ομάδα ζύμωσης με την προσθήκη *Lactobacillus brevis*, (Πίνακας 2) εντοπίστηκαν επίσης τα είδη *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus brevis*. Το ίδιο ισχύει και για την ομάδα ζύμωσης με την προσθήκη *Lactobacillus rhamnosus* επιτυγχάνοντας ωστόσο πολύ χαμηλότερα διαβάσματα για αυτά τα είδη (Πίνακας 4).

Τα είδη *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus brevis* έχουν εντοπιστεί στο παρελθόν σε πράσινες ελιές της Αλγερίας, της Ιταλίας και της Ισπανίας, καθώς και σε φυσικές μαύρες και πράσινες ελιές της Αλγερίας, της Ιταλίας, της Τουρκίας και του Μαρόκου αντίστοιχα (Lucena-Adrós et al., 2014; Lucena-Adrós et al., 2019; Lucena-Adrós et al., 2015; Randazzo et al., 2018; Ghabbour et al., 2011; Randazzo et al., 2004).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το *Lactobacillus spp.* κυριαρχεί σε μια σειρά από μεθόδους επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς. Ωστόσο, αυτή η κυριαρχία μπορεί επίσης να είναι προϊόν εκτενέστερης μελέτης που έχει επικεντρωθεί σε αυτά, αφήνοντας πολλά άλλα είδη ανεξερεύνητα. Ωστόσο, η αυξημένη προσβασιμότητα σε πιο ακριβείς τεχνικές ταυτοποίησης (μοριακές αναλύσεις), καθώς και η ύπαρξη ευρέως προσβάσιμων και πυκνοκατοικημένων βάσεων δεδομένων γονιδιωματικών αλληλουχιών, μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο έχουν γίνει αρκετές μελέτες για νέα είδη τα τελευταία χρόνια. Αν και η εις βάθος εξέταση απομονωμένων μικροβίων μπορεί να είναι δυνατή με τη χρήση τεχνικών προσδιορισμού αλληλουχίας και μετα-ανάλυσης επόμενης γενιάς, όπως η μεταγονιδιωματική και η μετατραγραφική, αυτό το ερευνητικό θέμα δεν έχει ακόμη διερευνηθεί διεξοδικά.



Σχήμα 12 Τα περισσότερα κυρίαρχα είδη σε κάθε δείγμα με την αλληλουχία 16S rRNA. **A:** φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (έλεγχος). **B:** ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. plantarum* ATCC14917 **C:** ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. rhamnosus* GG ATCC53103 **D:** ζύμωση με την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *L. brevis* ATCC8287

Πίνακας 14 Η αλληλουχία Nanopore MinION που προκύπτει από τη ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Levilactobacillus brevis* ATCC8287.

<i>Taxon</i>	<i>MinION Reads Total</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	42.451
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	18.122
<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	921
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	817
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	559
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	284
<i>Levilactobacillus brevis</i>	190
<i>Levilactobacillus parabrevis</i>	147
<i>Latilactobacillus graminis</i>	105
<i>Secundilactobacillus odoratitofui</i> DSM 19909 = JCM 15043	99
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	8
<i>Lactiplantibacillus modestisalitolerans</i>	72
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	71
<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	71
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	69
<i>Companilactobacillus tuccei</i>	64
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	57
<i>Lentilactobacillus rapi</i>	54
<i>Levilactobacillus hammesii</i>	51

Πίνακας 15 Η αλληλουχία Nanopore MinION που προκύπτει από τη ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917.

Taxon	MinION Reads Total
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	45.886
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	23.335
<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	878
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	593
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	283
<i>Levilactobacillus parabrevis</i>	178
<i>Levilactobacillus fructivorans</i>	96
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	93
<i>Levilactobacillus koreensis</i> JCM 16448	92
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	91
<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	87
<i>Companilactobacillus versmoldensis</i>	67
<i>Lactiplantibacillus modestisalitolerans</i>	60
<i>Latilactobacillus graminis</i>	57
<i>Lentilactobacillus rapi</i>	49
<i>Companilactobacillus tuceti</i>	48
<i>Paucilactobacillus vaccinostercus</i>	39
<i>Secundilactobacillus mixtipabuli</i>	37

Πίνακας 16 Η αλληλουχία Nanopore MinION που προκύπτει από ζύμωση με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103.

Taxon	MinION Reads Total
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	68.410
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	34.893
<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	1.291
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	908
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	385
<i>Levilactobacillus parabrevis</i>	292
<i>Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis</i>	155
<i>Levilactobacillus fructivorans</i>	134
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	131
<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	131
<i>Levilactobacillus koreensis</i> JCM 16448	130
<i>Lactiplantibacillus modestisalitolerans</i>	86
<i>Latilactobacillus graminis</i>	83
<i>Companilactobacillus versmoldensis</i>	73
<i>Lentilactobacillus rapi</i>	68
<i>Companilactobacillus tuceti</i>	58
<i>Companilactobacillus musae</i>	52
<i>Companilactobacillus furfuricola</i>	51

Πίνακας 17 Η αλληλουχία Nanopore MinION που προκύπτει από φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα της ελιάς (έλεγχος).

Taxon	MinION Reads Total
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	45.218
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	16.695
<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	744
<i>Lactiplantibacillus paraplanatarum</i>	693
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	294
<i>Levilactobacillus parabrevis</i>	141
<i>Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis</i>	111
<i>Latilactobacillus graminis</i>	94
<i>Levilactobacillus koreensis JCM 16448</i>	85
<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	85
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	74
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	72
<i>Lentilactobacillus rapi</i>	61
<i>Lactiplantibacillus modestisalitolerans</i>	56
<i>Paucilactobacillus vaccinostercus</i>	54
<i>Companilactobacillus tuceti</i>	45
<i>Companilactobacillus versmoldensis</i>	35
<i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i>	35

3.12 Συμπεράσματα από τις ζυμώσεις των επιτραπέζιων ελιών.

Οι επιτραπέζιες ελιές κατέχουν σημαντική οικονομική αξία παγκοσμίως, ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες. Στη ζύμωση φυσικών μαύρων ελιών, το LAB και οι ζύμες ανταγωνίζονται για την κυριαρχία. Παρά την οικονομική σημασία των επιτραπέζιων ελιών, η τεχνολογία ζύμωσης είναι εμπειρική και συχνά μπορεί να οδηγήσει σε διακυμάνσεις στο οργανοληπτικό και φυσικοχημικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Για τη βελτίωση της διαδικασίας ζύμωσης και την παραγωγή ενός σταθερού, υψηλής ποιότητας προϊόντος, ο έλεγχος της διαδικασίας είναι απαραίτητος. Η χρήση του *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC53103, του *Levilactobacillus brevis* ATCC8287 και του *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917 ως καλλιέργειες εκκίνησης για τη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών Καλαμάτας, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί για τα προβιοτικά αποδεκτά. Η προσθήκη των επιλεγμένων καλλιεργειών εκκίνησης οδήγησε σε αύξηση όλων των μετρούμενων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες σχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το DL-υδροξυφαινυλλακτικό οξύ (OH-PLA) εντοπίστηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση σε όλες τις διαφορετικές διεργασίες ζύμωσης. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του εργαλείου MinION™ NGS νανοπόρων, τα πιο άφθονα γένη που εντοπίστηκαν στις ζυμωμένες επιτραπέζιες ελιές Καλαμάτας ήταν οι *Lactobacillus* και *Leuconostoc*. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά αυτά τα συγκεκριμένα ορεκτικά με προβιοτικό δυναμικό για τη ζύμωση των ελιών. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για επιβεβαίωση και για την ανάπτυξη ενός τελικού προβιοτικού προϊόντος.

Προηγούμενος χαρακτηρίσαμε αυτά τα βακτήρια γαλακτικού οξέος με προβιοτικό και αντιοξειδωτικό δυναμικό. Αυτά τα βακτήρια γαλακτικού οξέος θα πρέπει να έχουν διπλό ρόλο ως καλλιέργειες εκκίνησης με προβιοτικό δυναμικό, γεγονός που επιτρέπει τον έλεγχο της διαδικασίας ζύμωσης, αλλά και την παράδοση ενός τελικού προϊόντος με προβιοτικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, αυτά τα βακτήρια αναμένεται να επιταχύνουν τη διαδικασία ζύμωσης σε σύγκριση με τα παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα βακτήρια, κάτι που είναι κρίσιμος παράγοντας για τη βιομηχανία για την επίτευξη αποτελεσματικών και χαμηλού κόστους παραγωγικών διαδικασιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που τα συγκεκριμένα βακτήρια γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά τη ζύμωση της μαύρης ελιάς Καλαμάτας, με αποτέλεσμα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν που δεν έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα. Επιπλέον, για την

αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας αυτών των ζυμωμένων ελιών Καλαμάτας, χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) για την αναγνώριση των βακτηρίων και τον προσδιορισμό προέλευσης με βάση την αλληλουχία 16S rRNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές

Τα LAB είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί για τη ζύμωση και τη συντήρηση των τροφίμων. Η σημασία τους συνδέεται κυρίως με την ασφαλή μεταβολική τους δραστηριότητα ενώ καλλιεργούνται σε τρόφιμα χρησιμοποιώντας τη διαθέσιμη ζάχαρη για την παραγωγή οργανικών οξέων και άλλων μεταβολιτών. Η αυξανόμενη κοινωνική ζήτηση για λιγότερο επεξεργασμένα προϊόντα διατροφής, με παράλληλη διατήρηση της ποιότητας, της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής αυτών των προϊόντων, έχει εγείρει το ζήτημα της αντικατάστασης των χημικών συντηρητικών. Σε αυτό το πλαίσιο, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος καθώς και οι μεταβολίτες τους είναι εναλλακτικές λύσεις ενδιαφέροντος για χρήση στα τρόφιμα ως βιοπροστατευτικά εργαλεία για την καταπολέμηση των παθογόνων μικροβίων και για την κάλυψη των απαιτήσεων των καταναλωτών.

Η μέθοδος HPLC-UV / DAD έχει βελτιστοποιηθεί, επιτρέποντας τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό 14 φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων που προέρχονται από το LAB. Ωστόσο, μόνο 6 φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στα CFS. Από τα φάσματα που προέκυψαν, παρατηρήθηκαν αρκετές κορυφές που δεν έχουν προηγουμένως αναγνωριστεί. Η βελτιστοποίηση των αναλυτικών δοκιμασιών μπορεί να προσφέρει ισχυρά εργαλεία για την ταυτοποίηση άγνωστων προς το παρόν ενώσεων που παράγονται από στελέχη LAB, τα οποία εμπλέκονται στους αντιμικροβιακούς μηχανισμούς έναντι διαφορετικών παθογόνων τροφίμων και μικροοργανισμών αλλοίωσης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την επικύρωση της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου σε πραγματικά συστήματα τροφίμων και τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης όχι μόνο σε εμβολιασμένα βακτήρια, αλλά και στη φυσική μικροχλωρίδα από διαφορετικές μητρες τροφίμων.

Οι προσδοκίες των προβιοτικών βακτηρίων έχουν γίνει οι πιο απαιτητικές για οποιαδήποτε βακτηριακή ομάδα. Τα προβιοτικά αποτελούν πολύ σημαντικό στοιχείο για τα καθημερινά προϊόντα υγιεινής διατροφής και η παγκόσμια αγορά τους εκτιμάται παραπάνω από 28,8 δισεκατομμύρια δολάρια Αμερικής έως το 2015 (Mills et al., 2011). Το καταναλωτικό κοινό ανησυχεί πολύ για τα χημικά συντηρητικά και τα επεξεργασμένα τρόφιμα, παρόλο που παρέχει έναν βαθμό ασφάλειας και ποικιλομορφίας τροφίμων που όμοιο του δεν έχει ξαναδεί. Ωστόσο, οι καταναλωτές αποδέχονται εύκολα το LAB ως φυσικό τρόπο διατήρησης των

τροφίμων και προώθησης της υγείας τους. Την τελευταία δεκαετία το ενδιαφέρον για τις βακτηριοσίνες που παράγεται από το LAB έχει αυξηθεί δραματικά (Hoover and Steenson, 1993). Πολλές βακτηριοσίνες αναστέλλουν την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα. Επιπλέον, τα βακτηριοκινογόνα LAB συνδέονται και χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στην επεξεργασία τροφίμων. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη παθογόνων στη φύση, επομένως η ειδική χρήση μιας συγκεκριμένης βακτηριοσίνης δεν μπορεί να εξαλείψει όλα τα βακτηριακά παθογόνα. Τα τελευταία χρόνια, ο αυξημένος αριθμός των πολυανθεκτικών παθογόνων έχει γίνει σοβαρό πρόβλημα. Η ανάπτυξη μιας νέας γενιάς αντιμικροβιακών παραγόντων είναι ένα δύσκολο έργο. Εφαρμόζονται βιοτεχνολογικές μέθοδοι για τη δημιουργία νέων ή πολυλειτουργικών βακτηριοσινών, άρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως στα τρόφιμα, την κτηνοτροφία και την ιατρική.

Τόσο οι παραδοσιακές μέθοδοι κυτταροκαλλιέργειας όσο και οι εναλλακτικές τεχνικές (άμεση απεικόνιση και οπτική απαρίθμηση, μέθοδοι απαρίθμησης με βάση νουκλεϊκά οξέα και κυτταρομετρία ροής και ταξινόμηση κυττάρων), προσφέρουν πλεονεκτήματα και περιορισμοί για την απαρίθμηση προβιοτικών μικροοργανισμών (Davis, 2014). Οι νέες μέθοδοι και τεχνικές δίνουν σημαντική υπόσχεση για ποσοτικοποίηση ζωντανών μικροοργανισμών σε διαφορετικές μεταβολικές καταστάσεις. Αλλά η προβιοτική αποτελεσματικότητα δεν μπορεί να προβλέπεται αποκλειστικά με βάση τα βιώσιμα κύτταρα. Salminen et al. 1999 ανέφερε ότι τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος από ζωμό νεκρών και ζωντανών κυττάρων συνέβαλαν στην αποτελεσματικότητα των προβιοτικών.

Πολύ λίγοι μικροοργανισμοί έχουν υποβληθεί σε ενδεδειγμένες *in vitro* μελέτες που επιβεβαιώνουν τη συγκεκριμένη δραστηριότητά τους για την προαγωγή της υγείας, και ακόμη λιγότεροι έχουν υποβληθεί στη συνέχεια και έχουν περάσει τις κατάλληλες δοκιμές σε ανθρώπους (Chikindas et al., 2014). Επιπλέον, τα προβιοτικά μπορεί να είναι επικίνδυνα, καθώς έχουν συνδεθεί με αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας εάν χορηγηθούν σε σοβαρά ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Besselink et al., 2008). Απαιτούνται μεταγενέστερες μελέτες για την αξιολόγηση της δραστηριότητας προαγωγής της υγείας των προβιοτικών βακτηρίων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbasiliasi, S.; Tan, J.; Tengkuibrahim, T.; Bashokouh, F. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. *RSC Adv* 7, 29395–29420.
2. Abdulhussain Kareem, R., & Hadi Razavi, S. (2019). Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *Journal of Food Safety* (40),1-12.
3. Ahmed-Sadiq F., Yan B., Tian F., Zhao J., Zhang H., et al. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: Comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18: 1403-1436.
4. Alegría A, Delgado S, Rocés C, López B, Mayo B (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol* 143: 61–66. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029)
5. Alshammari E., Patel M., Sachidanandan M., Kumar P., Adnan M. (2019). Potential evaluation and health fostering intrinsic traits of novel probiotic strain *Enterococcus durans* F3 isolated from the gut of fresh water fish *Catla catla*. *Food Sci. Anim. Resour.* 39:844–861. doi: 10.5851/kosfa.2019.e57.
6. Altena, K.; Guder, A.; Cramer, C.; Bierbaum, G. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: Organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol* 66, 2565–2571.
7. Alvarez-Sieiro, P.; Montalban-Lopez, M.; Mu, D.D.; Kuipers, O.P (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Appl. Microbiol. Biot* 100, 2939–2951.
8. Amanatidou, A. (2001), High oxygen as an additional factor in food preservation, Wageningen University dissertation no.3059, The Netherlands.
9. Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J., Margolles, A. and Mayo, B. (2008). Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14, 6-15. <http://dx.doi.org/10.1159/000106077>
10. Argyri, A.A.; Nisiotou, A.A.; Mallouchos, A.; Panagou, E.Z.; Tassou, C.C. (2014). Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as

- starters in the fermentation of heat shocked green olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 171, 68–76.
11. Argyri, K.; Doulgeraki, A.I.; Manthou, E.; Grounta, A.; Argyri, A.A.; Nychas, G.J.E.; Tassou, C.C. (2020). Microbial Diversity of Fermented Greek Table Olives of Halkidiki and Konservolia Varieties from Different Regions as Revealed by Metagenomic Analysis. *Microorganisms*, 8, 1241.
 12. Ashenafi, M. (1991). Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology* 8.4, 303-310.
 13. Axelsson L. (2004). Lactic Acid Bacteria Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Marcel Dekker, New York. 1- 66.
 14. Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology (Third εκδ.). New York: Marcel Dekker. Lindgren, S. E. (1990). "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.". *FEMS microbiology reviews* 7.1-2 , 149-163.
 15. Ayivi, R.D.; Gyawali, R.; Krastanov, A.; Aljaloud, S.O.; Worku, M.; Tahergorabi, R.; Silva, R.C.d.; Ibrahim, S.A. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy I*, 202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>
 16. Azcarate-Peril, M. A.; Altermann, E.; Yong, J. G.; Tallon, R.; Sanozky-Dawes, R. B.; Pfeiler, E. A.; O'Flaherty, S.; Buck, B. L.; Dobson, A.; Duong, T.; Miller, M. J.; Barrangou, R.; Klaenhammer, T. R. (2008). Analysis of the Genome Sequence of *Lactobacillus Gasseri* ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (15), 4610–4625. <https://doi.org/10.1128/AEM.00054-08>.
 17. Azizi, F.; Habibi Najafi, M.B.; Edalatian Dovom, M.R. (2017). The Biodiversity of *Lactobacillus* Spp. from Iranian Raw Milk Motal Cheese and Antibacterial Evaluation Based on Bacteriocin-Encoding Genes. *AMB Express*. 7, 176.
 18. Baldwin, C., Millette, M., Oth, D., et al., (2010). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis, *Nutrition and Cancer*, 62:371–378.
 19. Barboza N and Usaga J (2020). Lactic Acid Bacteria (LAB) Applications in the Food Industry: Probiotic Foods-A Mini Review. *J Nutr Food Sci* 3: 019.
 20. Barcenilla, C.; Ducic, M.; López, M.; Prieto, M.; Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Sci.*, 183, 108661.

21. Beloborodova, N.; Bairamov, I.; Olenin, A.; Shubina, V.; Teplova, V.; Fedotcheva, N. (2012). Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J. Biomed. Sci.* 19, 89.
22. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL et al. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal.* 11: 259- 274.
23. Bernet-Carnard M.F., Lievin V., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L., Hudault S. (1997). The human *L. acidophilus* strain LA1 secretes a non-bacteriocin anti-bacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2747–2753. doi: 10.1128/aem.63.7.2747-2753.1997.
24. Besselink, M.G., van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, H., Timmerman, H.M., Nieuwen- huijs, V.B., Bollen, T.L., van Ramshorst, B., Witterman, B.J.M., Rosman, C., Ploeg, R.J., Brink, M.A., Schaapherder, A.F.M., Dejong, C.H.C., Wahab, P.J., van Laarhoven, C.J.H.M., van der Harst, E., van Eijck, C.H.J., Cuesta, M.A., Akkermans, L.M.A. and Gooszen, H.G. (2008) Probiotic Prophylaxis in Predicted Severe Acute Pancreatitis: A Ran- domised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *The Lancet*, 371, 651-659. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60207-x](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60207-x)
25. Beukes EM, Bester BH and Mostert JF. (2001). The Microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology.* 63: 189-197.
26. Bhattacharya, D.; Nanda, P.K.; Pateiro, M.; Lorenzo, J.M.; Dhar, P.; Das, A.K. (2022). Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. *Microorganisms*, 10, 2058. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102058>
27. Biavati, B. (2001). Bifidobacteria. In: Biavati B, Bottazzi V, Morelli L, Schiavi C (eds) *Microorganisms as health supporters.* Mofin-Alce, Novara, pp 10–33
28. Bintis T (2018) Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol* 5: 1065
29. Bintis T, Vafopoulou-Mastrojiannaki A, Litopoulou- Tzanetaki, E et al. (2003). Protease, Peptidase and Esterase Activities by Lactobacilli and Y east Isolates from Feta Cheese Brine. *Journal of Applied Microbiology.* 95(1): 68-77.
30. Bintis, T. (2018). Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures: An Update in Their Metabolism and Genetics. *AIMS Microbiol.* 4 (4), 665–684 <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>.

31. Blana, V.A.; Polymeneas, N.; Tassou, C.C.; Panagou, E.Z. (2016). Survival of potential probiotic lactic acid bacteria on fermented green table olives during packaging in polyethylene pouches at 4 and 20 °C. *Food Microbiol.* 53, 71–75.
32. Bonatsou, M.; Paramithiotis, S.; Panagou, E.Z. (2018). Evolution of yeast consortia during the fermentation of Kalamata natural black olives upon two initial acidification treatments. *Front. Microbiol.* 8, 2673.
33. Bringel, F. (1998). Carbamoylphosphate and Natural Auxotrophies in Lactic Acid Bacteria. *Le Lait.* 78(1): 31-37.
34. Brosnan, B.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Furey, A. (2012). Rapid Identification, by Use of the LTQ Orbitrap Hybrid FT Mass Spectrometer, of Antifungal Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2983–2995.
35. Brosnan, B.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Furey, A.A. (2014). Comprehensive Investigation into Sample Extraction and Method Validation for the Identification of Antifungal Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria Using HPLC-UV/DAD. *Anal. Methods.* 6, 5331–5344.
36. Brown, N.; John, J. A.; Shahidi, F. (2019). Polyphenol Composition and Antioxidant Potential of Mint Leaves. *Food Prod. Process. Nutr.* 1, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0001-8>
37. Bruno-Barcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., et al., (2004), Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal Lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity, *Applied and Environmental Microbiology*, 70:4702–4710.
38. Bruno-Barcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., et al., (2004). Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal Lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity, *Applied and Environmental Microbiology*, 70:4702–4710.
39. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., et al., (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292: G315-22.
40. Caplice E and Fitzgerald GF. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 50: 131- 149.

41. Caroch, M and Ferreira, I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25.
42. Carr FJ, Chill D and Maida N (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28:281–370. doi:[10.1080/1040-840291046759](https://doi.org/10.1080/1040-840291046759)
43. Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; Ouakrim, D. A.; Oliveira, T. C.; Struelens, M. J.; Suetens, C.; Monnet, D. L. (2019). Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19 (1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
44. Chaalel A, Riazi A, Dubois-Dauphin R, Thonart P (2015). Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac J Trop Dis* 5:474–482
45. Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2002). Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5656–5662. doi:10.1128/aem.68.11.5656-5662.2002
46. Chen H, Hayek S, Guzman JR et al. (2012). The Microbiota Is Essential for the Generation of Black Tea The aflavins Derived Metabolites. *PloS One.* 7(12).
47. Chikindas, M.L. (2014). Probiotics and Antimicrobial Peptides: The Creatures’ and Substances’ Future in the Twenty- First Century: An Opinion Letter. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 69-72. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-014-9161-7>
48. Choi, S.J.; Yang, S.Y.; Yoon, K.S. (2021). Lactic acid bacteria starter in combination with sodium chloride controls pathogenic *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, and EHEC) in kimchi. *Food Microbiol.* 100, 103868.
49. Cintas LM, Casaus MP, Herranz C et al. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International.* 7: 281- 305
50. Cizeikiene, D and Jagelaviciute, J. (2021). Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 13, 1387–1403.
51. Cocolin, L.; Ercolini, D. (2015). Zooming into food-associated microbial consortia: A ‘cultural’ evolution. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 43–50.

52. Comunian, R.; Daga, E.; Dupre, I.; Paba, A.; Devirgiliis, C.; Piccioni, V.; Perozzi, G.; Zonenschain, D.; Rebecchi, A.; Morelli, L.; De Lorentiis, A.; Giraffa, G. (2010). Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 151-156
53. Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3060–3067. doi: 10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005.
54. Corsetti, A.; Perpetuini, G.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. (2012). Application of Starter Cultures to Table Olive Fermentation: An Overview on the Experimental Studies. *Front. Microbiol.* 3, 248.
55. Cotter PD, Hill C and Ross RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3:777–788. doi:10.1038/nrmicro1273
56. Cotter PD, Ross RP and Hill C (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11(2):95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
57. Cousin S, Gulat-Okalla M-L, Motreff L, Gouyette C, Bouchier C *et al.* (2012). *Lactobacillus gigeriorum* sp. nov., isolated from chicken crop. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:330–334.
58. Curioni PMG and Bosset JO. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J* 12(12):959–984. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00124-3).
59. D’Aimmo, M.R., Modesto, M. and Biavati, B. (2007). Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacterium Spp. Isolated from Dairy and Pharmaceutical Products. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 35-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.003>
60. Dal Bello, F.; Hertel, C. (2006). Oral Cavity as Natural Reservoir for Intestinal Lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.002>.
61. Dal Bello, F.; Hertel, C. (2006). Oral Cavity as Natural Reservoir for Intestinal Lactobacilli. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.002>.
62. Davis, C. (2014). Enumeration of Probiotic Strains: Review of Culture-Dependent and Alternative Techniques to Quantify Viable Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 9-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.012>

63. De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 78–90. doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00259-4
64. De Angelis, M.; Campanella, D.; Cosmai, L.; Summo, C.; Rizzello, C.G.; Caponio, F. (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of *Bella di Cerignola* table olives. *Food Microbiol.* 52, 18–30.
65. De Bellis, P.; Valerio, F.; Sisto, A.; Lonigro, S.L.; Lavermicocca, P. (2010). Probiotic table olives: Microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 6–13.
66. De Castro, A.; Sánchez, A.; López-López, A.; Cortés-Delgado, A.; Medina, E.; Montaña, A. (2018). Microbiota and Metabolite Profiling of Spoiled Spanish-Style Green Table Olives. *Metabolites* 8, 73.
67. De Champs C., Maroncle N., Balestrino D., Rich C., Forestier C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus LCR35, after oral consumption. *J. Clin. Microbiol.* 41:1270–1273.
68. De Freire Bastos, M.D.C.; Varella Coelho, M.L.; da Silva Santos, O.C. (2015). Resistance to Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Microbiology* 161, 683–700.
69. De Vuyst L, Avonts L and Makras E. (2004). Probiotics, Prebiotics and Gut Health. Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. 17: 416-482.
70. De Vuyst L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology.* 38: 105-112.
71. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J* 16(9):1058–1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.026>
72. Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., et al., (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: updated systematic review with meta-analysis, *World Journal of Gastroenterology*, 21: 3072-3084.
73. DOEPEL, Interprofessional Association for Table Olives. 2020. Available online: https://olivetreeroute.gr/wp-content/uploads/Studies_Publications_017a.pdf (accessed on 25 November 2023).

74. Doron S., Snyderman D.R., Gorbach S.L. (2005). *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol.Clin.N.Am.* 34:483–498. doi: 10.1016/j.gtc.2005.05.011.
75. Doulgeraki, A.I.; Hondrodinou, O.; Iliopoulos, V.; Panagou, E.Z. (2012). Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black Conservolea olives in polyethylene pouches. *Food Control* 2012, 26, 49–57.
76. Duar RM., Lin XB., Zheng JZ., Martino ME., Grenier T., et al. (2017). Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev* 41: 27-48.
77. Dykstra, NS., Hyde, L., Adawi, D., et al., (2011). Pulse probiotic administration induces repeated small intestinal Muc3 expression in rats, *Pediatric Research*, 69:206-11.
78. El-Esawi, M.A.; Elansary, H.O.; El-Shanhorey, N.A.; Abdel-Hamid, A.M.; Ali, H.M.; Elshikh, M.S. (2017). Salicylic acid-regulated antioxidant mechanisms and gene expression enhance rosemary performance under saline conditions. *Front. Physiol.* 8, 716.
79. Elyass, M.E.; Shigidi, M.T.; Attitalla, I.H.; Mahdi, A.A. (2017). Characterization and optimization of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented beef (Shermout). *Open J. Appl. Sci.* 2017, 7, 83–97.
80. European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary Importance. *EFSA J.*, 10, 2740.
81. Fak F and Backhed F. (2012). *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. *PLoS One*, 7:e46837.
82. Fang, Z.; Hongfei, Z.; Junyu, Z.; Dziugan, P.; Shanshan, L.; Bolin, Z. (2015). Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Traditional Chinese Cheese. *Ann. Microbiol.* 65, 1419–1426
83. FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/
84. Fenster, C.P.; Weinsier, R.L.; Darley-Usmar, V.M.; Patel, R.P. (2002). Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: The role of oxidant stress. *Obes. Res.* 10, 964–968.
85. Field, D.; Cotter, P.; Hill, C.; Ross, R.P. (2007). Bacteriocin Biosynthesis, Structure and Function. In *Research and Applications in Bacteriocins*; Riley, M.A., Gillor, O., Eds.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, pp. 5–37.
86. Flórez, A.B., Danielsen, M., Korhonen, J., Zyckal, J., von Wright, A., Bardowski, J. and Mayo, B. (2007). Antibiotic Survey of *Lactococcus lactis* Strains to Six Antibiotics by

- Etest and Establishment of New Susceptibility-Resistance Cut-Off Values. *Journal of Dairy Research*, 74, 262-268. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029907002543>
87. Ford, A., Quigley, E., Lacy, B., et al., (2014). Efficacy of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation: Systematic Review and Meta- analysis, *The American Journal of Gastroenterology*, 109:1547-61.
 88. Forestier C., De Champs C., Vatoux C., Joly B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: In vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152:167–173. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01188-3.
 89. Fraunhofer ME, Geißler AJ, Behr J, Vogel RF. (2019). Comparative genomics of *Lactobacillus brevis* reveals a significant plasmidome overlap of brewery and insect isolates. *Curr Microbiol* 76:37–47.
 90. Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T. (1992). Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int J Syst Bacteriol.* 42:487–491.
 91. Fukao, M. and Yajima, N. (2012). Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Lactobacilli. In: Pana, M., Ed., *Antibiotic Resistant Bacteria—A Continuous Challenge in the New Millennium*, InTech. <http://cdn.intechopen.com/pdfs/34707.pdf>
 92. Fusieger, A.; Martins, M. C. F.; de Freitas, R.; Nero, L. A.; de Carvalho, A. F. (2020). Technological Properties of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* Bv. *Diacetyllactis* Obtained from Dairy and Non-Dairy Niches. *Brazilian J. Microbiol* 51 (1), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00182-3>.
 93. Gabrielsen, C.; Brede, D.A.; Hernández, P.E.; Nes, I.F.; Diep, D.B. (2012). The Maltose ABC Transporter in *Lactococcus lactis* Facilitates High-Level Sensitivity to the Circular Bacteriocin Garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2908–2915.
 94. Gänzle MG. Fermented Foods. In: Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C (editors). (2019). *Food Microbiol. Fundam. Front*, 5th ed. ASM Press; pp. 855–900.
 95. Gao, Y.; Jia, S.; Gao, Q.; Tan, Z. (2010). A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Food Control*, 21, 76–81.
 96. García-Quintáns N, Repizo G, Martín M, Magni C, López P. (2008). Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetyllactis* CRL264 by

- acidic growth. *Appl Environ Microbiol* 74(7):1988–1996. <https://doi.org/10.1128/AEM.01851-07>
97. Gardiner G.E., O'sullivan E., Kelly J., Auty M.A.E., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2605–2612. doi: 10.1128/AEM.66.6.2605-2612.2000.
 98. Gasser, F and M. Mandel. (1968). Deoxyribonucleic acid base composition of the genus *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 96:580–588.
 99. Genigeorgis C.A (1985). Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *Intem. J. of Food Microbiol* 237- 251
 100. Ghabbour, N.; Lamzira, Z.; Thonart, P.; Cidalia, P.; Markaoui, M.; Asehraou, A. (2011). Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas Aceites* 62, 84–89.
 101. Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Gilani, A.-H.; Saari, N (2012) Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 3291–3340.
 102. Gonzales, J.C.H.; Tapia, A.M.; Hernandez, G.L.; Perez, B.E.G.; Jimenez, N.S.C. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*. 11, 979.
 103. Görner F and Valík L. (2004). Microbiological quality of egg liquid products. Malé Centrum, Bratislava. ISBN: 80-967064-9-7.
 104. Gradisteanu Pircalabioru, G.; Popa, L.I.; Marutescu, L.; Gheorghe, I.; Popa, M.; Czobor Barbu, I.; Cristescu, R.; Chifiriuc, M.C. (2021). Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics*. 13, 196.
 105. Grande MJ, López RL, Abriouel H, Valdivia E, Ben Omar N, Maqueda M, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. (2007). Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot* 70:405–411
 106. Grounta, A.; Doulgeraki, A.I.; Nychas, G.J.E.; Panagou, E.Z. (2016). Biofilm formation on *Conservolea* natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lactobacillus pentosus* starter culture. *Food Microbiol.* 56, 35–44.

107. Grounta, A.; Tassou, C.C.; Panagou, E.Z. (2017). Greek-style table olives and their functional value. In *Olives and Olive Oil as Functional Foods*; Kiritsakis, A., Shahidi, F., Eds.; Wiley: Oxford, UK, pp. 325–342.
108. Guerra NP, Macías CL, Agrasar AT, Castro LP. (2005). Development of a bioactive packaging cellophane using nisaplin as biopreservative agent. *Lett Appl Microbiol* 40:106–110. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01649.x
109. Hawaz, E. (2014). Isolation and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Curd and in Vitro Evaluation of Its Growth Inhibition Activities against Pathogenic Bacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 1419–1425.
110. Hébert EM, Raya RR and de Giori GS. (2004). Evaluation of Minimal Nutritional Requirements of Lactic Acid Bacteria Used in Functional Foods. *Methods in Biotechnology*, Humana Press, Totowa. 139-150.
111. Hébert EM, Raya RR and Giori GS. (2004). Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* in a Chemically Defined Medium. *Current Microbiology*. 49(5): 341-345.
112. Hempel, S., Newberry, S., Maher, A., et al., (2012). Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea, *JAMA*, 307:1959-69.
113. Hickson, M., D'Souza, AL., Muthu, N., et al., (2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial, *BMJ*, 335:80.
114. Hoefnagel MHN, Starrenburg MJC, Martens DE et al. (2002). Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria, the Combined Approach. *Kinetic Modelling, Metabolic Control and Experimental Analysis, Microbiology*. 148: 1003-1013.
115. Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85–101. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00044-0.
116. Hoover, G. and Steenson, L.R. (1993). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press Inc., New York.
117. Hsieh FC, Lee CL, Chai CY, Chen WT, Lu YC, Wu CS. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)*, 10:35.
118. Huang S.H., He L., Zhou Y., Wu C.H., Jong A. (2009). *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses meningitic *E. coli* K1 penetration across human intestinal epithelial cells *in*

- vitro* and protects neonatal rats against experimental hematogenous meningitis. *Int. J. Microbiol.* 2009:647862. doi: 10.1155/2009/647862.
119. Huang Y and Adams M.C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;91:253–260. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001.
120. Hurtado, A.; Reguant, A.; Bordons, A.; Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 31, 1–8.
121. Hutkins RW. (2006). Importance of lactobacilli for bread-making industry. In *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. (1.ed). IFT Press, Blackwell Publishing, Oxford. 475.
122. Hutkins RW. (2019). *Microbiology and technology of fermented foods*, 2nd. Chigaco, IL: IFT Press.
123. Jabbari, V.; Khiabani, M.S.; Mokarram, R.R.; Hassanzadeh, A.M.; Ahmadi, E.; Gharenaghadeh, S.; Karimi, N.; Kafil, H.S. (2017). Lactobacillus Plantarum as a Probiotic Potential from Kouzeh Cheese (Traditional Iranian Cheese) and Its Antimicrobial Activity. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 9, 189–193.
124. Jeon, H.J.; Choi, H.S.; Lee, O.H.; Jeon, Y.J.; Lee, B.Y. (2012). Inhibition of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) by Gelidium elegans using alternative drying and extraction conditions in 3T3-L1 and RAW264.7 cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* 17, 122–128.
125. Jones ML, Martoni CJ and Prakash S. (2012). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by Lactobacillus reuteri NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 66:1234-1241.
126. Jussier D, Morneau AD and de Orduña RM. (2006). Effect of Simultaneous Inoculation with Yeast and Bacteria on Fermentation Kinetics and Key Wine Parameters of Cool Climate Chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(1): 221-227.
127. Kajander, K., Myllyluoma, E., Rajilić-Stojanović, M., et al., (2007). Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27:48-57.
128. Karim, N.; Djamel, D.; Ismail, F. (2008). Purification of pediocin PA-1 by immunoaffinity chromatography. *J. AOAC Int* 91, 828–832.

129. Katz M, Medina R, Gonzalez S et al. (2002). Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewes Milk and Cheese. *Journal of Food Protection*. 65: 1997-2001.
130. Kazou, M.; Tzamourani, A.; Panagou, E.Z.; Tsakalidou, E (2020). Unraveling the Microbiota of Natural Black Cv. Kalamata Fermented Olives through 16S and ITS Metataxonomic Analysis. *Microorganisms*, 8, 672.
131. Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2161–2168.
132. Kim, H.J., Camilleri, M, McKinzie, S., et al., (2003). A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 17: 895–904.
133. Kim, S.; Lee, J.Y.; Jeong, Y.; Kang, C.H. (2022). Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria. *Fermentation*. 8, 29.
134. Kirilov N., Petkova T., Atanasova J., et al. (2009). Proteolytic Activity in Lactic Acid Bacteria from Iraq, Armenia and Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 23: 643-646.
135. Kjos, M.; Nes, I.F and Diep, D.B. (2011). Mechanisms of Resistance to Bacteriocins Targeting the Mannose Phosphotransferase System. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3335–3342.
136. Klaenhammer, T., E. Altermann, F. Arigoni, A. Bolotin, et al. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 29–58.
137. Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–85.
138. Klaenhammer, T.R.; Kullen, M.J (1999). Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol* 50, 45–57.
139. Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. (2007). Antimicrobial Susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus Human Isolates and Cultures Intended for Probiotic or Nutritional Use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 900-912. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm035>
140. Kocková M and Valík L. (2011). Potential of cereals and pseudo cereals for lactic acid fermentations. *Potravinárstvo*. 5 (2): 27- 40.

141. Koller, V., Marian, B., Stidl, R., et al., (2008). Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells, *Food and Chemical Toxicology*, 46:1221–1229.
142. Kong C, Gao R, Yan X, Huang L, Qin H (2019). Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition*, 60:175-184.
143. Korhonen, J.M., Van Hoek, A.H., Saarela, M., Huys, G., Tosi, L., Mayrhofer, S. and Wright, A.V. (2010). Antimicrobial Susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Beneficial Microbes*, 1, 75-80.
144. Korshunov S and Imlay JA (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 75:1389–1401. 10.1111/j.1365-2958.2010.07059.x
145. Kullisaar, T., Songisepp, M., Mikelsaar, K., et al., (2003). Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human, *British Journal of Nutrition*, 90:449–456.
146. Kullisaar, T., Zilmera, M., Mikelsaar, M., et al., (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 72:215–224.
147. Kumariya, R.; Garsa, A.K.; Rajput, Y.S.; Sood, S.K.; Akhtar, N.; Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, Synthesis, Mechanism of Action and Resistance Development in Food Spoilage Causing Bacteria. *Microb. Pathog.* 128, 171–177.
148. Lado BH and Yousef AE (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. 157-213.
149. Lai, Y.S.; Hsu, W.H.; Huang, J.J.; Wu, S.C. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide-and lipopolysaccharide-treated RAW264. 7 macrophages. *Food Funct.* 3, 1294–1301.
150. Lauer E and Kandler O. (1980). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB list no. 4. *Int J Syst Bacteriol.* 30:601.
151. Lauer, E., and O. Kandler. (1980). *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Orig. C* 1:75–78.
152. Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Evidente, A.; Lazzaroni, S.; Corsetti, A.; Gobbetti, M (2010). Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus Plantarum* Strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084–4090.
153. Law BA. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening. The research base for new technologies. *International Dairy Journal.* 11: 383-398.

154. Lee, H.-Y.; Lee, J.-H.; Kim, S. H.; Jo, S.-Y.; Min, K.-J. (2023). Probiotic *Limosilactobacillus Reuteri* (*Lactobacillus Reuteri*) Extends the Lifespan of *Drosophila Melanogaster* through Insulin/IGF-1 Signaling. *Aging Dis*, 14 (4), 0. <https://doi.org/10.14336/ad.2023.0122>.
155. Lee, J., Hwang, K.T., Heo, M.S., et al., (2005). Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from Kimchi to oxidative stress, *Journal of Medicinal Food*, 8:299–304.
156. Lee, N.K., Kim, S.Y., Han, K.J., et al., (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters, *LWT- Food Science and Technology*, 58:130– 134.
157. Leroy F and De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science Technology*. 15(1): 67–78.
158. Leroy F, Verluyten J and De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 270–285.
159. Letort C and Juillard V. (2001). Development of a Minimal Chemically Defined Medium for the Exponential Growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*. 91(6): 1023-1029.
160. Li, S.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Zhang, X.; Huang, L.; Li, D.; Niu, C.; Yang, Z.; Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem*. 135, 1914–1919.
161. Lin, X.; Xia, Y.; Wang, G.; Yang, Y.; Xiong, Z.; Lv, F.; Zhou, W.; Ai, L. (2018). Lactic Acid Bacteria with Antioxidant Activities Alleviating Oxidized Oil Induced Hepatic Injury in Mice. *Front. Microbiol*. 9, 2684
162. Liu M, Bayjanov JR, Renckens B et al. (2010). The Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Revisited: A Genomic Comparison. *BMC Genomics*. 11: 1- 15.
163. Liu M, Nauta A, Francke C et al. (2008). Comparative Genomics of Enzymes in Flavor Forming Pathways from Amino Acids in Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(15): 4590-4600.
164. Liu, W., Su, X., Duo, N., Yu, J., Song, Y., Sun, T., Sun, Z et al. (2019). A survey of the relationship between functional genes and acetaldehyde production characteristics in *Streptococcus thermophilus* by multilocus sequence typing. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-16203
165. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacogn. Rev*. 4, 118–126.

166. Lonvaud-Funel A. (1999). Lactic Acid Bacteria in the Quality Improvement and Depreciation of Wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76(1- 4): 317-331.
167. López-Lara, I.M and Geiger, O. (2017). Bacterial Lipid Diversity. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 1287–1299.
168. Lucena-Adrós, H.; Caballero-Guerrero, B.; Maldonado-Barragán, A.; Ruiz-Barba, J.L. (2014). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiol.* 42, 154–165.
169. Lucena-Adrós, H.; Jiménez, E.; Maldonado-Barragán, A.; Rodríguez, J.M.; Ruiz-Barba, J.L. (2015). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity in Spanish-style green table-olive fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 47–53.
170. Lucena-Adrós, H.; Ruiz-Barba, J.L. (2019). Microbial biogeography of Spanish-style green olive fermentations in the province of Seville, Spain. *Food Microbiol.* 82, 259–268.
171. Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjogren J. and Schnurer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, p. 129-135.
172. Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., & Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 142–152. doi:10.1016/j.copbio.2019.12.019
173. Martarelli, D., Verdenelli, MC., Scuri, S., et al., (2011). Effect of a Probiotic Intake on Oxidant and Antioxidant Parameters in Plasma of Athletes During Intense Exercise Training, *Current Microbiology*, 62:1689-96.
174. Martin R and Suarez JE. (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:400–405. 10.1128/AEM.01631-09
175. Martínez Viedma P, Sobrino López A, Ben Omar N, Abriouel H, Lucas López R, Valdivia E, Martín Belloso O, Gálvez A. (2008). Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int J Food Microbiol* 128:244–249. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.014
176. Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, Guigas C, et al. (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr Microbiol* 56: 315-321.

177. Mathipa-Mdakane, M.G.; Thantsha, M.S. (2022). *Lacticaseibacillus rhamnosus*: A Suitable Candidate for the Construction of Novel Bioengineered Probiotic Strains for Targeted Pathogen Control. *Foods* 11,785. <https://doi.org/10.3390/foods11060785>
178. McFarland, L. (2008). Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 5:40-48.
179. Medina, E.; Ruiz-Bellido, M.A.; Romero-Gil, V.; Rodríguez-Gómez, F.; Montes-Borrego, M.; Landa, B.B.; Arroyo-López, F.N. Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 236, 47–55.
180. Messens, W.; De Vuyst, L (2002). Inhibitory Substances Produced by Lactobacilli Isolated from Sourdoughs-A Review. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 31–43.
181. Meyers SA, Cuppett SL and Hutkins RW. (1996). Lipase Production by Lactic Acid Bacteria and Activity on Butter Oil. *Food Microbiology.* 13(5): 383-389.
182. Mignolet, J.; Fontaine, L.; Sass, A.; Nannan, C.; Mahillon, J.; Coenye, T.; Hols, P. (2018). Circuitry Rewiring Directly Couples Competence to Predation in the Gut Dweller *Streptococcus Salivarius*. *Cell Rep.* 22, 1627–1638.
183. Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. (2011). Enhancing the Stress Responses of Probiotics for a Life- style from Gut to Product and Back Again. *Microbial Cell Factories*, 10, S19.
184. Ming, L.C.; Halim, M.; Rahim, R.A.; Wan, H.Y.; Ari, A. (2016). Bin Strategies in fed-batch cultivation on the production performance of *Lactobacillus salivarius* I 24 viable cells. *Food Sci. Biotechnol.* 25, 1393–1398.
185. Morac̃anin, S.M.V.; Dukic , D.A.; Memiši, N.R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria—A review. *APCBEE Procedia* 2, 50–56.
186. Morelli L, Calleagri ML, Vogensen FK et al. (2011). Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. (Eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, CRC Press, London. 18-33.
187. Morton, J.T.; Freed, S.D.; Lee, S.W.; Friedberg, I. (2015). A Large Scale Prediction of Bacteriocin Gene Blocks Suggests a Wide Functional Spectrum for Bacteriocins. *BMC Bioinform.* 16, 381.
188. Moslem P., Hossein N., Mahdi R., Seyed N.H., Seyed A.S. *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): A top well-researched probiotic strain. *J. Med. Microbiol.* 2017;5:46–59.

189. Mukai T, Arihara K, Ikeda A, Nomura K, Suzuki F. (2003). *Lactobacillus kitasatonis* sp. nov., from chicken intestine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:2055–2059.
190. Munson, M. A., A. Banerjee, T. F. Watson, and W. G. Wade. (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J. Clin. Microbiol.* 42:3023–3029.
- Smith, S. I., A. J. Aweh, A. O. Coker, K. O. Savage, et al. 2001. Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios* 105:77–85.
191. Nakagawa H, Miyazaki T (2017). Beneficial effects of antioxidative lactic acid bacteria. *AIMS Microbiol*, 3:1-7.
192. Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure–activity relation. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1453–1459.
193. Nava GM, Bielke LR, Callaway TR, Castaneda MP. (2005). Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev*, 6:105-118.
194. Ni, K.; Wang, Y.; Li, D.; Cai, Y.; Pang, H. (2015). Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS ONE* 10, e0121967.
195. Nicosia, F. D.; Pino, A.; Vaccalluzzo, A.; Rodrigues Arruda Pinto, V.; Fusieger, A.; La Cava, R.; Caggia, C.; Randazzo, C.; Fernandes de Carvalho, A (2023). *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* Bv. *Diacetylactis* Q5C6 Strain as Debittering Adjunct Culture for Vegetable Clotted Cheese. *Food Biosci* 56 (October), 103284. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103284>.
196. Niedzielin, K., Kordecki, H., Birkenfeld, B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13:1143-7.
197. Nilchian Z, Sharifan A, Rahimi E, et al. Improvement of fermented cucumber characteristics by starter culture of *lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophiles*. *J Food Biosc Techn.* 6(2):31–40.
198. Nobaek, S., Johansson, ML., Molin, G., et al., (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome, *The American Journal of Gastroenterology*, 95:1231–8.
199. O’Connell, L.M.; Kelleher, P.; Van Rijswijck, I.M.H.; De Waal, P.; Van Peij, N.N.M.E.; Mahony, J.; Van Sinderen, D. (2022). Natural Transformation in Gram-Positive Bacteria and Its Biotechnological Relevance to Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 13, 409–431.

200. O'Hara, A. M., and F. Shanahan. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7:688–693.
201. Oberman H and Libudzisz Z. (1998). Fermented Milks. In: Wood, B. J. B (Ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London. 308-350
202. Ogawa J, Kishino S, Ando A et al. (2005). Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 100(4): 355-364.
203. Oliveira PM, Zannini E, Arendt EK (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol* 37: 78-95
204. Omar, S.H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 78, 133–154.
205. Panagou, E.Z.; Tassou, C.C.; Katsaboxakis, K.Z. (2003). Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83, 667–674.
206. Pasolli E, De Filippis F, Mauriello I, Cumbo F, Walsh A, et al. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nat Commun* 11: 2610.
207. Patel, A.R., Shah, N.P. and Prajapati, J.B. (2012). Antibiotic Resistance Profile of Lactic Acid Bacteria and Their Implication in Food Chain. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 7, 202-211.
208. Pereira D.I and Gibson G.R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4689–4693. doi: 10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002.
209. Pérez Pulido R, Toledo J, Grande MJ, Gálvez A, Lucas R. (2015). Analysis of the effect of high hydrostatic pressure treatment and enterocin AS- 48 addition on the bacterial communities of cherimoya pulp. *Int J Food Microbiol* 196:62–69. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.033
210. Petry S, Furlan S, Crepeau MJ et al. (2000). Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(8): 3427-3431
211. Pieniz, S.; Andrezza, R.; Anghinoni, T.; Camargo, F.; Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control.* 37, 251–256.

212. Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F., and Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6, 285-306. doi: 10.1007/s12263-010-0206-6.
213. Portilha-Cunha, M.F.; Macedo, A.C.; Malcata, F.X. (2020). A Review on Adventitious Lactic Acid Bacteria from Table Olives. *Foods* 9, 948.
214. Poutahidis T, Kleinewietfeld M, Smillie C, Levkovich T, Perrotta A, Bhela S, et al. (2013). Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity. *PLoS One*, 8:e68596.
215. Praet J, Meeus I, Cnockaert M, Houf K, Smagghe G et al. (2015). Novel lactic acid bacteria isolated from the bumble bee gut: *Convivina intestini* gen. nov., sp. nov., *Lactobacillus bombicola* sp. nov., and *Weissella bombi* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1337–1349.
216. Price, R.J. and Lee. J.S (1970). Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide produced by lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 33: 13-18.
217. Pridmore RD, Pittet AC, Praplan F, Cavadini C. (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 283:210–215. 10.1111/j.1574-6968.2008.01176.x
218. Qiao Y, Sun J, Xia S, Li L, Li Y, Wang P, et al. (2015). Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 14:424-434.
219. Ramya, S.; Mythili, A. Sathiavelu. (2010). Recovery of bacteriocin (NISIN) from *Lactococcus lactis* and testing its ability to increase the shelf life of vegetables (carrot and beans). *Res. J. Biol. Sci.* 5, 727–730.
220. Ranadheera C.S., Evans C.A., Adams M.C., Baines S.K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Int. Food Res. J.* 49:619–625. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.007.
221. Randazzo, C.L.; Restuccia, C.; Romano, A.D.; Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 9–14.
222. Randazzo, C.L.; Russo, N.; Pino, A.; Mazzaglia, A.; Ferrante, M.; Conti, G.O.; Caggia, C. (2018). Effects of selected bacterial cultures on safety and sensory traits of Nocellara Etnea olives produced at large factory scale. *Food Chem. Toxicol.* 115, 491–498.
223. Randazzo, C.L.; Todaro, A.; Pino, A.; Pitino, I.; Corona, O.; Caggia, C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of Nocellara Etnea table olives. *Food Microbiol.* 65, 136–148.

224. Rashid, R.; Veleba, M.; Kline, K.A. (2016). Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 55.
225. Reddy G., Altaf M., Naveena BJ., et al. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology Advances.* 26(1): 22- 34.
226. Reis, J.A.; Paula, A.T.; Casarotti, S.N.; Penna, A.L.B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Eng. Rev* 4, 124–140.
227. Reuter, G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2:43–53.
228. Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Pereira CI, et al. (2011). The Potential Effect of FOS and Inulin upon Probiotic Bacterium Performance in Curdled Milk Matrices. *LWT- Food Science and Technology.* 44: 100-108.
229. Rodríguez JM, Martínez MI and Kok J. (2002). Pediocin PA-1, a wide- spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:91–121. doi:[10.1080/10408690290825475](https://doi.org/10.1080/10408690290825475)
230. Roselli M, Pieper R, Rogel-Gaillard C, Vries Hd, Bailey M, Smidt H, et al. (2017). Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Animal Feed Science and Technology,* 233:104-119.
231. Ruiz Rodríguez LG., Mohamed F., Bleckwedel J., Medina R., De Vuyst L., et al. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Front Microbiol* 10: 1-26.
232. Ryan, D.; Robards, K (1998). Phenolic Compounds in Olives. *Analyst,* 123, 31–44.
233. Salminen, S., Ouwenhand, A., Benno, Y. and Lee, Y.K. (1999). Probiotics: How Should They Be Defined? *Trends in Food Science and Technology,* 10, 107-110. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8)
234. Salvetti E, Harris HMB, Felis GE, O’Toole PW (2018). Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Appl Environ Microbiol* 84: 3-18.
235. Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12:412–416. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.004.
236. Sánchez-Hidalgo M, Montalbán-López M, Cebrián R, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. (2011). AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell Mol Life Sci* 68:2845–2857.
237. Sandine WE. Commercial production of dairy starter cultures. (1996). In: T.M. Cogan, J.P. Accolas (Ed.), *Dairy Starter Cultures.* Wiley-VCH, New York. 191-206.

238. Savijoki K, Ingmer H and Varmanen P. (2006). Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(4): 394-406.
239. Selle, K and Klaenhammer, T. R. (2013). Genomic and Phenotypic Evidence for Probiotic Influences of *Lactobacillus Gasseri* on Human Health. *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (6), 915–935. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12021>.
240. Senok A.C., Ismaeel A.Y and Botta G.A. (2005). Probiotics: Facts and myths. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:958–966. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01228.x.
241. Servin A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405–440. doi: 10.1016/j.femsre.2004.01.003.
242. Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83:894–907. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8.
243. Sharma, A.; Kaur, J.; Lee, S.; Park, Y.S. (2020). Tracking of Intentionally Inoculated Lactic Acid Bacteria Strains in Yogurt and Probiotic Powder. *Microorganisms* 8, 5.
244. Shiraishi, T.; Yokota, S.I.; Fukiya, S.; Yokota, A. (2016). Structural Diversity and Biological Significance of Lipoteichoic Acid in Gram-Positive Bacteria: Focusing on Beneficial Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Biosci. Microbiota Food Health.* 35, 147–161.
245. Silva, C.C.G.; Silva, S.P.M.; Ribeiro, S.C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front. Microbiol.* 9, 594.
246. Sisto, A.; Lavermicocca, P. Suitability of a *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product “probiotic table olives”. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 174.
247. Smit G, Smit BA and Engels WJM (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* 29 (3 SPEC. ISS):591–610. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.002>
248. Smith, S. I., A. J. Aweh, A. O. Coker, K. O. Savage, et al. (2001). Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios* 105:77–85.
249. Song D, Ibrahim S and Hayek S. (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. Probiotics, InTech, Manhattan. 1-34.
250. Song, M.W.; Chung, Y.; Kim, K.T.; Hong, W.S.; Chang, H.J.; Paik, H.D. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* B13-2 isolated from kimchi and investigation of antioxidant and immune-modulating abilities of its heat-killed cells. *LWT-Food Sci. Technol.* 128, 109452.

251. Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14:166-171.
252. Spyropoulos, B., Misiakos E., Fotiadis, C., et al., (2011). Antioxidant Properties of Probiotics and Their Protective Effects in the Pathogenesis of Radiation-Induced Enteritis and Colitis, *Digestive Diseases and Sciences*, 56: 285–294.
253. Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).
254. Ström, K.; Sjögren, J.; Broberg, A.; Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus Plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-Trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4322–4327.
255. Suda S, Cotter PD, Hill C, Ross RP. (2012). Lactacin 3147—biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Curr Protein Pept Sci* 13:193–204. doi:10.2174/138920312800785021
256. Sun, Y.; Wilkinson, B.J.; Standiford, T.J.; Akinbi, H.T.; O’Riordan, M.X.D. (2012). Fatty Acids Regulate Stress Resistance and Virulence Factor Production for *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 194, 5274–5284.
257. Szymański, H., Armańska, M., Kowalska-Duplaga, K., et al., (2008). *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children: A Randomized Controlled Pilot Trial, *Digestion*, 78: 13–17.
258. Tang, W.; Li, C.; He, Z.; Pan, F.; Pan, S.; Wang, Y. (2018). Probiotic properties and cellular antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibetan Kefir grains. *Probiotics Antimicrob. Proteins*.10, 523–533.
259. Taranto MP, Medici M, Perdigon G et al. (1998). Evidence for Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic 274. Mice. *Journal of Dairy Science*. 81(9): 2336-234.
260. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. (2000). Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J Dairy Sci*, 83:401-403.
261. Teixeira, P. (2014). *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6>

262. Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 119, S3- S10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
263. Thakur, A. (2017). Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from dairy products and to assess their role in enhancing the shelf life of food. 166-226. hesis, University of Horticulture & Forestry Nauni, (Solan), India.
264. Thomas EL and Pera KA. (1983). Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 154:1236–1244
265. Ukuku DO and Fett WF (2004). Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *J Food Prot* 67:2143–2150.
266. Urbach G (1997). The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. *Int J Dairy Technol* 50(3):79–89. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01743.x>
267. Valerio, F.; Lavermicocca, P.; Pascale, M.; Visconti, A. (2004). Production of Phenyllactic Acid by Lactic Acid Bacteria: An Approach to the Selection of Strains Contributing to Food Quality and Preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 289–295.
268. Vancanneyt M, Naser SM, Engelbeen K, De Wachter M, Van der Meulen R. (2006). Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11494 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:1553–1557.
269. Velika, B.; Kron, I. (2012). Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radic. Antioxid.* 2, 62–67.
270. Venegas-Ortega MG., Flores-Gallegos AC., Martínez-Hernández JL., Aguilar CN., Nevárez-Moorillón GV. (2019). Production of bioactive peptides from Lactic Acid Bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18: 1039-1051.
271. Vera EP, Hebert EM, Sesma, F et al. (2009). Influence of Vitamins and Osmolites on Growth and Bacteriocin Production by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 in a Chemically Defined Medium. *Canadian Journal of Microbiology.* 55(3):304-310.
272. Villegas, E and Gilliland, S. E. (2006). Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science*, 63(6), 1070–1074. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15857.x
273. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanenet S., et al., (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 102:106–115.

274. Von AW and Axelsson L. (2011). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press, London. 1-17.
275. Von Wright A., Axelsson L. (2019). Lactic acid bacteria: An introduction. In Vinderola G, Ouwehand AC, Salminen, S, von Wright A. (eds): Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, 5th ed, Boca Ratón, FL: CRC Press 2-6.
276. Vougiouklaki, D.; Loka, K.; Tsakni, A.; Houhoula, D. (2022). Characterization of Metabolites Production by *Lactobacillus Gasseri* ATCC 33323 and Antioxidant Activity. *Nutr. Food Sci Int J*, 11, 1–8. <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2022.11.555815>
277. Vougiouklaki, D.; Tsironi, T.; Paparaskevas, J.; Halvatsiotis, P.; Houhoula, D. (2022). Characterization of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactiplantibacillus plantarum* Metabolites and Evaluation of Their Antimicrobial Activity against Food Pathogens. *Appl. Sci*, 12, 660.
278. Vougiouklaki, D.; Tsironi, T.; Tsantes, A.G.; Tsakali, E.; Van Impe, J.F.M.; Houhoula, D. (2023). Probiotic Properties and Antioxidant Activity In Vitro of Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 11, 1264.
279. Wakil, S.M.; Laba, S.A.; Fasiku, S.A. Isolation and Identification of Antimicrobial-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Cucumber. *Afr. J. Biotechnol.* 2014, 13, 2556–2564
280. Wall, R., G. Fitzgerald, S. Hussey, T. Ryan, et al. (2007). Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59:127–137.
281. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et al. (2015). Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat dietfed mice. *ISME J*, 9:1-15
282. Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Food Microbiology*, 23:125–135.
283. Wasilewska, E., Zlotkowska, D and Wroblewska, B. (2018). Yogurt starter cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* ameliorate symptoms and modulate the immune response in mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-14520
284. Welman AD and Maddox IS. (2003). Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Perspectives and Challenges. *Trends in Biotechnology*. 21(6):269- 274.

285. Wood BJB and Holzapfel WH. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London, Blackie Academic & Professional. 1-6.
286. Xu, J., and J. I. Gordon. (2003). Inaugural article: honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10452-10459.
287. York: Marcel Dekker. Lindgren, S. E. (1990). "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in
288. Yuan Q and Furuta GT. (2003). Insights into Milk Protein Allergy: Microenvironment Matters. *The American Journal of Gastroenterology*. 124(1): 259-261.
289. Zanoni, S., Pompei, A., Cordisco, L., et al., (2008). Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains, *Journal of Applied Microbiology*, 105:1266–1276.
290. Zhang, J. W., Du, P., Chen, D. W., et al., (2010). Effect of viable Bifidobacterium supplement on the immune status and inflammatory response in patients undergoing resection for colorectal cancer, *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 13:40–43.
291. Zhang, J.; Bilal, M.; Liu, S.; Lu, H.; Luo, H.; Zhao, Y. (2020). Isolation, identification and antimicrobial evaluation of bactericides secreting *Bacillus subtilis* Natto as a biocontrol agent. *Processes*, 8, 259.
292. Zhang, L.; Liu, C.; Li, D.; Zhao, Y.; Zhang, X.; Zeng, X.; Yang, Z.; Li, S. (2013). Antioxidant Activity of an Exopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int. J. Biol. Macromol.* 54, 270–275.
293. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C. M. A. P.; Harris, H. M. B.; Mattarelli, P.; O'toole, P. W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; Watanabe, K.; Wuyts, S.; Felis, G. E.; Gänzle, M. G.; Lebeer, S. (2020). A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (4), 2782–2858.
294. Zhong, L., Zhang, X., Covasa, M., (2014). Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer, *World Journal of Gastroenterology*, 20: 7878–7886.
295. Zhou, B and Zhang, D. (2018). Antibacterial effects of bacteriocins isolated from *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) in a rabbit model of knee implant infection. *Exp. Ther. Med.* 2018, 15, 2985–2989.