



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

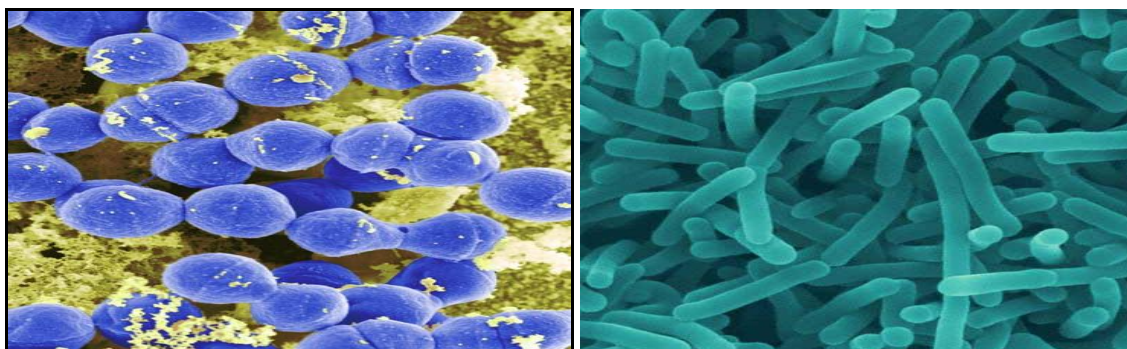
&

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΑΠΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΟΓΟΝΟ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΗΣ *Listeria welshimeri* 15008
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ
ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ

ΕΛΛΗ ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ



Επιβλέπων: Ακτύπης Α. Λέκτορας

Εξεταστική Επιτροπή:

Ακτύπης Α. Λέκτορας

Δροσινός Ε. Αναπληρωτής. Καθηγητής

Οικονομόπουλος Ι. Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΪΟΣ 2011



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

&

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΑΠΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΟΓΟΝΟ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΗΣ *Listeria welshimeri* 15008
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ
ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ

ΕΛΛΗ ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ

Επιβλέπων: Ακτύπης Α. Λέκτορας

Εξεταστική Επιτροπή:

Ακτύπης Α. Λέκτορας

Δροσινός Ε. Αναπληρωτής. Καθηγητής

Οικονομόπουλος Ι. Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΪΟΣ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες στο Εργαστήριο της Γαλακτοκομίας που με δέχτηκε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης και στον επιβλέποντα καθηγητή μου κο. Λέκτορα Ακτύπη Α. για την ανάθεσή της. Ακόμη, ευχαριστώ τον Αν. Καθηγητή κο. Δροσινό Ε. από το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και τον Επ. Καθηγητή κο. Οικονομόπουλο Ι. από το εργαστήριο Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Επίσης, να ευχαριστήσω την κα. Μανωλοπούλου Ε. και την κα. Ζωίδου Ε., που ήταν πρόθυμες να βοηθήσουν στις εργαστηριακές ασκήσεις κατά την παραμονή μου εκεί. Στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος ΕΤΤ και ιδιαίτερα τον κο. Παραμυθιώτη Σ. για την παραχώρηση στελεχών γένους *Listeria* κατά την πειραματική διαδικασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την στήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Έλλη Παναγοπούλου

Αθήνα, Μάιος 2011

*Συνάντησα έναν ταξιδιώτη από χώρα αρχαία.
Είπε: «Τεράστια, δίχως κορμό, δύο πόδια πέτρινα
υψώνονται στην έρημο... Κοντά τους, μες στην άμμο
βυθισμένο, ένα θρυμματισμένο πρόσωπο· τα σκυθρωπά του
χείλη, πτυχωμένα σ' ένα χαμόγελο ψυχρής υπεροχής,
λένε ο γλύπτης τους πως διάβασε σωστά αυτά τα πάθη
που ακόμη ζούνε χαραγμένα στ' άψυχα ετούτα πράγματα
το χέρι που τα περιέλασε και την καρδιά που τα 'θρεψε.
Και πάνω στο κρηπίδι αυτές οι λέξεις αχνοφαίνονται:
“Οζυμανδίας τ' όνομά μου, ο Βασιλεύς των Βασιλέων,
κοιτάζτε τα έργα μου. Ισχυροί, κι απελπιστείτε!”
Άλλο τίποτα δεν μένει. Γύρω από τη φθορά
των κολοσσιαίων ερειπίων, απέραντη, γυμνή,
μόνη η έρημος, κι επίπεδη, απλώνεται μακριά».*

Percy Bysshe Shelley, Οζυμανδίας (1817)

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AU	Arbitrary Units, μονάδες ενεργότητας βακτηριοσίνης
bac⁺	bacteriocin-producer strain, βακτηριοσινογόνο στέλεχος
bac⁻	non bacteriocin-producer strain, μη βακτηριοσινογόνο στέλεχος
CCPs	Critical Control Points
cfu/ml	Colony forming units/ml
d	days
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	hours
LAB	Lactic Acid Bacteria
MIC (AU/ml)	Minimum Inhibitory Concentration σε μονάδες AU/ml
M17	M17 Broth or Agar
MRS	MRS Broth or Agar
O.D.	Optical Density
TSBY	Tryptone Soy Broth with Yeast extract
t_{lag}	χρονική διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase)
WDA	Well Diffusion Assay
μ	maximum growth rate, μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vi
<i>Περίληψη</i>	1
<i>Abstract</i>	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Γιαούρτι	3
1.2 Θρεπτική αξία γιαούρτης και μεταβολές κατά την παρασκευή	4
1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια	7
1.4 Καλλιέργειες εκκίνησης.....	12
1.5 Τεχνολογία παραγωγής γιαουρτιού και τύποι	14
1.6 <i>Listeria</i> spp.	15
1.7 Συντήρηση και ασφάλεια.....	18
1.7.1 Βακτηριοσίνες.....	19
1.7.2 Πιθανές αλλοιώσεις γιαουρτιού μικροβιακής προέλευσης	27
1.7.3 Έλεγχος στη γραμμή γιαουρτιού για <i>Listeria</i> spp.	27
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 Μικροοργανισμοί.....	30
3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	31
3.3 Μέθοδοι	35
3.3.1 Αρίθμηση μικροοργανισμών	35
3.3.2 Προσδιορισμός οξύτητας με τη μέθοδο Dornic	36
3.3.3 Προσδιορισμός pH.....	36
3.3.4 Μέθοδος ανίχνευσης βακτηριοσίνης με τη μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία-Well Diffusion Assay (WDA)	36
3.3.5 Παραγωγή βακτηριοσίνης	37

3.3.6 Πρωτόκολλο μερικού καθαρισμού και συμπύκνωσης βακτηριοσίνης με (NH ₄) ₂ SO ₄	38
3.3.7 Προσδιορισμός της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης της θερμοφιλίνης (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) έναντι της <i>Listeria welshimeri</i> 15008	38
3.3.8 Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0040 στους 42°C.....	39
3.3.8.α Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ACA-DC 084 στους 42°C	39
3.3.8.β Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος <i>Listeria welshimeri</i> 15008 στους 42°C	40
3.3.9 Μελέτη της επίδρασης της in situ thermophilin T στην ανάπτυξη της <i>Listeria welshimeri</i> 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης διαφορετικού βαθμού οξίνισης.....	40
3.3.10 Προσθήκη βακτηριοσίνης thermophilin T στο γάλα παρασκευής γιαούρτης και μελέτη της επίδρασής της στην ανάπτυξη της <i>L. welshimeri</i> 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης.....	41
3.3.11 Μελέτη της επίδρασης της προστιθέμενης βακτηριοσίνης thermophilin T στην βιωσιμότητα της <i>L. welshimeri</i> 15008 στο γιαούρτι κατά την επιμόλυνσή του σε συνθήκες συντήρησης.....	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
4.1 Προσδιορισμούς της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης της θερμοφιλίνης (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) έναντι της <i>Listeria welshimeri</i> 15008	43
4.2 Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0040 στους 42°C.....	48
4.3. Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ACA-DC 084 και <i>L. welshimeri</i> 15008 στους 42°C	49
4.4 Μελέτη της επίδρασης της in situ thermophilin T στην ανάπτυξη της <i>Listeria welshimeri</i> 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης διαφορετικού βαθμού οξίνισης.....	50
4.5 Προσθήκη βακτηριοσίνης thermophilin T στο γάλα παρασκευής γιαούρτης και μελέτη της επίδρασής της στην ανάπτυξη της <i>L. welshimeri</i> 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης.....	59

4.6 Μελέτη της επίδρασης της προστιθέμενης βακτηριοσίνης thermophilin T στην βιωσιμότητα της <i>L. welshimeri</i> 15008 στο γιαούρτι κατά την επιμόλυνσή του σε συνθήκες συντήρησης.....	61
4.7 Σύγκριση αποτελεσμάτων και τελικά συμπεράσματα.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

Περίληψη

Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης στα ζυμωμένα προϊόντα, όπως στο γιαούρτι, αποτελούν σημαντική πηγή συντήρησης των τροφίμων δεδομένου ότι μπορούν να παραχθούν από αυτές φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βακτηριοσίνες που δρουν ενάντια σε παθογόνα βακτήρια, επιμηκύνουν τον χρόνο ζωής και ενισχύουν την ασφάλεια των τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συμπεριφοράς της *Listeria welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. Για το λόγο αυτό, παράγεται η βακτηριοσίνη thermophilin T του παραπάνω βακτηριοσινογόνου στελέχους και μελετάται η επίδρασή της στα κύτταρα της λιστέριας τόσο παραγόμενη *in situ* όσο και *ex situ*.

Αρχικά, μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης και παραγωγής της βακτηριοσίνης κατά την καλλιέργεια του βακτηριοσινογόνου στελέχους μόνο του και σε συγκαλλιέργεια με τη λιστέρια και με τον *Lb.bulgaricus* ACA-DC 084. Έπειτα, προσδιορίστηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση βακτηριοσίνης ενάντια στη λιστέρια σε υπόστρωμα TSBY. Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί το πείραμα σε υπόστρωμα γιαούρτης, παρασκευάστηκε γιαούρτι με τη βοήθεια του ζυμωτήρα Bioflo-3000 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, του οποίου το γάλα στην αρχή είχε ενοφθαλμιστεί με στέλεχος λιστέριας. Το πείραμα διεξήχθη σε τρία διαφορετικά τελικά pH παρασκευής γιαούρτης, 4.8, 4.5 και 4.2. Για την ολοκλήρωση του πειράματος, μελετήθηκε η επίδραση της βακτηριοσίνης στη βιωσιμότητα της λιστέριας όταν η thermophilin T προστέθηκε πρώτον σε γάλα πριν τη ζύμωση και τον ενοφθαλμισμό με λιστέρια και δεύτερον σε έτοιμη γιαούρτη πριν τον ενοφθαλμισμό με λιστέρια και τη συντήρηση. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της συντήρησης ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μετρήθηκε ο πληθυσμός της λιστέριας και των οξυγαλακτικών σε άγαρ, ενώ η ενεργότητα της βακτηριοσίνης υπολογίστηκε με τη μέθοδο WDA (Well Diffusion Assay) σε αυθαίρετες μονάδες AU/ml. Παράλληλα καταγραφόταν το pH και η οξύτητα των δειγμάτων. Τα επίπεδα λιστέριας που μελετήθηκαν κυμαίνονταν από 10^4 έως 10^1 cfu/ml. Από τα αποτελέσματα του πειράματος, προκύπτει ότι η thermophilin T μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοσυντηρητικό σε συνεργιστική δράση με το pH. Ειδικότερα, όσο περισσότερη βακτηριοσίνη παράγεται, όσο πιο όξινες είναι οι συνθήκες και όσο χαμηλότερο είναι το μόλυσμα, τόσο πιο γρήγορα μειώνεται η λιστέρια.

Λέξεις κλειδιά: Βακτηριοσίνες, Γιαούρτι, *Listeria welshimeri*, *Streptococcus thermophilus*, Thermophilin T.

Abstract

The lactic acid starters cultures in fermented products like yogurt are a significant source of food preservation, regarding the production of natural antimicrobial compounds from them. Bacteriocins are of great interest, which act against pathogens, so that they lengthen the lifetime of food and enhance the food safety.

Aim of the present thesis is the exploration of the behavior of *Listeria welshimeri* 15008 during production and preservation of yogurt with the bacteriocin-producing strain *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. For this reason, the bacteriocin thermophilin T is produced from the above bacteriocin-producing strain and its effect on the *Listeria*'s cells is studied, while it's produced *in situ* and *ex situ*.

Initially, the bacteriocin's kinetic of growth and production was studied during culture of bacteriocin-producing strain on its own and in coculture with *Listeria* strain and *Lb. bulgaricus* ACA-DC 084. Afterwards, bacteriocin's minimum inhibitory concentration against *Listeria welshimeri* 15008 was defined in a substrate of TSBY. With regard to the study of the experiment in substrate of yogurt, then yogurt, whose milk had been inoculated with *Listeria*, has been produced with the help of Bioflo-3000 bioreactor (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) in stable temperature condition. The experiment was being carried out in 3 different pH of yogurt production, 4.8, 4.5 and 4.2. The experiment was completed when the effect of bacteriocin in *Listeria*'s viability was studied through the thermophilin T addition in milk before inoculation with *Listeria* and fermentation and in yogurt before inoculation with *Listeria* and at last preservation. During fermentation and preservation, at short intervals, the population of *Listeria* and lactic acid bacteria were being measured in agar, while thermophilin T inhibitory activity was estimated by WDA (Well Diffusion Assay) and expressed as arbitrary units per ml (AU/ml). Parallel to this, pH and acidity have been recorded. The *Listeria*'s levels that have been studied are ranged between 10^4 and 10^1 cfu/ml.

From the experiment, it results that thermophilin T can be used as a biopreservative, acting synergistically with pH. Specifically, the more bacteriocin is produced, the more acidic the conditions are and the lower the infection is, then more quickly the sensitive strain of *Listeria* is decreased.

Keywords: Bacteriocins, *Listeria welshimeri*, *Streptococcus thermophilus*, Thermophilin T, Yogurt.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γιαούρτι

Το γιαούρτι είναι πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με γαλακτική ζύμωση του γάλακτος με τη δράση του *Lactobacillus bulgaricus* και του *Streptococcus thermophilus*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι στο τελικό προϊόν άφθονοι και ζωντανοί (FAO/WHO, 1977a).

Ανήκει στα ζυμωμένα γάλατα και παράγεται από πλήρες ή αποκορυφωμένο αγελαδινό ή αιγοπρόβειο γάλα ως αποτέλεσμα της γαλακτικής ζύμωσης της λακτόζης με τα θερμόφιλα γαλακτικά βακτήρια που δρουν συνεργιστικά και αποτελούν την καλλιέργεια εκκίνησης. Η λακτόζη ζυμώνεται προς γαλακτικό οξύ που μειώνει το pH. Όταν το pH φτάσει στο 4,6 που είναι το ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών προκαλείται η όξινη πήξη και δημιουργείται το πήγμα του γιαουρτιού.

Κύρια χαρακτηριστικά:

- Γάλα αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο ή μίγματα αυτών για το οποίο απαιτείται μικρό μικροβιακό φορτίο, να είναι ελεύθερο αντιβιοτικών, χημικών υπολειμμάτων και πρωτογάλακτος και απουσία βακτηριοφάγων.
- Προσθήκη οξυγαλακτικών καλλιεργειών εκκίνησης *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* σε ίση αναλογία (1:1) σε ποσοστό 2-3% του βάρους του γάλακτος.
- Μειωμένο pH (~4,2 και οξύτητα 90-100°D ή 0,9-1% γαλακτικό οξύ)
- Χαρακτηριστική γεύση και άρωμα από τα προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων
- Χαρακτηριστικός τύπος πήγματος με διάφορους βαθμούς ρευστότητας
- Παρουσία ζωντανών βακτηριακών κυττάρων περίπου 10^8 - 10^9 /g. Ο ελάχιστος αριθμός τους στο τελικό προϊόν να είναι 10^7 /g (FAO-WHO).

Πρόσθετες ύλες που επιτρέπονται στο γιαούρτι είναι:

- Προϊόντα γάλακτος: συμπυκνωμένο άπαχο γάλα, άπαχη σκόνη γάλακτος, τυρόγαλα, λακτόζη.
- Γλυκαντικές ύλες: γλυκόζη, σακχαρόζη, γλυκαντικά (ασπαρτάμη)
- Σταθεροποιητές: ζελατίνη, καραγεννάνες, συμπύκνωμα πρωτεϊνών τυρογάλακτος, αραβικό κόμη.
- Αρωματικές ουσίες: φρούτα φυσικά και τεχνικές αρωματικές και χρωστικές ουσίες.

1.2 Θρεπτική αξία γιαούρτης και μεταβολές κατά την παρασκευή

Η θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος εξαρτάται από τη σύσταση του γάλακτος από το οποίο προέρχεται, επηρεαζόμενη από πολλούς παράγοντες. Αυτοί είναι οι γενετικές και ατομικές διαφορές των γαλακτοπαραγωγών ζώων, η διατροφή τους, η ηλικία, η περίοδος γαλουχίας, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η θερμοκρασία και ο χρόνος έκθεσης στην θερμότητα, η έκθεση στο φως, οι συνθήκες αποθήκευσης και κατά τη διαδικασία της ζύμωσης από τα βακτηριακά στελέχη που θα επιλεγούν και τη θερμοκρασία και διάρκεια της ζύμωσης.

Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του γιαουρτιού που κυκλοφορεί στο εμπόριο είναι γενικότερα μεγαλύτερη από αυτή του γάλατος, εξαιτίας της προσθήκης σκόνης από άπαχο γάλα, η οποία αυξάνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του τελικού προϊόντος. Υποστηρίζεται ότι η πρωτεΐνη του γιαουρτιού είναι πιο εύπεπτη από αυτή του γάλατος, καθώς έχει προηγηθεί μια υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλατος από τα βακτήρια του γιαουρτιού, διότι αυξάνεται η περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα στο γιαούρτι, ειδικότερα προλίνης και γλυκίνης. Κάποια βακτηριακά στελέχη έχουν δείξει ότι έχουν μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα από άλλα, όπως για παράδειγμα το *L. bulgaricus* σε σχέση με το *S. thermophilus*. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η θερμική επεξεργασία και η παραγωγή γαλακτικού οξέος, έχουν ως αποτέλεσμα τη λεπτότερη πήξη της καζεΐνης κάνοντάς την πιο εύπεπτη. Η βιολογική αξία των πρωτεϊνών του γιαουρτιού είναι πολύ υψηλή, όπως του γάλατος, γιατί δεν μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τόσο οι καζεΐνες, όσο και οι πρωτεΐνες ορού είναι πλούσιες πηγές όλων των απαραίτητων αμινοξέων, με μεγάλη εντερική διαθεσιμότητα του οργανικού αζώτου, που φτάνει το 93%.

Λιπίδια

Το λίπος του γάλατος υφίσταται επίσης βιοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων ελευθερώνονται με τη δράση των λιπασών. Επίσης, το γιαούρτι έχει υψηλότερες συγκεντρώσεις συζευγμένου λινολενικού οξέος από το γάλα, που έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα.

Λακτόζη

Πριν τη ζύμωση η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε λακτόζη είναι περίπου 6%. Κατά τη ζύμωση παρατηρείται μείωση έως 30% της λακτόζης, που υδρολύεται στα συστατικά της, γλυκόζη και γαλακτόζη, ώστε να είναι το γιαούρτι πιο ανεκτό σε άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη.

Βιταμίνες

Η απώλεια των βιταμινών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των μετάλλων, λόγω της ευαισθησίας τους σε αλλαγές του περιβάλλοντος. Μερικοί παράγοντες που προκαλούν την απώλεια βιταμινών κατά τη διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού είναι η θερμοκρασία, η παστερίωση, η υπερδιήθηση και η ανάδευση. Επιπλέον, το περιεχόμενο του τελικού προϊόντος σε βιταμίνες επηρεάζεται και από τη δράση των βακτηριακών καλλιεργειών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρειάζονται βιταμίνες του συμπλέγματος B (ριβοφλαβίνη, νιασίνη, B-6 και B-12) για την ανάπτυξή τους, ενώ υπάρχουν και στελέχη που μπορούν να παράγουν βιταμίνες, με καλύτερο παράδειγμα την σύνθεση φυλικού οξέος από βακτήρια που ανήκουν στα γένη *S. thermophilus* και *Bifidobacterium*. Παρατηρούμε μείωση 50% των B₁, B₆, B₁₂ και C και αύξηση 100% φυλικού οξέος και σε μικρότερο ποσοστό χολίνης.

Μέταλλα

Το γιαούρτι είναι πολύ καλή πηγή ασβεστίου και φωσφόρου. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γάλα, το γιαούρτι και το τυρί, παρέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό ασβεστίου υψηλής βιοδιαθεσιμότητας στη διατροφή δυτικού τύπου. Οι φυτικές ίνες μειώνουν την απορρόφηση του ασβεστίου, όμως χάρη στο χαμηλό pH του γιαουρτιού ελαττώνεται η ανασταλτική δράση των φυτικών οξέων και αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα του ασβεστίου (131-200 mg ασβεστίου/100g γιαουρτιού). Επίσης, το χαμηλότερο pH του γιαουρτιού σε σχέση με το γάλα προκαλεί τον ιονισμό του ασβεστίου, το οποίο με τη μορφή ιόντων απορροφάται ευκολότερα από το έντερο. Κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στην απορρόφηση του ασβεστίου στο έντερο παίζει η βιταμίνη D.

Ευεργετική δράση

Στο γιαούρτι αποδίδονται ευεργετικές δράσεις για την υγεία του ανθρώπου, που σχετίζονται με την ομαλή λειτουργία του εντέρου.

Α. Τόνωση της κινητικότητας του εντέρου λόγω του γαλακτικού οξέος, διότι αυξάνεται το γαστρικό υγρό που αυξάνει την πεπτικότητα της καζεΐνης και βοηθείται η απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο.

- B. Αύξηση της πεπτικότητας λόγω πρωτεολυτικής δράσης της χλωρίδας του προϊόντος.
- C. Αντιμικροβιακή δράση έναντι ορισμένων παθογόνων βακτηρίων λόγω των αντιβιοτικών που παράγονται από τα βακτήρια της γιαούρτης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που περιέχονται σε ζυμωμένα προϊόντα γάλατος βρέθηκε ότι προκαλούν την αύξηση της σύνθεσης IgA και sIgA στο έντερο, καθώς και τον αριθμό των μακροφάγων και την φαγοκυτταρική δραστηριότητα.
- D. Αναγέννηση της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου, βοηθώντας τον πολλαπλασιασμό των λακτοβάκιλλων του εντέρου.
- E. Παρουσιάζει αντιχοληστερινικές ιδιότητες (από την αύξηση του διαλυτού Ca^{2+}).
- F. Περισσότερο ανεκτό σε άτομα με αλλεργία στο γάλα (αυξάνεται η δραστηριότητα της λακτάσης και μειώνεται η δράση της λακτόζης).
- G. Τα γιαούρτια που περιέχουν οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να δράσουν ενάντια της εξάπλωσης ορισμένων όγκων της κοιλιακής κοιλότητας. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης κάποιων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου και της πρόσληψης ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι προς το παρόν άγνωστος. Μερικοί πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί αφορούν την καταστολή των επικίνδυνων εντερικών βακτηρίων, την απομόνωση των πιθανών μεταλλαξιογόνων, την σύνθεση αντιμεταλλαξιογόνων παραγόντων, τη μείωση του pH στο κόλον, την παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών (πολυσακχαρίτες) και την ενίσχυση της εντερικής ανοσολογικής απάντησης. Ωστόσο, δεν έχουν όλα τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων την ικανότητα να εμποδίζουν την καρκινογένεση.
- H. Αύξηση της βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών από την μετουσίωση των πρωτεϊνών (πήξη ή και οξίνιση)
- I. Καλύτερη πεπτικότητα του λίπους εξαιτίας της λιπολυτικής δράσης (σχετικά μικρή)
- J. Αλλαγή του βιταμινικού περιεχόμενου λόγω του μεταβολισμού της χλωρίδας των προϊόντων

Πίνακας 1. Ενδεικτική σύσταση
τύπων γιαουρτιού.

Συστατικά σε 100g προϊόντος	Πλήρες	Άπαχο
Νερό (g)	3,4	5,6
Ενέργεια (Kcal)	60	54,6
Πρωτεΐνη(g)	3,4	5,6
Λίπος(g)	3,2	0,18
Υδατάνθρακες (g)	4,6	7,5
Ασβέστιο (mg)	118	120
Φώσφορος (mg)	93	94,4

1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria-LAB) αποτελούν μια ομάδα από Gram θετικά, μη σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση, αρνητικά στην καταλάση βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) σε γαλακτικό οξύ και ενέργεια, παίρνοντας έτσι την ονομασία τους από το κύριο προϊόν της ζύμωσης της λακτόζης, το γαλακτικό οξύ. Διάκριση των οξυγαλακτικών βακτηρίων γίνεται με βάση το είδος της γαλακτικής ζύμωσης, όμοιο- ή έτερο-ζυμωτική, τη μορφολογία κυττάρου και την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Εμφανίζονται σαν κόκκοι, κοκκοβάκιλλοι ή βάκιλλοι και βρίσκονται σε τρόφιμα (γαλακτοκομικά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, ποτά κ.α.), φυτά, εντερική μικροχλωρίδα ανθρώπου και ζώων, αλλά και στη στοματική κοιλότητα και τον γυναικείο κόλπο. Η σύνθεση των βάσεων G+C στο DNA είναι λιγότερο από 53% ανά mol. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella*. Οι *lactobacilli*, τα *carnobacteria* και μερικά βακτήρια του γένους *Weissella* έχουν σχήμα βάκιλλου, ενώ τα υπόλοιπα γένη έχουν σχήμα κόκκου. Στο γιαούρτι συναντούμε στελέχη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc* (Narvhus et al, 2003).

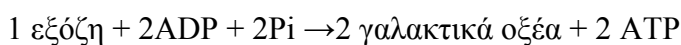
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά διάκρισης οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Character	Carno- bacterium	Lacto- bacillus	Aero- coccus	Entero- coccus	Lactoco- coccus/ Vagno- coccus	Leuconostoc/ Oenococcus	Pedio- coccus	Strepto- coccus	Tetragenococcus	Weissella
Tetrad formation	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
CO ₂ from glucose	–	±	–	–	–	+	–	–	–	+
Growth at 10°C	+	±	+	+	+	+	±	–	+	+
Growth at 45°C	–	±	–	+	–	–	±	±	–	–
Growth at 6.5% NaCl	ND	±	+	+	–	±	±	–	+	±
Growth at 18% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Growth at pH 4.4	Ns	±	–	+	±	±	+	–	–	±
Growth at pH 9.6	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–
Lactic acid	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL

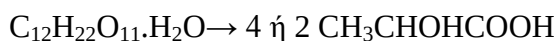
1.3.α Μεταβολικό μονοπάτι οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν τους υδατάνθρακες με δύο τρόπους, τον ομοιοζυμωτικό και τον ετεροζυμωτικό.

Ομοιοζυμωτικός τρόπος (Homofermentation): προκαλείται γλυκόλυση των εξοζών και συμβαίνει στα στελέχη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus*. Χαρακτηρίζεται από την διάσπαση της 1,6-διφωσφο-φρουκτόζης (FDP) σε δύο ίσο-τριόζες, την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεϋδη (GAP) και την φωσφο-διυδροξυ-ακετόνη, με την δράση της 1,6-διφωσφορικής αλδολάσης. Από την 3-φωσφο-γλυκεριλδεϋδη σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ από το οποίο τελικά παράγεται γαλακτικό οξύ που είναι και το μόνο προϊόν αυτού του τρόπου ζύμωσης (Axelsson,1998, Kandler, 1983).



Συγκεκριμένα για την ζύμωση της λακτόζης τα οξυγαλακτικά που διαθέτουν το ένζυμο αλδολάση παράγουν ως τελικό προϊόν ζύμωσης το γαλακτικό οξύ. Τα είδη του γένους *Lactococcus* παράγουν 4 μόρια γαλακτικού οξέος, ενώ τα είδη *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* παράγουν δύο μόρια γαλακτικού οξέος.



ένυδρη λακτόζη γαλακτικό οξύ

Ετεροζυμωτικός τρόπος (Heterofermentation): οξειδώνεται η γλυκόζη προς 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενη από μια αποκαρβοξυλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωσφο-γλυκεριναλδεϋδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ με τη δράση μιας φωσφοκετολάσης. Τελικά παράγεται CO₂, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσα μέρη. Εδώ ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του *Lactobacillus* spp. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια έχουν επίσης την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξωτερικούς δέκτες ηλεκτρονίων για να αναγεννούν το NADH και να αποδίδουν επιπλέον ενέργεια.



ή (αν υπάρχει εξωτερικός δέκτης ηλεκτρονίων)



Συγκεκριμένα για την ζύμωση της λακτόζης τα οξυγαλακτικά που διαθέτουν το ένζυμο φωσφοκετολάση παράγουν εκτός από το γαλακτικό οξύ και άλλους μεταβολίτες, όπως οξικό οξύ ή αιθανόλη και CO₂.



ένυδρη λακτόζη γαλακτικό οξύ αιθανόλη

1.3.β Οξυγαλακτικά βακτήρια γιαούρτης

Στρεπτόκοκκοι

Τα στελέχη του γένους *Streptococcus* έχουν μορφή κόκκων σχηματίζοντας αλυσίδες και έχουν διάμετρο 0,5-2 μm. Βρίσκονται σε τρόφιμα, στη στοματική κοιλότητα, στον αναπνευστικό σωλήνα σπονδυλόζων και κάποια είναι παθογόνα και κάποια άλλα ευκαιριακά παθογόνα (όπως τα ισχυρά παθογόνα βακτήρια *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* και *S. agalactiae*, την εντερική ομάδα *S. faecalis* και *S. faecium* και τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης *S. cremoris* και *S. lactis*). Οι στρεπτόκοκκοι έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα με επαρκείς πηγές πρωτεϊνών και υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των ιστών του εντερικού σωλήνα, του γάλακτος, των γαλακτοκομικών προϊόντων, των λαχανικών κ.α.

Εικόνα 1. Κόκκοι του *Streptococcus thermophilus* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

(πηγή:

<http://www.visualsunlimited.com/image/I0000Gi2nEyXlkqs>)



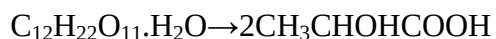
***S. thermophilus*:** Το μοναδικό στέλεχος των στρεπτόκοκκων που χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης στη βιομηχανία τροφίμων και είναι βασικό στοιχείο στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 40-50°C, ελάχιστη 20°C και μέγιστη 50°C. Μερικά είδη επιβιώνουν στους 80°C για 15 min. Για τη βέλτιστη ανάπτυξη του χρειάζονται βιταμίνες του συμπλέγματος B και κάποια αμινοξέα. Θρεπτικά μέσα και θερμοκρασίες επηρεάζουν τη μορφολογία τους. Η μορφολογία τους επηρεάζεται και από την παρουσία αντιβιοτικών ή άλλων φαρμακευτικών ουσιών του γάλακτος. Μορφολογικά είναι σφαιρικά ή ωοειδή κύτταρα διαμέτρου 0,7-0,9 μm. Σε γάλα και στους 45°C σχηματίζουν κοντές αλυσίδες, ενώ στους 30°C πολλά είδη εμφανίζονται σαν διπλόκοκκοι και σε όξινο περιβάλλον σχηματίζουν μακριές αλυσίδες. Αναπτύσσονται σε 2% NaCl και παράγουν NH₃ από αργινίνη, αλλά δεν ζυμώνουν τη μαλτόζη. Είναι πολύ ευαίσθητο στα αντιβιοτικά (>0,01 I.U). Ως ομοιοζυμωτικό βακτήριο παράγει 85-88% γαλακτικό οξύ και μικρές ποσότητες άλλων μεταβολιτών. Στο γάλα παράγει 0,7-0,8% L(+) γαλακτικό. Σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης και ελεγχόμενο pH, παράγει σε αναερόβιες συνθήκες φορμικό και οξικό οξύ, αιθανόλη, ακετοΐνη, CO₂ και στο γάλα πτητικά οξέα όπως φορμικό, οξικό οξύ, προπιονικό, βουτυρικό, ισοβαλερικό, και καπροϊκό, ακετοΐνη, και μικρές ποσότητες ακετόνης, ακεταλδεϋδης. Μερικά είδη παράγουν και διακετύλιο, ενώ άλλα δρουν ανταγωνιστικά σε άλλους μικροοργανισμούς. Στο γάλα παρουσιάζει μικρή πρωτεολυτική

δραστηριότητα και πολλά από τα παραγόμενα αμινοξέα καταναλώνονται κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξής του.

***Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040**

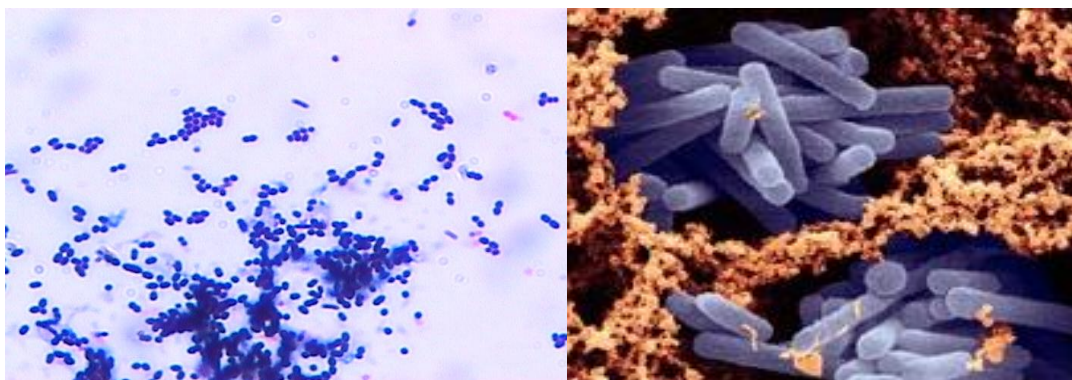
Απομονώθηκε από ελληνικό παραδοσιακό τυρί «φέτα» στην Ελλάδα και ανήκει στη συλλογή του ΓΠΑ.

Είναι ομοιοζυμωτικό, βακτηριοσινογόνο, οξυγαλακτικό βακτήριο, το οποίο ζυμώνει τη λακτόζη παράγοντας από ένα μόριο λακτόζης δύο μόρια γαλακτικού οξέος L(+).



ένυδρη λακτόζη γαλακτικό οξύ

Χαρακτηρίζεται ως προαιρετικό αερόβιο ή μικροαερόφιλο, θερμόφιλο βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37-45°C, θετικό στη χρώση Gram, αρνητικό στην καταλάση και οξειδάση και δεν σχηματίζει σπόρια. Απαριθμείται σε τρυβλίο με M17 Agar δίνοντας λευκές αποικίες κόκκων διαμέτρου 1-2mm. Αναπτύσσεται για ανανέωση σε M17 broth ή σε γάλα στους 37° C για 24h παράγοντας μια λευκή βιομάζα κυττάρων ως ίζημα και λευκό πήγμα λόγω οξύτητας αντίστοιχα.



Εικόνα 2. Κόκκοι *St. thermophilus* ACA-DC 0040 από χρώση Gram στα αριστερά και δεξιά
βακίλλοι του *L. bulgaricus* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (πηγή:

<http://news.bbc.co.uk/2/hi/8286646.stm>)

Λακτοβάκιλλοι

Οι λακτοβάκιλλοι είναι αποκλειστικά ζυμωτικοί οργανισμοί και έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις. Είναι ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον και τροποποιούν στην όξινη περιοχή το pH των τροφίμων που περιέχουν ζυμώσιμους υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα να μπορούν να αναστείλουν ή και να εξοντώσουν άλλα βακτήρια. Σχηματίζουν βακίλλους μεγέθους 0.5±1.2-1.0±10 μm και απαριθμούν πάνω από 60 είδη. Βρίσκονται σε μέρη θρεπτικά και υδατανθρακούχα, όπως φυτά, κρέας, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, σε κοπριά, ενσιρώματα και αποχέτευση, σε βλεννώδεις ιστούς ανθρώπων και ζώων.

Χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης για τυριά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά κρασιά, κ.α. Ανάλογα με τον χαρακτήρα ζύμωσης, οι λακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικούς, προαιρετικά ετεροζυμωτικούς και υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς.

Οι υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη *Lb. delbruekii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. farmicinis* και *Lb. kefirafaciens*. Το *Lb. acidophilus* χρησιμοποιείται στην παραγωγή ξινόγαλου και κατατάσσεται μαζί με το *Lb. jensonii* στην κατηγορία των προβιοτικών βακτηρίων. Το *Lb. delbruekii* περιλαμβάνει τα *Lb. delbruekii* subsp. *delbruekii* *bulgaricus* και *lactis*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή γιαουρτιών και τυριών. Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ, αλλά μπορούν να ζυμώσουν και το γλυκονικό παράγοντας CO₂. Ακόμα ζυμώνουν και τις πεντόζες προς παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* και *Lb. plantarum*. Ο *Lb. casei* εντοπίζεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τον εντερικό σωλήνα κ.α.

Οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις πεντόζες προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO₂. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο *Lb. sanfrancisco*, ο οποίος συμμετέχει στη ζύμωση του ψωμιού μετατρέποντας τη μαλτόζη σε γαλακτικό και οξικό οξύ (Stiles και Holzapfel, 1997).

Lactobacillus bulgaricus: Στέλεχος με ραβδόμορφα κύτταρα από 0,8-1,0 μέχρι 4-6μm. Η μορφολογία τους επηρεάζεται από μέσα ανάπτυξης, θερμοκρασία, παρουσία αντιβιοτικών ή άλλων φαρμακευτικών ουσιών του γάλακτος. Στο γάλα και στους 22 °C σχηματίζει λεπτούς μακρύς ράβδους που φθάνουν μέχρι 500μm. Βέλτιστα αναπτύσσεται σε 40- 43°C με ελάχιστη θερμοκρασία 22°C και μέγιστη 52,5°C. Μερικά είδη επιβιώνουν στους 75°C για 20-30 min. Δεν αναπτύσσεται παρουσία χολικών αλάτων και σε 2% NaCl. Σε αντίθεση με τον *Str. thermophilus* παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στα αντιβιοτικά (0,3-0,6 I.U/ml γάλακτος).

Παράγει μέχρι 1,7% D(-) γαλακτικό στο γάλα, μικρές ποσότητες καρβονιλικών ενώσεων, αιθανόλης και πτητικών οξέων. Η ακεταλδεϋδη είναι η πιο σημαντική και σε μεγάλη ποσότητα ουσία, και ακολουθούν βουτανόνη-2ακετόνη και ακετοΐνη. Παράγει επίσης λιπαρά οξέα, οξικό οξύ, προπιονικό, βουτυρικό, ισοβαλερικό, και καπροϊκό, καπριλικό και καπρικό. Ακόμη, παράγει H₂O₂ από την οξειδάση του NAD. Στο γάλα δείχνει χαμηλή λιπολυτική δράση και μέση πρωτεολυτική δραστηριότητα. Πολλά είδη δρουν ανταγωνιστικά έναντι πολλών σαπροφυτικών και παθογόνων μικροοργανισμών.

1.4 Καλλιέργειες εκκίνησης

Ως καλλιέργεια εκκίνησης ορίζεται το μικροβιακό παρασκεύασμα ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, το οποίο προστίθεται σε φρέσκο υλικό, με σκοπό την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης, μέσω της καθοδηγούμενης επιτάχυνσης της ζυμωτικής του λειτουργίας (Leroy και De Vuyst, 2004).

Ανάλογα με το προς παραγωγή γαλακτοκομικό προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν και οι κατάλληλες καλλιέργειες εκκίνησης. Οι καλλιέργειες εκκίνησης για τα γαλακτοκομικά προϊόντα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

1. Μεσοφιλικές καλλιέργειες, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 21 και 32°C, στις οποίες ανήκουν τα στελέχη: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.
2. Θερμοφιλικές καλλιέργειες, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 38 και 46°C, στις οποίες ανήκουν τα στελέχη: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. helveticus* και *L. plantarum*.

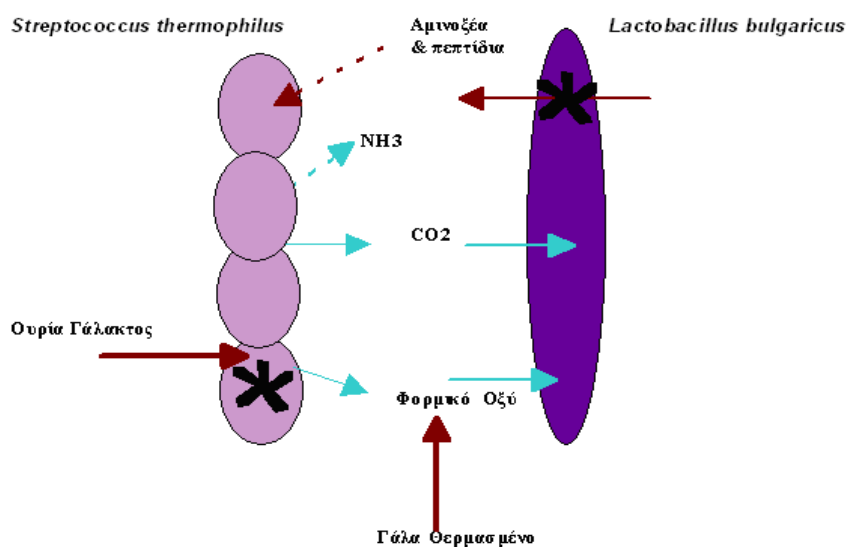
Οι πιο σημαντικές λειτουργίες τους είναι η επιμήκυνση του χρόνου ζωής των προϊόντων, η διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης τους. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν ταχύτατη οξίνιση του φρέσκου υλικού, μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος. Επίσης παράγουν αιθανόλη, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες, ένζυμα και αρωματικές ενώσεις. Έτσι, ευνοούν τη συντήρηση και μικροβιακή σταθερότητα του τροφίμου, βελτιώνουν τη γεύση και συμβάλουν στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Caplice και Fitzgerald, 1999). Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων γάλατος, κρέατος, λαχανικών, δημητριακών και αλκοολούχων ποτών (Leroy και De Vuyst, 2004). Η χρήση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων γάλατος οφείλεται στην ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού, κυρίως, οξέος, το οποίο, σε ορισμένες περιπτώσεις βοηθά στην πήξη των πρωτεϊνών του γάλατος. Αν και το ίδιο το γαλακτικό οξύ, καθώς και οι άλλες ενώσεις που παράγονται μαζί με αυτό, συμβάλλουν στην γεύση και το άρωμα τελικού προϊόντος, υπάρχουν ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές αποκλειστικά για την παραγωγή ενώσεων που προσδίδουν ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά και γεύση στο τελικό προϊόν, όπως το διακετύλιο, η ακεταλδεΐδη και το οξικό οξύ. Άλλος τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια εκκινητές μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση και την υφή του τελικού προϊόντος είναι μέσω της αποσύνθεσης των πρωτεϊνών και

του λίπους του γάλατος, καθώς και με τη μείωση του pH κατά την ζύμωση. Το χαμηλό pH των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, δρα ανασταλτικά για ορισμένα παθογόνα βακτήρια.

Κατάσταση Συνέργειας

Τα στελέχη *S. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* εμφανίζουν μια συνεργιστική σχέση στην ανάπτυξή τους κατά την παραγωγή γιαούρτης.

Ο *S. thermophilus* αναπτύσσεται πρώτος, προκαλεί την αρχική πτώση του pH του γιαουρτιού μέχρι το 5.0 και παράγει γαλακτικό οξύ. Τα παραγόμενα CO₂ και φουμαρικό οξύ ευνοούν την ανάπτυξη του *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ο οποίος ευθύνεται για την περαιτέρω πτώση του pH μέχρι το 4.2, καθώς στη συνέχεια παράγει πεπτίδια και αμινοξέα λόγω της πρωτεολυτικής δράσης του, τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη του στρεπτόκοκκου στο γάλα. Και οι δύο μικροοργανισμοί συμβάλουν στο σχηματισμό της γεύσης και του αρώματος του γιαουρτιού. Τα τελικά προϊόντα είναι γαλακτικό οξύ, ακεταλδεΐδη, οξικό οξύ, διακετύλιο και ακετοΐνη (Καλατζόπουλος Γ., 2002, Μοάτσου Γ., 2009).



Εικόνα 3. Συνεργιστική δράση των *S. thermophilus* και *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* κατά την παραγωγή γιαούρτης.

1.5 Τεχνολογία παραγωγής γιαουρτιού και τύποι

Κυριότεροι βιομηχανικοί τύποι παρασκευής γιαούρτης

1. Συμπαγές ή στερεάς δομής (set)
2. Αναδευόμενο (stirred)
3. Ρευστή γιαούρτη
4. Κατεψυγμένη γιαούρτη
5. Συμπυκνωμένη γιαούρτη

Στάδια παρασκευής

- I. Προετοιμασία γάλακτος (Καθαρισμός, έλεγχος για αντιβιοτικά, τυποποίηση)
- II. Συμπύκνωση υπό κενό ή προσθήκη σκόνης με αύξηση στερεών συστατικών στο 14-15%
- III. Προθέρμανση σε 60-70° C - Ομογενοποίηση
- IV. Θέρμανση (85° C για 30min ή 90-95° C για 5-10min ή 120° C για 2-3sec)
- V. Ψύξη σε θερμοκρασία επώασης 43° C
- VI. Εμβολιασμός με τις καλλιέργειες εκκίνησης (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) σε αναλογία 0,5-3% και σε πληθυσμιακή αναλογία μικροοργανισμών 1/1
 - a. Για το συμπαγές γιαούρτι γίνεται συσκευασία σε κύπελλα, επώαση στους 42° C για 3h μέσα σε αυτά, ψύξη σε <20° C και διατήρηση σε <5° C.
 - b. Για το αναδευόμενο γιαούρτι γίνεται επώαση στους 42° C για 3h μέσα σε δεξαμενές, ψύξη σε <20° C, συσκευασία σε κύπελλα και διατήρηση σε <5° C.

Στην περίπτωση της ρευστής γιαούρτης, το πήγμα αναμιγνύεται με ίση ποσότητα νερού, ανακινείται καλώς και διανέμεται ως εμφιαλωμένη.

Στην κατεψυγμένη γιαούρτη, η κατάψυξη γίνεται με ταχεία μέθοδο και η συντήρηση στους -18°C έως -26°C. Η απόψυξη μπορεί να γίνει βραδέως (24-36h) και σε θερμοκρασία ψύξεως. Επιτυχή είναι μόνο στο αναδευόμενο γιαούρτι, το οποίο θα περιέχει ήδη τουλάχιστον 13-14% στερεά συστατικά και συντηρείται για 12 μήνες.

Στη συμπυκνωμένη γιαούρτη, τα στερεά συστατικά αυξάνονται στο 23-25% με τη βοήθεια φυγοκέντρησης ή υπερδιήθησης. Με τη φυγοκέντρωση αποβάλλεται μέρος του ορού και αυξάνονται τα στερεά. Μπορεί να γίνει ή όχι αποβουτύρωση πριν την πήξη, οπότε προστίθεται ή όχι κρέμα πριν την ψύξη και συσκευασία για να είναι το λίπος στο 10%. Για την υπερδιήθηση πρώτα το γιαούρτι αποβουτυρώνεται και θερμαίνεται στους 90-95° C/10-15min, ψύχεται στους 47-50°C και συμπυκνώνεται. Με την υπερδιήθηση έως το ½ του αρχικού όγκου κατακρατούνται λίπος και πρωτεΐνες.

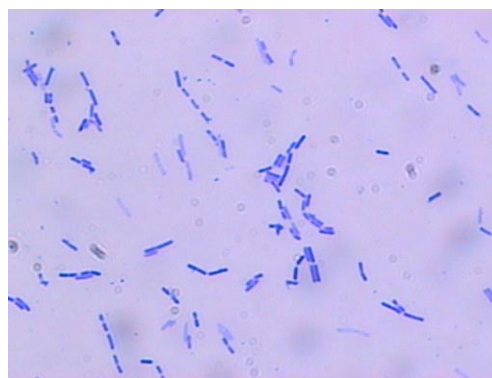
Το γιαούρτι συντηρείται για 1-6 εβδομάδες, ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης. Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών δίνει στο γιαούρτι χρόνο συντήρησης δεκαπέντε ημερών στη θερμοκρασία των 0-2° C.

1.6 *Listeria* spp.

Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι Gram+, θετικοί στην καταλάση, αρνητικοί στην οξειδάση, αερόβιοι-προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι, ψυχρότροφοι βάκιλλοι, διαμέτρου 0,4-0,5μm και 0.5-2 μm μήκους. Είναι κινητοί με περίτριχα μαστίγια στους 20-25°C και μη κινητοί στους 35°C. Έχει βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος 30-37°C και όρια θερμοκρασιακής ανάπτυξης 1-45°C. Δεν επιβιώνει στους 60°C για 30min. Αναπτύσσεται σε pH 6-9, σε 10% αλατότητα και σε ελάχιστη ενεργότητα ύδατος 0,92. Όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp. είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώθηκαν από πολλαπλές πηγές συμπεριλαμβανομένου εδάφους, νερών, λυμάτων τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης, κοπράνων των υγείων ζώων και περιβάλλοντος των εργοστασίων τροφίμων.

Σήμερα θεωρείται μικροοργανισμός του εδάφους με τη δυνατότητα εισβολής από διάφορες οδούς, με ποικίλη μολυσματική δόση, συμπτωμάτων και εντοπισμών στους ιστούς του ανθρώπου και των ζώων και αδιευκρίνιστη και πολυπαραγοντική παθογένεια (Mc Lauchlin et al., 2004).



Εικόνα 4. Βάκιλλοι γένους *Listeria*

Τα κυριότερα είδη που ανήκουν στο γένος της λιστέριας είναι *L.monocytogenes* που προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο και στα ζώα, *L.ivanovii* που συνδέεται με λοιμώξεις στα ζώα κυρίως βοοειδή και πρόβατα, *L.innocua* και *L.seeligeri* που σπάνια συνδέονται με λοίμωξη και τέλος τα είδη *L.grayi* και *L.welshimeri* που δεν σχετίζονται με μολύνσεις (Buchrieser C., 2007, Griffiths M., 2003).

Τροφιμογενή μόλυνση

Τα παθογόνα είδη λιστέριας μπορούν να προκαλέσουν τροφολοίμωξη που παρουσιάζεται μετά από κατανάλωση τροφίμου που περιέχει παθογόνα βακτήρια. Τα είδη *L.monocytogenes* και *L.ivanovii* μπορούν να προκαλέσουν β-αιμόλυση. Το βασικότερο παθογόνο για τον άνθρωπο, η *L.monocytogenes*, προκαλεί τη λιστερίωση και οι τροφές που ευθύνονται είναι γάλα, νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα, παγωτό, λαχανικά, κρέας, πουλερικά, θαλασσινά. Η περίοδος επώασης είναι >12 ώρες, συνήθως 3-70 ημέρες και η διάρκεια της ασθένειας μπορεί να είναι βραχεία ή μακρά. Τα συμπτώματα είναι εμετός, γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα, αποβολή, σηψαιμία, ενώ η μολυσματική δόση είναι άγνωστη, αλλά θεωρείται ότι ποικίλει με την πίεση και την ευαισθησία του θύματος. Από τις περιπτώσεις που προέρχονται

από το ακατέργαστο ή υποθετικά παστεριωμένο γάλα είναι ασφαλές να υποθεθεί ότι στα ευαίσθητα άτομα, λιγότεροι από 1.000 συνολικά μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια. Γενικά αναφέρεται η μολυσματική δόση σε 100 κύτταρα/γραμ. σε τρόφιμο. Το ποσοστό θνησιμότητας κυμαίνεται μεταξύ 20-30% και αφορά ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Περιπτώσεις λιστερίωσης αναφέρονται με τρέχουσα εκτίμηση της συχνότητας λιστεριώσεων 2-15 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού σε όλο τον κόσμο (Mead et al., 1999). Σύμφωνα με το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. καταγράφονται 0,3 κρούσματα ανά 10^6 πληθυσμού ετησίως στην Ελλάδα.

Τα τρόφιμα που συνδέθηκαν κατά το παρελθόν με πρόκληση λιστερίωσης καταναλώθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ή μετά από ελάχιστη θερμική επεξεργασία και παρείχαν κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς για την προσαρμογή και την επιβίωση στα όξινα περιβάλλοντα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH. Η προσαρμοστική απόκριση του καλείται ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR) και περιλαμβάνει απόκτηση όξινης αντοχής μετά από σύντομη έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα αλλαγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, παράγοντας πρωτεΐνες όξινης καταπόνησης (Acid Shock Proteins-ASPs) όταν υποβάλλεται σε συνθήκες έντονης πρόκλησης ή ακόμα και σε θανατηφόρο pH (Foster, 1991, Foster et al., 1994· Kroll και Patchett, 1992 O'Driscoll et al., 1997). Πολλές μελέτες συσχετίζουν την ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση με την παθογένεση του μικροοργανισμού (Conte et al., 2000, Gahan, 2002 και Hill, 1999). Το βακτήριο *L. monocytogenes* όχι μόνο επιζεί της όξινης καταπόνησης αλλά και απαιτεί πτώση του pH προκειμένου να ενεργοποιήσει την αιμολυσίνη ώστε να διαφύγει από το μακροφάγο φαγόσωμα. Επιπρόσθετοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, η απαμινάση της αργινίνης και το σύστημα της F0F1 ATPάσης.

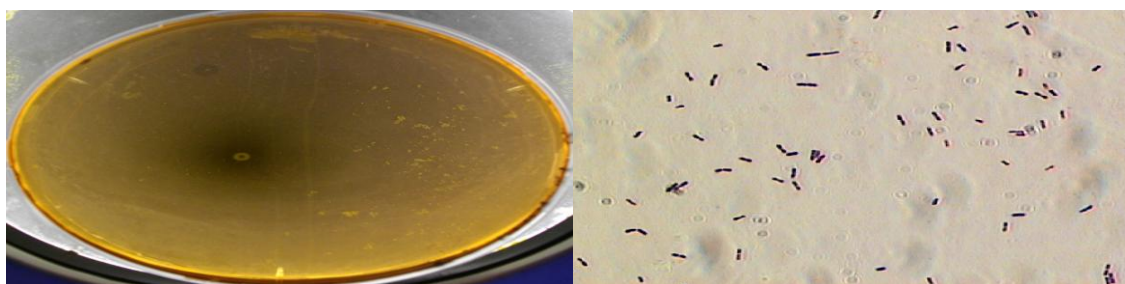
***Listeria welshimeri* 15008**

Είναι βακτήριο θετικό στη χρώση Gram σχηματίζοντας βακίλλους, θετικό στην καταλάση, αρνητικό στην οξειδάση και ουρεάση και υδρολύει την εσκουλίνη. Είναι προεραϊκά αναερόβιο, κινητικό κάτω από 30°C (βέλτιστη κινητικότητα στου 20-25°C) με τη βοήθεια περίτριχου μαστιγίου και μη σπορογόνο. Παράγεται οξύ από τη ζύμωση D-ξυλόζης και α-μεθυλ-D-μανογλυκοζιδίου. Δεν ζυμώνει την D-μαννιτόλη, ενώ για την L-ραμνόςη η αντίδραση ποικίλλει. Δεν μετατρέπει τα νιτρώδη ιόντα σε νιτρικά. Βρίσκεται παντού στη

φύση και μπορεί να απομονωθεί από λύματα, αποσυντιθέμενα φυτά, νερό, έδαφος και σκόνη. Το μέγεθος των βακτηρίων αυτών είναι 0,5-2μm. Έχει χαμηλό περιεχόμενο βάσεων G+C (36,4%) για αυτό και έχει μια λιγότερο άκαμπτη δομή DNA.

Απαριθμείται σε τρυβλίο με Palkam Agar στους 37°C για 48h δίνοντας γκρίζες-πράσινες αποικίες διαμέτρου περίπου 2mm που περιβάλλονται από σκούρους καστανούς έως μαύρους δακτυλίους. Η επιλεκτικότητα του υλικού επιτυγχάνεται μέσω της παρουσίας του χλωριούχου λιθίου, της πολυμυξίνης B, της ακριφλαβίνης-HCl και της κεφταζιντίμης, τα οποία καταστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων υποειδών πλην *Listeria*. Η διαφοροποίηση στο υλικό PALCAM βασίζεται στην υδρόλυση της εσκουλίνης και τη ζύμωση της μαννιτόλης. Όλα τα υποείδη *Listeria* υδρολύουν την εσκουλίνη, όπως καταδεικνύεται από την αμαύρωση του υλικού. Το προϊόν της υδρόλυσης, η εσκουλιτίνη (=6,7-διυδροκουμαρίνη), αντιδρά με ιόντα σιδήρου παράγοντας ένα καστανό έως μαύρο σύμπλεγμα. Περιστασιακά, στο υλικό αυτό μπορεί να αναπτυχθούν άλλοι οργανισμοί εκτός *Listeria*, όπως σταφυλόκοκκοι ή εντερόκοκκοι. Η μαννιτόλη, ο δείκτης pH και το ερυθρό της φαινόλης, έχουν προστεθεί για να διαφοροποιηθούν τα στελέχη αυτών των ειδών, τα οποία ζυμώνουν τη μαννιτόλη, από τα άλλα είδη *Listeria*. Η ζύμωση της μαννιτόλης δηλώνεται από μια χρωματική αλλαγή του υλικού από ερυθρό σε κίτρινο λόγω της παραγωγής οξέων. Για ανανέωση αναπτύσσεται σε TSBY σε 37°C για 24h παράγοντας μια λευκή βιομάζα κυττάρων ως ίζημα με θόλωμα.

Θεωρείται μη παθογόνο στέλεχος, καθώς είναι αρνητικό στην αιμόλυση τύπου β κατά την ανάπτυξη του σε blood agar και δεν έχει βρεθεί παθογένεια στα ποντίκια. Τα CAMP-test με *Staphylococcus aureus* και *Rhodococcus equi* είναι αρνητικά. Παθογένεια δεν έχει βρεθεί ακόμη και σε υψηλές μολυσματικές δόσεις ($>10^8$ CFU/ml) που είναι τουλάχιστον 100.000 φορές περισσότερο από το 50% της θανατηφόρου δόσης της *L. monocytogenes*, που προκαλεί λιστερίωση (10^3 CFU/ml). Αυτό συμβαίνει διότι λείπει η τοξική γονιδιακή περιοχή vgc. Τα στελέχη αυτού του είδους είναι ορότυπου 6a ή 6b με την αντιγονική σύνθεση να είναι αυτή του 6b.



Εικόνα 5. Αποικία *L. welshimeri* σε Palkam Agar και Βάκιλλοι *L. welshimeri* μετά από ανανέωση σε TSBY

1.7 Συντήρηση και ασφάλεια

Από τα πρώτα χρόνια της ζύμωσης των τροφίμων, οι πρόγονοι μας είχαν παρατηρήσει ότι τα ζυμωμένα τρόφιμα έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής και μικρότερες πιθανότητες προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ασφάλεια και σταθερότητα των τροφίμων αυτών μας οδήγησε στη μελέτη των *food-grade* βακτηρίων των ζυμώσιμων προϊόντων στα οποία οφείλεται η βιοσυντήρησή τους.

Η βιοσυντήρηση των τροφίμων αναφέρεται στην αύξηση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων, καθώς και στην καλύτερη υγιεινή των τροφίμων από μικροβιολογική άποψη, χρησιμοποιώντας είτε τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι ικανά να παράγουν βακτηριοσίνες ή άλλες αντιμικροβιακές ουσίες είτε τα μεταβολικά τους προϊόντα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως GRAS (generally recognized as safe) στελέχη και για αυτό έχουν τη δυναμική να χρησιμοποιούνται σαν συντηρητικά στα τρόφιμα (Hill et al, 2002, Galvez et al, 2007). Παράγουν μια ποικιλία μικρού μοριακού βάρους ουσιών, που παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, διαθέτοντας μεγάλο ή μικρό αντιμικροβιακό φάσμα δράσης, όπως τα οργανικά οξέα, οι αλκοόλες, το διοξείδιο του άνθρακα, το διακετύλιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οι βακτηριοσίνες.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, όπως *Listeria* spp. Οι βακτηριοσίνες έχουν στενό ή ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα αναστέλλοντας συγγενικά προς το παραγωγό στέλεχος είδη.

Πίνακας 3. Μερικές αντιμικροβιακές ουσίες *food-grade* βακτηρίων

Μεταβολίτες	Δραστικότητα
Ροτερίνη, οργανικά οξέα: γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ	Έναντι βακτηρίων και μυκήτων
Αλδεϋδες, κετόνες, αλκοόλες: ακεταλδεϋδη, διακετύλιο, αιθανόλη	Έναντι βακτηρίων
H ₂ O ₂	Έναντι βακτηρίων, μυκήτων και φάγων
Βακτηριοσίνες	Έναντι Gram+ βακτηρίων

1.7.1 Βακτηριοσίνες

Είναι βιοενεργά πεπτίδια ή σύμπλοκα πεπτιδίων, τα οποία συντίθενται ριβοσωμικά και απελευθερώνονται εξωκυτταρικά. Έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική επίδραση σε άλλα συνήθως στενά σχετιζόμενα είδη με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος (Hill et al, 2002).

Ένα στέλεχος μπορεί να παράγει περισσότερες από μια βακτηριοσίνες και πολλά στελέχη ιδίου είδους μπορούν να παράγουν την ίδια ή διαφορετικές βακτηριοσίνες. Επίσης, ένα πλασμίδιο μπορεί να κωδικοποιήσει μία ή περισσότερες βακτηριοσίνες και η ίδια η βακτηριοσίνη μπορεί να κωδικοποιηθεί είτε από διαφορετικού μεγέθους πλασμίδια ιδίου ή διαφορετικού είδους βακτήρια είτε από διαφορετικά πλασμίδια. Σε κάθε περίπτωση, το παραγωγών κύτταρο εμφανίζει συγκεκριμένη αντίσταση στη δράση της βακτηριοσίνης του.

Παράγονται από Gram+ και Gram-βακτήρια. Οι σημαντικότερες Gram- βακτηριοσίνες είναι οι κολισίνες (colicin) και παράγονται από στελέχη του *E. Coli*. Είναι μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικές λειτουργίες στις οποίες περιλαμβάνονται η κυτταρική σύνδεση, η μετανάστευση και η βακτηριακή δραστηριότητα. Δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων στόχων.

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram+ βακτήρια είναι μικρά πεπτίδια, αν και υπάρχουν και ορισμένες εξαιρέσεις. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα λαντιβιοτικά και τα μη-λαντιβιοτικά. Οι περισσότερες από τις Gram+ βακτηριοσίνες είναι ενεργά μεμβρανικά σύμπλοκα που αυξάνουν την διαπερατότητα της κυττοπλασματικής μεμβράνης, και συχνά εμφανίζουν ένα πολύ μεγαλύτερο πεδίο βακτηριακής ενεργότητας από ότι οι Gram-βακτηριοσίνες.

Το ιδανικό φυσικό συντηρητικό τροφίμου θα πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια: να εμφανίζει χαμηλή αποδεκτή τοξικότητα, να είναι οικονομικά βιώσιμο, σταθερό σε συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης, να μην παρουσιάζει δηλητηριώδη επίδραση στο τρόφιμο και να είναι αποδοτικό σε χαμηλή συγκέντρωση.

Η πιο διαδεδομένη βακτηριοσίνη ως φυσικό συντηρητικό είναι η νισίνη (nisin) που παράγεται από το είδος *Lactococcus lactis subsp. lactis* και δρά ενάντια Gram+ βακτηρίων περιλαμβάνοντας στελέχη ή είδη στρεπτόκοκκων, σταφυλόκοκκων, λακτοβάκιλλων, μικρόκοκκων, λιστέριας και των περισσότερων σπορογόνων γενών *Clostridium* και *Bacillus*. Τα Gram- βακτήρια, οι ζύμες και μύκητες δεν επηρεάζονται κανονικά. Η νισίνη έχει επιτραπεί ως προσθετικό τροφίμων σε περισσότερες από 50 χώρες, συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την εμπορική ονομασία Nisaplin.

Το φάσμα παρεμπόδισης των βακτηριοσινών ποικίλλει ενάντια σε Gram+ βακτήρια. Ακόμη και στο πιο ευαίσθητο στέλεχος μπορούν να υπάρξουν ανθεκτικά κύτταρα σε μια

βακτηριοσίνη, αλλά και στην απουσία της βακτηριοσίνης γίνονται ευαίσθητα ξανά. Ένα ευαίσθητο στέλεχος που είναι ανθεκτικό σε μια βακτηριοσίνη, μπορεί να είναι ευαίσθητο σε μια δεύτερη. Τα Gram-αρνητικά και τα ανθεκτικά Gram-θετικά βακτήρια καταπονημένα από φυσικούς ή χημικούς στρεσογόνους παράγοντες γίνονται ευαίσθητα σε μια βακτηριοσίνη, ενώ τα σπόρια ενός ευαίσθητου βακτηριακού στελέχους είναι ανθεκτικά σε μια βακτηριοσίνη, αλλά γίνονται ευαίσθητα μετά την ανάπτυξη τους.

Η δυναμική τους ικανότητα ανασχεσης ανάπτυξης ενός ευαίσθητου στελέχους χαρακτηρίζεται από την ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης [minimum inhibitory concentration (MIC) $\sim 0.01\mu\text{g/ml}$ για την pediocin AcH έναντι της *L.monocytogenes*] η οποία διαφέρει από βακτηριοσίνη σε βακτηριοσίνη.

Μηχανισμός δράσης βακτηριοσινών

Ένα μόριο βακτηριοσίνης καθώς μεταφράζεται οργανώνεται ως προβακτηριοσίνη, που περιέχει ένα N-τελικό πεπτίδιο καθοδηγητή και ένα C-τελικό άκρο που είναι η προβακτηριοσίνη. Το πεπτίδιο καθοδηγητής μετακινείται κατά τη μεταφορά των μορίων από το κυτόπλασμα έξω διαμέσου του ABC-μεταφορέα που λειτουργεί ως ενδοπεπτιδάση και είναι συνδεδεμένος στη μεμβράνη. Παρόλο που μερικές βακτηριοσίνες έχουν ένα πεπτίδιο στην αλυσίδα τους, μερικές έχουν δύο. Η λειτουργία του καθοδηγητή πεπτιδίου είναι να οδηγεί τη μεταφορά ενός μορίου μέσω του ABC-μεταφορέα.

Τα μόρια της βακτηριοσίνης μετά την έκκρισή τους από το παράγων στέλεχος παραμένουν είτε απορροφημένα στην επιφάνεια του κυττάρου είτε ελεύθερα στο μέσο, ανάλογα το pH του περιβάλλοντος. Τα περισσότερα μόρια παραμένουν ελεύθερα στο περιβάλλον σε pH 1.5-2.0, ενώ σε pH 6.0-7.0 παραμένουν συνδεδεμένα στην κυτταρική επιφάνεια. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι μερικές βακτηριοσίνες μπορούν να μεταφερθούν από το sec-εξαρτώμενο εκκριτικό σύστημα, ενώ κάποιες δεν έχουν την ακολουθία καθοδηγητή.

Γενικά θεωρείται ότι οι βακτηριοσίνες συνδέονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς και δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

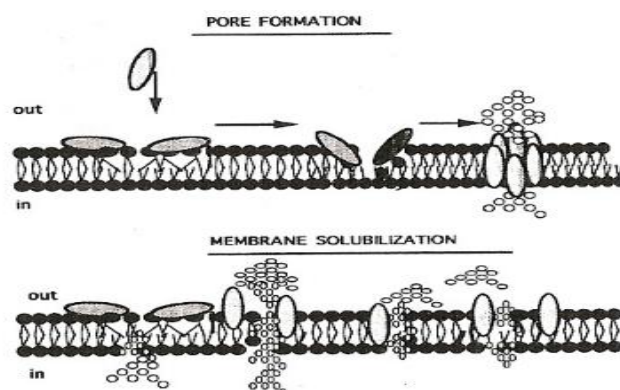
Η βακτηριοκτόνος επίδραση μιας βακτηριοσίνης απέναντι σε ένα ευαίσθητο βακτηριακό κύτταρο έγκειται στην αποσταθεροποίηση της λειτουργίας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Είναι γενικά αποδεκτό πλέον, ότι τα μόρια της βακτηριοσίνης αρχικά προσροφώνται σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών και σχηματίζουν προσωρινούς πόρους στη μεμβράνη, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του ηλεκτροχημικού δυναμικού και του ενδοκυτταρικού

pH. Αυτό αλλάζει την διαπερατότητα της μεμβράνης, προκαλώντας την διαφυγή μικρών θρεπτικών μορίων, ιόντων K^+ , ATP, ενώσεων που απορροφούν στο υπερίωδες, όπως αμινοξέα. Η απώλεια σε ATP και K^+ έχει ως αποτέλεσμα στην εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων και έτσι παρεμποδίζεται η σύνθεση μεγαλομορίων, όπως DNA, RNA και πρωτεϊνών. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν το κύτταρο να χάσει την βιωσιμότητά του.

Επιπρόσθετα, μερικές βακτηριοσίνες προκαλούν τη λύση των ευαίσθητων κυττάρων με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση, όπως στη νισίνη, αρκετά μόρια στην αρχή συνδέονται στη στοιβάδα λιπιδίων στη μεμβράνη, για τη νισίνη στο λιπίδιο II του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, τα μόρια έρχονται σε επαφή με τη μεμβράνη, οδηγώντας στο σχηματισμό πόρων, λόγω της διαφοράς δυναμικού μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού της μεμβράνης. Στη δεύτερη περίπτωση, όπως στην πεδιοσίνη AcH, σχηματίζονται πόροι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων στόχων και καθώς έρχονται σε επαφή τα μόρια με τη μεμβράνη, η τυχαία διαμόρφωσή τους αλλάζει σε συγκεκριμένη δομή. Τότε αρκετά μόρια οργανώνονται σε συστάδα, οδηγώντας στο σχηματισμό πόρου στη μεμβράνη (Moll et al, 1999).

Όσα στελέχη υποδεικνύουν ανοσία έναντι των βακτηριοσινών, πιθανώς παράγουν κάποιες πρωτεΐνες ανοσίας έναντι αυτών και δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στους υποδοχείς προσρόφησης.

Η βακτηριοκτόνος επίδραση των βακτηριοσινών εμφανίζεται μεγαλύτερη στα κύτταρα στόχους που βρίσκονται στην λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους, από ότι σε αυτά της στατικής.



Εικόνα 6. Μοντέλο δράσης βακτηριοσινών

Παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες επηρεάζονται από τη δράση των ενζύμων. Δεδομένου ότι οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικής φύσεως μπορούν να απενεργοποιηθούν από πρωτεάσες και συγκεκριμένα από ένζυμα του παγκρέατος, όπως τρυψίνη και χυμοτρυψίνη και του γαστρικού συστήματος, όπως πεψίνη. Η νισίνη είναι ευαίσθητη μόνο στο πρωτεολυτικό ένζυμο α -χυμοτρυψίνη. Μερικές βακτηριοσίνες του γένους *Lactobacillus* είναι ευαίσθητες σε

μη πρωτεολυτικά ένζυμα. Για παράδειγμα, η πλανταρισίνη B αδρανοποιείται με το ένζυμο α-αμυλάση και η πλανταρισίνη S με λιπολυτικά, γλυκολυτικά και φωσφορολιπολυτικά ένζυμα. Επίσης, οι βακτηριοσίνες δείχνουν ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες επεξεργασίας των τροφίμων ή σε θερμοκρασίες ψύξης και σταθερότητα σε ουδέτερα ή χαμηλά pH. Η νισίνη εμφανίζει τη μέγιστη διαλυτότητα και σταθερότητα σε pH 2, ενώ οι δύο αυτές παράμετροι μειώνονται καθώς το pH αυξάνεται. Ακόμη, σημαντικό ρόλο για την δραστικότητα της βακτηριοσίνης παίζει η σύνθεση του θρεπτικού μέσου. Παραδείγματα που μπορεί να αυξήσουν την ενεργότητα της παραγόμενης βακτηριοσίνης είναι εκχύλισμα ζύμης, τα αμινοξέα, υδρόλυμα καζεΐνης, η γλυκόζη, η πεπτόνη, το αλάτι και άλλα, όπου για κάθε μία είναι ξεχωριστές οι απαιτήσεις. Όσον αφορά τη μορφή του θρεπτικού μέσου, τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα είναι εύκολα στη χρήση και επιτρέπουν τη διατήρηση των άριστων συνθηκών ανάπτυξης. Σε μερικά στερεά υποστρώματα με τη χρήση πηκτινικών ουσιών όπως άγαρ, άμυλο, δεξτράνες ή γλυκερίνη επαυξάνεται η παραγωγή της βακτηριοσίνης. Επιπρόσθετα, οι βακτηριοσίνες είναι υδρόφοβα μόρια, γ' αυτό συμμετέχουν στην οργανική λιπαρή φάση των τροφίμων, πράγμα το οποίο περιορίζει τη χρήση τους στη βιομηχανία. Όμως, ως μικρά μόρια μπορούν με ευκολία να διαχυθούν στην υδατική φάση. Οι συνθήκες επεξεργασίας, αποθήκευσης και τα συστατικά ή τα πρόσθετα ενός τροφίμου, η χαμηλή διαλυτότητα και το μικροβιακό φορτίο στο τρόφιμο του τροφίμου, το στάδιο ανάπτυξης και η ανθεκτικότητα των κυττάρων στόχων είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της βακτηριοσίνης. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο χρόνος επώασης μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή βακτηριοσινών που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης και μέχρι την αρχή της στατικής φάσης. Η παρατεταμένη χρονικά επώαση έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση των βακτηριοσινών λόγω της πιθανής παραγωγής πρωτεασών και άλλων παρεμποδιστικών ενώσεων. Γενικά, οι συνθήκες ανάπτυξης των βακτηριοσινογόνων στελεχών επηρεάζουν την παραγωγή βιολογικά ενεργών βακτηριοσινών (Galvez et al, 2007, Hill et al, 2002, Yang R., 1994).

Προοπτικές χρήσης των βακτηριοσινών

Μελλοντικοί στόχοι είναι να παραχθούν βακτηριοσίνες με βελτιωμένη σταθερότητα και διαλυτότητα, με αυξημένο παρεμποδιστικό φάσμα και υψηλή βιολογική δραστικότητα με τη χρήση μοριακών μεθόδων, όπως η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Ιδιαίτερη πρόκληση αποτελεί η επέκταση της βακτηριοσινογόνου δράσης των LAB βακτηριοσινών έναντι των Gram- βακτηρίων είτε με τροποποίηση της δομής των βακτηριοσινών είτε με ευαισθητοποίηση των κυττάρων στόχων των Gram αρνητικών βακτηρίων με πρόσθετες ουσίες αποδεκτές στην τεχνολογία τροφίμων ή με κατεργασίες που υποβοηθούν τη δράση

βακτηριοσινών. Τελευταία, πραγματοποιείται η συνδυασμένη χρήση πολλών βακτηριοσινών μαζί, η προσθήκη βακτηριοσίνης στη συσκευασία ή σε κάψουλα στο τρόφιμο και τέλος η εφαρμογή βακτηριοσινών ως μέρος της τεχνολογίας εμποδίων.

Κατηγορίες βακτηριοσινών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Οι κατηγορίες των βακτηριοσινών όπως έχουν προταθεί και από τον Klaenhammer (1993):

Τάξη I: Περιλαμβάνει βακτηριοσίνες με δακτυλίους λανθειονίνης. Συντίθενται από ένα ή δύο πεπτίδια που έχουν μάζα περίπου 3kD και ονομάζονται λαντιβιοτικά (lantibiotics). Παραδείγματα είναι η νισίνη και η λακτισίνη 3147.

Τάξη II: Περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που αποτελούνται από μικρά πεπτίδια (30 – 100 αμινοξέα ή <10kDa), δεν περιέχουν δακτυλίους λανθειονίνης και παρουσιάζουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα. Στην τάξη αυτή ανήκουν 4 υποκατηγορίες.

IIa: Ανήκουν 14 βακτηριοσίνες με 2 ή 4 κυστεΐνες που σχηματίζουν έναν ή δύο δισουλφιδικούς δακτυλίους (cystibiotics ή pediosin-like). Παραδείγματα είναι οι πεδιοσίνη AcH, σακασίνη A ή P, λευκοσίνη A.

IIb: Ανήκουν βακτηριοσίνες με δύο πεπτίδια (λ.χ. πλανταρισίνη S, λακτοκοκκίνη G ή M, λακτασίνη F).

IIc: Ανήκουν βακτηριοσίνες που δεν έχουν κοινά χαρακτηριστικά (λ.χ. καρνοβακτηριοσίνη A)

IId: Ανήκουν βακτηριοσίνες στις οποίες μεταφράζεται μόνο το κυρίως μέρος, χωρίς το πεπτίδιο καθοδηγητής στο N-τελικό άκρο (λ.χ. εντερολυσίνη L50) .

IIe: Ανήκουν βακτηριοσίνες που παράγονται από το γενικό σύστημα έκκρισης (λ.χ. εντερολυσίνη P31).

Τάξη III: Περιλαμβάνει θερμοευαίσθητες βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Lactobacillus* και αποτελούνται από μεγάλες πρωτεΐνες (>30kDa, π.χ. ελβετισίνη J).

Τάξη IV: Περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες αποτελούμενες από μια πρωτεΐνη και ένα μη πρωτεϊνικό δομικό συστατικό (λιπίδιο ή υδατάνθρακα), το οποίο είναι απαραίτητο για να είναι ενεργή η βακτηριοσίνη. Θεωρείται η κατηγορία αυτή ότι προκύπτει από τις ιδιότητες των βακτηριοσινών, υδροφοβικές και κατιονικές, που τις οδηγούν στο να δημιουργούν σύμπλοκα με άλλα μόρια.

Οι βακτηριοσίνες της πρώτης και δεύτερης κατηγορίας χρησιμοποιούνται περισσότερο στη συντήρηση των τροφίμων λόγω της ανθεκτικότητας και της εξειδίκευσης τους στο κύτταρο στόχο.

Πίνακας 4. Κατηγορίες βακτηριοσινών LAB

Groups	Structural basis	Bacteriocin example	Producer strain
Class I: (Lanthionine containing) Lantibiotics	5 Thioether rings	Nisin A	<i>Lac. lactis</i> ATCC11454
	3 Thioether rings	Lacticin 481	<i>Lac. lactis</i> CNRZ481
	2 Thioether rings	Lactocin S	<i>Lab. sake</i> L45
Class II: (no lanthionine) <10 kDa			
IIa: Cystibiotics (also pediocin-like)	4 Cysteines with 2 disulfide bonds	Pediocin AcH	<i>Ped. acidilactici</i> H
	2 Cysteines with 1 disulfide bond	Leucocin A	<i>Leu. gelidum</i> UAL 187
IIb: Two peptides ^a	2 Separate peptides	Plantaricin S	<i>Lab. plantarum</i> LCP 010
II: Nonsubgroup	Some contain thiol group (1 or more)	Carnobacteriocin A	<i>Car. piscicola</i> LV17A
II: No leader peptide ^b	Translated as probacteriocin	Enterocin L50	<i>Ent. faecium</i> L51
II: sec-Dependent ^c	Leader peptide recognizes sec-secretory system	Enterocin P31	<i>Ent. faecium</i> P13
Class III: Large molecules ^d (>30 kDa)	Heat labile	Helveticin J	<i>Lab. helveticus</i> J

^a All other bacteriocins have one peptide.
^b All other bacteriocins have leader peptides.
^c All other bacteriocins are transported by specific ABC transporters.
^d All other bacteriocins are heat stable.

Πίνακας 5. Αντιπροσωπευτικές βακτηριοσίνες των LAB (Hill C. et al, 2002)

Bacteriocin	Producer	Inhibitory spectrum ^a	Size (number of amino acids)	Food source ^b
Class I: Lantibiotics				
Nisin (A and Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Broad	34	Milk
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Broad	27	—
Lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i>	Broad	37	Fermented sausage
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Broad	35–37	Fish
Variacin	<i>Micrococcus varians</i>	Broad	25	Meat fermentations
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i>	Broad	29 and 30	Kefir grain
Class II: Nonlantibiotic, small heat-stable				
Lactococcin A	<i>Lactococcus lactis</i>	Narrow	54	Cheese
Lactococcin B	<i>Lactococcus lactis</i>	Narrow	47	Cheese
Lactococcin M	<i>Lactococcus lactis</i>	Narrow	48	Cheese
Lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Narrow	57 and 48	—
Mesenterocin 52B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Narrow	32	Raw milk
Curvacin FS47	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Medium	31	Ground beef
Pediocin-like bacteriocins				
Sakacin A	<i>Lactobacillus sake</i>	Medium	41	Meat
Sakacin P	<i>Lactobacillus sake</i>	Medium	41	Fermented sausage
Carnobacteriocin A and B	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Medium	53 and 48	Meat
Pediocin AcH/PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Medium	44	Meat
Leucocin A-UAL-187	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Medium	37	Meat
Enterocin 1146/A	<i>Enterococcus faecium</i>	Medium	47	Fermented meat/milk
Piscicollin 126	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Medium	44	Ham
Mesenterocin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Medium	37	Goats' milk
Class III: Large, heat-labile				
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Narrow	333	—

^a Narrow spectrum indicates those bacteriocins which only affect the producer genus. Medium spectrum indicates those bacteriocins which affect the producer genus and members of one or two other genera.

^b Where known.

Reproduced with permission from O'Keefe T and Hill C (2000) Bacteriocins, potential in food preparation. In: Robinson RK, Batt CA and Patel PD (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 183–191. London: Academic Press.

Λαντιβιοτικά

Στα λαντιβιοτικά ανήκουν βακτηριοσίνες που παράγονται από τα Gram-θετικά βακτήρια και για την παραγωγή τους υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τα βασικά δομικά μόρια είναι τα θειοαιθερικά αμινοξέα λανθειονίνη και μεθυλολανθειονίνη και στην αρχή παράγονται ως προβακτηριοσίνες. Η δράση τους είναι ενάντια σε διάφορα παθογόνα Gram-θετικά βακτήρια.

Τα αμινοξέα δεϋδροαλανίνη (Dha), δεϋδροβουτυρίνη (Dhb), λανθειονίνη και β-μεθυλολανθειονίνη παράγονται μετά το στάδιο της μετάφρασης από την τροποποίηση της σερίνης και της θρεονίνης στις αφυδρογονωμένες (δεϋδρο) μορφές τους. Αυτά τα αμινοξέα αντιδρούν με την κυστεΐνη προς το σχηματισμό θειοαιθερικών δακτυλίων λανθειονίνης.

Διακρίνονται δύο τύποι λαντιβιοτικών. Στον πρώτο τύπο α). έχουν γραμμική δομή, θετικό φορτίο και δρουν μέσω αποπρωτονίωσης της μεμβράνης, όπου χωρίζονται σε δύο άλλους υποτύπους. α₁). Η λανθειονίνη και 3-μεθυλο-λανθειονίνη σχηματίζονται από τη δράση δύο εξειδικευμένων ενζύμων (π.χ. νισίνη). α₂). Τα λαντιβιοτικά σχηματίζονται από τη δράση ενός ενζύμου και αποτελούνται από μια αμινοτελική γραμμική περιοχή ακολουθούμενη από μια καρβοξυτελική (π.χ. λακτισίνη 481). Στον δεύτερο τύπο β). έχουν κυκλική δομή, ουδέτερο ή αρνητικό φορτίο και δρουν μέσω ενζυμικών αντιδράσεων (π.χ. ακτακαρδίνη, μερσασιντίνη).

Η βιοσύνθεση των λαντιβιοτικών γίνεται στα ριβοσώματα των βακτηριακών κυττάρων και τα γονίδια που ονομάζονται *lan*, βρίσκονται είτε σε χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια. Στα γονίδια αυτά ανήκουν το πρόδρομο μόριο *lanA*, ο ABC-μεταφορέας, τα ένζυμα τροποποίησης *lanB*, *lanC*, *lanM*, *lanD* και *lanJ*, τα γονίδια πρωτεόλυσης *lanP* και *lanT*, η ανοσοπρωτεΐνη *lanFEG*, *lanI* και *lanH* και η ρυθμιστική πρωτεΐνη *lanR*, *lanK*, *lanQ* και *lanX*. Στα γονίδια *lanB*, *lanC*, *lanT* και *lanP* οφείλεται η ωρίμανση λαντιβιοτικών τύπου α₁, ενώ στα *lanM* και *lanT* του τύπου α₂ και β (Xie et al 2002).

Thermophilin T

Η βακτηριοσίνη αυτή παράγεται από το οξυγαλακτικό βακτήριο *St.thermophilus* ACA-DC 0040. Αποτελεί ένα πεπτίδιο 2.5kDa με αντιμικροβιακή δράση έναντι αρκετών οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και βακτηρίων τροφικής αλλοίωσης, όπως τα κλωστρίδια *Clostridium sporogenes* C22/10 και *Clostridium tyrobutyricum* NCDO–1754. Είναι ιδιαίτερα ενεργή ενάντια θερμοφίλων γαλακτοβάκιλλων και άλλων στελεχών *St.thermophilus*, μικροοργανισμοί που ανήκουν στο ίδιο οικολογικό σύστημα με το παραγωγό στέλεχος.

Είναι ευαίσθητο στις πρωτεάσες και στην α-αμυλάση, ανθεκτικό σε θερμική καταπόνηση (λ.χ. 100°C για 30min) και στην έκθεση σε ακραία pH (pH < 1 και >10). Μπορεί να συντηρηθεί σε θερμοκρασία -30°C χωρίς να χάσει την ενεργότητά της για 1 με δύο μήνες (Aktypis et al. 1998).

Η σύνθεση της θερμοφιλίνης αυτής εμφανίζεται κατά το αρχικό μεταβολικό στάδιο ανάπτυξης με βέλτιστο ρυθμό σύνθεσης στους 30°C. Η δραστηριότητά της αυξάνεται σημαντικά στην εκθετική φάση ανάπτυξης κυττάρων, ενώ μειώνεται ραγδαία στη στατική φάση, ειδικά σε υψηλή θερμοκρασία ανάπτυξης (π.χ. 42°C).

Ταξινομείται στην 4^η κατηγορία βακτηριοσινών, που περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες αποτελούμενες από μια πρωτεΐνη και ένα μη πρωτεϊνικό δομικό συστατικό (υδατάνθρακα ή λιπίδιο), το οποίο είναι απαραίτητο για να είναι ενεργές (Klaenhammer 1993).

Η ανάπτυξη της βακτηριοσίνης καθορίζεται από στρεσογόνους παράγοντες, όπως η χαμηλή θερμοκρασία, η παρουσία τοξικών ουσιών και ανταγωνιστικών πληθυσμών, ενώ επηρεάζεται αρνητικά από την υψηλή παραγωγή βιομάζας. Μέσα ανάπτυξης με αυξημένη συγκέντρωση αζώτου ευνοούν την παραγωγή της θερμοφιλίνης, ενώ με αφθονία γλυκόζης την καταστέλλουν. Η απενεργοποίησή της μπορεί να οφείλεται στην προσκόλλησή της σε ένζυμα - πρωτεάσες (συσσωμάτωση) ή λόγω κυτταρικής απορρόφησης της ή σχηματισμού λιγότερο ενεργών μορίων (σύμπλοκα με άλλα συστατικά του μέσου) (De Vuyst et al. 1996b).

Βάσει των ιδιοτήτων της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης.

1.7.2 Πιθανές αλλοιώσεις γιαουρτιού μικροβιακής προέλευσης

Στο γιαούρτι μπορεί να εμφανιστούν αλλοιώσεις είτε μετά την παρασκευή, είτε κατά την συντήρηση και οι οποίες επηρεάζουν την εμφάνιση, τη σύσταση, το άρωμα, τη γεύση, αλλά και την υγιεινή του προϊόντος.

Κάποιες από τις αλλοιώσεις αυτές είναι οι παρακάτω: α). Διόγκωση που οφείλεται στην παραγωγή αερίων (CO_2 , H_2) λόγω ζυμώσεως της λακτόζης κυρίως από ζύμες και σπάνια από κολοβακτηριοειδή. Στη τελευταία περίπτωση η διόγκωση παρατηρείται στην πήξη. Το πήγμα γίνεται σπογγώδες και μπορεί να διαχωριστεί ο ορός. β). Ανάπτυξη αποικιών μυκήτων ή ζυμών όταν εμφανίζονται επιφανειακά λευκές (ζύμες) ή έγχρωμες (μύκητες) αποικίες διαφόρου εκτάσεως και το γιαούρτι αποκτάει ταγγή και πικρή γεύση. γ). Βλεννώδης σύσταση που παρατηρείται μετά την παραγωγή βλέννας από βακτήρια. Κυρίως ενέχονται είδη του γένους *Bacillus* (*B.subtilis*), αλλά και βακτήρια της γιαούρτης μετά από αντιγονική μετάλλαξη (στελέχη RO). δ). Αλλοίωση στην οσμή και τη γεύση λόγω της ανάπτυξης πρωτεολυτικών και λιπολυτικών βακτηρίων ή μυκήτων προκαλώντας πικρή και ταγγή γεύση.

Γενικά στη γιαούρτη εκτός από την οξυγαλακτική χλωρίδα μπορούν να βρεθούν και άλλοι μικροοργανισμοί. Μπορεί να είναι σπόρια θερμοάντοχων βακίλλων που πολλαπλασιάζονται κατά την επώαση και αλλοιώνουν τη γιαούρτη. Μπορεί να βρεθούν σταφυλόκοκκοι, μικρόκοκκοι ή Gram αρνητικά βακτήρια και κολοβακτηριοειδή, τα οποία αποτελούν επιμολύνσεις μετά την παστερίωση. Σε pH γιαούρτης κάτω από 4.5 τα κολοβακτηριοειδή και τα μη σπορογόνα βακτήρια γενικότερα εκτός από τα οξυάντοχα πεθαίνουν γρήγορα. Σε pH 4.0-4.3 η γιαούρτη είναι ένα δυσμενές υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό και επιβίωση παθογόνων βακτηρίων. Όμως, οι ζύμες και οι μύκητες μπορούν να επιμολύνουν το γιαούρτι και να πολλαπλασιαστούν ακόμα και στο χαμηλό pH και στη θερμοκρασία συντηρήσεώς του (Μάντης, 1990).

1.7.3 Έλεγχος στη γραμμή γιαουρτιού για *Listeria* spp.

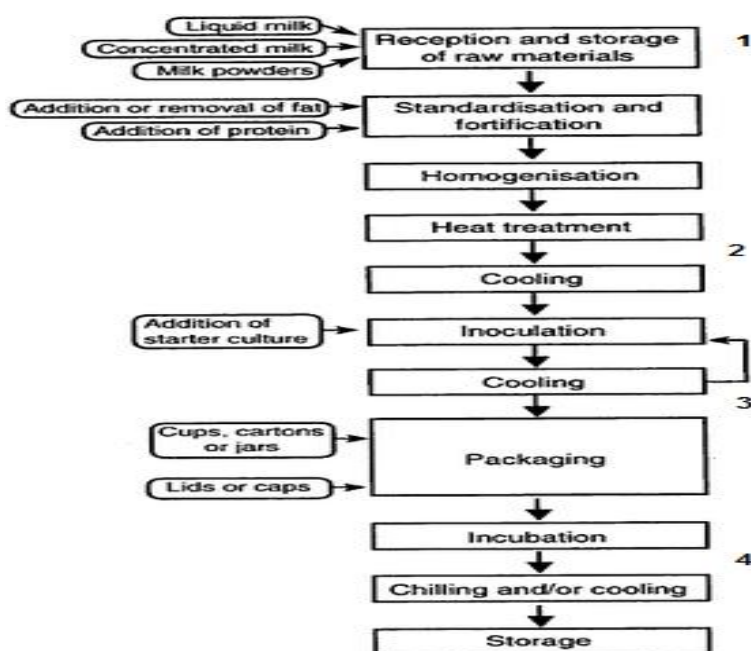
Στη γραμμή παραγωγής του γιαουρτιού υπάρχουν διάφορες βασικές αρχές που μπορούν να υιοθετηθούν προκειμένου να μειωθεί η έκθεση σε παθογόνα και ιδιαίτερα στη λιστέρια. Τα αγροτικά προϊόντα θα πρέπει να παράγονται υπό συνθήκες που ελαχιστοποιούν την παρουσία λιστέριας σε αυτά και να ακολουθούνται αυστηρά τα προαπαιτούμενα, όπως οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής (GMPs). Σε κάθε περίπτωση, το γάλα που θα χρησιμοποιείται για το γιαούρτι να έχει παστεριωθεί. Ακόμη, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή του συστήματος HACCP και ορισμένων μέτρων ελέγχου (control measures) επί της παραγωγικής διαδικασίας για την περαιτέρω μείωση της πιθανότητας μόλυνσης στους

χώρους παραγωγής και διάθεσης τροφίμων. Να γίνεται πάντα έλεγχος της τήρησης κανόνων υγιεινής, αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης, κατάλληλη θέρμανση και ψύξη των πρώτων υλών ή του προϊόντος. Βασική αρχή του συστήματος HACCP είναι ο καθορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου CCPs (Critical Control Points), όπου είναι δυνατόν να μετρηθεί ή και να απαλειφθεί ένας ενδεχόμενος κίνδυνος και τα οποία κρίσιμα σημεία έχουν άμεση σχέση με την ασφάλεια προϊόντων ρυθμίζοντας παραμέτρους όπως θερμοκρασία ή pH.

Κρίσιμα σημεία ελέγχου επιμόλυνσης με λιστέρια

Στη γραμμή παραγωγής του γιαουρτιού συγκεκριμένα, το πρώτο κρίσιμο σημείο ελέγχου συναντάται στην παραλαβή των πρώτων υλών με κίνδυνο χημικό και μικροβιολογικό, επειδή μπορεί να υπάρχουν υπολείμματα χημικών ουσιών, αλλά και επιμόλυνση με ανεπιθύμητη μικροβιακή χλωρίδα. Το δεύτερο είναι η θερμική επεξεργασία, γιατί μπορεί να επιβιώσουν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, έπειτα ο εμβολιασμός με τις εναρκτηρίες καλλιέργειες, οι οποίες μπορεί να έχουν επιμολυνθεί με βακτηριοφάγους ή να έχουν μειωμένη δυναμικότητα, οπότε να μην μπορούν να δράσουν ενάντια στο παθογόνο. Ακόμη, η συσκευασία η οποία πρέπει να είναι αποστειρωμένη και τέλος η επώαση και η αποθήκευση, είναι κρίσιμα σημεία ελέγχου κατά τη διάρκεια των οποίων μπορεί να υπάρξει επιμόλυνση από τον εξοπλισμό, ή από τις ακατάλληλες συνθήκες υγιεινής του χώρου ή του προσωπικού (Biorollo et al, 2001).

Όσον αφορά το παθογόνο *L.monocytogenes* για την κατανάλωση γαλακτοκομικού προϊόντος έχει καθοριστεί ότι αν δεν υπερβαίνει τα 100/g τροφίμου τη στιγμή της κατανάλωσης, τότε επιτρέπεται η κατανάλωσή του από άτομα υγιή (International Commission on Microbiological Specification for Foods-ICMSF, Norrung B., 2000).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής γιαουρτιού τύπου set με CCPs (1-4).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της ανάπτυξης του στελέχους *Listeria welshimeri* κατά την παρασκευή γιαούρτης στους 42°C και συντήρησή της στους 4°C. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε γιαούρτη με το βακτηριοσινογόνο οξυγαλακτικό στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040.

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η ασφάλεια του παραγόμενου ζυμώσιμου γαλακτοκομικού προϊόντος από την πιθανή επιμόλυνση με στέλεχη *Listeria spp.*, μέσω της *in situ* και *ex situ* παραγόμενης βακτηριοσίνης thermophilin T ως μεταβολικό προϊόν ενός αναγνωρισμένου ως *food grade* οξυγαλακτικού στελέχους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μικροοργανισμοί

Ως καλλιέργειες εκκίνησης στο πείραμα επιλεγήκαν τα οξυγαλακτικά στελέχη *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 και *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084. Το βακτήριο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 είναι το βακτηριοσινογόνο στέλεχος του πειράματος που παράγει τη βακτηριοσίνη thermophilin T. Το θερμόφιλο οξυγαλακτικό στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084 χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερη καλλιέργεια εκκίνησης για την παρασκευή γιαούρτης λόγω της ανθεκτικότητάς του έναντι της βακτηριοσίνης thermophilin T στη οποία δεν επηρεάζεται η ανάπτυξή του. Ως στέλεχος μάρτυρας που δεν παράγει βακτηριοσίνη στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το θερμόφιλο οξυγαλακτικό στέλεχος *St.thermophilus* ACA-DC 004, διότι έχει την ίδια οξυπαραγωγική ικανότητα κατά την ανάπτυξή του σε άπαχο γάλα με το στέλεχος *St. thermophilus* ACA-DC 0040.

Η επιλογή του κατάλληλου στελέχους ευαισθησίας γένους *Listeria* του πειράματος έγινε κατόπιν ελέγχου της ευαισθησίας σε μια σειρά από διάφορα στελέχη λιστέριας στη thermophilin T με τη μέθοδο WDA από την ανάπτυξη του βακτηριοσινογόνου στελέχους σε γάλα. Τα στελέχη που δοκιμάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους στην βακτηριοσίνη είναι 17 *Listeria* spp. που δόθηκαν από το Εργ. Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος ETT και 2 από το Εργ. Γαλακτοκομίας (*Listeria monocytogenes* και *Listeria innocua* BL 86/20) Η επιβεβαίωση της ενεργότητας της βακτηριοσίνης αυτής γίνεται με το στέλεχος-δείκτη *Lactococcus cremoris* CNRZ-117 για το οποίο είναι αποδεδειγμένη η παρεμποδιστική της δράση σε αυτό. Τελικά, παρατηρήθηκε ότι οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής ήταν στα στελέχη *Listeria welshimeri* 15008 και *Listeria monocytogenes*. Λόγω του ότι η *Listeria welshimeri* 15008 προσομοιάζει σε γενετική σύνθεση, φαινοτυπικές και βιοχημικές ιδιότητες με τη *L.monocytogenes*, αλλά δεν είναι παθογενές, προτιμήθηκε να χρησιμοποιηθεί ως το στέλεχος ευαισθησίας του πειράματος.

Όλα τα στελέχη του πειράματος κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας βρίσκονταν στους -80°C σε φιαλίδια με κρυοπροστατευτικά σφαιρίδια (bits) με 10% διάλυμα γλυκερόλης για την προστασία των κυττάρων. Για την χρησιμοποίησή τους γινόντουσαν ανανεώσεις των καλλιεργειών αναπτύσσοντάς τες στα αντίστοιχα υγρά υποστρώματα ή σε γάλα με εκχύλισμα ζύμης σε κατάλληλη θερμοκρασία για μια μέρα.

3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Συσκευές και όργανα

- LaminAir Holten HV 2436
- Αναδευτήρας με θέρμανση
- Αναλυτικός ζυγός
- Ζυμωτήρας Batch/Continuous Bioreactor BIOFLO 3000, New Brunswick Scientific Edison, N.J., USA
- Κεφαλές φυγοκέντρησης (24x1,5ml και 16x16ml)
- Κλίβανος αποστείρωσης κάθετου τύπου με προγραμματισμό
- Κλίβανος επώασης 37°C, 42°C και 42°C αναεροβίως
- Κυκλομίκτης (Vortex)
- Μετρητής αποικιών (Colony Counter Gallenkamp)
- Πεχάμετρο
- Συσκευή φυγοκέντρησης Biofuge 22R
- Συσκευή φυγοκέντρησης SORVALL® RC24
- Υδατόλουτρο με δυνατότητα προσαρμογής σε διάφορες θερμοκρασίες
- Φωτόμετρο ELISA (TECAN-Sunrise TS)
- Ψυγείο 4°C



Εικόνα 7. Φυγόκεντρος, κλίβανος επώασης, βιοαντιδραστήρας και φωτόμετρο ELISA αντίστοιχα

Σκεύη

- Eppendorf 1,5 ml
- Tips 1000 μ l και 200 μ l
- Αυτόματες πιπέττες Brand και Gilson έως 1000 μ l και έως 200 μ l
- Γκαζάκι
- Διανομέας
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μαγνητάκια ανάδευσης
- Μικροπλακίδια 96 θέσεων για φωτομέτρηση δειγμάτων
- Μπουκάλια δειγματοληψίας
- Μπουκάλια διαφόρων ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Πιπέττες Pasteur 150 mm
- Ποτήρια ζέσεως
- Προχοΐδα 25 ml με υποδιαιρέσεις ανά 0,1 ml
- Σιφόνια 10 ml
- Σπάτουλες
- Στατώ
- Σύρριγγες 10 ml
- Τριγωνάκια επιφανειακής εξάπλωσης
- Τρυβλία στρογγυλά διαμέτρου 9 cm από PS
- Τρυβλία τετράγωνα διαμέτρου 12,5 cm από PS

Αντιδραστήρια

- Agar No.1 Bacteriological 14‰ (Oxoid). Η προσθήκη του άγαρ στερεοποιεί το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, ρευστοποιείται σε βραστό νερό, ζελοποιείται στους 40°C και δεν αλληλεπιδρά με τους μικροοργανισμούς.
- HCl 5N
- M.R.S. Broth (pH 6,4 $\pm$ 0,2 σε 25°C, Oxoid)
- M17 Broth (pH 7,1 $\pm$ 0,2 σε 25°C, Oxoid)
- Palkam Listeria Selective - Supplement acc. to van Netten et al. (Oxoid, φιαλίδιο με αντιβιοτικό για την εκλεκτική επικράτηση στελεχών *Listeria spp.* κατά την ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα). Περιέχει ακριφλαβίνη HCl, πολυμυξίνη B και κεφταζιντίμη.

- Palkam Listeria-Selective agar (Base, pH 7,2±0,2 σε 25°C, Oxoid). Περιέχει βάση αιματούχου άγαρ, εκχύλισμα ζύμης, γλυκόζη, εσκουλίνη, κιτρικό σιδηροαμμώνιο, μαννιτόλη, ερυθρό της φαινόλης και χλωριούχο λίθιο.
- Ringer's solution (1/4 strength, Oxoid). Ένα χαπάκι διαλύεται σε 500ml απεσταγμένου νερού. Είναι μέσο διασποράς γενικής χρήσης, χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις δείγματος και περιέχει 2,25g L⁻¹ NaCl, 0,105g L⁻¹ KCl, 0,12g L⁻¹ CaCl₂ και 0,05g L⁻¹ NaHCO₃.
- Tryptone Soy Broth (pH 7,3±0,2 σε 25°C, Oxoid)
- Yeast extract 2% (εκχύλισμα ζύμης, Oxoid)
- Απεσταγμένο νερό
- Γάλα άπαχο σε σκόνη Ιρλανδίας 10% (skim milk powder) της Dairygold
- Γαλακτικό οξύ σε υγρή μορφή (C₃H₆O₃) 85%
- Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης 0,1%
- Διάλυμα NaOH N/9, 1N και 5N
- Θειικό αμμώνιο (NH₄)₂SO₄ (Mr 132,14 gr/mol)
- Πάγος
- Ρυθμιστικά διαλύματα pH 7 και 4

Γάλα πειράματος

Χρησιμοποιήθηκε σκόνη ανασυσταμένου αγελαδινού άπαχου γάλακτος 10% (Skim milk) με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε συγκέντρωση 2%. Η αποστείρωση του έγινε στους 115°C για 10 min.

Για την ανανέωση των καλλιεργειών η σύσταση ήταν η ίδια και το γάλα αποστειρωνόταν για 5min στους 121°C.

Χρησιμοποιήθηκε άπαχο γάλα γιατί έτσι δεν θα περιέχονται ουσίες με ανασταλτική δράση ως προς την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών στελεχών και δεδομένου της σταθερής σύστασης του γάλακτος δεν θα επηρεάζετο η σταθερότητα και δράση της παραγόμενης βακτηριοσίνης. Η προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης στο γάλα αυξάνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, καθώς αποτελεί σημαντική πηγή βιταμινών συμπλέγματος Β και αμμωνιακού αζώτου.

Η σκόνη άπαχου γάλακτος έχει κατά μέσο όρο την εξής σύσταση:

0.8% Λίπος, 35.9% Πρωτεΐνη, 52.3% Λακτόζη, 0.8% Τέφρα και 1308 mg% Ασβέστιο.

Σύνθεση θρεπτικών υποστρωμάτων

M.R.S: Εξειδικευμένο εκλεκτικό υπόστρωμα με συγκεκριμένο pH ικανοποιώντας τις απαιτήσεις των Gram+ γαλακτοβακίλλων. Για το **M.R.S. broth** σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 55 gr του μέσου υπό ανάδευση. Διανέμονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνονται. Για το **M.R.S. agar** σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 55 gr του μέσου και 14% άγαρ υπό ανάδευση και με θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού. Ρυθμίζεται το pH στο 5,4-6,4 με HCl 5N, διανέμονται σε μπουκάλια και αποστειρώνονται.

M17: Εξειδικευμένο επιλεκτικό υπόστρωμα με συγκεκριμένο pH ικανοποιώντας τις απαιτήσεις των Gram+ στρεπτόκοκκων χωρίς να παρεμποδίζονται τελείως άλλες ομάδες, αλλά επιτρέπει την εκλεκτική απαρίθμηση του *Streptococcus thermophilus* από το γαούρτι. Για το **M17 broth** σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 42,2 gr του μέσου υπό ανάδευση. Διανέμονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνονται. Για το **M17 agar** σε 1000ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 42,2 gr του μέσου και 14% άγαρ υπό ανάδευση και με θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού. Διανέμονται σε μπουκάλια και αποστειρώνονται.

Tryptone Soy: Εξειδικευμένο επιλεκτικό υπόστρωμα με συγκεκριμένο pH ικανοποιώντας τις απαιτήσεις μιας ή περισσότερων ομάδων βακτηρίων χωρίς να παρεμποδίζει τελείως άλλες ομάδες. Χρησιμοποιείται στο πείραμα αυτό ειδικά για την ανάπτυξη και την αρίθμηση ειδών του γένους *Listeria*. Για το **broth (TSBY)** σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 30 gr του μέσου και 6% yeast extract υπό ανάδευση. Διανέμονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνονται. Για το **agar (TSA)** σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 42,2 gr του μέσου και 14% άγαρ υπό ανάδευση και με θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού. Διανέμονται σε μπουκάλια και αποστειρώνονται.

Palkam Listeria-Selective agar: Εξειδικευμένο εκλεκτικό υπόστρωμα που επιτρέπει την ανάπτυξη ειδών του γένους *Listeria* με την προσθήκη αντιβιοτικού. Η σύνθεση γίνεται διαλύοντας 35,9 gr μέσου σε 500 ml απεσταγμένου νερού υπό συνεχή ανάδευση και θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού. Ύστερα γίνεται μεταφορά σε μπουκάλι και αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση όταν η θερμοκρασία κατέβει στους 50°C γίνεται προσθήκη αντιβιοτικού το οποίο αρχικά έχει διαλυθεί σε 1 ml αποστειρωμένου νερού. Έπειτα το άγαρ μοιράζεται σε τρυβλία.

Όλα τα υλικά αποστειρώνονται πριν τη χρήση τους στους 121°C για 15min. Τα θρεπτικά υποστρώματα φυλάσσονται στους 2-8°C.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Αρίθμηση μικροοργανισμών

Η μέθοδος της αρίθμησης των μικροοργανισμών στο πείραμα βασίζεται στην προετοιμασία τρυβλίων με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και γνωστή ποσότητα δείγματος είτε ως έχει, είτε μετά από αραιώση. Ακολουθεί η επώαση των τρυβλίων σε κατάλληλες συνθήκες και η αρίθμηση των αποικιών που αναπτύσσονται ανά ml γαουρτιού, παραδέχοντας συμβατικά ότι κάθε ζωντανό κύτταρο δίνει μια ορατή αποικία.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Προετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες με αραιωτικό διάλυμα Ringer 9ml και έγιναν οι ανάλογες δεκαδικές αραιώσεις παίρνοντας ασηπτικά και με ανάδευση 1ml κάθε φορά από το αρχικό δείγμα.
2. Εμβολιασμός και ενσωμάτωση ή εξάπλωση: για κάθε αραιώση που επιλέχτηκε χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία και μεταφέρθηκε ασηπτικά εκεί το δείγμα.
 - a. Επιφανειακή επίστρωση για το στέλεχος *Listeria welshimeri* 15008: σε αποστειρωμένα τρυβλία 9cm, τα οποία ήδη είχαν επιστρωθεί ασηπτικά με Palkam άγαρ, προσθέσαμε 0,1ml από το δείγμα από την αντίστοιχη αραιώση και το εξάπλωσαμε με τριγωνάκι. Τα τρυβλία επώαστηκαν ανεστραμμένα στους 37°C για 24 h. Οι αραιώσεις που επιλέχτηκαν είναι η μηδενική, η 10^{-1} και η 10^{-2} .
 - b. Ενσωμάτωση για τα οξυγαλακτικά στελέχη: σε αποστειρωμένα τρυβλία 9cm χωρίς υπόστρωμα προστέθηκε 1ml με πιπέττα από το δείγμα από τις αντίστοιχες αραιώσεις και από πάνω ρίξαμε άγαρ θερμοκρασίας 42-45°C M17 για τα στελέχη *St.thermophilus* ACA-DC 0040 ή 004 και MRS για το στέλεχος *L. bulgaricus* ACA-DC 084. Αναδεύσαμε καλά, αφήσαμε για λίγο να στερεοποιηθεί το άγαρ και τοποθετήσαμε τα τρυβλία προς επώαση ανεστραμμένα. Στους 37°C για 24 h επώαστηκαν τα *St.thermophilus* ACA-DC 0040 ή 004 και στους 42°C για 48 h αναεροβίως επώαστηκε το *L. bulgaricus* ACA-DC 084.

Οι αραιώσεις που επιλέχτηκαν για *St.thermophilus* ACA-DC 0040 ή 004 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν οι 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , ενώ κατά τη συντήρηση ήταν οι 10^{-6} , 10^{-7} . Επίσης, οι αραιώσεις που επιλέχτηκαν για *L. bulgaricus* ACA-DC 084 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν οι 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , ενώ κατά τη συντήρηση ήταν 10^{-4} , 10^{-5} .

3. Αρίθμηση αποικιών: επιλέχθηκαν τα τρυβλία δύο διαδοχικών αραιώσεων που αριθμούν 10-300 αποικίες (IDF) με τη βοήθεια του μετρητή αποικιών και υπολογίστηκε ο αριθμός των ζώντων βακτηρίων ανά ml γιουρτιού μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{cfu/ml} = \Sigma C / (n_1 + 0,1n_2)d$$
, όπου ΣC ήταν το άθροισμα των αποικιών από τα επιλεγμένα τρυβλία, n_1 ήταν ο αριθμός των τρυβλίων της πρώτης επιλεγείσας αραιώσης, n_2 ήταν ο αριθμός των τρυβλίων της δεύτερης επιλεγείσας αραιώσης και d ήταν η δεκαδική αραιώση της πρώτης αραιώσης που επιλέχθηκε. Το αποτέλεσμα εκφράστηκε με μια δύναμη του 10 από 1,1 έως 9,9.

3.3.2 Προσδιορισμός οξύτητας με τη μέθοδο Dornic

Στο πείραμα η οξύτητα μετρήθηκε με τη μέθοδο Dornic που βασίζεται στην τιτλοδότηση 10 ml δείγματος με διάλυμα καυστικού νατρίου N/9, παρουσία δείκτη φαινοolphθαλεΐνης (3-4 σταγόνες). Το τελικό σημείο τιτλοδότησης είναι αυτό όπου το χρώμα αλλάζει από λευκό σε ελαφρά ρόδινο (~pH 8.3) για 10 sec. Η οξύτητα εκφράζεται σε βαθμούς Dornic ($^{\circ}\text{D}$) ή σε γαλακτικό οξύ %, πολλαπλασιάζοντας την ποσότητα NaOH που καταναλώθηκε με το 10 ή με το 0,1 αντίστοιχα. Με αυτόν τρόπο βρίσκεται η συνολική ογκομετρούμενη οξύτητα, δηλαδή η ένταση της οξύτητας μέσω της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου.

3.3.3 Προσδιορισμός pH

Στο πείραμα ο προσδιορισμός του pH επιτυγχάνεται με πεχάμετρο το οποίο συνδυάζεται με κατάλληλο ηλεκτρόδιο και σε λίγο χρόνο προσδιορίζεται ηλεκτρομετρικά το pH του γιουρτιού μετρώντας το σύνολο των ατόμων του υδρογόνου (ποσότητα οξύτητας) ύστερα από καλή ανάδευση του δείγματος.

3.3.4 Μέθοδος ανίχνευσης βακτηριοσίνης με τη μέθοδο της διάχυσης σε τρυβλία-Well Diffusion Assay (WDA)

Κατά την πειραματική διαδικασία η παρεμποδιστική ικανότητα της θερμοφιλίνης μετρήθηκε με τη μέθοδο WDA, η οποία έχει ως αρχή τη διάχυση της βακτηριοσίνης σε στερεό θρεπτικό μέσο ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη του ευαίσθητου στελέχους.

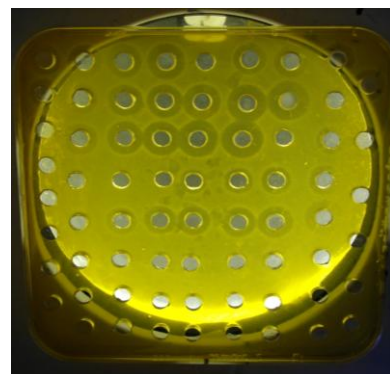
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της βακτηριοσίνης ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- εμβολιασμός τρυβλίου 9 cm με 0,1 ml του φρέσκου ανανεωμένου (αφού προηγηθούν ήδη δύο ανανεώσεις) ευαίσθητου στελέχους από την αραιώση 10^{-1} σε Ringer και 12,5cm με 0,2 ml.

- επίστρωση από πάνω με 20 ml TSA
- μετά από 10 min ανοίγονται οπές διαμέτρου 6mm με αποστειρωμένη πιπέττα Pasteur
- τοποθέτηση σε κλίβανο για 45 min των 42°C του τρυβλίου ανεστραμμένο και ανοιχτό προς αφυδάτωση του άγαρ
- φυγοκέντρηση 1 ml σε erpendorf βακτηριοσινογόνου στελέχους (που μόλις έχει ήδη ανανεωθεί) στις 12000 στροφές για 10 min σε 4°C για την απομάκρυνση των κυττάρων ως λευκό ίζημα και παραλαβή του υπερκείμενου σε νέο erpendorf στο οποίο μετά ρυθμίζεται το pH στο 5,8-6,2 με NaOH 1N
- έγχυση στις οπές 50 μl από το υπερκείμενο
- παραμονή τρυβλίου στους 4°C για 1 h ώστε το υπερκείμενο να απορροφηθεί στο άγαρ
- επώαση στους 37°C για 24 h
- παρατήρηση ζώνης παρεμπόδισης ανάπτυξης του ευαίσθητου στελέχους γύρω από την οπή δηλώνει την παρουσία βακτηριοσίνης.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βακτηριοσίνης ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι όταν λαμβάνεται το υπερκείμενο και αφού διορθωθεί το pH γίνονται οι απαραίτητες δυαδικές αραιώσεις του δείγματος με 200 μl Ringer (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, κ.ο.κ.).

Εικόνα 8. Ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του ευαίσθητου στελέχους *Listeria welshimeri* 15008 από τη βακτηριοσίνη thermophilin T.



Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε Arbitrary Units (AU) που είναι αυθαίρετες μονάδες και αποτελούν το αντίστροφο της τελευταίας αραιώσης στην οποία παρατηρείται ανασταλτική δράση βακτηριοσίνης. Στο τέλος το αποτέλεσμα μετατρέπεται στο 1ml, διότι ο τίτλος που λαμβάνεται αρχικά θα είναι στα 50μl.

3.3.5 Παραγωγή βακτηριοσίνης *ex situ*

Στόχος της διαδικασίας παραγωγής βακτηριοσίνης κατά την διαδικασία του πειράματος ήταν η βελτιστοποίηση των συνθηκών της παραγωγής βακτηριοσίνης, επιτυγχάνοντας βακτηριοσίνη υψηλής ενεργότητας σε ζυμωτήρα σταθερών συνθηκών.

Για το σκοπό αυτό γίνονται τα εξής: Σε ζυμωτήρα BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) σε σταθερές συνθήκες pH 6.2, θερμοκρασίας T=37°C και συνεχής ανάδευσης 100 στροφών (rpm x min⁻¹) παράγουμε βακτηριοσίνη *in situ* σε γάλα 1500 ml. Η παραγωγή γίνεται με εμβολιασμό 1% του στελέχους *St.thermophilus* ACA-DC 0040 στο γάλα. Ταυτόχρονα το σύστημα τροφοδοτείται από αντλία με αποστειρωμένο NaOH 5N κάθε φορά που το pH πέφτει κάτω από το 6,2. Στο σημείο που θα έχει παραχθεί η μέγιστη βακτηριοσίνη και θα έχει καταναλωθεί και η μεγαλύτερη ποσότητα NaOH, σταματάμε τη

ζύμωση και παστεριώνουμε για 15sec στους 72°C. Έπειτα ψύχουμε το γάλα και μετράμε σε δείγμα την ανασταλτική δράση της βακτηριοσίνης που έχει παραχθεί με τη μέθοδο WDA.

3.3.6 Πρωτόκολλο μερικού καθαρισμού και συμπύκνωσης βακτηριοσίνης με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Στην παρούσα μελέτη με σκοπό την παραλαβή συμπυκνωμένης μορφής της θερμοφιλίνης, απομονώθηκε η βακτηριοσίνη ως πρωτεΐνη με καταβύθιση μέσω του θειϊκού αμμωνίου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον καθαρισμό πρωτεϊνών αλλάζοντας τη διαλυτότητά τους, μια μέθοδος γνωστή ως εξαλάτωση.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών ποικίλλει βάσει της συγκέντρωσης άλατος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος η διαλυτότητα πρωτεΐνης αυξάνει, καθώς το αλάτι σταθεροποιεί τις διάφορες φορτισμένες ομάδες του μορίου κρατώντας το διαλυμένο μέσα στο διάλυμα. Όσο αυξάνεται το αλάτι, κάποια στιγμή η πρωτεΐνη φτάνει στη μέγιστη διαλυτότητα της και στο ισοηλεκτρικό της σημείο και έτσι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μειώνεται, γιατί ελαττώνονται τα μόρια του νερού που επιδρούν με τα μόρια της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα είναι η πρωτεΐνη να αφυδατώνεται με την περαιτέρω προσθήκη άλατος και τελικά να κατακρημνίζεται (Pimgitore et al, 2007, Sapatnekar et al, 2010, Todorov et al, 2004).

Για την διεξαγωγή του πειράματος ακολουθούνται τα εξής βήματα: Στην αρχή σε ζυμωτήρα σε σταθερές συνθήκες παράγουμε βακτηριοσίνη *in situ*. Όταν θα έχει παραχθεί η μέγιστη βακτηριοσίνη και θα έχει καταναλωθεί και η μεγαλύτερη ποσότητα NaOH, σταματάμε τη ζύμωση και ψύχουμε στους 24°C, μεταφέρουμε στον πάγο το γάλα και απομονώνουμε τη βακτηριοσίνη με φυγοκέντρηση σε 9000 rpm για 10 min σε 4°C. Στο υπερκείμενο ελεύθερου κυττάρων που λαμβάνεται ύστερα γίνεται καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο 55% (w/v), το οποίο ρίχνεται τμηματικά και για μισή ώρα και έπειτα προστίθεται όλο το υπόλοιπο ώσπου το υπερκείμενο μεταφέρεται στο ψυγείο για 3-4 ώρες. Το ίζημα που δημιουργείται συλλέγεται με φυγοκέντρηση (9000 rpm, 10 min, 4°C) στο οποίο μετράμε τη συγκέντρωση βακτηριοσίνης.

3.3.7 Προσδιορισμός της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης της θερμοφιλίνης (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) έναντι της *Listeria welshimeri* 15008

Ο στόχος της διαδικασίας ήταν να προσδιορίσουμε τις συγκεντρώσεις της βακτηριοσίνης στην οποία παρατηρείται βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος δράση ενάντια στη *Listeria welshimeri* 15008 με τη βοήθεια του φωτόμετρου ELISA.

Στην αρχή παρήγαμε βακτηριοσίνη τίτλου 5120 (AU/ml) από την ανάπτυξη του στελέχους *St.thermophilus* ACA-DC 0040 σε γάλα μέσω της μεθόδου μερικού καθαρισμού και συμπύκνωσης βακτηριοσίνης με θειϊκό αμμώνιο. Η βακτηριοσίνη που έχει παραχθεί

χρησιμοποιήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις για τον προσδιορισμό της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης.

Παράλληλα, έχουμε αναπτύξει και το στέλεχος *L.welshimeri* 15008 στους 37°C για 24h σε σωληνάκι TSBY. Από το αρχικό ευαίσθητο στέλεχος προέκυψαν 3 ενοφθαλμίσματα λιστέριας προσθέτοντας την αντίστοιχη ποσότητα σε καθαρό σωληνάκι TSBY: α). υψηλή (10^4 cfu/ml), β). μεσαία (10^3 cfu/ml) και γ). χαμηλή (10^2 cfu/ml) του στελέχους.

Τελικά τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο 7 σειρές δειγμάτων για τα τρία είδη ενοφθαλμισμάτων με διάφορες συγκεντρώσεις βακτηριοσίνης. Το πλακίδιο τοποθετήθηκε στο φωτόμετρο ELISA και μετρήθηκε η απορρόφηση της βιομάζας κάθε συνδυασμού δείκτη και βακτηριοσίνης για τα τρία ενοφθαλμίσματα για 20h στους 37°C στα 610 nm (οπτικό πεδίο). Έγιναν δύο επαναλήψεις για κάθε ενοφθαλμισμό. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Magellan V2.50.

3.3.8 Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 στους 42°C

Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας ήταν ο έλεγχος της παραγωγής και δραστηριότητας της βακτηριοσίνης σε συνθήκες παρασκευής γιαούρτης.

Αρχικά το βακτηριοσινογόνο στέλεχος ανανεώθηκε (100 μl σε γάλα). Επίσης, εισήχθη γάλα 1000 ml στη συσκευή του ζυμωτήρα για να αποστειρωθούν μαζί στους 121°C για 15 min. Έπειτα, το γάλα εμβολιάστηκε με 0,5% (5 ml) του στελέχους. Το στέλεχος στο ζυμωτήρα αναπτύχθηκε σε συνθήκες 42°C. Τελικά, παραλαμβάνονταν δείγμα προς μέτρηση ανά 2 ώρες και γινόταν η καταμέτρηση του οξυγαλακτικού πληθυσμού σε M17 άγαρ, ο ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριοσίνης και η καταγραφή pH σε διάστημα των 24 ωρών. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

3.3.8.α Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084 στους 42°C

Στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν η μελέτη της πορείας και ανάπτυξης της βακτηριοσίνης και της ενεργότητά της κατά τη διάρκεια συγκαλιέργειας με τον *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084 σε συνθήκες παραγωγής γιαούρτης σε κλειστό ζυμωτικό σύστημα στο ζυμωτήρα BIOFLO.

Αρχικά τα δύο οξυγαλακτικά στελέχη ανανεώθηκαν. Έπειτα, γάλα 1000 ml εισήχθη στη συσκευή ζυμωτήρα για να αποστειρωθούν μαζί στους 121°C για 15 min. Στη συνέχεια, το γάλα εμβολιάστηκε με 0,5% από το κάθε στέλεχος. Τελικά τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 42°C. Δείγμα παραλαμβάνονταν προς μέτρηση ανά 2 ώρες για να γίνει ποσοτικός

προσδιορισμός βακτηριοσίνης και καταγραφή pH σε διάστημα 24 ωρών. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

3.3.8.β Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος *Listeria welshimeri* 15008 στους 42°C

Στόχος στη διαδικασία αυτή ήταν η μελέτη της πορείας και ανάπτυξης της βακτηριοσίνης και της ενεργότητά της κατά τη διάρκεια συγκαλιέργειας με το στέλεχος *Listeria welshimeri* 15008 σε συνθήκες παραγωγής γιαούρτης σε κλειστό ζυμωτικό σύστημα στο ζυμωτήρα BIOFLO.

Αρχικά το βακτηριοσινογόνο στέλεχος και το στέλεχος δείκτη ανανεώθηκαν. Έπειτα, γάλα 1000 ml εισήχθη στη συσκευή ζυμωτήρα για να αποστειρωθούν μαζί στους 121°C για 15 min. Στη συνέχεια, το γάλα εμβολιάστηκε με 0,5% του βακτηριοσινογόνου στελέχους και 1% του δείκτη. Τελικά τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 42°C. Δείγμα παραλαμβανόταν προς μέτρηση ανά 2 ώρες για να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριοσίνης και καταγραφή pH σε διάστημα 24 ωρών. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

3.3.9 Μελέτη της επίδρασης της *in situ* thermophilin T στην ανάπτυξη της *Listeria welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης διαφορετικού βαθμού οξίνισης

Στόχος του πειράματος αυτού ήταν να μελετήσουμε την παραγόμενη βακτηριοσίνη κατά την παρασκευή γιαούρτης και την επίδρασή της στη βιωσιμότητα της *Listeria welshimeri* 15008.

Για την εκτέλεση του πειράματος αυτού αρχικά ανανεώθηκαν τα στελέχη και παρασκευάστηκε γάλα 1000 ml το οποίο προστέθηκε στο ζυμωτήρα και αποστειρώθηκαν μαζί. Θέσαμε σε λειτουργία το ζυμωτήρα με το γάλα με 1% οξυγαλακτικά στελέχη, δηλαδή 0,5% *St.thermophilus* ACA-DC 0040 και 0,5% *L. bulgaricus* ACA-DC 084 σε συνθήκες 42°C και υπό συνεχή ανάδευση και ενοφθαλμίσαμε το γάλα στο ζυμωτήρα με 1% *L. welshimeri* 15008. Λαμβάναμε δείγμα προς μέτρηση ανά μία ώρα περίπου ελέγχοντας το pH ανά μισή ξεκινώντας από τη μηδενική. Όταν το pH έφτανε στο επιθυμητό για την παραγωγή γιαούρτης, το γάλα μοιραζότανε σε μπουκαλάκια δειγματοληψίας, τοποθετούνταν σε πάγο για να σταματήσει η αντίδραση και έπειτα μεταφέρονταν στο ψυγείο προς συντήρηση για 20 μέρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές.

Τόσο κατά τη ζύμωση όσο και κατά τη συντήρηση, σε κάθε δείγμα μετρήθηκε ο πληθυσμός του δείκτη σε τρυβλία με επιφανειακή εξάπλωση με Palkam άγαρ και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών σε τρυβλία με ενσωμάτωση, με M17 άγαρ για το στέλεχος *St.thermophilus* και MRS άγαρ για το στέλεχος *L. bulgaricus*. Ακόμη, υπολογίστηκε ο τίτλος της βακτηριοσίνης με τη μέθοδο WDA, μετρήθηκε το pH και η οξύτητα.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος μελετάται η επίδραση της βακτηριοσίνης για δύο είδη συγκέντρωσης κυττάρων λιστέριας υψηλή 10^4 (cfu/ml) και χαμηλή 10^2 (cfu/ml) για τα τελικά pH παρασκευής γιαούρτης 4.8, 4.5 και 4.2.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές και για το μη βακτηριοσινογόνο στέλεχος.

3.3.10 Προσθήκη βακτηριοσίνης thermophilin T στο γάλα παρασκευής γιαούρτης και μελέτη της επίδρασής της στην ανάπτυξη της *L. welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης

Ο στόχος στο παρών πείραμα ήταν να μελετηθεί η επίδραση της έξωθεν προστιθέμενης βακτηριοσίνης στην ανάπτυξη και περαιτέρω βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση γιαούρτης.

Για την εκτέλεση του πειράματος αυτού αρχικά παρασκευάστηκε βακτηριοσίνη τίτλου 5120 (AU/ml) σε γάλα που ζυμώθηκε με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος *St.thermophilus* ACA-DC 0040 σε σταθερές συνθήκες pH και θερμοκρασίας.

Παράλληλα έχουν ανανεωθεί τα στελέχη και παρασκευάστηκε γάλα το οποίο προστέθηκε στο ζυμωτήρα και αποστειρώθηκαν μαζί. Ύστερα παρασκευάστηκε γιαούρτη με γάλα το οποίο πρώτα αναμίχθηκε με την παραγόμενη βακτηριοσίνη ως εξής:

Στους 42°C στο υδατόλουτρο σε 4 μπουκάλια ζέσεως αποστειρωμένα με 30 ml γάλα προστέθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες 30 ml γάλα με *ex situ* βακτηριοσίνη και έπειτα, ενοφθαλμίσαμε με 2% οξυγαλακτικά (1% *St.thermophilus* ACA-DC 0040, 1% *L. bulgaricus* ACA-DC 084) και 1‰ λιστέρια. Λαμβάναμε δείγμα προς μέτρηση ανά μία ώρα περίπου ελέγχοντας το pH ανά μισή ξεκινώντας από τη μηδενική. Όταν το pH έφτανε στο επιθυμητό για την παραγωγή γιαούρτης, τα μπουκαλάκια τοποθετούνταν σε πάγο για να σταματήσει η αντίδραση και έπειτα μεταφέρονταν στο ψυγείο προς συντήρηση για 27 μέρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές.

Τόσο κατά τη ζύμωση όσο και κατά τη συντήρηση, σε κάθε δείγμα μετρήθηκε ο πληθυσμός του δείκτη σε τρυβλία με επιφανειακή εξάπλωση με Palkam άγαρ και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών σε τρυβλία με ενσωμάτωση, με M17 άγαρ για το στέλεχος *St.thermophilus* και MRS άγαρ για το στέλεχος *L. bulgaricus*. Υπολογίστηκε ο τίτλος της βακτηριοσίνης με τη μέθοδο WDA και μετρήθηκαν το pH και η οξύτητα.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος μελετάται η επίδραση της έξωθεν προστιθέμενης βακτηριοσίνης για υψηλή συγκέντρωση λιστέριας 10^4 (cfu/ml) και για χαμηλή 10^2 (cfu/ml) για το τελικό pH παρασκευής γιαούρτης 4.8.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφτηκε δύο φορές και για το μη βακτηριοσινογόνο στέλεχος.

3.3.11 Μελέτη της επίδρασης της προστιθέμενης βακτηριοσίνης thermophilin T στην βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 στο γιαούρτι κατά την επιμόλυνσή του σε συνθήκες συντήρησης

Στόχος για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν να μελετηθεί η επίδραση της έξωθεν προστιθέμενης βακτηριοσίνης στην ανάπτυξη και περαιτέρω βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 κατά την συντήρηση γιαούρτης.

Για την εκτέλεση του πειράματος αυτού αρχικά παρήγαμε βακτηριοσίνη τίτλου 10240 (AU/ml) σύμφωνα με το πρωτόκολλο καταβύθισης με θειικό αμμώνιο. Παράλληλα έχουν ανανεωθεί τα στελέχη και παρασκευάστηκε γάλα το οποίο προστέθηκε στο ζυμωτήρα και αποστειρώθηκαν μαζί. Ύστερα παρασκευάστηκε γιαούρτη από αποστειρωμένο γάλα 500ml στους 42°C στο υδατόλουτρο εμβολιάζοντας με 1% οξυγαλακτικά *St.thermophilus* ACA-DC 0040 και *L. bulgaricus* ACA-DC 084. Η ζύμωση σταμάτησε στο pH 4,4 και στη συνέχεια κάναμε την επιμόλυνση ως εξής:

Το γιαούρτι μοιράστηκε σε μπουκάλια και προστέθηκε *ex situ* παραγόμενης συμπυκνωμένη βακτηριοσίνη σε διάφορους συνδυασμούς. Έγινε διόρθωση του pH στο 4,4 με γαλακτικό οξύ 85%, διότι με την προσθήκη της βακτηριοσίνης το pH αυξήθηκε. Τότε έγινε ενοφθαλμισμός σε δύο διαφορετικά επίπεδα λιστέριας, από 10^2 (cfu/ml) έως 10^1 (cfu/ml). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο ψυγείο και από εκεί και έπειτα μετρήθηκε ο τίτλος της βακτηριοσίνης και ο πληθυσμός του μολύσματος στη μηδενική ώρα και για τις 20 μέρες της συντήρησης στο ψυγείο. Η διαδικασία επαναλήφτηκε δύο φορές.

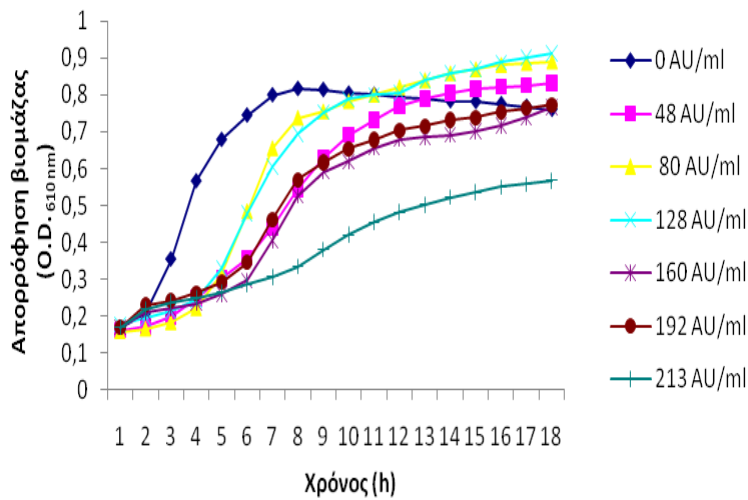
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Προσδιορισμούς της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης της θερμοφιλίνης (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) έναντι της *Listeria welshimeri* 15008

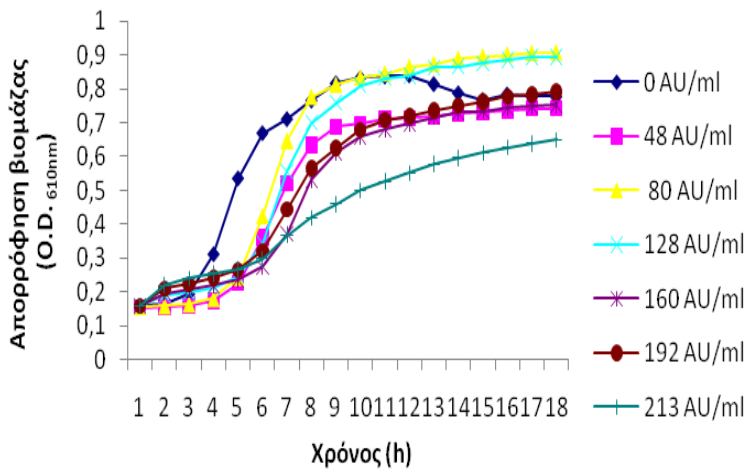
Ο προσδιορισμός της MIC της θερμοφιλίνης έναντι του ευαίσθητου στελέχους *Listeria welshimeri* 15008 έγινε με τον έλεγχο ανάπτυξης σε υγρό υπόστρωμα TSBY με διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηριοσίνης από 0 – 3413 (AU/ml) έναντι τριών διαφορετικής συγκέντρωσης κυττάρων *Listeria* στατικής φάσης ανάπτυξης, ήτοι 10^4 , 10^3 και 10^2 (cfu/ml). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο ELISA τύπου TECAN στα 610 nm στους 37°C με μέτρηση της ανάπτυξης της *Listeria* φωτομετρικά ανά ώρα για 20 ώρες.

Συγκεκριμένα, στους χαμηλούς τίτλους της βακτηριοσίνης 0-213 (AU/ml), παρατηρούμε ότι ο χρόνος της φάσης προσαρμογής (lag phase) αυξάνεται όσο περισσότερο βακτηριοσίνη προστίθεται και στα τρία είδη λιστέριας και μάλιστα όσο λιγότερο είναι το αρχικό επίπεδο λιστέριας, τόσο η φάση προσαρμογής επιμηκύνεται (Γράφημα 1, 2 & 3). Το κοινό για τις τρεις συγκεντρώσεις κυττάρων λιστέριας είναι ότι στο μεγαλύτερο τίτλο βακτηριοσίνης συναντάμε τη χαμηλότερη ανάπτυξη. Επίσης, βλέπουμε ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριοσίνης (213 AU/ml) συναντάμε τον μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης για κάθε επίπεδο λιστέριας, χωρίς όμως να έχουμε μηδενισμό του ρυθμού, κατά μέσο όρο 0.074, (Πίν.6). Συμπεραίνουμε έτσι ότι η δράση εδώ της βακτηριοσίνης είναι βακτηριοστατική και η παρεμπόδιση μερική.

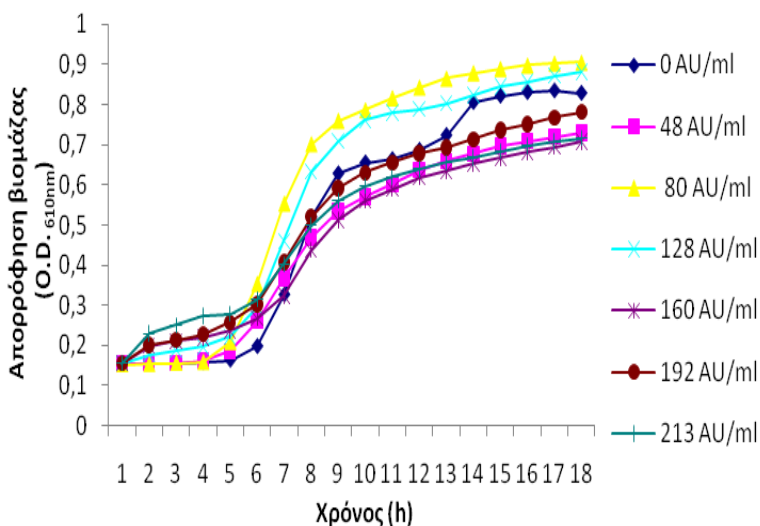
Στους πιο υψηλούς τίτλους βακτηριοσίνης 768-3413 (AU/ml) (Γράφ. 4, 5 & 6), από τα 768 (AU/ml) η ανάπτυξη των κυττάρων της λιστέριας είναι χαμηλή. Από τον πίνακα 6 παρατηρούνται μεγάλοι χρόνοι προσαρμογής, ειδικότερα στο χαμηλό επίπεδο λιστέριας. Επίσης, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της βακτηριοσίνης τόσο μειώνεται ο ρυθμός αύξησης. Τελικά, στα 2048 (AU/ml) ο ρυθμός μηδενίζεται, ενώ δεν διακρίνεται πλέον φάση προσαρμογής. Άρα, η δράση της βακτηριοσίνης εδώ είναι βακτηριοκτόνος και η παρεμπόδιση της λιστέριας είναι πλήρης. Οπότε, η ελάχιστη συγκέντρωση βακτηριοσίνης (MIC) στην οποία παρεμποδίζεται η *L. welshimeri* 15008 είναι τα 2048 (AU/ml).



Γράφημα 1. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (0-213 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε υψηλή συγκέντρωση (10^4 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.



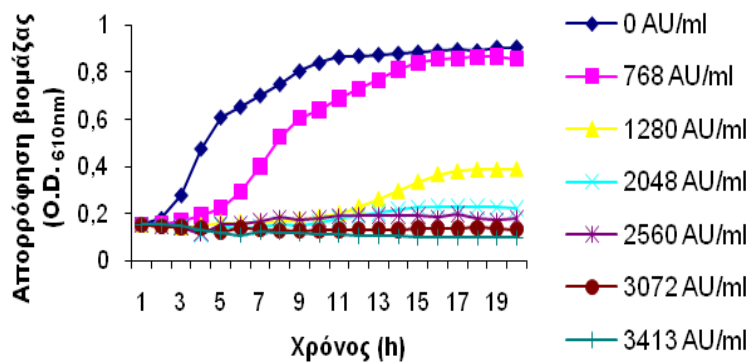
Γράφημα 2. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (0-213 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε μεσαία συγκέντρωση (10^3 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.



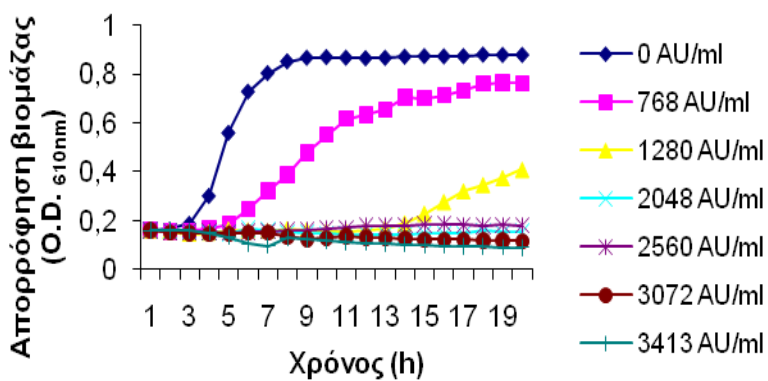
Γράφημα 3. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (0-213 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε χαμηλή συγκέντρωση (10^2 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.

Πίνακας 6. Χρόνος προσαρμογής και μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης *L.welshimeri* 15008 σε υπόστρωμα TSBY παρουσία βακτηριοσίνης 0-5120 AUml⁻¹.

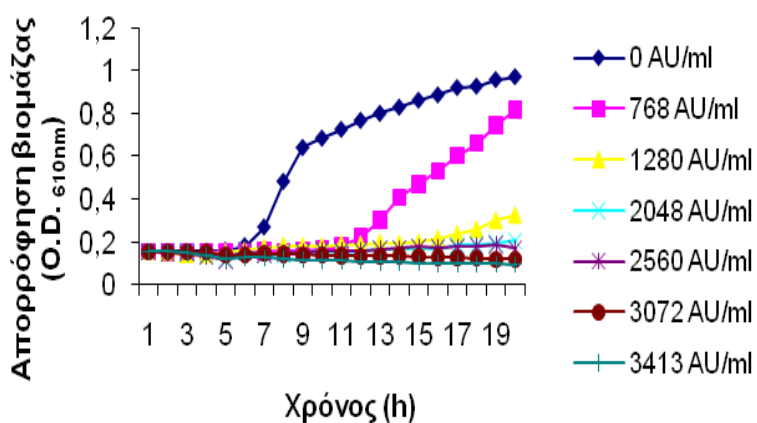
Ενοφθάλμισμα <i>Listeria</i> (cfu/ml)	Υψηλό (10 ⁴)		Μεσαίο (10 ³)		Χαμηλό (10 ²)	
AU/ml στο τελικό δείγμα	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (t _{lag} , h)	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης λίστέριας (μ _{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (t _{lag} , h)	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης λίστέριας (μ _{max})	Διάρκεια φάσης προσαρμογής (t _{lag} , h)	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης λίστέριας (μ _{max})
0	1	0,165	2	0,166	3	0,159
48	2	0,182	3	0,138	3	0,117
80	2	0,12	3	0,104	3	0,099
128	2	0,12	3	0,096	3	0,091
160	3	0,101	4	0,089	4	0,085
192	4	0,09	4	0,084	4	0,076
213	7	0,077	7	0,071	7	0,073
768	8	0,062	8	0,044	9	0,034
1280	10	0,045	12	0,035	14	0,027
2048	-	0	-	0	-	0
2560	-	0	-	0	-	0
3072	-	0	-	0	-	0
3413	-	0	-	0	-	0



Γράφημα 4. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (768-3413 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε υψηλή συγκέντρωση (10^4 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.



Γράφημα 5. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (768-3413 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε μεσαία συγκέντρωση (10^3 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.



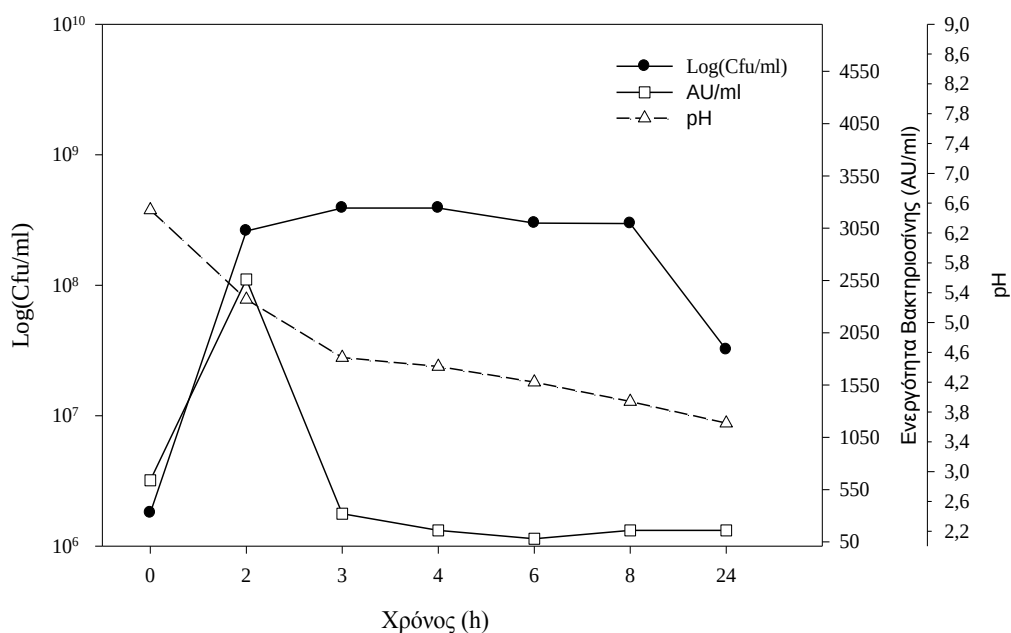
Γράφημα 6. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων θερμοφιλίνης (768-3413 AU/ml) στην ανάπτυξη και επιβίωση του ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 σε χαμηλή συγκέντρωση (10^2 cfu/ml) σε υπόστρωμα TSBY κατά τη μέτρηση της απορρόφησης της βιομάζας της λιστέριας επί 20 ώρες.

Συγκριτικά, στους χαμηλούς τίτλους της θερμοφιλίνης (0-213 AU/ml) η παρεμποδιστική δράση έναντι της λιστέριας παρατηρείται κατά την εκθετική φάση αύξησης, μετά από ορισμένο χρόνο προσαρμογής, πιθανώς λόγω ανθεκτικότητας του στελέχους της λιστέριας στη θερμοφιλίνη. Αντίθετα, στους υψηλούς τίτλους βακτηριοσίνης (768-3413 AU/ml) παρατηρούνται μεγαλύτεροι χρόνοι προσαρμογής και μικρότεροι ρυθμοί αύξησης όσο μικρότερο είναι το ενοφθάλμισμα και όσο περισσότερο προστίθεται η βακτηριοσίνη. Συνολικά, η δράση της thermophilin T γίνεται εμφανής από τα 48 AU/ml και επίσης παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος προσαρμογής (t_{lag}) της *Listeria* στις μικρές συγκεντρώσεις από $10^2 - 10^3$ (cfu/ml) ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με αυτή της μεγαλύτερης συγκέντρωσης (10^4 cfu/ml) στις συγκεντρώσεις θερμοφιλίνης μέχρι 160 (AU/ml). Άρα, από την ανάλυση των καμπυλών ανάπτυξης της λιστέριας (Γράφημα 1 - 6) και τον προσδιορισμό των παραμέτρων ανάπτυξης, χρόνου προσαρμογής t_{lag} και μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μ_{max} στις διάφορες συγκεντρώσεις από 0-3413 (AU/ml) θερμοφιλίνης προκύπτει, ότι ο χρόνος προσαρμογής (lag phase) αυξάνεται ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση της θερμοφιλίνης στο μέσο, με μέγιστο τις 10-14 ώρες για την συγκέντρωση 1280 (AU/ml), ενώ ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) είναι αντιστρόφως ανάλογος αυτής (Πίνακας 8). Επομένως, η δράση της βακτηριοσίνης σχετίζεται τόσο με την ποσότητα που προστίθεται και τον αρχικό τίτλο της, όσο και με την συγκέντρωση του ευαίσθητου στελέχους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αντίστοιχες παρατηρήσεις επιβίωσης διαφόρων στελεχών λιστέριας σε TSBY, όταν προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις νισίνης από 100 έως 5000 (AU/ml) και μόνο στα 5000 (AU/ml) παρουσιάζεται τελικά παρεμποδιστική δράση της νισίνης, ενώ στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις τα βακτήρια γένους *Listeria* έδειχναν ανθεκτικότητα (Vignolo et al, 2000).

4.2 Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 στους 42°C

Ο έλεγχος της παραγωγής και ενεργότητας της βακτηριοσίνης thermophilin T έγινε με την ανάπτυξη του βακτηριοσινογόνου στελέχους *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 στο ζυμωτήρα BIOFLO (New Brunswick, NJ USA) σε γάλα στους 42°C για 24 ώρες.

Όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα 7, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα πληθυσμού του στελέχους ξεκινάνε από 10^6 (cfu/ml) και φτάνουν 10^8 (cfu/ml). Τα επίπεδα της βακτηριοσίνης αρχίζουν από 640 (AU/ml) καταλήγοντας στα 80 (AU/ml). Η μέγιστη παραγωγή της βακτηριοσίνης (2560 AU/ml) συναντάται στις 2 ώρες, όπου το pH είναι στο 5,3 και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα $2,60 \times 10^8$ (cfu/ml). Μετά τις 3 ώρες τόσο το στέλεχος όσο και η παραγόμενη βακτηριοσίνη αρχίζουν να μειώνονται, καθώς το pH ελαττώνεται και φτάνει από το 6,51 στο 3,65 στις 24 ώρες. Συμπεραίνουμε ότι η μέγιστη ενεργότητα βακτηριοσίνης εμφανίζεται κατά το τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης του οξυγαλακτικού βακτηρίου, ενώ η απώλεια της στη στατική φάση. Στη στατική φάση συμβαίνει εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, οπότε ο μικροοργανισμός χάνει την ικανότητα παραγωγής βακτηριοσίνης. Επίσης, η απώλεια της ενεργότητας της θερμοφιλίνης πιθανών να οφείλεται στην προσρόφησή της σε συστατικά του γάλακτος.

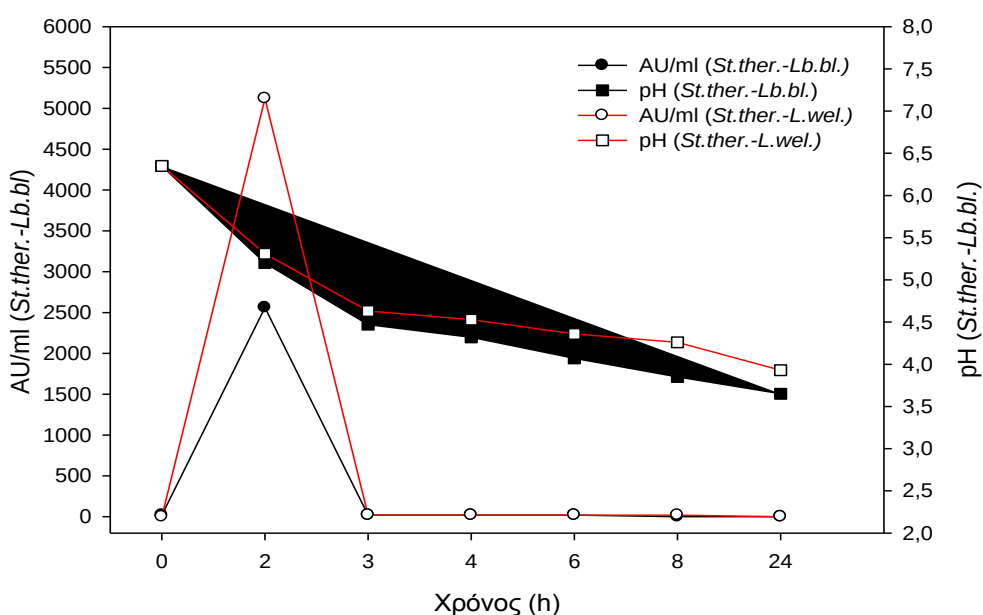


Γράφημα 7. Ανάπτυξη του βακτηριοσινογόνου στελέχους *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 και παραγωγή της βακτηριοσίνης στη διάρκεια επώασης 24 ωρών στους 42°C.

4.3. Μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης και παραγωγής βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 σε συγκαλιέργεια με το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084 και *L. welshimeri* 15008 στους 42°C

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης και ενεργότητά της βακτηριοσίνης thermophilin T κατά τη διάρκεια συγκαλιέργειας με τα στελέχη *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084 και *Listeria welshimeri* 15008 έγινε σε συνθήκες παραγωγής γιαούρτης σε γάλα σε κλειστό ζυμωτικό σύστημα στο ζυμωτήρα BIOFLO στους 42°C για 24 ώρες.

Όταν καλλιεργείται το βακτηριοσινογόνο στέλεχος με το *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 084, η μέγιστη παραγωγή της βακτηριοσίνης είναι 2560 (AU/ml) στις 2 ώρες και σε pH 5,2. Εκτός από το σημείο στο οποίο η βακτηριοσίνη είναι μέγιστη, τα επίπεδά της είναι σταθερά στα 20 (AU/ml), ενώ από την 8^η ώρα με pH 3,65 και ύστερα, η δραστηριότητα της χάνεται (Γράφημα 8).



Γράφημα 8. Παραγωγή της βακτηριοσίνης και επίδραση του pH στην παραγωγή της κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας 24h στους 42°C α). των δύο οξυγαλακτικών εναρκτηρίων καλλιεργειών και β). του βακτηριοσινογόνου στελέχους με το στέλεχος της λιστέριας.

Όταν καλλιεργείται το βακτηριοσινογόνο στέλεχος με τη λιστέρια, η μέγιστη παραγωγή της βακτηριοσίνης είναι 5120 (AU/ml) στις 2 ώρες σε pH 5,3. Από την επόμενη ώρα μειώνεται στα 20 (AU/ml) με την ίδια ποσότητα μέχρι τις 24 ώρες, όπου τότε μηδενίζεται, όταν το pH είναι πλέον 3,93 (Γράφημα 9).

Βλέπουμε ότι και στις δύο περιπτώσεις η μέγιστη βακτηριοσίνη εμφανίζεται στις 2 ώρες σε pH 5.2-5.3, το οποίο παρατηρήθηκε και κατά την καλλιέργεια του βακτηριοσινογόνου στελέχους μόνο του. Μετά από τη μέγιστη τιμή της η ενεργότητα μειώνεται στα 20 (AU/ml) και τελικά μηδενίζεται. Δηλαδή, με την περαιτέρω μείωση του pH έχουμε μείωση της βακτηριοσίνης. Όμως, κατά την συγκαλλιέργεια με τη λιστέρια, ο ρυθμός πτώσης του pH είναι πιο αργός, για αυτό και το μέγιστο της βακτηριοσίνης είναι το διπλάσιο από το μέγιστο κατά την συγκαλλιέργεια με *L. bulgaricus* και έτσι η θερμοφιλίνη μηδενίζεται αργότερα.

Η καλλιέργεια του βακτηριοσινογόνου στελέχους μόνο του, αλλά και σε συνδυασμό με τα άλλα δύο στελέχη, έγινε για να συσχετιστεί το pH και η συγκαλλιέργεια των μικροοργανισμών στην απώλεια της ενεργότητας της βακτηριοσίνης και συμπεραίνουμε ότι η απώλειά της δεν επηρεάζεται από την υψηλή θερμοκρασία και το χαμηλό pH, αλλά από την πιθανή προσρόφησή της στα συστατικά του γάλακτος ή σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς είτε του *L. bulgaricus* είτε της λιστέριας.

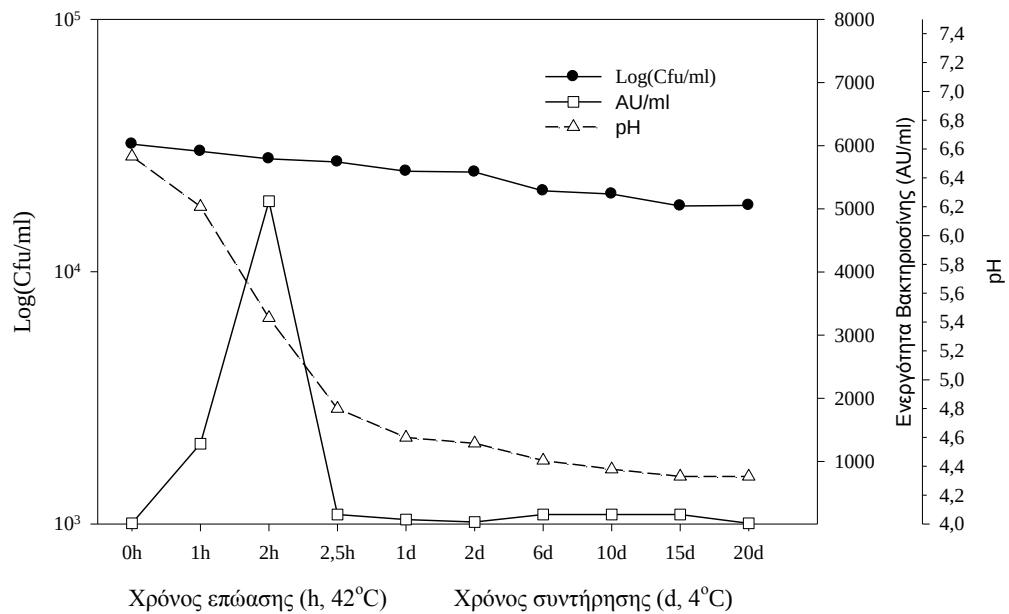
4.4 Μελέτη της επίδρασης της *in situ* thermophilin T στην ανάπτυξη της *Listeria welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης διαφορετικού βαθμού οξίνισης

Η μελέτη της βιωσιμότητας της *Listeria welshimeri* 15008 για δύο είδη συγκεντρώσεων κυττάρων λιστέριας 10^4 (cfu/ml) και 10^2 (cfu/ml) κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης για 20 ημέρες έγινε παρασκευάζοντας γιαούρτι με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος *St.thermophilus* ACA-DC 0040 και το στέλεχος μάρτυρα *St.thermophilus* ACA-DC 004 σε ζυμωτήρα BIOFLO στους 42°C σε τρία τελικά pH 4.8, 4.5 και 4.2.

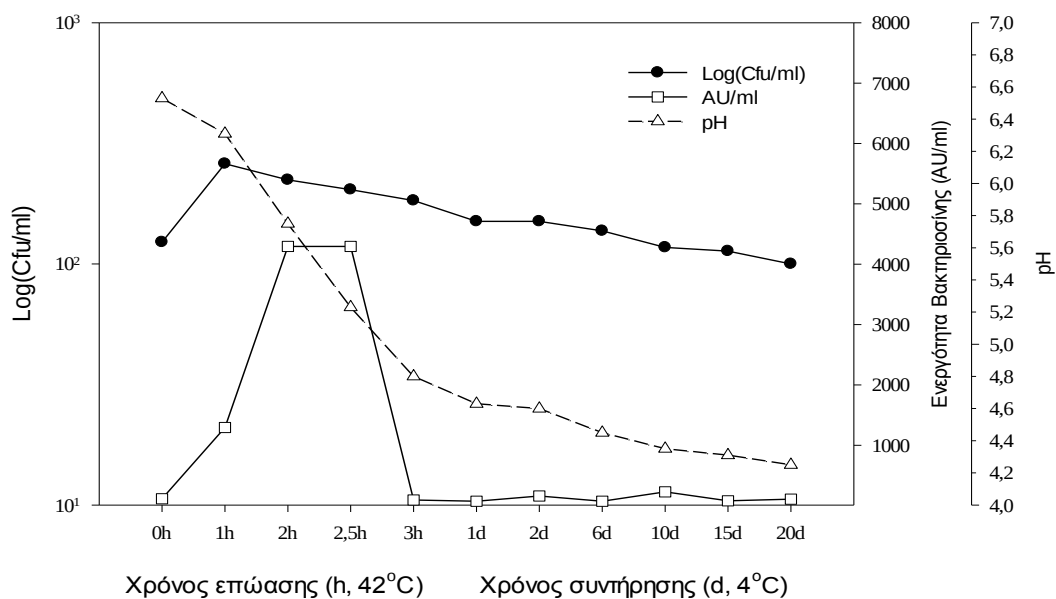
➤ Τελικό pH γιαούρτης 4,8

Αρχικά μελετήσαμε την συμπεριφορά της λιστέρια όταν το γιαούρτι παρασκευάστηκε με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος. Στην περίπτωση του υψηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^4 cfu/ml) από το γράφημα 12 βλέπουμε ότι ο πληθυσμός της λιστέριας ξεκινάει από $3,20 \times 10^4$ (cfu/ml) την ώρα της ζύμωσης, στη συντήρηση έχει $2,50 \times 10^4$ (cfu/ml) και τελικά την 20^η μέρα είναι $1,80 \times 10^4$ (cfu/ml). Η βακτηριοσίνη εμφανίζει μέγιστο παραγωγής 5120 (AU/ml) στις 2 ώρες σε pH 5,43 και έπειτα μειώνεται απότομα από 160 έως 20 (AU/ml). Το pH είναι σταδιακά μειούμενο φτάνοντας την τελευταία μέρα στο 4,3 και η οξύτητα τότε είναι στο 0,87%.

Στην περίπτωση του χαμηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^2 cfu/ml) στο γράφημα 13 βλέπουμε ότι ο πληθυσμός της λιστέριας ξεκινάει από $1,23 \times 10^2$ (cfu/ml) την ώρα της ζύμωσης, στη συντήρηση έχει $1,50 \times 10^2$ (cfu/ml) και στην 20^η μέρα είναι 10^2 (cfu/ml). Η βακτηριοσίνη έχει μέγιστο παραγωγή 4293 (AU/ml) στις 2 ώρες σε pH 5,7 και ύστερα παρουσιάζει μείωση από 160-73 (AU/ml). Το pH είναι σταδιακά μειούμενο φτάνοντας την τελευταία μέρα στο 4,25 με την οξύτητα να είναι τότε στο 0,98%.



Γράφημα 9. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 (cfu/ml) και δραστικότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺.

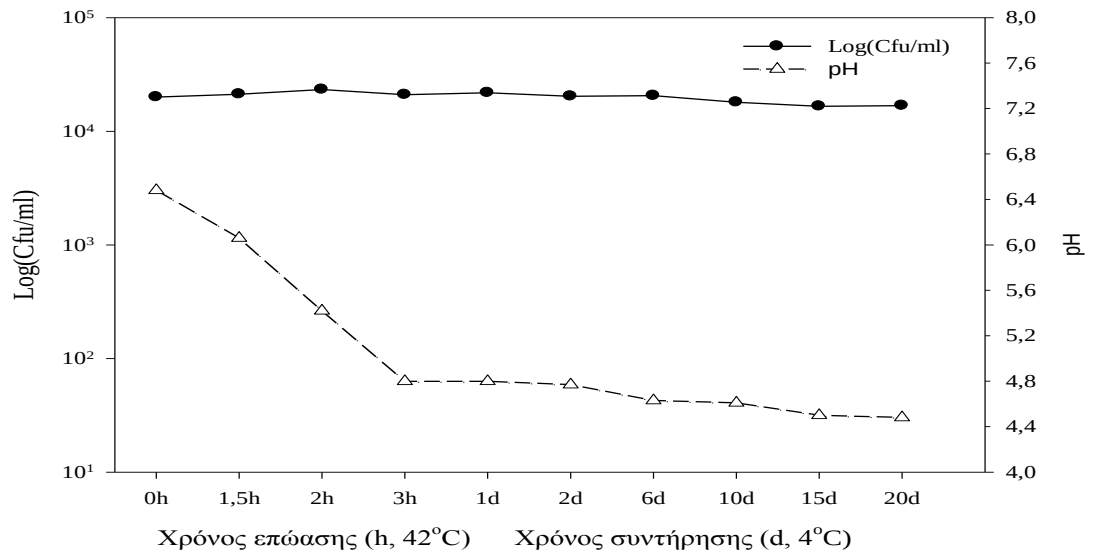


Γράφημα 10. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^2 (cfu/ml) και δραστικότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺.

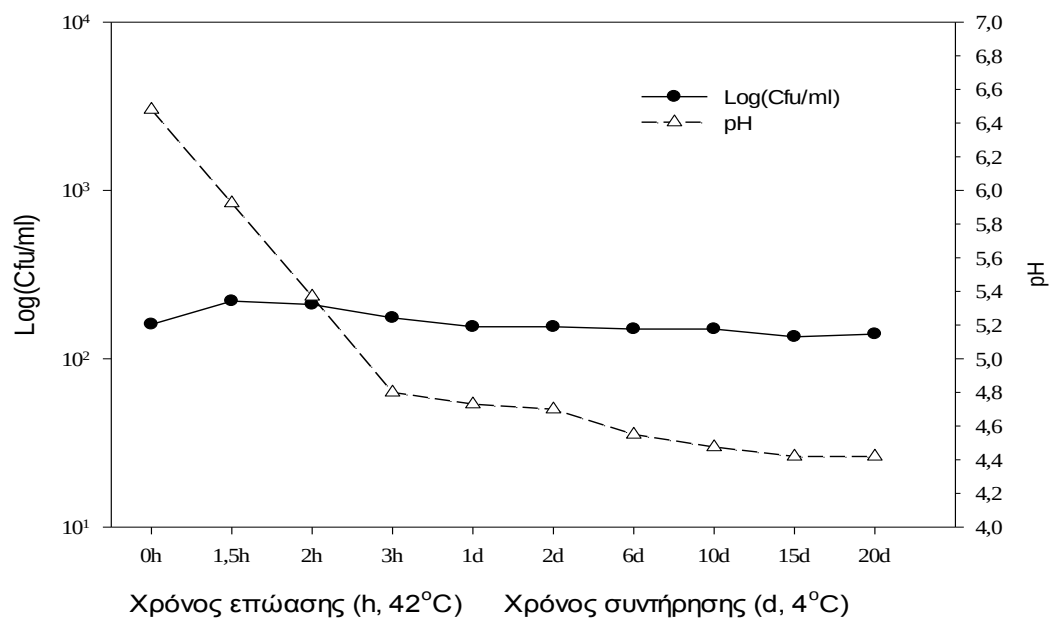
Συμπεραίνουμε πως είτε στην περίπτωση που το ενοφθάλμισμα με λιστέρια είναι υψηλό είτε χαμηλό, η πορεία ανάπτυξης της λιστέριας είναι πτωτική. Όμως, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος η λιστέρια επιβιώνει, καθώς την τελευταία μέρα της συντήρησης τα επίπεδα του μικροοργανισμού παρέμεναν ίδια, δηλαδή 10^4 (cfu/ml) για το υψηλό ενοφθάλμισμα και 10^2 (cfu/ml) για το χαμηλό. Ακόμη, παρατηρούμε ότι η βακτηριοσίνη στην αρχή της έναρξης της ζύμωσης του γάλακτος για την παραγωγή γιαούρτης είναι σε χαμηλά επίπεδα, μετά όμως γίνεται μέγιστη γύρω στις 2 ώρες (για το υψηλό και χαμηλό ενοφθάλμισμα) και έπειτα από την πήξη του γάλακτος όπου το παραχθέν γιαούρτι μεταφέρεται στη συντήρηση και για τις υπόλοιπες ημέρες, η βακτηριοσίνη μειώνεται δραματικά. Τότε που η βακτηριοσίνη αρχίζει και αυξάνεται, η λιστέρια μειώνεται και συνεχίζει να μειώνεται ακόμα και όταν η βακτηριοσίνη δεν είναι υψηλή, με τη σημαντικότερη μείωση να φαίνεται στο χαμηλότερο ενοφθάλμισμα. Τελικά, παρόλο που δεν υπάρχει αύξηση του ενοφθαλμίσματος, δεν υπάρχει σημαντική μείωση στον πληθυσμό της λιστέριας. Άρα, η λιστέρια επιβιώνει και η thermophilin T έχει περισσότερο βακτηριοστατική δράση.

Όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με το στέλεχος μάρτυρα, στην περίπτωση του υψηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^4 cfu/ml) από το γράφημα 11 βλέπουμε ότι ο πληθυσμός της λιστέριας ξεκινάει από $2,00 \times 10^4$ (cfu/ml) την ώρα της ζύμωσης, στη συντήρηση έχει $2,18 \times 10^4$ (cfu/ml) και τελικά την 20^η μέρα είναι $1,68 \times 10^4$ (cfu/ml). Το pH είναι σταδιακά μειούμενο φτάνοντας την τελευταία μέρα στο 4,48 και η οξύτητα τότε είναι

στο 0,80%. Στην περίπτωση του χαμηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^2 cfu/ml) στο γράφημα 12 ο πληθυσμός της λιστέριας ξεκινάει από $1,60 \times 10^2$ (cfu/ml) την ώρα της ζύμωσης, στη συντήρηση έχει $1,55 \times 10^2$ (cfu/ml) και τελικά την 20^η μέρα είναι $1,40 \times 10^2$ (cfu/ml). Το pH την τελευταία μέρα έφτασε στο 4,48 και η οξύτητα στο 0,88%. Οπότε, φαίνεται καθαρά στο δείγμα του μάρτυρα ότι ο πληθυσμός της λιστέριας δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μείωση και στα δύο επίπεδα ενοφθαλμίσματος.



Γράφημα 11. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 (cfu/ml) σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁻.

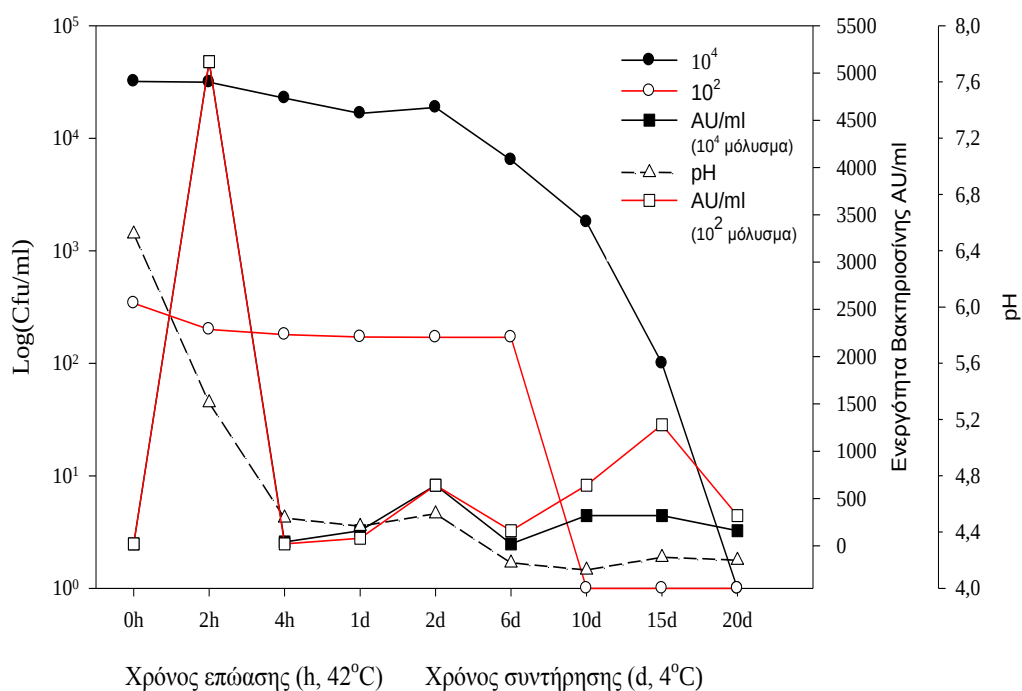


Γράφημα 12. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^2 (cfu/ml) σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁻.

Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις παρασκευής γιαούρτης με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος και τον μάρτυρα παρατηρούμε ότι η λιστέρια επιβιώνει και μάλιστα επιβιώνει λιγότερο όταν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος bac^+ .

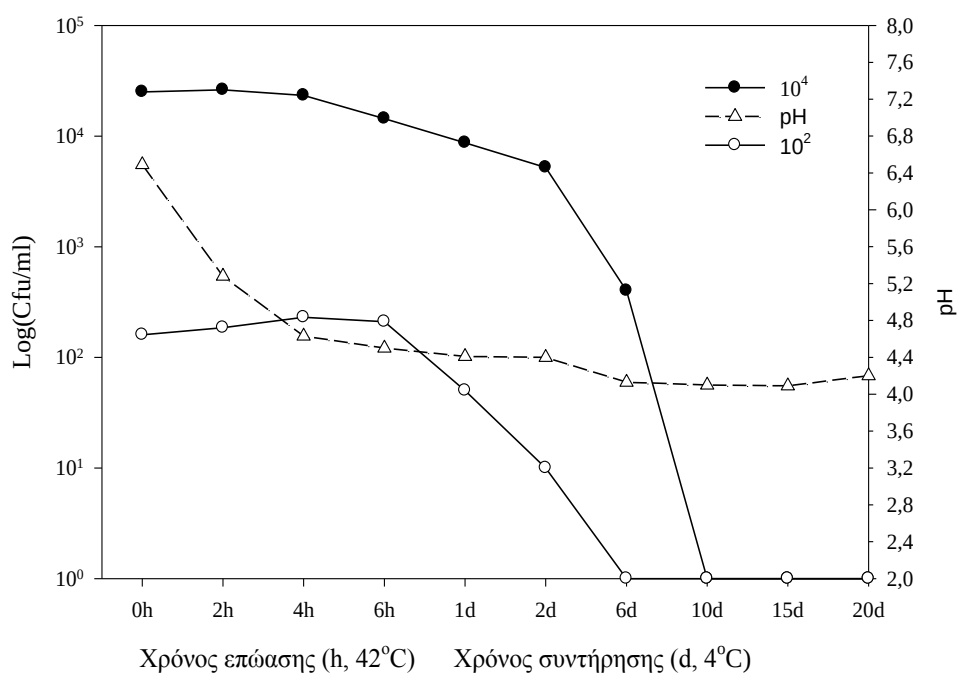
➤ Τελικό pH γιαούρτης 4,5

Αρχικά μελετήθηκε η συμπεριφορά της λιστέριας όταν το γιαούρτι παρασκευάστηκε με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος. Στην περίπτωση του υψηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^4 cfu/ml) από το γράφημα 13 βλέπουμε ότι η thermophilin T έχει βακτηριοκτόνο επίδραση καθώς ξεκινάει από $3,20 \times 10^4$ (cfu/ml) και από τη δεύτερη ώρα της ζύμωσης αρχίζει να μειώνεται ώσπου τελικά εξαλείφεται την 20^η μέρα της συντήρησης. Στην περίπτωση του χαμηλού ενοφθαλμίσματος με λιστέρια (10^2 cfu/ml) από το γράφημα 13 παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός της λιστέριας ξεκινάει από $3,42 \times 10^2$ (cfu/ml) και από τη δεύτερη ώρα της ζύμωσης επίσης αρχίζει να μειώνεται, αλλά εξαλείφεται νωρίτερα την 10^η μέρα της συντήρησης. Η βακτηριοσίνη και στις δύο περιπτώσεις στην αρχή της έναρξης της ζύμωσης του γάλακτος για την παραγωγή γιαούρτης είναι σε χαμηλά επίπεδα. Μετά όμως στις 2 ώρες σε pH 5.32 γίνεται μέγιστη (5120 AU/ml) και έπειτα από την πήξη του γάλακτος όπου το παραχθέν γιαούρτι μεταφέρεται στη συντήρηση και για τις υπόλοιπες ημέρες, η ενεργότητα της βακτηριοσίνης κυμαίνεται από 20 έως 1280 (AU/ml). Η οξύτητα και στις δύο περιπτώσεις από τη στιγμή που μπαίνει το γιαούρτι στη συντήρηση είναι σε υψηλά επίπεδα στο 0,88% και την 20^η μέρα έχει ήδη φτάσει το 0,96%. Οπότε, η λιστέρια και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζει πτωτική τάση από τη δεύτερη ώρα η οποία συμπίπτει με το μέγιστο της βακτηριοσίνης, η οποία εκτός από το μέγιστο που παρουσιάζει κινείται σε χαμηλά επίπεδα.



Γράφημα 13. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) και δραστικότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.5 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺.

Όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με το στέλεχος μάρτυρα, όπως φαίνεται στο γράφημα 14, στην περίπτωση υψηλού ενοφθαλμίσματος (10^4 cfu/ml) η λιστέρια μειώνεται από την 4^η ώρα της ζύμωσης και εξαλείφεται τη 10^η μέρα της συντήρησης, ενώ στην περίπτωση χαμηλού ενοφθαλμίσματος (10^2 cfu/ml) μειώνεται από την 6^η ώρα της ζύμωσης και εξαλείφεται την 6^η μέρα της συντήρησης. Η οξύτητα κινείται σε πολύ υψηλά επίπεδα φτάνοντας στη συντήρηση στο 0,93% και την τελευταία μέρα της συντήρησης στο 0,98% και για αυτό η μείωση της λιστέριας είναι δραστική.

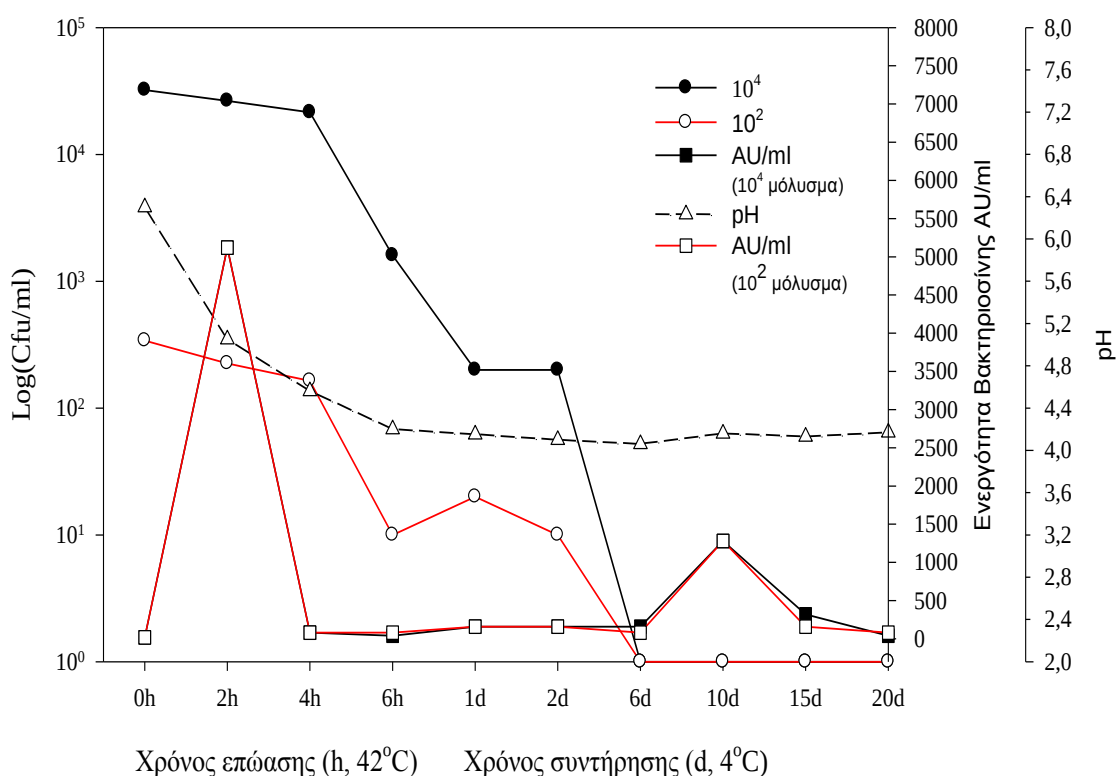


Γράφημα 14. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) σε γιαούρτι τελικού pH 4.5 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁻.

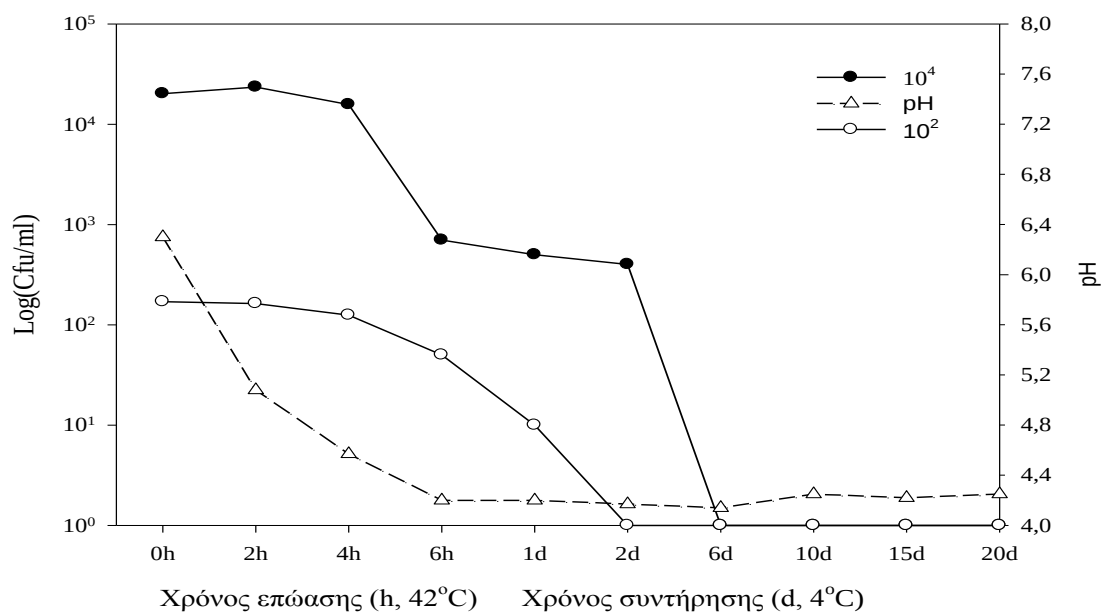
Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις παρασκευής γιαούρτης με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος και τον μάρτυρα παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη της λιστέριας παρεμποδίζεται και τελικά εξαλείφεται κατά τη συντήρηση.

➤ Τελικό pH γιαούρτης 4,2

Ξεκινώντας από την παρατήρηση της συμπεριφοράς της λιστέριας όταν το γιαούρτι παρασκευάστηκε με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος, στην περίπτωση του υψηλού (10^4 cfu/ml) και χαμηλού (10^2 cfu/ml) ενοφθαλμίσματος με λιστέρια από το γράφημα 15 βλέπουμε ότι η thermophilin T ασκεί βακτηριοκτόνο επίδραση στη λιστέρια επειδή μειώνεται από τη δεύτερη ώρα της ζύμωσης και εξαλείφεται την 6^η μέρα, όταν η οξύτητα έχει φτάσει το 1,14% και το pH στο 4,17. Η βακτηριοσίνη πέρα από το μέγιστο σημείο της στις 2h στα 5120 (AU/ml) μειώνεται από 160 έως 40 (AU/ml). Από το γράφημα 16 όπου το γιαούρτι παρασκευάστηκε με το μη βακτηριοσινογόνο στέλεχος παρατηρείται ότι η λιστέρια εξαλείφεται στο υψηλό ενοφθάλμισμα από την 6^η μέρα της συντήρησης και στο χαμηλό από την 2^η μέρα, το οποίο φαίνεται να οφείλεται στην εξαιρετικά υψηλή οξύτητα και το χαμηλό pH, τα οποία την 20^η μέρα της συντήρησης φτάνουν στο 1% και στο 4.25 αντίστοιχα.



Γράφημα 15. Επιβίωση εναερίστου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) και δραστηριότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.2 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺.



Γράφημα 16. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) σε γιαούρτι τελικού pH 4.2 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁻.

Συγκρίνοντας τις δύο περιπτώσεις παρασκευής γιαούρτης με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος και τον μάρτυρα παρατηρούμε ότι η λιστέρια παρεμποδίστηκε και τελικά εξαλείφθηκε κατά τη συντήρηση.

Λαμβάνοντας υπόψη και τα τρία πειράματα στα διαφορετικά pH, συμπεραίνουμε ότι η ανάπτυξη της λιστέριας εξαρτάται από δύο βασικούς παρεμποδιστικούς παράγοντες την οξύτητα και τη βακτηριοσίνη. Η διαφορά είναι ότι στο τελικό pH παρασκευής της γιαούρτης η λιστέρια επιβίωνε, ενώ στα 4.5 και 4.2 η thermophilin T επιδρά αρνητικά στη βιωσιμότητα της λιστέριας με τη βακτηριοκτόνο της δράση να εμφανίζεται κατά τη συντήρηση και να είναι μεγαλύτερη στο χαμηλότερο τελικό pH. Παρόλα αυτά κοινό σημείο όλων αυτών των πειραμάτων είναι η απώλεια της ενεργότητας της θερμοφιλίνης μετά την απόκτηση του μέγιστου τίτλου λόγω της αποδόμησής της ή προσρόφησής της σε άλλα μόρια. Επιπλέον, τα πειράματα με το στέλεχος μάρτυρα σε τελικό pH 4.5 και 4.2 δείχνουν ότι η συνεισφορά της βακτηριοσίνης στην παρεμπόδιση της λιστέριας δεν είναι ουσιαστική, γεγονός που δικαιολογείται από τα αποτελέσματα του πειράματος προσδιορισμού της ελάχιστης παρεμποδιστικής ενεργότητας της θερμοφιλίνης έναντι της λιστέριας (2048 AU/ml), τιμή που δεν επετεύχθη σε όλη τη διάρκεια συντήρησης της γιαούρτης.

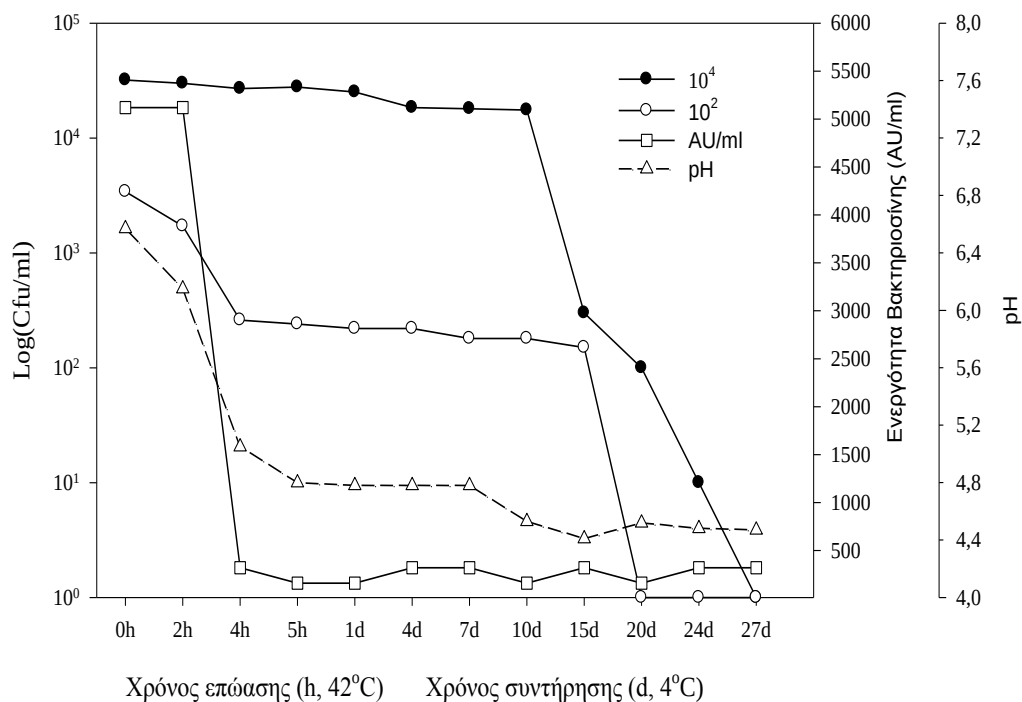
4.5 Προσθήκη βακτηριοσίνης *thermophilin T* στο γάλα παρασκευής γιαούρτης και μελέτη της επίδρασής της στην ανάπτυξη της *L. welshimeri* 15008 κατά την παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης

Για τη μελέτη της επίδρασης της έξωθεν προστιθέμενης βακτηριοσίνης στην βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 δύο ειδών συγκεντρώσεων κυττάρων λιστέριας 10^4 (cfu/ml) και 10^2 (cfu/ml) κατά την παρασκευή και συντήρηση γιαούρτης τελικού pH 4.8 έγινε αρχικώς παραγωγή βακτηριοσίνης *ex situ* ενεργότητας 5120 (AU/ml) και αυτή στη συνέχεια προστέθηκε στο γάλα για την παρασκευή γιαούρτης στους 42°C με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος *St.thermophilus* ACA-DC 0040 και αντίστοιχα με το στέλεχος μάρτυρα *St.thermophilus* ACA-DC 004.

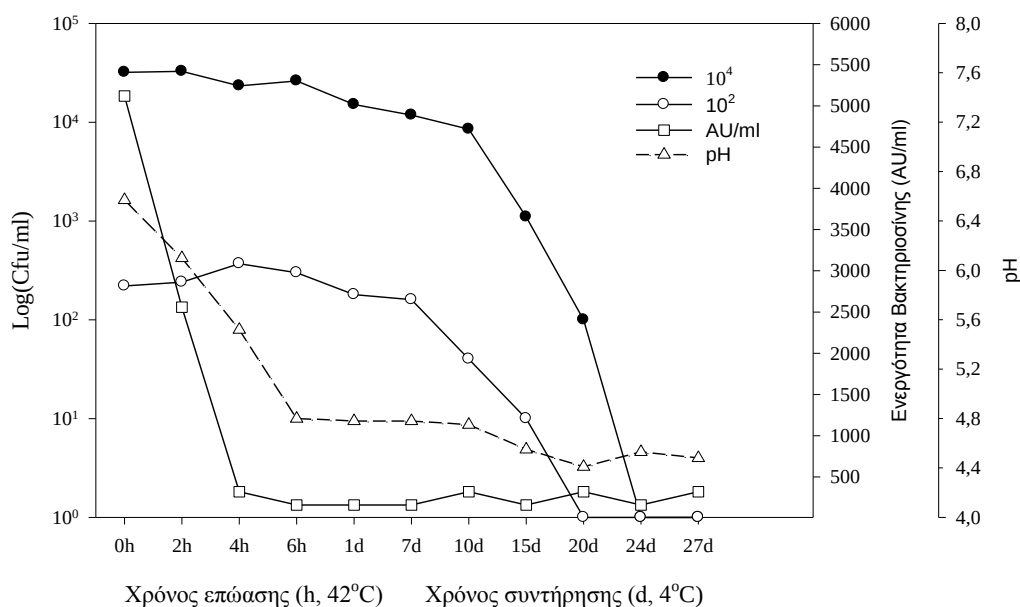
Όταν το γιαούρτι παρασκευάστηκε με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος *St.thermophilus* ACA-DC 0040 φαίνεται πως και στις δύο περιπτώσεις υψηλού (10^4 cfu/ml) και χαμηλού (10^2 cfu/ml) ενοφθαλμίσματος η λιστέρια μειώνεται από την έναρξη της ζύμωσης για την παραγωγή του γιαουρτιού και τελικά εξαλείφεται την 27^η μέρα στην περίπτωση του υψηλού και την 20^η μέρα στο χαμηλό. Η ενεργότητα της βακτηριοσίνης ξεκινάει από τα 5120 (AU/ml) και για την υπόλοιπη διαδικασία μειώνεται μεταξύ 120-360 (AU/ml). Το pH μειώνεται αλλά όχι με γρήγορο ρυθμό και από το 6.57 καταλήγει στο 4.48, ενώ η οξύτητα από το 0,20% φτάνει στο 0,89%. Επομένως, η δράση της θερμοφιλίνης σε αυτό το πείραμα χαρακτηρίζεται βακτηριοκτόνος (Γράφημα 17).

Όταν δεν χρησιμοποιείται το βακτηριοσινογόνο στέλεχος, αλλά υπάρχει η προστιθέμενη παραγόμενη βακτηριοσίνη, η λιστέρια εξαλείφεται την 24^η μέρα στο υψηλό ενοφθαλμισμό και την 20^η μέρα στο χαμηλό (Γράφημα 18). Η βακτηριοσίνη και εδώ ξεκινάει από τα 5120 (AU/ml) και έπειτα μειώνεται μεταξύ 120-360 (AU/ml). Το pH μειώνεται με αργό ρυθμό καταλήγοντας στο 4.48 και η οξύτητα φτάνει στο 0,88%.

Οπότε, η προσθήκη έξωθεν παραγόμενης βακτηριοσίνης στο γάλα της παρασκευής γιαούρτης έχει θετικά αποτελέσματα ως προς την καταπολέμηση της λιστέριας, δεδομένου ότι και στο πείραμα με το στέλεχος μάρτυρα η δράση της θερμοφιλίνης είναι βακτηριοκτόνος και δεδομένου επιπλέον ότι στο αντίστοιχο πείραμα τελικού pH γιαούρτης 4.8 χωρίς προσθήκη έξωθεν της βακτηριοσίνης η λιστέρια επιβίωνε. Ακόμη, παρατηρούμε ότι η βακτηριοσίνη και εδώ μειώνεται και χάνει την ενεργότητά της και η επίδραση της δεν είναι μεγαλύτερης σημασίας από το pH, αφού στο πείραμα με το μάρτυρα η λιστέρια παρεμποδίστηκε κατά τη συντήρηση σχεδόν το ίδιο γρήγορα με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος.



Γράφημα 17. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) και δραστηριότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac⁺* και *ex situ* παραγόμενη βακτηριοσίνη.



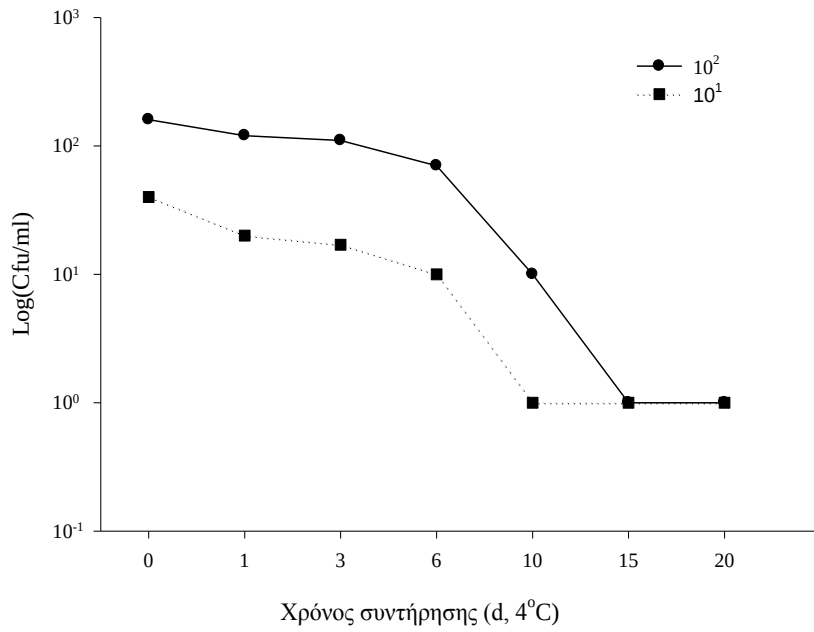
Γράφημα 18. Επιβίωση ευαίσθητου στελέχους *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^4 και 10^2 (cfu/ml) και δραστηριότητα βακτηριοσίνης σε γιαούρτι τελικού pH 4.8 κατά την παρασκευή και συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac⁻* και *ex situ* παραγόμενη βακτηριοσίνη.

4.6 Μελέτη της επίδρασης της προστιθέμενης βακτηριοσίνης thermophilin T στην βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 στο γιαούρτι κατά την επιμόλυνσή του σε συνθήκες συντήρησης

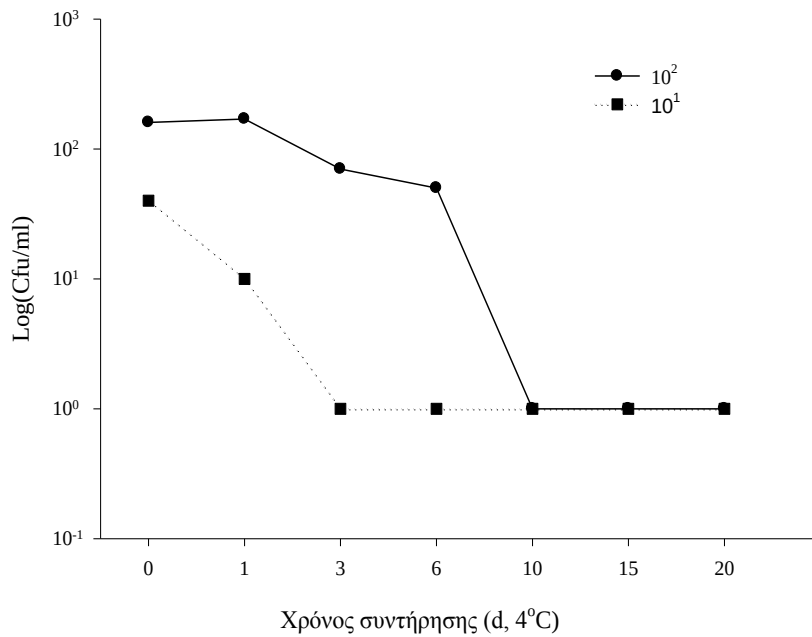
Η επίδραση της έξωθεν προστιθέμενης βακτηριοσίνης στη βιωσιμότητα της *L. welshimeri* 15008 σε συγκεντρώσεις ενοφθαλμίσματος 10^2 (cfu/ml) και 10^1 (cfu/ml), κατά την συντήρηση γιαούρτης μελετήθηκε παρασκευάζοντας βακτηριοσίνη *ex situ* υψηλής ενεργότητας (10.240 AU/ml) μέσω του μερικού καθαρισμού και συμπύκνωσης με θειϊκό αμμώνιο και προσθήκης της σε διάφορες συγκεντρώσεις σε ένα ήδη παρασκευασμένο γιαούρτι με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος λίγο πριν τον ενοφθαλμισμό του με τη λιστέρια και πριν τοποθετηθεί στη συντήρηση στους 4° C. Το τελικό pH της γιαούρτης ήταν 4.4, το οποίο επιλέχθηκε ως το pH ενός συνήθους βιομηχανικά παρασκευαζόμενου γιαουρτιού.

Οι συγκεντρώσεις της βακτηριοσίνης που επιτεύχθηκαν στο τελικό προϊόν ήταν 3413, 5120 και 6827 (AU/ml). Ως δείγμα μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ποσότητα γιαουρτιού 40 (AU/ml) που είχε παραχθεί με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος χωρίς να προστεθεί επιπλέον βακτηριοσίνη.

Αρχικώς παρατηρούμε τη συμπεριφορά της λιστέρια στο δείγμα του μάρτυρα των 40 (AU/ml). Στο 10^2 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα του γιαουρτιού με λιστέρια από το γράφημα 19 βλέπουμε ότι η λιστέρια ξεκινάει από $1,60 \times 10^2$ Cfu/ml και εξαλείφεται από τη 15^η μέρα της συντήρησης, ενώ στο 10^1 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα ξεκινάει από 4×10^1 Cfu/ml και εξαλείφεται στη 10^η. Από το γράφημα 20 βλέπουμε την επίδραση της βακτηριοσίνης στη λιστέρια σε γιαούρτι 3413 (AU/ml), όπου στο 10^2 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα η λιστέρια εξαλείφεται από τη 10^η μέρα της συντήρησης, ενώ στο 10^1 (cfu/ml) στην 3^η.

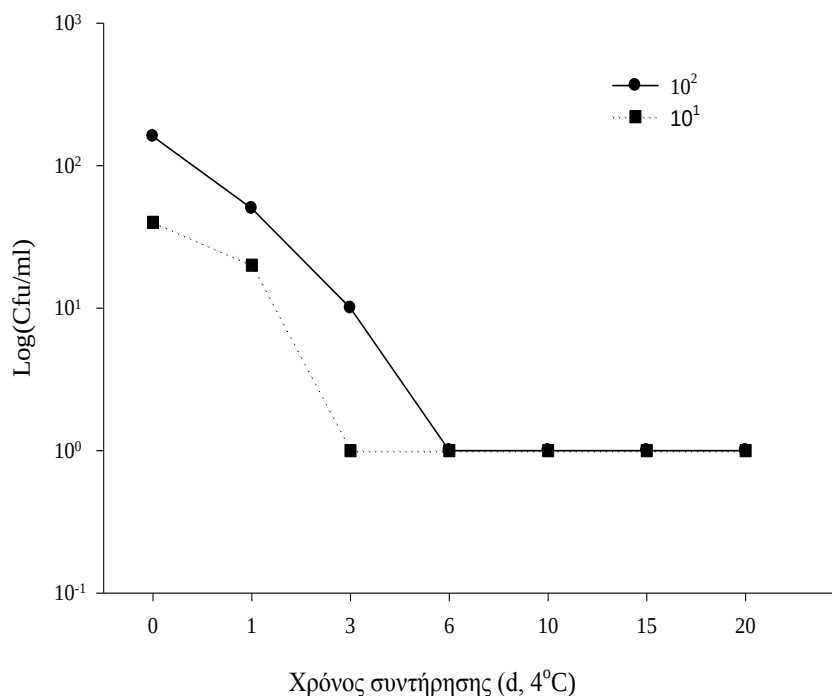


Γράφημα 19. Επιβίωση *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^2 και 10^1 (cfu/ml) σε γιαούρτι τελικού pH 4.4 (40 AU/ml) κατά την συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺.



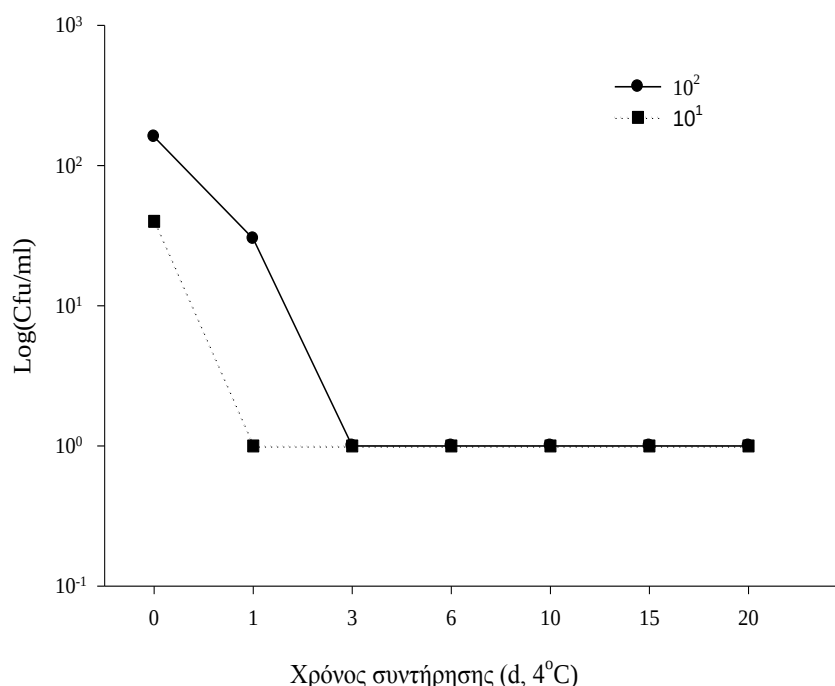
Γράφημα 20. Επιβίωση *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^2 και 10^1 (cfu/ml) σε γιαούρτι 3413 (AU/ml) και τελικού pH 4.4 κατά την συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺ και *ex situ* συμπυκνωμένης βακτηριοσίνης.

Στο γράφημα 21 παρατηρούμε τη δράση ης βακτηριοσίνης σε γιαούρτι 5120 (AU/ml) και βλέπουμε ότι στο 10^2 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα η λιστέρια εξαλείφεται από την 6^η μέρα της συντήρησης, ενώ στο 10^1 (cfu/ml) στην 3^η.



Γράφημα 21. Επιβίωση *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίματος 10^2 και 10^1 (cfu/ml) σε γιαούρτι 5120 (AU/ml) και τελικού pH 4.4 κατά την συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺ και *ex situ* συμπυκνωμένης βακτηριοσίνης.

Η βιωσιμότητα της λιστέριας σε γιαούρτι 6827 (AU/ml) φαίνεται στο γράφημα 22 και παρατηρούμε ότι στο 10^2 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα η λιστέρια εξαλείφεται από την 3^η μέρα της συντήρησης, ενώ στο 10^1 (cfu/ml) ενοφθάλμισμα από την 1^η. Σε αυτήν την περίπτωση η δράση της thermophilin T είναι πλήρως βακτηριοκτόνος.



Γράφημα 22. Επιβίωση *L.welshimeri* 15008 ενοφθαλμίσματος 10^2 και 10^1 (cfu/ml) σε γιαούρτι 6827 (AU/ml) και τελικού pH 4.4 κατά την συντήρησή του με βακτηριοσινογόνο στέλεχος *bac*⁺ και *ex situ* συμπυκνωμένης βακτηριοσίνης.

Συγκρίνοντας τα 4 αυτά γραφήματα (19-22), συμπεραίνουμε πως όσο περισσότερη βακτηριοσίνη προστίθεται στο γιαούρτι που έχει παραχθεί τόσο πιο γρήγορα εξαλείφεται το ευαίσθητο στέλεχος. Στο δείγμα μάρτυρα με το γιαούρτι των 40 (AU/ml) συναντάμε τον μεγαλύτερο πληθυσμό σε λιστέρια, ενώ στο δείγμα με τη μεγαλύτερη προσθήκη θερμοφιλίνης (6827 AU/ml) έχουμε την πιο δραστική μείωση της λιστέριας και είναι μεγαλύτερη όσο χαμηλότερο είναι το ενοφθάλμισμα. Άρα, η προστιθέμενη βακτηριοσίνη έχει θετικά αποτελέσματα ενάντια στη λιστέρια και ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση, αφού κατά τη διάρκεια των 20 ημερών της συντήρησης η λιστέρια δεν επανέκαμψε μετά το μηδενισμό της. Να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος αυτού και στα τέσσερα δείγματα, παρατηρήθηκε η απώλεια της θερμοφιλίνης αρκετά νωρίς μετά την τρίτη μέρα της συντήρησης, η οποία είχε συγκέντρωση που κυμαινόταν κατά τη συντήρηση μεταξύ 20-160 (AU/ml), ενώ για τις τρεις πρώτες ημέρες παρέμενε σταθερή από 80 έως 160 (AU/ml).

4.7 Σύγκριση αποτελεσμάτων και τελικά συμπεράσματα

Αρχικά, να αναφέρουμε ότι στα πειράματα όπου η βακτηριοσίνη παράγεται *in situ*, κατά την παρασκευή της γιαούρτης η ενεργότητα της thermophilin T λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της (5120 AU/ml) στις 2 ώρες σε pH 5,2-5,3 και έπειτα διατηρείται σε χαμηλά σταθερά επίπεδα. Η μέγιστη παραγωγή της θερμοφιλίνης συμπίπτει με την λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηριοσινογόνου στελέχους είτε όταν καλλιεργείται μόνο του είτε με *L. bulgaricus* ή *L. welshimeri* 15008 ή και τα τρία στελέχη μαζί.

Όσον αφορά την δραστικότητα της βακτηριοσίνης thermophilin T σε υπόστρωμα TSBY, αυτή είναι μεγαλύτερη όσο περισσότερη προστίθεται στο προϊόν και όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του ευαίσθητου στελέχους, δηλαδή της λιστέριας, όπου στα 2048 (AU/ml) συναντάται η πλήρης βακτηριοκτόνος δράση της.

Όσον αφορά την δραστικότητα της thermophilin T σε υπόστρωμα γιαουρτιού, γενικά βλέπουμε σε όλα τα πειράματα ότι:

- α). στο χαμηλότερο μόλυσμα η βιωσιμότητα της λιστέρια είναι μικρότερη.
- β). η προσθήκη επιπλέον βακτηριοσίνης παραγόμενης εξωγενώς ενισχύει την βακτηριοκτόνο δράση της στο γιαούρτι ενάντια στην λιστέρια.
- γ). η βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική δράση της thermophilin T εμφανίζεται κατά την συντήρηση της γιαούρτης.
- δ). η ενεργότητα της βακτηριοσίνης μετά τη μέγιστη τιμή της (5120 AU/ml) μειώνεται δραστικά σε χαμηλά επίπεδα που κυμαίνονται περίπου από 20 έως 160 (AU/ml).
- ε). για το ευαίσθητο στέλεχος *Listeria welshimeri* 15008 υπάρχει κάποιος ανθεκτικός υποπληθυσμός στη thermophilin T και σε αυτόν οφείλεται η αντίσταση στη βακτηριοσίνη, μέχρι να μειωθεί ή και να μηδενιστεί.
- στ). η θερμοφιλίνη αυτή δρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης της λιστέριας γεγονός που συμφωνεί και με τους Mathieu et al, 1994 σε άλλες βακτηριοσίνες.

Στο πείραμα παρασκευής γιαούρτης τελικού pH 4.8 όπου παρατηρείται η επιβίωση της λιστέριας και στα δύο επίπεδα ενοφθαλμίσματος, αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ανθεκτικότητα της λιστέριας στο ήπια χαμηλό pH. Βέβαια δεν μπορεί να καθοριστεί αν παρατηρείται ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR) που παρουσιάζει η *L. monocytogenes* μετά από σύντομη έκθεση σε ήπια όξινες συνθήκες, όπως περιγράφεται σε διάφορα πειράματα των Bonnet et al, 2004 και Koutsoumanis et al, 2003, διότι τα πειράματα γιαούρτης pH 4.5 και 4.2 που ήταν θανατηφόρα για τη *L. welshimeri*, έγιναν σε διαφορετικά κύτταρα από αυτά στο 4.8.

Όπως ειπώθηκε παραπάνω, παρουσιάζεται επίσης αντίσταση στη βακτηριοσίνη. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από την ανικανότητα της θερμοφιλίνης να σχηματίσει πόρους σε μια μάλλον πιο άκαμπτη μεμβράνη της λιστέριας, κάτι που έχει παρατηρηθεί και για τη νισίνη σε άλλα πειράματα (Vignolo et al, 2000) ή ακόμη δικαιολογείται και από την μετάλλαξη πληθυσμού της λιστέριας, ώστε να προκύψει ένας ανθεκτικός υποπληθυσμός, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει από σχετικές μελέτες των Harris et al, 1989, Leroy F. et al, 2005, Mantovani et al, 2003 και Mathieu et al, 1994. Μάλιστα, για το είδος *L. monocytogenes* θεωρείται ότι η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται στην αλλαγή της δομής του κυτταρικού τοιχώματος και της σύνθεσης των λιπαρών οξέων της μεμβράνης και σε απαιτήσεις σε δισθενή κατιόντα. Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνονται τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στην κυτταρική μεμβράνη, οπότε αυξάνεται έτσι η ακαμψία της και άρα η ρευστότητα της μεμβράνης μειώνεται με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η διείσδυση των βακτηριοσινών (Naghmouchi et al, 2007).

Όταν η βακτηριοσίνη παράγεται *in situ* η δράση της δεν είναι ισχυρή σε τελικό pH γιαούρτης 4.8, ενώ σε pH κάτω από 4.5 έχει συνεργιστική δράση με το pH. Όμως, η δράση της βακτηριοσίνης αυξάνεται στο προϊόν όταν προστίθεται επιπλέον. Γενικότερα παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση όταν η αρχική συγκέντρωση είτε στο τρόφιμο είτε στο broth όταν προστίθεται εξωγενώς είναι τουλάχιστον 2048 AU/ml.

Το ότι η βακτηριοσίνη κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα πειράματα πέρα του μέγιστου που θα παρουσίαζε, μπορεί να συμβαίνει για διάφορους λόγους. Αρχικά, εξηγείται με την προσρόφηση της thermophilin T στο κυτταρικό τοίχωμα των οξυγαλακτικών και της *L. welshimeri* 15008, καθώς υπάρχουν υποδοχείς πρωτεϊνικής φύσεως για τη βακτηριοσίνη στα κύτταρα αυτά, οπότε δεν ανιχνεύεται πλέον, διότι μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, μπορεί να προσροφάται σε συστατικά του γάλακτος κυρίως πρωτεϊνικά όπως η καζεΐνη του γάλακτος ή σε ένζυμα (πρωτεάσες), οπότε υποβαθμίζεται πρωτεολυτικά. Η απώλεια της ενεργότητας της θερμοφιλίνης είναι λοιπόν ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο (Aesen et al 2003, Gänzle et al, 1999, Harris et al, 1989, Leroy et al, 1999).

Ακόμη, παρατηρούμε ότι στο πείραμα όπου η προσθήκη της βακτηριοσίνης και ο ενοφθαλμισμός με λιστέρια γίνεται λίγο πριν τη συντήρηση, τα αποτελέσματα του δείγματος με 6827 (AU/ml) και pH 4.4 είναι ιδιαίτερα θετικά ως προς την παρεμπόδιση της λιστέριας. Επομένως, είτε θα πρέπει το τελικό pH του γιαουρτιού να είναι τουλάχιστον το 4.2 όπου τότε η θερμοφιλίνη δρα σε συνδυασμό με το χαμηλό pH, είτε να είναι λίγο πιο πάνω το pH αλλά να προστίθεται *ex situ* βακτηριοσίνη τουλάχιστον 2048 (AU/ml). Επιπρόσθετα, καλό θα ήταν να προστίθεται πριν τη συντήρηση, πριν δηλαδή την εισαγωγή στο ψυγείο το οποίο είναι κρίσιμο σημείο ελέγχου, καθώς όταν προστίθεται από την αρχή πριν την έναρξη της ζύμωσης

στην πρώτη ύλη το γάλα, το οποίο είναι ένα ακόμη κρίσιμο σημείο ελέγχου, η βακτηριοκτόνος δράση της thermophilin T είναι λιγότερο έντονη. Άλλωστε, ακόμη και στα πειράματα μόνο με την παραγόμενη *in situ* θερμοφιλίνη, η βιωσιμότητα της λιστέριας παρεμποδιζότανε πλήρως περισσότερο κατά τη συντήρηση.

Τέλος, να αναφέρουμε ότι η βακτηριοκτόνος επίδραση της thermophilin T ήταν ηπιότερη στα αναπτυσσόμενα κύτταρα της λιστέριας κατά τη παρασκευή και συντήρηση της γιαούρτης από ότι στο TSBY, πιθανώς διότι τα συστατικά του γάλακτος προστατεύουν τον ευαίσθητο πληθυσμό του δείκτη. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και από Mathieu et al, 1994.

Έπειτα από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως το pH παίζει τον κυρίαρχο ρόλο για την παρεμπόδιση των κυττάρων στόχων και σε όσο πιο χαμηλό pH γίνεται η πήξη του γιαουρτιού τόσο πιο γρήγορα εξαλείφεται το ευαίσθητο στέλεχος. Παρόλα αυτά, ο ρόλος της βακτηριοσίνης παίζει σημαντικό ρόλο και συγκεκριμένα δρα συνεργιστικά με το pH ως προς την καταπολέμηση του ενοφθαλμίσματος και αυτό φαίνεται να αποτελεί μέρος της τεχνολογίας εμποδίων (*hurdle technology*). Καλό θα ήταν να προστίθεται εξωγενώς πριν τη συντήρηση σε συμπυκνωμένη μορφή τουλάχιστον 2048 (AU/ml) που είναι η τιμή της MIC. Ως μελλοντική χρήση της thermophilin T σαν φυσικό βιοσυντηρητικό θα μπορούσε να προταθεί ο συνδυασμός της στο τρόφιμο και με άλλες βακτηριοσίνες διαφορετικής τάξης, διότι κύτταρα της λιστέριας που είναι ανθεκτικά σε αυτή θα σκοτώνονται από άλλη διαφορετικής δομής βακτηριοσίνη. Συνεργιστικός συνδυασμός δύο βακτηριοσινών έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες για τις πεδιοσίνη AcH/νισίνη (Hanlin et al., 1993), λακτασίνη B και λακτασίνη F με νισίνη ή πεδιοσίνη AcH, λακτασίνη 481/πεδιοσίνη AcH (Mulet-Powell et al., 1998) και πεδιοσίνη PA-1/πολυμιξίνη E ή πολυμιξίνη E/νισίνη A (Naghmouchi et al, 2011).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aesen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology* 87, 35–43.
2. Aktypis A, Kalantzopoulos G, Huis in't Veld JHJ, Brink B (1998) Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Strep. thermophilus* ACA-DC 0040. *J Appl Microbiol* 84:568–576.
3. Aktypis A., Tychowski M., Kalantzopoulos G., Aggelis G. (2007). Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:207–220.
4. Birollo G.A., Reinheimer J.A. and Vinderla C.G. (2001). Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yogurt. *Food Microbiology*.
5. Bonnet M. and Montville T.J. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 237–242.
6. Bridson E.Y. (1990). *The Oxoid Manual*. Unipath Ltd, England. 6th Edition.
7. Buchrieser C. (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes and Infection* 9:1147-1155.
8. Burgess R. (2008). *Protein Purification*. Edited by H.G. Nothwang and S.E. Pfeiffer.
9. Chandan R.C., White C.H., Kilara A., Hui Y.H> (2006). *Manufacturing Yoghurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing, USA.
10. Conte, M.P. et al. (2000). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage cells. *Microbial Pathog.* 29,137.
11. *Dairy Processing Handbook*
12. De Vuyst L, Callewaert R, Crabbe K (1996b) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol* 142:817–827.
13. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (1997). *Food microbiology-Fundamentals and Frontiers*. USA.
14. Foster, J. W., (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the acid tolerance response, *J. Bacteriol.*, 173, 6896.
15. Foster, J. W., and Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771–778.

16. Gálvez A., Abriouel H., López R., Omar N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51–70.
17. Gahan, C. G. M., and Hill, C., (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.* 50, 93.
18. Gänzle, M., Weber, S., Hammes, W., (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 46, 207–217.
19. Griffiths M.W., (2003). *Listeria: Properties and Occurrence*. Elsevier Science Ltd, pp.3562-3573.
20. Hanlin M.B., Kalchayanand N., Ray P., Ray B., (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56, 252e255.
21. Harris L., Daeschel M., Stiles M. and Klaenhammer T. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Vol 52:384-386.
22. Hill C., O’Keeffe T., Ross P. (2002). Bacteriocins. Elsevier Science. pp.128-135.
23. International Commission on Microbiological specifications for Foods (1980). *Microbial Ecology of Foods*, Volume 1 and Volume 2. Academic Press, London.
24. ICMSF (1996). *Microorganisms in Foods, Characteristics of microbial pathogens*. Great Britain.
25. ICMSF (1998). *Microorganisms in Foods, Microbial ecology of food commodities*. Great Britain.
26. Jay J.M, Loessner M.J., Golden D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7th Edition, Springer, USA.
27. Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–86.
28. Koutsoumanis K., Kendall P. and Sofos J.(2003). Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 12, pp. 7514–7516.
29. Kroll, R.G., and Patchett, R.A., (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 224.
30. Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009). *Γαλακτοκομία*. Εκδόσεις Έμβρυο.
31. Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, 2007: Λιστερίωση, Ερωτήσεις και απαντήσεις για το κοινό.

32. Leroy, F., De Vuyst, L., (1999). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production of *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5350–5356.
33. Leroy F. and De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15: 67–78.
34. Leroy F., Lievens K. and De Vuyst L. (2005). Modelling bacteriocin resistance and inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under sausage fermentation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 11, pp.7567-7570.
35. Mantovani H., Russell J. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. *International Journal of Food Microbiology* 89:77–83.
36. Mathieu F., Michel M., Lebrihi A., Lefebvre G. (1994). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium pbcicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 22:155-172.
37. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625.
38. Moll G., Konings W. and Driessen A. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185–198.
39. Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A.M., Vinas, M., Simeon-De- Buochberg, M., 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61, 1210e1212.
40. Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C., Fliss I., (2007). Class I/class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 24, 718e727.
41. Naghmouchi K., Belguesmia Y., Baah J., Teather R., Drider D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 162, 99-107.
42. Norrung B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches *International Journal of Food Microbiology*. Volume 62, Issue 3, pp. 217-221.

43. O'Driscoll, B., Gahan, C. G., and Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1693–1698.
44. O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., (1997). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2679–2685.
45. Official Journal of the European Union. CONSLEG:1992L0046-01/05/2004.
46. Pingitore V.E., Salvucci E., Sesma F. and Nader-Macías M. E. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB).
47. Ray B., Bhumia A. (2008). *Fundamental food Microbiology*. 4th Edition, CRC Press, USA.
48. Razavilar V., Genigeorgis C. (1998). Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. *International Journal of Food Microbiology* 40:149–157.
49. Sapatnekar N.M., Patil S.N. and Aglave B.A. (2010). Extraction of Bacteriocin and Study of Its Antagonistic Assay. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Volume 6, Number 6, pp. 865–870.
50. Sneath Peter H.A., Mair Nicholas S., Sharpe Elisabeth M., Holt John G. (1986). *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, USA. Volume 2.
51. Tamime A.Y. and Robinson R.K. (1999). *Yogurt Science and Technology*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cambridge, England.
52. Todorov S.D., Vaz-Velho M., Gibbs P. (2004). Comparison Of Two Methods For Purification Of Plantaricin St31, A Bacteriocin Produced By *Lactobacillus Plantarum* St31. *Brazilian Journal of Microbiology* (2004) 35:157-160.
53. Vignolo G., Palacios J., Farias M., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G. (2000). Combined Effect of Bacteriocins on the Survival of Various *Listeria* Species in Broth and Meat System. *Current Microbiology*, Vol. 41, pp. 410–416.
54. Xie L., Van der Donk W., (2004). Post translational modifications during lantibiotics biosynthesis. *Elsevier* 8:498-507.
55. Yang R. and Ray B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11, pp.281-291.