

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΠΟΤΩΝ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη ιδιοτήτων λακτοβάκιλλων που σχετίζονται με την
παρασκευή του προζυμιού



ΑΜΥΡΣΑ Ν. ΤΡΙΑΛΙΖΑ

Επιβ. Καθηγητής: Ε. ΔΡΟΣΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΠΟΤΩΝ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη ιδιοτήτων λακτοβάκιλλων που σχετίζονται με την
παρασκευή του προζυμιού

ΑΜΥΡΣΑ Ν. ΤΡΙΛΙΖΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΔΡΟΣΙΝΟΣ

Αθήνα, 2018

Μεταπτυχιακή Διατριβή:

Μελέτη ιδιοτήτων λακτοβάκιλλων που σχετίζονται με την παρασκευή του προζυμιού.

Αμύρσα Ν. Τρίλιζα

Επιβλέπων Καθηγητής: Ελευθέριος Δροσινός

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής: Παναγιώτης Σκανδάμης
Σεραφείμ Παπανικολάου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το προζύμι αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της διαδικασίας της αρτοποιίας. Είναι ένα μείγμα αλεύρου δημητριακών και νερού, του οποίου η ενδογενής μικροχλωρίδα απαρτίζεται από οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες. Λόγω αυτής της μικροχλωρίδας και κυρίως λόγω των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η χρήση του μπορεί να βελτιώσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος, να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του αλλά και να βελτιώσει την θρεπτική αξία του - ακολουθώντας παράλληλα την απαίτηση των καταναλωτών για τρόφιμα απαλλαγμένα από συντηρητικά – ιδιαίτερα σε προϊόντα καθημερινής κατανάλωσης όπως το ψωμί.

Στην παρούσα μελέτη, σκοπό αποτέλεσε η μελέτη μεταβολικών και τεχνολογικών ιδιοτήτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων που προέρχονται από ζυμούμενα αλλαντικά, λαχανικά (κουνουπίδι), αλλά και προζύμι και σχετίζονται με την παραγωγή προζυμιών. Τέτοιες ήταν η δραστικότητα λιπασών, πρωτεασών και φυτάσης, η ικανότητα οξίνισης του ζυμαριού καθώς και η ικανότητα τους να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις με απώτερο στόχο την επιλογή στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριοι καλλιέργειες στην προετοιμασία προζυμιών για την παρασκευή παραδοσιακού ψωμιού.

Έτσι, κατά την διεξαγωγή της ερευνητικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 78 στελέχη του είδους *Lb. plantarum* τα οποία ανήκουν στην συλλογή μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αναφορικά με τις μεταβολικές ιδιότητες των στελεχών που μελετήθηκαν, τα στελέχη μετά από επώαση 24 ωρών προκάλεσαν μείωση της τιμής του pH ζυμαριών από αλεύρι σίτου στο 3.25 - 4.69 με ταυτόχρονη αύξηση της οξύτητας στο 2.18 – 6.31, η πρωτεολυτική δραστηριότητα αξιολογήθηκε με δύο μεθόδους, αρχικά με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, όπου βρέθηκαν 26 στελέχη θετικά στη δοκιμή πρωτεολυτικής δράσης και τα οποία ελέγχθηκαν και με δεύτερη μέθοδο, αυτή της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θειικό νάτριο, όπου και επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των στελεχών. Με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις αξιολογήθηκε και η λιπολυτική δραστηριότητα των στελεχών *Lb. plantarum*. Θετικά αποτελέσματα λιπολυτικής δράσης παρουσίασαν 7 από τα στελέχη. Κατά την δεύτερη μέθοδο μελετήθηκε η κινητική της λιπόλυσης των στελεχών αυτών. Όσον αφορά στην ενεργότητα φυτάσης, δεν ανιχνεύτηκε ικανότητα παραγωγής της από κανένα μελετούμενο στέλεχος.

Επιπλέον, μελέτη πραγματοποιήθηκε και για την αντιμυκητιακή ικανότητα των στελεχών. Από το σύνολο των στελεχών, 13 στελέχη του *Lb. plantarum* παρουσίασαν ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *Aspergillus* sp.. Η παρεμπόδιση αυτή σε 3 στελέχη αποδόθηκε σε πρωτεϊνικής φύσης ενώσεις. Σε ότι αφορά στα υπόλοιπα 10 στελέχη, από τις ενώσεις που βιβλιογραφικά συνεισφέρουν στην αντιμικροβιακή δράση, (π.χ. φορμικό, βενζοϊκό κτλ.) ενοπίστηκαν μόνο το γαλακτικό και σε ορισμένα στελέχη το οξικό οξύ.

Τέλος, εκτιμώντας συνολικά τα αποτελέσματα των παραπάνω ιδιοτήτων επιλέχθηκαν 24 από τα 78 στελέχη *Lb. plantarum* ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παρασκευή παραδοσιακού ψωμιού με προζύμι και διεξαγωγή οργανοληπτικού ελέγχου προς αξιολόγηση του τελικού προϊόντος.

*Λέξεις κλειδιά: προζύμι · Οξυγαλακτικά βακτήρια · *Lactobacillus* · τεχνολογικές, μεταβολικές ιδιότητες

ABSTRACT

Sourdough is an intermediate product of bread making. It consists of flour, water and a complex microbial ecosystem mainly constituted by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts.

Sourdough, due to its endogenous microbiota and mostly due to the lactic acid bacteria, is known to improve the organoleptic and technical properties of bread and also expand its shelf life, following the present trend of not using preservatives in everyday consuming products such as bread.

The aim of this study was to assess the metabolic activities of lactic acid bacteria isolated from sourdough, meat and vegetable fermentations. Such activities were acidification capacity, lipolysis and proteolysis ones, their ability to produce antifungal compounds and phytase towards the ultimate aim of selecting strains suitable to be used as starter cultures in sourdough breads.

In this study seventy-eight *Lactobacillus plantarum* strains available at the Laboratory of Food Quality Control and Hygiene of Agricultural University of Athens, previously isolated from different food matrices, were used.

Proteolytic and lipolytic activities were evaluated by two approaches. The former was assessed initially by the Agar Well Diffusion Assay and for the twenty-six strains that exhibited proteolytic activity Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was also applied. Seven strains showed lipolytic activity when tested, using the Agar Well Diffusion Assay, the kinetics of which were also studied.

Phytase activity of the strains was also assessed, but none of the strains showed positive results. Furthermore, all strains were screened for their antifungal activity against *Aspergillus* sp. using the Agar Well Diffusion Assay. Results demonstrated that 13 strains had inhibitory activity towards *Aspergillus* sp.

Finally, in accordance with the results obtained from all metabolic activities tested, 24 of the 78 bacterial strains were selected and used as starter cultures for sourdough breadmaking. Then, the final product was evaluated by conducting an organoleptic test.

*Keywords: Sourdough · Lactic acid bacteria · *Lactobacillus* · Technological properties

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1	ΓΕΝΙΚΑ	12
1.2	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	12
1.3	ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΠΡΟΖΥΜΙ – ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	17
1.3.1	ΠΡΟΖΥΜΙ ΑΝΑ ΤΟΝ ΚΟΣΜΟ.....	17
1.3.2.	ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ	18
1.3.2.1	Προζύμια Τύπου Ι.....	18
1.3.2.2	Προζύμια Τύπου ΙΙ.....	19
1.3.2.3	Προζύμια Τύπου ΙΙΙ.....	19
1.3.3.	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ	22
1.4	ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ	23
1.5	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	23
1.5.1.	ΟΡΙΣΜΟΙ.....	23
1.5.2.	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ	24
1.5.3	LACTOBACILLUS PLANTARUM	28
1.5.3	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ.....	28
1.5.3.1	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ.....	29
1.5.4	ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (EPS).....	30
1.5.5	ΟΞΙΝΙΣΗ.....	30
1.5.6	ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	31
1.5.7	ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	32
1.5.8	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	33
1.5.9	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	33
1.6	ΣΗΜΑΣΙΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	34
1.6.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΨΩΜΙΟΥ.....	35
1.6.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΥΦΗ, ΔΟΜΗ	35
1.6.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΓΕΥΣΗ & ΣΤΟ ΑΡΩΜΑ	36
1.6.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ	36
	ΣΚΟΠΟΣ.....	38
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1	ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	39
2.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	42
2.2.1	ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	43

2.2.2	ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	44
2.3	ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD – PCR	46
2.3.1	ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA	46
2.3.2	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA	47
2.3.3	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	48
2.4	ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	49
2.4.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ.....	49
2.4.2	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ SDS (SDS – PAGE) 50	
2.4.2.1	Προετοιμασία δειγμάτων και εκχύλιση πρωτεϊνών.....	50
2.4.2.2	Παρασκευή διαλυμάτων της Sds-Page.....	51
2.4.2.3	Προετοιμασία συσκευής ηλεκτροφόρησης	52
2.4.2.4	Εμφάνιση πρωτεϊνών.....	54
2.4.2.5	Χρώση των πηκτών	54
2.4.2.6	Αποχρωματισμός των πηκτών.....	54
2.4.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ	55
2.4.4	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 55	
2.4.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΑΣΗΣ.....	56
2.4.6	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	57
2.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	58
2.6	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	59
2.6.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ & ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	59
2.6.2	ΜΕΤΡΗΣΗ pH & ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ) ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ	61
2.6.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ cfu/ g ΖΥΜΑΡΙΟΥ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ 61	
2.6.4	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	62
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
3.1	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ DNA	63
3.2	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	64
3.3	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ	65
3.3.1	ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	65
3.3.1.1	Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	65

3.3.1.2	Ηλεκτροφορήση Πηκτής Πολυακρυλαμιδίου Με SDS.....	68
3.3.2	ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	73
3.3.2.1	Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	73
3.3.2.2	Κινητική μικροοργανισμών με λιπολυτική δράση	74
3.3.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΑΣΗΣ	75
3.3.4	ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΙ ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ) 75	
3.3.5	ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΙ ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ) ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ	79
3.3.6	ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ.....	82
3.4	ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	85
3.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ/ (HPLC)	89
3.6	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	93
3.6.1	Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς την εμφάνιση	96
3.6.2	Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς το άρωμα	101
3.6.3	Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς γεύσης.....	105
3.6.4	Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς την υφή	109
3.6.5	Συνολική αξιολόγηση δειγμάτων	113
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	127
4.1	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	127
4.2	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ	128
4.2.1	ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	128
4.2.2	ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	129
4.2.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΑΣΗΣ	130
4.2.4	pH ΚΑΙ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	130
4.2.5	ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	131
4.3	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	132
4.3.2	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΡΥΒΛΙΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ, ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΙΜΕΣ pH	133
4.4	ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ HPLC.....	135
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	137
	ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137
	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	149
	ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ.....	149
	Παράρτημα Ι.....	150

Παράρτημα II 156

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το προζύμι αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν στην διαδικασία της αρτοποιίας. Χρησιμοποιείται στην παραγωγή αρτοσκευασμάτων με σκοπό να βελτιώσει την υφή και τη γεύση αλλά και την διάρκεια συντήρησης του. Σήμερα χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον ως βελτιωτικό της γεύσης του ψωμιού (Petel και συν., 2017).

Το προζύμι είναι ουσιαστικά μια συμβιωτική καλλιέργεια μικροοργανισμών που «τρέφεται» με αλεύρι και νερό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, το οποίο αποτελείται από ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια. (Settanni και συν., 2013). Τα βακτήρια αυτά ανήκουν κυρίως στο γένος *Lactobacillus* και είναι υπεύθυνα για την παράγωγή οξέων που προσδίδουν την χαρακτηριστική ξινή γεύση στο ψωμί. Τα κυριότερα είδη γαλακτικών βακτηρίων που απαντώνται στο ψωμί είναι *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. bucheri* και *Lb. fermentum* (Hui και συν., 2006). Αντίστοιχα οι μύκητες ανήκουν κυρίως στο γένος *Saccharomyces* και είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης, του αερίου που διογκώνει το αρτοπαρασκεύασμα (Leroy & De Vuyst, 2004).

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το ψωμί αποτελεί την παλαιότερη παρασκευαζόμενη τροφή του ανθρώπου και γίνεται με ανάμειξη αλεύρου δημητριακών και νερού. Στη συνέχεια δημιουργείται το ζυμάρι το οποίο φουσκώνει και τελικά ψήνεται. Το πρώτο ψωμί παρασκευάζεται με την αυγή του πολιτισμού μας, κατά την νεολιθική εποχή (8.000 π.Χ.), όταν ο άνθρωπος ξεκίνησε την καλλιέργεια δημητριακών. Αυτό το πρώτο αρτοποιητικό παρασκεύασμα δεν μοιάζει με το ψωμί που γνωρίζουμε, αλλά είναι ένα είδος σκληρής πίτας που δεν διογκώνεται (φουσκώνει) (leavening, rising) και ψήνεται πάνω σε καυτές πλάκες.



Εικόνα 1: Ειδώλιο που απεικονίζει ομαδικό ζύμωμα υπό τους ήχους του διαύλου 5^{ος} αιώνας πΧ.

Πιο αναλυτικά, το πρώτο ψωμί παρασκευάζεται στη Μεσοποταμία (8.000 π.Χ.) και είναι ουσιαστικά ένας χυλός που ψήνεται στον ήλιο. Στη συνέχεια, οι Σουμέριοι διαδίδουν τον τρόπο παρασκευής του ψωμιού στους Αιγύπτιους, όπου από το 3.000 π.Χ. υπάρχουν αναφορές για παρασκευή του ψωμιού. Οι Αιγύπτιοι ήταν άριστοι γνώστες της γεωργίας και των τεχνικών της και η Αίγυπτος θεωρούνταν ο σιτοβολώνας του κόσμου. Εκεί, καλλιεργούνταν καλής ποιότητας σιτάρι με αποτέλεσμα το ψωμί να είναι η βασική τροφή των Αιγυπτίων, ακόμα και ο μισθός των εργατών πληρωνόταν σε ψωμί. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι πειραματίστηκαν επίσης με τη χρήση διαφόρων ειδών φούρνων. Ο πρώτος ήταν κωνικού σχήματος και φτιαγμένος από άργιλο. Αργότερα κατασκευάζονται πιο περίτεχνοι, υπενδεδυμένοι με πέτρες φούρνοι όπου το ψωμί ψηνόταν μέσω της καύσης ξύλων. Ακόμα, φαίνεται πως οι Αιγύπτιοι ήταν αυτοί που ανακάλυψαν τυχαία το ψωμί με προζύμι. Μέσα σε μεγάλα πήλινα αγγεία συνέθλιβαν το σιτάρι και προσέθεταν νερό από το Νείλο, το οποίο ήταν πλούσιο σε μικροοργανισμούς και ένζυμα. Τα μείγμα ξεκουραζόταν για λίγες ώρες, υφίστατο τη φυσική ζύμωση και ψηνόταν σε προθερμασμένα καλούπια. Έτσι, παρόλο που οι πρώτοι αρτοποιοί της αρχαιότητας ήταν Αιγύπτιοι στους οποίους οφείλουμε την



Εικόνα 2: Αιγυπτιακή τοιχογραφία που απεικονίζει την διαδικασία αρτοποιίας (Jacob 1997).

ανακάλυψη της φυσικής ζύμωσης εξίσου σημαντική ήταν και η συμβολή των Αρχαίων Ελλήνων στην παρασκευή του ψωμιού καθώς και στην βελτίωση του τόσο γευστικά όσο και εμφανισιακά. Ήταν εκείνοι που βελτίωσαν σημαντικά τις τεχνικές παρασκευής του ψωμιού δημιουργώντας μια μεγάλη ποικιλία τύπων

ψωμιού με την προσθήκη αρωματικών, μπαχαρικών, σουσαμιού, γάλακτος ή μελιού. Ο τύπος του δημητριακού που χρησιμοποιούνταν προσδιόριζε την ονομασία της ποικιλίας ή του τύπου του ψωμιού.

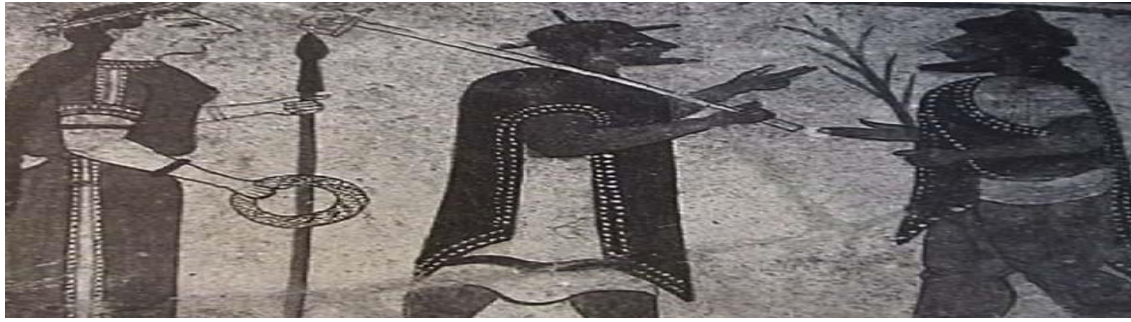
Σε άλλες περιπτώσεις το όνομα προερχόταν από τις τελετουργίες και από τις τελετές προσφορών που γίνονταν για τις θεότητες. Έτσι, τα διάφορα είδη άρτου στην Αρχαία Ελλάδα ήταν, οι κόλλαβοι (ψωμί μικρού σχήματος), τα πόπανα (επίπεδο ψωμί με ένα

ή περισσότερα επάρματα στο κέντρο), οι σησαμίδες (άρτοι σφαιρικοί που προσφέρονταν στην θεά Δήμητρα), ο ιπνίτης (περιζήτητο τότε ψωμί αφού ήταν από τα λίγα είδη άρτου που ψηνόταν σε φούρνο), ο εσχαρίτης (ψωμί ψημένο σε πήλινη σχάρα) και ο κριβανίτης (ψημένος στον κρίβανο, ένα είδος κινητού πήλινου φούρνου). Κάποια ακόμα είδη ψωμιού ήταν ο βλωμιαίος (ψωμί με εγκοπές που το έκαναν εύκολο στο διαχωρισμό σε τμήματα), ο συγκομιστός (ψωμί από άλευρα από διάφορα δημητριακά), ο μακωνίδης (ψωμί με σπόρο παπαρούνας), ο πυρίτης (ψωμί σιταριού με μέλι), ο αλιφατίτης (σήμερα γνωστό ως λαδόψωμο, μπορεί να φτιάχνονταν και με ζωικό λίπος).

Τέλος, άλλα πολύ γνωστά είδη άρτου ήταν η κόλλυρα ή κολλίκια (τα σημερινά κουλούρια), το αρτολάγανο ή λάγανο (πρόγονος της λαγάνας που φτιαχνόταν με καλής ποιότητας αλεύρι), ο αυτόζυμος (σήμερα γνωστό ως εφτάζυμο – λέξη που προέκυψε από παράφραση – το αυτόζυμο φτιάχνεται δεν προκύπτει από προζύμι αλλά με προσθήκη μιας καλλιέργειας από ρεβίθια), ο απαλός άρτος (ψωμί με λάδι και γάλα – το έφτιαχναν και οι Καπαδόκες και οι Σύριοι που το έλεγαν λαχμά). Επίσης, οι Έλληνες δημιούργησαν τους πρώτους κλειστούς πέτρινους φούρνους έξω από τα όρια της οικίας και τις πρώτες συντεχνίες αρτοποιών, ορίζοντας βάρδιες και κανόνες για την νυχτερινή εργασία των αρτοποιών (Μότσιας, 1982, Cappelletti και συν., 2013).



Εικόνα 3: Είδη άρτου στην αρχαία Ελλάδα



Εικόνα 4: Λεπτομέρεια από ελληνικό αμφορέα που απεικονίζει γεωργικές διαδικασίες.



Εικόνα 5: Ειδώλιο – διαδικασία ζύμωσης άρτου.



Εικόνα 6: Ειδώλιο από τη Βοιωτία – γυναίκα που ζυμώνει άρτο.

Περί το 170 π.Χ. οι αρχαίοι Ρωμαίοι, μετά την κατάκτηση της Ελλάδας, μυούνται στην τέχνη της αρτοποιίας από τους Έλληνες και προσθέτουν και εκείνοι σε μεγάλο βαθμό στην εξέλιξη της. Τα πρώτα οργανωμένα αρτοποιεία –περίπου 300 στη Ρώμη- εμφανίζονται το 172 π.Χ., όπου ιδρύεται και η πρώτη συντεχνία αρτοποιών. Αυτά αποτελούνται από πέντε μέρη, ένα τμήμα όπου αλέθονταν το σιτάρι, ένα δεύτερο με το φούρνο από πυρίμαχα τούβλα και θολωτή οροφή, ένα τρίτο που αποτελούσε την αποθήκη, ένα τέταρτο που ήταν ο χώρος πώλησης, ενώ το πέμπτο ήταν το σπίτι του αρτοποιού (Μποσδίκος, 2005).



Εικόνα 7: Εικόνα πώλησης ψωμιού στην αρχαία Ρώμη.

Κατά το Μεσαίωνα, κάνει την πρώτη του εμφάνιση το λευκό ψωμί όπως το γνωρίζουμε σήμερα. Εκείνη τη χρονική περίοδο αρχίζει η παραγωγή αλεύρου χωρίς πίτουρο, κάτι που κάνει αυτόματα την παραγωγή ψωμιού πιο χρονοβόρα, επίπονη και αυτόματα ακριβή διαδικασία, καθιστώντας έτσι το ψωμί ως προνόμιο των πλουσίων. Άλλη μία αλλαγή εκείνης της περιόδου είναι η κατασκευή ανεμόμυλων ενώ οι νερόμυλοι προϋπήρχαν από τη ρωμαϊκή εποχή.

Ως τον 19^ο αιώνα δεν γίνονται ενέργειες βελτίωσης της αρτοποιητικής πρακτικής. Στην συνέχεια βλέπουμε προσπάθειες βελτίωσης της ποιότητας του ψωμιού, με πρωτεργάτη τον Parmetier που προσπάθησε να εισάγει όρους όπως η ποιότητα του αλεύρου. Ακόμα, το 1780 ο ίδιος ιδρύει την «Ακαδημία της Αρτοποιήσης», το πρώτο σχολείο για αρτοποιούς στο οποίο είναι και ένας από τους καθηγητές. Όμως η μεγαλύτερη συμβολή στην βελτίωση της ποιότητας του αλεύρου κατά τον 19^ο αιώνα έρχεται με την κατασκευή των σιδερένιων κυλινδρόμυλων από τους Mueller και Sulzberger που αντικατέστησαν τους πέτρινους μύλους.

Τέλος, μεγάλη βελτίωση στην ποιότητα του ψωμιού έρχεται μετά τη λήξη του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου, όπου γίνονται μεγάλα άλματα στις τεχνικές παρασκευής με τη χρήση μηχανοκίνητων εργαλείων και ζυμωτηρίων, αναπτύσσεται παράλληλα και η βιομηχανία και έτσι η διαδικασία της αρτοποιήσης αυτοματοποιείται και γίνεται πλέον σε βιομηχανική κλίμακα (<http://loulismuseum.gr>).

1.3 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΠΡΟΖΥΜΙ – ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το προζύμι αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν της διαδικασίας της αρτοποιήσης στο οποίο εμπεριέχονται διάφοροι μικροοργανισμοί. Το προζύμι λόγω του ότι είναι άμεσα εξαρτημένο από την περιοχή παρασκευής του, αποτελεί μία αστείρευτη πηγή διαφορετικών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και ζυμών. Αυτά τα είδη αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του προζυμιού και με τις διάφορες ιδιότητες τους προσδίδουν ξεχωριστές ιδιότητες στο προζύμι (De Vuyst & Neysens, 2005).

1.3.1 ΠΡΟΖΥΜΙ ΑΝΑ ΤΟΝ ΚΟΣΜΟ

Σε διάφορες χώρες το προζύμι έχει διαφορετικά ονόματα. Στη Γαλλία παρουσιάζεται ως “levain”, στην Ιταλία ως “lievito naturale”, στην Ρωσία ως “zakvaska”, στην Γερμανία ως “sauerteig” και στην Ισπανία ως “masa madre” (μητέρα ζύμη). Το προζύμι μπορεί να δώσει ξινή γεύση στο ψωμί, όπως το ψωμί με προζύμι του Σαν Φρανσίσκο στις ΗΠΑ. Όμως αυτό δεν ισχύει πάντα, στην Ιταλία οι αρτοποιοί παρασκευάζουν το “Lievito Naturale” –που σημαίνει φυσική ζύμη, ενώ στην Νότια Αφρική έχουν το “Soet Suur” - δηλαδή γλυκόξινο, αντίστοιχα η Ολλανδία έχει το “Desem”. Το αγγλικό “sourdough” πιθανών προέρχεται από το γερμανικό “Sauerteig”, το οποίο προέρχεται από το προζύμι σίκαλη (Καμάρδα & Ορεστίδης 2016).

Πιο αναλυτικά, στην Ισπανία ο συνηθέστερος τύπος προζυμιού είναι το “masa de pan”, δηλαδή η χρήση από μέρους από πλήρως ανεπτυγμένο προζύμι το οποίο ως έχει ή με ανανεώσεις χρησιμοποιείται για την παραγωγή της επόμενης δόσης ψωμιού (Ottogalli και συν., 1996).

Αντίστοιχα στην Ιταλία παρασκευάζονται περίπου 200 διαφορετικά είδη ψωμιού σε όλη την χώρα με μεγάλες διαφοροποιήσεις στις συνταγές και τις παραδόσεις. Ορισμένα από αυτά τα ψωμιά με προζύμι έχουν ήδη παραλάβει την Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ), όπως τα Panedi Altamura και Pagnotta del Dittaino ή την προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη, όπως τα Pane di Matera, Pane Casareccio di Genzano και Coppia Ferrarese (Minervini και συν., 2011).

Στην Γαλλία το ψωμί με προζύμι περιγράφεται στη νομοθεσία ως εκείνο που η διόγκωσή του προκαλείται κυρίως από το προζύμι (η προστιθέμενη μαγιά πρέπει να είναι λιγότερο από 0,2 % επί του αλεύρου) και με χαρακτηριστικά pH χαμηλότερο από 4,3 και οξικό οξύ μεγαλύτερο από 900 ppm να προέρχονται από το προζύμι. Έτσι στην Γαλλία υπάρχουν τα “Levain spontanee”, που είναι το φυσικό/ αυθόρμητο προζύμι, “Levain de pate fermentee” που αποτελούν ανακύκλωση πλήρως ωριμασμένου

ζυμαριού. Με τον όρο “Levain mixture sur rafraichi” εννοούν την ταυτόχρονη χρήση προζυμιού και μαγιάς στο ζυμάρι, έτσι ώστε το προζύμι να λαμβάνει τεχνικά χαρακτηριστικά από το προζύμι και από τη χρήση της μαγιάς διόγκωση (Tamony, 1973). Τέλος, στην Γερμανία χρησιμοποιείται ο γενικός όρος “Vorlaufer” ο οποίος μεταφράζεται ως προπαρασκευάσμα με μικροοργανισμούς ή αλλιώς “Vorstufe” που σημαίνει προπαρασκευαστικό στάδιο. Χαρακτηριστικά είδη “Vorstufe” είναι το “Sauerteig” το οποίο είναι το κλασσικό προζύμι και το “Vorteig” που είναι αντίστοιχο με το sponge (Lorenz & Bruemmer, 2003).

1.3.2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ

Το προζύμι είναι ουσιαστικά ένα μείγμα δύο μόνο συστατικών, του νερού και του αλεύρου που υπόκειται σε ζύμωση. Ωστόσο, οι διαφορετικές πρώτες ύλες, οι διαφορετικές τεχνικές και παραδόσεις κάθε χώρας αλλά και οι απαιτήσεις των καταναλωτών έχουν οδηγήσει σε μία ανεξέλεγκτη ποικιλία προζυμιών ανά τον κόσμο (Di Cagno και συν., 2014).

Έτσι για την ομαδοποίηση τους σε κατηγορίες χρησιμοποιείται από τη βιβλιογραφία η κατάταξη τους με βάση τις διαφορετικές τεχνολογίες παραγωγής. Συγκεκριμένα, τα προζύμια κατατάσσονται σε τρεις τύπους, τον **Τύπο I** στον οποίο ουσιαστικά ανήκουν τα παραδοσιακά προζύμια όπου γίνεται ανακύκλωση – σε αυτά δεν απαιτείται μαγιά στο τελικό ζυμάρι. Ο **Τύπος II** είναι τα προζύμια σε υγρή μορφή - βιομηχανικού τύπου στα οποία χρησιμοποιούνται προσαρμοσμένα στελέχη για να ξεκινήσει η ζύμωση. Τα προζύμια αυτά έχουν μεγάλη ενυδάτωση οπότε είναι εύκολα αντλήσιμα σε ένα βιομηχανικό αρτοποιείο – απαιτείται μαγιά στο τελικό ζυμάρι. Τέλος, ο **Τύπος III (αποξηραμένα προζύμια)** περιλαμβάνει προζύμια που μπορεί να έχουν ξηρανθεί. Τα προζύμια που κατατάσσονται στον τρίτο αυτό τύπο χρησιμοποιούνται κυρίως σε βιομηχανική κλίμακα αφού έχουν σταθερή ποιότητα και δεν παρουσιάζουν παραλλαγές στο τελικό προϊόν. Τα προζύμια αυτού του τύπου χρειάζονται προσθήκη μαγιάς στο τελικό ζυμάρι (Chavan & Chavan, 2011).

Πιο αναλυτικά,

1.3.2.1 Προζύμια Τύπου I

Πρόκειται για τα παραδοσιακά προζύμια τα οποία διατηρούνται σε ενεργή κατάσταση μέσω διαδοχικών ανανεώσεων (Corsetti & Settanni, 2006). Συνήθως ένας πλήρης κύκλος είναι 24 ώρες ώστε να ανταποκριθεί στην ημερήσια παραγωγή άρτου. Η συνέχεια της δράσης των μικροοργανισμών εξασφαλίζεται από τον επανεμβολιασμό

της νέας παρτίδας από την προηγούμενη (back-slopping) σε αντίθεση με την άμεση ζύμωση που γίνεται στα προζύμια τύπου II. Αρτοποιητικά προϊόντα όπως το Pannetone, Brioche, το ιταλικό ψωμί τύπου Pugliese και Altamura παρασκευάζονται από αυτού του τύπου τα παραδοσιακά προζύμια. Τα προζύμια αυτά, όπως αναφέρθηκε είναι κατάλληλα για τη διόγκωση του ψωμιού χωρίς την προσθήκη μαγιάς. Κατά την παραγωγή τους χρησιμοποιείται συνήθως πρωτόκολλο 3 σταδίων. Σε κάθε στάδιο γίνεται μία ενυδάτωση, η θερμοκρασία κυμαίνεται από 20-30 °C και το τελικό pH είναι γύρω στο 4 (Gobbetti και συν., 2008).

1.3.2.2 Προζύμια Τύπου II

Πρόκειται για προζύμια που παράγονται μέσω ενός σταδίου ζύμωσης (συνήθως 12-18 ωρών) το οποίο ακολουθείται από αποθήκευση που μπορεί να διαρκέσει ως και μερικές μέρες. Τα προζύμια αυτού του τύπου δεν είναι κατάλληλα για διόγκωση του τελικού ζυμαριού αλλά χρησιμοποιούνται ως βελτιωτικά αλλά και για οξίνιση (Corsetti & Settanni, 2006). Τα προζύμια τύπου II είναι υγρά, παραγόμενα σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία ζύμωσης > 30 °C και τελικά pH < 3,5) σε βιοαντιδραστήρες βιομηχανικής κλίμακας. Μετά τη ζύμωση ακολουθεί ψύξη και αποθήκευση σε 10 – 15 °C. Λόγω του μεγάλου βαθμού ενυδάτωσης σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία και το μακρύ χρόνο αποθήκευσης, κυριαρχούν ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι οι οποίοι είναι ανθεκτικοί σε χαμηλό pH. Αντίθετα, οι ενδογενείς ζύμες του αλεύρου αναστέλλονται σε αυτές τις συνθήκες και έτσι η διόγκωση του τελικού ζυμαριού γίνεται με μαγιά. Επίσης, τα προζύμια αυτής της κατηγορίας μπορούν να εισαχθούν για ξήρανση και παραγωγή εμπορικών εκκινητών σε σκόνη (Siermann και συν., 2018).

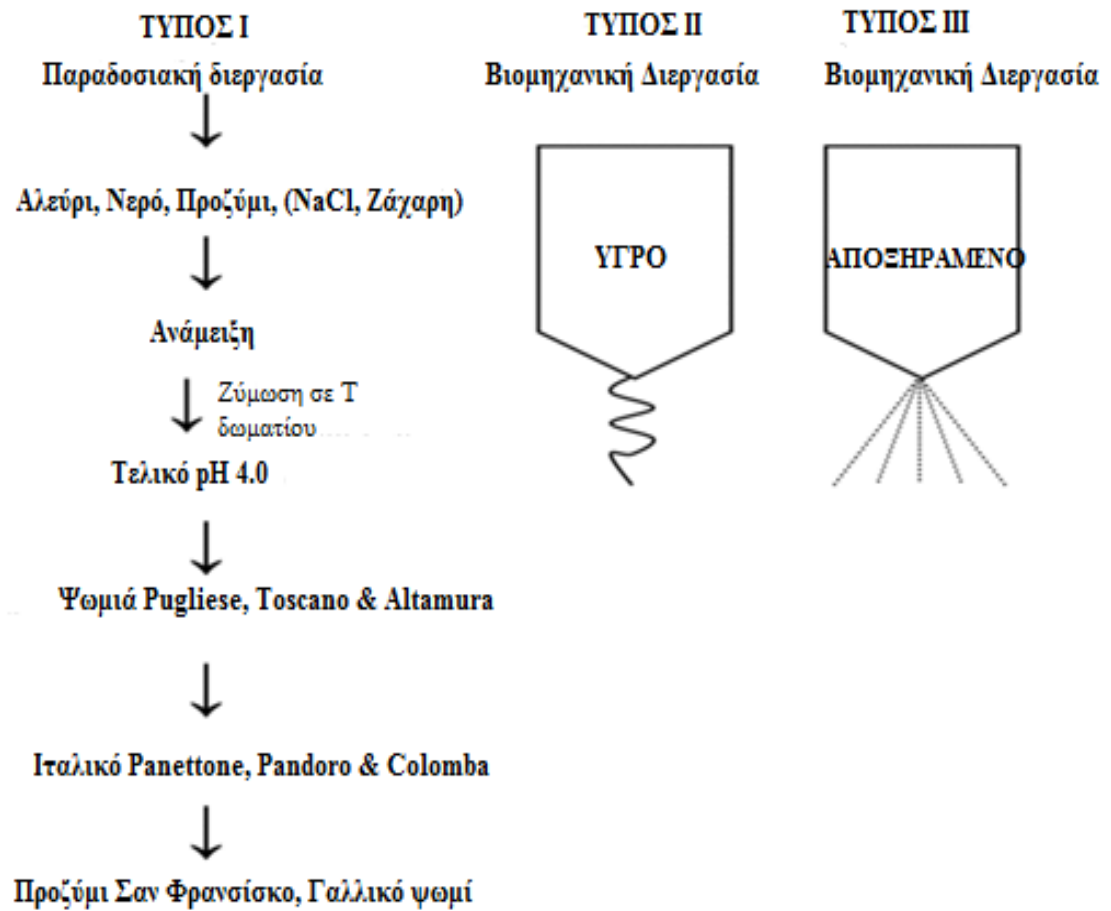
1.3.2.3 Προζύμια Τύπου III

Τα προζύμια σε αυτήν την κατηγορία προκύπτουν από αυτά του Τύπου II, όταν αυτά υποστούν επεξεργασία ώστε να ξηραθούν και να σταθεροποιηθούν σε μορφή σκόνης. Είναι ουσιαστικά αποξηραμένες παρασκευές που περιέχουν ανθεκτικά στην ξήρανση στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Corsetti & Settanni, 2006). Διαφορετικές τεχνικές ξήρανσης χρησιμοποιούνται καθώς και υγρή παστερίωση, για να επιτευχθεί μικροβιακή σταθερότητα. Η ξήρανση με ψεκασμό και η ξήρανση με τύμπανο είναι οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές ξήρανσης στην παραγωγή αυτού του τύπου προζυμιού (De Vuyst και συν., 2017).

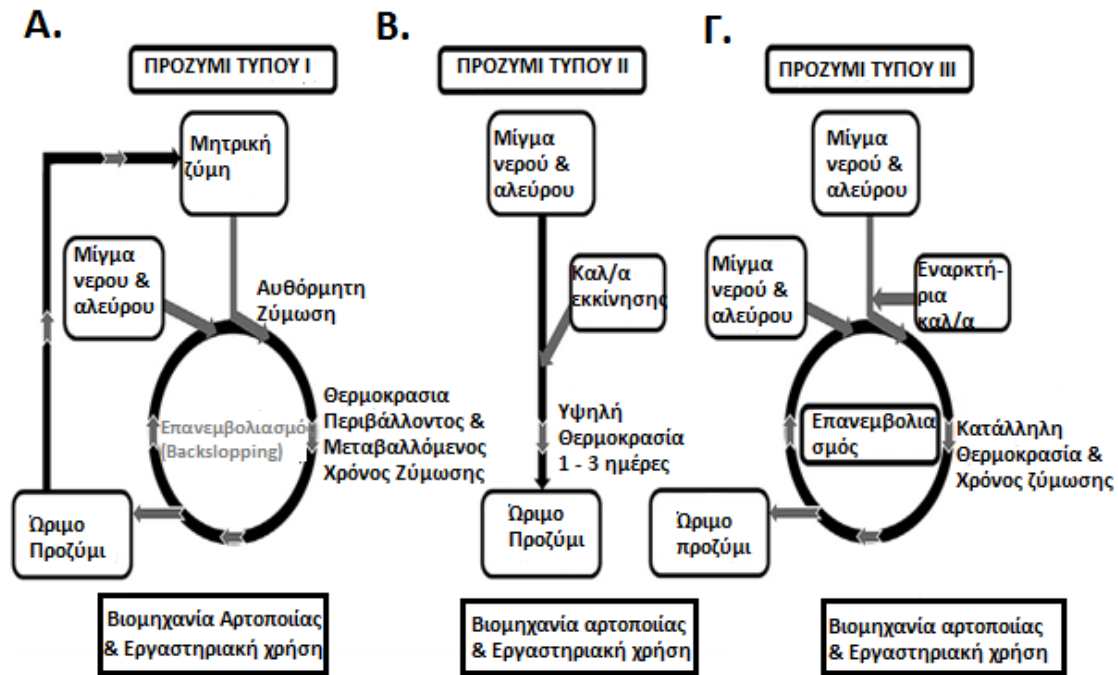
Πίνακας 1: Κατάταξη προζυμιών και χαρακτηριστική μικροχλωρίδα κάθε τύπου.

Προζύμι τύπου Ια	Προζύμι τύπου Ιβ	Προζύμι τύπου Ιγ	Προζύμι τύπου ΙΙ	Προζύμι τύπου ΙΙΙ
Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά
<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. ^a	<i>Lactobacillus</i> spp. ^b	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	
	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. frumenti</i>	
	<i>Lb. fermentum</i>		<i>Lb. pontis</i>	
	<i>Lb. fructivorans</i>		<i>Lb. panis</i>	
	<i>Lb. pontis</i>		<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. reuteri</i>		<i>Lb. sanfranciscensis</i>	
	<i>Lb. sanfranciscensis</i>		<i>W. confusa</i>	
	<i>W. cibaria</i>			
	Προαιρετικά ετεροζυμωτικά			Προαιρετικά ετεροζυμωτικά
	<i>Lb. alimentarius</i>			<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. casei</i>			<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. paralimentarius</i>			<i>P. pentosaceus</i>
	<i>Lb. plantarum</i>			
	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά	
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	
	<i>Lb. delbrueckii</i>		<i>Lb. delbrueckii</i>	
	<i>Lb. farciminis</i>		<i>Lb. amylovorus (rye)</i>	
	<i>Lb. mindensis</i>		<i>Lb. farciminis</i>	
			<i>Lb. johnsonii</i>	

Όπου, α: Φυλογενετικά συσχετιζόμενα με το *Lb. brevis* και β: Φυλογενετικά συσχετιζόμενα με τον *Lb. pontis* (De Vuyst & Neysens, 2005).



Εικόνα 8: Τύποι προζυμιού (Chavan & Chavan, 2011).



Εικόνα 9: Τύποι διεργασιών ζύμωσης προζυμιού ανάλογα με το ενοφθάλμισμα (μητρική ζύμη ή καλλιέργεια εκκίνησης) που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση του μείγματος αλεύρου : νερού.

(A): τύπος I, διεργασία αυθόρμητης ζύμωσης

(B): τύπος II, διεργασία ζύμωσης προζυμιού με χρήση καλλιέργειας εκκίνησης

(C): τύπος III ή back slopped starter culture (De Vuyst και συν., 2017).

1.3.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ

Αν και η μέθοδος παρασκευής ψωμιού από προζύμι είναι χρονοβόρα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, υπάρχουν μια σειρά ευεργετικών αντιδράσεων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Το προζύμι χρησιμοποιείται τόσο για να βελτιώσει την ποιότητα του παραγόμενου ψωμιού όσο και για να παρατείνει την διάρκεια ζωής του (Couch, 2016). Το προζύμι λόγω της ενδογενούς του μικροχλωρίδας προσδίδει διάφορες ιδιότητες στο τελικό προϊόν που επηρεάζουν τελικά και την ποιότητα του. Κάποιες από αυτές είναι, η παραγωγή αερίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος, που δίνει την χαρακτηριστική ξινή γεύση στο ψωμί, η παραγωγή αρωματικών ουσιών κ.α. - γ' αυτές τις ιδιότητες υπεύθυνα είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αλλά και οι ζύμες του προζυμιού (Ganzle & Gobbetti, 2013). Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του προζυμιού, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) παράγουν έναν αριθμό μεταβολιτών που έχει αποδειχθεί ότι έχουν θετική επίδραση στην υφή και το ψήσιμο του ψωμιού, π.χ. οργανικά οξέα, εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και / ή ένζυμα. Οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να αντικαταστήσουν υδροκολλοειδή

που χρησιμοποιούνται ως βελτιωτικά ψωμιού ενώ τα οργανικά οξέα επηρεάζουν τα κλάσματα πρωτεΐνης και αμύλου του αλεύρου. Επιπλέον, η πτώση του pH που σχετίζεται με την παραγωγή οξέος προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας των πρωτεασών και των αμυλασών του αλεύρου, οδηγώντας έτσι σε μείωση του ψησίματος (Arendt και συν., 2007).

1.4 ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το προζύμι είναι ένα μείγμα αλεύρου δημητριακών και νερού το οποίο καθίσταται μεταβολικά δραστήριο λόγω ενός ετερογενούς μικροβιακού πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών που προέρχονται είτε από αυθόρμητη ζύμωση είτε από χρήση εναρκτήριας καλλιέργειας (De Vuyst και συν., 2009). Οι ζύμες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια του προζυμιού βρίσκονται περίπου σε αναλογία 1:100 (Gobbetti και συν., 1996). Όμοια, και σε ώριμο προζύμι κυρίαρχο χαρακτήρα φαίνεται να έχουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αφού βρίσκονται σε πληθυσμούς μεγαλύτερους από 10^8 cfu/ g, ενώ ο αντίστοιχος πληθυσμός των ζυμών είναι πολύ μικρότερος (Ehrmann & Vogel, 2005). Οι ζύμες περιλαμβάνουν συνήθως τα είδη *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *S. holmii*, *Torulopsis* sp., *C. krusei* κ.ά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αναφέρονται συχνότερα ως τμήμα προζυμιού είναι τα *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. bucheri*, *P. cerevisiae* κ.ά. Τα *Lb. brevis* και *Lb. plantarum* απομονώνονται από προζύμια σίτου, σόργου και σίκαλης ενώ το *Lb. sanfranciscensis* από προζύμι σίτου και σίκαλης (De Vuyst και συν., 2009). Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η μεγάλη αυτή κατηγορία μικροοργανισμών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

1.5 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.5.1. ΟΡΙΣΜΟΙ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά βακτήρια κατά κανόνα προαιρετικά αναερόβια. Έχουν σχήμα βάκκιλων ή κόκκων, είναι μη σποριογόνα και μη ικανά για κίνηση, τα οποία ζυμώνουν τους υδατάνθρακες προς σχηματισμό κυρίως γαλακτικού οξέος. Επίσης παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH σε σύγκριση με άλλα είδη βακτηρίων που σχετίζονται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα. (Cornel University, 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμπλέκονται σ' ένα μεγάλο αριθμό ζυμώσεων τροφίμων – έτσι οι νεώτεροι ορισμοί που δίνονται γι' αυτά στηρίζονται στην ικανότητα ζύμωσης. Η κατηγορία αυτή βακτηρίων απαρτίζεται από

20 περίπου γένη, με κυρίαρχα να είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Ακόμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατηγοριοποιούνται ως ομοζυμωτικά ή ως ετεροζυμωτικά ανάλογα με τα υποπροϊόντα ζύμωσης των σακχάρων.

Τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (homofermentative lactic acid bacteria) με τη ζύμωση της γλυκόζης δίνουν ως βασικό υποπροϊόν το γαλακτικό οξύ. Σ' αυτή την κατηγορία υπάγονται τα *Lactococcus* spp. που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές καλλιέργειας γαλακτοπαραγωγικών εκκινητών όπου επιθυμείται η ταχεία ανάπτυξη γαλακτικού οξέος και μειωμένου pH. Άλλα είδη που ανήκουν στα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια είναι τα *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* και το *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus*.

Τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (heterofermentative lactic acid bacteria) με τη ζύμωση της γλυκόζης καταβολίζουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη/ οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Στην δεύτερη αυτή κατηγορία οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνονται το *Leuconostoc* spp. (Gram-θετικά, κόκκοι) και τα *Lb. brevis* και *Lb. reuteri* (Gram-θετικά, ράβδοι). Τέλος, υπάρχουν και κάποια είδη *Lactobacillus* που χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά ετεροζυμωτικά κάτι που σημαίνει ότι παράγουν CO₂ και άλλα υποπροϊόντα μόνο υπό ορισμένες συνθήκες ή υποστρώματα – τέτοια είναι τα *Lb. plantarum*, *Lb. casei* και *Lb. curvatus* (Damiani και συν., 1996, <https://www.sourdough.co.uk/glossary/>).

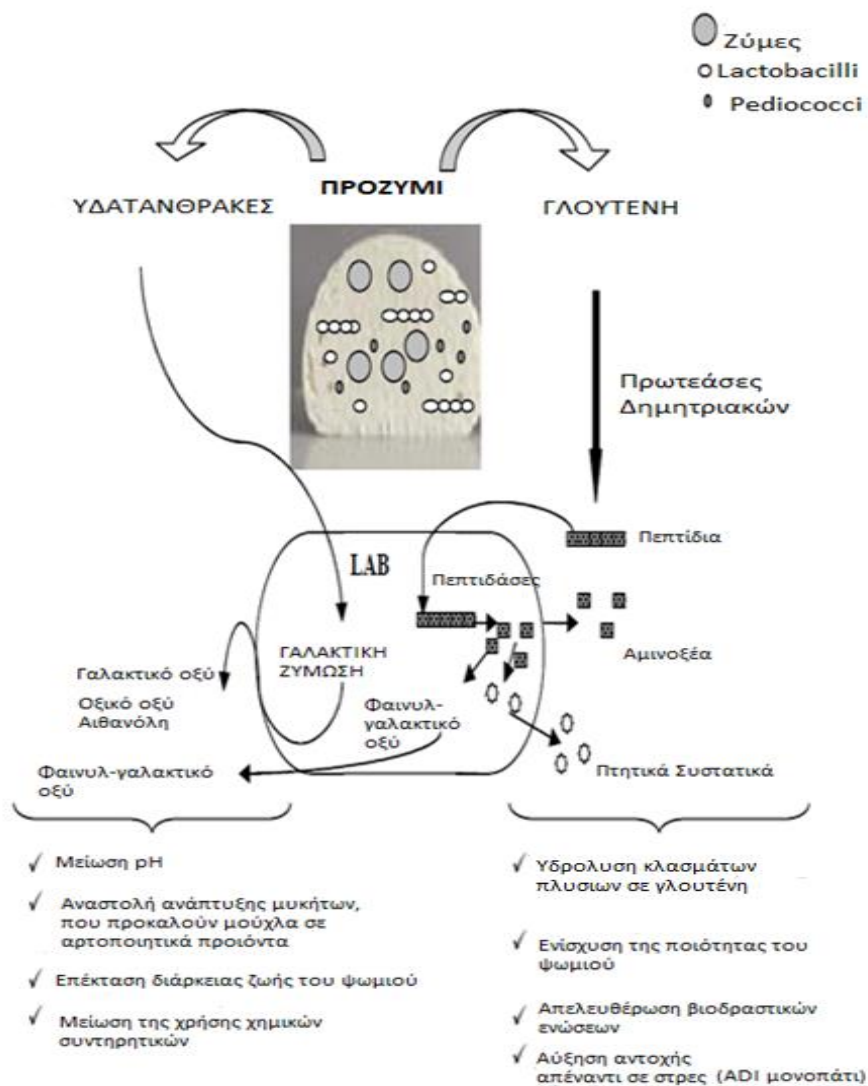
1.5.2. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αποτελούν τμήμα της μικροβιακής χλωρίδας του προζυμιού, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία σε επίπεδο είδους. Παρόλο που η κυριαρχία των γαλακτοβάκιλλων (*Lactobacillus* spp.) είναι ξεκάθαρη, υπάρχουν και άλλα γένη που συνθέτουν το οικοσύστημα οξυγαλακτικών βακτηρίων στο προζύμι. Τα επικρατέστερα είναι τα γένη *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* και *Streptococcus* (Πίνακας 2) (Huys και συν., 2013).

Η κατανομή των παραπάνω γενών στα διάφορα προζύμια παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και εξαρτάται κυρίως από οικολογικούς παράγοντες. Στο προζύμι οι παράγοντες αυτοί είναι κυρίως η θερμοκρασία, το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η ιοντική ισχύ, αλλά και μικροβιακά προϊόντα όπως γαλακτικό και το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα, και η αιθανόλη, καθώς και παράγοντες που προκύπτουν από

υπάρχοντα υποστρώματα στο κλάσμα των δημητριακών και από το ενδογενείς, καθώς και μικροβιακές ενζυμικές αντιδράσεις (De Vuyst & Neysens, 2005).

Ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παρασκευή του προζυμιού είναι σύνθετος. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν διάφορα οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό οξύ κ.ά.) τα οποία προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες στο προζύμι (Muhialdin και συν., 2015). Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος, η οποία μειώνει το pH και επομένως ασκεί μια ανασταλτική επίδραση στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (Hammes και συν., 1996). Ακόμα, με την παραγωγή οξικού οξέως, που λειτουργεί κυρίως ως αρωματικό συστατικό, παρεμποδίζεται η ανάπτυξη μυκήτων (Gobbetti και συν., 1996). Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αμιλάσες, πρωτεΐνάσες αλλά και βακτηριοσύνες που είναι σημαντικές στην παρασκευή του προζυμιού (Paramithiotis, 2001).



Εικόνα 10: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του ρόλου οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) κατά την ζύμωση σε προζύμι (Rollán και συν., 2010)

Πίνακας 2: Είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που σχετίζονται με ζύμωση προζυμιού.

Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια	Προαιρετικά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια	Υποχρεωτικά ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια
<i>Lb. acidifarinae</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>E. casseli flavus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. casei/paracasei</i>	<i>E. durans</i>
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. coleohominis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>Lb. kimchi</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Lb. collinoides</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. crustorum</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. amylolyticus</i>
<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. perolens</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
<i>Lb. frumenti</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>Lb. farciminis</i>
<i>Lb. hammesii</i>	<i>P. dextrinicus</i>	<i>Lb. gallinarum</i>
<i>Lb. hilgardii</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Lb. gasseri</i>
<i>Lb. homohiochii</i>		<i>Lb. helveticus</i>
<i>Lb. kefirii</i>		<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. kunkeei</i>		<i>Lb. mindensis</i>
<i>Lb. lindneri</i>		<i>Lb. nagelii</i>
<i>Lb. mucosae</i>		<i>Lb. salivarius</i>
<i>Lb. namurensis</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lb. nantensis</i>		<i>S. constellatus</i>
<i>Lb. nodensis</i>		<i>S. equines</i>
<i>Lb. oris</i>		<i>S. suis</i>
<i>Lb. panis</i>		
<i>Lb. parabuchneri</i>		
<i>Lb. pontis</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		

Lb. rossiae

Lb. sanfranciscensis

Lb. secaliphilus

Lb. siliginis

Lb. spicheri

Lb. vaginalis

Lb. zymae

Le. Citreum

Le. Gelidum

Le. mesenteroides subsp.
cremoris

Le. mesenteroides subsp.
dextranicum

Le. mesenteroides subsp.
mesenteroides

W. cibaria

W. confusa

W. hellenica

W. kandleri

W. paramesenteroides

W. viridescens

Όπου, Lb: *Lactobacillus*, Le: *Leuconostoc*, W: *Weissella*, P: *Pediococcus*, E: *Enterococcus*, Lc: *Lactococcus*, S: *Streptococcus* (Gobbetti & Ganzle 2013).

1.5.3 LACTOBACILLUS PLANTARUM

Το *Lb. plantarum* είναι ένας μικροαερόφιλος, Gram-θετικός μικροοργανισμός, με μορφολογία ράβδου, που εμφανίζεται μεμονωμένα ή ομαδοποιείται σε βραχείες αλυσίδες. Το είδος αυτό έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe)



Εικόνα 11: Μορφολογία είδους *Lb. plantarum*.

και πολλά στελέχη του *L. plantarum* έχουν απομονωθεί από διαφορετικές πηγές, όπως το κρέας, τα ψάρια, τα φρούτα, τα λαχανικά, το γάλα και τα προϊόντα δημητριακών (Todorov και συν., 2010).

Το *Lb. plantarum* είναι ένα είδος βακτηρίου που υπάγεται γένος

Lactobacillus, το οποίο περιλαμβάνει περίπου 90 αναγνωρισμένα υποείδη. Τα είδη του γένους *Lactobacillus*, όπως περιγράφεται παραπάνω, διακρίνονται σε τρεις λειτουργικές ομάδες ανάλογα με τις ικανότητες ζύμωσης τους. Το *Lactobacillus plantarum* ανήκει στα προαιρετικά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια και έτσι έχει την ικανότητα να ζυμώνει εξόξες σε γαλακτικό οξύ, μέσω της γλυκόλυσης (λόγω της παρουσίας ενός συστατικού: 1,6 - διφωσφορικής φρουκτόζης, αλδολάσης που αποτελεί βασικό ένζυμο της γλυκόλυσης) αλλά και ζυμώνει πεντόζες σε γαλακτικό και οξικό οξύ μέσω του 6 - φωσφογλυκονικού/ φωσφοκετολάση μονοπατιού. (phosphogluconate/ phosphoketolase) (Molin, 2015).

Το είδος αυτό οξυγαλακτικού βακτηρίου αποτελεί κυρίαρχο είδος και στο προζύμι (Corsetti & Settanni 2006, Robert και συν. 2009, Ventimiglia και συν. 2015). Έχει βρεθεί ότι το *Lb. plantarum* σε προζύμι δεν είναι μόνο σημαντικό για την παραγωγή οξέων, αλλά και για πολλά θετικά αποτελέσματα που εκφράζονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Ventimiglia και συν. 2015). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι δρα ως αναστολέας του *B. subtilis* που είναι υπεύθυνο για το φαινόμενο του «goring» σε προϊόντα αρτοποιίας (Katina και συν. 2002, Mentis και συν. 2007) αλλά και ότι είναι σε θέση να παράγει βακτηριοσίνες και αντιμυκητιακές ενώσεις (Batish και συν. 1997, Magnusson και συν. 2003, Ryan και συν. 2008).

1.5.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ

Ο μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες που θα έχει το προζύμι και συνεπώς το τελικό προϊόν αρτοποιίας. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η μεταβολική δραστηριότητα τους.

1.5.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Οι κύριοι υδατάνθρακες του αλεύρου είναι η μαλτόζη, η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη, καθώς και κάποιοι τρισακχαρίτες όπως η μαλτοτριόζη και η ραφινόζη. Κατά την ζύμωση, η ποσότητα της γλυκόζης αυξάνεται ενώ η ποσότητα της σακχαρόζης μειώνεται λόγω της δράσης της ιμπερτάσης παρουσία ζυμών. Οι ζύμες του προζυμίου δεν έχουν την ικανότητα ζύμωσης της μαλτόζης. Παρόλα αυτά, αναπτύσσονται λόγω της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα διάφορα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων και κυρίως του *Lb. sanfranciscensis* (Chavan & Chavan 2011). Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αυτά έχουν την ικανότητα να καταβολίζουν τους υδατάνθρακες αυτούς είτε ομοζυμωτικά είτε ετεροζυμωτικά και έτσι κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες που σχετίζονται με το μεταβολισμό υδατανθράκων (Saeed και συν. 2014).

(1) Τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (obligate homofermentative lactic acid bacteria), τα οποία ζυμώνουν εξόζες μέσω του EMP μονοπατιού (Embden-Meyerhof-Parnas) με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ.

(2) Τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (obligate heterofermentative). Σε αυτή την κατηγορία, οι μικροοργανισμοί ζυμώνουν εξόζες και πεντόζες μέσω του μονοπατιού 6-PG/ PK των φωσφορικών πεντοζών (6-phosphoglyconate/ phosphoketolase) με κύρια τελικά προϊόντα το γαλακτικό και οξικό οξύ, την αιθανόλη και τέλος το διοξείδιο του άνθρακα από τις εξόζες (Paramithiotis & Drosinos 2017).

(3) Τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια (facultative heterofermentative). Σε αυτήν την τρίτη και τελευταία κατηγορία οι μικροοργανισμοί ζυμώνουν εξόζες μέσω του EMP μονοπατιού καθώς και πεντόζες και γλυκονικό οξύ μέσω της οδού 6-PO/ PK. Από τους παραπάνω, ο μεταβολισμός των ετεροζυμωτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι αυτός που έχει μελετηθεί εκτενώς, λόγω της σημασίας του στην παρασκευή του προζυμίου.

Εκτός της γλυκόζης, εξόζες εισέρχονται σε αυτά τα μονοπάτια σε επίπεδο γλυκόζης - 6-φωσφορικό ή της φρουκτόζης-6-φωσφορικό μετά από ισομερισμό ή/ και φωσφορυλίωση. Δισακχαρίτες διασπώνται από συγκεκριμένες υδρολάσες ή/και φωσφοϋδρολάσες σε μονοσακχαρίτες και έτσι εισέρχονται σε αυτά τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια που αναφέρονται παραπάνω. Όσον αφορά τις πεντόζες, αυτές φωσφορυλιώνονται και μετατρέπονται σε ριβουλόζη-5-φωσφορικό ή σε ξυλουλόζη-5-φωσφορικό από ισομεράσες ή επιμεράσες και στην συνέχεια μεταβολίζονται μέσω του κατώτερου μισού του 6- PG/ PK μονοπατιού.

Η χρησιμοποίηση των πεντοζών δεν περιορίζεται για τα οξυγαλακτικά βακτήρια που έχουν συστατικό φωσφοκετολάση (ένζυμο «κλειδί» για το 6-PG/ PK μονοπάτι) (υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά). Προαιρετικά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία ζυμώνουν εξόζες μέσω της γλυκόλυσης - λόγω του ότι διαθέτουν συστατικό μία 1,6 - διφωσφορικό φρουκτόζη αλδολάση (βασικό ένζυμο της γλυκόλυσης) - ζυμώνουν τις πεντόζες με τον ίδιο τρόπο όπως τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά είδη. Η ζύμωση των πεντοζών αυτών οδηγεί στην παραγωγή ισομοριακών ποσοτήτων γαλακτικού και οξικού οξέος - χωρίς την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Τέλος, τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια δεν μπορούν να ζυμώσουν πεντόζες (Corsetti & Settanni, 2006).

1.5.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (EPS)

Ο σχηματισμός εξωπολυσακχαριτών είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα που βρίσκουμε σε πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια, κυρίως στα ετεροζυμωτικά, που υπάρχουν στο προζύμι και συνθέτουν ομοπολυμερή της γλυκάνης και της φρουκτάνης (Vogel και συν., 2011).

Ως εξωπολυσακχαρίτες (EPS) ορίζονται οι βακτηριακοί πολυσακχαρίτες που εκκρίνονται στο περιβάλλον. Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνουμε δύο τάξεις EPS, τους εξωκυτταρικά συντιθέμενους ομοπολυσακχαρίτες (HoPS) και τους ετεροπολυσακχαρίτες (HePS) (Tieking & Ganzle, 2005). Οι HoPS αποτελούνται από ένα μόνο τύπο μονοσακχαρίτη και συντίθενται από εξωκυτταρική γλυκάνη και φρουκτοζυλοτρανσφεράσες, χρησιμοποιώντας σακχαρόζη ως δότη γλυκοζυλίου. Από τις δύο κατηγορίες, η πρώτη είναι αυτή που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία της αρτοποιίας για βελτίωση της δομής του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από τα βακτήρια του προζυμιού επηρεάζουν το ιξώδες του. Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια των προζυμιών δεν έχει βρεθεί να παράγουν HePS (Vogel και συν., 2002).

1.5.5 ΟΞΙΝΙΣΗ

Η ζύμωση που λαμβάνει χώρα στο προζύμι βασίζεται τόσο στο γαλακτικό οξύ όσο και αλκοολική ζύμωση, που εξαρτάται από τη σύνθεση της μικροχλωρίδας και τις συνθήκες ζύμωσης. Οι τυπικές τιμές pH και TTA ενός προζυμιού κυμαίνονται από 3,6 - 3,8 και 8 - 13 αντίστοιχα (Brummer & Lorenz, 1991).

Ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει την οξίνιση είναι η ποσότητα των ζυμούμενων υδατανθράκων. Τα λευκά αλεύρα έχουν πολύ μικρές ποσότητες ελεύθερων σακχάρων,

περίπου 1,55 -1,84% (σακχαρόζη, μαλτόζη, γλυκόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και ολιγοσακχαρίτες) ωστόσο η ενδογενής α-αμυλάση, κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, αυξάνει τα αρχικά επίπεδα μαλτόζης κατά δέκα με δεκαπέντε φορές. Τα διάφορα αυτά σάκχαρα που χρησιμοποιούνται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ποικίλουν τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο στελέχους του βακτηρίου (Martínez-Anaya, 2003). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απαντώνται πιο συχνά στο προζύμι, έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν κυρίως πεντόζες, εξόζες, τη σακχαρόζη και τη μαλτόζη. Πιο συγκεκριμένα, το *Lb. sanfranciscensis* έχει την ικανότητα ζύμωσης της μαλτόζης και ειδικότερα, υδρολύει τη μαλτόζη και συσσωρεύει τη γλυκόζη (με τελική μορική αναλογία 1:1). Άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται γρηγορότερα σε μαλτόζη παρά σε γλυκόζη. Το *Lb. plantarum* προτιμά τη μαλτόζη και τη γλυκόζη και όχι την φρουκτόζη και ζυμώνει ασθενώς τη σακχαρόζη (De Vuyst & Neysens, 2005).

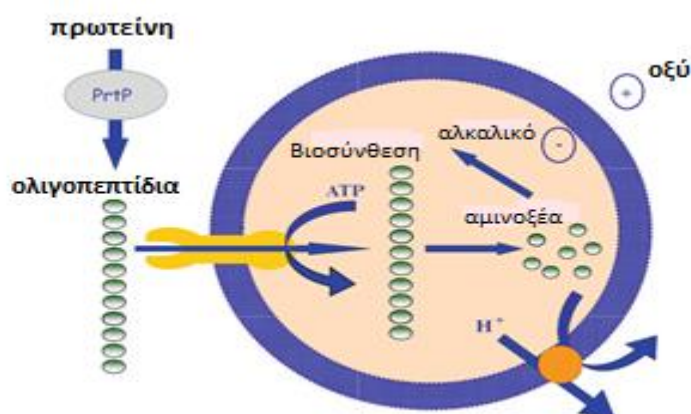
Όμως, το προζύμι εκτός από οξυγαλακτικά βακτηρία περιέχει συνήθως και ζύμες που φαίνεται να επηρεάζουν την παραγωγή οξέων κατά τη ζύμωση και συγκεκριμένα να μειώνουν την παραγωγή των οξέων αυτών. Τέλος, η παραγωγή οξέων εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως ο χρόνος, η θερμοκρασία κατά τη ζύμωση αλλά και η απόδοση της ζύμης. Ως βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη των λακτοβάκιλλων είναι 30 - 40 °C, ανάλογα με το στέλεχος και για τις ζύμες 25-27 °C (Vilanova και συν. 2015). Σε γενικές γραμμές, η υψηλότερη θερμοκρασία, η υψηλότερη περιεκτικότητα του προζυμιού σε νερό, αλλά και η χρήση αλεύρου ολικής αλέσεως αυξάνει την παραγωγή οξέων στο προζύμι (Lorenz & Brummer 2003).

1.5.6 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια όπως έχει ήδη αναφερθεί έχουν πολύ σημαντικό ρόλο κατά την ζύμωση στο προζύμι. Πέρα από την οξίνιση, σημαντική είναι και η πρωτεολυτική τους δράση – αφού σύμφωνα με τον Gerez και συν. (2006) μέσω αυτής απελευθερώνουν αμινοξέα και μικρά πεπτίδια που προωθούν την αύξηση και τη μεταβολική δραστηριότητα άλλων μικροοργανισμών και ταυτόχρονα ενισχύουν τη γεύση αλλά και διάφορες ρεολογικές παραμέτρους.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την διαδικασία της ζύμωσης στο ζυμάρι, αρχικά η πρωτεολυτική δραστηριότητα είχε αποδοθεί στα ενδογενή ένζυμα του αλεύρου, όπως η αμινοπεπτιδάση (AP), η καρβοξυλοπεπτιδάση και η ενδοπεπτιδάση (EP). Στην συνέχεια, βρέθηκε ότι η πρωτεολυτική δραστηριότητα ήταν υψηλότερη σε προζύμια απ' ότι σε απλά ζυμάρια ή σε ζυμάρια χωρίς εναρκτήρια καλλιέργεια μικροοργανισμών (Rollan και συν., 2005). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αποτελούν την κύρια ενδογενή

μικροχλωρίδα των προζυμιών αυτών συμβάλλουν στην συνολική πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δημιουργώντας ιδανικές συνθήκες για να δράσουν οι πρωτεϊνάσες των δημητριακών. Πιο αναλυτικά, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η πρωτεολυτική δραστηριότητα οξυγαλακτικών βακτηρίων απελευθερώνει μικροπεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα, που είναι σημαντικά για την ταχεία μικροβιακή ανάπτυξη, για την οξίνιση, αλλά αποτελούν και πρόδρομους ανάπτυξης της γεύσης και του φουσκόματος του τελικού προϊόντος. Ακόμα, λόγω της υψηλής πρωτεολυτικής τους δράσης τα οξυγαλακτικά βακτήρια συμβάλλουν στην υδρόλυση των πρωτεϊνών σίτου. Τέλος, η πρωτεολυτική δραστηριότητα μπορεί να λειτουργήσει και ως εργαλείο για τη μείωση κάποιων αλλεργιογόνων ενώσεων που προέρχονται από τη γλουτένη (όπως οι γλιαδίνες) που σχετίζονται με την κοιλιοκάκη και βρίσκονται σε τρόφιμα που ψήνονται και έχουν ως βάση τα σιτηρά (Di Cagno και συν., 2002).



Εικόνα 12: Πρωτεολυτικό σύστημα οξυγαλακτικών βακτηρίων, PrtP, CEP (Gänze & Gobbetti, 2013).

1.5.7 ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Η λιπολυτική δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά την διάσπαση λιπιδίων υπό αερόβιες συνθήκες, κατά την διαδικασία της ζύμωσης. Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος των λακτοβάκιλλων στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων – όπως το ψωμί από προζύμι- έχει μελετηθεί εκτενώς, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τις λιπάσες που παράγονται από *Lactobacillus* spp. (Ganzle & Gobbetti 2013, Dincer & Kivanc 2018). Αποτελέσματα από τις πρώτες μελέτες, που σχετίζονται με μεθόδους ανίχνευσης της δραστηριότητας λιπάσης, δείχνουν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έχουν πολύ χαμηλή λιπολυτική δράση (Vogel και συν., 1990).

Ωστόσο, μερικές πρόσφατες έρευνες ανέφεραν ότι ορισμένα στελέχη που ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως το *Lb. plantarum*, έχουν σημαντική λιπολυτική δραστηριότητα και οι λιπάσες αυτών εμπλέκονται στην ανάπτυξη της γεύσης

και του αρώματος σε ζυμούμενα αλλαντικά, σε ψωμί με προζύμι και σε άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (Dincer & Kivanc 2018, Esteban-Torres και συν., 2015, De Fatima Silva Lopes και συν., 2002).

1.5.8 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά την παραγωγή και την διατήρηση των προϊόντων αρτοποιίας είναι η επιμόλυνση τους με σπόρια του γένους *Bacillus* (κυρίως *Pichia* και *Zygosaccharomyces*), τα οποία επιβιώνουν του ψησίματος, αποικίζουν την επιφάνεια επηρεάζοντας οργανοληπτικά το τελικό προϊόν, αλλά κυρίως η επιμόλυνση από είδη του γένους *Penicillium*, *Aspergillus* και *Cladosporium* τα οποία ευθύνονται για την ανάπτυξη μούχλας. Αυτά επηρεάζουν εξίσου οργανοληπτικές ιδιότητες στα προϊόντα αρτοποιίας, αλλάζουν το χρώμα και σε ορισμένες περιπτώσεις, συνθέτουν μυκοτοξίνες (Gänze & Gobbetti, 2013). Η χρήση χημικών συντηρητικών είναι ένας τρόπος πρόληψης και προστασίας από τα σχεδόν 40 είδη μυκήτων που έχει αποδειχθεί ότι επιμολύνουν προϊόντα αρτοποιίας. Όμως τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν μια σειρά φυσικών βιοπροστατευτικών (biopreservatives) χαρακτηριστικών που μπορούν αν όχι να υποκαταστήσουν την χρήση των χημικών συντηρητικών, να δράσουν συμπληρωματικά σε αυτά (Gänzle & Ripari, 2016).

Η αντιμικροβιακή αυτή φύση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή οξέων, όπως το γαλακτικό και το οξικό, καθώς και του προπιονικού, σορβικού και βενζοϊκού οξέος, Επίσης έχει συσχετιστεί και με την παραγωγή άλλων ανασταλτικών ουσιών, παραγόμενων σε μικρότερες ποσότητες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, η αιθανόλη αλλά και με φαινολικές και πρωτεϊνικές ενώσεις (Cizeikiene και συν. 2013). Τέλος, μερικά στελέχη (*Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, και *Lb. plantarum*) είναι ικανά να συνθέσουν αντιμικροβιακές ουσίες τις βακτηριοσίνες. Οι δύο βακτηριοσίνες που έχουν βρεθεί να παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια είναι η νισίνη και η διπλοκοκκίνη (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

1.5.9 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Τα κυριότερα είδη υπεύθυνα για εμφάνιση της γνωστής μούχλας στα ζυμούμενα τρόφιμα υπάγονται στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, και *Mucor* (Batish και συν., 1997). Κάποια είδη που περιλαμβάνονται στα παραπάνω εκτός από την προφανή αλλοίωση του τροφίμου, έχουν την ικανότητα να παράγουν επιβλαβείς ουσίες τις μυκοτοξίνες (Garofalo και συν., 2012).

Έτσι, ενώ υπάρχουν πολλές μελέτες για την παραγωγή αντιβακτηριακών ενώσεων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ο μηχανισμός παραγωγής αντιμυκητιακών ενώσεων έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο (Magnusson & Schnurer, 2001), (Batish και συν., 1997), (Bullerman και συν., 2006). Η πλειοψηφία των αντιμικροβιακών ουσιών που έχουν απομονωθεί από τα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται να είναι δραστικές κυρίως ενάντια σε βακτήρια (Batish και συν., 1997), όμως διάφοροι παραγόμενοι μεταβολίτες και οξέα όπως το γαλακτικό, το φαινυλ-γαλακτικό φαίνεται να έχουν αντιμυκητιακή δράση σε προϊόντα παραγόμενα από δημητριακά (Russo και συν., 2017).

Σύμφωνα με τον Hui και συν. (2004), παρεμποδιστική δράση ενάντια σε μύκητες που δημιουργούν μούχλες παρουσιάζουν τα παραγόμενα από τα οξυγαλακτικά βακτήρια οξέα και πιο συγκεκριμένα το οξικό και το προπιονικό. Αυτά παρουσιάζουν ακόμα υψηλότερη δραστικότητα όταν το pH είναι σε χαμηλές τιμές και όχι σε ουδέτερες. Από τα δύο αυτά οξέα, το πρώτο παρουσιάζει ευρύτερο φάσμα δράσης, με παρεμποδιστικές δράσεις ενάντια σε ζύμες, μύκητες και βακτήρια, ενώ το δεύτερο φαίνεται να έχει ισχυρή παρεμποδιστική δράση ενάντια σε μύκητες που μιαίνουν τα προϊόντα αρτοποιίας.

1.6 ΣΗΜΑΣΙΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η ποιότητα ενός ψωμιού συνίσταται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες όπως, την γεύση, το άρωμα, την υφή, την θρεπτική του αξία αλλά και την διατηρησιμότητά του. Έτσι, για να επιτευχθεί υψηλής ποιότητας τελικό προϊόν η βιομηχανία χρησιμοποιεί συνήθως πρόσθετα αλλά και συντηρητικά (Smith 1993).

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το προζύμι, ως ενδιάμεσο προϊόν της αρτοποιίας, το οποίο επηρεάζει πολλές πτυχές της ποιότητας του τελικού προϊόντος και ικανοποιεί και μία επιπλέον ανάγκη των καταναλωτών, αυτή για μειωμένη χρήση πρόσθετων και συντηρητικών στο ψωμί (Leroy & De Vuyst, 2004).

Η συμβολή λοιπόν του προζυμιού στην ποιότητα του ψωμιού είναι πολύ σημαντική. Λόγω της αλληλεπίδρασης των ζυμών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων που αποτελούν τη μικροχλωρίδα του προζυμιού αλλά και λόγω του μεταβολισμού αυτών, παρουσιάζεται βελτίωση στις διάφορες ιδιότητες του αλεύρου, στην δομή, στη γεύση, στο άρωμα αλλά και στην διάρκεια ζωής του ψωμιού (Petel και συν., 2017).

1.6.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΨΩΜΙΟΥ

Το προζύμι έχει θετική επίδραση στην θρεπτική αξία του ψωμιού. Στοιχεία υποδεικνύουν ότι είναι μια καλύτερη πηγή μαγνησίου, σιδήρου και ψευδαργύρου σε σύγκριση με τα ψωμιά που παράγονται με άλλους τρόπους (Chaouia και συν., 2006).

Εξίσου σημαντική φαίνεται να είναι και η περιεκτικότητα των δυο ισομερών του γαλακτικού οξέος στο προζύμι. Πιο αναλυτικά, το ψωμί που παράγεται με τη χρήση προζυμίου εμφανίζει αυξημένη περιεκτικότητα στο D - γαλακτικό οξύ, παράλληλα ο ανθρώπινος οργανισμός φαίνεται να το μεταβολίζει σε αργούς ρυθμούς. Η περιεκτικότητα αυτή εξαρτάται τόσο από την μικροχλωρίδα του προζυμίου όσο και από το χρόνο ζύμωσης. Το *Lb. plantarum* είναι ένα κοινό είδος οξυγαλακτικού βακτηρίου σε προζύμι και παράγει μεγάλες ποσότητες του ισομερούς αυτού του γαλακτικού οξέος. Όσον αφορά το L - γαλακτικό οξύ, μεγαλύτερη αναλογία παρατηρείται κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης από κάποιους μικροοργανισμούς και το D - γαλακτικό οξύ παρατηρείται μόνο όταν υπάρχει αρκετά μεγάλη μείωση του pH (Paramithiotis, 2001).

Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει και η ζύμωση που λαμβάνει χώρα στο προζύμι. Αυτή επηρεάζει την διατροφική αξία του ψωμιού, είτε βελτιώνοντας την υφή και δίνοντας ευχάριστη γεύση, είτε σταθεροποιώντας ή/ και αυξάνοντας το επίπεδο διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων. Επιπροσθέτως, μειώνοντας τη βιοδραστικότητα του αμύλου και δημιουργώντας έτσι προϊόντα με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη (Katina και συν., 2005). Επίσης, σημαντική επίδραση έχει και η οξίνιση του προζυμίου από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αφού αυξάνει τα επίπεδα κάποιων βιοδραστικών ενώσεων – όπως φαινολικές ενώσεις.

Επιπλέον, μέσω της οξίνισης αυξάνεται η διαλυτότητα του μαγνησίου και του φωσφόρου που έχουν βρεθεί να είναι προστατευτικοί παράγοντες της β - γλυκάνης στο ψωμί. Επίσης, οργανικά οξέα όπως αυτά που παράγονται κατά τη γαλακτική ζύμωση στο προζύμι, συσχετίζονται με τις μεταγευματικές γλυκαιμικές αποκρίσεις. Τέλος, η παρουσία του γαλακτικού οξέος κατά τη θερμική επεξεργασία προωθεί τις αλληλεπιδράσεις του αμύλου και της γλουτένης μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα του πρώτου και εν συνεχεία του γλυκαιμικού δείκτη του τελικού προϊόντος (Nionelli & Rizzello 2016).

1.6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΥΦΗ, ΔΟΜΗ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια του προζυμίου επηρεάζουν μέσω του βαθμού οξίνισης τους, τη διαλυτότητα διαφόρων συστατικών του ψωμιού που σχετίζονται με τη δομή

του. Δηλαδή, τη γλουτένη, το άμυλο, τις αραβοξιλάνες κ.ά., καθώς και τη δραστικότητα κάποιων ενδογενών ενζύμων. Επίσης ο βαθμός οξίνισης τους επηρεάζει και το πώς θα «συμπεριφερθεί» το ζυμάρι κατά την ανάμειξη των συστατικών του – σύμφωνα με τον Hosenev, (1994) σε χαμηλό pH επιτυγχάνεται μικρότερος χρόνος ανάμειξης αλλά και μικρότερη σταθερότητα σε σύγκριση με μία απλή ζύμη.

1.6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΓΕΥΣΗ & ΣΤΟ ΑΡΩΜΑ

Η γεύση και το άρωμα των αρτοποιητικών προϊόντων αποτελεί έναν από τους κύριους λόγους επιλογής τους από τους καταναλωτές. Το γευστικό αποτέλεσμα ενός αρτοποιητικού προϊόντος δημιουργείται τόσο από τα συστατικά αυτού, όσο και από τις συνθήκες κατά τη ζύμωση και τη διαδικασία ψησίματος. Σύμφωνα με τους Hansen & Schieberle, (2005), η διαδικασία του ψησίματος που επιλέγεται κάθε φορά, επηρεάζει κυρίως το άρωμα της κόρας ενώ η ζύμωση του ζυμαριού είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του αρώματος της ψίχας. Άλλος ένας παράγοντας που επιδρά στα δύο αυτά χαρακτηριστικά είναι η γεωγραφική προέλευση του προϊόντος άρα και τον συστατικών και της μικροβιακής χλωρίδας που αναπτύσσεται. Παρόλο που τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο άρωμα του τελικού προϊόντος δίνει το ψήσιμο (Schieberle, 1996), η ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια στο προζύμι έχει αποδειχθεί αναγκαία για την επίτευξη ποιοτικής γεύσης και αρώματος.

Πιο αναλυτικά, η ζύμωση των διαλυτών υδατανθράκων, ο μεταβολισμός αζωτούχων ενώσεων, αλλά και η παραγωγή πτητικών ενώσεων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια στο προζύμι, επηρεάζουν έμμεσα ή άμεσα τη γεύση του τελικού αρτοποιητικού προϊόντος (Heiniö, 2014).

1.6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ

Η χρήση προζυμιού με οξυγαλακτικά βακτήρια που παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει το χρόνο ζωής του τελικού προϊόντος – εξασφαλίζοντας ένα μικροβιακά ασφαλές τρόφιμο - και ικανοποιώντας ταυτόχρονα την απαίτηση των καταναλωτών για απαλλαγμένα από συντηρητικά προϊόντα. Έχει παρατηρηθεί ότι ένας αριθμός αντιμυκητιακών μεταβολιτών όπως κάποια οργανικά οξέα (οξικό, καπροϊκό και φορμικό οξύ), κυκλικά διπεπτίδια, φαινυλ-γαλακτικό οξύ, πρωτεϊνικές ενώσεις αλλά και υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα πιθανών να συντίθενται από οξυγαλακτικά βακτήρια, που αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του προζυμιού, και να δρουν ενάντια στους μύκητες που δημιουργούν τη γνωστή μούχλα

στο ψωμί (Messens & De Vuyst, 2002). Πιο συγκεκριμένα, η παρεμποδιστική αυτή δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται στην ταχεία κατανάλωση οξυγόνου και ζυμούμενων υδατανθράκων και στον σχηματισμό του γαλακτικού οξέος με ταυτόχρονη μείωση του pH. Επιπροσθέτως, διάφοροι μεταβολίτες των βακτηρίων όπως το διακετύλιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οξικό οξύ και λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και 3-υδροξυ-προπανάλη (reuterin), παρουσιάζουν εξειδικευμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες (Gobbetti & Ganzle, 2013).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη μεταβολικών δραστηριοτήτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων του είδους *Lb. plantarum*, που προέρχονται από ζυμώσεις αλλαντικών, λαχανικών (κουνουπιδιού) αλλά και προζυμιών και σχετίζονται με την παραγωγή προζυμιών. Τέτοιες ήταν η δραστικότητα λιπασών, πρωτεασών και φυτάσης, η ικανότητα οξίνισης του ζυμαριού από τα οξυγαλακτικά βακτήρια καθώς και η ικανότητα τους να παράγουν αντιμυκητιακές ενώσεις με τελικό στόχο την επιλογή στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες-εκκινητές στην προετοιμασία προζυμιών για την παρασκευή ψωμιού.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 78 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από την συλλογή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πιο αναλυτικά, τα μελετηθέντα στελέχη είναι οξυγαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στο είδος *Lactobacillus plantarum* και έχουν απομονωθεί από ζυμώσεις κουνουπιδιού, αλλαντικών και προζυμιού (Πινάκας 3). Οι μικροοργανισμοί συντηρούνταν στους -20 °C σε nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου. Καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, για τα οξυγαλακτικά βακτήρια που μελετώνται πραγματοποιείται ανανέωση των στελεχών σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth (LAB M, UK) καθώς και έλεγχος καθαρότητας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar (LAB M, UK), υπό ασηπτικές συνθήκες, που αναλύονται παρακάτω (πργ. 2.3.1 και 2.3.2).

Πίνακας 3: Μικροβιακά στελέχη και πηγή προέλευσης.

Στέλεχος	Είδος οξυγαλακτικού βακτηρίου και πηγή απομόνωσης
LQC 7	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 13	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 17	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 46	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 69	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 92	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 95	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 169	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 228	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)

LQC 230	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 233	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 713	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 731	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 740	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 748	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 759	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 761	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 764	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 771	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 788	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 789	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 794	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 808	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 810	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 843	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 853	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 879	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 882	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 883	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 897	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 938	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 940	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 941	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)

LQC 957	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 1638	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1641	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1644	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1670	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1673	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1680	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1685	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1690	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1693	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1698	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1704	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1705	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1706	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1924	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1928	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1932	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1933	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1936	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1938	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1939	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1940	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1941	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)
LQC 1942	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)

LQC 1943	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1944	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1945	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1946	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1947	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1949	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1950	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1957	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1958	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1960	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1966	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1975	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1976	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1977	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1978	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1979	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1980	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1981	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1982	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1983	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1984	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)

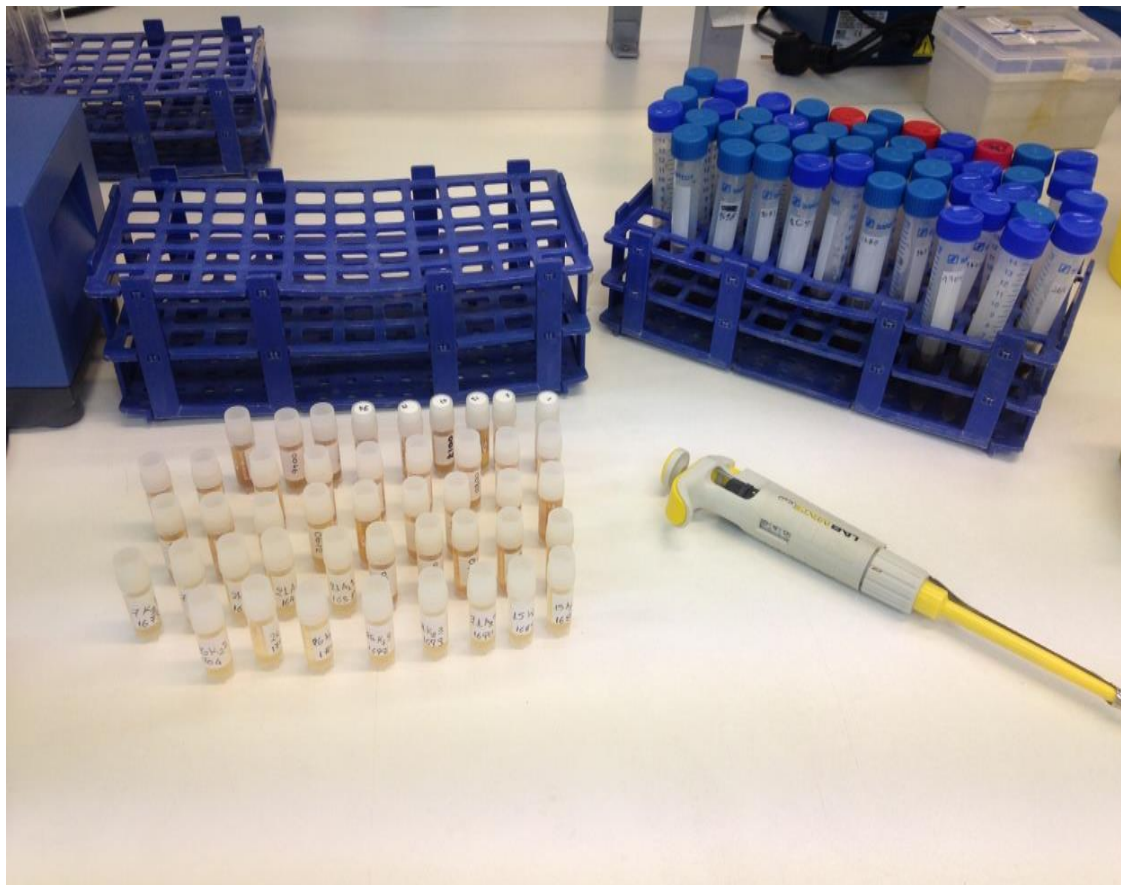
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε αυτήν την παράγραφο αναλύεται η πειραματική διαδικασία, που ακολουθείται για την αξιολόγηση διαφόρων ιδιοτήτων των μικροοργανισμών, καθώς και οι χειρισμοί

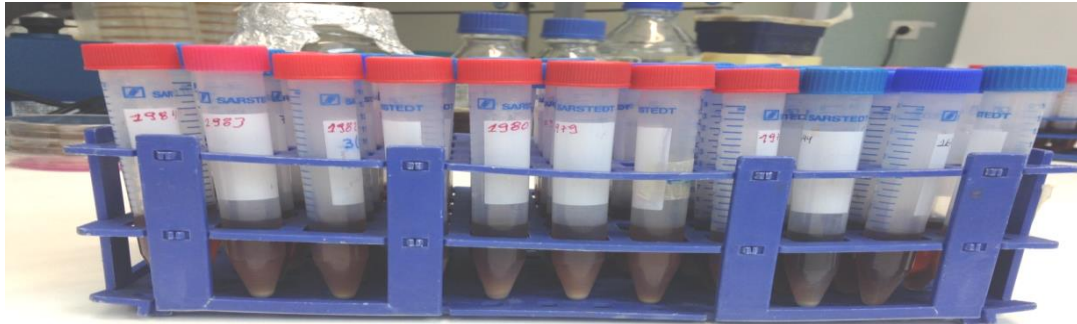
που αφορούν τους μικροοργανισμούς – αυτοί παρουσιάζονται συνοπτικά και στο Σχήμα 1.

2.2.1 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Το αρχικό αυτό στάδιο μεσολαβεί πριν από το έλεγχο της καθαρότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία και πραγματοποιείται προκειμένου να ανακτήσουν οι μικροοργανισμοί τη ζωτικότητα τους (resuscitation). Η ανανέωση πραγματοποιείται με την χρήση υγρού θρεπτικού υποστρώματος στο οποίο ενοφθαλμίζονται τα επιλεγμένα βακτήρια. Συγκεκριμένα, ποσότητα ενοφθαλμίσματος 40 μ L, περίπου το 1 % του τελικού όγκου, μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες με τη χρήση πιπέτας σε περιέκτες τ. Falcon® με 4 mL MRS broth (Εικόνα 13). Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση τους στους 30 °C για 48 με 72 h.



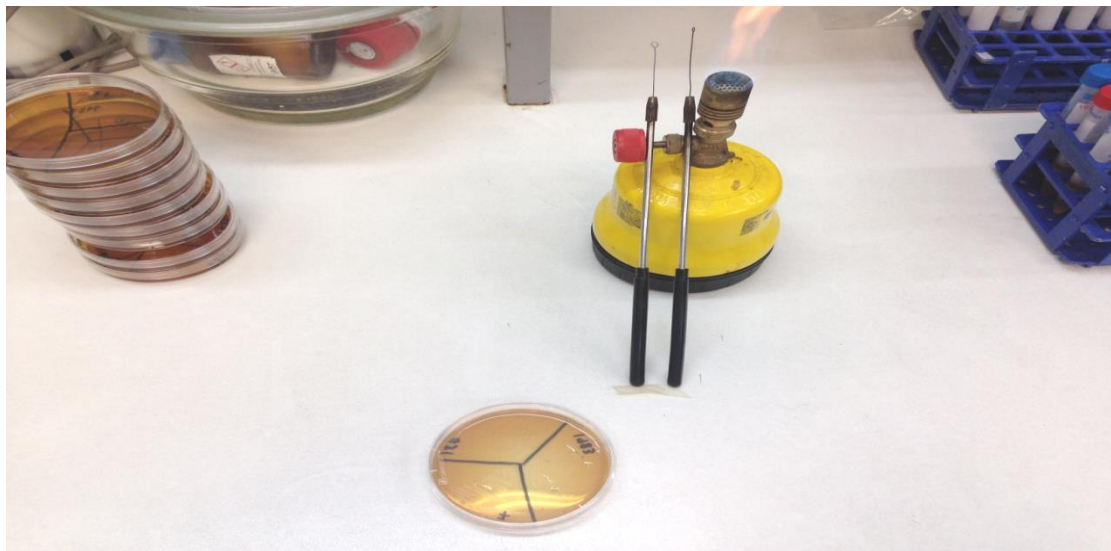
Εικόνα 13: Διαδικασία ανανέωσης στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων.



Εικόνα 14: Ανεπτυγμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων μετά από επώαση (48-72 h, 30 °C).

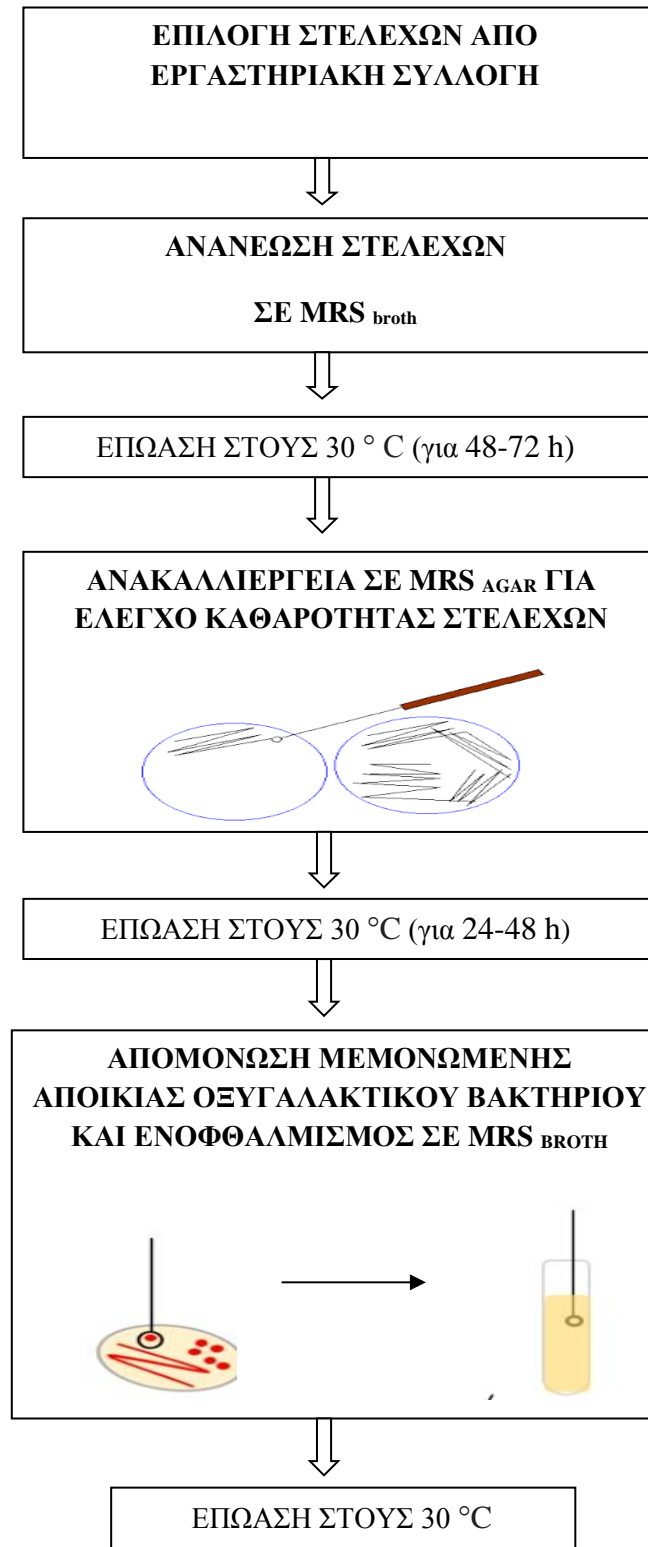
2.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Μετά την διαδικασία της ανανέωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και πριν την έναρξη των διαφόρων πειραμάτων, ακολουθεί έλεγχος της καθαρότητας των στελεχών για αποφυγή επιμολύνσεων. Για την διεξαγωγή του ελέγχου χρησιμοποιείται η μέθοδος γραμμικής εξάπλωσης τρυβλίων με μικροβιολογικό κρίκο (streaking), υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τρυβλίο με MRS agar (Εικόνα 15). Στην συνέχεια τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C για 24 με 48 h.



Εικόνα 15: Μέθοδος γραμμικής εξάπλωσης τρυβλίων με μικροβιολογικό κρίκο υπό ασηπτικές συνθήκες.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΠΕΙΡΑΜΑ



Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής της προετοιμασίας των μικροβιολογικών στελεχών – ανανέωση, επώαση και έλεγχος καθαρότητας.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD – PCR

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA από τα κύτταρα εφαρμόζοντας ήπια λύση των κυττάρων καθώς και την ποσοτικοποίηση του εξαγόμενου DNA. Η αποδιάταξη του κυτταρικού περιβλήματος πραγματοποιήθηκε με τη μηχανική μέθοδο των υπερήχων, (5min, 50W) προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν την έκβαση της πειραματικής διαδικασίας.

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης ηλεκτροφορούνται, χρωματίζονται και τα στελέχη ομαδοποιούνται (cluster analysis) με βάση τις ομοιότητες που εμφανίζουν οι ηλεκτροφορητικές τους ζώνες. Τα στάδια αυτά αναλυτικά περιγράφονται στη συνέχεια.



Εικόνα 16: Μηχανική λύση κυττάρων με υπερήχους (Χουρζαμανογλου, 2008).

2.3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Η μέθοδος περιλαμβάνει αναλυτικά τα εξής βήματα:

- Αιώρηση βιομάζας σε 1mL διαλύματος 1M sorbitol 0.1M EDTA, pH 7.5
- Ήπια λύση με χρήση υπερήχων και επώαση στους 37 ° C για 2 ώρες.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές για 10 λεπτά, απόρριψη υπερκείμενου και διάλυση ιζήματος σε 0.5 mL διαλύματος 50 mM Tris – HCl, 20 mM EDTA, pH 7.4
- Προσθήκη 50 μL 10 % SDS και επώαση στους 65 ° C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη 0.2 mL οξικού καλίου 5M (καθίζηση των πρωτεϊνών) και μεταφορά σε πάγο για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf .
- Προσθήκη 0.5 mL ισοπροπανόλης και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (καθίζηση του DNA).

- Φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές για 10 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση ιζήματος σε 0.5 mL 70% αιθανόλης (επανάληψη αυτού του βήματος και δεύτερη φορά).
- Φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές για 5 λεπτά και καλή απομάκρυνση της αιθανόλης με μικροπιπέτα. Αιώρηση σε 50 mL απιονισμένου νερού και απομάκρυνση υπερκειμένου. Παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να εξατμιστεί η περίσσεια της αιθανόλης.
- Συντήρηση στους -20°C .

2.3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA

Για να εξακριβωθεί αν το DNA ήταν ικανοποιητικό τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά μετράται η απορρόφηση στα 260 nm και 280 nm σε φασματοφωτόμετρο. Η τιμή της απορρόφησης στα 260 nm (ενδεικτική της ποσότητας του DNA) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA (επιθυμητά όρια για την τιμή του A_{260} κυμάνθηκαν από 0.010 ως 1.6, τιμές < 0.010 υποδείκνυαν ότι δεν υπήρχε DNA).

Ο λόγος της απορρόφησης A_{260}/A_{280} nm (ενδεικτικός της ποιότητας του DNA) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA (τιμές < 1.8 έδειχναν αυξημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, ενώ τιμές από 1.8-2.0 υποδείκνυαν καθαρό DNA).



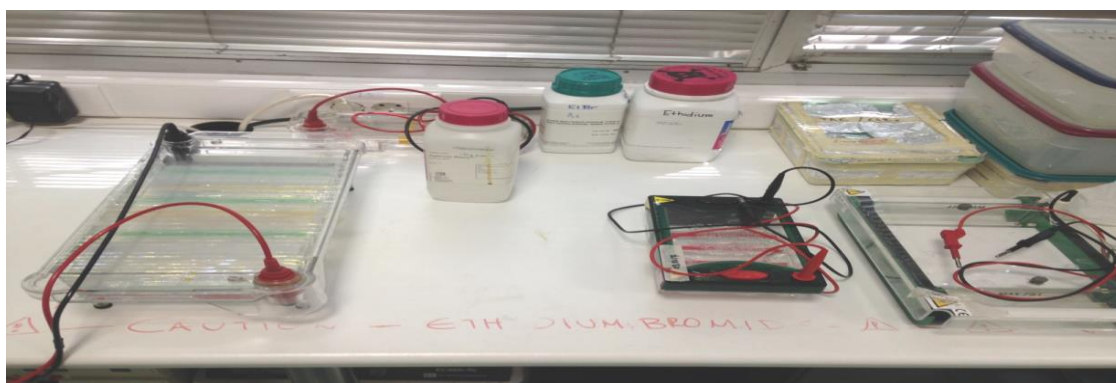
Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο εργαστηρίου Γ.Π.Α

2.3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

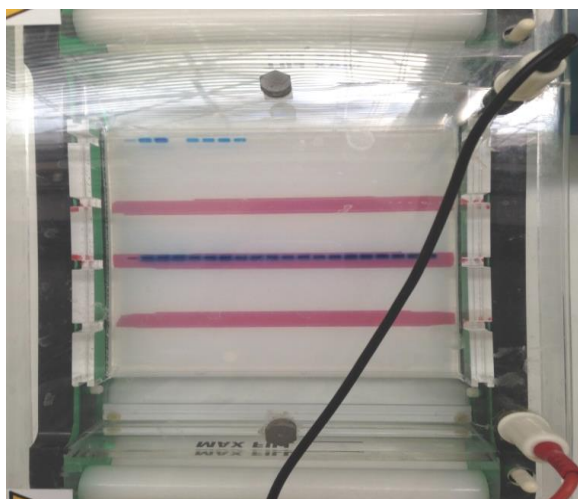
Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωλήνες Eppendorf σε τελικό όγκο 20 μL που αποτελούνταν από 1 μL από το DNA του κάθε δείγματος καθώς και 0.2 mM dNTPs (Peqlab, Erlangen, Germany), 2.5 mM MgCl_2 , 1.5 μM εκκινητή UBC155 (5'-CTGGCGGCTG-3') και 2 UΤaq πολυμεράση (Biotools, Madrid, Spain).

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5%) σε TAE buffer (Tris/Acetate/EDTA) (Εικόνα 15). Πιο αναλυτικά, για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αγαρόζη σε σκόνη με ρυθμιστικό διάλυμα (TAE) και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετείται σε εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα (χτένες), δημιουργώντας τα μικρά βοηθία υποδοχής του δείγματος (πηγαδάκια). Μετά τη στερεοποίηση το προκύπτον πήκτωμα εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Σε κάθε θέση υποδοχής δείγματος εισάγονταν 10 μL προϊόν της RAPD-PCR και 5 μL χρωστικής (Εικόνα 18). Σε μία θέση της πηκτής εισήχθη και ένα πρότυπο μοριακών βαρών (DNA ladder). Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε σταθερή τάση 100 Volt και ολοκληρωνόταν όταν το μέτωπο διένυε 8–9 cm. Οι πηκτές χρωματίζονταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για περίπου 30 min. Στη συνέχεια, οι πηκτές τοποθετούνταν σε απιονισμένο νερό για άλλη περίπου μισή ώρα. Ακολούθως, οι φωτογραφίες σαρώνονταν με χρήση του Gel Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Η μετατροπή, η κανονικοποίηση και η επιπλέον ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκαν με το Bionumerics Software (AppliedMathsNV, Sint-Martens-Latem, Belgium) με συντελεστή Pearson και ανάλυση συμπλέγματος UPGMA.



Εικόνα 18: Συσκευή ηλεκτροφόρησης με πηκτή αγαρόζης.



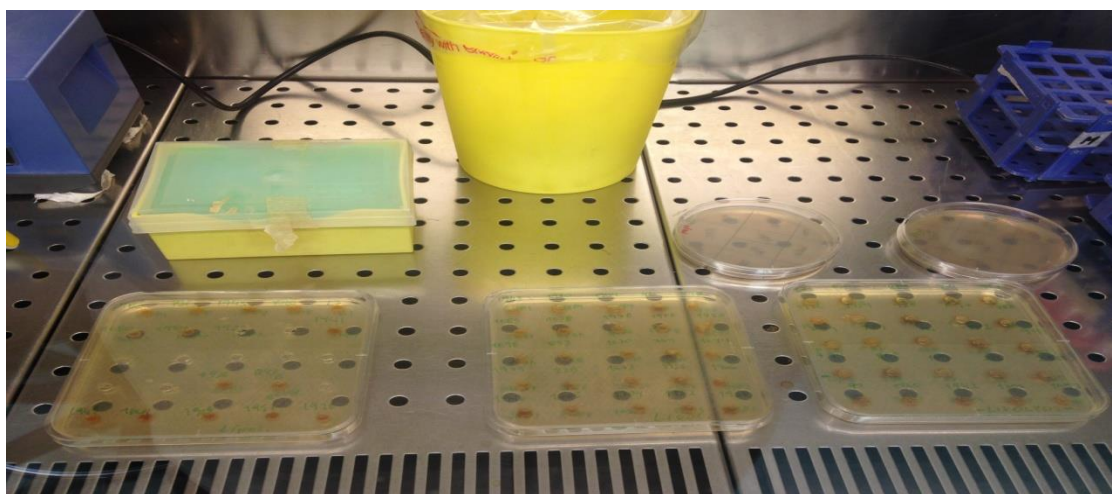
Εικόνα 19: Πηκτή αγαρόζης όπου έχουν εισαχθεί δείγματα.

2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

2.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ

Η πιθανότητα ύπαρξης πρωτεολυτικών ιδιοτήτων στα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων μελετήθηκε με δύο μεθόδους, πρώτα με την τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτής πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE.

Ο προσδιορισμό της ύπαρξης ή όχι πρωτεολυτικής δράσης έγινε σύμφωνα με τον Paramithiotis και συν., (2010) με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay). Αναλυτικότερα, σε τετράγωνα τρυβλία διαστάσεων 15x15 με ειδικό υπόστρωμα για μελέτη πρωτεολυτικής ενεργότητας αποτελούμενο από μεμονωμένα υλικά (0.5% τρυπτόνη, 0.25% εκχύλισμα ζύμης, 0.1% γλυκόζη, 1.5% άγαρ και 1% πρωτεΐνη) ανοίχθηκαν 25 οπές (πηγαδάκια) αφού αυτό είχε σταθεροποιηθεί. Στη συνέχεια 50 μ L υπερκειμένου ανάπτυξης από 24ωρη ενεργή καλλιέργεια κάθε στελέχους, το οποίο έχει υποστεί φυγοκέντρηση (10 min, 3000 rpm, 4 °C) μεταφέρθηκε με πιπέτα σε κάθε πηγαδάκι. Ακολούθως, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 30 °C για 5 ημέρες. Μετά την επώαση, τα τρυβλία υποβλήθηκαν σε χρώση με 0.05% (w/v) Coomassie Blue Brilliant Blue G-250. Μετά το πέρας μίας ώρας ακολούθησε αποχρωματισμός των τρυβλίων με απιονισμένο νερό. Τέλος, ο σχηματισμός διαυγούς ζώνης γύρω από τις αποικίες υποδεικνυε την ύπαρξη πρωτεολυτικής ενεργότητας του αντίστοιχου στελέχους.



Εικόνα 20: Διαδικασία μεταφοράς εμβολίου στα τρυβλία πρωτεόλυσης σε θάλαμο νηματικής ροής.

2.4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ SDS (SDS – PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με SDS αποτελεί μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο μεγάλης διαχωριστικής (αναλυτική) ικανότητας που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα συσσώρευσης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli (1970) το πήκτωμα συσσώρευσης δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις συμπυκνώνει σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Οι δύο βασικοί τύποι της συσκευής ηλεκτροφόρησης είναι ο οριζόντιος και ο κατακόρυφος τύπος. Η κατακόρυφη συσκευή χρησιμοποιείται κυρίως για ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και αυτός ο τύπος χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

2.4.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων και εκχύλιση πρωτεϊνών

Τα στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό ήταν όσα έδειξαν πρωτεολυτική δράση σε επίπεδο τρυβλίου στην δοκιμή που αναφέρεται στην πργ. 2.3.1. Η αρχική προετοιμασία των καλλιιεργειών των βακτηρίων έγινε ως εξής: κάθε

στέλεχος αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και επώαστηκε στους 30 °C για 24 h. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (3500 rpm, 20 min, 4 °C) όπου το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αναμείχθηκε με 5 mL νερού. Ακολούθως, η ποσότητα των 5 mL προστέθηκε σε μίγμα 10 g αλεύρου (τύπου 70%) με νερό που είχε τελικό όγκο 20 mL (αναλογία 1:2-αλεύρι:νερό).

Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών η προετοιμασία των στελεχών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Di Cagno και συν., (2002) με τροποποιήσεις. Ένα γραμμάριο ζύμης αραιώθηκε σε 4 mL 50 mM Tris HCl, παρέμεινε στους 4 °C για 1 h με περιδίνηση (vortex) σε κάθε 15 min και μετά φυγοκεντρήθηκε (3500 rpm, 20 min, 4 °C). Το υπερκείμενο περιείχε αλβουμίνες και γλοβουλίνες (1^ο κλάσμα της γλουτένης), έτσι 1 mL υπερκειμένου μεταφέρθηκε σε Eppendorf στους -20 °C.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ανάμειξη μεταξύ των αλβουμινών, των γλοβουλινών και των γλιαδινών, το ίζημα εκχυλίστηκε περαιτέρω δύο φορές με 50 mM Tris HCl (pH 8.8), και τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν. Μετά την πλύση με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν ιόντα ρυθμιστικού διαλύματος, το ίζημα αραιώθηκε με 4 mL αιθανόλης (75% vol/ vol), και παρέμεινε στους 25 °C για 2 h υπό συνεχή ανάδευση και φυγοκεντρήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Το υπερκείμενο περιείχε τις γλιαδίνες (2^ο κλάσμα της γλουτένης) –έτσι 1 mL υπερκειμένου μεταφέρθηκε σε Eppendorf στους -20 °C. Η εκχύλιση με αιθανόλη επαναλήφθηκε επίσης δύο φορές. Υπολείμματα αιθανόλης απομακρύνθηκαν με επαναιώρηση των ιζημάτων με απιονισμένο νερό και φυγοκέντρηση.

Τέλος, τα ιζήματα αραιώθηκαν με 4 mL μίγματος ουρίας - θειουρίας (7M Urea, 2M Thiourea), που παρέμειναν για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με περιστασιακή περιδίνηση. Μετά το πέρας των 2 h πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση όπως περιγράφεται παραπάνω. Το υπερκείμενο περιείχε τις γλουτενίνες (3^ο κλάσμα της γλουτένης). Όλα τα πρωτεϊνικά κλάσματα, που αποσπάστηκαν με την παραπάνω μέθοδο, διατηρήθηκαν στους - 20 °C.

2.4.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων της Sds-Page

Κατά την Ηλεκτροφόρηση ηηκτηής πολυακρυλαμιδίου (Sds-Page) παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Ακρυλαμίδιο / Δις (30% T, 2,67% C):** ακρυλαμίδιο (29.2 g/ 100 mL), N'N'-δις-μεθυλενο-ακρυλαμίδιο (0.8 g / 100 mL. Φιλτράρισμα και αποθήκευση στους 4 °C στο σκοτάδι.

- **1.5 M Tris-HCl:** βάση Tris (18.15 g / 100 mL), pH 8.8. Αποθήκευση στους 4 °C.
- **0,5 M Tris-HCl:** 6 g βάσης Tris και 60 mL απιονισμένου νερού, pH 6.8. Διατήρηση στους 4 °C.
- **10% (w / v) SDS:** Διάλυση 10 g SDS σε νερό με ήπια ανάδευση.
- **Sample Buffer–Ρυθμιστικό Διάλυμα Δείγματος:** (SDS reducing buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% γλυκερόλη, 2% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.4 mL 0,5% (β / ο) μπλε βρωμοφαινόλης (σε νερό). Αραίωση κάθε δείγματος τουλάχιστον 1:4 με Sample Buffer. Θέρμανση στους 95 °C για 4 min.
- **5 X Electrode (Running) Buffer:** βάσης Tris (15 g/ l), γλυκίνη (72 g/ l), SDS (5 g/ l), pH 8.3.
- **Κολλοειδής χρωστική:** 34% μεθανόλη, 3% φωσφορικό οξύ, 15% θειϊκό αμμώνιο και 0.1% G – 250.
- **Stacking gel/ Πηκτή συσσώρευσης(4.0%) - 0.125 M Tris, pH 6.8:** 6.1 mL απεσταγμένο νερό, 5 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 200μL10% (w/ v) SDS, 2.6 mL Ακρυλαμίδα / Δις (30% stock), 100 μL10% υπερθειικό αμμώνιο (dailyfresh: 0.1g/1mL dH₂O) και 20 μL TEMED.
- **Separating gel/ Πηκτή διαχωρισμού (12%)-0.375 MTris, pH 8.8:** 33.5 mL απεσταγμένο νερό, 25.0 mL 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 1.0 mL 10% (w/ v) SDS, 40 mL Ακρυλαμίδα/ Δις (30% stock), 500μL10% υπερθειικό αμμώνιο (daily fresh: 0.1g/1mL dH₂O) και 50 μL TEMED.

2.4.2.3 Προετοιμασία συσκευής ηλεκτροφόρησης

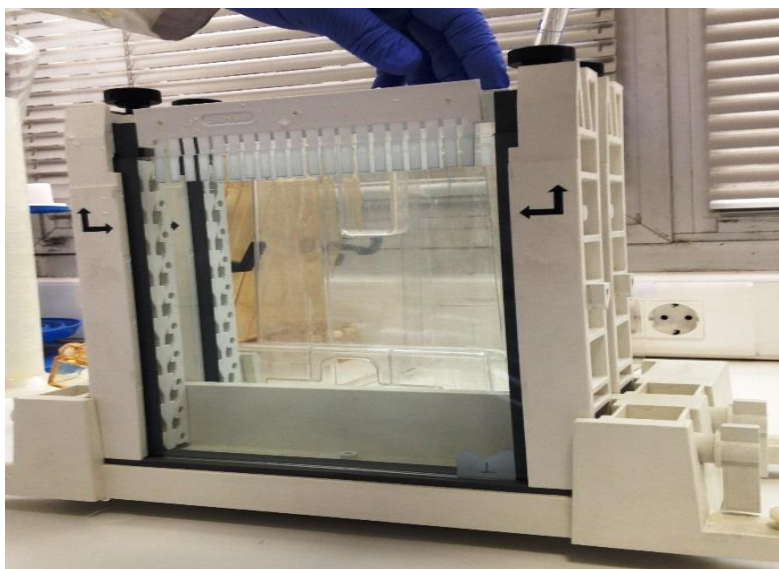
Η συναρμολόγηση της συσκευής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν η πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) και η διαχωριστική πηκτή (separating gel) (πργ. 2.4.2) χωρίς προσθήκη APS και TEMED και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Μετά την παρασκευή της διαχωριστικής πηκτής (separating gel) προστέθηκε APS και TEMED, έγινε ανάμιξη για ένα λεπτό και με πιπέτα των 10 mL προστέθηκαν 28 mL σε κατάλληλη διάταξη για την παρασκευή της πηκτής. Στη συνέχεια, η πηκτή επικαλύφθηκε με 1.2 mL κορεσμένης με νερό ισοβουτανόλης και επωάστηκε στους 30 °C για 1 h.

Μετά το πέρας των 60 min, η ισοβουτανόλη απορρίπτεται και η πηκτική ξεπλένεται με άφθονο απιονισμένο νερό (4 με 5 φορές). Τέλος, το νερό απομακρύνεται πλήρως και οι πλάκες της ηλεκτροφόρησης σκουπίζονται καλά με τη χρήση χαρτιού.

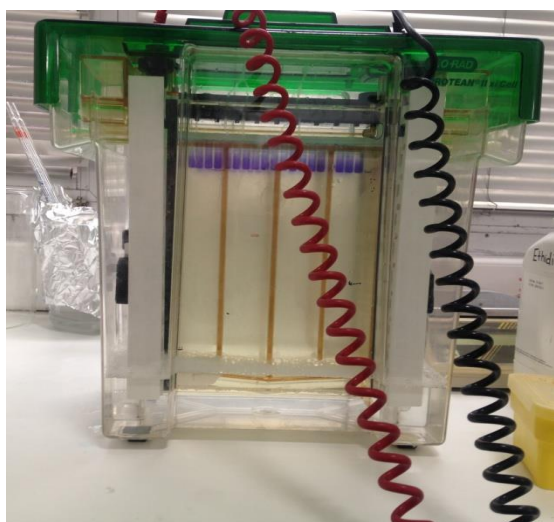
Όμοια με το προηγούμενο, προστέθηκε APS και TEMED και στην πηκτική συσσώρευσης (stacking gel) και έγινε ανάμιξη για ένα λεπτό. Τέλος, η διαχωριστική πηκτική καλύφθηκε από την πηκτική συσσώρευσης με τις χτένες να έχουν ήδη τοποθετηθεί υπό γωνία και τοποθετήθηκε στους 30 °C για 1 h (Εικόνα 21).

Μετά τα 60 min και αφού είχαν σταθεροποιηθεί οι πηκτές, οι χτένες αφαιρέθηκαν και τοποθετήθηκαν στον πυρήνα ψύξης της συσκευής. Ποσότητα δείγματος 10 μ L προστέθηκε στις θέσεις υποδοχής και στην πρώτη θέση προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα ladder για να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση.

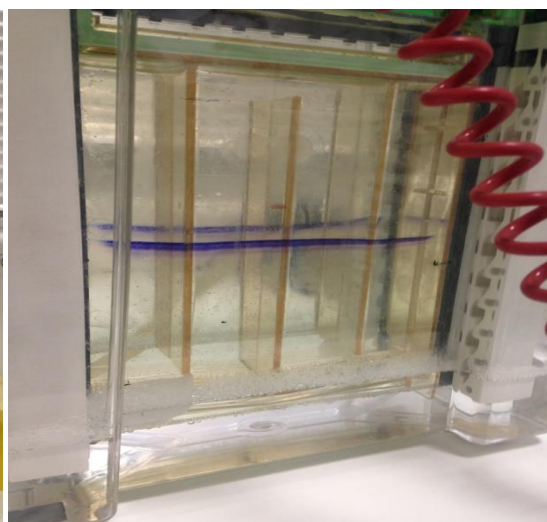


Εικόνα 21: Συσκευή ηλεκτροφόρησης κατακόρυφου τύπου.

Η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης συνδέεται με σωλήνες παροχής νερού και τα ηλεκτρόδια συνδέονται με συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος. Η εκκίνηση της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με ρύθμιση του ρεύματος στα 15 mA ανά πηκτική και σταθερή παροχή νερού. Με την συμπλήρωση μίας ώρας η οποία συμπίπτει χρονικά με τη μετάβαση του ορατού μετώπου της ηλεκτροφόρησης από το τμήμα της πηκτικής συσσώρευσης στο τμήμα της διαχωριστικής πηκτικής, η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 50 mA ανά πηκτική και διατηρείται σταθερή μέχρι το τέλος της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης. Η παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της μετατόπισης του μετώπου του μπλε της βρωμοφαινόλης.



Εικόνα 22: Έναρξη sds - ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 23: Πρόοδος sds – μετατόπιση μετώπου.

2.4.2.4 Εμφάνιση πρωτεϊνών

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η παροχή του ρεύματος διακόπτεται και η συσκευή αποσυναρμολογείται. Η διαχωριστική πηκτή (separating gel) αποκολλάται προσεκτικά από τις πλάκες της ηλεκτροφόρησης ενώ το τμήμα της πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) αποκολλάται και απορρίπτεται. Η διαχωριστική πηκτή υφίσταται ειδική επεξεργασία για την εμφάνιση των πρωτεϊνών, υπό μορφή αποτυπωμάτων, που διαχωρίστηκαν.

2.4.2.5 Χρώση των πηκτών

Οι πηκτές μετά την ηλεκτροφόρηση, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα καθήλωσης (Fixation) (50% methanol, 3% phosphoric acid) για 1 h, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με απιονισμένο νερό, διάρκειας 15 min η κάθε μία και ακολούθησε εμβάπτιση στο διάλυμα της κολλοειδούς χρωστικής για 18 h. Ο αποχρωματισμός στην επιθυμητή ένταση έγινε με τη χρήση απιονισμένου νερού σε ανακινούμενη επωαστική τράπεζα.

2.4.2.6 Αποχρωματισμός των πηκτών

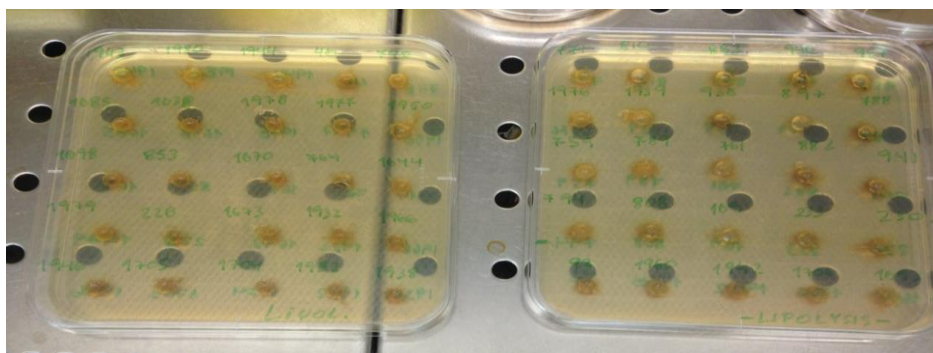
Με την διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω η χρωστική διαχέεται εντός της πηκτής αλλά συνδέεται μόνιμα μόνο με τις πρωτεΐνες. Για να πραγματοποιηθεί στην συνέχεια η σάρωση των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων έπρεπε να γίνει αποχρωματισμός της πηκτής, δηλαδή να απομακρυνθεί η χρωστική από τις περιοχές που δεν παρατηρείται

σύνδεση με τις πρωτεΐνες. προκειμένου λοιπόν οι πηκτές να αποχρωματιστούν, εκπλένονται με απιονισμένο νερό υπό ανακίνηση για 1-2 μέρες.

Μετά τον αποχρωματισμό των πηκτών, αυτές σαρώθηκαν με τη βοήθεια ενός οπτικού Σαρωτή (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad,) και η επεξεργασία της εικόνας πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο) χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Pearson και ανάλυση cluster UPGMA.

2.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός της λιπολυτικής δραστηριότητας των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Paramithiotis και συν. (2010) με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay). Έτσι, κατά την διεξαγωγή του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούμενο από Nutrient agar (pH 6.8), 1% τριβουτυρίνη και 0,25% DMSO (γαλακτοματοποιητής-ποσοτικά προστίθεται ως ¼ της τριβουτυρίνης). Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην πργ. 2.3.1. Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 30 °C για 10 μέρες. Η εμφάνιση της διαφανούς ζώνης γύρω από τις αποικίες θεωρήθηκε ως δείκτης για λιπόλυση.



Εικόνα 24: Τρυβλία με MRS agar για έλεγχο λιπολυτικής δραστηριότητας.

2.4.4 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Μετά την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, ακολούθησε η μέτρηση της κινητικής των στελεχών που έδωσαν θετικά αποτελέσματα λιπολυτικής δραστηριότητας.

Αρχικά έγινε ενοφθαλμισμός καλλιέργειας στελεχών ηλικίας 24 h, όπου 1 mL καλλιέργειας μεταφέρθηκε από περιέκτες τ. Falcon® των 10 ml σε κωνική των 250 mL.

Ο ενοφθαλμισμός πραγματοποιήθηκε σε ειδικό για μελέτη της λιπόλυσης υπόστρωμα (0,5% λεκιθίνη, 1% τριβουτυρίνη, 3 g/ L meat extract και 5 g/ L πεπτόνη) και οι κωνικές τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C υπό ανάδευση για 72 h. Μετά από 72 h, πραγματοποιήθηκε η πρώτη μέτρηση (7 δείγματα και 1 τυφλό). Σε αποστειρωμένο πλαστικό περιέκτη μεταφέρθηκαν, μετά από ανάδευση, 10 ml δείγματος. Στη συνέχεια ακολουθήσε μέτρηση του pH για κάθε δείγμα, υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος έγινε ογκομέτρηση με ποσότητα διαλύματος N/10 NaOH μέχρι τελικού σημείου pH 9,0. Για την μελέτη αυτή η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε 5 φορές (ανά 2 μέρες). Οι κωνικές μετά από κάθε μέτρηση επανατοποθετούνταν για επώαση στους 30 °C υπό ανάδευση.



Εικόνα 25: Κωνικές φιάλες με ειδικό υπόστρωμα λιπόλυσης.

2.4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΑΣΗΣ

Για την διεξαγωγή του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα ειδικό για ανίχνευση της ενεργότητας φυτάσης, που παρασκευάστηκε από μεμονωμένα συστατικά. Αναλυτικότερα, σε 200 mL απιονισμένο νερό προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια: 1 g phytic Ca^{++} , 0.6g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 g MgSO_4 , 0.02 g CaCl_2 , 0.002 g MnSO_4 , 2 g γλυκόζη και 0.02 g FeSO_4 . Αφού είχε ρυθμιστεί το pH στο 5.5 προστίθενται και 4 g agar bacteriological. Τέλος, αφού στερεοποιήθηκε το υπόστρωμα στα τρυβλία,

πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός με μικροβιολογικό κρίκο. Ποσότητα ενοφθαλμίσματος λαμβάνεται υπό ασηπτικές συνθήκες από την τελευταία ανανέωση των στελεχών και μεταφέρεται στο τρυβλία. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό θάλαμο 30 °C για 10 μέρες.

2.4.6 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Για τον έλεγχο ύπαρξης ή όχι αντιμικροβιακής ικανότητας των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν στελεχών ηλικίας 24 h, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν έτσι ώστε να ληφθεί υπερκείμενο ανάπτυξης ελεύθερο κυττάρων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar well diffusion assay). Το χρησιμοποιούμενο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ήταν MRS broth, στο οποίο, πριν στερεοποιηθεί στα τρυβλία και ανοιχτούν οι οπές, είχε ενσωματωθεί και ο μύκητας γένους *Aspergillus* sp. (ταυτοποίηση με βάση την καρποφορία του), από τη συλλογή του Εργαστηρίου, που λειτούργησε ως δείκτης. Η ενσωμάτωση του μύκητα στο υγρό υπόστρωμα έγινε με τη χρήση 9 mL διαλύματος Ringer στο οποίο είχαν αιωρηθεί τα σπόρια του μύκητα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C, για 5 ημέρες. Η εμφάνιση ζώνης που δεν είχε καλυφθεί με το μύκητα αποτέλεσε ένδειξη αντιμυκητιακής ικανότητας του αντίστοιχου στελέχους.

Στην συνέχεια μελετήθηκαν οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, του pH και των πρωτεολυτικών ενζύμων στην αντιμικροβιακή ικανότητα των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που έδωσαν θετικά αποτελέσματα στο προηγούμενο πείραμα. Αυτό έγινε σύμφωνα με τους Magnusson & Schnurer (2001) με τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, η αντιμυκητιακή δράση των στελεχών που παρέμεινε μετά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, διαφορετικές τιμές pH και πρωτεολυτικά ένζυμα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα όπως περιγράφεται και παραπάνω. Το υπερκείμενο ανάπτυξης των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 2 πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάση και θρυψίνη) ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία αντιμυκητιακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσης και σε 4 τιμές θερμοκρασίας (60, 70, 96 και 121 °C) ώστε να μελετηθεί η θερμοανθεκτικότητα των αντιμυκητιακών ουσιών. Τέλος, η τιμή του pH ρυθμίστηκε σε 4 επίπεδα (3.0, 4.0, 5.0 και 9.0) και ώστε να μελετηθεί η αντίστοιχη σταθερότητα των αντιμυκητιακών ενώσεων και να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της ταυτότητάς τους.

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε στέλεχος που μελετήθηκε, ποσότητα εμβολίου 100 μL από ανανεωμένη καλλιέργεια στελεχών ηλικίας 24 h μεταφέρθηκε με πιπέτα σε περιέκτες τ. Falcon® με 10 mL MRS broth, στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 60, 70, 96 και 121 $^{\circ}\text{C}$ για 10 min. Αντίστοιχα, η επίδραση του pH ερευνήθηκε με τον ίδιο τρόπο, αλλά τα στελέχη προσαρμόστηκαν σε τιμές pH 3.0, 4.0, 5.0 και 9.0 με 1 M HCl και 2 M NaOH, πριν από την αξιολόγηση της αντιμυκητιακής δραστηριότητας. Επιπλέον, για την αξιοπιστία της μεθόδου MRS ρυθμισμένο στις ίδιες τιμές pH χρησίμευσε ως μάρτυρας. Τέλος διερευνήθηκε και η επίδραση των πρωτεολυτικών ενζύμων στην αντιμυκητιακή δραστηριότητα των στελεχών. Τα δείγματα ρυθμίστηκαν με 1 M HCl και 2 M NaOH στην βέλτιστη τιμή pH για κάθε ένζυμο, δηλ. 7.6 και 8.0 για την πρωτεΐνάση, θρυψίνη αντίστοιχα.

2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Τα οργανικά οξέα εμφανίζονται σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης, του βιοχημικού μεταβολισμού και της μικροβιακής δραστηριότητας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των οξέων είναι σημαντικός σε ζυμούμενα τρόφιμα για τεχνικούς, θρεπτικούς και μικροβιολογικούς λόγους. Η HPLC είναι μια τεχνική που απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος πριν από τον διαχωρισμό και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των οργανικών οξέων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Paramithiotis και συν. 2005 με κάποιες τροποποιήσεις.

Η ανάλυση με σύστημα HPLC (Εικόνα 26) αποτελείται από μία αντλία (880-PU intelligent HPLC pump, JASCO) και μία στήλη (Aminex HPX-87H), έναν ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (UV), ένα ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (LC-30 RI Detector, PERKIN ELMER) και ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος με την χρήση σύριγγας χωρητικότητας 20 μL . Η έκλυση πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά (35 $^{\circ}\text{C}$) με 5 mM H_2SO_4 , με ρυθμό ροής 1 ml / λεπτό και με όγκο δείγματος 20 μL .

Τα δεδομένα συλλέγονται και αναλύονται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PeakSimple Chromatography Data System (SRI Model 202, Link Lab Laboratory Equipment). Η ποσοτική ανάλυση εκτελείται με βάση πρότυπες καμπύλες σχεδιασμένες για κάθε ένωση. Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι: οξικό, γαλακτικό, τρυγικό, κιτρικό οξύ, φαινυλ-γαλακτικό και προπιονικό, βουτυρικό οξύ, αιθανόλη, γλυκόζη και φρουκτόζη και γλυκερόλη κ.ά.

Τα 13 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, LQC-771, LQC-843, LQC-1673, LQC-1680, LQC-1936, LQC-1950, LQC-1966, LQC-1976, LQC-1977, LQC-1978, LQC-1979, LQC-1980, LQC-1984, χρησιμοποιήθηκαν μετά από επώαση σε MRS broth (18 ώρες, 30 °C).

Πιο αναλυτικά, 10 mL δείγματος φυγοκεντρήθηκαν (3.500 rpm, 9 °C, 15 min). Στην συνέχεια 1 mL υπερκείμενου μεταφέρεται σε Eppendorf και διηθείται μέσω φίλτρου σύριγγας Millex (Millipore, Billerica, Mass. USA). Από αυτό 100 µL αναμειγνύονται με 100 µL φέρουσα φάση H₂SO₄ 0,025 M (αναλογία 1:1) και τελικά 20 µL εγχέονται σε στήλη Aminex HPX-87H (300 mm 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) μέσω σύριγγας.



Εικόνα 26: Σύστημα HPLC Εργαστηρίου .

2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ

2.6.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΖΥΜΙΟΥ & ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η αρχική προετοιμασία των καλλιιεργειών των βακτηρίων έγινε ως εξής: κάθε στέλεχος αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και επώαστηκε στους 30 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (3500 rpm, 20 min, 4 °C) όπου το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αναμείχθηκε με 5 mL πόσιμο νερού. Ακολούθως, σε 10 g αλεύρου (τύπου 70%, μαλακό) προστέθηκε η ποσότητα των 5 mL

και συμπληρώθηκε με πόσιμο νερό ως τα 20 mL. Το τελικό αυτό μίγμα επώαστηκε σε θάλαμο των 30 °C για 18 h.

Μετά την επώαση σχηματίστηκε το προζύμι το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του ψωμιού σε ποσότητα 10% επί του βάρους του χρησιμοποιούμενου αλεύρου. Μετά την ανάμειξη των παραπάνω υλικών και την προσθήκη 2% NaCl και επιπλέον ποσότητας νερού, ακολούθησε η μορφοποίηση των ζυμαριών σε τεμάχια των 400 g και η τοποθέτηση τους σε φόρμες ψησίματος. Αυτά παρέμειναν για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την συμπλήρωση των 18 αυτών ωρών, ακολούθησε το ψήσιμο των ζυμαριών αυτών (220 °C, 40 min).



Εικόνα 27: Υγρά προζύμια μετά από επώαση διάρκειας 18 ωρών.



Εικόνα 28: Ζυμάρι με προζύμι πριν το ψήσιμο.

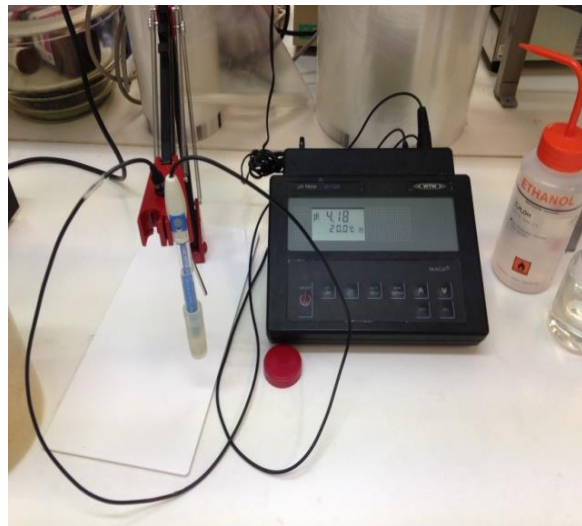


Εικόνα 29: Ψωμί με προζύμι μετά από ψήσιμο.

2.6.2 ΜΕΤΡΗΣΗ pH & ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ) ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ

Το pH κάθε προζυμιού μετρούνταν με απευθείας βύθιση του ηλεκτροδίου στο κάθε προζύμι (που έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με την πργ. 2.6.1) με pH-μετρο και η τιμή του καταγράφηκε. Η μέτρηση τόσο του pH όσο και της οξύτητας πραγματοποιούνταν μετά την επώαση των στελεχών (18 ώρες, 30 °C). Για την ακρίβεια της μέτρησης, έγινε μία επανάληψη για κάθε δείγμα.

Για τη μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας λαμβάνονταν 30 mL δείγματος αραιώνονταν στα 100 mL με απιονισμένο νερό και τιτλοδοτούνταν



με 0.1 N NaOH (Merck, Darmstadt, Germany), υπό ανάδευση έως η τιμή του pH 8.5 παραμείνει σταθερή για μερικά λεπτά. Τα mL του 0.1 N NaOH που καταναλώθηκαν εκφράζουν την ολική ογκομετρούμενη οξύτητα (ΤΤΑ).

2.6.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ cfu/ g ΖΥΜΑΡΙΟΥ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Κατά τη διαδικασία παρασκευής του προζυμιού που περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.1, στο στάδιο όπου το μίγμα έχει μείνει 18 h για επώαση στους 30 °C (1^ο προζύμι), μεταφέρεται 1 mL μίγματος σε Eppendorf. Όμοια μεταφέρθηκε σε Eppendorf 1g από

το 2^ο προζύμι, που έχει ωριμάσει για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παραπάνω διατηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν με πιπέτα 100 µL (από το 1 mL και το 1 g αντίστοιχα) σε 9 mL Ringer - που αποτελεί και την αραιώση -1. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα Ringer και μετά πραγματοποιείται επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με MRS agar. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων καταμετρείται μετά από επώαση στους 30 °C για 48 h.

Τέλος, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων εκφράζεται σε cfu/ g (colony forming units/ g) ζυμαριού.

2.6.4 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε από μια ομάδα δέκα δοκιμαστών, από τους οποίους ζητήθηκε να αξιολογήσουν χωριστά την συνολική εμφάνιση του κάθε ψωμιού, την κόρα και τη ψίχα.

Λόγω του ότι τα χαρακτηριστικά που τέθηκαν προς αξιολόγηση δεν επηρεάζονται μόνο από την καλλιέργεια εκκινήσεως που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και από την εκάστοτε μηχανική ή θερμική κατεργασία, η ζύμωση, η ωρίμαση και το ψήσιμο, έγιναν σε σταθερές συνθήκες.

Όσον αφορά στην κόρα, ζητήθηκε να αξιολογηθεί το χρώμα, το άρωμα, η γεύση και η υφή κατά τη μάσηση. Τα ίδια χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένου και του πορώδους, αξιολογήθηκαν και για την ψίχα. Όσον αφορά στην συνολική εντύπωση, ζητήθηκε η συνολική αξιολόγηση του αρώματος, της γεύσης αλλά και της συνολικής εμφάνισης. Για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών δημιουργήθηκε φύλλο οργανοληπτικού ελέγχου με κλίμακα βαθμολογίας από 0 έως 10 το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα I και διαμορφώθηκε σύμφωνα με εξειδικευμένες οδηγίες NMKL PROCEDURE No. 31 (2015) - “GUIDELINES FOR SENSORY EVALUATION OF BREAD” και AACC International Method 10-12.01 -“GUIDELINES FOR SCORING EXPERIMENTAL BREAD” καθώς και τις εξής πηγές: Curic και συν., (2008), Heenan και συν (2008) και Elia, (2011).



Εικόνα 31: Δείγμα κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο.



Εικόνα 32: Δείγμα κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο.



Εικόνα 33: Δείγματα κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο.

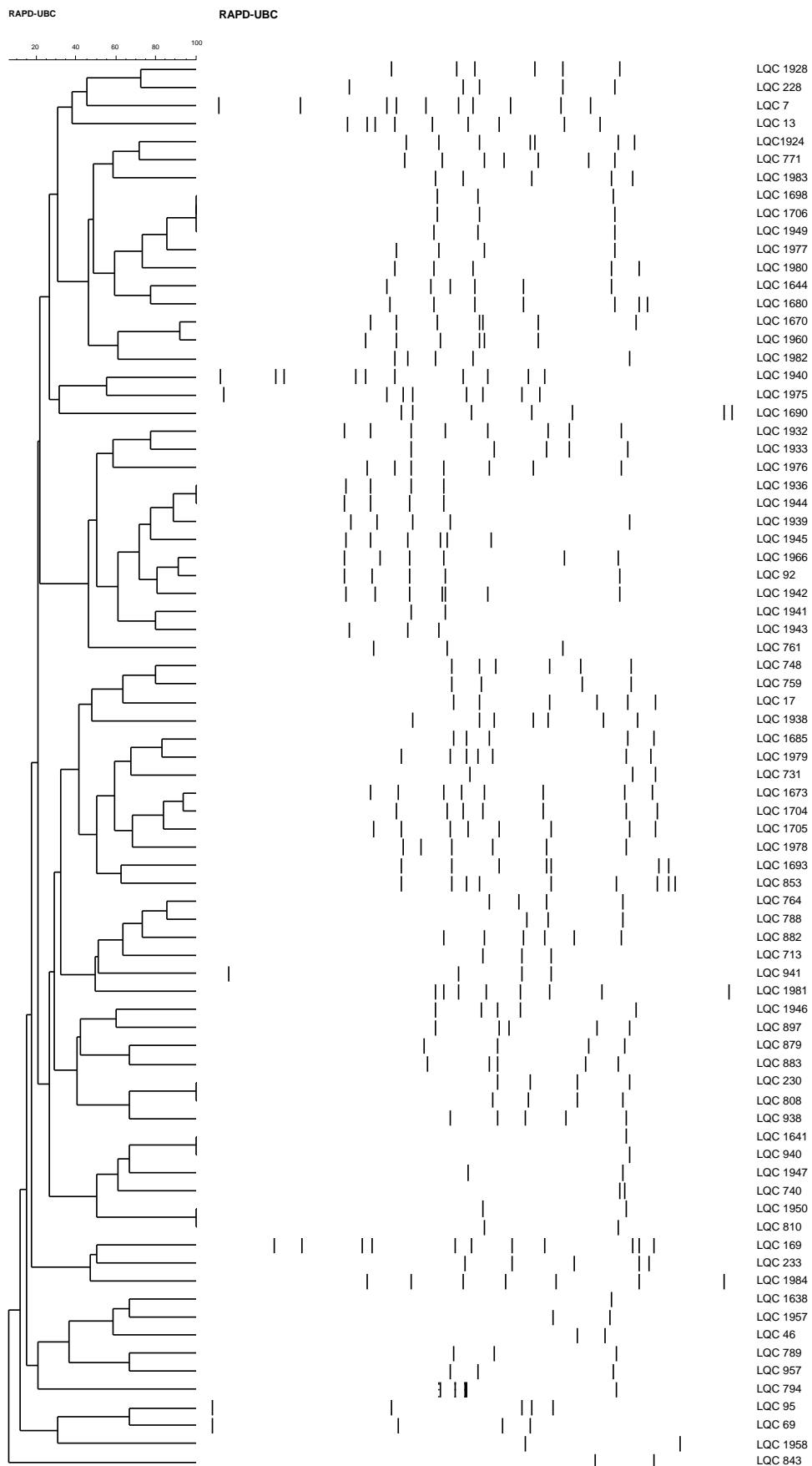
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ DNA

Στον Πίνακα 23, Παράρτημα II παρατίθενται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης και του ποιοτικού ελέγχου του DNA των στελεχών που υπάγονται στο είδος οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* και προέρχονται από τρεις διαφορετικές πηγές απομόνωσης. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζουν τόσο την καλή ποιότητα, όσο και την επαρκή ποσότητα DNA και έτσι είναι κατάλληλα για χρήση σε επόμενη μελέτη.

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων ακολουθεί η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους, που πραγματοποιήθηκε μέσω της PCR – RAPD, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στο Σχήμα 1 που ακολουθεί.

3.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



Σχήμα 1: Ομαδοποίηση των στελεχών με RAPD-PCR (UBC155 ως εκκινήτης). Η απόσταση καταδεικνύεται από το μέσο συντελεστή συσχέτισης (r %) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση UPGMA.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση συστάδων της PCR-RAPD των στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, με εκκινητή το UBC155. Συνολικά μελετήθηκαν 78 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, συλλογής του Εργαστηρίου, τα οποία διαχωρίστηκαν σε επιμέρους ομάδες. Η ανάλυση αυτή διεξήχθη για απεικόνιση της ποικιλομορφίας στελεχών του είδους *Lactobacillus plantarum*, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή όλων των επιμέρους πειραμάτων, λόγω των διαφορετικών πηγών απομόνωσης απ' όπου προήλθαν. Έτσι, στο Σχήμα 1 απεικονίζεται η διαφοροποίηση των διαφορετικών στελεχών που εμπεριέχει το είδος *Lb. plantarum*.

Η φυλογενετική θέση των μικροοργανισμών αποτυπώνεται στην παραπάνω εικόνα, όπου η απόσταση καταδεικνύεται από το mean correlation coefficient (r %) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση UPGMA.

Τα στελέχη LQC 1698, LQC 1706 και LQC 1949 δημιουργούν μια συστάδα/ομαδοποιούνται. Από τα τρία στελέχη που παρουσιάζουν πανομοιότυπο προφίλ, τα LQC 1698 και LQC 1706 προέρχονται και από την ίδια πηγή απομόνωσης (ζύμωση κουνουπιδιού). Όμοια φαίνεται να ομαδοποιούνται τα στελέχη LQC 1944 και LQC 1936, που έχουν ως κοινή πηγή απομόνωσης το προζύμι, καθώς και τα LQC 1945 και LQC 1942 αντίστοιχα. Τέλος, πανομοιότυπο προφίλ παρουσιάζουν και τα LQC 230, LQC 808, με πηγή απομόνωσης ζυμούμενα αλλαντικά.

3.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ

3.3.1 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

3.3.1.1 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των διαφόρων στελεχών *Lb. plantarum* ήταν η μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay), όπως περιγράφεται στην πργ. 2.4.1 της Ενότητας των Υλικών και Μεθόδων. Από τα 78 στελέχη που μελετήθηκαν 26 παρουσίασαν ένδειξη πρωτεολυτικής δραστηριότητας σε επίπεδο τρυβλίου (Πίνακας 4). Η πρωτεολυτική αυτή δράση των διαφόρων στελεχών διακρίνεται με την ύπαρξη μιας ζώνης διάγασης γύρω από την οπή, στην οποία έχει μεταφερθεί η αντίστοιχη ποσότητα ενοφθαλμίσματος κάθε στελέχους (Εικόνες 34-35). Συγκεκριμένα, η ύπαρξη πρωτεολυτικής δράσης των στελεχών διαπιστώθηκε με την χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρωστική δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, ως εκ τούτου η παρουσία μετά τη χρώση στεφάνης ή ζωνών διάγασης στο υπόστρωμα δηλώνει την απουσία πρωτεϊνών και

κατ' επέκταση την αποδόμησή τους και την πρωτεολυτική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν ενοφθαλμιστεί σε αυτό.

Πίνακας 4: Στελέχη *Lb. plantarum* μικροβιακής συλλογής εργαστηρίου με πρωτεολυτική δράση, με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay).

Στέλεχος	Πηγή Απομόνωσης
LQC 7	
LQC 17	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικών)
LQC 731	
LQC 740	
LQC 748	
LQC 764	
LQC 1685	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικών)
LQC 1670	
LQC 1704	
LQC 1705	
LQC 1936	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1939	
LQC 1942	
LQC 1943	
LQC 1944	
LQC 1945	
LQC 1949	
LQC 1950	

LQC 1975

LQC 1976

LQC 1977

LQC 1979

LQC 1981

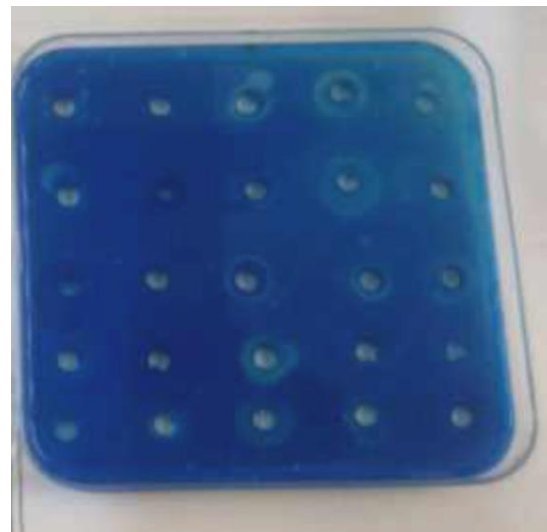
LQC 1982

LQC 1983

LQC 1984



Εικόνα 34: Ύπαρξη πρωτεολυτικής δράσης στελεχών των βακτηρίων, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, με δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές του υποστρώματος πρωτεόλυσης.

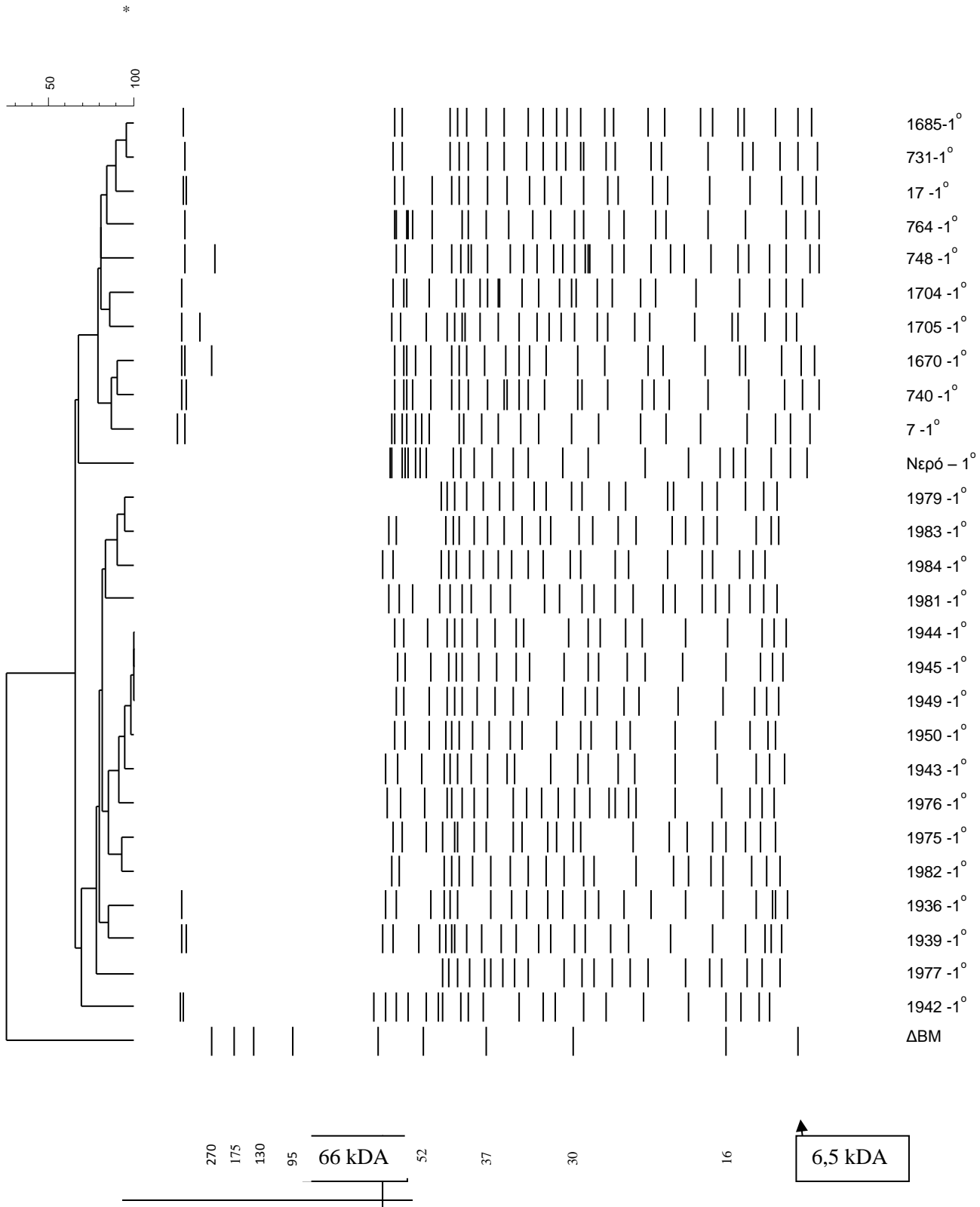


Εικόνα 35: Ύπαρξη πρωτεολυτικής δράσης στελεχών των βακτηρίων, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, με δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές του υποστρώματος πρωτεόλυσης.

3.3.1.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Πολυακρυλαμιδίου Με SDS

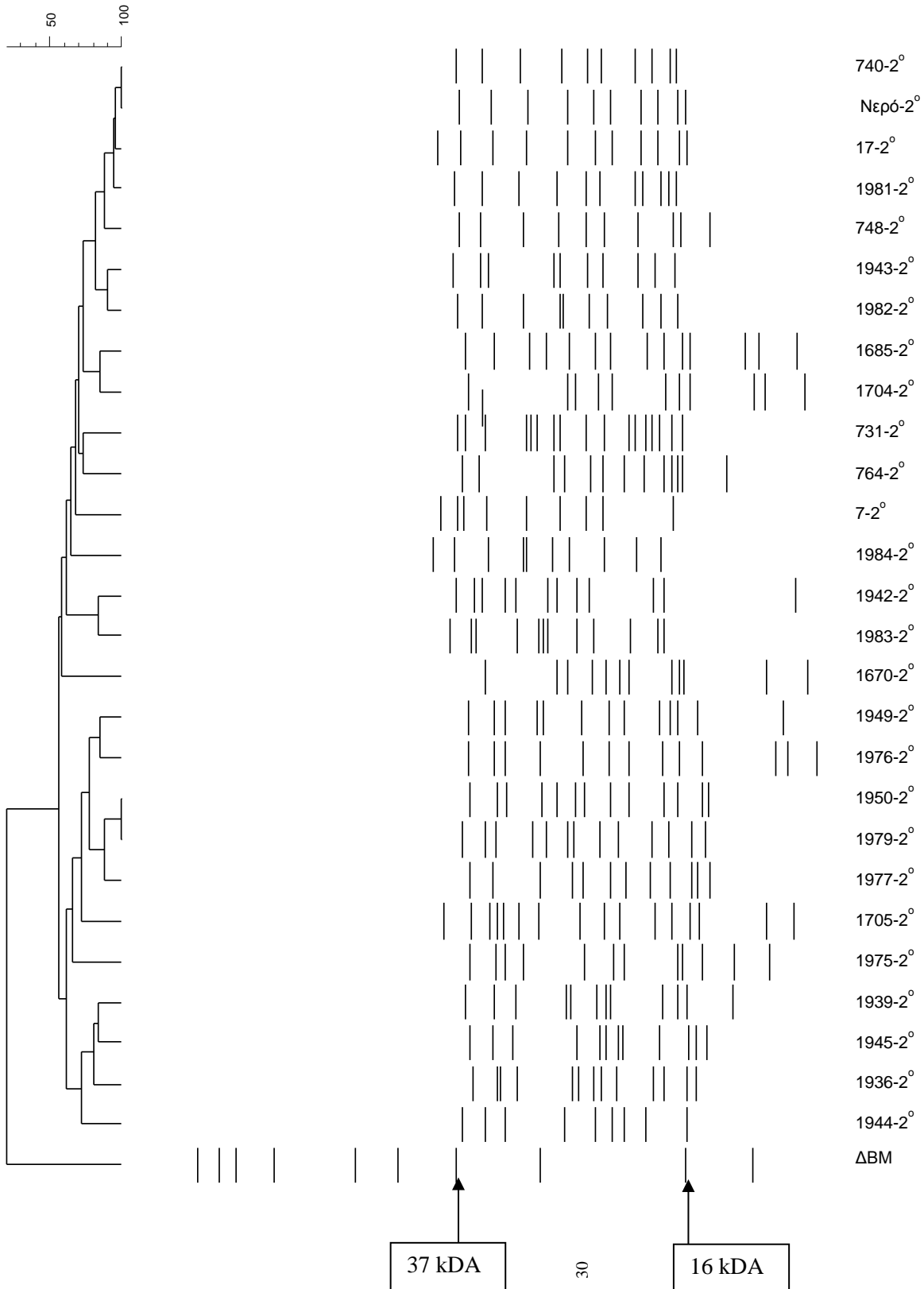
Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη Ενότητα, τα παραπάνω στελέχη (Πίνακας 4) που παρουσίασαν πρωτεολυτική δράση σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay), υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θειικό νάτριο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω ιδιότητά τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται στα δένδρογράμματα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 2, 3 και 4.

Σχήμα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικο νάτριο των πρωτεϊνών 1^ο κλάσματος των μικροβιακών στελεχών, που εμφάνισαν πρωτεολυτική δράση με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

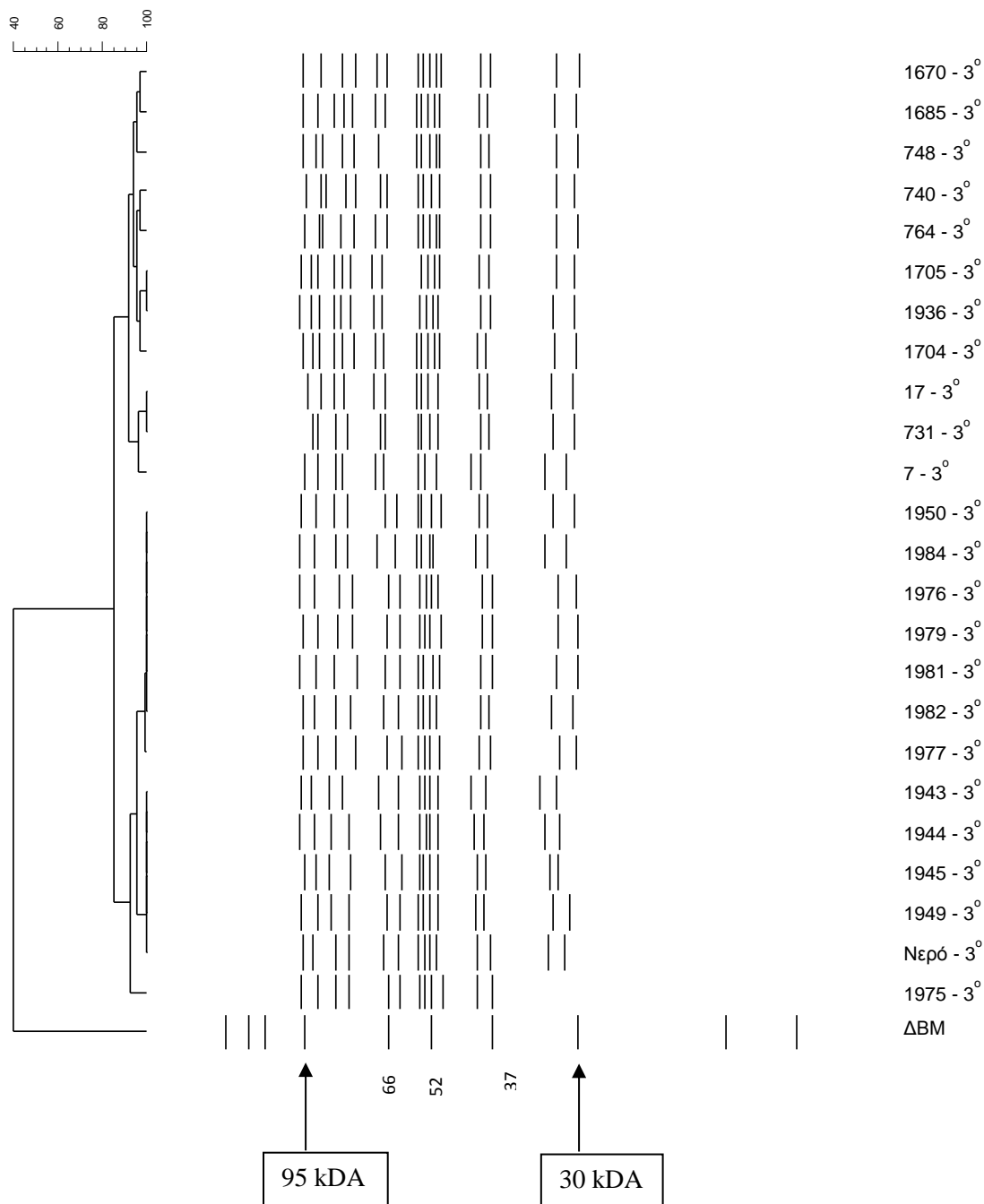


** Οπου: **ΔBM**: Δείκτης μοριακών βαρών (6,5 – 270 kDa)
1° : 1^ο πρωτεϊνικό κλάσμα (αλβουμίνες και γλοβουλίνες)
Νερό: μάρτυρας νερό:αλεύρι (αναλογία 2:1).

Σχήμα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικο νάτριο των πρωτεϊνών 2^{ου} κλάσματος των μικροβιακών στελεχών, που εμφάνισαν πρωτεολυτική δράση με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.



Σχήμα 4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικο νάτριο των πρωτεϊνών 3^{ου} κλάσματος των μικροβιακών στελεχών, που εμφάνισαν πρωτεολυτική δράση με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.



Στα Σχήματα 2-4 απεικονίζονται τα τρία πρωτεϊνικά κλάσματα σίτου. Πιο συγκεκριμένα, το Σχήμα 2 αντιστοιχεί στο 1^ο πρωτεϊνικό κλάσμα. Το Σχήμα 3 απεικονίζει το 2^ο κλάσμα πρωτεϊνών και το Σχήμα 4 στο 3^ο και τελευταίο πρωτεϊνικό κλάσμα. Στα σχήματα αυτά επισημαίνονται οι μπάντες με τα πρωτεϊνικά βάρη στις οποίες περιέχονται τα πρωτεϊνικά κλάσματα.

Θεωρητικά, το 1^ο κλάσμα πρωτεϊνών σίτου αποτελούν οι αλβουμίνες και οι γλοβουλίνες που βιβλιογραφικά παρουσιάζουν μοριακά βάρη (MB) χαμηλότερα από 25 kDa αν και ένα σημαντικό ποσοστό τους παρουσιάζει MB που κυμαίνονται από 60 και 70 kDa (Veraverbeke & Delcour, 2002). Το 2^ο κλάσμα πρωτεϊνών αντιστοιχεί στις γλιαδίνες, με μοριακά βάρη να κυμαίνονται από 30 – 80 kDa (δηλ. 30 – 45 kDa οι α,β,γ - γλιαδίνες και 40 – 75 kDa οι ω-γλιαδίνες). Τέλος, το 3^ο πρωτεϊνικό κλάσμα αποτελούν οι γλουτενίνες και παρουσιάζουν το μεγαλύτερο εύρος μοριακών βαρών, από 30 – 95 kDa (65 - 95 kDa οι υψηλού MB υπομονάδες των γλουτενινών (HMW subunits of glutenins) και από 30 – 45 kDa οι χαμηλού MB υπομονάδες των γλουτενινών (LMW subunits of glutenins) (Goesaert και συν., 2005).

Από τα σχήματα 2, 3 και 4 αρχικά παρατηρείται ότι δεν υπάρχει πλήρης υδρόλυση των πρωτεϊνών στα διάφορα στελέχη του *Lb. plantarum*, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της 1^{ης} μεθόδου, της διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay). Πιο συγκεκριμένα, στο Σχήμα 2 – που αφορά τις γλοβουλίνες και τις αλβουμίνες, στα στελέχη LQC 7, LQC 740, LQC 1670, LQC παρατηρείται πλήρης υδρόλυση της μπάντας μεταξύ των μοριακών βαρών (MB) 16 και 30, σε προϊόντα μικρότερα από το κατώφλι της ανάλυσης. Όμοια πλήρης υδρόλυση παρουσιάζεται και στις μπάντες μεταξύ των MB 52 – 66 για τα στελέχη LQC 1685, LQC 731, LQC 17, LQC 748, LQC 1979, LQC 1983, LQC 1984 και LQC 1942. Οι επιπλέον μπάντες, που παρατηρούνται στα στελέχη, σε σύγκριση με το νερό, οφείλονται είτε σε μερική υδρόλυση των πρωτεϊνών του 1^{ου} κλάσματος (γλοβουλίνες και αλβουμίνες) είτε στα υπόλοιπα πεπτίδια του υποστρώματος πρωτεόλυσης που μπορεί να προέρχονται από την τρυπτόνη ή το εκχύλισμα της ζύμης. Όπως αναφέρθηκε στα περισσότερα στελέχη δεν παρατηρήθηκε πλήρης υδρόλυση των πρωτεϊνών, κάτι που απεικονίζεται και από την ελαφριά μετατόπιση των ζωνών, σε σχέση με τον μάρτυρα (νερό 1^{ου} κλάσματος).

Όσον αφορά το 2^ο κλάσμα πρωτεϊνών, που απεικονίζεται στο Σχήμα 3, παρατηρείται επίσης μια ελαφριά μετατόπιση στις μπάντες μεταξύ των δειγμάτων και του μάρτυρα (νερό 2^{ου} κλάσματος). Πρόσθετα, τα στελέχη LQC 764, LQC 1704, LQC

1685, LQC 1942, LQC 1670, LQC 1949, LQC 1976, LQC 1705, LQC 1975 και LQC 1939 παρουσιάζουν μπάντες εκτός των μοριακών βαρών του μάρτυρα που αποτελούν προϊόντα υδρόλυσης μεγαλύτερου MB.

Τέλος, αναφορικά με το 3^ο κλάσμα πρωτεϊνών, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4, η πλειοψηφία των στελεχών παρουσιάζουν πανομοιότυπο προφίλ αποικοδόμησης των πρωτεϊνών. Όπως και στα δύο πρώτα κλάσματα, το 3^ο και τελευταίο (γλουτενίνες) τα δείγματα δεν παρουσιάζουν διαφορές με το μάρτυρα (νερό 3^{ου} κλάσματος), δηλαδή δεν έχει πραγματοποιηθεί πλήρης υδρόλυση των πρωτεϊνών. Το στέλεχος LQC 1975 παρουσιάζει πλήρη υδρόλυση σε 2 μπάντες, στα MB 30-32 και τα στελέχη LQC 1984 και LQC 7 επίσης παρουσιάζουν πλήρη υδρόλυση 1 μπάντας μεταξύ των MB 52-66.

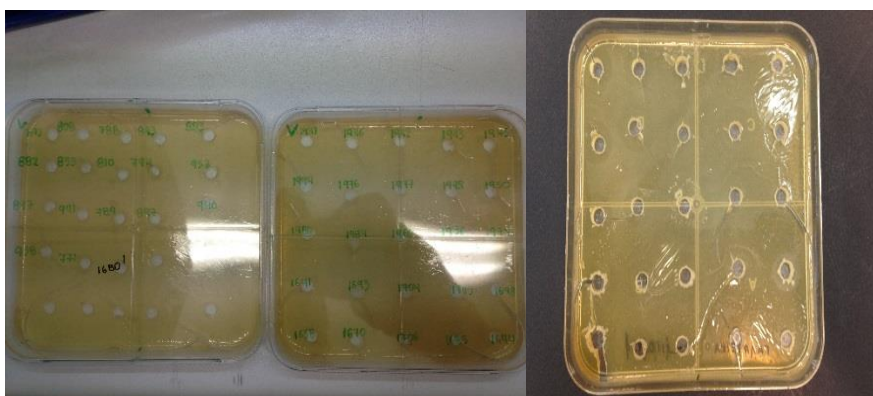
3.3.2 ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η μελέτη της ύπαρξης λιπολυτικής δραστηριότητας μελετήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους που αναλύονται στην πργ. 2.4.3 της ενότητας Υλικών και Μεθόδων.

3.3.2.1 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Όμοια με την πρωτεολυτική δραστηριότητα που περιγράφεται παραπάνω, ελέγχθηκε και η πιθανή ύπαρξη λιπολυτικής δραστηριότητας των στελεχών *Lb. plantarum*. Έτσι, από τα 78 στελέχη που μελετήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay), 7 μόνο στελέχη φαίνεται να παρουσιάζουν λιπολυτική δράση, εκ' των οποίων 1 προέρχεται από ζύμωση αλλαντικών, 2 από ζύμωση λαχανικών και 4 από ζύμωση προζυμιών (Πίνακας 5).

Η ύπαρξη λιπολυτικής δράσης των διαφόρων στελεχών *Lb. plantarum*, αποδεικνύεται στην παρουσία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές, στις οποίες είχε μεταφερθεί οι αντίστοιχες ποσότητες των στελεχών (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Παρουσία λιπολυτικής δράσης στελεχών των βακτηρίων, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, με δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές του λιπολυτικού υποστρώματος.

Πίνακας 5: Στελέχη *Lb. plantarum* μικροβιακής συλλογής εργαστηρίου με λιπολυτική δράση, με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay).

Στέλεχος	Πηγή απομόνωσης
LQC 957	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)
LQC 1693	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)
LQC 1704	
LQC 1944	
LQC 1966	<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμιού)
LQC 1976	
LQC 1984	

3.3.2.2 Κινητική μικροοργανισμών με λιπολυτική δράση

Τα στελέχη που παρουσίασαν ένδειξη λιπολυτικής δράσης σε επίπεδο τρυβλίου, με την 1^η μέθοδο, μελετήθηκαν ως προς την κινητική τους, 5 φορές (ανά 2 μέρες), όπως περιγράφεται στην πργ. 2.4.4 της Ενότητας των Υλικών και Μεθόδων. Έτσι, για τον προσδιορισμό της λιπόλυσης, ως μονάδα λιπολυτικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα του ενζύμου της λιπάσης που καταλύει την απελευθέρωση 1 μmol λιπαρών οξέων στους 30 °C. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα τιμών ενεργότητας σε επιλεγμένα στελέχη *Lb. plantarum* (AU/g)

Ημέρα	Στέλεχος						
	LQC 1984	LQC 1976	LQC 1704	LQC 1693	LQC 1944	LQC 1966	LQC 957
2	0,31 ± 0,06	0,85 ± 0,08	1,01 ± 0,15	0,55 ± 0,14	0,81 ± 0,08	0,48 ± 0,09	0,38 ± 0,03
4	0,55 ± 0,14	0,73 ± 0,11	1,03 ± 0,11	0,88 ± 0,11	0,85 ± 0,06	0,81 ± 0,08	0,56 ± 0,15
6	0,63 ± 0,18	1,13 ± 0,18	1,25 ± 0,14	1,09 ± 0,20	0,84 ± 0,20	0,95 ± 0,28	0,72 ± 0,18
8	0,52 ± 0,23	1,08 ± 0,18	1,32 ± 0,09	1,14 ± 0,26	1,01 ± 0,22	0,95 ± 0,21	0,63 ± 0,19
10	0,67 ± 0,18	0,77 ± 0,04	0,95 ± 0,21	0,84 ± 0,19	0,99 ± 0,13	0,87 ± 0,11	0,56 ± 0,16

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, οι χαμηλότερες τιμές ενεργότητας σημειώθηκαν στο στέλεχος LQC 1984 (εύρος 0.31-0.67). Παράλληλα τις υψηλότερες τιμές ενεργότητας παρουσίασε το στέλεχος LQC 1704 (εύρος 0.95-1.32). Σε γενικές γραμμές, μετά την 8^η ημέρα οι τιμές της ενεργότητας παρουσιάζουν μείωση στο σύνολο των στελεχών. Εξάιρεση αποτελεί το στέλεχος LQC 1984 το οποίο παρουσίασε μικρή αύξηση ενεργότητας.

3.3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΑΣΗΣ

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας φυτάσης των στελεχών *Lb. plantarum* που μελετήθηκαν περιγράφεται αναλυτικά στην πργρ. 2.4.5 της ενότητας Υλικών και Μεθόδων. Στην παρούσα ερευνητική εργασία από σύνολο των 78 στελεχών *Lb. plantarum* που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε παραγωγή φυτάσης.

3.3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΙ ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ)

Η παρασκευή των προζυμιών διεξήχθη με τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.1, στην ενότητα των Υλικών & Μεθόδων, σύμφωνα με τον οποίο για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν μονοκαλλιέργειες στελεχών *Lb. plantarum*. Στον Πίνακα 7 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (ΤΤΑ) που πραγματοποιήθηκαν μετά από επώαση των στελεχών (18 h, 30 °C). Σε αυτόν απεικονίζονται οι τιμές για κάθε στέλεχος *Lb. plantarum*, αλλά και για το μάρτυρα που ήταν θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης MRS broth. Για την αποτύπωση της διακύμανσης του pH και της οξύτητας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA.

Οι τιμές του pH κυμαίνονταν από 3.25 έως 4.69, με το μάρτυρα να παρουσιάζει pH 4.96. Την χαμηλότερη τιμή παρουσιάζει το στέλεχος LQC 1976 (με πηγή απομόνωσης το προζύμι), ενώ την υψηλότερη το LQC 1706 (με πηγή απομόνωσης το κουνουπίδι). Συνολικά, χαμηλότερες τιμές pH φαίνεται να έχουν τα στελέχη που έχουν ως πηγή απομόνωσης το προζύμι, ενώ τα στελέχη με πηγή απομόνωσης ζυμούμενα αλλαντικά και λαχανικά να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές ελαφρά μεγαλύτερες από τα πρώτα.

Πίνακας 7: Μετρήσεις pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας των στελεχών *Lb. plantarum* διαφορετικών πηγών απομόνωσης.

Στέλεχος	pH	Οξύτητα
----------	----	---------

Lb. plantarum (ζύμωση αλλαντικού)

		(% Γαλακτικό οξύ)
Μάρτυρας	4.96 ± 0.02 ^{ag}	3.02 ± 0.02 ^{e, f}
LQC 7	4.12 ± 0.01 ^{x, y}	3.54 ± 0.01 ^{n, o, p}
LQC 13	4.11 ± 0.01 ^{w, x}	3.55 ± 0.00 ^{o, p}
LQC 17	3.36 ± 0.03 ^{e, f}	5.68 ± 0.03 ^{ah}
LQC 46	4.13 ± 0.01 ^{x, y}	2.27 ± 0.03 ^{a, b}
LQC 69	4.13 ± 0.01 ^{x, y}	3.49 ± 0.05 ^{m, n, o}
LQC 92	3.54 ± 0.05 ^{i, j, k}	4.08 ± 0.04 ^{x, y, z}
LQC 95	3.49 ± 0.01 ^{h, i, j}	4.58 ± 0.04 ^{ad}
LQC 169	4.05 ± 0.06 ^{u, v, w}	2.43 ± 0.04 ^{c, d}
LQC 228	4.07 ± 0.04 ^{u, v, w, x}	2.39 ± 0.02 ^{b, c, d}
LQC 230	4.01 ± 0.02 ^u	2.45 ± 0.14 ^d
LQC 233	4.11 ± 0.01 ^{w, x}	2.30 ± 0.00 ^{a, b, c}
LQC 713	4.11 ± 0.03 ^{w, x}	3.55 ± 0.06 ^{n, o, p}
LQC 731	3.34 ± 0.03 ^{b, c, d, e, f}	6.05 ± 0.07 ^{am, an, ao}
LQC 740	3.64 ± 0.05 ^{m, n}	5.90 ± 0.09 ^{aj, ak, al}
LQC 748	3.39 ± 0.01 ^{f, g}	5.03 ± 0.04 ^{af}
LQC 759	3.33 ± 0.01 ^{b, c, d, e, f}	5.88 ± 0.04 ^{aj, ak, al}
LQC 761	4.13 ± 0.01 ^{x, y}	3.02 ± 0.03 ^{e, f}
LQC 764	4.41 ± 0.01 ^{aa}	3.13 ± 0.18 ^{f, g, h}
LQC 771	3.45 ± 0.08 ^{g, h}	3.95 ± 0.07 ^{w, x}
LQC 788	4.21 ± 0.01 ^z	3.63 ± 0.04 ^{p, q}
LQC 789	4.62 ± 0.03 ^{ae, af}	3.19 ± 0.06 ^{g, h, i}
LQC 794	4.10 ± 0.01 ^{v, w, x}	3.33 ± 0.04 ^{j, k, l}

Lb. plantarum (ζύμωση λαχανικού)

LQC 808	4.60 ± 0.00 ^{ad, ae}	3.31 ± 0.01 ^{i, j, k}
LQC 810	4.52 ± 0.02 ^{ab, ac}	3.65 ± 0.07 ^{p, q, r, s}
LQC 843	4.56 ± 0.01 ^{ac, ad, ae}	3.42 ± 0.03 ^{k, l, m, n}
LQC 853	4.60 ± 0.02 ^{ad, ae}	3.99 ± 0.12 ^{w, x, y}
LQC 879	4.10 ± 0.01 ^{v, w, x}	3.34 ± 0.01 ^{j, k, l}
LQC 882	3.29 ± 0.06 ^{a, b, c, d, e}	6.08 ± 0.11 ^{an, ao}
LQC 883	3.47 ± 0.03 ^{h, i}	4.42 ± 0.03 ^{ac}
LQC 897	4.12 ± 0.11 ^{x, y}	2.38 ± 0.10 ^{b, c, d}
LQC 938	3.72 ± 0.04 ^{o, p, q}	3.30 ± 0.08 ^{i, j, k}
LQC 940	3.28 ± 0.01 ^{a, b, c, d}	5.98 ± 0.04 ^{al, am, an}
LQC 941	3.62 ± 0.03 ^{l, m, n}	4.08 ± 0.04 ^{y, z}
LQC 957	4.48 ± 0.01 ^{aa, ab}	3.77 ± 0.09 ^{s, t, u}
<hr/>		
LQC 1638	4.54 ± 0.01 ^{ab, ac, ad}	3.07 ± 0.05 ^{e, f, g}
LQC 1641	3.82 ± 0.02 ^{s, t}	4.26 ± 0.08 ^{aa, ab}
LQC 1644	3.65 ± 0.01 ^{n, o}	3.40 ± 0.01 ^{k, l, m}
LQC 1670	3.69 ± 0.01 ^{n, o, p}	3.64 ± 0.09 ^{p, q, r}
LQC 1673	4.19 ± 0.03 ^{y, z}	3.71 ± 0.01 ^{p, q, r, s, t}
LQC 1680	4.11 ± 0.01 ^{w, x}	3.37 ± 0.05 ^{j, k, l, m}
LQC 1685	3.30 ± 0.04 ^{a, b, c, d, e}	6.31 ± 0.01 ^{ap}
LQC 1690	4.03 ± 0.01 ^{u, v}	3.76 ± 0.06 ^{r, s, t}
LQC 1693	4.47 ± 0.06 ^{aa, ab}	3.21 ± 0.01 ^{g, h, i}
LQC 1698	3.74 ± 0.01 ^{p, q, r}	3.89 ± 0.16 ^{u, v, w}
LQC 1704	3.88 ± 0.03 ^t	3.08 ± 0.03 ^{f, g}
LQC 1705	3.35 ± 0.06 ^{c, d, e, f}	5.33 ± 0.04 ^{ag}

Lb. plantarum (ζύμωση προζύμου)

LQC 1706	4.69 ± 0.04 ^{af, ag}	2.29 ± 0.01 ^{a, b}
LQC 1924	3.31 ± 0.01 ^{a, b, c, d, e}	3.93 ± 0.04 ^{v, w}
LQC 1928	3.67 ± 0.02 ^{n, o}	4.19 ± 0.02 ^{z, aa}
LQC 1932	3.54 ± 0.06 ^{i, j, k}	4.07 ± 0.09 ^{x, y, z}
LQC 1936	3.54 ± 0.05 ^{i, j, k}	3.92 ± 0.03 ^{v, w}
LQC 1938	4.08 ± 0.04 ^{u, v, w, x}	3.45 ± 0.07 ^{l, m, n, o}
LQC 1939	3.64 ± 0.08 ^{m, n}	4.88 ± 0.11 ^{ae}
LQC 1940	3.80 ± 0.01 ^{r, s}	3.54 ± 0.05 ^{n, o, p}
LQC 1941	3.78 ± 0.03 ^{q, r, s}	3.13 ± 0.03 ^{f, g, h}
LQC 1942	3.76 ± 0.01 ^{p, q, r, s}	3.25 ± 0.06 ^{h, i, j}
LQC 1943	3.57 ± 0.07 ^{k, l, m}	3.81 ± 0.01 ^{t, u, v}
LQC 1944	3.56 ± 0.04 ^{j, k, l}	4.38 ± 0.03 ^{ab, ac}
LQC 1945	3.67 ± 0.02 ^{n, o}	3.51 ± 0.01 ^{m, n, o}
LQC 1946	4.58 ± 0.04 ^{ac, ad, ae}	2.18 ± 0.11 ^a
LQC 1949	3.54 ± 0.04 ^{i, j, k}	4.09 ± 0.01 ^{y, z}
LQC 1950	3.29 ± 0.06 ^{a, b, c, d}	6.05 ± 0.07 ^{am, an, ao}
LQC 1957	3.32 ± 0.04 ^{a, b, c, d, e, f}	5.94 ± 0.09 ^{ak, al, am}
LQC 1960	3.35 ± 0.00 ^{c, d, e, f}	4.83 ± 0.04 ^{ae}
LQC 1966	3.53 ± 0.03 ^{i, j, k}	4.19 ± 0.04 ^{z, aa}
LQC 1975	4.24 ± 0.03 ^z	2.95 ± 0.07 ^e
LQC 1976	3.25 ± 0.02 ^a	5.73 ± 0.04 ^{ah, ai}
LQC 1977	3.29 ± 0.04 ^{a, b, c, d}	5.81 ± 0.01 ^{ai, aj, ak}
LQC 1978	3.33 ± 0.01 ^{b, c, d, e, f}	5.93 ± 0.04 ^{ak, al, am}
LQC 1979	3.27 ± 0.04 ^{a, b}	5.78 ± 0.03 ^{ah, ai, aj}

LQC 1980	3.36 ± 0.04 ^{e, f}	5.85 ± 0.07 ^{ai, aj, ak, al}
LQC 1981	4.56 ± 0.04 ^{ac, ad, ae}	3.37 ± 0.03 ^{j, k, l, m}
LQC 1982	3.28 ± 0.01 ^{a, b, c, d}	5.89 ± 0.02 ^{aj, ak, al}
LQC 1983	3.28 ± 0.04 ^{a, b, c, d}	5.95 ± 0.13 ^{al, am}
LQC 1984	3.28 ± 0.04 ^{a, b, c}	6.18 ± 0.06 ^{ao†}

3.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΙ ΟΛΙΚΗΣ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ (ΤΤΑ) ΣΤΟ ΠΡΟΖΥΜΙ

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις pH και οξύτητας τόσο στο υγρό προζύμι (1^ο προζύμι, 18h επώαση, 30 °C) μετά την πρώτη επώαση για 18 h όσο και στο προζύμι πριν το ψήσιμο (2^ο προζύμι, επιπλέον 18h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου) σε στελέχη που επιλέχθηκαν μετά από μελέτη διαφόρων ιδιοτήτων και έδωσαν επιθυμητά αποτελέσματα. Τα 24 στελέχη που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 και 9.

Όπως απεικονίζεται, το pH στο 1^ο προζύμι (υγρό προζύμι) κυμαίνεται από 3.25 έως 4.57. Την πιο χαμηλή τιμή παρουσιάζει το στέλεχος LQC 1976 και την υψηλότερη το LQC 843. Αντίστοιχα, το pH στο 2^ο προζύμι παρουσιάζει τιμές από 3.23 έως 4.50 με την κατώτερη τιμή pH να παρατηρείται στο προζύμι ενοφθαλμισμένο με το στέλεχος LQC 1979 και την ανώτερη στο προζύμι με το LQC 843. Τέλος, σε γενικές γραμμές βλέπουμε ότι το pH παρουσιάζει μικρή μείωση από το αρχικό υγρό προζύμι στο τελικό προζύμι.

Πίνακας 8: Μετρήσεις pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στο 1^ο προζύμι (υγρό προζύμι, 18 h επώαση, 30 °C).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ (% Γαλακτικό οξύ)
MARTYΡΑΣ	4.96 ± 0.02	3.02 ± 0.02

[†] Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές pH είναι ανεξάρτητοι από τους δείκτες που σχετίζονται με την οξύτητα.

LQC 17	3.38 ± 0.02 ^c	5.72 ± 0.02 ^k
LQC 169	4.06 ± 0.03 ^j	2.43 ± 0.04 ^b
LQC 228	4.09 ± 0.02 ^{j,k}	2.37 ± 0.02 ^{a,b}
LQC 233	4.11 ± 0.01 ^{j,k}	2.32 ± 0.02 ^a
LQC 740	3.65 ± 0.02 ^g	5.89 ± 0.05 ^m
LQC 771	3.49 ± 0.04 ^{d,e}	3.93 ± 0.04 ^g
LQC 843	4.57 ± 0.01 ^m	3.43 ± 0.04 ^{d,e}
LQC 882	3.28 ± 0.04 ^a	6.03 ± 0.04 ⁿ
LQC 883	3.48 ± 0.01 ^d	4.42 ± 0.02 ^j
LQC 1641	3.82 ± 0.01 ⁱ	4.29 ± 0.02 ⁱ
LQC 1670	3.72 ± 0.04 ^h	3.67 ± 0.04 ^f
LQC 1673	4.18 ± 0.01 ^l	3.74 ± 0.05 ^f
LQC 1680	4.12 ± 0.01 ^k	3.40 ± 0.01 ^d
LQC 1704	3.87 ± 0.01 ⁱ	3.09 ± 0.03 ^c
LQC 1936	3.54 ± 0.04 ^{e,f}	3.92 ± 0.01 ^g
LQC 1938	4.08 ± 0.01 ^{j,k}	3.48 ± 0.02 ^e
LQC 1944	3.57 ± 0.04 ^f	4.37 ± 0.04 ^j
LQC 1950	3.34 ± 0.01 ^{b,c}	5.99 ± 0.02 ⁿ
LQC 1966	3.54 ± 0.03 ^{e,f}	4.19 ± 0.02 ^h
LQC 1976	3.25 ± 0.03 ^a	5.74 ± 0.02 ^{k,l}
LQC 1978	3.34 ± 0.03 ^{b,c}	5.87 ± 0.04 ^m
LQC 1979	3.28 ± 0.04 ^a	5.80 ± 0.02 ^l
LQC 1980	3.35 ± 0.01 ^{b,c}	5.88 ± 0.04 ^m

LQC 1984	3.30 ± 0.03 ^{a, b}	6.17 ± 0.05 ^{o‡}
----------	-----------------------------	---------------------------

Πίνακας 9: Μετρήσεις pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στο 2^ο προζύμι (επιπλέον 18 h επώαση, θερμοκρασία δωματίου).

Στέλεχος	pH	Οξύτητα (% Γαλακτικό οξύ)
LQC 17	3.36 ± 0.02 ^c	5.72 ± 0.03 ^j
LQC 169	4.01 ± 0.01 ^{i, j}	2.42 ± 0.04 ^b
LQC 228	4.06 ± 0.01 ^{j, k}	2.37 ± 0.03 ^{a, b}
LQC 233	4.06 ± 0.01 ^{j, k}	2.32 ± 0.03 ^a
LQC 740	3.65 ± 0.07 ^f	5.89 ± 0.06 ^{l, m}
LQC 771	3.42 ± 0.02 ^d	3.95 ± 0.04 ^f
LQC 843	4.50 ± 0.01 ⁿ	3.44 ± 0.05 ^d
LQC 882	3.24 ± 0.02 ^a	6.03 ± 0.06 ^o
LQC 883	3.52 ± 0.02 ^e	4.43 ± 0.01 ⁱ
LQC 1641	3.77 ± 0.03 ^g	4.29 ± 0.03 ^h
LQC 1670	3.64 ± 0.01 ^f	3.67 ± 0.05 ^e
LQC 1673	4.21 ± 0.01 ^m	3.74 ± 0.07 ^e
LQC 1680	4.07 ± 0.03 ^l	3.40 ± 0.01 ^d
LQC 1704	3.82 ± 0.03 ^h	3.09 ± 0.04 ^c
LQC 1936	3.51 ± 0.01 ^e	3.91 ± 0.01 ^f

[‡] Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές pH είναι ανεξάρτητοι από τους δείκτες που σχετίζονται με την οξύτητα.

LQC 1938	3.99 ± 0.01 ⁱ	3.48 ± 0.03 ^d
LQC 1944	3.53 ± 0.04 ^e	4.38 ± 0.04 ⁱ
LQC 1950	3.29 ± 0.01 ^b	5.99 ± 0.03 ^{n, o}
LQC 1966	3.49 ± 0.01 ^e	4.19 ± 0.03 ^g
LQC 1976	3.29 ± 0.01 ^b	5.74 ± 0.03 ^{j, k}
LQC 1978	3.27 ± 0.01 ^{a, b}	5.87 ± 0.05 ^{l, m}
LQC 1979	3.23 ± 0.01 ^a	5.82 ± 0.01 ^{k, l}
LQC 1980	3.29 ± 0.02 ^b	5.92 ± 0.01 ^{m, n}
LQC 1984	3.25 ± 0.02 ^{a, b}	6.18 ± 0.06 ^{p*}

3.3.6 ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ

Η απαρίθμηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Παράγραφο 2.6.3, της ενότητας Υλικά & Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα μέτρησης τόσο από 1^ο προζύμι (υγρό προζύμι - μετά από 18 h επώασης στους 30 °C), όσο και από το 2^ο (προζύμι πριν το ψήσιμο - μετά από επιπλέον 18 h επώασης σε θερμοκρασία δωματίου) παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 10.

Συγκεκριμένα, στο 1^ο και στο 2^ο προζύμι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε από 8.94 – 9.98 CFU/ g και 9.37 – 10.23 CFU/ g αντίστοιχα, με τις τιμές να παρουσιάζουν αύξηση μικρότερη του ενός λογαρίθμου από το 1^ο στο 2^ο προζύμι.

Πίνακας 10: Απαρίθμηση αποικιών στελεχών *Lb. plantarum* στο 1^ο (υγρό προζύμι, 18h επώαση, 30 °C) και στο 2^ο προζύμι (επιπλέον 18h επώαση, θερμοκρασία δωματίου).

Στέλεχος	Πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων (CFU/g) –	Πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων (CFU/g) –
	1 ^ο προζύμι	2 ^ο προζύμι

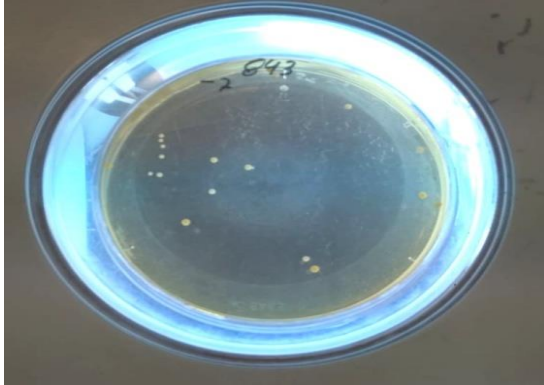
* Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές pH είναι ανεξάρτητοι από τους δείκτες που σχετίζονται με την οξύτητα.

LQC 17	9.56 ± 0.06 ^{c, d, e, f, g, h}	9.88 ± 0.04 ^{g, h, i}
LQC 169	9.37 ± 0.16 ^{b, c, d, e}	9.71 ± 0.05 ^{d, e}
LQC 228	9.67 ± 0.10 ^{f, g, h, i}	9.92 ± 0.03 ^{h, i}
LQC 233	9.81 ± 0.05 ^{h, i, j}	10.03 ± 0.01 ^{j, k}
LQC 740	9.22 ± 0.11 ^{a, b}	9.96 ± 0.01 ^{i, j}
LQC 771	9.35 ± 0.07 ^{b, c}	9.91 ± 0.05 ^{h, i}
LQC 843	9.36 ± 0.12 ^{b, c, d}	10.23 ± 0.03 ^l
LQC 882	9.38 ± 0.14 ^{b, c, d, e, f}	10.21 ± 0.03 ^l
LQC 883	9.40 ± 0.13 ^{b, c, d, e, f, g}	9.88 ± 0.05 ^{g, h, i}
LQC 1641	9.45 ± 0.10 ^{b, c, d, e, f, g}	9.59 ± 0.01 ^{b, c}
LQC 1670	9.55 ± 0.05 ^{c, d, e, f, g, h}	9.72 ± 0.04 ^{d, e}
LQC 1673	9.66 ± 0.08 ^{e, f, g, h, i}	9.75 ± 0.04 ^{e, f}
LQC 1680	9.64 ± 0.05 ^{c, d, e, f, g, h}	9.71 ± 0.01 ^{d, e}
LQC 1704	9.56 ± 0.08 ^{c, d, e, f, g, h}	7.97 ± 0.03 ^{b, c}
LQC 1936	9.82 ± 0.05 ^{h, i, j}	9.87 ± 0.04 ^{g, h, i}
LQC 1938	8.94 ± 0.34 ^a	9.37 ± 0.09 ^a
LQC 1944	8.99 ± 0.41 ^a	9.40 ± 0.14 ^a
LQC 1950	9.39 ± 0.10 ^{b, c, d, e, f, g}	9.52 ± 0.06 ^b
LQC 1966	9.20 ± 0.23 ^{a, b}	9.63 ± 0.04 ^{c, d}
LQC 1976	9.68 ± 0.05 ^{g, h, i}	9.79 ± 0.02 ^{e, f, g}
LQC 1978	9.94 ± 0.05 ^{i, j}	10.08 ± 0.02 ^k
LQC 1979	9.98 ± 0.04 ^j	10.02 ± 0.03 ^{j, k}
LQC 1980	9.75 ± 0.07 ^{h, i, j}	9.83 ± 0.05 ^{f, g, h}

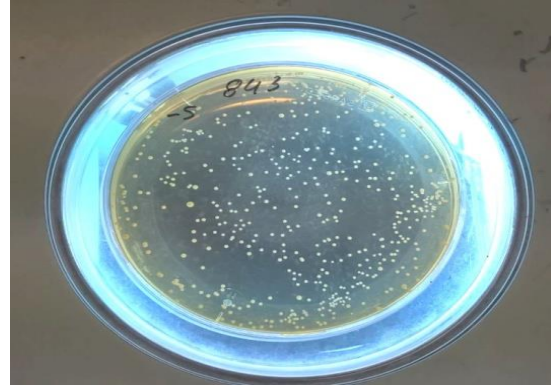
LQC 1984

9.65 ± 0.03 d, e, f, g, h, i

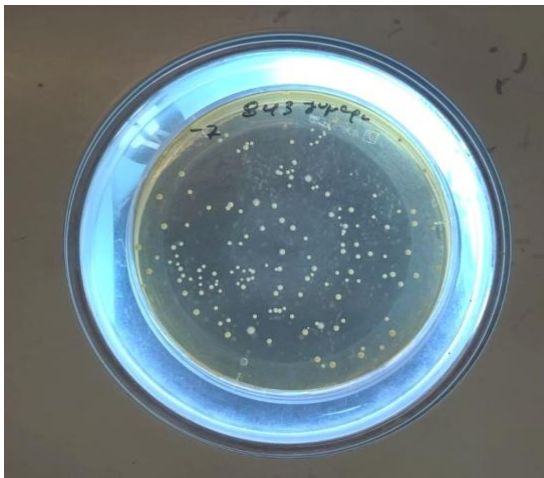
9.76 ± 0.02 e, f*



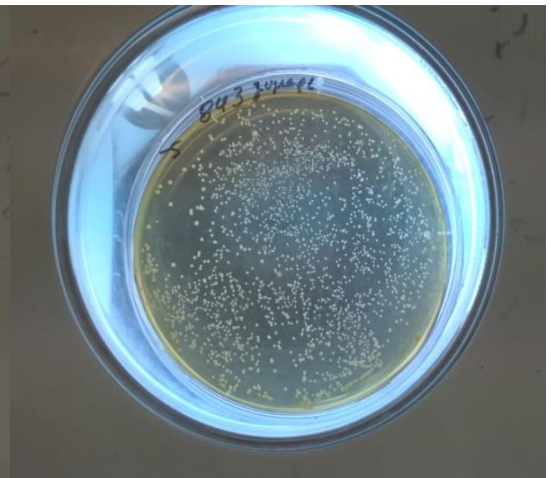
Εικόνα 37: Αποικίες του στελέχους LQC 843 (από 1^ο προζύμι) σε τρυβλία με MRS broth, σε αραίωση -7.



Εικόνα 38: Αποικίες του στελέχους LQC 843 (από 1^ο προζύμι) σε τρυβλία με MRS broth, σε αραίωση -5.



Εικόνα 39: Αποικίες του στελέχους LQC 843 (από 2^ο προζύμι) σε τρυβλία με MRS broth, σε αραίωση -7.



Εικόνα 40: Αποικίες του στελέχους LQC 843 (από 2^ο προζύμι) σε τρυβλία με MRS broth, σε αραίωση -5.

* Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο 1^ο προζύμι είναι ανεξάρτητοι από τους δείκτες των τιμών που αφορούν τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο 2^ο προζύμι.

3.4 ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Σε πρώτο στάδιο 78 στελέχη *Lb. plantarum* μελετήθηκαν ως προς την ύπαρξη αντιμυκητιακής δραστηριότητας, σε επίπεδο τρυβλίου, με την ενσωμάτωση μύκητα γένους *Aspergillus* (όπως περιγράφεται στην πργρ. 2.4.6 της ενότητας Υλικά & Μέθοδοι). Τέτοιου είδους μύκητες επιλέχθηκαν λόγω του ότι αποτελούν αντιπροσωπευτικό γένος μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα, αλλά και λόγω της ικανότητας τους να παράγουν μυκοτοξίνες. Η εμφάνιση ζώνης που δεν είχε καλυφθεί με την καρποφορία του μύκητα αποτέλεσε ένδειξη αντιμυκητιακής ικανότητας του αντίστοιχου στελέχους. Στις *Εικόνες 41-45* παρουσιάζονται ενδεικτικά τόσο στελέχη που παρουσίασαν όσο και στελέχη που δεν παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση.

Πιο αναλυτικά, 13 στελέχη *Lb. plantarum* παρουσίασαν τέτοια δράση και παρουσιάζονται στον *Πίνακα 11* μαζί με την πηγή απομόνωσής τους.

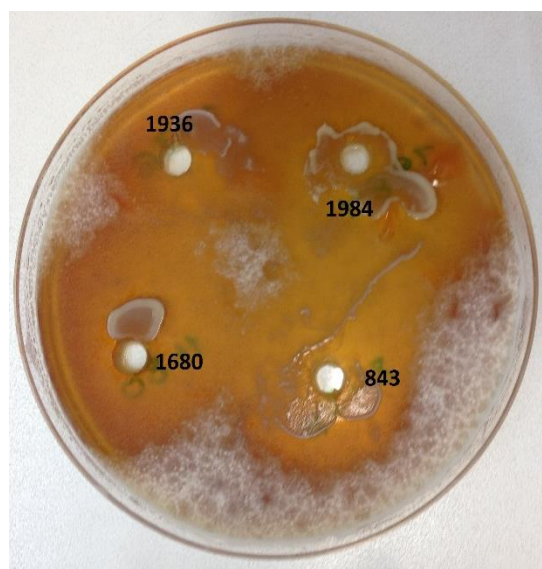
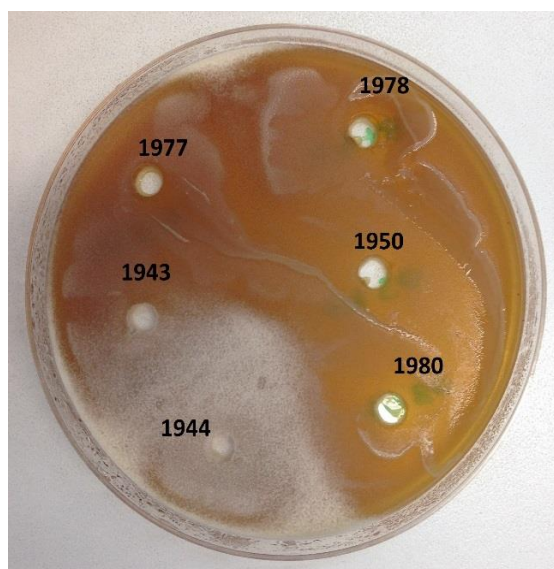
Πίνακας 11: Στελέχη *Lb. plantarum* με αντιμυκητιακή δράση και οι διαφορετικές πηγές απομόνωσής τους.

Πηγή απομόνωσης	Στέλεχος
<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση αλλαντικού)	LQC 771
	LQC 843
<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση λαχανικού)	LQC 1673
	LQC 1680
<i>Lb. plantarum</i> (ζύμωση προζυμίου)	LQC 1936
	LQC 1950
	LQC 1966
	LQC 1976
	LQC 1977
	LQC 1978
	LQC 1979

LQC 1980

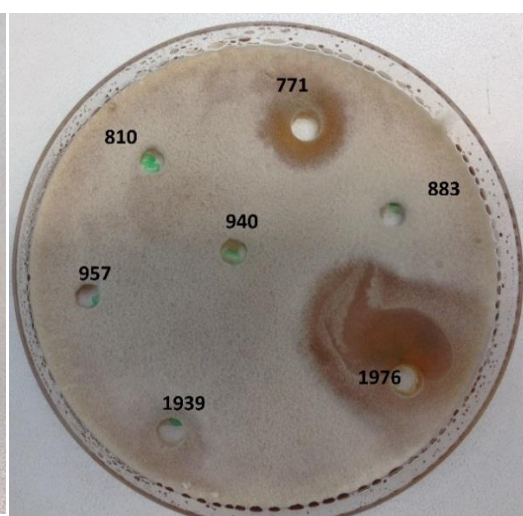
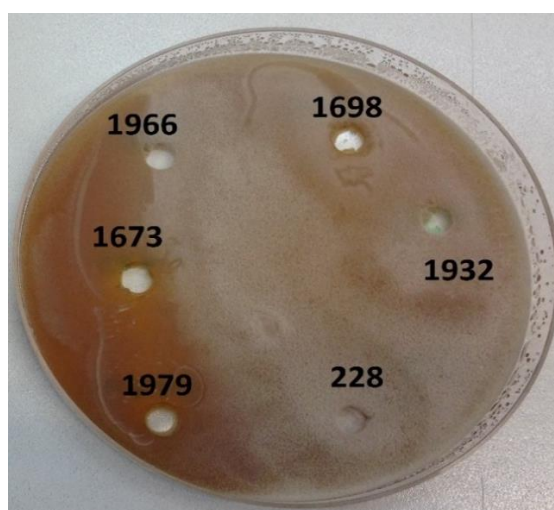
LQC 1984

Η πλειοψηφία των στελεχών (δηλ. LQC 1936, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1977, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980 και LQC 1984), προέρχονται από προζύμι, ενώ τα LQC 771 και LQC 843 είχαν ως πηγή απομόνωσης ζυμούμενα αλλαντικά, τέλος, τα στελέχη LQC 1673 και LQC 1680 είχαν απομονωθεί από κουνουπίδι (Εικόνες 36 - 39).



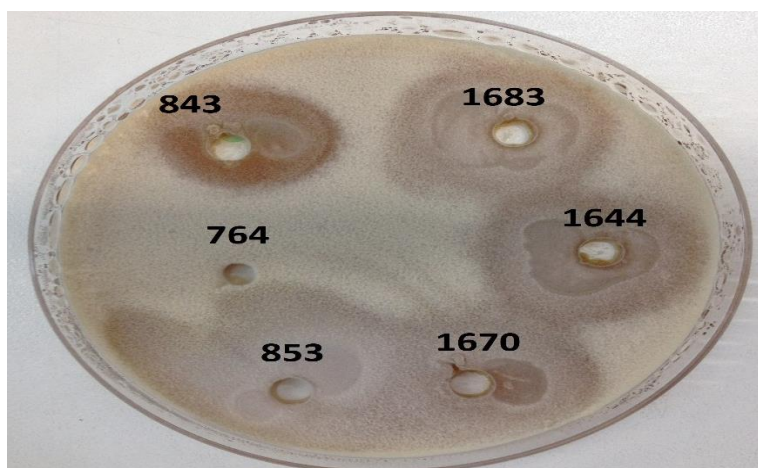
Εικόνα 41 : Στελέχη με αντιμυκητιακή ικανότητα (LQC 1977, LQC 1978, LQC 1950, LQC 1980).

Εικόνα 42: Στελέχη με αντιμυκητιακή ικανότητα (LQC 1936, LQC 1984, LQC 1680, LQC 843).



Εικόνα 43: Στελέχη με αντιμυκητιακή ικανότητα (LQC 1673, LQC 1979).

Εικόνα 44: Στελέχη με αντιμυκητιακή ικανότητα (LQC 771, LQC 1976).



Εικόνα 45: Στέλεχος LQC 843 με αντιμυκητιακή δράση και άλλα στελέχη χωρίς αντιμυκητιακή ικανότητα.

Στην συνέχεια τα 13 στελέχη που παρουσίασαν ισχυρή αντιμυκητιακή ικανότητα αναπτύχθηκαν εκ νέου υποβλήθηκαν σε ενζυματική, θερμική κατεργασία και ανάπτυξη σε διάφορες τιμές pH (όπως περιγράφονται στην Παράγραφο 2.4.6). Επίσης αναπτύχθηκαν χωρίς καμία κατεργασία για επιβεβαίωση της ύπαρξης αντιμυκητιακής δραστηριότητας (Μάρτυρας) τα αποτελέσματα των οποίων παρατείθενται συνοπτικά στον Πίνακα 12.

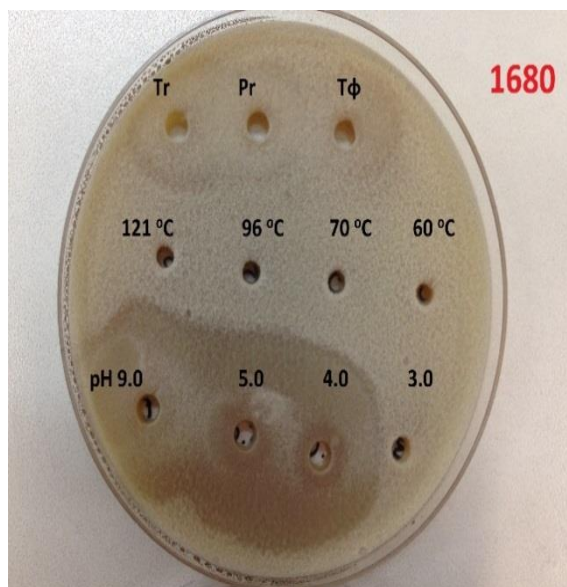
Πιο αναλυτικά, το κάθε στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία 2 διαφορετικών πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεάση και θρυψίνη) καθώς και σε 4 διαφορετικές τιμές pH (3.0, 4.0, 5.0 και 9.0) και 4 τιμές θερμοκρασίας (60, 70, 96 και 121 °C). (Εικόνες 46 - 49).

Πίνακας 12: Αντιμυκητιακή ικανότητα στελεχών του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lb. plantarum*. Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως (+/-), με (+): διατήρηση της αντιμυκητιακής δράσης των στελεχών και (-): αναστολή της αντιμυκητιακής δράσης των στελεχών. Τα πειράματα επαναλαμβάνονται δύο φορές.

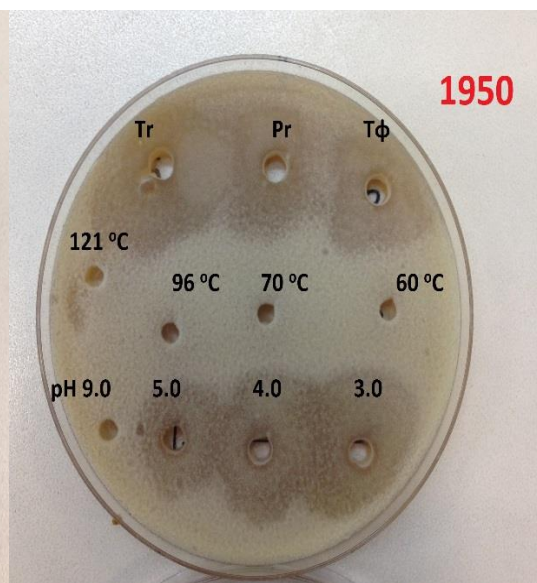
Στέλεχος	Μάρτυρας	Πρωτεολυτικά Ένζυμα		Τιμές pH				Θερμοκρασία (°C)			
		Θρυψίνη (Trypsin)	Πρωτεάση (Protease)	3.0	4.0	5.0	9.0	60	70	96	121
771	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
843	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

1673	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
1680	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
1936	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1950	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1966	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1976	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
1977	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
1978	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1979	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
1980	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
1984	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

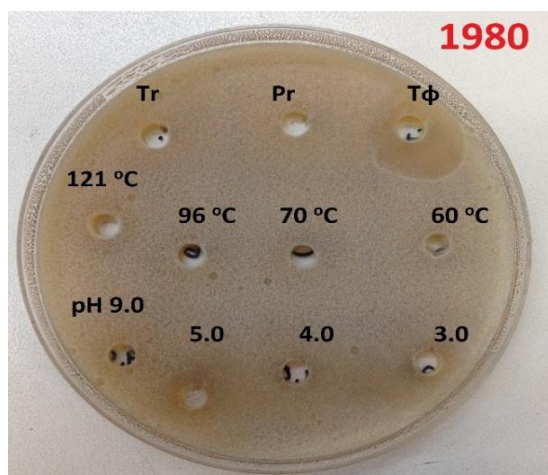
+ : διατηρείται η αντιμυκητιακή δράση του στελέχους.
 - : δεν ανιχνεύεται καμία αντιμυκητιακή δραστηριότητα.



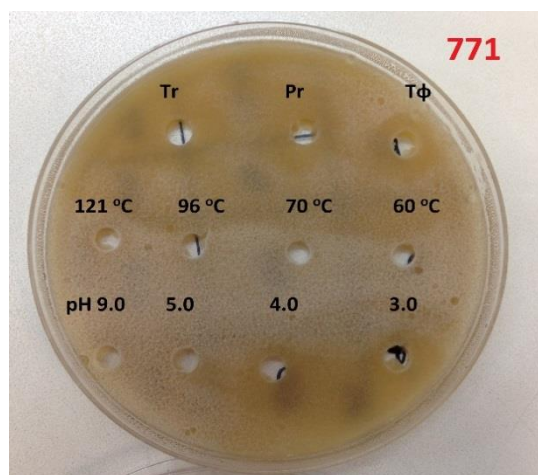
Εικόνα 46: Στέλεχος LQC 1680.



Εικόνα 47: Στέλεχος LQC 1950.



Εικόνα 48: Στέλεχος LQC 1980.



Εικόνα 49: Στέλεχος LQC 771.

Γενικώς παρατηρείται ότι από τα 9 στελέχη, με πηγή απομόνωσης το προζύμι, τα 4 – και πιο συγκεκριμένα τα LQC 1976, LQC 1977, LQC 1978 και LQC 1979 – διατηρούν την αντιμυκητιακή τους δράση σε όλες τις τιμές pH, και 2 - τα LQC 1936, LQC 1950 -διατηρούν την δράση αυτή στις χαμηλότερες τιμές pH ενώ δεν ανιχνεύεται καμία αντιμυκητιακή δραστηριότητα στο pH 9.0.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα στελέχη LQC 1966, LQC 1980 και LQC 1984 (με πηγή απομόνωσης το προζύμι) που δεν παρουσιάζουν παρεμπόδιση μετά την ενζυμική κατεργασία με πρωτεάση και θρυψίνη, κάτι που υποδεικνύει την πρωτεϊνική τους φύση.

3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ/ (HPLC)

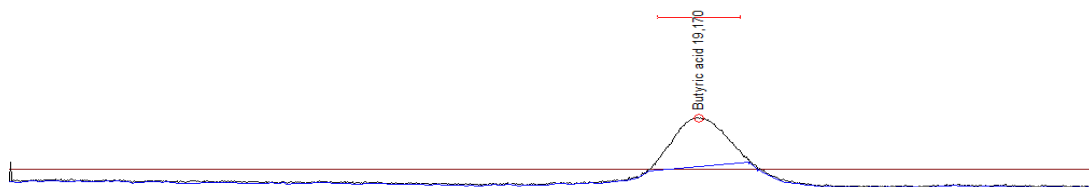
Με την μέθοδο διάχυσης σε στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται παραπάνω, φαίνεται ότι τα 13 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, LQC 771, LQC 843, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1936, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1977, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984 παρουσιάζουν αντιμυκητιακές δραστηριότητες που μπορεί να οφείλονται, είτε σε πρωτεϊνικής φύσης ενώσεις ή σε άλλες όπως οργανικά οξέα. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται με την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η ποσοτική ανάλυση εκτελείται με βάση πρότυπες καμπύλες σχεδιασμένες για κάθε ένωση. Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, αλκοόλες όπως η γλυκερόλη και η αιθανόλη αλλά και οργανικά οξέα όπως γαλακτικό, οξικό, μηλικό, κιτρικό οξύ κ.ά. που

παρουσιάζονται στον Πίνακα 13 μαζί με τους χρόνους κατακράτησης (retention time – Rt) υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

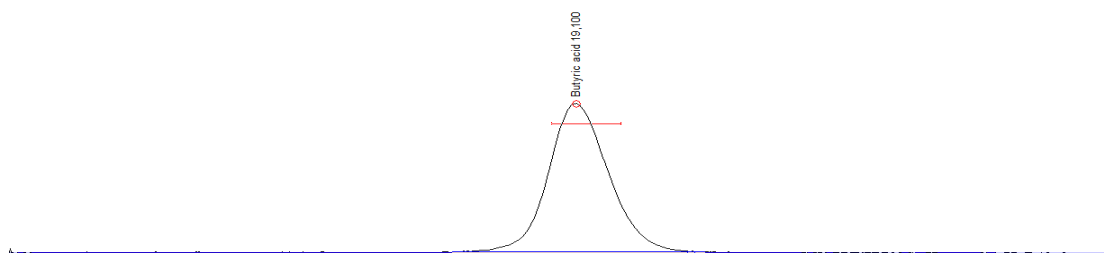
Πίνακας 13: Χρόνος κατακράτησης (retention time) πρότυπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην HPLC, με στήλη Aminex HPX-87H.

Παράμετροι:	Συνθήκες:
T (° C)	35
Συγκέντρωση H ₂ SO ₄ (mM)	5

Πρότυπες Ενώσεις	Χρόνος Κατακράτησης (min)
Αιθανόλη	19.97
Γλυκόζη	7.44
Φρουκτόζη	8.35
Γλυκερόλη	12.26
Γαλακτικό οξύ	10.83
Οξικό οξύ	13.03
Μηλικό οξύ	8.47
Κιτρικό οξύ	6.90
3-Φαινυλ-γαλακτικό οξύ	15.05
Προπιονικό οξύ	15.47
Βουτυρικό οξύ	19.13
Ηλεκτρικό οξύ	10.45
Τρυγικό οξύ	7.50
Βενζοϊκό κάλλιο	7.15



Εικόνα 50: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς βουτυρικού οξέος (UV).



Εικόνα 51: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς βουτυρικού οξέος (RI).

Όπως αναφέρθηκε, για να αξιολογηθεί ο τρόπος κατανάλωσης των σακχάρων και η παραγωγή των μεταβολιτών, από τις μονοκαλλιέργειες στελεχών του προαιρετικά ετεροζυμωτικού βακτηρίου *Lb. plantarum*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MRS broth, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 14. Το *Lb. plantarum* μπορεί να μεταβολίσει τη γλυκόζη, η οποία αποτέλεσε την αποκλειστική πηγή υδατάνθρακων στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Στα περισσότερα στελέχη δεν παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης, αλλά παράχθηκαν γαλακτικό και οξικό οξύ. Τρία στελέχη *Lb. plantarum* παρουσίασαν πλήρη κατανάλωση της γλυκόζης και ήταν τα LQC 1977, LQC 1979 και LQC 1980. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της

κατανάλωσης των σακχάρων καθώς και η παραγωγή των μεταβολιτών από τα 13 στελέχη *Lb. plantarum* που παρουσίασαν αντιμυκητιακές ιδιότητες.

Πίνακας 14: Σύσταση (g/ L) του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης MRS broth (LAB M, UK).

Σύσταση	g/ L
Μικτές πεπτόνες (Mixed peptones)	10.0
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	5.0
Εκχύλισμα κρέατος (Beef extract)	10.0
Γλυκόζη (Glucose)	20.0
Φωσφορικό κάλλιο (Potassium phosphate)	2.0
Οξικό νάτριο (Sodium acetate)	5.0
Θειικό μαγνήσιο (Magnesium sulphate)	0.2
Θειικό μαγγάνιο (Manganese sulphate)	0.05
Tween® 80	1.08
Κιτρικό αμμώνιο (Ammonium citrate)	2.0

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής μεταβολιτών από 13 στελέχη *Lb. plantarum*.

Στέλεχος	Κατανάλωση Σακχάρων (mM)			
	Γλυκόζη (110 mM) ¹	Κιτρικό οξύ (0,14832 mM) ²	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ (0,0921mM) ³
LQC 771	-81,169	0,129	84,143	4,655
LQC 843	-85,107	0,024	81,173	-
LQC 1673	-57,386	0,055	98,039	2,354
LQC 1680	-84,744	0,041	67,119	-

LQC 1936	-27,792	0,131	45,113	6,249
LQC 1950	-25,368	0,135	73,874	-
LQC 1966	-78,690	0,157	46,497	-
LQC 1976	-102,259	0,140	152,839	2,819
LQC 1977	-110	0,140	160,560	-
LQC 1978	-99,945	0,124	188,281	3,22
LQC 1979	-110	0,126	182,654	-
LQC 1980	-110	0,151	116,504	4,237
LQC 1984	-100,136	0,112	84,714	3,926

1. Αρχική συγκέντρωση (mM) γλυκόζης στο υπόστωμα MRS broth.
2. Αρχική συγκέντρωση (mM) κιτρικού οξέος στο υπόστωμα MRS broth.
3. Αρχική συγκέντρωση (mM) οξικού οξέος στο υπόστωμα MRS broth.

Σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα, η κατανάλωση της γλυκόζης από τα στελέχη *Lb. plantarum* κυμάνθηκε από 25,368 mM έως 110 mM (πλήρης κατανάλωση). Τρία στελέχη *Lb. plantarum* παρουσίασαν πλήρη κατανάλωση της γλυκόζης. Πιο αναλυτικά τα LQC 1977, LQC 1979 και LQC 1980 παρουσίασαν πλήρη καταβολισμό της γλυκόζης και αυτό είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε στοιχειομετρική αναλογία περίπου 1:2. Τα LQC 1976, LQC 1978 παρουσίασαν εξίσου υψηλή κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού (στοιχειομετρική αναλογία 1:2) και οξικού οξέος. Στα στελέχη LQC 1984, LQC 771 και LQC 843 που παρουσιάζουν υψηλή κατανάλωση γλυκόζης, παράγεται μικρότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος από την αναμενόμενη.

Αναφορικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος, το οποίο υπήρχε σε αρχική συγκέντρωση 0,14832 mM, στα στελέχη LQC 843, LQC 1673, LQC 1680 παρουσίασε πολύ μικρότερες τιμές. Στα υπόλοιπα 10 στελέχη η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0,111780 έως 0,157182 (Πίνακας 15).

Τέλος όσον αφορά στο οξικό οξύ, μόνο 7 από τα 13 στελέχη παρήγαγαν οξικό οξύ με τις τιμές του να παρουσιάζουν εύρος από 2,3544 έως 6,2492 mM.

3.6 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Μετά την εκτίμηση των παραμέτρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, pH, οξύτητα, αντιμυκητιακή δράση, πρωτεολυτική και λιπολυτική ικανότητα, επιλέχθηκαν στελέχη

για την δημιουργία προζυμιού και κατ'έπекταση την παρασκευή ψωμιού με προζύμι. Στην συνέχεια, ακολούθησε η οργανοληπτική αξιολόγηση του ψωμιού που , το πρότυπο της οποίας επισυνάπτεται στο *Παράρτημα I* και ο τρόπος διεξαγωγής της περιγράφεται αναλυτικά στην προηγούμενη Ενότητα των Υλικών και Μεθόδων.

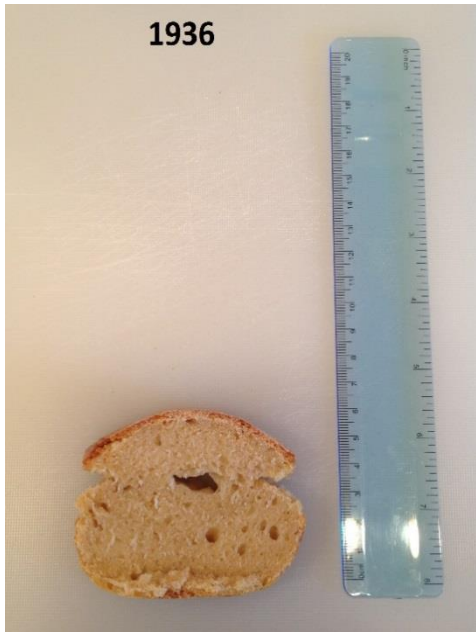
Συνολικά τα δείγματα ψωμιού με προζύμι που παρασκευάστηκαν και κατ'έπекταση αξιολογήθηκαν ήταν 24, 10 δείγματα που είχαν ως καλλιέργεια εκκίνησης στέλεχη *Lb. plantarum* με πηγή απομόνωσης το προζύμι (LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980 και LQC 1984) 5 δείγματα είχαν ως καλλιέργεια εκκίνησης στέλεχη *Lb. plantarum* με πηγή απομόνωσης το κουνουπίδι (LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680 και LQC 1704) και 9 δείγματα που είχαν ως καλλιέργεια εκκίνησης στέλεχη *Lb. plantarum* με πηγή απομόνωσης τα αλλαντικά (LQC 17, LQC228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883) (*Εικόνες 52-57*).



Εικόνα 52: Ψωμί με προζύμι πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1980, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Εικόνα 53: Ψωμί με προζύμι πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1704, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Εικόνα 54: Ψωμί με προζύμι πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 740, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.



Εικόνα 55: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1936, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.



Εικόνα 56: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1641, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.



Εικόνα 57: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 882,, κατά τη διεξαγωγή οργανοληπτικής αξιολόγησης.



Εικόνα 58: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1673, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.



Εικόνα 59: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1673, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.



Εικόνα 60: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1673, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.



Εικόνα 61: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1960, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.

Εικόνα 62: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1960, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.

Εικόνα 63: Δείγμα ψωμιού πειραματικής αρτοποιίας, με καλλιέργεια εκκίνησης το στέλεχος LQC 1960, κατά τη διεξαγωγή αξιολόγησης παραμέτρων της εμφάνισης.

Όπως αναγράφεται και στο έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης, τα δείγματα ψωμιού αξιολογήθηκαν ως προς 4 παραμέτρους, την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση και την υφή και στο τέλος πραγματοποιήθηκε μια συνολική αξιολόγηση για κάθε δείγμα (Εικόνες 58-63). Τέλος, τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού ANOVA.

Στα Διαγράμματα (1-7) αποτυπώνονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς τις 4 παραμέτρους, την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση και την υφή. Η εκτίμηση των δειγμάτων και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη τιμή της διαμέσου (median value) των χαρακτηριστικών αυτών.

3.6.1 Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς την εμφάνιση

Όσον αφορά την εκτίμηση της εμφάνισης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι, αυτή πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο το ψωμί (breadloaf), στην κόρα (crust) και στην ψίχα (crumb). Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης γι' αυτό το χαρακτηριστικό αποτυπώνονται στα Διαγράμματα 1 και 2. Έτσι, η αξιολόγηση της εμφάνισης περιλαμβάνει ως επιμέρους παραμέτρους το χρώμα (colour intensity), τον βαθμό

λάμψης (shininess), τον βαθμό διόγκωσης (leavening) και την περίσσεια αλεύρου στην επιφάνεια (flouryness) όσον αφορά ολόκληρο το ψωμί (breadloaf), επίσης το χρώμα (colour intensity), την λεπτότητα (thickness) και την ύπαρξη ρωγμών (crookedness) που αφορούν την κόρα και τέλος τις παραμέτρους χρώμα (colour intensity), μέγεθος πόρων (pore size), ομοιογένεια πόρων (pore regularity) και ύπαρξη ακατέργαστης ζύμης (raw streak) που σχετίζονται με την ψίχα.

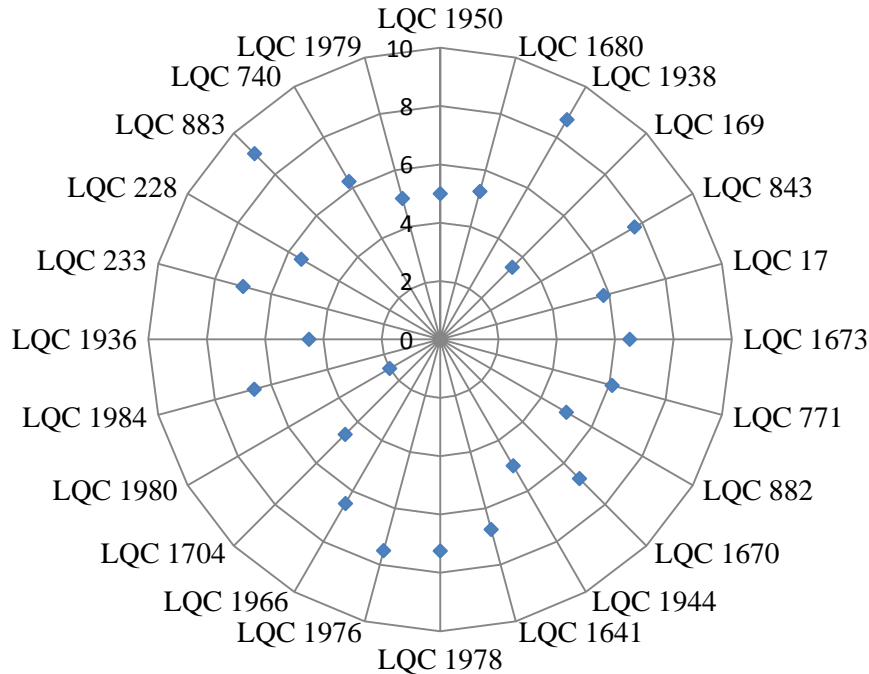
Ως προς το χρώμα σε ολόκληρο το ψωμί, που κυμαινόταν από λευκό (μικρότερη ένταση) έως σκούρο καφέ/ μαύρο (μεγαλύτερη ένταση), τα LQC 740 και LQC 843 ήταν εκείνα με τη μεγαλύτερη διάμεσο (median), ενώ το LQC 169 παρουσίασε λευκούς χρωματισμούς. Όμοια η ένταση του χρώματος αξιολογήθηκε για την κόρα, όπου υψηλότερη τιμή παρουσίασε το δείγμα με εναρκτήρια καλλιέργεια το στέλεχος LQC 843 και χαμηλότερη τιμή τα LQC 169 και LQC 1936. Ίδια αποτελέσματα όσον αφορά το χρώμα παρουσιάζονται και για την ψίχα όσον αφορά τις χαμηλότερες τιμές, ενώ υψηλότερη τιμή παρουσίασε το δείγμα με εναρκτήρια καλλιέργεια το στέλεχος LQC 233. Ως προς την αξιολόγηση της λάμψης, που ορίστηκε ως η αντανάκλαση του φωτός στην κόρα του ψωμιού-και χαρακτηρίστηκε από μηδενική (0) έως καθαρή φωτεινή (10)- τα δείγματα ψωμιού παρουσίασαν χαμηλές ως μέσες τιμές, με υψηλότερες να έχουν τα δείγματα με καλλιέργειες εκκίνησης τα στελέχη LQC 1950 και LQC 740. Αναφορικά με τον βαθμό διόγκωσης των δειγμάτων, που κυμάνθηκε από επίπεδο - έλλειψη όγκου (χαμηλότερες τιμές) ως στρογγυλό - κυλινδρικό καρβέλι ψωμιού (υψηλότερες τιμές), τις χαμηλότερες τιμές φαίνεται να παρουσιάζουν δείγματα με εναρκτήρια καλλιέργεια τα LQC 1936, LQC 17 και LQC 771 και τις υψηλότερες το LQC 843, LQC 1950 και LQC 1673. Ακόμα, σχετικά με το τελευταίο χαρακτήρα που εξετάστηκε στην κόρα, την περίσσεια αλεύρου στην επιφάνεια, οι τιμές κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, με τα περισσότερα δείγματα να παρουσιάζουν μηδενική διάμεσο (median).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την εκτίμηση της εμφάνισης (appearance), εκτός του ψωμιού εξωτερικά, αξιολογήθηκαν τόσο η κόρα όσο και η ψίχα. Έτσι, σχετικά με την κόρα πέραν του χρώματος που αναλύθηκε παραπάνω, αξιολογήθηκε και η λεπτότητα αυτής (δηλ. το πλάτος της κόρας του ψωμιού και ορίστηκε από πολύ λεπτή – χαμηλές τιμές- έως πολύ παχιά –υψηλότερες τιμές). Τα 2 δείγματα ψωμιού με τα LQC 1641 και LQC 883 ως καλλιέργειες εκκίνησης παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές (μεγαλύτερο πάχος κόρας). Τέλος, σχετικά με την κόρα εκτιμήθηκε και η παρουσία ή όχι ρωγμών. Το στέλεχος που έδωσε ψωμί με τις περισσότερες ρωγμές (υψηλότερη

διάμεσος) ήταν το LQC 1680, ενώ υπήρχαν και στελέχη που παρουσίασαν πολύ χαμηλές ως και μηδενικές τιμές για αυτήν την παράμετρο ήταν τα LQC 771, LQC 882, LQC 1984, LQC 233, LQC 238, LQC 740.

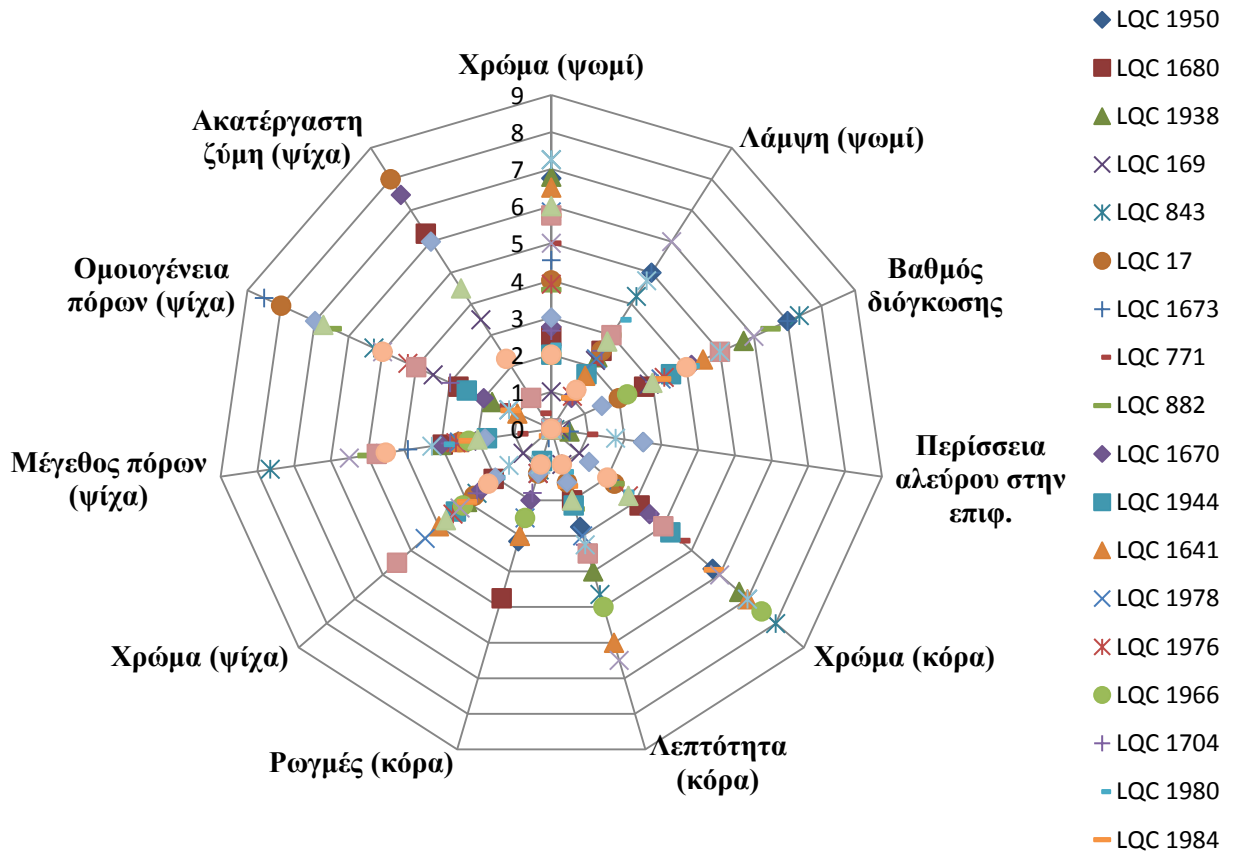
Για την ολοκλήρωση της εκτίμησης της εμφάνισης, αξιολογήθηκαν και οι παράμετροι του μεγέθους και της ομοιογένειας των πόρων και της ύπαρξης ακατέργαστης ζύμης που αφορούν την ψίχα. Σχετικά με την ομοιογένεια, ομοιόμορφα κατανεμημένοι πόροι στο εσωτερικό του ψωμιού συνδέθηκαν με χαμηλές διαμέσους (median) και ακανόνιστοι πόροι με υψηλές. Έτσι, ακανόνιστους πόρους παρουσίασαν τα 3 ψωμιά με τα στελέχη LQC 17, LQC 1673 και LQC 1936 αντίστοιχα, ενώ ομοιογένεια στους πόρους παρουσίασε η πλειοψηφία των στελεχών: τα LQC 1641, LQC 1978, LQC 1966, LQC 1984 και LQC 740. Τέλος, όσον αφορά την ανίχνευση ακατέργαστης ζύμης στην ψίχα, αξιολογήθηκε από μηδενική (χαμηλες τιμές) έως ορατό ωμό ζυμάρι στην ψίχα (υψηλότερες τιμές). Ακατέργαστη ζύμη (υψηλές διαμέσους (median) παρουσίασαν δείγματα ψωμιού με εναρκτήριοις καλλιέργειες τα στελέχη LQC 1950, LQC 17, LQC 1670.

Συνολική Αξιόγηση Εμφάνισης



Διάγραμμα 1: Αποτέλεσμα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την εμφάνιση. Η αξιολόγηση της εμφάνισης πραγματοποιήθηκε σε τρεις συνιστώσες, σε ολόκληρο το ψωμί (breadloaf), στην κόρα (crust) καθώς και την ψίχα (crumb). Η συνολική εκτίμηση της εμφάνισης κάθε δειγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Μη αποδεκτή υφή» και 10 ως «Αποδεκτή-Άριστη». Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

Παράμετροι Εμφάνισης

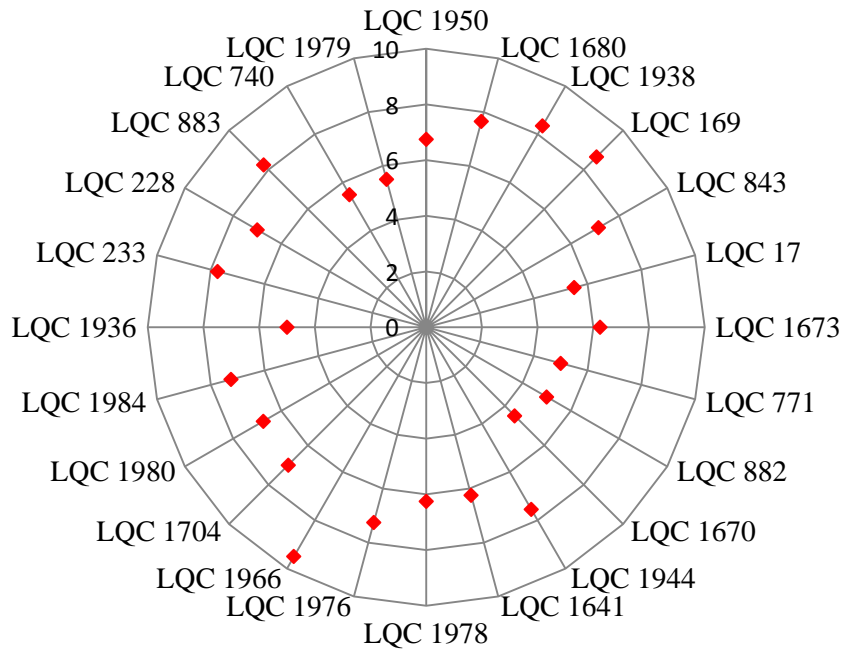


Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την εμφάνιση, που περιλαμβάνει ως επιμέρους παραμέτρους το χρώμα (colour intensity), τον βαθμό λάμψης (shininess), τον βαθμό διόγκωσης (leavening) και την περίσσεια αλεύρου στην επιφάνεια (flouryness) όσον αφορά ολόκληρο το ψωμί (breadloaf), επίσης το χρώμα (colour intensity), την λεπτότητα (thickness) και την ύπαρξη ρωγμών (crookedness) που αφορούν την κόρα και τέλος τις παραμέτρους χρώμα (colour intensity), μέγεθος πόρων (pore size), ομοιογένεια πόρων (pore regularity και ύπαρξη ακατέργαστης ζύμης (raw streak) που σχετίζονται με την ψίχα. Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

3.6.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς το άρωμα

Η δεύτερη παράμετρος ως προς την οποία εκτιμήθηκαν τα δείγματα ψωμιού με προζύμι ήταν το άρωμα, το οποίο διακρίθηκε σε 10 επιμέρους ευχάριστες και δυσάρεστες οσμές που αξιολογήθηκαν τόσο στην ψίχα όσο και στην κόρα του κάθε δείγματος. Αυτές ήταν οι εξής: άρωμα οξικού, γαλακτικού, βουτυρικού οξέος, βουτυρώδες, άρωμα λίπους γάλακτος, οσμή ξύλου, καραμέλας, μούχλας, καπνιστό άρωμα και τέλος, αλευρώδες. Το καθένα από τα αρώματα είχε ειδική επεξήγηση στο φυλλάδιο οργανοληπτικού ελέγχου προς διευκόλυνση των δοκιμαστών (Παράρτημα Ι). Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης γι' αυτό τον χαρακτήρα αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 3 και στους Πίνακες 16 και 17 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με το άρωμα της κόρας και της ψίχας αντίστοιχα.

Συνολική Αξιόγηση Αρώματος



Διάγραμμα 3: Αποτέλεσμα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς το άρωμα. Η εκτίμηση του αρώματος κάθε δείγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Δυσάρεστο» και 10 ως «Πολύ ευχάριστο». Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΑΡΩΜΑ ΚΟΡΑΣ									
	Οξικό οξύ	Βουτυρικό οξύ	Γαλακτικό οξύ	Βουτυρώδες	Λίπος γάλακτος	Εύλο	Καραμέλα	Μούγλα	Καπνιστό	Αλευρώδες
LQC 1950	33,3 %					33,3 %				33,3 %
LQC 1680							25 %		25 %	50 %
LQC 1938	50 %		50 %							
LQC 169		70 %		30 %						
LQC 843									50%	50%
LQC 17			75 %						25 %	
LQC 1673	60 %		40 %							
LQC 771		25 %				50 %				25 %
LQC 882						25 %			50 %	25 %
LQC 1670	28,6 %					42,8 %			28,6 %	
LQC 1944										100 %
LQC 1641						40 %	60 %			
LQC 1978			75 %							25 %
LQC 1976	100 %									
LQC 1966	100 %									
LQC 1704	10 %		90 %							
LQC 1980			100 %							
LQC 1984									100 %	
LQC 1936	50 %			50 %						
LQC 233	50 %									50 %
LQC 228										100 %
LQC 883							50 %		50 %	
LQC 740	33,3 %					33,3 %			33,3 %	
LQC 1979				50 %						50 %

Πίνακας 16: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς το άρωμα της κόρας.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Πίνακας 17: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς το άρωμα ψίχας.

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΑΡΩΜΑ ΨΙΧΑΣ									
	Οξικό οξύ	Βουτυρικό οξύ	Γαλακτικό οξύ	Βουτυρώδες	Λίπος γάλακτος	Ξύλο	Καραμέλα	Μούχλα	Καπνιστό	Αλευρώδες
LQC 1950	50 %		50 %							
LQC 1680	50 %			50 %						
LQC 1938	50 %		50 %							
LQC 169	25 %		50 %				25 %			
LQC 843	30 %									70 %
LQC 17	70 %		20 %							10 %
LQC 1673	100 %									
LQC 771			50 %			50 %				
LQC 882	20 %		50 %		10 %			10 %		10 %
LQC 1670	50 %		30 %		20 %					
LQC 1944	30 %		70 %							
LQC 1641	60 %		30 %							10 %
LQC 1978	50 %		50 %							
LQC 1976	75 %	25 %								
LQC 1966	100 %									10 %
LQC 1704	70 %	30 %								
LQC 1980			50 %	50 %						
LQC 1984			100 %							
LQC 1936			50 %	50 %						
LQC 233			100 %							
LQC 228			80 %							20 %
LQC 883			100 %							
LQC 740	100 %									
LQC 1979	50 %			50 %						

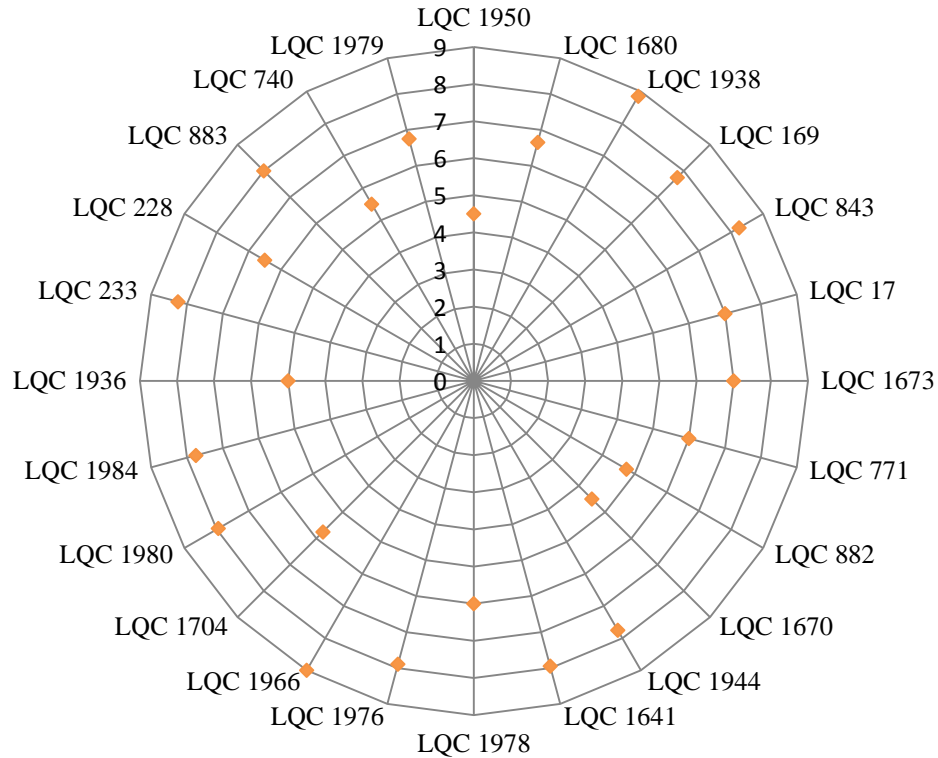
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

3.6.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς γεύσης

Η τρίτη παράμετρος ως προς την οποία εκτιμήθηκαν τα δείγματα ψωμιού με προζύμι ήταν η γεύση. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς τις 4 βασικές γεύσεις, δηλαδή πικρή, αλμυρή, ξινή και γλυκιά καθώς και τις συμπληρωματικές πικάντικη, καψαλισμένη και γεύση άχρου και λαδιού που συνδέονται με προϊόντα αρτοποιίας. Οι διαφορετικές αυτές γεύσεις αξιολογήθηκαν ξεχωριστά στην κόρα και την ψίχα. Η συνολική εκτίμηση της γεύσης κάθε δείγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Μη αποδεκτή υφή» και 10 ως «Αποδεκτή-Άριστη». Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης γι' αυτό τον χαρακτήρα αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 4 και στους Πίνακες 18 και 19 όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με τη γεύση της κόρας και της ψίχας του ψωμιού αντίστοιχα.

Έτσι, όσον αφορά την συνολική εκτίμηση της γεύσης, υψηλότερες τιμές και κατ' επέκταση καλύτερη γεύση παρουσίασαν τα δείγματα ψωμιού με καλλιέργεια εκκίνησης τα στελέχη LQC 1938 και LQC 1966 αντίστοιχα. Αντίθετα, χαμηλότερες τιμές όσον αφορά την εκτίμηση της γεύσης παρουσίασαν τα στελέχη LQC 1950 και LQC 1670.

Συνολική Εκτίμηση Γεύσης



Διάγραμμα 4: Αποτέλεσμα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την γεύση. Η εκτίμηση της γεύσης κάθε δείγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Μη αποδεκτή υφή» και 10 ως «Αποδεκτή-Άριστη». Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Πίνακας 18: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την γεύση της κόρας.

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΓΕΥΣΗ ΚΟΡΑΣ							
	Γλυκιά	Αλμυρή	Ξινή	Πικρή	Πικάντικη	Γεύση Άχυρου	Γεύση Λαδιού	Καψαλισμένη
LQC 1950			90 %			10 %		
LQC 1680						50 %		50 %
LQC 1938	50 %		50 %					
LQC 169	100 %							
LQC 843	40 %					50 %		10 %
LQC 17	40%		50 %			10 %		
LQC 1673			100 %					
LQC 771	70 %							30 %
LQC 882		20 %	80 %					
LQC 1670			70 %				30 %	
LQC 1944			100 %					
LQC 1641	10 %							90 %
LQC 1978	10 %		80 %					10 %
LQC 1976	50 %		50 %					
LQC 1966	50 %		50 %					
LQC 1704	90 %					10 %		
LQC 1980	50 %		50 %					
LQC 1984			100 %					
LQC 1936	50 %		50 %					
LQC 233			50 %				25 %	25 %
LQC 228			70 %					30 %
LQC 883	33,3 %		33,3 %				33,3 %	
LQC 740	100 %							
LQC 1979		100 %						

Πίνακας 19: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την γεύση της ψίχας.

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΓΕΥΣΗ ΨΙΧΑΣ							
	Γλυκιά	Αλμυρή	Ξινή	Πικρή	Πικάντικη	Γεύση Άχυρου	Γεύση Λαδιού	Καυγαλισμένη
LQC 1950			90 %			10 %		
LQC 1680			100 %					
LQC 1938	40 %		60 %					
LQC 169	100 %							
LQC 843	50 %					50 %		
LQC 17	20 %		70 %			10 %		
LQC 1673			100 %					
LQC 771			100 %					
LQC 882			90 %			10 %		
LQC 1670		10 %	50 %				40 %	
LQC 1944	30 %	20 %	50 %					
LQC 1641		10 %				80 %		10 %
LQC 1978	10 %		80 %			10 %		
LQC 1976	40 %		60 %					
LQC 1966	50 %		50 %					
LQC 1704	50 %		50 %					
LQC 1980	30 %		70 %					
LQC 1984			100 %					
LQC 1936			100 %					
LQC 233		25 %	50 %				25 %	
LQC 228			70 %		30 %			
LQC 883			60 %				40 %	
LQC 740			100 %					
LQC 1979		80 %	20 %					

3.6.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση ως προς την υφή

Η τέταρτη και τελευταία παράμετρος ως προς την οποία αξιολογήθηκαν τα δείγματα ψωμιού με προζύμι ήταν αυτή της υφής. Πιο συγκεκριμένα το κάθε δείγμα ψωμιού αξιολογήθηκε ως προς την συνολική υφή μέσω της στοματικής αίσθησης (πρώτο δάγκωμα και φάση μάσησης). Η εκτίμηση της υφής κάθε δείγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Μη αποδεκτή υφή» και 10 ως «Αποδεκτή-Άριστη». Η αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την υφή, πραγματοποιήθηκε με βάση 6 συνιστώσες, 4 από αυτές αφορούσαν την κόρα και 2 την ψίχα. Αυτές ήταν η σκληρότητα (crustiness), η ελαστικότητα (elasticity), η ευθρυπτότητα (friability) και η λιπαρότητα (oiliness-mouth residue) όσον αφορά την κόρα καθώς και η υφή ζύμης (doughy crumb) και η μαστιχωτή υφή (chewiness) όσον αφορά την ψίχα. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης αποτυπώνονται στα Διαγράμματα 5 και 6.

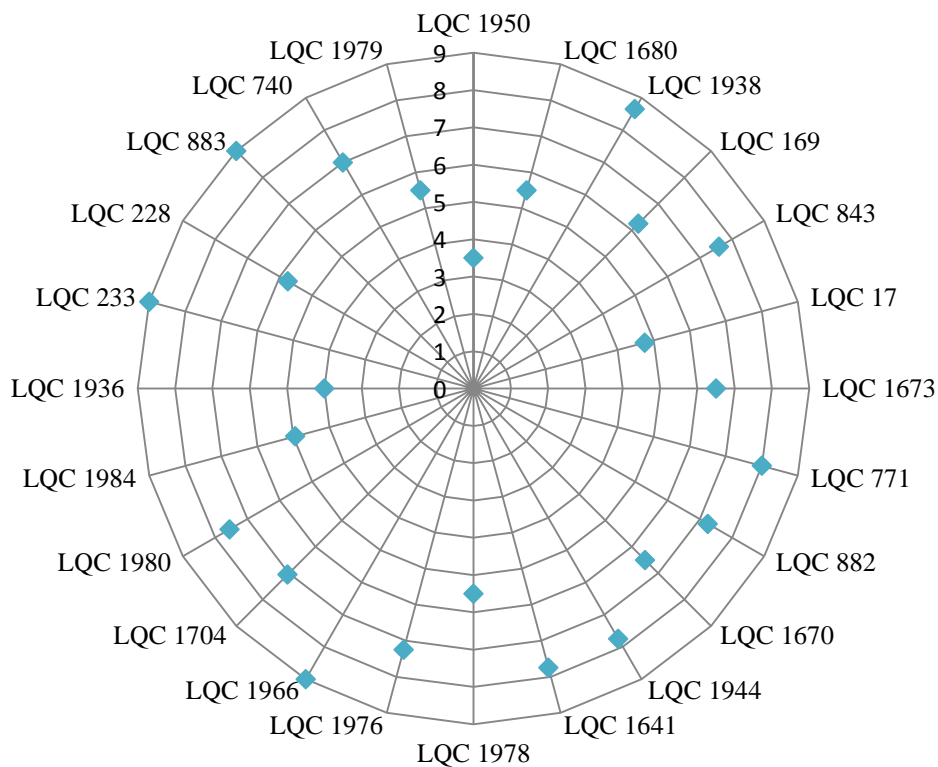
Ως προς την σκληρότητα, που ορίστηκε ως ο θόρυβος από το πρώτο δάγκωμα του δείγματος μεταξύ των γομφίων, αυτή κυμάνθηκε από χαμηλές τιμές (ελάχιστος-μηδαμινός θόρυβος) έως τις υψηλότερες τιμές (πολύ δυνατός θόρυβος). Έτσι τα δείγματα που παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές αναφορικά με την σκληρότητα ήταν αυτά με τα στελέχη LQC 1938, LQC 1976 και LQC 1966 (με προζύμι ως πηγή απομόνωσης). Αντίθετα, τις χαμηλότερες τιμές έδωσαν τα δείγματα ψωμιού με τα στελέχη LQC 1673, LQC 1670 (με λαχανικά ως πηγή απομόνωσης).

Τα δείγματα αναφορικά με την ελαστικότητα που παρουσίασαν βαθμολογήθηκαν με χαμηλές τιμές (Μηδενική ως μικρή επαναφορά δείγματος μετά το πρώτο δάγκωμα) ως υψηλές τιμές (μεγάλη-πολύ έντονη επαναφορά δείγματος μετά το πρώτο δάγκωμα). Η εκτίμηση γι' αυτό το χαρακτήρα κυμάνθηκε σε χαμηλές ως μέτριες τιμές, με τα δείγματα να μην παρουσιάζουν έντονη ελαστικότητα. Έτσι την χαμηλότερη τιμή έδωσε το στέλεχος LQC 1673 ενώ υψηλότερη τα LQC 1936 LQC 882. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω άλλη μία παράμετρος σχετικά με την υφή που αξιολογήθηκε ήταν η ευθρυπτότητα της κόρας (δηλ. η ευκολία με την οποία το δείγμα έχει σπάσει σε μικρότερα μέρη κατά τη διάρκεια της μάσησης) κυμάνθηκε επίσης από χαμηλές (μεγάλη δυσκολία) ως υψηλές τιμές (ευκολία καά τη μάσηση). Τις υψηλότερες τιμές και κατ' επέκταση ευκολία κατά τη μάσηση παρουσίασαν στελέχη LQC 1966 και LQC 1938, με πηγή απομόνωσης το προζύμι. Ενώ τις πιο χαμηλές τιμές παρουσίασαν τα δείγματα ψωμιού που είχαν ως καλλιέργεια εκκίνησης τα στελέχη LQC 1673, LQC 1976 και LQC 883. Τελευταία εκτιμήθηκε η παράμετρος της λιπαρότητας (δηλ. ο βαθμός υπολειμματικής λιπαρότητας που αφήνεται στην στοματική κοιλότητα μετά από κατάποση), σχετικά με την υφή της

κόρας του ψωμιού. Η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασε χαμηλή τιμή σχετικά με την λιπαρότητα, ενώ 7 δείγματα παρουσίασαν μηδενική τιμή (LQC 740, LQC 1984, LQC 1980, LQC 1976, LQC 771, LQC 1673 και LQC 1938). Την υψηλότερη τιμή σχετικά με αυτό το χαρακτηριστικό παρουσίασε το δείγμα με το στέλεχος οξυγαλακτικού βακτηρίου LQC 1704.

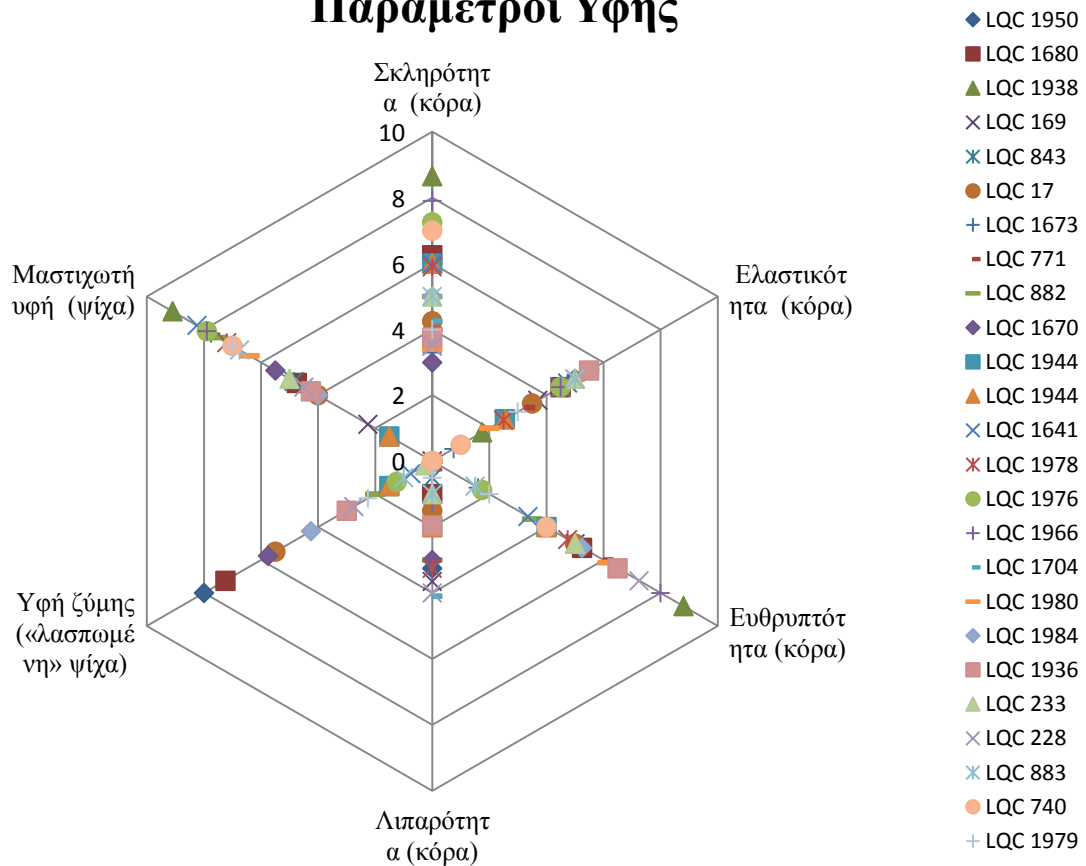
Σχετικά με την υφή της ψίχας των δειγμάτων ψωμιού, εκτιμήθηκαν δύο παράμετροι. Η πρώτη αφορά το αρνητικό χαρακτηριστικό της υφή ζύμης, όπου μέρη της ψίχας που δεν έχουν ψηθεί και έχουν υφή σβόλου που γίνεται αντιληπτό και κατά τη μάσηση. Τα 10 από τα 24 δείγματα ψωμιού με προζύμι παρουσίασαν μηδενική τιμή γ' αυτή την παράμετρο, δηλαδή τα δείγματα αυτά δεν είχαν άψητα τμήματα. Αντίθετα, υψηλές τιμές και κατ' επέκταση μεγάλα άψητα τμήματα είχαν τα δείγματα με τα στελέχη LQC 1950 και LQC 1680. Τέλος, η δεύτερη παράμετρος ήταν η μαστιχωτή υφή της ψίχας. Το δείγμα ψωμιού με την υψηλότερη τιμή (δηλ. μαλακή μαστιχωτή ψίχα και ευκολία κατά τη μάσηση) ήταν το LQC 1938. Ενώ στην αντίθετη πλευρά, χαμηλότερη τιμή και κατ' επέκταση σκληρότητα ψίχας και δυσκολία- αντίσταση κατά τη μάσηση παρουσίασε το δείγμα με το στέλεχος LQC 1944.

Συνολική Εκτίμηση Υφής



Διάγραμμα 5: Αποτέλεσμα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την συνολική υφή μέσω της στοματικής αίσθησης (πρώτο δάγκωμα και φάση μάσησης). Η εκτίμηση της υφής κάθε δείγματος ψωμιού βαθμολογήθηκε από 0-10, με (0) ως «Μη αποδεκτή υφή» και 10 ως «Αποδεκτή-Άριστη». Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

Παράμετροι Υφής

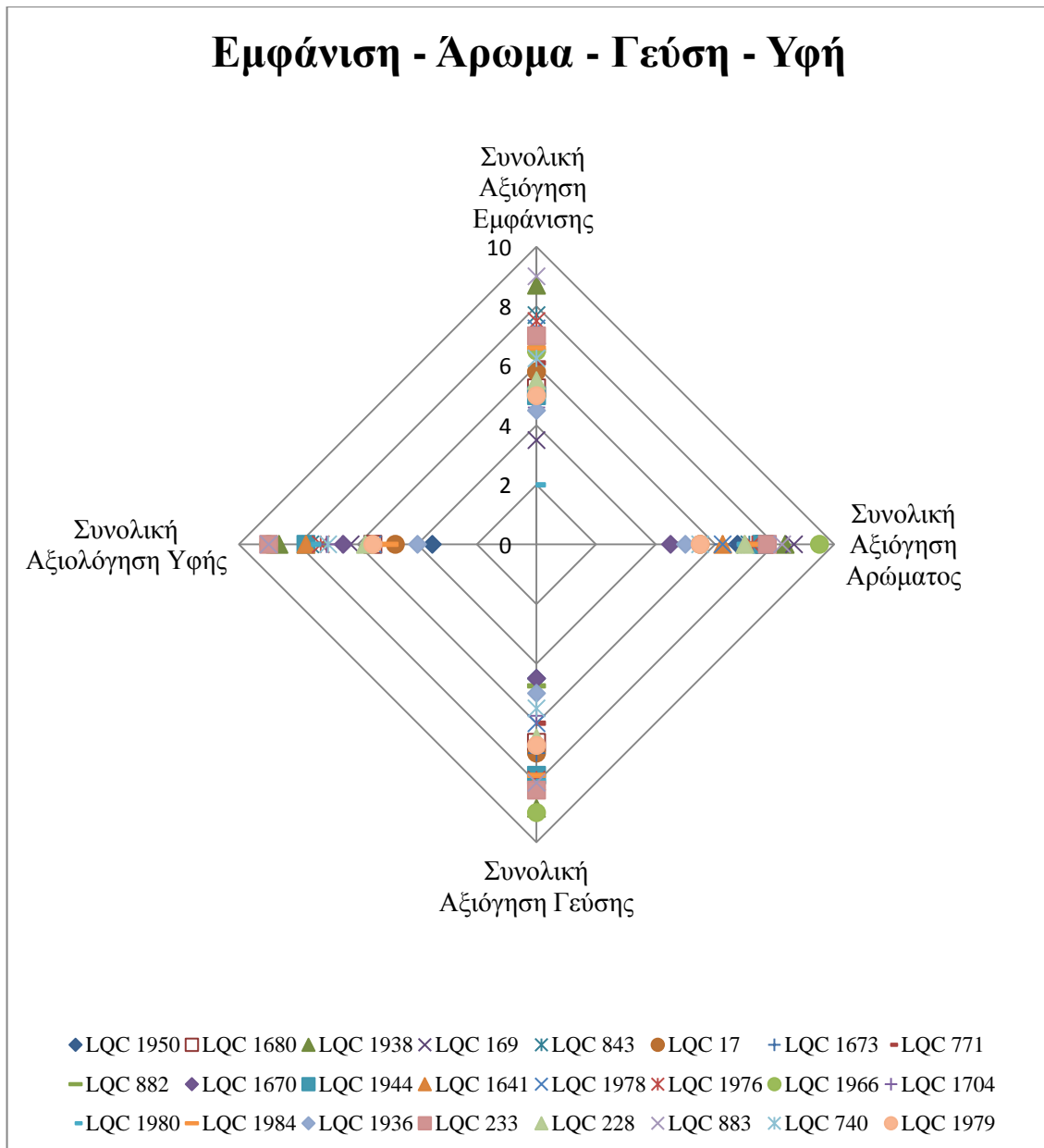


Διάγραμμα 6: Αποτέλεσμα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την υφή, που αξιολογούνται ως προς την σκληρότητα (crustiness), την ελαστικότητα (elasticity) και την ευθρυπτότητα (friability) και την λιπαρότητα (oiliness-mouth residue) όσον αφορά την κόρα, την υφή ζύμης (doughy crumb) καθώς και την μαστιχωτή υφή (chewiness) όσον αφορά την ψίχα. Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

3.6.5 Συνολική αξιολόγηση δειγμάτων

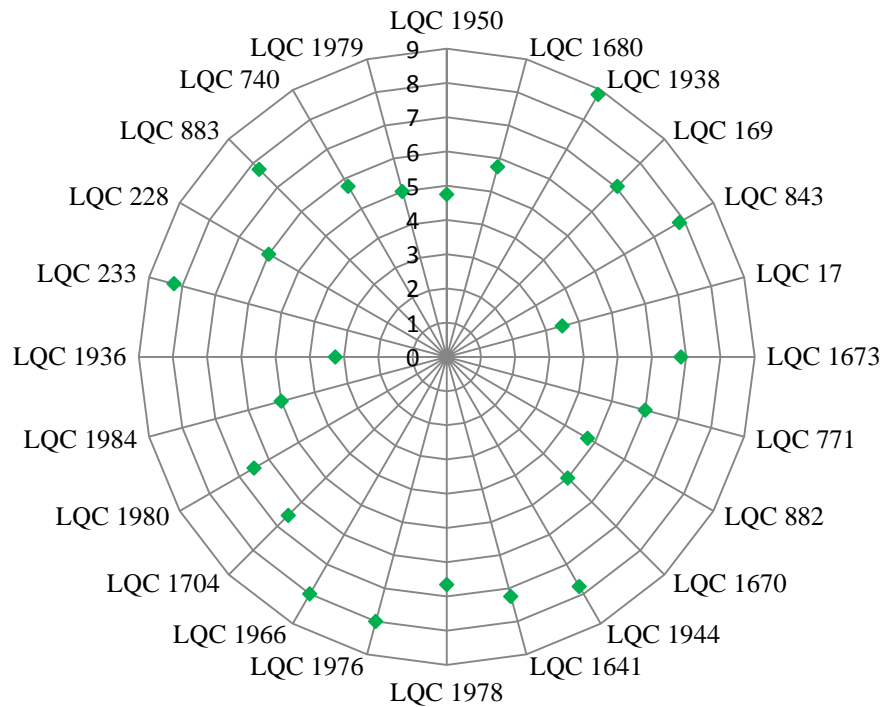
Τέλος, στα Διαγράμματα 7 και 8 παρουσιάζεται η συνολική απεικόνιση της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων καθώς και η συνολική εκτίμηση για καθεμία από τις 4 παραμέτρους (εμφάνιση, γεύση, άρωμα και υφή) με βάση τις οποίες αξιολογήθηκαν τα δείγματα. Τα δείγματα που παρουσίασαν την υψηλότερη διάμεσο και κατ'επέκταση την μεγαλύτερη προτίμηση ήταν αυτό με τα στελέχη LQC 1938 και LQC 233 με τιμή 8,85 και 8,25 αντίστοιχα (Διάγραμμα 8). Τα δύο αυτά δείγματα ψωμιού με τα στελέχη LQC 1938 και LQC 233 αντίστοιχα, φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλές τιμές διαμέσου και στην αξιολόγηση των 4 παραμέτρων (Διάγραμμα 7). Αναλυτικότερα στην συνολική εκτίμηση της παραμέτρου της εμφάνισης τα δύο αυτά δείγματα παρουσιάζουν επίσης τις 2 υψηλότερες τιμές διαμέσου, κάτι που μεταφράζεται ως τα δείγματα με την καλύτερη εμφάνιση απ'όσα αξιολογήθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και κατά την συνολική αξιολόγηση των δειγμάτων ψωμιού ως προς τη γεύση και το άρωμα, όπου τα 2 αυτά δείγματα μαζί τα LQC 169 και το LQC 843 έχουν τις μεγαλύτερες τιμές διαμέσου.

Εμφάνιση - Άρωμα - Γεύση - Υφή



Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την συνολική εμφάνιση, γεύση, υφή και άρωμα. Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν με καλλιέργεια εκκίνησης ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

Συνολική Εκτίμηση Δείγματος



Διάγραμμα 8: Αποτύπωση της συνολικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι που προκύπτουν μετά από πειραματική αρτοποιήση. Τα κάθε δείγμα ψωμιού με προζύμι αποτελεί αρτοποιητικό προϊόν που έχει προκύψει από ενοφθαλμισμό μίγματος νερού και αλεύρου (σε αναλογία 2:1) με καλλιέργεια εκκίνησης, ένα από τα 24 στελέχη *Lb. plantarum*: LQC 1936, LQC 1938, LQC 1944, LQC 1950, LQC 1966, LQC 1976, LQC 1978, LQC 1979, LQC 1980, LQC 1984, LQC 1641, LQC 1670, LQC 1673, LQC 1680, LQC 1704, LQC 17, LQC 228, LQC 233, LQC 169, LQC 740, LQC 771, LQC 843, LQC 882 και LQC 883.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Πίνακας 20: Αποτελέσματα της της συνολικής αξιολόγησης των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι, καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την συνολική εμφάνιση, άρωμα, γεύση και υφή, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με μονοκαλλιέργειες του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lb. plantarum*, που αποτέλεσαν και την καλλιέργεια εκκίνησης.

Στέλεχος	Συνολική Αξιολόγηση Δείγματος	Συνολική Αξιόγηση Εμφάνισης	Συνολική Αξιόγηση Αρώματος	Συνολική Αξιόγηση Γεύσης	Συνολική Αξιολόγηση Υφής
LQC 17	3,50 ± 1,73 ^{ab}	6,03 ± 1,07 ^{d,e,f,g}	6,00 ± 2,16 ^{ab,c,d,e}	7,00 ± 0,00 ^{e,f,g,h,i,j}	5,38 ± 3,82 ^{ab,c,d}
LQC 169	7,05 ± 2,33 ^{d,e,f,g,h}	3,38 ± 1,49 ^{ab}	8,68 ± 0,28 ^{hi}	6,88 ± 2,66 ^{e,f,g,h,i}	6,28 ± 2,88 ^{c,d,e,f,g}
LQC 228	6,00 ± 0,50 ^{c,d,e,f,g,h}	5,75 ± 0,87 ^{d,e,f}	7,25 ± 0,50 ^{e,f,g,h}	6,75 ± 0,96 ^{d,e,f,g,h,i}	5,63 ± 0,48 ^{a,b,c,d,e}
LQC 233	8,25 ± 0,95 ^j	7,00 ± 0,82 ^{e,f,g,h}	8,13 ± 1,31 ^{f,g,h,i}	8,38 ± 1,25 ^{ij,k}	9,00 ± 0,82 ^{ij}
LQC 740	5,75 ± 0,65 ^{c,d,e,f,g}	6,13 ± 1,03 ^{d,e,f,g}	5,38 ± 0,75 ^{ab,c,d}	5,50 ± 0,41 ^{ab,c,d,e}	7,10 ± 0,27 ^{d,e,f,g,h,i}

LQC 771	6,00 ± 1,32 ^{c,d,e,f,g,h}	6,25 ± 0,53 ^{d,e,f,g}	5,25 ± 2,47 ^{a,b,c}	6,50 ± 1,91 ^{c,d,e,f,g}	7,85 ± 1,35 ^{f,g,h,i,j}
LQC 843	7,85 ± 1,43 ^{h,i,j}	7,60 ± 0,45 ^{g,h,i}	7,33 ± 1,27 ^{e,f,g,h}	7,88 ± 1,31 ^{f,g,h,i,j,k}	8,18 ± 1,22 ^{g,h,i,j}
LQC 882	4,75 ± 0,48 ^{a,b,c}	4,75 ± 0,50 ^{b,c,d}	5,00 ± 0,82 ^{a,b}	4,88 ± 0,85 ^{a,b,c}	7,38 ± 1,25 ^{e,f,g,h,i,j}
LQC 883	7,75 ± 1,03 ^{h,i,j}	8,75 ± 1,26 ⁱ	8,63 ± 0,95 ^{g,h,i}	7,875 ± 0,63 ^{f,g,h,i,j,k}	8,75 ± 1,26 ^{ij}
LQC 1641	7,25 ± 1,55 ^{h,i,j}	6,38 ± 1,97 ^{d,e,f,g}	6,00 ± 1,08 ^{a,b,c,d,e}	8,23 ± 1,34 ^{h,i,j,k}	7,88 ± 0,85 ^{f,g,h,i,j}
LQC 1670	5,00 ± 1,11 ^{b,c,d,e,f}	6,38 ± 2,87 ^{d,e,f,g}	4,50 ± 1,29 ^a	4,50 ± 2,38 ^a	6,75 ± 1,71 ^{c,d,e,f,g,h}
LQC 1673	6,85 ± 0,63 ^{f,g,h,i}	6,75 ± 0,88 ^{e,f,g}	6,88 ± 1,44 ^{c,d,e,f}	6,90 ± 0,78 ^{e,f,g,h,i}	6,63 ± 1,11 ^{c,d,e,f,g,h}
LQC 1680	5,75 ± 0,61 ^{b,c,d,e,f}	5,38 ± 0,48 ^{c,d,e}	7,63 ± 0,51 ^{e,f,g,h}	6,58 ± 0,43 ^{d,e,f,g,h}	5,25 ± 1,32 ^{a,b,c,d}
LQC 1704	6,55 ± 0,41 ^{e,f,g,h}	4,83 ± 0,88 ^{b,c,d}	7,00 ± 0,82 ^{d,e,f,g}	5,88 ± 0,85 ^{a,b,c,d,e}	7,23 ± 0,84 ^{d,e,f,g,h,i,j}
LQC 1936	3,25 ± 0,65 ^a	4,00 ± 1,41 ^{b,c}	4,73 ± 0,91 ^a	5,08 ± 1,18 ^{a,b,c,d}	4,13 ± 0,63 ^{a,b}

LQC 1938	8,85 ± 0,50 ^j	8,68 ± 0,30 ^{h,i}	8,65 ± 0,97 ^{g,h,i}	8,68 ± 1,27 ^{j,k}	8,43 ± 1,02 ^{h,i,j}
LQC 1944	7,75 ± 2,64 ^{f,g,h,i}	5,38 ± 2,06 ^{c,d,e}	7,03 ± 1,37 ^{d,e,f,g,h}	7,98 ± 0,73 ^{g,h,i,j,k}	7,38 ± 1,70 ^{e,f,g,h,i,j}
LQC 1950	4,75 ± 0,65 ^{a,b,c,d}	4,88 ± 0,25 ^{b,c,d}	7,00 ± 1,08 ^{d,e,f,g}	4,63 ± 1,49 ^{a,b}	4,00 ± 1,41 ^a
LQC 1966	8,00 ± 1,32 ^{ij}	6,95 ± 1,46 ^{e,f,g}	9,50 ± 0,58 ⁱ	9,25 ± 0,50 ^k	9,13 ± 0,63 ^j
LQC 1976	8,00 ± 1,50 ^{f,g,h,i,j}	7,48 ± 0,61 ^{g,h,i}	7,00 ± 1,47 ^{d,e,f,g}	7,60 ± 1,16 ^{f,g,h,i,j,k}	7,13 ± 0,85 ^{d,e,f,g,h,i}
LQC 1978	6,65 ± 1,27 ^{f,g,h,i}	7,25 ± 1,76 ^{g,h,i}	6,50 ± 1,58 ^{b,c,d,e,f}	6,20 ± 1,17 ^{b,c,d,e,f}	6,08 ± 1,56 ^{b,c,d,e,f}
LQC 1979	5,00 ± 0,63 ^{a,b,c,d,e}	4,88 ± 0,25 ^{b,c,d}	5,50 ± 0,41 ^{a,b,c,d}	6,63 ± 0,48 ^{d,e,f,g,h}	5,50 ± 0,41 ^{a,b,c,d,e*}
LQC 1980	6,50 ± 0,64 ^{e,f,g,h}	2,125 ± 0,63 ^a	6,75 ± 0,65 ^{c,d,e,f}	7,85 ± 0,24 ^{f,g,h,i,j,k}	7,40 ± 0,41 ^{e,f,g,h,i,j}
LQC 1984	5,00 ± 0,41 ^{b,c,d,e}	6,8 ± 0,85 ^{e,f,g}	7,48 ± 0,73 ^{e,f,g,h}	7,73 ± 0,61 ^{f,g,h,i,j,k}	4,85 ± 0,24 ^{a,b,c}

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές της Συνολική αξιολόγησης δείγματος, της Συνολικής αξιόγησης εμφάνισης, της Συνολικής αξιόγησης αρώματος, της Συνολικής αξιόγησης γεύσης και της Συνολική αξιολόγηση υφής είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα μικροβιακά στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ($P < 0.05$). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των μονοκαλλιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

Πίνακας 21: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την εμφάνιση, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με μονοκαλλιέργειες του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lb. plantarum*, που αποτέλεσαν και την καλλιέργεια εκκίνησης.

Στέλεχος	Εμφάνιση										
	Χρώμα (ψωμί)	Λάμψη (ψωμί)	Βαθμός διόγκωσης	Περίσσεια αλεύρου στην επιφάνεια	Χρώμα (κόρα)	Λεπτότητα (κόρα)	Ρωγμές (κόρα)	Χρώμα (ψίχα)	Μέγεθος πόρων (ψίχα)	Ομοιογένεια πόρων (ψίχα)	Ακατέργαστη ζύμη (ψίχα)
LQC 17	3,63 ± 0,75 <i>b,c,d</i>	2,63 ± 0,75 <i>a,b,c</i>	1,88 ± 0,25 <i>a,b</i>	0,25 ± 0,50 <i>a</i>	1,38 ± 1,08 <i>a,b,c</i>	1,38 ± 0,75 <i>a,b,c</i>	1,38 ± 1,60 <i>a,b,c,d</i>	3,13 ± 1,44 <i>c,d,e,f,g</i>	2,50 ± 1,29 <i>b,c</i>	7,75 ± 1,26 <i>m</i>	8,00 ± 0,82 <i>e</i>
LQC 169	1,20 ± 0,54 <i>a</i>	2,10 ± 0,84 <i>a,b,c</i>	3,33 ± 1,14 <i>d,e,f,g</i>	0,38 ± 0,48 <i>a</i>	1,45 ± 0,25 <i>a</i>	1,05 ± 0,10 <i>a,b,c</i>	1,45 ± 1,28 <i>a,b,c,d,e</i>	0,83 ± 0,35 <i>a</i>	2,65 ± 0,94 <i>b,c</i>	3,78 ± 1,75 <i>e,f,g</i>	4,25 ± 2,87 <i>c</i>
LQC 228	6,00 ± 0,00 <i>g,h,i</i>	2,65 ± 0,47 <i>a,b,c,d</i>	3,25 ± 0,50 <i>c,d,e,f,g</i>	0,00 ± 0,00 <i>a</i>	0,00 ± 0,85 <i>c,d</i>	2,00 ± 0,00 <i>a,b,c,d,e</i>	0,00 ± 0,00 <i>a</i>	4,13 ± 1,31 <i>f,g,h</i>	2,00 ± 0,00 <i>a,b</i>	6,75 ± 1,04 <i>j,k,l,m</i>	4,50 ± 0,58 <i>c</i>
LQC 233	5,63 ± 0,48 <i>e,f,g,h</i>	2,63 ± 1,11 <i>a,b,c</i>	5,13 ± 0,25 <i>h,i,j,k</i>	0,00 ± 0,00 <i>a</i>	0,25 ± 0,00 <i>d,e</i>	3,38 ± 0,75 <i>e,f,g</i>	0,25 ± 0,50 <i>a,b</i>	5,50 ± 0,58 <i>h</i>	5,00 ± 0,71 <i>g,h</i>	4,00 ± 0,00 <i>f,g,h</i>	0,75 ± 0,50 <i>a</i>
LQC 771	4,75 ± 2,63 <i>d,e,f,g</i>	2,43 ± 2,01 <i>a,b,c</i>	2,00 ± 0,53 <i>a,b,c</i>	0,98 ± 0,37 <i>a,b</i>	0,00 ± 0,88 <i>e,f</i>	0,80 ± 0,28 <i>a</i>	0,00 ± 0,00 <i>a</i>	2,58 ± 1,16 <i>b,c,d,e</i>	1,15 ± 0,79 <i>a</i>	1,50 ± 0,58 <i>a,b,c,d</i>	0,75 ± 0,96 <i>a</i>

LQC 740	7,38 ± 0,48 ⁱ	4,63 ± 0,48 ^{e,f,g}	4,75 ± 0,50 ^{h,i,j}	1,63 ± 0,48 ^{b,c}	1,13 ± 0,91 ^{h,i,j}	3,38 ± 0,48 ^{e,f,g}	1,13 ± 0,25 ^{a,b,c,d}	1,50 ± 0,58 ^{a,b}	3,38 ± 0,48 ^{c,d,e,f}	1,38 ± 0,48 ^{a,b,c,d}	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 843	7,00 ± 1,58 ⁱ	4,38 ± 2,06 ^{d,e,f,g}	7,38 ± 0,57 ^m	0,18 ± 0,24 ^a	2,08 ± 0,60 ^j	5,18 ± 1,99 ^{h,i}	2,08 ± 2,83 ^{b,c,d,e,f}	2,95 ± 1,12 ^{b,c,d,e,f}	7,48 ± 1,24 ⁱ	5,70 ± 1,71 ^{i,j,k}	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 882	4,00 ± 1,08 ^{c,d,e,f}	1,25 ± 0,50 ^{a,b}	6,25 ± 0,96 ^{k,l,m}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,48 ^{a,b,c}	2,38 ± 0,48 ^{b,c,d,e,f}	0,00 ± 0,00 ^a	2,38 ± 0,48 ^{b,c,d}	5,13 ± 0,63 ^{g,h}	7,00 ± 1,41 ^{k,l,m}	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 883	5,00 ± 0,00 ^{d,e,f,g,h}	6,00 ± 0,41 ^g	5,88 ± 0,63 ^{j,k,l}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,63 ^{f,g,h}	6,63 ± 1,11 ⁱ	0,00 ± 0,00 ^a	3,38 ± 0,48 ^{d,e,f,g}	5,50 ± 0,58 ^h	5,00 ± 0,00 ^{g,h,i}	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 1641	6,00 ± 2,45 ^{g,h,i}	2,35 ± 2,62 ^{a,b,c}	4,50 ± 1,73 ^{g,h,i}	0,25 ± 0,50 ^a	3,43 ± 1,73 ^{g,h,i,j}	5,00 ± 2,00 ^h	3,43 ± 3,58 ^{f,g}	3,63 ± 1,49 ^{d,e,f,g}	2,68 ± 0,83 ^{b,c}	1,25 ± 0,50 ^{a,b,c}	0,25 ± 0,50 ^a
LQC 1670	2,63 ± 1,25 ^{a,b,c}	1,38 ± 1,11 ^{a,b}	3,83 ± 1,29 ^{e,f,g,h}	0,25 ± 0,50 ^a	2,00 ± 2,06 ^{c,d}	1,00 ± 0,00 ^{a,b}	2,00 ± 1,83 ^{b,c,d,e,f}	2,75 ± 1,32 ^{b,c,d,e,f}	3,13 ± 1,31 ^{b,c,d,e}	2,25 ± 1,50 ^{b,c,d}	7,25 ± 0,96 ^{d,e}
LQC 1673	5,03 ± 1,36 ^{d,e,f,g,h}	5,20 ± 0,54 ^{f,g}	6,90 ± 0,66 ^{l,m}	1,75 ± 2,87 ^{b,c}	0,75 ± 1,54 ^{b,c,d}	0,88 ± 0,25 ^a	0,75 ± 1,19 ^{a,b,c}	2,90 ± 1,23 ^{b,c,d,e,f}	3,95 ± 0,42 ^{d,e,f,g}	8,25 ± 0,96 ^m	0,50 ± 1,00 ^a
LQC 1680	2,50 ± 1,29 ^{a,b,c}	2,25 ± 0,96 ^{a,b,c}	2,63 ± 1,38 ^{a,b,c,d,e}	0,00 ± 0,00 ^a	5,00 ± 0,47 ^{c,d}	1,90 ± 0,66 ^{a,b,c,d,e}	5,00 ± 1,08 ^g	2,40 ± 1,10 ^{b,c,d}	2,98 ± 0,90 ^{b,c,d,e}	2,88 ± 1,03 ^{d,e,f}	6,50 ± 0,71 ^d
LQC 1704	2,95 ± 1,20 ^{a,b,c}	3,48 ± 2,40 ^{c,d,e,f}	3,10 ± 0,14 ^{b,c,d,e,f}	0,08 ± 0,15 ^a	1,83 ± 1,02 ^{d,e}	2,88 ± 1,44 ^{d,e,f,g}	1,83 ± 0,97 ^{a,b,c,d,e,f}	2,83 ± 0,89 ^{b,c,d,e,f}	2,63 ± 0,48 ^{b,c}	2,75 ± 1,26 ^{c,d,e,f}	0,25 ± 0,50 ^a
LQC 1936	2,86 ± 1,65 ^{a,b,c}	1,45 ± 0,61 ^{a,b}	1,38 ± 0,25 ^a	2,50 ± 0,58 ^c	1,13 ± 0,54 ^{a,b}	1,45 ± 0,33 ^{a,b,c,d}	1,13 ± 0,48 ^{a,b,c,d}	1,80 ± 0,40 ^{a,b,c}	2,03 ± 0,68 ^{a,b}	7,25 ± 0,50 ^{l,m}	6,25 ± 1,50 ^d
LQC 1938	6,53 ± 1,08 ^{h,i}	2,00 ± 1,54 ^{a,b,c}	5,60 ± 1,36 ^{i,j,k}	0,58 ± 0,68 ^a	1,05 ± 0,94 ^{g,h,i}	3,95 ± 1,90 ^{g,h}	1,05 ± 1,00 ^{a,b,c,d}	3,50 ± 1,73 ^{d,e,f,g}	2,88 ± 1,11 ^{b,c,d,e}	2,38 ± 1,80 ^{b,c,d,e}	0,00 ± 0,00 ^a

LQC 1944	2,50 ± 1,91 a,b,c	1,75 ± 1,19 a,b,c	3,28 ± 1,84 c,d,e,f,g	0,00 ± 0,00 ^a	1,20 ± 0,85 ^{d,e}	2,20 ± 1,03 a,b,c,d,e,f	1,20 ± 1,31 a,b,c,d	2,90 ± 1,07 b,c,d,e,f	1,88 ± 0,85 ^{a,b}	2,63 ± 1,49 c,d,e,f	0,25 ± 0,50 ^a
LQC 1950	6,50 ± 0,71 g,h,i	5,13 ± 0,25 e,f,g	7,25 ± 0,50 ^m	2,38 ± 1,11 ^c	3,33 ± 0,95 ^{e,f,g}	2,50 ± 0,71 c,d,e,f,g	3,33 ± 0,47 ^{e,f,g}	2,88 ± 0,63 b,c,d,e,f	4,13 ± 1,44 ^{e,f,g}	5,75 ± 1,50 i,j,k,l	8,25 ± 0,87 ^e
LQC 1966	2,25 ± 1,50 a,b,c	2,88 ± 0,25 b,c,d	2,38 ± 0,48 a,b,c,d	0,00 ± 0,00 ^a	2,75 ± 1,18 ^{i,j}	5,03 ± 1,44 ^h	2,75 ± 0,96 ^{d,e,f}	3,08 ± 0,83 c,d,e,f,g	2,15 ± 0,51 ^{a,b,c}	0,25 ± 0,50 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 1976	3,96 ± 0,78 c,d,e	1,28 ± 1,25 a,b	3,18 ± 0,85 b,c,d,e,f	0,00 ± 0,00 ^a	1,10 ± 1,24 ^{c,d}	3,50 ± 1,73 f,g	1,10 ± 0,82 a,b,c,d	4,00 ± 1,41 e,f,g	2,95 ± 1,14 b,c,d,e	4,05 ± 0,99 f,g,h	0,38 ± 0,75 ^a
LQC 1978	6,18 ± 1,29 g,h,i	2,38 ± 1,60 a,b,c	3,38 ± 1,60 d,e,f,g	0,25 ± 0,50 ^a	2,50 ± 1,50 g,h,i,j	3,13 ± 1,44 e,f,g	2,50 ± 2,89 c,d,e,f	4,50 ± 1,73 g,h	2,75 ± 1,71 ^{b,c,d}	1,00 ± 0,71 a,b	0,75 ± 0,50 ^a
LQC 1979	2,13 ± 0,25 a,b	1,63 ± 0,95 a,b	3,88 ± 0,63 e,f,g,h	0,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,25 ^{a,b,c}	1,25 ± 0,50 a,b,c	1,00 ± 0,00 a,b,c,d	2,38 ± 0,48 b,c,d	4,50 ± 0,41 ^{f,g,h}	5,25 ± 0,50 g,h,i,j	2,38 ± 0,48 ^b
LQC 1980	2,05 ± 0,76 a,b	3,40 ± 0,71 c,d,e	4,30 ± 0,48 f,g,h,i	0,00 ± 0,00 ^a	0,925 ± 0,33 a,b,c	1,18 ± 0,33 a,b,c	0,93 ± 0,30 a,b,c,d	1,83 ± 0,57 a,b,c	3,03 ± 0,73 b,c,d,e	5,33 ± 0,54 h,i,j	0,00 ± 0,00 ^a
LQC 1984	5,75 ± 0,42 f,g,h,i	1,05 ± 0,17 ^a	3,25 ± 0,29 c,d,e,f,g	0,23 ± 0,26 ^a	0,35 ± 0,45 ^{f,g,h}	1,53 ± 0,39 a,b,c,d	0,35 ± 0,47 ^{a,b}	3,13 ± 0,25 c,d,e,f,g	2,30 ± 0,36 ^{a,b,c}	1,35 ± 0,47 a,b,c	0,00 ± 0,00 ^{a*}

* Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές των χαρακτηριστικών της Εμφάνισης είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα μικροβιακά στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ($P < 0.05$). Σε κάθε περίπτωση εκτίμηση των μονοκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

Πίνακας 22: Οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ψωμιού με προζύμι ως προς την Υφή, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με μονοκαλλιέργειες του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lb. plantarum*, που αποτέλεσαν και την καλλιέργεια εκκίνησης.

Στέλεχος	Υφή					
	Σκληρότητα (κόρα)	Ελαστικότητα (κόρα)	Ευθρυπτότητα (κόρα)	Λιπαρότητα (κόρα)	Υφή ζύμης («κλασπωμένη» ψίχα)	Μαστιχωτή υφή (ψίχα)
LQC						
17	4,63 ± 1,70 ^{a,b,c}	3,75 ± 1,71 ^{b,c,d,e,f,g}	4,63 ± 2,06 ^{d,e,f}	1,50 ± 1,29 ^{a,b,c,d,e}	6,25 ± 2,87 ^h	4,00 ± 1,83 ^{b,c}
LQC						
169	5,00 ± 2,83 ^{a,b,c,d}	3,85 ± 2,68 ^{c,d,e,f,g}	4,75 ± 2,06 ^{d,e,f,g}	3,58 ± 2,32 ^{g,h}	2,00 ± 4,00 ^{b,c,d,e}	2,88 ± 1,44 ^{a,b}
LQC						
228	3,50 ± 0,58 ^a	5,25 ± 0,50 ^{f,g}	7,38 ± 0,48 ^{i,j,k}	3,88 ± 0,63 ^h	2,63 ± 0,48 ^{d,e,f}	4,63 ± 0,75 ^c
LQC						
233	5,00 ± 0,00 ^{a,b,c,d}	5,50 ± 1,00 ^g	5,00 ± 0,00 ^{d,e,f,g,h}	1,13 ± 0,25 ^{a,b,c,d}	0,38 ± 0,48 ^{a,b}	5,25 ± 0,50 ^{c,d,e}

LQC						
740	7,25 ± 0,50 ^{e,f}	1,25 ± 0,50 ^a	4,00 ± 0,41 ^{d,e}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	7,13 ± 0,25 ^{f,g}
LQC						
771	3,88 ± 1,65 ^a	3,13 ± 1,75 ^{a,b,c,d,e,f}	6,23 ± 0,52 ^{f,g,h,i}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	8,00 ± 1,00 ^{g,h}
LQC						
843	3,45 ± 2,95 ^a	4,75 ± 3,23 ^{e,f,g}	6,25 ± 1,71 ^{f,g,h,i}	1,00 ± 1,41 ^{a,b,c,d}	0,33 ± 0,65 ^{a,b}	4,68 ± 2,55 ^c
LQC						
882	5,25 ± 0,50 ^{a,b,c,d}	5,63 ± 0,75 ^g	3,50 ± 0,58 ^{c,d}	2,63 ± 0,75 ^{d,e,f,g,h}	1,75 ± 0,50 ^{b,c,d,e}	7,88 ± 1,55 ^{f,g,h}
LQC						
883	5,00 ± 0,00 ^{a,b,c,d}	4,88 ± 0,63 ^{e,f,g}	1,75 ± 0,96 ^{a,b}	1,25 ± 0,50 ^{a,b,c,d,e}	0,75 ± 0,50 ^{a,b,c}	6,63 ± 0,48 ^{e,f,g}
LQC						
1641	6,38 ± 0,75 ^{c,d,e}	4,75 ± 2,50 ^{e,f,g}	3,43 ± 1,34 ^{b,c,d}	1,00 ± 0,82 ^{a,b,c,d}	0,88 ± 1,03 ^{a,b,c}	7,50 ± 1,68 ^{f,g,h}
LQC						
1670	3,60 ± 2,09 ^a	5,13 ± 2,78 ^{f,g}	4,25 ± 0,50 ^{d,e}	2,88 ± 2,02 ^{e,f,g,h}	5,63 ± 0,48 ^{g,h}	5,25 ± 0,96 ^{c,d,e}
LQC						
1673	3,40 ± 0,49 ^a	1,13 ± 1,31 ^a	1,55 ± 0,42 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	7,70 ± 0,80 ^{f,g,h}

LQC							
1680	$6,00 \pm 1,47$ ^{b,c,d,e}	$4,80 \pm 1,41$ ^{e,f,g}	$5,38 \pm 1,25$ ^{e,f,g,h}	$1,13 \pm 0,63$ ^{a,b,c,d}	$7,05 \pm 0,76$ ^{h,i}	$4,88 \pm 1,03$ ^{c,d}	
LQC							
1704	$4,38 \pm 2,10$ ^{a,b}	$4,73 \pm 0,55$ ^{e,f,g}	$5,33 \pm 1,42$ ^{e,f,g,h}	$4,05 \pm 1,10$ ^h	$0,50 \pm 1,00$ ^{a,b}	$6,93 \pm 0,70$ ^{f,g}	
LQC							
1936	$3,75 \pm 1,76$ ^a	$5,60 \pm 0,71$ ^g	$6,63 \pm 0,75$ ^{h,i,j}	$1,98 \pm 0,41$ ^{b,c,d,e,f,g}	$3,13 \pm 0,25$ ^{e,f}	$3,88 \pm 1,44$ ^{b,c}	
LQC							
1938	$8,58 \pm 0,87$ ^g	$1,63 \pm 1,25$ ^{a,b}	$8,88 \pm 0,88$ ^k	$0,75 \pm 1,50$ ^{a,b,c}	$0,50 \pm 1,00$ ^{a,b}	$8,90 \pm 0,62$ ^h	
LQC							
1944	$6,05 \pm 1,22$ ^{b,c,d,e}	$2,90 \pm 0,73$ ^{a,b,c,d,e}	$3,98 \pm 1,18$ ^{d,e}	$2,38 \pm 2,06$ ^{c,d,e,f,g,h}	$1,25 \pm 0,96$ ^{a,b,c,d}	$1,63 \pm 0,75$ ^a	
LQC							
1950	$4,25 \pm 0,87$ ^{a,b}	$4,75 \pm 0,87$ ^{e,f,g}	$5,00 \pm 1,63$ ^{d,e,f,g,h}	$3,38 \pm 1,25$ ^{f,g,h}	$8,00 \pm 0,82$ ⁱ	$4,38 \pm 1,11$ ^{b,c}	
LQC							
1966	$7,70 \pm 0,48$ ^{e,f}	$4,50 \pm 1,29$ ^{d,e,f,g}	$8,00 \pm 0,82$ ^{j,k}	$1,88 \pm 1,44$ ^{b,c,d,e,f}	$0,00 \pm 0,00$ ^a	$8,15 \pm 0,57$ ^{g,h}	
LQC							
1976	$7,58 \pm 0,98$ ^{e,f}	$4,65 \pm 1,85$ ^{e,f,g}	$2,25 \pm 1,55$ ^{a,b,c}	$0,88 \pm 1,75$ ^{a,b,c}	$1,88 \pm 1,44$ ^{b,c,d,e}	$8,08 \pm 1,05$ ^{g,h}	

LQC						
1978	6,58 ± 1,63 ^{d,e}	2,43 ± 1,96 ^{a,b,c,d}	4,25 ± 2,40 ^{d,e}	3,28 ± 2,14 ^{f,g,h}	0,00 ± 0,00 ^a	7,28 ± 1,12 ^{f,g}
LQC						
1979	4,25 ± 0,50 ^{a,b}	3,13 ± 0,25 ^{a,b,c,d,e,f}	2,25 ± 0,50 ^{a,b,c}	0,50 ± 0,58 ^{a,b}	2,38 ± 0,48 ^{c,d,e}	6,88 ± 0,25 ^{f,g}
LQC						
1980	3,43 ± 0,38 ^a	1,85 ± 0,52 ^{a,b,c}	6,33 ± 0,47 ^{g,h,i,j}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	6,35 ± 0,66 ^{d,e,f}
LQC						
1984	4,98 ± 0,37 ^{a,b,c,d}	1,43 ± 1,06 ^a	5,35 ± 0,44 ^{e,f,g,h}	0,00 ± 0,00 ^a	4,13 ± 1,03 ^{f,g}	4,13 ± 0,25 ^{b,c*}

* Οι δείκτες που αφορούν τις τιμές των χαρακτηριστικών της Υφής είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα μικροβιακά στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ($P < 0.05$). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των μονοκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Για την πραγματοποίηση της ταυτοποίησης των βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκε η ανάλυση με PCR-RAPD. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε για την αποτύπωση της ποικιλομορφίας σε επίπεδο είδους, με την ύπαρξη πολλών στελεχών εντός αυτού λόγω των διαφορετικών πηγών απομόνωσης. Έτσι για την επίτευξη της αποτύπωσης αυτής χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής UBC 155.

Η ομαδοποίηση σε επίπεδο στελεχών πραγματοποιήθηκε με βάση την παραδοχή ότι το ίδιο προφίλ παραπέμπει στο ίδιο στέλεχος εντός του είδους *Lb. plantarum*. Όπως παρουσιάστηκε και στην ενότητα των Αποτελεσμάτων, μέσω της ανάλυσης μελετήθηκαν 78 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, συλλογής του Εργαστηρίου, τα οποία διαχωρίστηκαν σε επιμέρους ομάδες οι οποίες απεικονίζουν τη διαφοροποίηση των διαφορετικών στελεχών που εμπεριέχει το είδος *Lb. plantarum*.

Από τους πρώτους, οι Zapparoli και συν., (1998) εφάρμοσαν την μέθοδο PCR-RAPD σε στελέχη *Lb. sanfranciscensis* για απεικόνιση της διαφοροποίησης των στελεχών εντός είδους. Ακόμα, οι Pateraki και συν., (2014), ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία απομονώνοντας 156 στελέχη άγριων ζυμών μέσω ανάλυσης με PCR-RAPD χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους M13 και UBC 155, στα πλαίσια της μελέτης του δυναμικού τους, κατά την αυθόρμητη ζύμωση κόκκινου κρασιού. Παρόμοια, οι Corsetti και συν., (2003) απομόνωσαν 150 στελέχη που άνηκαν στα είδη *Lactobacillus* spp. και *Weissella* spp. με εκκινητές τους P1 - P10 για την μελέτη της ποικιλομορφίας οξυγαλακτικών βακτηρίων προζυμιών. Παρόμοια προσέγγιση ακολούθησαν οι Hamza και συν., (2009) που απομόνωσαν 160 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από παραδοσιακό ξινόγαλα (roab) χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον O10 (70% G+C). Παρεμφερή μέθοδο ανάλυσης PCR-RAPD ακολουθήθηκε και από τους Carminati και συν., (2004) που απομόνωσαν 43 στελέχη, από την επιφάνεια τυριών ωρίμανσης Gorgonzola χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους UBC155, HLWL85 και M1. Τέλος, οι Siragusa και συν., (2008) πραγματοποίησαν παρόμοια ανάλυση PCR-RAPD με εκκινητές P4, P7, or M13, απομονώνοντας οξυγαλακτικά βακτήρια από προζύμια με αλεύρι σίτου τύπου 0 F114.

4.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΖΥΜΙΩΝ

4.2.1 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η πρωτεόλυση έχει επιβεβαιωθεί ότι αντιπροσωπεύει έναν από τους σημαντικότερους βιολογικούς μηχανισμούς που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία ζύμωσης. Αναλυτικότερα, η πρωτεόλυση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στην αρχική πρωτεόλυση όπου πραγματοποιείται απελευθέρωση ολιγοπεπτιδίων και στην δευτερεύουσα κατά την οποία απελευθερώνονται ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια μικρού μεγέθους. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεόλυση έχει πρωταρχικό ρόλο στα ρεολογικά και σε άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά –κυρίως τη γεύση και την υφή- που αφορούν τα προϊόντα αρτοποιίας.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, αξιολογήθηκε η πρωτεολυτική δράση τόσο των βακτηριακών στελεχών *Lb. plantarum*, με δύο προσεγγίσεις, πρώτα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο. Από το σύνολο των στελεχών που μελετήθηκαν, 26 παρουσίασαν ένδειξη πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Βιβλιογραφικά η πρωτεολυτική ικανότητα των λακτοβάκιλλων και συγκεκριμένα στελεχών του είδους *Lb. plantarum* έχει υποστηριχθεί από διάφορες μελέτες (Di Cagno και συν., 2006, Martinez-Anaya, 1996, Saeed και συν., 2014, Valcheva και συν., 2009).

Στην συνέχεια του πειράματος, τα στελέχη αυτά που έδωσαν θετικά αποτελέσματα με την πρώτη μέθοδο, υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο, προς επιβεβαίωση της πρωτεολυτικής τους ιδιότητας. Αναλυτικότερα, κατά την διεξαγωγή της 1^{ης} μεθόδου υπήρξε δημιουργία ζωνών διαύγασης γύρω από τις οπές, στις οποίες έχει μεταφερθεί η αντίστοιχη ποσότητα υπερκειμένου ανάπτυξης βακτηρίων. Κατά τη 2^η μέθοδο όμως, δεν επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα και δεν φαίνεται να πραγματοποιείται πλήρης υδρόλυση των πρωτεϊνών σίτου (3 κλάσματα πρωτεϊνών).

Βιβλιογραφικά, σε ερευνητική εργασία με ίδια πειραματική διαδικασία με μικρές παραλλαγές (Di Cagno και συν., 2002) μελετήθηκαν 55 στελέχη που ανήκαν σε 12 είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αυτά εξετάστηκαν ως προς την πρωτεολυτική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας το WFHP υπόστρωμα και όσα έδωσαν θετικά αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της δευτερης μεθόδου (SDS ηλεκτροφόρηση).

4.2.2 ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Μία επόμενη ιδιότητα ως προς την οποία ελέγχθηκαν τα διάφορα στελέχη *Lb. plantarum* είναι αυτή της λιπόλυσης. Πρόκειται για μια βιοχημική διεργασία με ζωτική σημασία για τη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος ιδιαίτερα στα αρτοποιητικά προϊόντα. Η ιδιότητα αυτή έχει μελετηθεί εξίσου και σε άλλα πεδία της παραγωγής τροφίμων όπως αυτό των γαλακτοκομικών προϊόντων (Hernández και συν., 2009, Ozturkoglu-Budak και συν., 2016, Karami, 2017), του κρέατος (Huang και συν., 2014, Chen και συν., 2017) αλλά και του ελαιολάδου (Hernández και συν., 2006, Zullo & Ciafardini, 2008, Rodríguez-Gómez και συν., 2010) κ.ά.. Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την ζύμωση προϊόντων αρτοποιίας έχει μελετηθεί εκτενώς, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με λιπάσες που παράγονται από στελέχη *Lactobacillus* spp. (de Fatima Silva Lopes και συν., 2001). Από τις πρώτες μελέτες για ανίχνευσης λιπολυτικής δραστηριότητας οξυγαλακτικών βακτηρίων παρατηρήθηκε το γεγονός ότι έχουν πολύ χαμηλή (Vogel και συν., 1990), ή ακόμη και αμελητέα λιπολυτική δραστηριότητα (Kenneally και συν., 1998).

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η εκτίμηση της λιπολυτικής δραστηριότητας των διαφόρων στελεχών, όπως περιγράφεται και στις πργρ. 2.4.3 και 2.4.4 της ενότητας των Υλικών & Μεθόδων, πραγματοποιήθηκε με δύο προσεγγίσεις. Αναλυτικότερα, από τα 78 στελέχη, που μελετήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, 7 στελέχη παρουσίασαν λιπολυτική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να είναι σχετικά με αυτά της βιβλιογραφίας όπου, οι Paramithiotis και συν., 2010 σε αξιολόγηση της λιπολυτικής δράσης 136 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από προζύμια, δεν παρατήρησαν λιπολυτική δραστηριότητα σε κανένα από τα στελέχη που μελετήθηκαν. Παρόμοια, οι Ozturkoglu-Budak και συν., (2016) έδειξαν ότι από τα βακτηριακά στελέχη *Lb. paraplantarum*, *Lb. brevis* και *Lb. coryniformis*, που απομονώθηκαν από τυρί πρόβειου γάλακτος, παρουσίασαν από ασθενή έως καθόλου λιπολυτική δράση σε spirit blue lipase agar plates. Γενικότερα τα είδη *Lactococcus* και *Lactobacillus* spp. θεωρούνται ασθενώς λιπολυτικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Flavobacterium* (Collins και συν., 2003). Τέλος, σχετικά με την παρούσα ερευνητική εργασία ήταν και τα αποτελέσματα έρευνας για τη λιπολυτική δράση στελεχών του γένους *Lactobacillus* που πραγματοποιήθηκε από τους de Fatima Silva Lopes και συν., 2002. Αναλυτικότερα, στελέχη *Lb. plantarum*, που απομονώθηκαν από προϊόντα κρέατος, με χρήση υποστρώματος τριβουτυρίνης αλλά και ελαιολάδου ελέγχθηκαν για ύπαρξη λιπολυτικής δράσης. Ωστόσο, κανένα στέλεχος, με τη μέθοδο τρυβλίου με υπόστρωμα το ελαιόλαδο, δεν παρουσίασε τέτοια δράση.

Παρόμοια, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η τριβουτυρίνη, μικρός αριθμός στελεχών παρουσίασε μικρή δραστικότητα, αλλά μόνο μετά το πέρας 2 εβδομάδων.

4.2.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΑΣΗΣ

Από το σύνολο των οξυγαλακτικών βακτηρίων λίγα είναι αυτά στα οποία έχει παρατηρηθεί ικανότητα παραγωγής φυτάσης, με τα σημαντικότερα είδη να είναι τα *Lb. amylovorus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. acidophilus* και *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Η ικανότητα παραγωγής φυτάσης, που παρουσιάζουν τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν, έχει περιγραφεί αναλυτικά στις πργρ. 2.4.5 και 3.3.3 των προηγούμενων Ενοτήτων. Συνοπτικά, με μέθοδο τρυβλίου ελέγχθηκε η πιθανή παραγωγή φυτάσης από τα στελέχη. Βρέθηκε ότι στο σύνολο των στελεχών *Lb. plantarum* που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε παραγωγή φυτάσης.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντιπαράθεση με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας τα οποία σχετίζονταν με την παραγωγή φυτάσης. Οι Sumengen και συν., (2013) μελέτησαν αρχικά, σε επίπεδο τρυβλίου, την ικανότητα παραγωγής φυτάσης από στελέχη *Lb. plantarum*. Συγκεκριμένα, 30 από τα 41 στελέχη που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα παραγωγής φυτάσης (ύπαρξη ορατής ζώνης υδρόλυσης γύρω από την αποικία). Αντίστοιχα αποτελέσματα βιβλιογραφίας επιβεβαιώνουν την ικανότητα παραγωγής φυτάσης από είδη που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* (Anastasio και συν., 2010; Bae και συν 1999; Raghavendra & Halami, 2009, Afolabi & Popoola, 2006, Sumengen και συν., 2012, De Angelis και συν., 2003).

4.2.4 pH ΚΑΙ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Άλλο ένα χαρακτηριστικό που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον είναι η ικανότητα οξίνισης των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήρια καλλιέργεια σε προϊόντα αρτοποιίας. Έτσι, μελετήθηκαν τόσο το pH όσο και η ογκομετρούμενη οξύτητα των στελεχών *Lb. plantarum* σε προζύμι και ο τρόπος και τα αποτελέσματα περιγράφονται αναλυτικά στις πργρ. 2.6.2, 3.3.4 και 3.3.5 των δύο προηγούμενων Ενοτήτων. Όσον αφορά το pH, οι τιμές του κυμαίνονταν στο 1^ο προζύμι (υγρό προζύμι, 18h επώαση, 30 °C) κυμάνθηκαν από 3.25 έως 4.57. Αντίστοιχα, το pH στο 2^ο προζύμι (επιπλέον 18h επώαση, θερμοκρασία δωματίου) παρουσιάζει τιμές από 3.23 έως 4.50, με το μάρτυρα να παρουσιάζει pH 4.96. Τέλος, σε γενικές γραμμές βλέπουμε ότι το pH παρουσιάζει πολύ μικρή μείωση από το αρχικό υγρό προζύμι στο

τελικό προζύμι κάτι που μπορεί να οφείλεται στην δυνατότητα επώασης των μικροοργανισμών για 18 επιπλέον ώρες. Βιβλιογραφικά τα αποτελέσματα, σχετικά με τις τιμές του pH μετά τη ζύμωση, σε αντίστοιχες μελέτες φαίνεται να είναι κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα και να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές pH συγκριτικά με το μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, οι Tamani και συν., (2013) παρουσιάζουν τιμές pH σε προζύμι που κυμαίνονται από 3.66 – 3.93 με το μάρτυρα να έχει τιμή pH 5.67. Παρόμοια με την παρούσα μελέτη αποτελέσματα παρουσιάζονται και από τους Paramithiotis και συν., (2006) όπου μετά από επώαση οξυγαλακτικών οξέων για 24h στους 30 °C το pH για το *Lb. sanfranciscensis* και το *Lb. brevis* ήταν 3.65 – 3.67 και για το *Lb. paralimentarius* 3.46 – 3.47, με το μάρτυρα (προζύμι χωρίς εναρκτήρια καλλιέργεια οξυγαλακτικού βακτηρίου) να παρουσιάζει τιμή pH 5.99. Αντίστοιχα αποτελέσματα με τα παραπάνω παρουσιάζει και το pH προζυμιών με καλλιέργειες εκκίνησης τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, όπου το pH κυμάνθηκε από 4.02 – 5.12, με το μάρτυρα να έχει pH 5.39 (Hadaegh και συν., 2017).

4.2.5 ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Κατά την παρασκευή των προζυμιών με μονοκαλλιέργειες των στελεχών *Lb. plantarum* ως εναρκτήριες καλλιέργειες, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των μικροβιακών αποικιών των βακτηρίων, που απομονώθηκαν τόσο από το 1^ο προζύμι (υγρό προζύμι - μετά από 18 h επώασης στους 30 °C) όσο και από το 2^ο (προζύμι πριν το ψήσιμο - μετά από επιπλέον 18 h επώασης σε θερμοκρασία δωματίου), όπως περιγράφεται στην πργρ. 2.6.3 της Ενότητας των Υλικών και Μεθόδων. Συγκεκριμένα, στο 1^ο και στο 2^ο προζύμι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε από 8.94 – 9.98 CFU/ g και 9.37 – 10.23 CFU/ g αντίστοιχα, με τις τιμές να παρουσιάζουν αύξηση μικρότερη του ενός λογαρίθμου από το 1^ο στο 2^ο προζύμι.

Όσον αφορά την βιβλιογραφία, τα επίπεδα στελεχών *Lb. plantarum*, που χρησιμοποιούνταν ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε προζύμια τύπου I, κυμαίνονται από 9.13 - 9.46 CFU/ g (8 h επώασης στους 30 °C) (Minervini και συν., 2010). Σε παρόμοια ερευνητική εργασία, οι Paramithiotis και συν., (2010) παρουσιάζουν τα επίπεδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε προζύμια από 8.25 - 8.77 log CFU/g, τιμές ελάχιστα μικρότερες από αυτές της παρούσας μελέτης.

4.3 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Η αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δραστηριότητα που επιδεικνύουν τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, που αποτελούν ενδογενή μικροχλωρίδα του προζυμίου, έχει περιγραφεί αναλυτικά στην πρώτη Ενότητα, και συγκεκριμένα στις πργρ. 1.5.8 και 1.5.9.

4.3.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΡΥΒΑΙΟΥ

Ο σχηματισμός μούχλας είναι ένα από τα συχνότερα φαινόμενα αλλοίωσης που εμφανίζεται στα διάφορα προϊόντα αρτοποιίας. Αναφορικά με το ψωμί, η εμφάνιση μούχλας οδηγεί όχι μόνο σε αλλαγές στο χρώμα και τη γεύση, αλλά και στην ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου, ως αποτέλεσμα του ενδεχόμενου σχηματισμού μυκοτοξινών. Οι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* κ.ά. είναι αυτοί που μολύνουν κυρίως το ψωμί και άλλα αρτοποιητικά προϊόντα.

Όπως παρατέθηκε αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα, 78 στελέχη *Lb. plantarum* της συλλογής του Εργαστηρίου, μελετήθηκαν ως προς την ύπαρξη αντιμυκητιακής δραστηριότητας, σε επίπεδο τρυβλίου, με την ενσωμάτωση μύκητα γένους *Aspergillus*. Τέτοιου είδους μύκητες επιλέχθηκαν λόγω του ότι αποτελούν αντιπροσωπευτικό γένος μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα, αλλά και λόγω της ικανότητας τους να παράγουν μυκοτοξίνες.

Από το σύνολο των μελετούμενων στελεχών, 13 στελέχη *Lb. plantarum* παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης του μυκήτα. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να συνάδουν με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας, που χρησιμοποίησαν μέθοδο τρυβλίου, αφού σε πολλές μελέτες λακτοβάκιλλοι έχουν συνδεθεί με την παραπάνω ιδιότητα. Πιο συγκεκριμένα, οι Magnusson & Schnurer (2001) μελέτησαν την αντιμυκητιακή ικανότητα του είδους *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* ενάντια σε διάφορα είδη μυκήτων όπως τα *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti*, *M. hiemalis*, *T. flavus*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, και *F. Sporotrichoides*. Αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή αντιμυκητιακή δράση του συγκεκριμένου είδους ενάντια στους παραπάνω μύκητες που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Παρόμοια αποτελέσματα που αναδεικνύουν την αντιμικροβιακή ιδιότητα των λακτοβάκιλλων και συγκεκριμένα του είδους *Lb. plantarum* παρουσίασαν οι Russo και συν., (2017). Πιο αναλυτικά, 88 στελέχη *Lb. plantarum* μελετήθηκαν ως προς την αντιμυκητιακή τους δράση ενάντια στους μύκητες *A. niger*, *A. flavus*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *F. culmorum* και *Cladosporium* spp. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, μικρό ποσοστό στελεχών (9 στελέχη) παρουσίασε αντιμυκητιακή δράση, με το 60 – 80 % αυτών να μην μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων *P. roqueforti*, *A. niger*, *A. flavus* και *Cladosporium* spp.. Ενώ το 75 % των

στελεχών *Lb. plantarum* παρουσίασε ισχυρή παρεμποδιστική δράση ενάντια στα *P. chrysogenum*, *P. expansum*. Επίσης, οι Magnusson και συν., (2003), με την μέθοδο της επίστρωσης, μελέτησαν την πιθανή αντιμυκητιακή δράση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα στελέχη διαφόρων ειδών (*Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, *Lb. coryniformis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. sakei*, *P. parvulus*) μελετήθηκαν ως προς την παρεμποδιστική τους δράση στον *A. fumigatus*, με συνολικό ποσοστό περίπου 10 % να παρουσιάζει αντιμυκητιακή δράση και 4% να παρουσιάζει ισχυρή αντιμυκητιακή δράση. Τέλος, οι Cortés-Zavaleta και συν., (2013) πραγματοποίησαν παρόμοια μελέτη όσον αφορά στην αντιμυκητιακή ικανότητα στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, 13 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (5 *Lb. casei* [5], *Lb. rhamnosus* [2], *Lb. fermentum* [2], *Lb. acidophilus* [1], *Lb. plantarum* [1], *Lb. sakei* [1] και *Lb. reuteri*[1]) αξιολογήθηκαν ως προς στην αντιμυκητιακή τους δράση έναντι 4 ειδών μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα (*C. gloeosporioides*, *B. cinerea*, *P. expansum* και *A. flavus*).αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα στελέχη παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση, με τα *Lb. acidophilus* και *Lb. casei* να παρουσιάζουν ισχυρή δράση ενώ τα *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus* και *Lb. plantarum* να παρουσιάζουν χαμηλή παρεμποδιστική δράση ενάντια στους παραπάνω μύκητες.

4.3.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΡΥΒΑΙΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ, ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΙΜΕΣ pH

Όπως περιγράφεται και στην ενότητα των Αποτελεσμάτων, για την περαιτέρω μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης των στελεχών *Lb. plantarum*, τα 13 στελέχη που παρουσίασαν ισχυρή αντιμυκητιακή ικανότητα στην μέθοδο τρυβλίου, αναπτύχθηκαν εκ νέου και υποβλήθηκαν σε ενζυματική, θερμική κατεργασία και ανάπτυξη σε διάφορες τιμές pH (όπως περιγράφονται στην Παράγραφο 2.4.6).

Συνοπτικά, το υπερκείμενο ανάπτυξης των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων υποβλήθηκε σε επεξεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάση και θρυψίνη) ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία αντιμυκητιακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσης και σε 4 τιμές θερμοκρασίας (60, 70, 96 και 121 °C) ώστε να μελετηθεί η θερμοανθεκτικότητα των αντιμυκητιακών ουσιών. Τέλος, η τιμή του pH ρυθμίστηκε σε 4 επίπεδα (3.0, 4.0, 5.0 και 9.0) ώστε να μελετηθεί η αντίστοιχη σταθερότητα των αντιμυκητιακών ενώσεων και να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της ταυτότητάς τους. Όσον αφορά στην αντιμυκητιακή δράση μετά την κατεργασία στις διάφορες τιμές pH, η πλειοψηφία των στελεχών την διατηρούσε στις χαμηλές τιμές pH (3.0 – 5.0), ενώ η

πλειοψηφία των στελεχών φαίνεται να χάνει την ικανότητα αυτή σε pH 9.0. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να επιβεβαιώνονται και βιβλιογραφικά από τους Magnusson & Schnurer (2001), όπου μετά από παρόμοια κατεργασία σε εύρος τιμών pH, παρατήρησαν ότι μέγιστη παρεμποδιστική ικανότητα ενάντια στους μύκητες παρουσιάστηκε σε τιμές pH 3.0 – 4.5, ενώ μειωμένη παρεμποδιστική δράση σε τιμές pH 4.5 – 6.0. Τέλος, σε τιμές pH μεγαλύτερες τους 6.0 δεν παρουσιάστηκε αντιμυκητιακή δράση σε υπερκείμενο αναπτυξής στελεχών του *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*. Επίσης, σύμφωνα με τους Ki Huh & Yean Hwang (2016) σε μελέτη της αντιμυκητιακής ικανότητας στελεχών *Lb. sakei* ενάντια σε *P. brevicompactum*, μετά από παρόμοια κατεργασία σε εύρος τιμών pH, τα στελέχη φαίνεται να διατηρούν την παρεμποδιστική τους δράση ενάντια στο μύκητα σε χαμηλά pH (3.0 – 4.0), ενώ χάνουν την δράση τους όταν το pH κυμάνθηκε σε υψηλότερες τιμές, από 5.0 – 8.0. Τέλος, οι Yang και συν., (2010) ανέφεραν ότι οι ουσίες που παράγονται από στελέχη *Lb. plantarum* παρουσιάζουν δραστηριότητα σε pH 3.0 και 4.0 αλλά όχι σε pH 5.0 - 7.0

Σχετικά με την αντιμυκητιακή δράση των 13 στελεχών μετά την κατεργασία με τα πρωτεολυτικά ένζυμα, 3 στελέχη *Lb. plantarum*, δεν παρουσίασαν παρεμπόδιση μετά την ενζυμική κατεργασία με πρωτεάση και θρυψίνη, κάτι που υποδεικνύει την πρωτεϊνική τους φύση. Σχετικά με τα υπόλοιπα 10 στελέχη *Lb. plantarum* που μελετήθηκαν, αυτά φαίνεται να μην διατηρούν την δράση τους μετά την παραπάνω κατεργασία – κάτι που συνάδει με την πλειοψηφία των βιβλιογραφικών πηγών. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τους Magnusson & Schnurer (2001) μετά από κατεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεϊνάση K, τρυψίνη και πεψίνη) τα στελέχη *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* δεν παρατηρήθηκε να διατηρούν την αντιμυκητιακή τους δράση. Αντίστοιχα, οι Rouse και συν., (2008) σε στελέχη *Lb. plantarum* που υποβλήθηκαν σε κατεργασία με πρωτεϊνάση K παρουσίασαν ότι εξαλείφθηκε η αντιμυκητιακή δραστηριότητα των στελεχών. Επίσης, οι Mauch και συν., (2010), Guo και συν., (2011) έδειξαν ότι μετά την κατεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα μειώθηκε η αντιμυκητιακή δραστηριότητα στελεχών των *Lb. brevis* και *Lb. reuteri*. Τέλος, σύμφωνα με τους Ki Huh & Yean Hwang (2016), μετά από ανάλογη ενζυμική επεξεργασία στελεχών του *Lb. sakei* με τα πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεϊνάση K και πρωτεάση) τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αντιμυκητιακές ουσίες που παράγονται δεν ήταν πρωτεϊνικής φύσεως.

Τέλος, σχετικά με την κατεργασία στις διάφορες θερμοκρασίες, τα στελέχη του *Lb. plantarum* που μελετήθηκαν φαίνεται να χάνουν την αντιμυκητιακή τους δράση. Σε αντίστοιχες μελέτες, καμία απώλεια αντιμυκητιακής δραστηριότητας στελεχών *Lb.*

plantarum και- *Lb. farciminis* ενάντια σε μύκητες που ανήκουν στα *Aspergillus* spp., *Fusarium roseum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. και *Stemphylium* spp. δεν παρατηρήθηκε μετά τη θερμική κατεργασία (45, 70, 100 και 120 °C), σύμφωνα με τους Laref & Guessas (2013). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για στελέχη *Lb. plantarum*, από τους Niku-Paavola και συν., (1999) μετά από θερμική επεξεργασία στους 120 °C, αλλά και από τους Rouse και συν., (2008) κατά τη θερμική κατεργασία στελεχών *Lb. plantarum* τόσο στους 80 °C για 1 h όσο και στους 121 °C για 15 min. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την διατήρηση της αντιμυκητιακής ικανότητας στελεχών *Lb. plantarum*, μετά από κατεργασία σε διάφορες τιμές θερμοκρασίας, παρουσίασαν και οι Gerez και συν., (2009) που ανέφεραν ότι η θερμική επεξεργασία (100 °C για 10 min) δεν φαίνεται να επηρέασε την αντιμυκητιακή δραστηριότητα των στελεχών. Αντίστοιχα, οι Miescher Schwenninger και συν., (2005) ανέφεραν ότι η θερμική επεξεργασία σε στελέχη *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29 και SM63 για 10 min στους 100 °C δεν επηρέασε την αντιμυκητιακή ενεργότητα τους. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Gourama (1997) σε αντίστοιχη μελέτη έδειξε απώλεια της παρεμποδιστικής δραστηριότητας μετά από κατεργασία στους 100 °C για μια χρονική περίοδο 10 min.

4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΜΕ HPLC

Για την αξιολόγηση του τρόπου κατανάλωσης των σακχάρων και την παραγωγή μεταβολιτών από τις μονοκαλλιέργειες στελεχών *Lb. plantarum*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται στις πργρ. 2.5 και 3.7 των Υλικών και Μεθόδων και των Αποτελεσμάτων αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε, το *Lb. plantarum* μπορεί να μεταβολίσει τη γλυκόζη, η οποία αποτέλεσε την αποκλειστική πηγή υδατάνθρακων στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Στα περισσότερα στελέχη *Lb. plantarum*- που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε πλήρης καταβολισμό της γλυκόζης, αλλά παράχθηκαν γαλακτικό και οξικό οξύ. Όπως παρουσιάζεται εκτενώς στην προηγούμενη Ενότητα, η κατανάλωση της γλυκόζης από τα στελέχη *Lb. plantarum* κυμάνθηκε από 25,368 mM έως 110 mM (πλήρης κατανάλωση). Από το σύνολο, 3 μόνο στελέχη *Lb. plantarum* φαίνεται να καταναλώνουν πλήρως τη γλυκόζη. Συγκεκριμένα, τα LQC 1977, LQC 1979 και LQC 1980 παρουσίασαν πλήρη καταβολισμό της γλυκόζης και αυτό είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε στοιχειομετρική αναλογία περίπου 1:2. Ακόμα, 2 από τα μελετούμενα στελέχη (LQC 1976, LQC 1978) παρουσίασαν εξίσου υψηλή κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού (αλλά και οξικού οξέος). Τέλος, σε 3 στελέχη (LQC 1984, LQC 771 και LQC

843) παρουσιάστηκε υψηλή κατανάλωση γλυκόζης αλλά παράχθηκε μικρότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος από την αναμενόμενη. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε παραγωγή επιπλέον καταβολικών προϊόντων, που δεν ανιχνεύθηκαν από την παρούσα ανάλυση, είτε σε κατεύθυνση τους σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια και κυτταρικές λειτουργίες που δεν είναι ανιχνεύσιμα με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε (Paramithiotis και συν., 2007).

Όσον αφορά στην παραγωγή κιτρικού οξέος (το οποίο υπήρχε σε αρχική συγκέντρωση 0,148 mM), στα στελέχη LQC 843, LQC 1673, LQC 1680 παρουσιάστηκε σε πολύ μικρότερες τιμές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε βιομετατροπή του κιτρικού οξέος σε φορμικό ή/ και σε ηλεκτρικό οξύ (Hugenholtz, 1993, Kennes και συν., 1991, Gemelas και συν., 2014, Ouattara και συν., 2016). Πιο συγκεκριμένα, για το είδος *Lb. plantarum* έχει περιγραφεί η μετατροπή του κιτρικού οξέος σε ηλεκτρικό οξύ ή/ και η μετατροπή του σε οξικό και φορμικό (μέσω πυροσταφυλικού) (Kennes και συν., 1991).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AACC International Method 10-12.01, (2012). Guidelines for scoring experimental bread. Baking Quality, 1 – 6.
- Afolabi O.R., Popoola T.O.S., (2006). Phytase activity of *Lactobacillus plantarum* strains from fufu-fermented cassava. Trop. Sci., 44, 184–186.
- Anastasio M., Pepe O., Cirillo T., Palomba S., Blaiotta G., Villani F., (2010). Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. Journal of Food Science, 75(1), 28–35.
- Arendt E. K., Ryan L. A.M., Dal Bello F., (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology, 24, 165 – 174.
- Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.J., Selinger L.B. (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. Journal of Microbiological Methods, 39, 17–22.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K., (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6, 71 –79.
- Batish V. K., Roy U., Lal R., Grover S., (1997). Lactic acid bacteria - A review. Critical Reviews in Biotechnology, 17(3), 209 – 225.
- Brummer J.M. Lorenz K., (1991). European developments in wheat sourdoughs. Cereal Foods World 36, 310 - 314.
- Bullerman L.B., Giesova M., Hassan Y., Deibert D., Ryu D., (2006). Antifungal activity of sourdough bread cultures. Advances in Experimental Medicine and Biology, 571, 307 – 316.
- Carminati D., Perrone A., Giraffa G., Neviani E., Mucchetti G., (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. Food Microbiol 21: 801 – 807.
- Cappelle S., Guylaine L., Ganzle M., Gobbetti M., (2013). History and Social Aspects of Sourdough. In: Gobbetti M., Ganzle M., Handbook on Sourdough Biotachnology, Springer, New York, 1 - 11.

- Chaoui A., Faid M., Belahsen R., (2006). Making bread with sourdough improves iron bioavailability from reconstituted fortified wheat flour in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 217 – 220.
- Chavan R. S., Chavan S. R., (2011). Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 169 – 182.
- Chen Q., Kong B., Han Q., Xia X., Xu L., (2017). The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development. *LWT Food Sci Technol*, 77, 389-396.
- Cizeikiene D., Juodeikiene G., Paskevicius A., Bartkiene E., (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31, 539 – 545.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int Dairy J*, 13, 841-866.
- Corsetti A., De Angelis M., Dellaglio F., Paparella A., Fox P.F., Settanni L., Gobbetti M., (2003). Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.*, 94 (4), 641 - 654.
- Corsetti A., Settanni L., (2006). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539 – 558.
- Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., Hernández-Mendoza A., García H.S., (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 30–35.
- Couch G. W., (2016). Effect of sourdough fermentation parameters on bread properties. *Clemson University All Theses*. 2581. https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/2581
- Curic D., Novotni D., Skevin D., Rosell C.M, Collar C., Le Bail A., Colic-Baric I., Gabric D., (2008). Design of a quality index for the objective evaluation of bread quality: Application to wheat breads using selected bake off technology for bread making. *Food Research International*, 41, 714 – 719.
- Damiani P., Gobbetti M., Cossignani L., Corsetti A., Simonetti M. S., Rossi J., (1996). The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative

Lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Food Science and Technology*, 29 (1-2), 63 - 70.

De Angelis M., Gallo G., Corbo M.R., McSweeney P.L.H., Faccia M., Giovine M., Gobbetti M., (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 259 – 270.

De Fatima Silva Lopes M., Leitao A.L., Regalla M., Figueiredo Marques J.J., Teixeira Carrondo M.J., Barreto Crespo M.T., (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 107 – 115.

De Vuyst L., Neysens P., (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43 – 56.

De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Leroy F., (2017). Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 50 – 65.

De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S., (2009). Biodiversity, ecological determinants and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26, 666 – 675.

Di Cagno R., Quinto M., Corsetti A., Minervini F., Gobbetti M., (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16, 119–130.

Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M., Gobbetti M., (2002). Proteolysis by sourdough Lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), 623 – 633.

Di Cagno R., Pontonio E., Buchin S., De Angelis M., Lattanzi A., Valerio F., Gobbetti M., Calasso M., (2014). Diversity of the lactic acid bacterium and yeast microbiota in the switch from firm- to liquid-sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 3161 – 3172.

- Dincer E., Kivanc M., (2018). Lipolytic activity of Lactic acid bacteria isolated from Turkish pastirma. *Anadolu Univ. J. of Sci. and Technology C – Life Sci. and Biotech.*, 7 (1), 12 – 19.
- Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 31 - 42.
- Elia M., (2011). A procedure for sensory evaluation of bread: protocol developed by a trained panel. *Journal of Sensory Studies*, 26, 269 – 277.
- Esteban-Torres M., Mancheno J.M., De las Rivas B., Munoz R., (2015). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT- Food Sci Technol.*, 60, 246 - 252.
- Gänzle M., Gobbetti M., (2013). Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria. In: Gobbetti M., Ganzle M., *Handbook on Sourdough Biotachnology*, Springer, New York.
- Gänzle M., Ripari V., (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 19 – 25.
- Garofalo C., Zannini E., Aquilanti L., Silvestri G., Fierro O., Picariello G., Clementi F., (2012). Selection of sourdough Lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 7719 – 7728.
- Gemelas L., Degraeve P., Demarigny Y., (2014). The citrate metabolism in homo- and heterofermentative LAB: a selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 953-969.
- Gerez C.L, Rollan G.C., De Valdez G.F., (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 42, 459 – 464.
- Gerez C.L., Torino M.I., Rollan G., De Valdez G.F., (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20, 144–148.
- Gobbetti M., Corsetti A, Rossi J., (1996). *Lactobacillus sanfrancisco*, a key sourdough lactic acid bacterium: physiology, genetic and biotechnology. *Adv. Food Sci.*, 18, 167 – 175.

- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Rizzello C. G., (2008). Sourdough/lactic acid bacteria. In: Arendt E.K., Dal Bello F. Gluten-free cereal products and beverages. Food Science and Technology.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W.S., Courtin C.M., Gebruers K., Delcour J.A., (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends in Food Science & Technology, 16, 12 - 30.
- Gourama H. (1997) Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. LWT-Food Science Technology, 30, 279–283.
- Guo J., Mauch A., Galle S., Murphy P., Arendt E.K., Coffey A., (2011). Inhibition of growth of Trichophyton tonsurans by Lactobacillus reuteri. Journal of Applied Microbiology, 111, 474-483.
- Hadaegh H., Seyyedain Ardabili S. M., Tajabadi Ebrahimi M., Chamani M., Azizi Nezhad R., (2017). The impact of different lactic acid bacteria sourdoughs on the quality characteristics of toast bread. Journal of Food Quality, 2017, 1-11.
- Hammes, P. W., Stolz, P. and Ganzle, M. (1996). Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. Adv. Food Sci., 18, 176 – 184.
- Hamza A.A., El Gaali E.I., Mahdi A.A., (2009). Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). African Journal of Biotechnology, 8 (15), 3399 -3404.
- Hansen A., Schieberle P., (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. Trends Food Sci. Technol., 16, 85 – 94.
- Heenan S. P., Dufour J-P., Hamid N., Harvey W., Delahunty C. M., (2008). The sensory quality of fresh bread: Descriptive attributes and consumer perceptions. Food Research International, 41, 989 – 997.
- Heiniö R.L., (2014). Sensory attributes of bakery products. In: Zhou W., Hui Y.H., De Leyn I., Pagani M. A., Rosell C. M., Selman J. D., Therdthai N., Bakery products science and technology, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd.
- Hernández A., Martín A., Aranda E., Pérez Nevado F., Córdoba M.G., (2006). Identification and characterization of yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Food Microbiol, 24, 346-351.

- Hernández I., Barrón L.J.R., Virto M., Pérez-Elortondo F.J., Flanagan C., Rozas U., de Renobales M., (2009). Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. *Food Chemistry*, 116(1), 158–166.
- Hoseney, R.C., (1994). *Principles of cereal science and technology*, 2nd ed. Am. Assoc. of Cereal Chem. Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Huang Y., Li H., Huang T., Li F., Sun J., (2014). Lipolysis and lipid oxidation during processing of Chinese traditional smoke-cured bacon. *Food Chemistry*, 149, 31–39.
- Hughenoltz J., (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews*, 12, 165-178.
- Hui Y.H., Corke H., Nip W-K., De Leyn I., Cross N.A., (2006). *Bakery products: science and technology*, Blackwell Publishing Iowa, USA, 365 – 380.
- Hui Y.H., Meunier-Goddik L., Hansen A.S., Josephsen J., Nip W-K., Stanfield P.S., Toldra F., (2004). *Food Science and Technology. A Series of Monographs, Textbooks, and Reference Books. Part VII: Fermented cereal Foods*. Marcel Dekker, Inc. NY.
- Huys G., Daniel H-M., De Vuyst L., (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. In: Gobbetti M., Ganzle M., *Handbook on Sourdough Biotechnology*, Springer, New York.
- Karami M., (2017). Enhancing the lipolysis of feta-type cheese made from ultrafiltered cow's milk. *LWT Food Sci Technol*, 80, 386-393.
- Katina K., Arendt E.K., Liukkonen K.H., Autio K., Flander L., Poutanen K., (2005). Potential of sourdough for cereal products. *Trends Food Sci. Technol*, 16, 104 – 112.
- Katina K., Sauri M., Alakomi H.L., Mattila Sandholm T., (2002). Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *LWT - Food Science and Technology*, 35 (1), 38 – 45.
- Kenneally P.M., Leuschner R.G., Arendt E.K., (1998). Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 839–846.

- Kennes C., Dubourguier H.C., Albagnac G., Nyns E.-J., (1991). Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 380-384.
- Ki Huh C., Yean Hwang T., (2016). Identification of antifungal substances of *Lactobacillus sakei* subsp. ALI033 and antifungal activity against *Penicillium brevicompactum* strain FI02. *Prev Nutr Food Sci.*, 21(1), 52–56.
- Laref N., Guessas B., (2013). Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13, 80-88.
- Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A., (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 634–640.
- Leroy F., De Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67 – 78.
- Lopez H. W., Duclos V., Coudray C., Krespine V., Feillet-Coudray C., Messenger A., Demigne C., Remesy C., (2003). Making Bread With Sourdough Improves Mineral Bioavailability From Reconstituted Whole Wheat Flour in Rats. *Nutrition*, 19, 524 – 530.
- Lorenz K., Brummer J.M., (2003). Preferments and sourdoughs in German breads In: Kulp K., Lorenz K. *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Magnusson J., Schnurer J., (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1 - 5.
- Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjogren J., Schnürer J., (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219, 129 - 135.
- Martínez-Anaya M.A., (1996). Enzymes and Bread Flavor. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9), 2469 – 2480.
- Martínez-Anaya M.A., (2003). Associations and interactions of micro-organisms in dough fermentations: Effects on dough and bread characteristics. In: Kulp K., Lorenz K. *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker Inc, New York.
- Mauch A., Dal Bello F., Coffey A., Arendt E.K., (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common

- Fusarium species found on barley. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 116 – 121.
- Mentes O., Ercan R., Akcelik M., (2007). Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope forming *Bacillus* strains. *Food Control*, 18 (4), 359 – 363.
- Messens W., De Vuyst L., (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs - a review. *International Journal of Food Microbiology.*, 72 (1–2), 31 - 43.
- Miescher Schwenninger S., Meile L., (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic Applied Microbiology*, 27, 229–237.
- Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Pinto D., Siragusa S., Rizzello C.G., Gobbetti M., (2010). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27, 897-908.
- Minervini F., Di Cagno R., Lattanzi A., De Angelis M., Antonielli L., Cardinali G., Cappelle S., Gobbetti M., (2011). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1251 – 1264
- Molin G., (2015). *Lactobacillus plantarum* 299v. Lund University, 1 - 14.
- Muhaladin B. J., Hassan Z., Saari N., (2015). Lactic acid bacteria in biopreservation and the enhancement of the functional quality of bread. In: Kongo M. *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. (www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes).
- Niku-Paavola M.L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A., (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29–35.
- Nionelli L., Rizzello C. G., (2016). Sourdough-Based Biotechnologies for the Production of Gluten-Free Foods. *Foods*, 5, 65.
- NMKL PROCEDURE No. 31, (2015). Guidelines for sensory evaluation of bread. Nordic Committee on Food Analysis, 1, 1 - 25.

- Ottogalli G., Galli A., Foschino R., (1996). Italian bakery products obtained with sour dough: Characterization of the typical microflora. *Adv. Food Sci.*, 18, 131 -144.
- Ouattara D.H., Ouattara H.G., Adom J.N., Goualié B.G., Koua G.A., Doué G.G., Niamke S.L., (2016). Screening of lactic acid bacteria capable to breakdown citric acid during Ivorian cocoa fermentation and response of bacterial strains to fermentative conditions. *British Biotechnology Journal*, 10(3), 1-10.
- Ouwehand A. C., Vesterlund S., (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A.C., *Lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga A., Bron P.A., De Vries R.P., (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 237, 17–27.
- Paramithiotis S., (2001). Μελέτη συμβίωσης άγριων στελεχών ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων σε παραδοσιακό ζυμάρι.
- Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G., (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry*, 40, 2813 – 2819.
- Paramithiotis S., Drosinos E. H., (2017). The Sourdough Micro-ecosystem: An Update. *Fermented Food - Part II: Technological Interventions*.
- Paramithiotis S., Gioulatos S., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G., (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, 41, 2429–2433.
- Paramithiotis S., Sofou A., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G., (2007). Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 1417–1423.
- Paramithiotis S., Tsiasiotou S., Drosinos E. H., (2010). Comparative study of spontaneously fermented Sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur Food Res Technol*, 231, 883 – 890.
- Pateraki S., Paramithiotis S., Doulgeraki A.I., Kallithraka S., Kotseridis Y., Drosinos E.H., (2014). Effect of sulfur dioxide addition in wild yeast population dynamics and

- polyphenolic composition during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko, 239, 1067 - 1075.
- Petel C., Onno B., Prost C., (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 105 – 123.
- Raghavendra P., Halami P.M. (2009). Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 129–134.
- Robert H., Gabriel V., Fontagne-Faucher C., (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 135, 53 - 59.
- Rodríguez-Gómez F., Arroyo-López F.N., López-López A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A., (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiol*, 27, 604 -612.
- Rollán G., De Angelis M., Gobbetti M., De Valdez G. F., (2005). Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1495 – 1502.
- Rollán G., Gerez C.L., Dallagnol A. M., Torino M.I., Font G., (2010). Update in bread fermentation by lactic acid bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1168 – 1174.
- Rouse S., Harnett D., Vaughan A., Van Sinderen D., (2008). Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915 – 923.
- Russo P., Arena M. P., Fiocco D., Capozzi V., Drider D., Spano G., (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48 - 54.
- Ryan L.A.M., Dal Bello F., Arendt E.K., (2008). The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 274 – 278.

- Saeed M., Yasmin I., Khan M. I., Pasha I., Khan M.R., Shabbir A., Khan W.A., (2014). Lactic acid bacteria in sourdough fermentation: a safe approach for food preservation. *Pak. J. Food Sci.*, 24 (4), 211-217.
- Schieberle P., (1996). Intense aroma compounds: Useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Adv Food Sci*, 18 (5-6), 237 –244.
- Settanni L., Ventimiglia G., Alfonzo A., Corona O., Miceli A., Moschetti G., (2013). An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Research International*, 54, 1569 – 1578.
- Siepmann F. B., Ripari V., Waszczynskij N., Spier M.R., (2018). Overview of Sourdough Technology: from production to marketing. *Food Bioprocess Technol.*, 11(2), 242 – 270.
- Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M., De Angelis M., (2008). Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4), 1099 – 1109.
- Smith, J. (1993). *Technology of reduced-additive foods*. Blackwell Publishing, 46 – 59.
- Sumengen M., Dincer S., Kaya A., (2012). Phytase production from *Lactobacillus brevis*. *Turk J Biol*, 36, 533-541.
- Sumengen M., Dincer S., Kaya A., (2013). Production and characterization of phytase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Biotechnology*, 27(2), 105-118.
- Tamani R.J., Goh K.K.T., Brennan C.S., (2013). Physico-chemical properties of sourdough bread production using selected lactobacilli starter cultures. *Journal of Food Quality*, 1745-4557.
- Tamony P., (1973). Sourdough and French bread. *Western Folklore*, 32, 265-270.
- Tieking M., Ganzle M.G., (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 79 – 84.
- Todorov S. D., Gombossy De Melo Franco B.D., (2010). *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*, 26 (3), 205 – 229.

- Valcheva R., Yungareva Ts., Kirilov N., Dobрева G., Minkov I., Ivanova I., (2009). Proteolytic and Phytase Activity in Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23 (1), 666-668.
- Ventimiglia G., Alfonzo A., Galluzzo P., Corona O., Francesca N., Caracappa S., Moschetti G., Settanni L., (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 51, 57 – 68.
- Veraverbeke W. S., Delcour J. A., (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to bread-making functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 179 - 208.
- Vilanova M. G., Díez C., Quirino B., Álava J. I., (2015). Microbiota distribution in sourdough: Influence of high sucrose resistant strains. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2, 98 – 102.
- Vogel R.F., Ehrmann M. A. Gänzle M. G., (2002). Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 631 – 638.
- Vogel R.F., Gaier W., Hammes W.P., (1990). Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* in *Lactobacillus curvatus* Lc2-c. *FEMS Microbiol Lett.*, 69, 289-292.
- Vogel R. F., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Wiezer A., Liesegan H., Offschanka S., Voget S., Angelov A., Böcker G., Liebl W., (2011). Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories* 10 (1), S6, 1-11.
- Yang E.J., Chang H.C., (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol.*, 139, 56–63.
- Zapparoli, G., Torriani, S. and Dellaglio, F. (1998) Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 166, 325–332.
- Zullo B.A., Ciafardini G., (2008). Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiol*, 25, 970 - 977.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καμάρδα Ε., Ορεστίδης Μ., (2016). Τεχνολογία Προζυμιών: Λειτουργία, τεχνικές ανάπτυξης και εφαρμογές στην αρτοποιία. Ελληνική Σχολή Αρτοποιίας.

Μποσδίκος Δ., (2005). Από το σιτάρι στο ψωμί, τεχνολογία αρτοποιίας, Κορμος Ειδικές Εκδόσεις, Αθήνα.

Μότσιας Χ., (1982). Τι έτρωγαν οι Αρχαίοι Έλληνες, Εκδόσεις Κάκτος.

Χουρζαμάνογλου Γ., (2008). Καθαρισμός και μελέτη ιδιοτήτων λυτικού ενζύμου από *Thermus thermophiles*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/s_hared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-HomoHeteroferm-10-08.pdf

<http://loulismuseum.gr/education/bread.html?showall=1&limitstart>

<https://www.sourdough.co.uk/glossary/>

ΟΝΟΜΑ ΔΟΚΙΜΑΣΤΗ :	
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ :	
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ :	

Παράρτημα Ι

ΦΥΛΛΟ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΨΩΜΙΟΥ

1) ΕΜΦΑΝΙΣΗ



(Συνολική εκτίμηση της εμφάνισης το δείγματος – «Δεν μου αρέσει καθόλου» (0) έως «Μου αρέσει πολύ» (10))

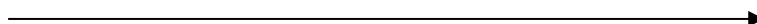
Α) ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΤΟ ΨΩΜΙ

• Χρώμα



(Άσπρο χρώμα (0) έως σκούρο καφέ/ μαύρο (10))

• Λάμψη



(Αντανάκλαση του φωτός στην κόρα του ψωμιού- Μηδενική(0) έως καθαρή φωτεινή (10))

• Βαθμός διόγκωσης



(Έλλειψη όγκου ή υπερβολικός όγκος ψωμιού μετά το ψήσιμο - Από επίπεδο (0) έως στρογγυλό/ κυλινδρικό καρβέλι ψωμιού (10))

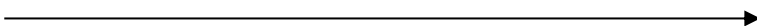
• **Περίσσεια αλεύρου
στην επιφάνεια**



(Ποσότητα αλεύρου στην επιφάνεια του δείγματος- Μηδενική (0) έως Πλήρης κάλυψη επιφάνειας (10))

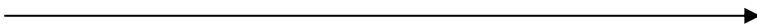
Β) ΚΟΡΑ

• **Χρώμα**



(Άσπρο χρώμα (0) έως σκούρο καφέ/ μαύρο (10))

• **Λεπτότητα**



(Πλάτος της κόρας του ψωμιού – πολύ λεπτή (0) έως πολύ παχιά (10))

• **Ρωγμές
στην κόρα**



(Παρουσία ρωγμών στην επιφάνεια του δείγματος – Μηδενική (0) έως πολλές ρωγμές σε όλη την επιφάνεια (10))

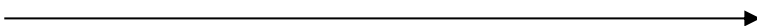
Γ) ΨΙΧΑ

• **Χρώμα**



(Άσπρο χρώμα (0) έως σκούρο καφέ/ μαύρο (10))

• **Αριθμός
& Μέγεθος πόρων**



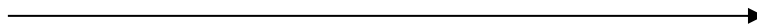
(Αριθμός και μέγεθος οπών στο εσωτερικό του ψωμιού – Από μηδενικοί και μικροί (0) έως πολλοί και μεγάλοι πόροι (10))

• **Ομοιογένεια
πόρων**



(Ομοιόμορφα κατανεμημένοι πόροι στο εσωτερικό του ψωμιού - Από ομοιομορφία στους πόρους (0) έως ακανόνιστοι πόροι (10))

- Ακατέργαστη ζύμη



(Βαθμός ανίχνευσης ακατέργαστης ζύμης στην ψίχα και σβώλοι – Μηδενική (0) έως ορατό ωμό ζυμάρι στο εσωτερικό)

2) ΆΡΩΜΑ



(Βαθμός αντιληπτού συνολικού αρώματος του δείγματος – «Δυσάρεστο » (0) έως «Πολύ ευχάριστο» (10))

A) ΚΟΡΑ

- ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ
(Ξινό άρωμα που συνδέεται με το ξύδι)
- ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ
- ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
(Άρωμα που σχετίζεται με ξινισμένο γάλα)
- ΒΟΥΤΥΡΩΔΕΣ
(Άρωμα του βουτύρου με ελαφρώς ταγγισμένο)
- ΛΙΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
(Άρωμα που σχετίζεται με το γαλακτικό λίπος)
- ΞΥΛΟ
(Άρωμα που σχετίζεται με ξηρό ξύλο)
- ΚΑΡΑΜΕΛΑ
(Άρωμα που συνδέεται με τη καραμελωμένη ζάχαρη)
- ΜΟΥΧΛΑ
(Άρωμα που σχετίζεται με τον υγρό κλειστό αέρα χώρων)
- ΚΑΠΝΙΣΤΟ
(Άρωμα που σχετίζεται με τη σκόνη και τη φωτιά)
- ΑΛΕΥΡΩΔΕΣ
(Τα αρωματικά που συνδέονται με το κανονικό αλεύρι ψησίματος)

Β) ΨΙΧΑ

- ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ
(Ξινό άρωμα που συνδέεται με το ξύδι)
- ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ
- ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ
(Άρωμα που σχετίζεται με ξινισμένο γάλα)
- ΒΟΥΤΥΡΩΔΕΣ
(Άρωμα του βουτύρου με ελαφρώς ταγγισμένο)
- ΛΙΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
(Άρωμα που σχετίζεται με το γαλακτικό λίπος)
- ΞΥΛΟ
(Άρωμα που σχετίζεται με ξηρό ξύλο)
- ΚΑΡΑΜΕΛΑ
(Άρωμα που συνδέεται με τη καραμελωμένη ζάχαρη)
- ΜΟΥΧΛΑ
(Άρωμα που σχετίζεται με τον υγρό κλειστό αέρα χώρων)
- ΚΑΠΝΙΣΤΟ
(Άρωμα που σχετίζεται με τη σκόνη και τη φωτιά)
- ΑΛΕΥΡΩΔΕΣ
(Τα αρωματικά που συνδέονται με το κανονικό αλεύρι ψησίματος)

3) ΓΕΥΣΗ



(Συνολική εκτίμηση της γεύσης του δείγματος – «Δεν μου αρέσει καθόλου » (0) έως «Μου αρέσει πολύ» (10))

Α) ΚΟΡΑ

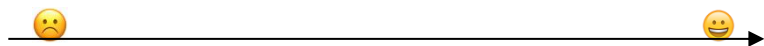
- ΓΛΥΚΙΑ
- ΑΛΜΥΡΗ
- ΞΙΝΗ

- ΠΙΚΡΗ
- ΠΙΚΑΝΤΙΚΗ
- ΓΕΥΣΗ ΑΧΥΡΟΥ
- ΓΕΥΣΗ ΛΑΔΙΟΥ
- ΚΑΨΑΛΙΣΜΕΝΗ

Β) ΨΙΧΑ

- ΓΛΥΚΙΑ
- ΑΛΜΥΡΗ
- ΞΙΝΗ
- ΠΙΚΡΗ
- ΠΙΚΑΝΤΙΚΗ
- ΓΕΥΣΗ ΑΧΥΡΟΥ
- ΓΕΥΣΗ ΛΑΔΙΟΥ
- ΚΑΨΑΛΙΣΜΕΝΗ

4) ΥΦΗ



(Συνολική εκτίμηση της υφής του δείγματος – «Μη αποδεκτή» (0) έως «Αποδεκτή» (10))

Α) ΚΟΡΑ

- Σκληρότητα

(Θόρυβος από το πρώτο δάγκωμα του δείγματος μεταξύ των γομφίων – Μηδαμινός θόρυβος (0) έως πολύ δυνατός (10))

• **Ελαστικότητα** _____➔

(Επαναφορά δείγματος μετά το πρώτο δάγκωμα - Μηδενική επαναφορά (0) έως πολύ έντονη (10))

• **Ευθρυπτότητα** _____➔

(Ευκολία με την οποία το δείγμα έχει σπάσει σε μικρότερα μέρη κατά τη διάρκεια της μάσησης - Μεγάλη δυσκολία (0) έως ευκολία μάσησης (10))

• **Λιπαρότητα** _____➔

(Βαθμός υπολειμματικής λιπαρότητας που αφήνεται στην στοματική κοιλότητα μετά από κατάποση - Μηδενική (0) έως πολύ έντονη λιπαρότητα (10))

B) ΨΙΧΑ

• **Υφή ζύμης** _____➔

(«λασπωμένη» ψίχα)

(Μέρη της ψίχας που δεν έχουν ψηθεί και έχουν υφή σβόλου που γίνεται αντιληπτό και κατά τη μάσηση- Μηδενικά άψητα μέρη (0) έως πάρα πολλά άψητα τμήματα (10))

• **Μαστιχωτή υφή (“Chewiness”)** _____➔

(Σκληρότητα ψίχας και δυσκολία / αντίσταση κατά τη μάσηση του δείγματος (0) – Μαλακή μαστιχωτή ψίχα και ευκολία κατά τη μάσηση / (10))

6) ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ



(Συνολική εκτίμηση του δείγματος μετά από την επιμέρους αξιολόγηση των παραπάνω παραγόντων – «Δεν μου αρέσει καθόλου » (0), «Ουτε δεν μου άρεσε ούτε μου άρεσε» (5), έως «Μου αρέσει πολύ» (10))

7) ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ & ΣΧΟΛΙΑ

Παράρτημα II

Πίνακας 23: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης και ποιοτικού ελέγχου του DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Στέλεχος	A _{260/280}	A ₂₆₀	Συγκέντρωση (ng/μL)
LQC 7	2.100	0.900	398
LQC 13	2.077	0.851	377
LQC 17	2.092	1.526	759
LQC 46	2.125	0.961	477
LQC 69	1.877	0.544	347
LQC 92	1.966	0.187	86.5
LQC 95	1.950	0.181	87.5
LQC 169	2.162	0.502	248
LQC 228	2.116	0.697	347
LQC 230	2.106	1.270	628
LQC 233	2.077	1.051	513
LQC 713	1.975	0.988	414
LQC 731	2.039	1.579	743
LQC 740	2.084	1.052	523
LQC 748	2.077	1.568	780
LQC 759	2.099	1.113	553
LQC 761	2.030	0.683	337
LQC 764	2.040	0.573	303
LQC 771	2.112	0.539	265

LQC 788	1.884	1.591	634
LQC 789	2.121	1.222	606
LQC 794	1.741	1.531	682
LQC 808	2.100	1.112	499
LQC 810	2.114	0.226	111
LQC 843	2.134	1.160	574
LQC 853	2.071	1.473	729
LQC 879	1.934	1.173	529
LQC 882	2.099	0.301	109
LQC 883	2.097	0.200	97.5
LQC 897	2.045	0.402	203
LQC 938	1.667	0.011	500
LQC 940	1.800	0.011	450
LQC 941	1.966	0.400	179
LQC 957	2.044	0.399	200
LQC 1638	2.130	1.152	573
LQC 1641	1.950	1.135	562
LQC 1644	2.088	0.911	452
LQC 1670	2.031	1.466	728
LQC 1673	2.017	1.362	426
LQC 1680	2.008	1.487	640
LQC 1685	2.093	1.344	519
LQC 1690	2.000	0.836	400

LQC 1693	2.042	0.936	463
LQC 1698	2.041	1.067	523
LQC 1704	2.093	1.400	698
LQC 1705	2.034	1.487	639
LQC 1706	2.082	0.664	331
LQC 1924	2.066	0.360	221
LQC 1928	2.122	1.561	774
LQC 1932	2.047	0.184	87
LQC 1933	2.099	0.540	231
LQC 1936	2.089	0.460	224
LQC 1938	2.081	0.571	283
LQC 1939	2.035	0.183	87.5
LQC 1940	2.030	0.180	85.5
LQC 1941	1.988	0.181	85.5
LQC 1942	1.743	0.315	119
LQC 1943	1.939	0.283	128
LQC 1944	2.081	0.320	155
LQC 1945	2.086	0.325	158
LQC 1946	2.108	0.986	486
LQC 1947	2.061	1.396	690
LQC 1949	2.098	0.704	341
LQC 1950	2.073	1.257	624
LQC 1957	1.940	1.072	502

LQC 1958	1.973	1.057	424
LQC 1960	2.060	1.394	687
LQC 1966	2.032	0.405	192
LQC 1975	2.002	0.400	189
LQC 1976	2.056	1.558	727
LQC 1977	2.063	1.520	758
LQC 1978	2.012	1.534	613
LQC 1979	2.021	1.596	783
LQC 1980	2.080	1.541	760
LQC 1981	2.064	0.777	387
LQC 1982	2.111	1.123	560
LQC 1983	2.085	1.370	683
LQC 1984	2.081	1.541	768
