



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ &  
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση συνθηκών παρασκευής παραδοσιακών προζυμιών  
στην παραγωγή βακτηριοσινών από το είδος *Lactiplantibacillus plantarum*

**Παναγιώτα Β. Στασινοπούλου**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση συνθηκών παρασκευής παραδοσιακών προζυμιών  
στην παραγωγή βακτηριοσινών από το είδος *Lactiplantibacillus plantarum*

Effect of parameters related to sourdough preparation  
on plantaricin activity of *Lactiplantibacillus plantarum*

**Παναγιώτα Β. Στασινοπούλου**

Εξεταστική επιτροπή:

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

## **Επίδραση συνθηκών παρασκευής παραδοσιακών προζυμιών στην παραγωγή βακτηριοσινών από το είδος *Lactiplantibacillus plantarum***

ΠΜΣ Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων

### **Περίληψη**

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης παραμέτρων, σχετικών με την παρασκευή των προζυμιών, στην ενεργότητα της πλανταρισίνης, στον πληθυσμό και στη μείωση της τιμής του pH, 6 στελεχών του είδους *Lactiplantibacillus plantarum*. Οι συγκεκριμένες παράμετροι περιλάμβαναν τρία υποστρώματα (υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS, τροποποιημένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ως προς το είδος και την ποσότητα των υδατανθράκων που απαντώνται στο αλεύρι σίτου, υδατικό εκχύλισμα αλεύρου σίτου-νερού), τρεις θερμοκρασίες επώασης (20, 30, 37 °C), δύο αρχικές τιμές pH (5.0, 6.0), δύο συγκεντρώσεις NaCl (0.0, 1.8%), δύο χρονικές στιγμές (12, 21 h) και 6 διαφορετικά στελέχη του είδους *Lp. plantarum* (LQC 2320, 2422, 2441, 2485, 2516, 2520).

Τα αποτελέσματα παρουσίασαν διαφορετικό τρόπο δράσης των πλανταρισινών ανάλογα με το στέλεχος. Συγκεκριμένα, η φαινοτυπική αξιολόγηση έδειξε την κατηγοριοποίηση των 6 στελεχών *Lp. plantarum* σε δύο ομάδες, με τα στελέχη LQC 2422, 2441, 2485, 2516 να ομαδοποιούνται και να διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα δύο στελέχη, LQC 2320 και 2520. Σχετικά με τα τέσσερα πρώτα στελέχη, η μέγιστη ενεργότητα πλανταρισίνης ποσοτικοποιήθηκε ως 2560 AU/ mL, ενώ για τα στελέχη LQC 2320 και 2520 η αντίστοιχη καταγράφηκε ως 160 AU/ mL. Η Πολυπαραγοντική Ανάλυση Διακύμανσης έδειξε τη σημαντική επίδραση του υποστρώματος, της θερμοκρασίας, της αρχικής τιμής, του χρόνου και του στελέχους στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης, ενώ οι διαφορετικές περιεκτικότητες σε NaCl φάνηκαν να μην επηρεάζουν σημαντικά τη μέση ενεργότητα. Στην περίπτωση του πληθυσμού, τόσο οι διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl όσο και το στέλεχος δεν είχαν σημαντική επίδραση στη μεταβλητότητα, ενώ η αξιολόγηση της επίδρασης των παραμέτρων στην τελική τιμή pH, υπέδειξαν ως μη σημαντικό παράγοντα μόνο το NaCl. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των στελεχών σε υδατικό εκχύλισμα αλεύρου σίτου-νερού οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας, συγκριτικά με την ανάπτυξή τους σε τόσο σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS όσο και σε τροποποιημένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Αναφορικά με τη θερμοκρασία, υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης καταγράφηκαν μετά από ανάπτυξη των στελεχών στους 30 και 37 °C, σε σχέση με τους 20 °C.

**Επιστημονική περιοχή:** Γαλακτικά βακτήρια

**Λέξεις-κλειδιά:** Ελληνικά προζύμια, *Lactiplantibacillus plantarum*, Πλανταρισίνες, *Listeria monocytogenes*

**Effect of parameters related to sourdough preparation on plantaricin activity of *Lactiplantibacillus plantarum***

*MSc Quality Management & Food Safety Systems*  
*Department of Food Science & Human Nutrition*  
*Laboratory of Food Quality Control & Hygiene*

**Abstract**

The aim of this study was to assess the effect of parameters associated with sourdough preparation on the plantaricin activity, population and pH reduction of 6 *Lactiplantibacillus plantarum* strains. The parameters included three substrates (MRS broth, MRS broth modified having the kind and quantity of carbohydrates of wheat flour, wheat flour and water extract), three incubation temperatures (20, 30, 37 °C), two initial pH values (5.0, 6.0), two NaCl concentrations (0.0, 1.8%), two incubation times (12, 21 h) and 6 *Lp. plantarum* strains (LQC 2320, 2422, 2441, 2485, 2516, 2520).

Results obtained revealed a strain dependent plantaricin activity. Based on the phenotypic assessment, the 6 strains were discriminated into two groups, with strains LQC 2422, 2441, 2485 and 2516 being assigned to the former group and strains LQC 2320 and 2520 forming the latter one. Regarding the four *Lp. plantarum* strains, the maximum plantaricin activity was quantified as 2560 AU/ mL, while in the case of strains LQC 2320 and 2520, the plantaricin activity barely reached 160 AU/ mL. Multifactor Analysis of Variance indicated that substrate, temperature, initial pH value, incubation time and strain had significant effect on the mean plantaricin activity, while that was not the case for NaCl. Concerning the effect of sourdough related parameters on the mean population, NaCl and strain had only marginal effect on the variability, while similar were the findings in the case of pH reduction, according to which the contribution of NaCl was not considered significant. It is worth noting that growth of strains on wheat flour and water extract resulted in decreased plantaricin activities, compared to the respective obtained after growth in both MRS and modified MRS broth. As far as the effect of temperature was concerned, increased plantaricin activities were recorded after growth at 30, 37 °C, compared to those at 20 °C.

**Scientific area:** Lactic acid bacteria

**Keywords:** Greek sourdoughs, *Lactiplantibacillus plantarum*, Plantaricins, *Listeria monocytogenes*

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω ένα ευχαριστώ στους ανθρώπους που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Ελευθέριο Δροσινό για τη συνεργασία και για την υποστήριξη του. Επιπλέον, ευχαριστώ τη διδάκτορα Μαρία Συρόκου για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μελέτης μου.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

# Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Περίληψη.....   | 2  |
| Abstract .....  | 3  |
| 1 Εισαγωγή .....  | 8  |
| 1.1 Ιστορική αναδρομή.....  | 8  |
| 1.2 Προζύμι.....  | 10 |
| 1.3 Κατάταξη προζυμιών.....   | 11 |
| 1.4 Μικροχλωρίδα προζυμιού.....   | 13 |
| 1.4.1 Γαλακτικά βακτήρια.....   | 14 |
| 1.5 Βακτηριοσίνες.....  | 18 |
| 1.5.1 Κατηγορίες βακτηριοσινών .....  | 20 |
| 1.5.2 Τρόπος δράσης βακτηριοσινών .....   | 21 |
| 1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριοσινών.....   | 22 |
| 1.6 Χρήση των γαλακτικών βακτηρίων και των μεταβολιτών τους στη βιομηχανία τροφίμων ως βιοσυντηρητικά .....   | 23 |
| Σκοπός εργασίας .....   | 25 |
| 2 Υλικά & Μέθοδοι.....  | 26 |
| 2.1 Μικροβιακά στελέχη .....  | 26 |
| 2.2 Ανανέωση των μικροβιακών στελεχών .....   | 26 |
| 2.3 Έλεγχος καθαρότητας μικροβιακών στελεχών .....  | 27 |
| 2.4 Επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στη μείωση της τιμής pH των στελεχών <i>Lp. plantarum</i> ..... | 27 |
| 2.5 Στατιστική ανάλυση .....  | 28 |
| 3 Αποτελέσματα.....   | 29 |
| 3.1 Επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στη μείωση της τιμής pH των στελεχών <i>Lp. plantarum</i> ..... | 29 |
| 4 Συζήτηση .....  | 41 |
| 5 Συμπεράσματα .....  | 45 |
| 6 Βιβλιογραφία .....  | 46 |
| 6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....  | 46 |
| 6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....  | 55 |
| Παράρτημα I.....  | 56 |

# Κατάλογος Πινάκων-Εικόνων

## Πίνακες

**Πίνακας 1:** Γαλακτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από προζύμια σίτου στην Ευρώπη. .... 16

## Εικόνες

**Εικόνα 1:** Τοιχογραφία από την Αίγυπτο η οποία απεικονίζει την διαδικασία αρτοποιίας (Jacob 1997).  
..... 9

**Εικόνα 2:** Τύποι προζυμιών (De Vuyst και συν., 2017). ..... 13

**Εικόνα 3:** Μορφολογία *Lp. plantarum* ..... 17

**Εικόνα 4:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε MRS broth ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. .... 31

**Εικόνα 5:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε MRS broth ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. .... 32

**Εικόνα 6:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε mMRS broth ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21 h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. .... 33

**Εικόνα 7:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε mMRS broth ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. .... 34

**Εικόνα 8:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε WFE ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη

|   |    |
|---|----|
| <i>Lp. plantarum</i> , LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. ....   | 35 |
| <b>Εικόνα 9:</b> Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών <i>Lp. plantarum</i> , μετά από την επώαση σε WFE ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (Α), 37 (Β) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη <i>Lp. plantarum</i> , LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα. ....  | 36 |
| <b>Εικόνα 10:</b> Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν τη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων, μετά από 12 h επώασης. 1) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl. .... | 38 |
| <b>Εικόνα 11:</b> Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν το μέσο πληθυσμό που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων, μετά από 12 h επώασης. 1) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, log (CFU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl. ....  | 40 |
| <b>Εικόνα 12:</b> Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν τη μέση τελική τιμή pH που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων, μετά από 12 h επώασης. 1) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl. ....   | 41 |



## 1 Εισαγωγή

Το προζύμι αποτελεί το ενδιάμεσο προϊόν στην διαδικασία της αρτοποιήσης με όξινη γέυση και έντονο άρωμα. Χρησιμοποιείται στη παραγωγή ψωμιού όπου επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του και κάνει καλύτερη την υφή και τη γέυση του (Petel και συν., 2017). Στις μέρες μας, το προζύμι χρησιμοποιείται κυρίως ως βελτιωτικό αρώματος και γέυσης (Hansen & Schieberle, 2005). Το μικρο-οικοσύστημα των προζυμιών αποτελείται κυρίως από γαλακτικά βακτήρια και ζυμομύκητες (Vogel και συν., 1999). Τα βακτήρια, εκ των οποίων τα περισσότερα ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, ευθύνονται κυρίως για την οξίνιση του μέσου (Corsetti & Settanni, 2007). Οι μικροοργανισμοί που έχουν μελετηθεί πάνω στην μικροχλωρίδα του προζυμιού, όσον αφορά στα γαλακτικά βακτήρια είναι συνήθως στελέχη των *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus pontis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lentilactobacillus buchneri*. Όσον αφορά τους ζυμομύκητες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης, τα συχνότερα απαντώμενα στελέχη ανήκουν στους *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, *Candida krusei*, *Candida humilis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus* και *Torulaspora delbrueckii* (De Vuyst και συν., 2016, Hui και συν., 2006, De Vuyst και συν., 2009, Settani και συν., 2013, Paramithiotis και συν., 2017).

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Μια από τις παλαιότερες τροφές που παρασκεύαζε ο άνθρωπος είναι το ψωμί. Από την ανάμειξη αλεύρου δημητριακών με το νερό σχηματίζεται το ζυμάρι που φουσκώνει και τελικά ψήνεται (Μότσιας, 1982, Cappelle και συν., 2013). Υπάρχουν ευρήματα που φανερώνουν τη παρασκευή του ψωμιού ήδη από τα αρχαία χρόνια από τους λαούς της Βαβυλώνας, της Αιγύπτου, της Ρώμης και της Ελλάδας (Chavan & Chavan, 2011). Οι Αιγύπτιοι το 3500 π.Χ. φαίνεται ότι ξεκίνησαν τη παρασκευή ψωμιού και χρησιμοποίησαν είδη δημητριακών τα οποία καλλιεργούσαν, όπως το σίτο emmer (*Triticum dicoccum*) και τα έξι είδη κριθαριού (Sheikha και συν., 2015).



**Εικόνα 1:** Τοιχογραφία από την Αίγυπτο η οποία απεικονίζει την διαδικασία αρτοποιίας (Jacob 1997).

Οι Αιγύπτιοι ήταν από τους καλύτερους γνώστες της γεωργίας και των τεχνικών της και η Αίγυπτος χαρακτηριζόταν ως ο σιτοβολώνας του κόσμου. Στην Αίγυπτο, καλλιεργούνταν καλής ποιότητας σιτάρι. Το ψωμί ήταν η βασική τροφή των Αιγυπτίων και οι μισθοί των εργατών πληρωνόταν με τη μορφή ψωμιού. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν διαφόρων ειδών φούρνων. Πιο συγκεκριμένα, ο πρώτος φούρνος είχε σχήμα κωνικό και ήταν φτιαγμένος από άργιλο ενώ στα επόμενα χρόνια κατασκευάζονταν πιο περίτεχνοι φούρνοι, με υλικά όπως είναι η πέτρα. Επιπλέον, οι Αιγύπτιοι ήταν εκείνοι οι οποίοι ανακάλυψαν τυχαία το ψωμί με προζύμι. Μέσα σε μεγάλα πήλινα δοχεία συνέθλιβαν το σιτάρι και προσέθεταν νερό από το Νείλο, που ήταν εμπλουτισμένο με μικροοργανισμούς και ένζυμα. Στη συνέχεια, το μείγμα ξεκουραζόταν για κάποιες ώρες, γινόταν η φυσική ζύμωση και στο τέλος ψηνόταν. (Μότσιας, 1982, Carpelle και συν., 2013). Πολύ σημαντική ήταν η συνεισφορά των αρχαίων Ελλήνων στη γεύση του ψωμιού με την προσθήκη διάφορων άλλων υλικών όπως σουσάμι, μέλι κ.ά.

Κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης οι πέτρινοι κύλινδροι οι οποίοι χρησιμοποιούνταν για την άλεση του σιταριού αντικαταστάθηκαν από κυλίνδρους χάλυβα. Το 1961 άλλαξε η διαδικασία παραγωγής ψωμιού μέσα από τη μέθοδο Chorleywood. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη χρήση πρωτεΐνης σιταριού σε χαμηλότερο ποσοστό. Κάτι τέτοιο φάνηκε χρήσιμο και βοήθησε την παραγωγή ψωμιού σε κάποιες περιοχές όπως το Ηνωμένο Βασίλειο όπου ήταν γνωστό ότι τα δημητριακά δεν είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Sheikha και συν., 2015). Μετά το τέλος του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου, η βελτίωση των τεχνικών

καλλιέργειας, η ανάπτυξη της χημικής βιομηχανίας και της μικροβιολογίας οδήγησε στην αυτοματοποίηση της διαδικασίας αρτοποιίας και στην παραγωγή ψωμιού σε μεγάλη κλίμακα.

## 1.2 Προζύμι

Το προζύμι είναι ένα μίγμα αλεύρου και νερού το οποίο έχει υποστεί ζύμωση με γαλακτικά βακτήρια, κυρίως ετεροζυμωτικά τα οποία συνθέτουν γαλακτικό και οξικό οξύ στο μείγμα, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργείται μια ξινή γεύση στο τελικό προϊόν (Hammes & Gänzle, 1998; Salovaara, 1988). Η ενσωμάτωση του προζυμιού κατά το στάδιο της ζύμωσης ευνοεί τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις θρεπτικές ιδιότητες και επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των αρτοποιημάτων (Corsetti A., και συν., 2000). Έχει χρησιμοποιηθεί προζύμι στη παρασκευή ψωμιού, κέικ και κράκερ (Ottogalli και συν., 1996). Το ψωμί με προζύμι αποτελεί έναν πολύ διαδεδομένο τρόπο παρασκευής του ψωμιού. Η παραγωγή ψωμιού με προζύμι εκτιμάται ότι ξεκίνησε στην αρχαία εποχή (Spicher, 1999a). Η χρήση προζυμιού στη διαδικασία ζύμωσής είναι μία από τις πιο παλιές βιοτεχνολογικές διαδικασίες στην παραγωγή τροφίμων (Siepman και συν., 2018).

Η μικροβιακή ανάπτυξη καθώς και η ενεργότητα των γαλακτικών βακτηρίων στο προζύμι επηρεάζεται και από ενδογενείς παράγοντες (όπως ένζυμα), από την αλληλεπίδραση μεταξύ γαλακτικών βακτηρίων, ζυμομυκήτων και άλλων βακτηρίων, καθώς και από παράγοντες όπως η θερμοκρασία ή ακόμη και η σύσταση του νερού που χρησιμοποιείται κάθε φορά (Scheirlinck και συν., 2008). Ακόμη, είναι αρκετοί οι εξωγενείς παράγοντες που επιδρούν στο ρυθμό ανάπτυξης τους. Στο προζύμι, οι παράγοντες αυτοί είναι η θερμοκρασία, το pH, η ελαστικότητα του προζυμιού και οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των μικροοργανισμών όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθανόλη,

Η θερμοκρασία όσον αφορά το προζύμι αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό παράγοντα. Σύμφωνα με τους Gänzle και συν. (2004) η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του οξικού και του γαλακτικού οξέος. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων είναι 30 έως 40°C ανάλογα με το στέλεχος. Γενικά, η υψηλότερη θερμοκρασία, ενισχύει την παραγωγή οξέων σε προζύμι σίτου (Brummer και Lorenz 1991). Επιπλέον η θερμοκρασία επηρεάζει τη μικροβιακή σύνθεση του προζυμιού.

Σημαντικό ρόλο στον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο προζύμι έχει και το pH, αφού οι τιμές  $pH > 5$  θεωρούνται ιδανικές ενώ σε  $pH = 4$  παρεμποδίζεται η διαδικασία (Gänzle και συν., 2004). Πιο συγκεκριμένα οι τιμές pH τις πρώτες 12 ώρες όπως και την τελευταία ημέρα της διαδικασίας παραμένουν σταθερές ( $pH > 5$ ), ενώ στα υπόλοιπα διαστήματα είναι σημαντικά μειωμένες  $pH < 4$  (Scheirlinck και συν., 2008). Το pH του προζυμιού εξαρτάται κυρίως από τα γαλακτικά βακτήρια.

### 1.3 Κατάταξη προζυμιών

Το προζύμι έχει ταξινομηθεί σε τρεις τύπους, με βάση το είδος της τεχνολογίας που εφαρμόζεται για την παραγωγή τους, όπως χρησιμοποιείται σε τεχνικές και βιομηχανικές διαδικασίες (Bocker, Stolz, & Hammes, 1995). Αναλυτικότερα, τα προζύμια διακρίνονται σε τρεις τύπους:

- τον Τύπο I όπου ανήκουν τα παραδοσιακά προζύμια – σε αυτά δεν χρειάζεται μαγιά στο τελικό ζυμάρι.
- τον Τύπο II, στον οποίο ανήκουν τα προζύμια σε υγρή μορφή βιομηχανικού τύπου και χρησιμοποιούνται προσαρμοσμένα στελέχη για να γίνει η έναρξη της ζύμωσης. Ένα από τα χαρακτηριστικά των προζυμιών αυτών, είναι η μεγάλη ενυδάτωση οπότε είναι εύκολα αντλήσιμα σε ένα βιομηχανικό αρτοποιείο – χρειάζεται μαγιά στο τελικό ζυμάρι.
- Τον Τύπο III (αποξηραμένα προζύμια) όπου ανήκουν προζύμια τα οποία μπορεί να έχουν ξηρανθεί. Τα προζύμια αυτά χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα καθώς έχουν αρκετά σταθερή ποιότητα και δεν προκύπτουν αλλαγές στο τελικό προϊόν. Στα προζύμια του τύπου III απαιτείται προσθήκη μαγιάς στο τελικό ζυμάρι (Chavan & Chavan, 2011).

#### Προζύμι Τύπου I - Παραδοσιακά προζύμια

Τα προζύμια τύπου I παράγονται με παραδοσιακές τεχνικές και δεν απαιτείται η προσθήκη μαγιάς στο τελικό ζυμάρι. Επιπλέον η διαδικασία της ζύμωσης χαρακτηρίζεται από συνεχή, καθημερινή ανανέωση ώστε να διατηρήσουν τους μικροοργανισμούς σε ενεργή κατάσταση. Σε αυτό το είδος προζυμιού η διαδικασία ζύμωσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ( $20-30^{\circ}\text{C}$ ) και  $pH$  4. (Stolz, 1999). Σε αυτόν τον τύπο προζυμιού ανήκουν όλα τα είδη των ελληνικών παραδοσιακών προζυμιών. Ο τύπος I προζυμιού μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε τρεις

μικρότερες υποκατηγορίες : Ια) η πρώτη περιλαμβάνει τη χρήση καθαρής καλλιέργειας εκκίνησης από διαφορετική προέλευση, Ιβ) η δεύτερη περιλαμβάνονται όλες οι αυθόρμητες ζυμώσεις και Ιγ) η τρίτη περιλαμβάνει τα προζύμια που παράγονται σε τροπικές περιοχές με υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης. (Paramythiotis, 2017).

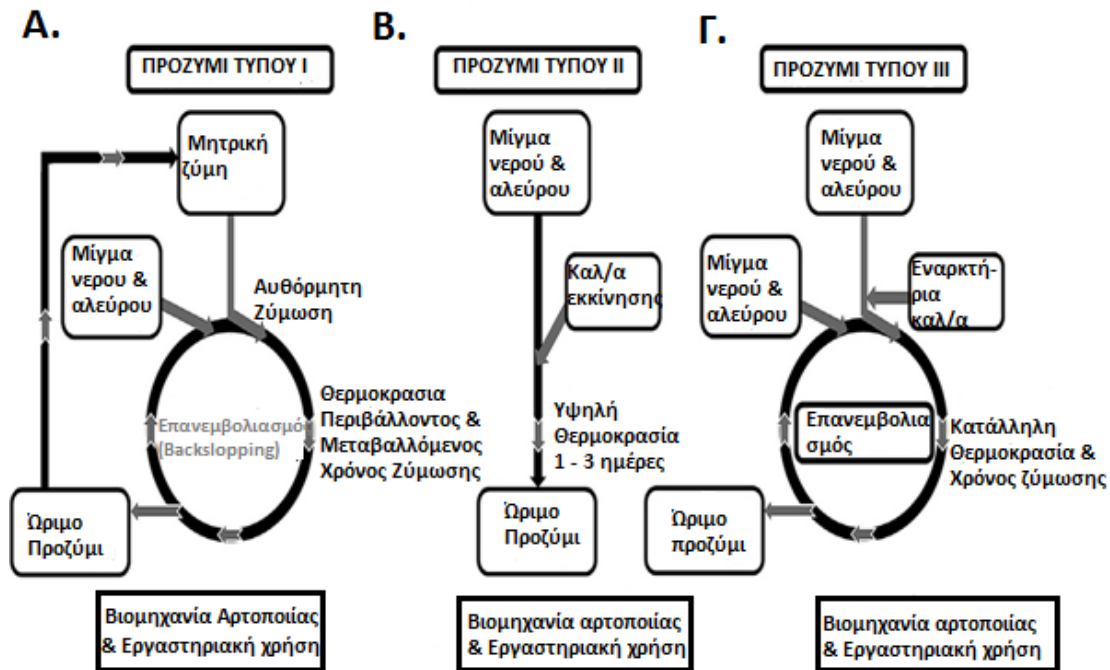
### Προζύμι Τύπου II

Τα προζύμια τύπου II, ονομάζονται προζύμια βιομηχανικού τύπου. Παράγονται μέσω ενός σταδίου ζύμωσης (συνήθως 12-18 ωρών) το οποίο ακολουθείται από αποθήκευση που μπορεί να διαρκέσει ως και μερικές μέρες. Τα προζύμια αυτά επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν ως βελτιωτικά στην παραγωγή ψωμιού ή μέσα οξίνισης (Corsetti & Settanni, 2006). Τα προζύμια αυτού του τύπου παράγονται σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία ζύμωσης > 30 °C, pH < 3,5) σε βιοαντιδραστήρες βιομηχανικής κλίμακας και έχουν τη δυνατότητα να αποθηκευτούν σε μεγάλους όγκους έως και 7 ημέρες σε θερμοκρασία 10 έως 15 °C (Hammes και συν., 1996, Corsetti και συν., 2007, Sierman και συν., 2018). Η ταχύτερη ζύμωση μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης από μύκητες. Εξαιτίας του υψηλού βαθμού ενυδάτωσης, της μεγάλης θερμοκρασίας και του μεγάλου χρόνου αποθήκευσης, στα προζύμια τύπου II επικρατούν ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι αρκετά ανθεκτικά στο χαμηλό pH. Επιπλέον, τα προζύμια που ανήκουν σε αυτό το τύπο, μπορούν να εισαχθούν για παραγωγή εμπορικών εκκινήτων σε σκόνη καθώς και για ξήρανση (Siermann και συν., 2018).

### Προζύμι Τύπου III

Τα προζύμια τύπου III, είναι ξηρά προζύμια σε μορφή σκόνης, τα οποία προέρχονται από την επεξεργασία των προζυμιών του τύπου II και χρειάζονται την προσθήκη μαγιάς στο τελικό ζυμάρι (Corsetti και συν., 2007). Περιλαμβάνουν στελέχη μικροοργανισμών τα οποία είναι ανθεκτικά στην ξήρανση (Hammes και συν., 1996). Χρησιμοποιούνται κυρίως για την βελτίωση της γεύσης, της υφής, της οξίνισης και του αρώματος κατά την παραγωγή ψωμιού στις σύγχρονες και υψηλής τεχνολογίας βιομηχανίες προσφέροντας σταθερή ποιότητα, χωρίς κίνδυνο παρουσίασης παραλλαγών και αλλοιώσεων στο τελικό προϊόν (Sierman και συν., 2018, Paramithiotis και συν., 2017). Για να δημιουργηθεί μικροβιακή σταθερότητα επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές τεχνικές ξήρανσης καθώς και η υγρή παστερίωση. (De Vuyst και συν., 2017). Η ποιότητα του προζυμιού επηρεάζεται από τη μικροβιακή χλωρίδα, τον τύπο

αλεύρου, την αναλογία αλεύρου/νερού και τις παραμέτρους της διαδικασίας όπως θερμοκρασία, το αρχικό pH, και ο χρόνος ζύμωσης (Müller και συν., 2001).



Εικόνα 2: Τύποι προζυμιών (De Vuyst και συν., 2017).

#### 1.4 Μικρογλωρίδα προζυμιού

Το προζύμι είναι ένα μείγμα αλεύρου και νερού που είναι μεταβολικά δραστήριο λόγω ενός ετερογενούς μικροβιακού πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων και ζυμομυκήτων τα οποία προκύπτουν είτε από αυθόρμητη ζύμωση είτε από χρήση εναρκτήριας καλλιέργειας. Ο τύπος του αλεύρου που θα χρησιμοποιηθεί, επηρεάζει αρκετά το είδος των μικροοργανισμών που πρόκειται να αναπτυχθούν στο προζύμι. Τα διάφορα συστατικά που προστίθενται, όπως τα σάκχαρα, το αλάτι κ.τ.λ. βοηθούν την ανάπτυξη επιπλέον μικροοργανισμών (De Vuyst και συν., 2009). Πολλές μελέτες αποκάλυψαν την παρουσία περισσότερων από 50 είδη γαλακτικών βακτηρίων, κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus*, και πάνω από 25 είδη ζυμομυκήτων, με κυρίως τα γένη *Saccharomyces* και *Candida* (De Vuyst και Neysens, 2005).

Οι ζυμομυκήτες και τα γαλακτικά βακτήρια του προζυμιού βρίσκονται περίπου σε αναλογία 1:100 (Gobbetti και συν., 1996). Ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων είναι μεγαλύτερος και κυμαίνεται από  $10^7$  έως  $10^9$  ενώ στους ζυμομυκήτες από  $10^6$  έως  $10^7$  CFUg. Παρόλα αυτά,

τα προζύμια τα οποία παρασκευάζονται σε αρτοποιία ή μεγάλες βιομηχανίες, χαρακτηρίζονται συχνά από αυξημένο πληθυσμό ζυμομυκήτων που υπερβαίνει αυτόν των βακτηρίων λόγω της προσθήκης μαγιάς (Paramithiotis και συν., 2017). Οι ζυμομύκητες περιλαμβάνουν συνήθως τα είδη *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *C. krusei*, *C. humilis*, *K. exigua*, *Pi. kudriavzevii*, *W. anomalus* και *T. delbrueckii*. Τα γαλακτικά βακτήρια που αναφέρονται συχνότερα ως τμήμα προζυμίου είναι τα *Lp. plantarum*, *Fr. sanfranciscensis*, *Lv. brevis*, *Le. buchneri*, *Lm. pontis*, *La. casei*, *Lm. fermentum*, κ.ά. Τα *Lv. brevis* και *Lp. plantarum* απομονώνονται από προζύμια σίτου, σόργου και σίκαλης ενώ το *Fr. sanfranciscensis* από προζύμι σίτου και σίκαλης (De Vuyst και συν., 2009).

#### **1.4.1 Γαλακτικά βακτήρια**

Τα γαλακτικά βακτήρια, παράγουν γαλακτικό οξύ ως βασικό προϊόν μεταβολισμού και θεωρούνται σημαντικά στην βιομηχανία των τροφίμων. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι μια ομάδα βακτηρίων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά όπως : Gram θετικοί, μη σπορογόνοι κόκκοι ή ράβδοι, ομοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά είδη (Salfinger & Tortorello, 2015). Επιπλέον, τα γαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στις χαμηλές τιμές pH. Ακόμη, έχουν την ικανότητα να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις όπως οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ), υπεροξειδίο του υδρογόνου, διοξειδίο του άνθρακα και βακτηριοσίνες (Gerez και συν., 2008). Η ταξινόμησή των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με βάση τη μορφολογία τους (κόκκος ή βάκιλος), τον τύπο της ζύμωσης της γλυκόζης, (ομοζύμωση ή ετεροζύμωση), την ανάπτυξή τους σε ορισμένες κύριες θερμοκρασίες οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 10°C και 40°C και τα ποσοστά χρήσης και κατανάλωσης σακχάρων (Akcelik M., 2000).

Τα γαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Στην πρώτη κατηγορία είναι τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά είδη γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ από τους υδατάνθρακες που διασπούν (καθαρά γαλακτική ζύμωση). Στην δεύτερη κατηγορία είναι τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά είδη, που παράγουν γαλακτικό οξύ από τις εξόζες και αέριο από το γλυκονικό οξύ. Στην τρίτη κατηγορία είναι οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά είδη που παράγουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα από τις εξόζες. Ο μεταβολισμός των ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων έχει αρκετά μεγάλη σημασία στη παρασκευή του προζυμίου και γι'

αυτό το λόγο έχει μελετηθεί εκτενώς (Paramithiotis 2000, Salfinger & Tortorello, 2015). Τα γαλακτικά βακτήρια έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας, λαχανικά, προϊόντα αρτοποιίας και αλκοολούχα ποτά (Carr και συν., 2002). Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκκινητές καλλιέργειας στην παρασκευή προϊόντων διατροφής.

Τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν ή να μειώνουν τη μόλυνση από αλλοιώσεις ή/και παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της παραγωγής διαφόρων αντιμικροβιακών ενώσεων (Martinez, Balciunas, Salgado, et al., 2013). Η οξίνιση των τροφίμων, κυρίως από σχηματισμός γαλακτικού οξέος, είναι πιθανώς ο πρωταρχικός παράγοντας στην αναστολή ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Τα γαλακτικά βακτήρια μειώνουν το pH σε τιμές κοντά στο 4 σε αυτά τα τρόφιμα, γεγονός που εμποδίζει την επιβίωση των ευαίσθητων μικροοργανισμών σε όξινο μέσο. Μια τέτοια κατάσταση οδηγεί στην αύξηση διάρκειας ζωής του προϊόντος (Leroy & De Vuyst, 2004).

#### **1.4.1.1 Γαλακτικά βακτήρια στο προζύμι**

Τα είδη *Fr. Sanfranciscensis*, *Lv. brevis*, *Lm. fermentum* είναι τα κυρίαρχα γαλακτικά βακτήρια και τα πιο συνηθισμένα στο οικοσύστημα του προζυμιού. Πάραυτα, ένα ευρύ φάσμα άλλων ειδών γαλακτικών βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* και *Lactococcus* είναι πολύ συχνά παρόν σε χαμηλότερους πληθυσμούς και αποτελούν τη δευτερογενή μικροχλωρίδα του προζυμιού. Είδη που ανήκουν στα γένη *Enterococcus*, *Streptococcus* κ.ά., τα συναντάμε λιγότερο συχνά παρόλο που κάποια από αυτά είναι παρόντα στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Παρά το γεγονός ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην διαδικασία της ζύμωσης είναι αρκετά υψηλός, σε περίπτωση ανάλυσης του προζυμιού θα διαπιστωθεί ότι επικρατούν μόνο τα κυρίαρχα γένη (De Vuyst και συν., 2009, Paramithiotis και συν., 2017).

Τα γαλακτικά βακτήρια στην παρασκευή του προζυμιού έχουν έναν σύνθετο ρόλο. Τα βακτήρια αυτά, παράγουν διάφορα οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό οξύ κ.ά.) τα οποία προσδίδουν πολλές διαφορετικές ιδιότητες στο προζύμι (Muhialdin και συν., 2015). Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των γαλακτικών βακτηρίων είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος, το οποίο μειώνει το pH και έχει ως αποτέλεσμα να ασκεί μια ανασταλτική επίδραση στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (Hammes και συν., 1996). Ακόμη, με την παραγωγή οξικού



οξέος, η οποία λειτουργεί κυρίως ως αρωματικό συστατικό, παρεμποδίζεται η ανάπτυξη μυκήτων (Gobbetti και συν., 1996). Τέλος, τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν αμυλάσες, πρωτεϊνάσες αλλά και βακτηριοσύνες οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην παρασκευή του προζυμιού (Paramithiotis, 2001).

**Πίνακας 1:** Γαλακτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από προζύμια σίτου στην Ευρώπη.

| Χώρες προέλευσης | Γαλακτικά βακτήρια   | Πηγές   |
|------------------|--|---|
| Αλβανία          | <i>Lp. plantarum</i> , <i>Lc. Lactis</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>  | Nionelli και συν. (2014)  |
| Βέλγιο           | <i>Lv. brevis</i> , <i>Lp. plantarum</i> , <i>Cp. paralimentarius</i> , <i>Fr. sanfranciscensis</i> , <i>Lt. sakei</i> , <i>Le. buchneri</i> , <i>Le. parabuchneri</i> , <i>Cp. crustorum</i> , <i>Lv. hammesii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Cp. nantensis</i> , <i>La. paracasei</i> , <i>Lm. pontis</i> , <i>Fu. rossiae</i> , <i>Lv. spicheri</i> , <i>Lm. fermentum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confuse</i>         | Scheirlinck και συν. (2007 a,b, 2008),<br>Van der Meulen και συν. (2007),<br>Comasio και συν. (2020)        |
| Γαλλία           | <i>Fr. sanfranciscensis</i> , <i>Lt. curvatus</i> , <i>Lv. hammesii</i> , <i>Fr. lindneri</i> , <i>Cp. paralimentarius</i> , <i>Lp. plantarum</i> , <i>Lt. sakei</i> , <i>Lv. spicheri</i> , <i>La. paracasei</i> , <i>Lp. pentosus</i> , <i>Lp. paraplantarum</i> , <i>Lv. brevis</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>E. Hirae</i>                                      | Robert και συν. (2009)<br>Lhomme και συν. (2015 a,b 2016)   |
| Γερμανία         | <i>Lp. plantarum</i> , <i>Fr. sanfranciscensis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>La. casei</i> , <i>Lm. fermentum</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>W. confuse</i>  | Kitahara και συν. (2005)  |
| Ελλάδα           | <i>Fr. sanfranciscensis</i> , <i>Lv. brevis</i> , <i>Lp. plantarum</i> , <i>Lv. zymae</i> , <i>Cp. paralimentarius</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lt. sakei</i> , <i>Lt. curvatus</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. Citreum</i>   | De Vuyst και συν. (2002),<br>Paramithiotis και συν. (2010),<br>Syrokou και συν. (2020)                      |
| Ιταλία           | <i>E. faecium</i> , <i>Lv. brevis</i> , <i>Lv. zymae</i> , <i>La. casei</i> , <i>Lt. curvatus</i> , <i>La. paracasei</i> , <i>Cp. paralimentarius</i> , <i>Lp. paraplantarum</i> , <i>Lp. pentosus</i> , <i>Lp. paraplantarum</i> , <i>Fu. rossiae</i> , <i>Lt. sakei</i> , <i>Fr. sanfranciensis</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>Leu. durionis</i> , <i>Leu. fructosus</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. pseudomesenteroides</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>W.cibaria</i> | Iacumin και συν. (2009),<br>Minervini και συν. (2012),<br>Alfonzo και συν. (2017),<br>Reale και συν. (2019) |
| Ισπανία          | <i>Lv. brevis</i> , <i>Lp. plantrum</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Leu. Mesenteroides</i>   | Barber και συν. (1983),<br>Barber & Báguena (1988, 1989)  |
| Αυστρία          | <i>Lv. brevis</i> , <i>Lp. plantarum</i> , <i>Cp. paralimentarius</i> , <i>Fr. sanfranciscensis</i> , <i>Lt. sakei</i> , <i>Le. buchneri</i> , <i>Le. parabuchneri</i> , <i>Cp. crustorum</i> , <i>Lv. hammesii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Cp. nantensis</i> , <i>La. paracasei</i> , <i>Lm. pontis</i> , <i>Fu. rossiae</i> , <i>Lv. spicheri</i> , <i>Lm. fermentum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confuse</i>         | Van der Meulen και συν. (2007),<br>Scheirlinck και συν. (2007a, b, 2008)                                    |

|           |   |                         |
|-----------|---|-------------------------|
| Βουλγαρία | <i>Lv. brevis, Lp. plantarum, Pd. pentosaceus, Pd. parvulus, Pd. acidilactici, E. faecium</i> | Petkova και συν. (2021) |
|-----------|---|-------------------------|

*Cp.: Companilactobacillus, E.: Enterococcus, Fr.: Fructilactobacillus, Fu.: Furfurilactobacillus, La.: Lacticaseibacillus, Lb.: Lactobacillus, Lc.: Lactococcus, Le.: Lentilactobacillus, Leu.: Leuconostoc, Lm.: Limosilactobacillus, Lo.: Loigolactobacillus, Lp.: Lactiplantibacillus, Lt.: Latilactobacillus, Lv.: Levilactobacillus, Pa.: Paucilactobacillus, Pd.: Pediococcus, Sc.: Schleiferilactobacillus, Str.: Streptococcus, W.: Weissella*

#### 1.4.1.2 *Lactiplantibacillus plantarum*

Ο *Lp. plantarum* είναι ένας μικροαερόφιλος, Gram-θετικός μικροοργανισμός, με μορφολογία ράβδου, που εμφανίζεται μεμονωμένα ή ομαδοποιείται σε βραχείες αλυσίδες και χαρακτηρίζεται ως GRAS (Generally Recognized As Safe). Ο *Lp. plantarum* είναι ένα μεσόφιλο στέλεχος και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 15 °C έως 45 °C. Καλή ανάπτυξη σημειώθηκε με παρουσία 4 έως 6% NaCl και σε τιμές pH μεταξύ 4 και 9. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, ο *Lp. plantarum* απομονώθηκε επιτυχώς από διαφορετικές πηγές, όπως το κρέας, τα ψάρια, τα φρούτα, τα λαχανικά, το γάλα και τα προϊόντα δημητριακών (Todorov & Franco, 2010).



Εικόνα 3: Μορφολογία *Lp. plantarum*

Ο *Lp. plantarum* είναι ένα είδος βακτηρίου το οποίο ανήκει στο γένος *Lactobacillus*, που περιλαμβάνει περίπου 90 αναγνωρισμένα υποείδη. Ο *Lp. plantarum* ανήκει στα προαιρετικά

ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια και μπορεί να ζυμώνει εξόζες σε γαλακτικό οξύ, μέσω της γλυκόλυσης λόγω της παρουσίας της: 1,6 - διφωσφορικής φρουκτόζης, αλδολάσης που είναι βασικό ένζυμο της γλυκόλυσης αλλά και να ζυμώνει πεντόζες σε γαλακτικό και οξικό οξύ μέσω του 6 - φωσφογλυκονικού/ φωσφοκετολάση μονοπατιού. (phosphoglucuronate/ phosphoketolase) (Molin, 2015).

Ο *Lp. plantarum* χρησιμοποιείται ως εκκινήτης σε καλλιέργεια σε διάφορες ζυμώσεις τροφίμων οι οποίες συμβάλλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες, γεύση και υφή (Todorov και Franco, 2010). Ο *Lp. plantarum* παράγει την βακτηριοσίνη της πλανταρισίνης (Collins et al., 2010). Κάποιοι ερευνητές έχουν αξιολογήσει την εφαρμογή διαφορετικών πλανταρισίνων για τον έλεγχο της ανάπτυξης του τροφιμογενές παθογόνου *Listeria monocytogenes* (Todorov, 2008). Το παθογόνο αυτό, έχει ανιχνευθεί σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων, και προκαλεί μια ασθένεια αρκετά επικίνδυνη για κάποιες ομάδες ανθρώπων όπως είναι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι κ.ά (Newell και συν., 2010).

## 1.5 Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν βιοενεργά πεπτιδία ή σύμπλοκα πεπτιδίων, τα οποία συντίθενται ριβοσωμικά και απελευθερώνονται εξωκυτταρικά. Έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση συνήθως σε στενά συσχετιζόμενα είδη με το βακτηριοσινογόνο στέλεχος (Hill και συν., 2002).

Πιο συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες ποικίλλουν όσον αφορά το αντιμικροβιακό φάσμα και τον τρόπο δράσης, το μοριακό βάρος (MB), τη γενετική τους προέλευση και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η σημασία των βακτηριοσινών αποδίδεται στην ενδεχόμενη εφαρμογή τους ως φυσικά συντηρητικά των τροφίμων, με σκοπό την αντικατάσταση ή μείωση των συντηρητικών. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσης, δηλαδή αποτελούνται από πεπτιδία και αμινοξέα. Μπορούν να παρεμποδίσουν την αύξηση των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις και των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

Ορισμένες βακτηριοσίνες μπορεί να είναι απλά πρωτεϊνικά μόρια, αλλά αρκετές βακτηριοσίνες είναι πολύπλοκες χημικές ενώσεις, όπου εκτός από το πρωτεϊνικό τμήμα περιλαμβάνουν και άλλα τμήματα (υδατανθρακικό ή λιπαρό) τα οποία συνδέονται με το πρωτεϊνικό.

Μερικά στελέχη (*Lm. fermentum*, *Lb. helveticus*, και *Lp. plantarum*) είναι ικανά να συνθέσουν αντιμικροβιακές ουσίες τις βακτηριοσίνες. Διάφοροι τύποι βακτηριοσινών από τρόφιμα που σχετίζονται με γαλακτικά βακτήρια, έχουν ταυτοποιηθεί, εκ των οποίων τα πιο σημαντικά είναι η νισίνη, διπλοκοκκίνη, πλανταρισίνη και η λακτασίνη (Nettles και Barefoot, 1993). Οι δύο βακτηριοσίνες που έχουν βρεθεί να παράγονται από γαλακτικά βακτήρια είναι η νισίνη και η διπλοκοκκίνη (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

Η παραγωγή των βακτηριοσινών, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, από τους οποίους οι πιο σημαντικοί είναι το pH και η θερμοκρασία. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις βακτηριοσίνης συνήθως λαμβάνονται σε τιμές pH και θερμοκρασίας χαμηλότερες από τις βέλτιστες για ανάπτυξη. Οι περισσότεροι συγγραφείς αναφέρουν ότι η καλή ανάπτυξη των κυττάρων συχνά συμβαδίζει με τη παραγωγή βακτηριοσίνης. Ωστόσο, η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη δεν οδηγεί πάντα σε υψηλά επίπεδα βακτηριοσίνης (Mataragas και συν., 2003)

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικές στη θέρμανση. Διατηρούν τη δραστηριότητα τους σε διάφορες θερμοκρασίες και για ποίκιλα χρονικά διαστήματα επεξεργασίας, όπως στους 100 °C ακόμα και σε θερμοκρασία αποστείρωσης. Οι βακτηριοσίνες των γαλακτικών βακτηρίων είναι γενικά σταθερές σε όξινο ή ουδέτερο pH (2.0-8.0).

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται εντατικά τις τελευταίες δεκαετίες στο βιοέλεγχο, εφόσον διαθέτουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για αυτό, και αναστέλουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό ποικίλων αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων (Drosinos και συν., 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση, σε σημαντικά παθογόνα όπως η *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* και *Staphylococcus aureus* (De Vuyst & Leroy, 2007). Πρόσφατα, η βιομηχανία τροφίμων έχει δείξει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση βακτηριοσινών ως υποκατάστατο χημικών συντηρητικών, αφού είναι αποτελεσματικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις και, όταν προστίθενται στο φαγητό, δεν μεταβάλλουν την οργανοληπτική του χαρακτηριστικά.

### 1.5.1 Κατηγορίες βακτηριοσινών

Με βάση τη δομή τους καθώς και τις βιοχημικές τους ιδιότητες, οι βακτηριοσίνες χωρίζονται σε τρεις ομάδες: λαντιβιοτικά (Τάξη I), μη λαντιβιοτικά (Τάξη II) και μη λαντιβιοτικά θερμικά ασταθή μόρια που αποτελούνται από μεγάλα μόρια πρωτεΐνης (Τάξη III). Η συντριπτική πλειονότητα των βακτηριοσινών που παράγονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες. (Drosinos και συν., 2008).

Τα λαντιβιοτικά είναι μικρού MB πεπτίδια (< 3,5 kDa), ανθεκτικά στη θέρμανση και χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο μόριο τους αμινοξέων, τα οποία δεν απαντούν συχνά, όπως είναι η λανθειονίνη και η 3-μεθυλο-λανθειονίνη. Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής και η πιο καλά μελετημένη από όλες τις βακτηριοσίνες είναι η νισίνη. Η νισίνη, χρησιμοποιείται με σκοπό την επιμήκυνση διάρκειας ζωής σε αρκετά προϊόντα για περισσότερα από 40 χρόνια σε περισσότερες από 50 χώρες παγκοσμίως, χωρίς να έχει αναπτύξει κάποια φυσικής αντίστασης (Mangalassary και συν., 2008).

Τα μη λαντιβιοτικά είναι μικρού MB βακτηριοσίνες (<10 kDa) με 30-100 αμινοξέα στο μόριο τους, ανθεκτικές στη θέρμανση και οι οποίες δεν περιέχουν λανθειονίνη στο μόριο τους. Τα μη λαντιβιοτικά χωρίζονται σε 4 υποκατηγορίες:

- ✓ **Κλάση II a.** είναι η πιο κοινή κλάση και περιλαμβάνει πεπτίδια τα οποία είναι δραστικά έναντι του γένους *Listeria*. Σε αυτή την κλάση ανήκουν 14 βακτηριοσίνες. Η πεδιοσίνη PA-1 ήταν η πρώτη βακτηριοσίνη της ομάδας που χαρακτηρίστηκε. Η plantaricin 423 που παράγεται από το *L. plantarum* 423 ανήκει σε αυτή την ομάδα. Η βακτηριοσίνη αυτή είναι ανθεκτική στη θερμότητα, ευαίσθητη στα πρωτεολυτικά ένζυμα, και σταθερή σε pH 1-10. Αρκετά, θετικά gram βακτήρια αναστέλλονται από την plantaricin 423, όπως *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Enterococcus spp.* και παθογόνα βακτήρια όπως *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* και *Listeria spp.* (Van Reenen και συν., 1998).
- ✓ **Κλάση II b.** η οποία περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που απαιτούν την ένωση δύο πεπτιδίων για να ασκήσουν πλήρως αντιβακτηριακή δράση (λακτοκοκκίνη G, πλανατρισίνη S).
- ✓ **Κλάση II c.** βακτηριοσίνες που έχουν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του C και N τερματικού, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια κυκλική δομή. Σε αυτή την κλάση ανήκουν βακτηριοσίνες που δεν έχουν κοινά χαρακτηριστικά. Έχουν υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα

και προτεολυτική σταθερότητα και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια.

✓ **Κλάση II d.** που περιλαμβάνει πεπτιδία που απαιτούν ανηγμένα μόρια κυστεΐνης για την εκδήλωση της δραστηριότητας (εντερολυσίνη L50) (Mokoena, 2017).

### 1.5.2 Τρόπος δράσης βακτηριοσινών

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών εξαρτάται άμεσα από παράγοντες που σχετίζονται με τα βακτηριακά είδη και τις συνθήκες ανάπτυξής τους (Parada et al., 2007). Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων αποτελεί τον κύριο στόχο δράσης των βακτηριοσινών. (Bierbaum & Sahl, 2009).

Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών διακρίνεται σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η βακτηριοσίνη προσδένεται πάνω σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών. Στο στάδιο αυτό οι βακτηριοσίνες δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στο κύτταρο. Αυτή η φάση είναι αντιστρεπτή και η απομάκρυνση της βακτηριοσίνης (π.χ. με δράση πρωτεασών) κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της δομής της μεμβράνης χωρίς να προκληθούν βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα. Το δεύτερο στάδιο είναι μη αντιστρεπτό και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στα ευαίσθητα κύτταρα, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε βακτηριοσίνη. Κάποια στελέχη που εμφανίζουν ανοσία έναντι των βακτηριοσινών, πιθανώς παράγουν πρωτεΐνες ανοσίας έναντι αυτών και δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στους υποδοχείς προσρόφησης. Από την κλάση I των λαντιβιοτικών έχει διαπιστωθεί ότι η νισίνη δρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργώντας πόρους με αποτέλεσμα την έξοδο κυτταρικών υλικών, όπως ATP και αμινοξέων ή υπάρχουν περιπτώσεις που συμβαίνει λύση του κυττάρου, λόγω αύξησης της ωσμωτικής πίεσης. Οι πόροι που σχηματίζονται δεν έχουν πολύ μεγάλη διάμετρο με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η έξοδος από το κύτταρο των μεγαλομοριακών ενώσεων και λόγω της αύξησης των ωσμωτικών φαινομένων αρχίζει να εισέρχεται μέσα στο κύτταρο νερό. Ερευνητές έχουν δείξει επίσης ότι η νισίνη παρεμποδίζει και τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (μουρεΐνης), η οποία αποτελεί σημαντικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (+) μικροοργανισμών.

Από πειράματα που έγιναν αποδείχτηκε ότι η βακτηριοσίνη από την κλάση II αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Σε αντίθεση με τις βακτηριοσίνες της πρώτης κατηγορίας, οι οποίες προκαλούν διαταραχή της δομικής ακεραιότητας της μεμβράνης,

αυτές της κλάσης II διαταράσσουν τη λειτουργία της ανεξάρτητα από τη διαφορά δυναμικού που επικρατεί. (Cotter και συν., 2012)

### **1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριοσίνων**

Ο τύπος και το επίπεδο θρεπτικών συστατικών (σάκχαρα, άζωτο, φώσφορος, μαγνήσιο, ασβέστιο κ.λπ.) επηρεάζουν την παραγωγή βακτηριοσίνης. Τα γαλακτικά βακτήρια διαθέτουν περιορισμένο αριθμό καταβολικών μονοπατιών που παρέχουν ενέργεια για τη σύνθεση των κυττάρων και ενέργεια που απαιτείται για την παραγωγή βακτηριοσίνης. Επιπλέον, οι συνθήκες που ευνοούν την κυτταρική ανάπτυξη θα βελτιώσουν πιθανώς τη παραγωγή βακτηριοσίνης. Ωστόσο, ένας εξαιρετικά πλούσιο περιβάλλον δεν θα οδηγήσει απαραίτητα σε αύξηση της παραγωγής βακτηριοσίνης. Αρκετά μελέτες έχουν δείξει ότι ο τύπος και το επίπεδο των σακχάρων (π.χ. γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, κ.λπ.) που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα επηρεάζουν σημαντικά τη σύνθεση βακτηριοσίνης (Drosinos και συν., 2008). Η παραγωγή βακτηριοσίνης ενεργοποιήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Drosinos και συν., 2005b), επειδή μερικές φορές η κατάσταση στρες που δημιουργείται από την υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (υψηλές οσμωτικές πιέσεις) προκαλεί καλύτερη παραγωγή βακτηριοσίνης (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH είναι πολύ σημαντική στη παραγωγή βακτηριοσίνης και έχει μελετηθεί σε αρκετά γαλακτικά βακτήρια. Συχνά, η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριοσίνης επιτυγχάνεται σε pH εντός του εύρους 5,5–6,0 και σε τιμές θερμοκρασίας ελαφρώς χαμηλότερες από τις βέλτιστες για ανάπτυξη. Μόνο μερικές βακτηριοσίνες εμφανίζουν καλύτερη παραγωγή σε χαμηλότερες τιμές pH (5,0). Η παραγωγή βακτηριοσίνης ενισχύεται σε χαμηλότερες τιμές περιβαλλοντικών παραγόντων από αυτές του βέλτιστου, πιθανώς επειδή η συνολική διαδικασία σύνθεσης βακτηριοσίνης ευνοείται από σχετικά χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Αυξημένοι ρυθμοί ανάπτυξης δεν σημαίνει απαραίτητα καλύτερη παραγωγή βακτηριοσίνης (De Vuyst και συν., 1996; Mataragas και συν., 2003a). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες ή τιμές pH η παραγωγή βακτηριοσίνης είναι χαμηλότερη επειδή οι ενεργειακές ανάγκες για λόγους συντήρησης είναι υψηλότερες. (Drosinos και συν., 2005; Leroy & De Vuyst, 1999). Λειτουργίες συντήρησης όπως ο κύκλος εργασιών μακρομορίων (DNA, RNA) και η διατήρηση του δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης των κυττάρων είναι

ανάπτυξη εξαρτώμενοι και ταχύτεροι ρυθμοί ανάπτυξης σημαίνουν ότι απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τη συντήρηση. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις καλύτερης παραγωγής βακτηριοσίνης σε θερμοκρασίες κοντά στις βέλτιστες για ανάπτυξη (Drosinos και συν., 2008). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο χρόνος επώασης επηρεάζει τη παραγωγή βακτηριοσινών που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης και μέχρι την αρχή της στατικής φάσης. Η παρατεταμένη επώαση έχει ως συνέπεια την αποδόμηση των βακτηριοσινών εξαιτίας της πιθανής παραγωγής πρωτεασών και άλλων παρεμποδιστικών ενώσεων (Hill και συν., 2002, Galvez και συν., 2007).

## **1.6 Χρήση των γαλακτικών βακτηρίων και των μεταβολιτών τους στη βιομηχανία τροφίμων ως βιοσυντηρητικά**

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτές όλο και περισσότερο ανησυχούν σχετικά με την παρουσία χημικών ουσιών στα τρόφιμα (Zeuthen και Bøgh-Sørensen, 2003). Επομένως, οι απαιτήσεις των καταναλωτών έχουν ενθαρρύνει την έρευνα για εναλλακτικά συντηρητικά. Τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν ενδιαφέρον για τη βιοσυντήρηση διάφορων τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση, καθώς έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή στελέχη (GRAS) και έχουν τη δυναμική να χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα τρόφιμα (Hansen, 2005; Hill και συν., 2002). Τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών μέσω της ζύμωσης που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της ανάπτυξης αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Cintas και συν., 1998; Holzappel και Wood, 2014). Πιο συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες οι οποίες παράγονται από γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται εντατικά στο βιοέλεγχο τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς αναστέλλουν την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών παθογόνων και αλλοιωγόνων βακτηρίων και προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στους καταναλωτές των εμβολιασμένων τροφίμων (Drosinos και συν., 2008). Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις βιομηχανίες τροφίμων για τη βελτίωση της ποιότητας, την αύξηση της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής των τροφίμων (De Vuyst και Leroy, 2007). Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί παγκοσμίως η δυνατότητα χρήσης βακτηριοσινών ώστε να μειωθεί η μικροβιολογική αλλοίωση. Οι βακτηριοσίνες δρουν ενάντια σε διάφορα παθογόνα βακτήρια όπως *Salmonella enteritidis*, *Eschericia coli*, *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringenes* και *Bacillus cereus* (Thakur, 2017). Παρά το γεγονός ότι η δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσινών



από οξυγαλακτικά βακτήρια έχει μελετηθεί έως ένα βαθμό σε περίπλοκα οικοσυστήματα, είναι ελάχιστη η βιβλιογραφία που αφορά στην παραγωγή βακτηριοσινών σε συνθήκες που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιών (Messens και συν., 2002). Μολονότι η δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσινών δεν σχετίζεται με την επιμήκυνση της διάρκειας χρόνου ζωής των άρτων, ωστόσο κατά το στάδιο προετοιμασίας των προζυμιών ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμόλυνσης από παθογόνα βακτήρια, όπως η *L. monocytogenes*.

## **Σκοπός εργασίας**

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή των προζυμιών, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης, το θρεπτικό υπόστρωμα, οι διαφορετικές περιεκτικότητες σε NaCl και οι διαφορετικές τιμές pH, στην ενεργότητα των πλανταρισινών, στον πληθυσμό και στη μείωση της τιμής του pH 6 στελεχών του είδους *Lp. plantarum*.

## **2 Υλικά & Μέθοδοι**

### **2.1 Μικροβιακά στελέχη**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, LQC 2320, 2422, 2441, 2485 2516, και 2520. Πιο αναλυτικά, τα υπό μελέτη στελέχη ανήκουν στο είδος *Lp. plantarum* και προηγουμένως χαρακτηρίστηκαν από τη δυνατότητα παρεμπόδισης ανάπτυξης μίγματος 5 στελεχών του είδους *L. monocytogenes*, ορότυπου 4b. Τα 5 στελέχη του είδους *L. monocytogenes*, LQC 15186, 15187, 15188, 15189, 15190, είχαν απομονωθεί από χοιρινό κιμά από τους Andritsos και συν. (2013).

Καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, πραγματοποιούνταν ανανέωση των στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα de Mann Rogosa Sharpe (MRS, LABM, UK), καθώς και έλεγχος καθαρότητας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS, υπό ασηπτικές συνθήκες. Όλα τα στελέχη βακτηρίων προέρχονται από την συλλογή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, αποθηκευμένα στους -20 °C σε θρεπτικό ζυμό, παρουσία γλυκερόλης (50% συνολικού όγκου).

### **2.2 Ανανέωση των μικροβιακών στελεχών**

Το αρχικό αυτό στάδιο μεσολαβεί πριν από το έλεγχο της καθαρότητας των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ανακτήσουν οι μικροοργανισμοί τη ζωτικότητα τους. Η ανανέωση πραγματοποιήθηκε με την χρήση υγρού θρεπτικού υποστρώματος στο οποίο ενοφθαλμίστηκαν τα επιλεγμένα βακτήρια. Συγκεκριμένα, ποσότητα ενοφθαλμίσματος 40 μL, περίπου το 1 % του τελικού όγκου, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη χρήση πιπέτας σε περιέκτες τ. Falcon® με 4 mL MRS broth. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση τους στους 30°C για 24 h. Σχετικά με το μίγμα 5 στελεχών *L. monocytogenes*, το θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το Brain Heart Infusion (BHI) broth (LAB M). Η ανανέωση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω, αλλά σε BHI broth, ενώ ακολούθησε η επώαση τους στους 37°C για 24 h.

### **2.3 Έλεγχος καθαρότητας μικροβιακών στελεχών**

Μετά την ανανέωση των γαλακτικών βακτηρίων και πριν την έναρξη των πειραμάτων, πραγματοποιούνταν έλεγχος της καθαρότητας των στελεχών προς αποφυγή επιμολύνσεων. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν αυτή της γραμμικής εξάπλωσης τρυβλίων με MRS agar με μικροβιολογικό κρίκο (streaking), υπό ασηπτικές συνθήκες. Στην συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C για 24 με 48 h. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της καθαρότητας των στελεχών *L. monocytogenes* σε τρυβλία με BHI με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω και στην συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 h.

### **2.4 Επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στη μείωση της τιμής pH των στελεχών *Lp. plantarum***

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά υποστρώματα. Το πρώτο ήταν το MRS broth. Το δεύτερο υπόστρωμα ήταν το MRS broth τροποποιημένο (mMRS broth) ως προς το είδος και την ποσότητα των υδατανθράκων που απαντώνται στο αλεύρι σίτου: γλυκόζη (1,47 g/L), φρουκτόζη (0,52 g/L), μαλτόζη (9,87 g/L) και σακχαρόζη (8,35 g/L). Τέλος χρησιμοποιήθηκε ένα εκχύλισμα αλεύρου σίτου-νερού (WFE). Το τελευταίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους Gobetti και συν. (1998) και Rizzello και συν.(2009) τροποποιημένο ως εξής: αλεύρι σίτου εναιωρήθηκε σε νερό βρύσης (σε αναλογία 1:5), και ακολούθησε επώαση για 18 h υπό ανακίνηση (200 rpm) στους 30°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο που ελήφθη με φυγοκέντρηση (12.000 × g, 20 λεπτά, 4°C) ενισχύθηκε περαιτέρω με τους υδατάνθρακες που απαντώνται στο αλεύρι σίτου έτσι ώστε να φτάσουν στην αρχική τους συγκέντρωση. Τέλος το εκχύλισμα αλεύρου σίτου αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min. Κάθε ένα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα προσαρμόστηκε σύμφωνα με τις παραμέτρους που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού, δηλαδή δύο τιμές pH: 5.0 και 6.0, ρυθμισμένο με NaOH 3 M. δύο συγκεντρώσεις NaCl, 0,0 και 1,8%. Ακολούθησε επώαση σε τρεις θερμοκρασίες 20, 30 και 37°C για 12 και 21 h, αντίστοιχα (Syrokou και συν., 2021).

24ώρες καλλιέργειες των 6 γαλακτικών βακτηρίων ενοφθαλμίστηκαν σε MRS broth, mMRS broth και WFE σε τελικό πληθυσμό περίπου 7.5 log (CFU/mL). Αφού ακολούθησε επώαση

στους 30, 37 και 20 °C για 12 h και 21h αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του πληθυσμού.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας πλανταρισίνης, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar well diffusion assay). Ως δείκτες χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα 5 στελεχών *L. monocytogenes*, ορότυπου 4b. Πιο αναλυτικά, 24ωρες καλλιέργειες των στελεχών δεικτών ενοφθαλμίστηκαν (1% η καθεμία) σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI agar. Έπειτα, το BHI agar διανεμήθηκε σε τρυβλία Petri. Μετά τη σταθεροποίησή τους ακολούθησε η διάνοιξη οπών, ασηπτικά με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur. Σε κάθε οπή έγινε μεταφορά 25  $\mu$ L υπερκειμένου ανάπτυξης ελεύθερου κυττάρων, τα οποία ελήφθησαν με φυγοκέντρηση (12,000 $\times$  g; 10 min; 4°C) και ουδετεροποίηση του pH. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 h. Η παρουσία ζώνης διάγασης γύρω από τις οπές σηματοδοτεί την παρουσία παρεμποδιστικής δράσης κατά του μίγματος 5 στελεχών *L. monocytogenes*. Η δράση της πλανταρισίνης ποσοτικοποιήθηκε μέσω των δυαδικών αραιώσεων του υπερκειμένου ανάπτυξης ελεύθερου κυττάρων και εκφράστηκε σε AU/ mL. Η αυθαίρετη μονάδα (AU) ορίστηκε ως ο ανάστροφος της υψηλότερης αραιώσης, που εμφανίζει μια ξεκάθαρη ζώνη αναστολής, πολλαπλασιασμένη επί 40 για να ληφθεί το AU/ mL. (Syrokou και συν., 2021). Πιο συγκεκριμένα, η δράση της βακτηρισίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση. Δραστηριότητα βακτηρισίνης (AU/mL) = (d  $\times$  1/m), όπου «d» είναι ο συντελεστής αραιώσης, που στην περίπτωση μας ήταν 40, και το "m" είναι η υψηλότερη αραιώση που εμφάνισε μια ξεκάθαρη ζώνη αναστολής. Όλες οι αναλύσεις εκτελέστηκαν εις διπλούν.

## 2.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της Πολυπαραγοντικής Ανάλυσης Διακύμανσης, η οποία πραγματοποιήθηκε με το Statgraphics 19 -X64. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το  $P < 0.05$ .

### 3 Αποτελέσματα

#### 3.1 Επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στη μείωση της τιμής pH των στελεχών *Lp. plantarum*

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν οι παράμετροι που σχετίζονται με τη παρασκευή προζυμιού. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρία υποστρώματα ανάπτυξης (MRS, mMRS, WFE), τρεις θερμοκρασίες επώασης (20, 30, 37 °C), δύο αρχικές τιμές pH (5.0, 6.0), δύο συγκεντρώσεις NaCl (0.0, 1.8%) και δύο χρονικά σημεία (12 και 21 h). Στις εικόνες 4-9 παρουσιάζεται η επίδραση των παραμέτρων αυτών στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στη μείωση της τιμής pH των 6 στελεχών *Lp. plantarum*.

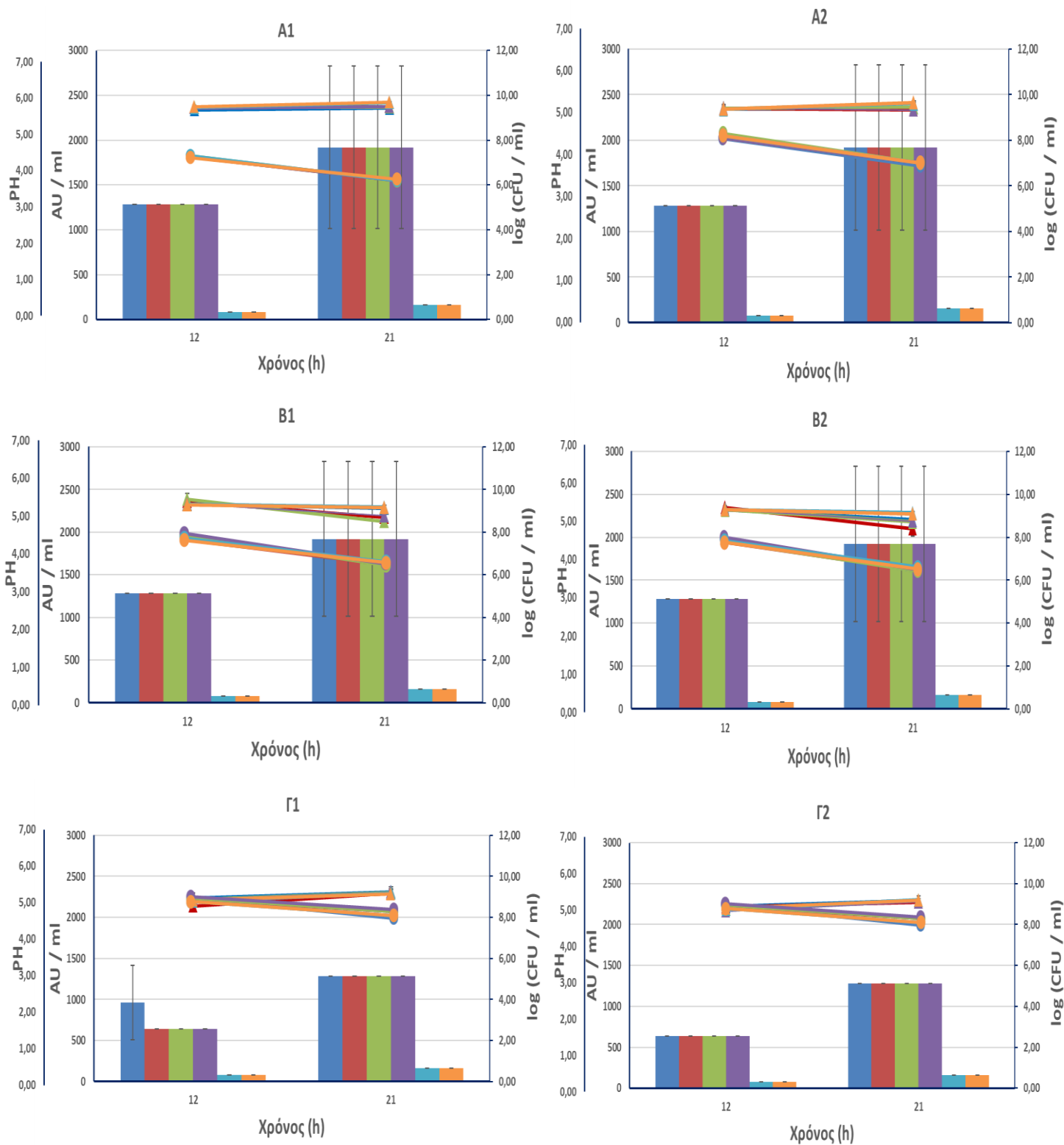
Η φαινοτυπική αξιολόγηση έδειξε ότι τα 6 στελέχη διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ταξινομήθηκαν τα LQC 2422, 2441, 2485 και 2516, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης σε σχέση με τα LQC 2320 και 2520, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από χαμηλότερες τιμές. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης για τα στελέχη LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 κυμάνθηκαν από 160 έως 2560 AU/ mL, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα στελέχη LQC 2320 και 2520 κυμάνθηκαν από 80 έως 160 AU/ mL.

Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας, η ανάπτυξη των στελεχών LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 στους 30 και 37 °C οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης σε σχέση με την αντίστοιχη στους 20 °C. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα ενεργότητας κυμάνθηκαν από 320 έως 2560 AU/mL μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 στους 30 και 37 °C, σε σύγκριση με τις τιμές που καταγράφηκαν μετά από επώαση στους 20 °C, με τις τελευταίες να είναι αρκετά χαμηλότερες (από 320 έως 1280 AU/mL). Αντίθετα, στην περίπτωση των στελεχών LQC 2320 και 2520, καταγράφηκαν επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης από 80 έως 160 AU/ mL, σε οποιαδήποτε θερμοκρασία επώασης. Σχετικά με την επίδραση του υποστρώματος, υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης για τα στελέχη LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 παρατηρήθηκαν μετά από επώασή τους σε MRS και mMRS broth, σε σύγκριση με την ανάπτυξη σε WFE. Αναλυτικότερα, η ανάπτυξη σε mMRS broth, οδήγησε σε υψηλότερη τιμή ενεργότητας πλανταρισίνης που ποσοτικοποιήθηκε ως 2560 AU/ mL, ενώ η αντίστοιχη στο WFE καταγράφηκε ως 640 AU/ mL. Σχετικά με το υπόστρωμα

MRS broth, η υψηλότερη τιμή που καταγράφηκε ήταν 1920 AU/ mL. Όσον αφορά στα στελέχη LQC 2320 και 2520, η ανάπτυξή τους σε mMRS και MRS broth οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (από 80 έως 160 AU/mL), ενώ στο υπόστρωμα WFE σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές ήταν 80 AU/mL. Σχετικά με το υπόστρωμα WFE, υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης καταγράφηκαν μετά από επώαση για 21h σε σχέση με τις 12h για τα στελέχη LQC 2422, 2441, 2485 και 2516. Αναφορικά με την επίδραση της αρχικής τιμής pH στην ενεργότητα πλανταρισίνης παρατηρήθηκε ότι, μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε MRS broth και mMRS broth, σε pH 6, καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα πλανταρισίνης από ότι μετά από επώαση στα ίδια υποστρώματα ρυθμισμένα σε pH 5. Αξίζει να σημειωθεί πως μετά από επώαση των 6 στελεχών για 21 h καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης, σε σύγκριση με την ανάπτυξη για 12h.

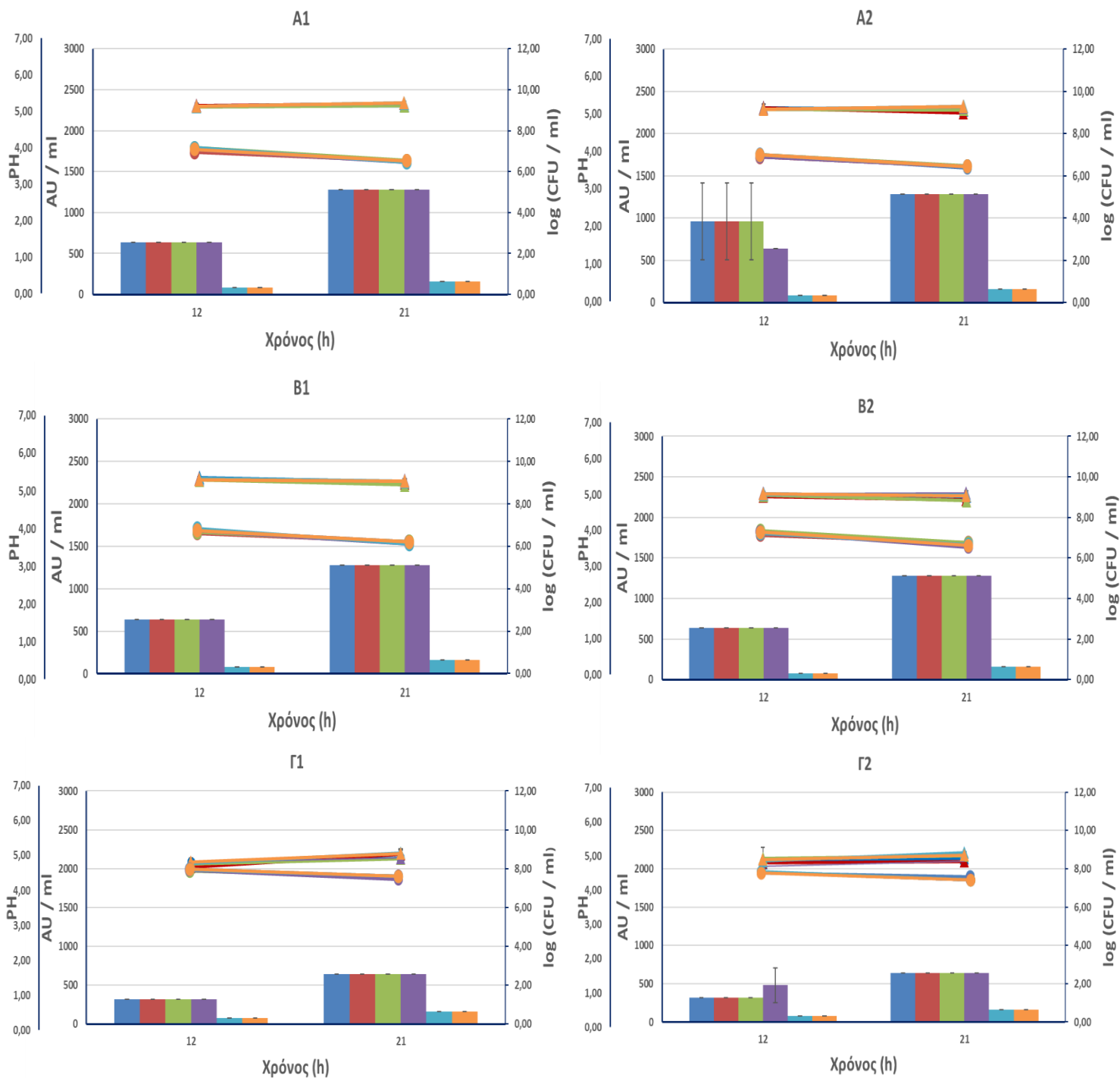
Σχετικά με την αξιολόγηση της επίδρασης παραμέτρων στην μικροβιακή ανάπτυξη, παρατηρήθηκε ότι και τα 6 στελέχη, εμφάνισαν τιμές  $< 9 \log$  (CFU/ mL) σε χρόνο επώασης 12 h ενώ σε χρόνο επώασης 21h καταγράφηκαν τιμές  $> 9 \log$  (CFU/ mL). Αξίζει να αναφερθεί ότι σε υπόστρωμα WFE οι τιμές μικροβιακής ανάπτυξης για όλα τα στελέχη ήταν  $< 9 \log$  CFU/ mL ενώ σε υπόστρωμα mMRS ήταν  $> 9 \log$  CFU/mL.

Στην περίπτωση της επίδρασης των παραμέτρων στην τελική τιμή pH, τα 6 στελέχη *Lp. plantarum* παρουσίασαν παρόμοιες τελικές τιμές pH ( $< 4.5$ ) μετά από επώαση σε θερμοκρασίες 30 και 37 °C, ενώ μετά από επώαση σε θερμοκρασία 20 °C παρατηρήθηκαν υψηλότερες τελικές τιμές pH (από 4.2 έως 5.1). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μετά από επώαση των 6 στελεχών για 12 h καταγράφηκαν υψηλότερες τελικές τιμές pH σε σύγκριση με την ανάπτυξη για 21 h.

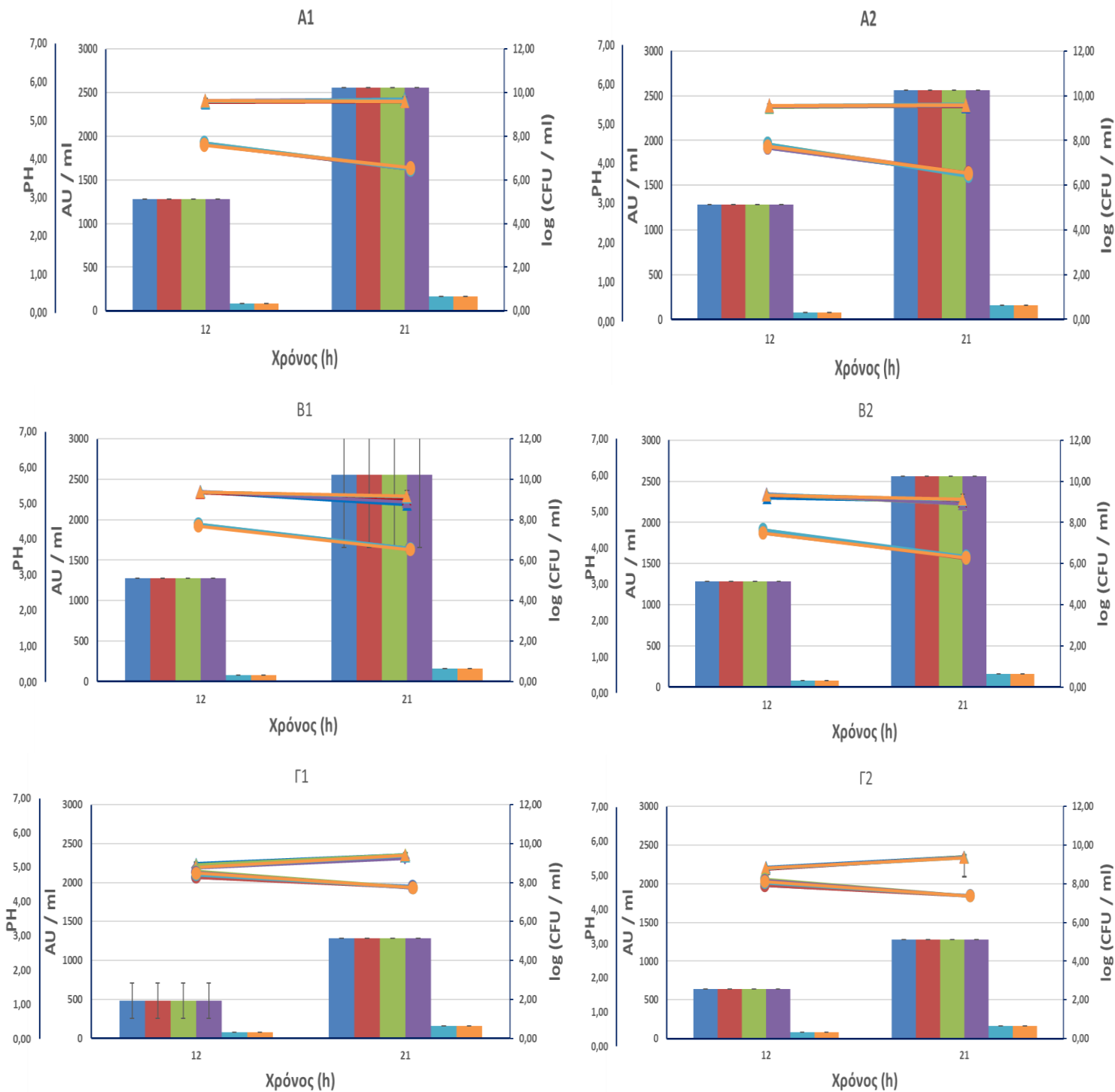


**Εικόνα 4:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) ( $\blacktriangle$ ), μείωση pH ( $\bullet$ ) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε MRS broth ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.

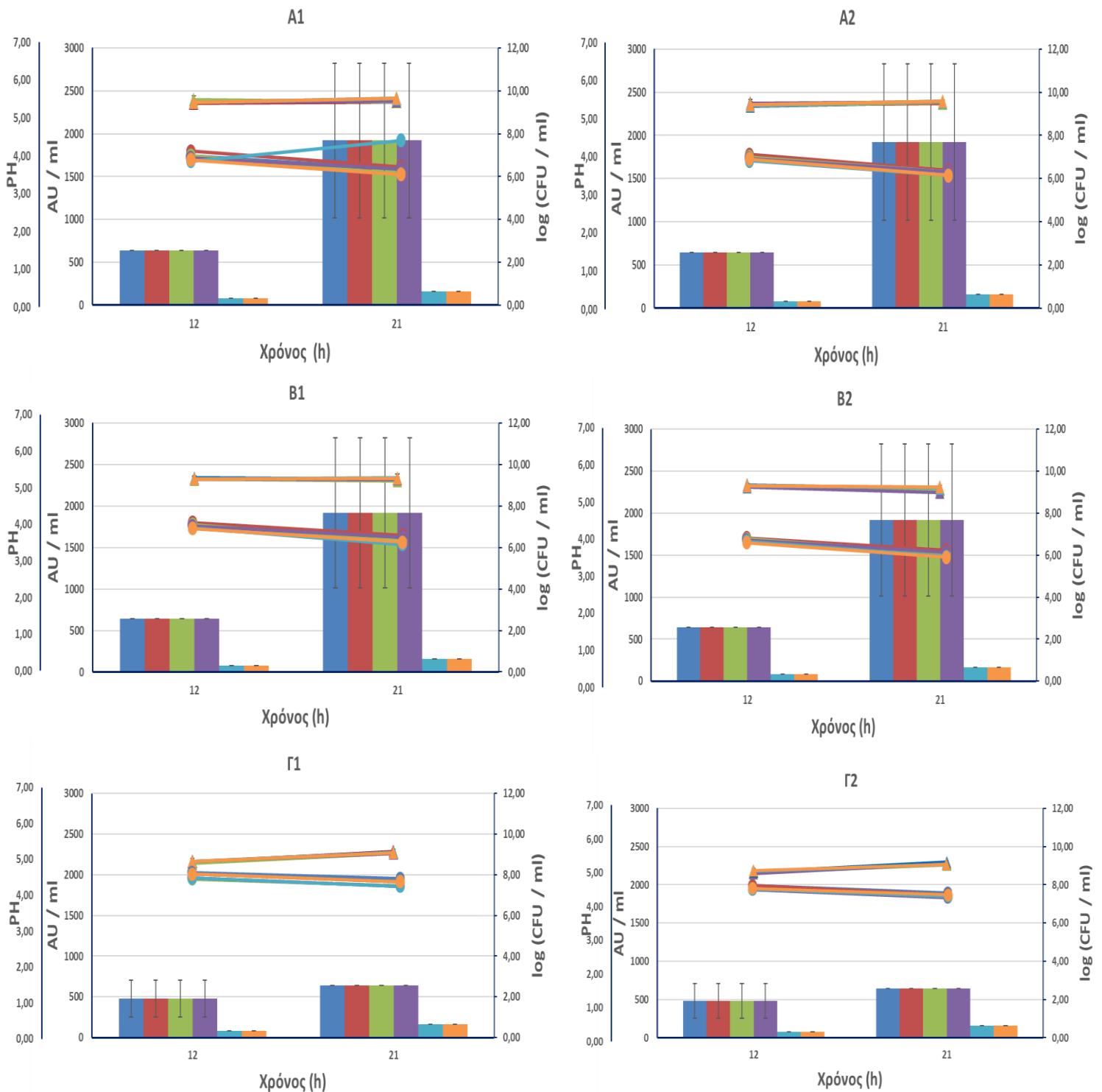




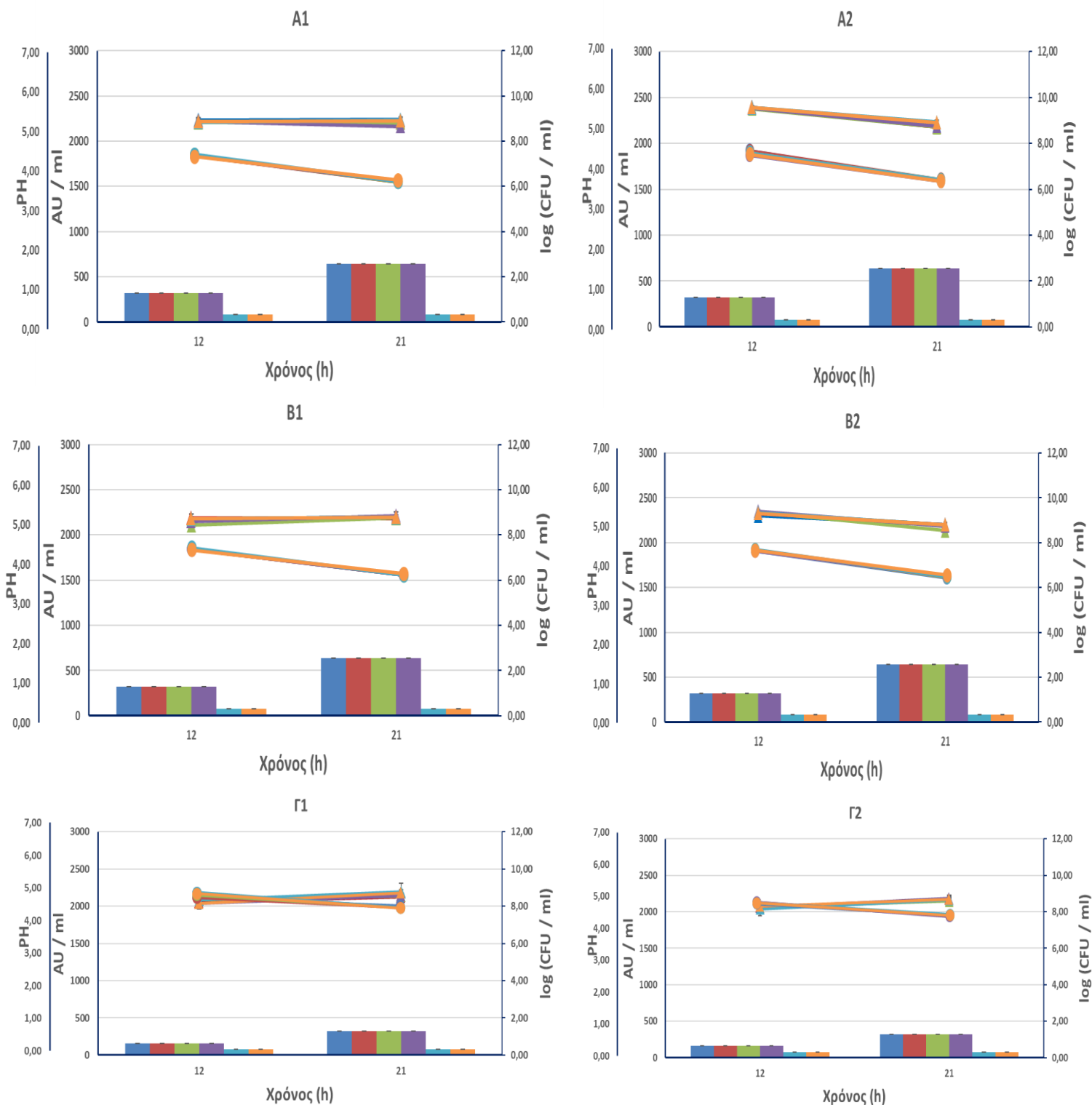
**Εικόνα 5:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε MRS broth ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.



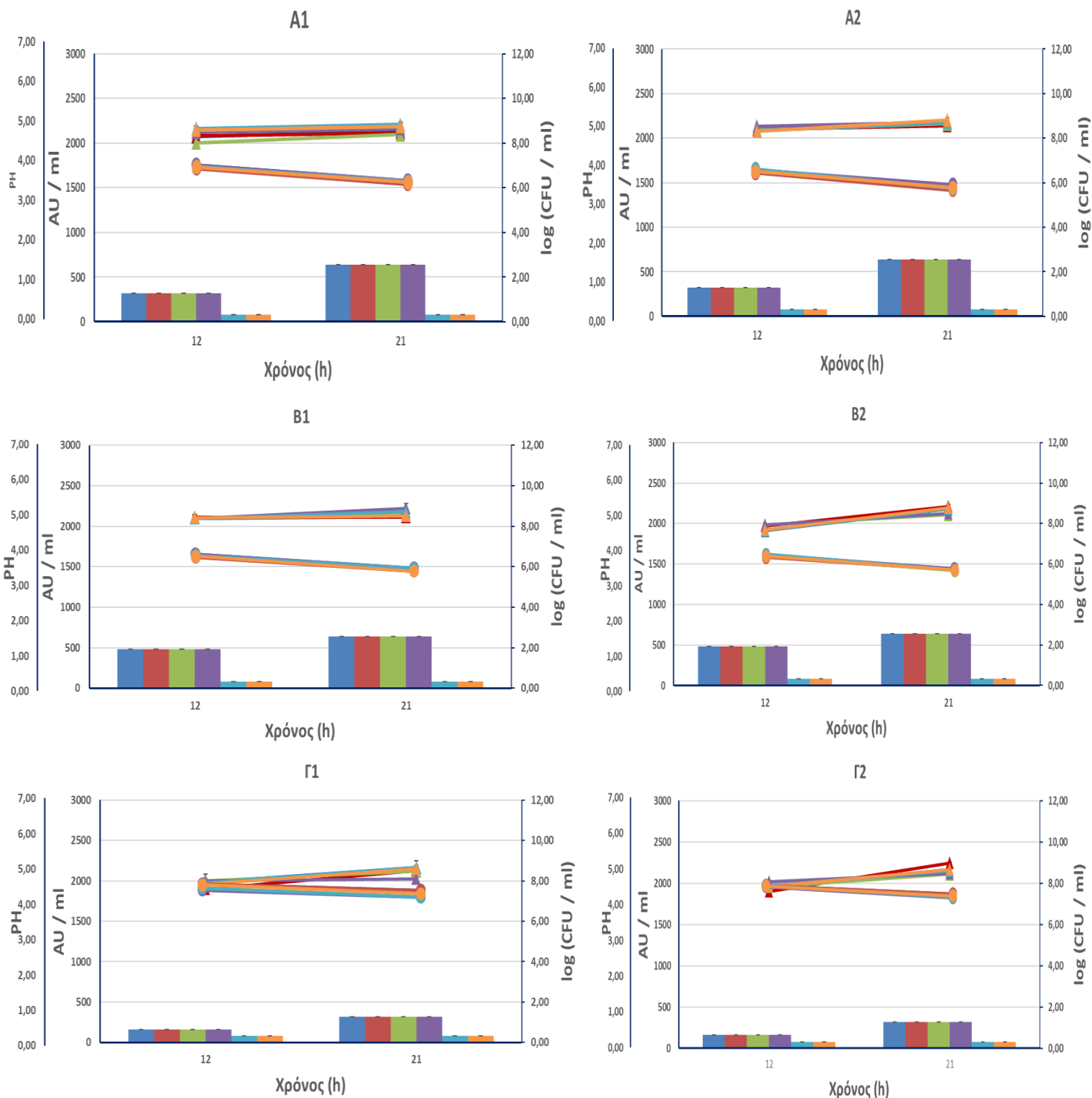
**Εικόνα 6:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε mMRS broth ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21 h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.



**Εικόνα 7:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μάρκες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε mMRS broth ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.



**Εικόνα 8:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε WFE ρυθμισμένο σε pH 6, στους 30 (Α), 37 (Β) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.

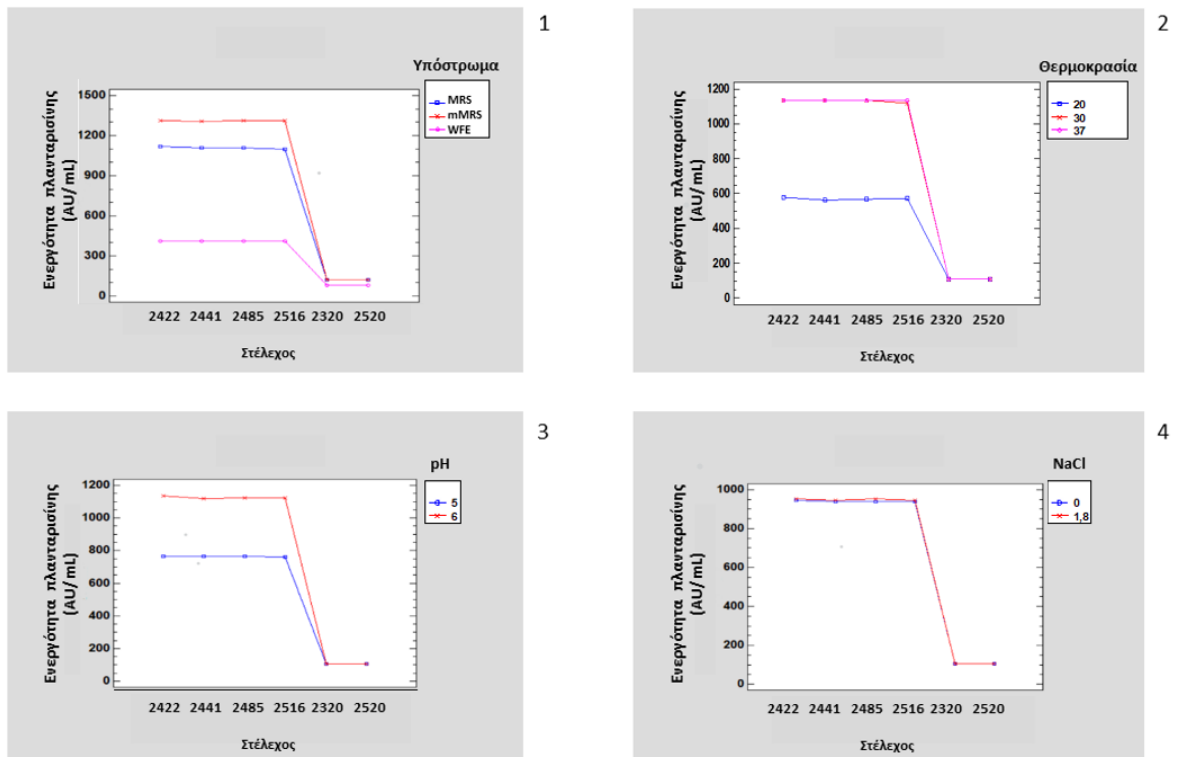


**Εικόνα 9:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε log (CFU/ mL) (▲), μείωση pH (●) και ενεργότητα πλανταρισίνης σε AU/ mL (μπάρες) των 6 στελεχών *Lp. plantarum*, μετά από την επώαση σε WFE ρυθμισμένο σε pH 5, στους 30 (A), 37 (B) και 20 °C (Γ), για 12 και 21h, αντίστοιχα. Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0 και 1.8 %) υποδηλώνεται με τους αριθμούς 1 και 2, αντίστοιχα. Τα 6 στελέχη *Lp. plantarum*, LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520 υποδηλώνονται με τα χρώματα μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, γαλάζιο, πορτοκαλί, αντίστοιχα.

Η Πολυπαραγοντική Ανάλυση Διακύμανσης πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η επίδραση των παραμέτρων όπως η αρχική τιμή pH, η θερμοκρασία επώασης, η συγκέντρωση NaCl, το θρεπτικό υπόστρωμα, ο χρόνος επώασης και το βακτηριακό στέλεχος στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και στην τελική τιμή pH των 6 στελεχών *Lp. plantarum*.

Στους Πίνακες Σ1, Σ3, Σ5, οι οποίοι αποτυπώνονται στο Παράρτημα I, παρουσιάζονται περαιτέρω στοιχεία που αφορούν στην επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με τη παρασκευή προζυμιού στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης, τη μικροβιακή ανάπτυξη και την τελική τιμή pH. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία επώασης, το βακτηριακό στέλεχος, το θρεπτικό υπόστρωμα, ο χρόνος επώασης και η αρχική τιμή pH επηρέασαν σημαντικά τη μεταβλητότητα της ενεργότητας πλανταρισίνης ( $p < 0,05$ ), ενώ το NaCl χαρακτηρίστηκε ως μη σημαντικός παράγοντας. Στις Εικόνες 10-12 αποτυπώνονται τόσο η αλληλεπίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με τη παρασκευή προζυμιού όσο και η επίδρασή τους στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης, τη μικροβιακή ανάπτυξη και την τελική τιμή pH. Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών με τη θερμοκρασία επώασης, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/mL) των στελεχών LQC 2422, 2441, 2485, 2516 στους 30 και 37 °C ήταν παραπλήσιες και διέφεραν από τις μέσες τιμές που καταγράφηκαν μετά από ανάπτυξη στους 20 °C (Εικόνα 10, 2). Για τα στελέχη 2320 και 2520 καταγράφηκαν παρόμοιες μέσες τιμές ενεργότητας (AU/mL) μετά από ανάπτυξη και στις τρεις θερμοκρασίες. Σχετικά με την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών με το θρεπτικό υπόστρωμα, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/mL) των στελεχών LQC 2441, 2422, 2516, 2485 που καταγράφηκαν μετά από ανάπτυξη σε mMRS broth ήταν υψηλότερες και διέφεραν από τις μέσες τιμές μετά από ανάπτυξη σε MRS broth και WFE. Για τα στελέχη 2320 και 2520, οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/mL) ήταν παραπλήσιες και στα τρία διαφορετικά υποστρώματα (Εικόνα 10, 1). Σχετικά με την επίδραση στην μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/mL), η οποία προέκυψε από την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών και της αρχικής τιμής pH, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης των στελεχών LQC 2441, 2422, 2516, 2485 για αρχική τιμή pH 6 διέφεραν από τις τιμές για pH 5, ενώ για τα στελέχη 2320 και 2520 οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/mL) ήταν παραπλήσιες σε pH 6 και pH 5 (Εικόνα 10, 3). Αξίζει να αναφερθεί ότι όσον αφορά την επίδραση στην μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/mL), η οποία προέκυψε από την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών και του χρόνου επώασης,

παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης των στελεχών LQC 2441, 2422, 2516, 2485 σε χρόνο επώασης 12h διέφεραν από τις τιμές για 21h, ενώ για τα στελέχη 2320 και 2520 οι μέσες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/mL) ήταν παραπλήσιες σε 12h και 21h.

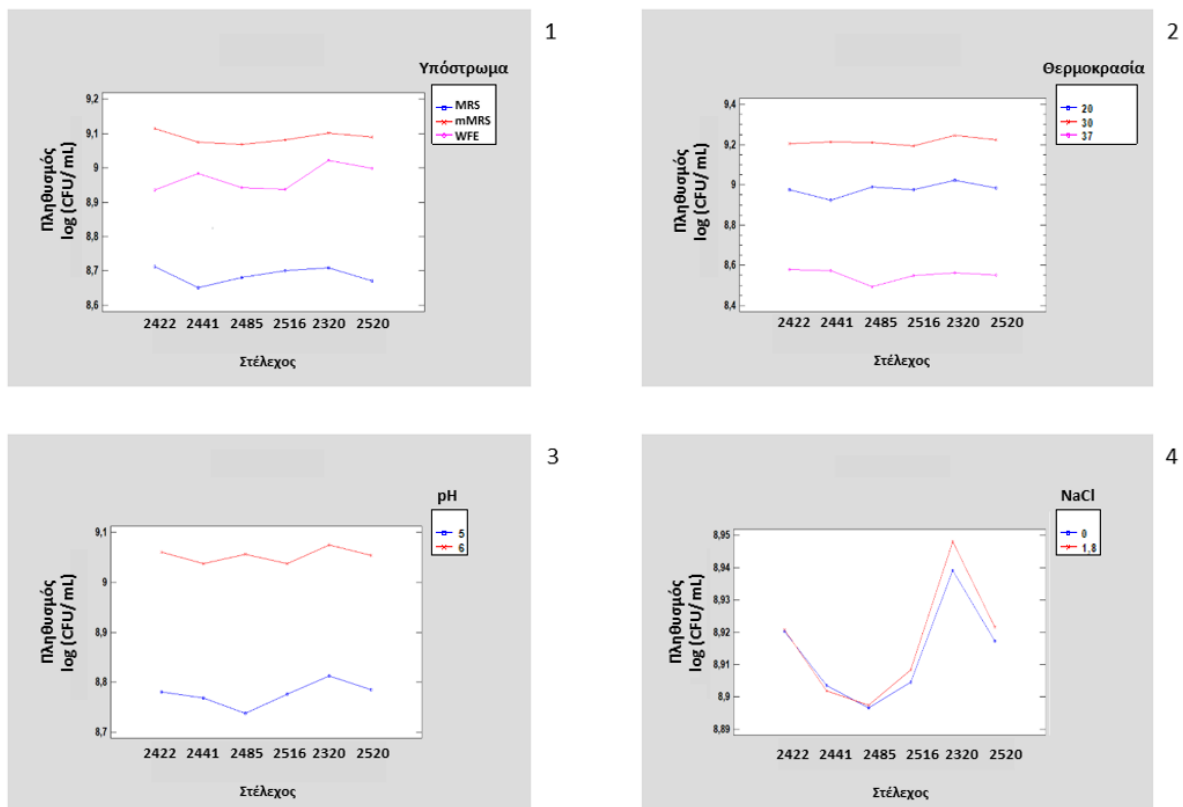


**Εικόνα 10:** Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν τη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων. 1) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στη μέση ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl.

Στην περίπτωση της επίδρασης των παραμέτρων στη μεταβλητότητα του πληθυσμού, η θερμοκρασία επώασης, το θρεπτικό υπόστρωμα, ο χρόνος επώασης και η αρχική τιμή pH χαρακτηρίστηκαν ως σημαντικοί παράγοντες ( $p < 0,05$ ). Από την άλλη, το βακτηριακό στέλεχος και το NaCl δεν είχαν σημαντική επίδραση στη μεταβλητότητα του πληθυσμού σε κανέναν από τους δύο χρόνους επώασης (Πίνακας Σ3). Σχετικά με την αλληλεπίδραση του

θρεπτικού υποστρώματος με τη θερμοκρασία επώασης, φάνηκε ότι οι μέσες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης log (CFU/ mL) σε WFE στους 20, 30 και 37 °C ήταν παραπλήσιες με τις μέσες τιμές στα θρεπτικά υποστρώματα MRS broth και mMRS broth και στις τρεις θερμοκρασίες επώασης (Πίνακας Σ4). Η αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους με το υπόστρωμα οδήγησε σε μέσες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης log (CFU/ mL) υψηλότερες και για τα 6 στελέχη μετά από επώαση σε υπόστρωμα mMRS από ότι σε MRS και WFE (Εικόνα 11, 1). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους με την αρχική τιμή pH οδήγησε σε μέσες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης log (CFU/ mL) υψηλότερες και για τα 6 στελέχη μετά από επώαση σε αρχική τιμή pH 6 από ότι σε pH 5 (Εικόνα 11, 3). Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών με τη θερμοκρασία επώασης, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης log (CFU/ mL) ήταν υψηλότερες για όλα τα στελέχη έπειτα από επώαση στους 30 °C από ότι στους 20 και 37 °C (Εικόνα 11, 2). Τέλος, η αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους με τον χρόνο επώασης οδήγησε σε μέσες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης υψηλότερες και για τα 6 στελέχη μετά από επώαση σε χρόνο 21h από ότι σε 12h.

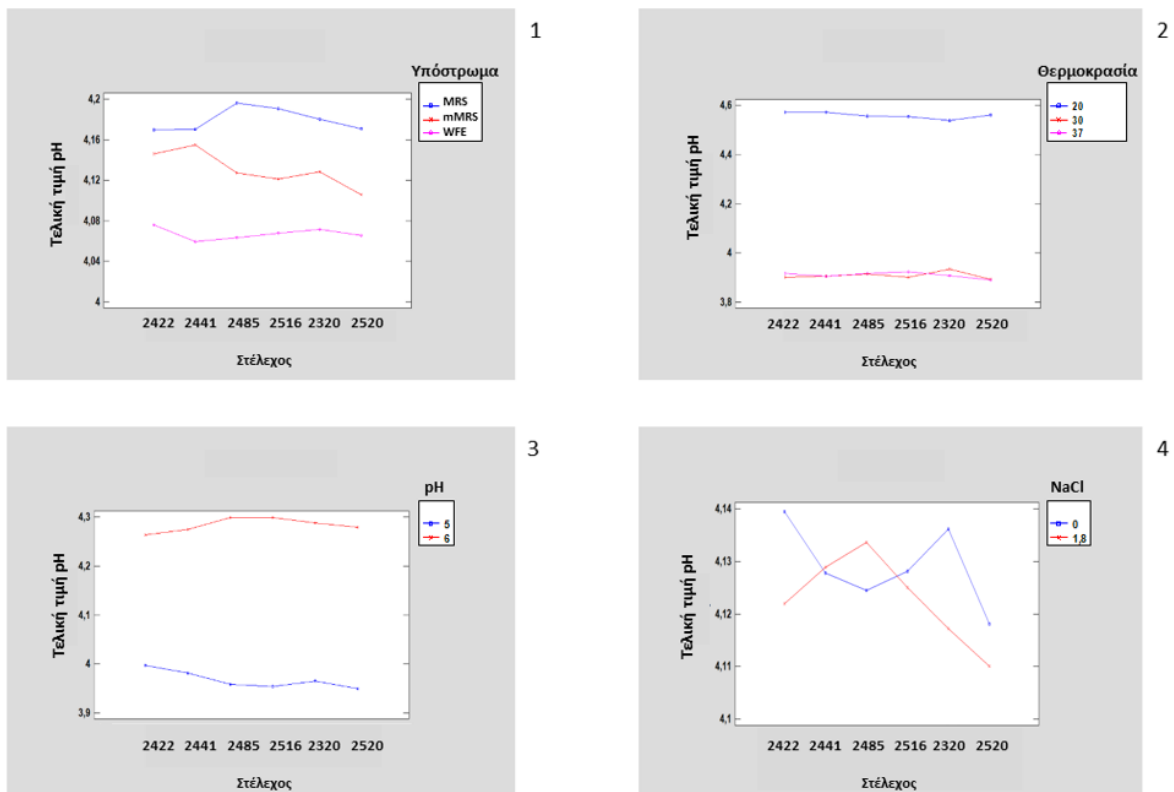




**Εικόνα 11:** Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν το μέσο πληθυσμό που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων. 1) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό,  $\log$  (CFU/ mL), η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στο μέσο πληθυσμό, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl.

Σχετικά με την επίδραση των παραμέτρων στην τελική τιμή pH, η θερμοκρασία επώασης, το θρεπτικό υπόστρωμα, ο χρόνος επώασης και η αρχική τιμή pH επηρέασαν σημαντικά την τελική τιμή pH ( $p < 0,05$ ). Αντιθέτως, το βακτηριακό στέλεχος και το NaCl χαρακτηρίστηκαν ως μη σημαντικοί παράγοντες. Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους με τη θερμοκρασία επώασης, οι μέσες τελικές τιμές pH στους 30 και 37°C ήταν παραπλήσιες και διέφεραν από τις μέσες τιμές στους 20°C και για τα 6 στελέχη (Πίνακας Σ6). Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του βακτηριακού στελέχους με το θρεπτικό υπόστρωμα, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τελικές τιμές pH των 6 στελεχών σε υπόστρωμα MRS ήταν υψηλότερες από ότι σε υπόστρωμα mMRS και WFE. Η αλληλεπίδραση του βακτηριακού στελέχους με την αρχική τιμή pH οδήγησε σε μέσες τελικές τιμές pH υψηλότερες και για τα 6 στελέχη μετά από επώαση

σε αρχική τιμή pH 6 από ότι σε pH 5 (Εικόνα 12, 3). Τέλος, όσον αφορά την επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προέκυψε από την αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών και του χρόνου επώασης, παρατηρήθηκε ότι οι μέσες τελικές τιμές pH και για τα 6 στελέχη σε χρόνο επώασης 12h διέφεραν από τις τιμές για 21h.



**Εικόνα 12:** Διαγράμματα αλληλεπίδρασης που απεικονίζουν τη μέση τελική τιμή pH που προκύπτει από το συνδυασμό δύο παραμέτρων. 1) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τα θρεπτικά υποστρώματα. 2) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με τη θερμοκρασία. 3) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με την αρχική τιμή pH. 4) Η επίδραση στη μέση τελική τιμή pH, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση των στελεχών με το NaCl.

## 4 Συζήτηση

Η ζύμωση μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της διάρκειας ζωής και της μικροβιακής ασφάλειας των τροφίμων. Οι καταναλωτές έχουν γίνει πιο απαιτητικοί όσον αφορά την

ποιότητα των τροφίμων. Το γεγονός αυτό, που συνδέεται με την αυξανόμενη τάση για τρόφιμα, με την ελάχιστη ποσότητα χημικών πρόσθετων, έχει ενθαρρύνει την αναζήτηση αποτελεσματικών φυσικών συντηρητικών, μεταξύ των οποίων, οι αντιμικροβιακές ενώσεις όπως για παράδειγμα οι βακτηριοσίνες (Divya και συν., 2012; Castro και συν., 2011). Πολλές βακτηριοσίνες που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια όπως το *L. plantarum* συμβάλλουν όχι μόνο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων, αλλά παίζουν ουσιαστικό ρόλο και στη βιοσυντήρηση τους (Todorov, 2009).

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή των προζυμιών, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης, το θρεπτικό υπόστρωμα, οι διαφορετικές περιεκτικότητες σε NaCl και οι αρχικές τιμές pH, στην ενεργότητα των πλανταρισινών, στον πληθυσμό και στη μείωση της τιμής του pH των 6 στελεχών του είδους *Lp. plantarum*.

Τα στελέχη του είδους *Lp. plantarum* που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν τα LQC 2320, 2422, 2441, 2485 2516, και 2520 τα οποία προηγουμένως χαρακτηρίστηκαν από τη δυνατότητα παρεμπόδισης ανάπτυξης μίγματος 5 στελεχών *L. monocytogenes*, ορότυπου 4b (Andritsos και συν., 2013). Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες όσον αφορά στην ενεργότητα πλανταρισίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητα πλανταρισίνης, από ότι για τα στελέχη LQC 2320 και 2520, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Επομένως, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα πλανταρισίνης εξαρτάται από το στέλεχος. Κάτι τέτοιο έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτη των Delgado και συν., (2005). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι τα στελέχη που εμφανίζουν δραστηριότητα βακτηριοσίνης υπό εργαστηριακές συνθήκες δεν έχουν απαραίτητα καλή απόδοση όταν εφαρμόζονται σε ένα τρόφιμο υπό συνθήκες ζύμωσης (Mullen & Stiles, 1996).

Η θερμοκρασία φαίνεται πώς επηρεάζει την μικροβιακή ανάπτυξη και την παραγωγή βακτηριοσίνης (Yang και συν., 2018). Στην παρούσα μελέτη οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν οι 20, 30 και 37 °C. Σύμφωνα με τους Gautam και Sharma, (2009) το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για την παραγωγή βακτηριοσίνης είναι μεταξύ 30 °C και 37 °C για τα περισσότερα από τα στελέχη *Lactobacillus*. Επιπλέον, η προετοιμασία προζυμιών που ανήκουν στο τύπο I πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20-30°C (Stolz, 1999). Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρατηρούμε ότι καταγράφηκαν υψηλότερα

επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε θερμοκρασίες 30 και 37 °C σε σύγκριση με τις τιμές σε θερμοκρασία επώασης 20 °C οι οποίες κυμαίνονταν σε χαμηλότερα επίπεδα. Υπάρχουν περιπτώσεις καλύτερης παραγωγής βακτηριοσίνης σε θερμοκρασίες κοντά στη βέλτιστη για ανάπτυξη (Drosinos και συν., 2008). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η καλή κυτταρική ανάπτυξη συχνά οδηγεί σε καλή παραγωγή βακτηριοσίνης. Ωστόσο, η βέλτιστη κυτταρική ανάπτυξη δεν οδηγεί πάντα σε υψηλή παραγωγή βακτηριοσίνης (Zhou και συν., 2015). Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρατηρούμε ότι καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας πλανταρισίνης μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε θερμοκρασίες 30 και 37 °C σε σύγκριση με τις τιμές σε θερμοκρασία επώασης 20 °C οι οποίες κυμαίνονταν σε χαμηλότερα επίπεδα. Σύμφωνα με τους Yang και συν., 2018 η θερμοκρασία 37 °C είναι η βέλτιστη ώστε τα γαλακτικά βακτήρια *Lp. plantarum* να παράγουν τα υψηλότερα επίπεδα βακτηριοσίνης. Η θερμοκρασία επώασης για την παραγωγή υψηλών επιπέδων βακτηριοσίνης ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος. Η παραγωγή βακτηριοσίνης φαίνεται να μην επηρεάστηκε από την θερμοκρασία επώασης για τα στελέχη LQC 2320 και 2520.

Η αρχική τιμή pH φαίνεται πως αποτελεί σημαντικό παράγοντα επίδρασης στην παραγωγή βακτηριοσίνης. Στην ζύμωση με προζύμι, το αρχικό pH είναι συνήθως μεταξύ 5-6,2 ενώ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης φτάνει περίπου το 3,5 με 4,2 (Corsetti και συν., 2001). Επιπλέον, η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριοσίνης επιτυγχάνεται σε pH εντός του εύρους 5,5-6,0 (Drosinos και συν., 2008). Επομένως, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθεί η επίδραση των αρχικών τιμών pH 6 και 5 στην παραγωγή βακτηριοσίνης. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε υπόστρωμα MRS broth και mMRS broth, σε pH 6, καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα πλανταρισίνης από ότι μετά από επώαση στα ίδια υποστρώματα σε pH 5. Τα επίπεδα πλανταρισίνης που καταγράφηκαν ήταν παρόμοια με εκείνα που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με Lim, (2010) η παραγωγή βακτηριοσίνης του *L. plantarum* ήταν μέγιστη σε αρχικό pH 6, ενώ παρατηρήθηκε μείωση παραγωγής σε pH 5 ή 8, και καμία δραστηριότητα βακτηριοσίνης δεν μπορούσε να ανιχνευθεί σε pH 4 ή 9. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Todorov και συν. 2000 μέγιστη παραγωγή της πλανταρισίνης ST31 παρατηρήθηκε σε pH 6. Για τα στελέχη LQC 2320 και 2520 φάνηκε πως η αρχική τιμή pH δεν επηρέασε την παραγωγή βακτηριοσίνης.

Η παραγωγή βακτηριοσίνης φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το θρεπτικό υπόστρωμα (Gänzle και συν. 1999). Επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν τα υποστρώματα MRS broth, mMRS broth και WFE. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι σε υπόστρωμα MRS broth και mMRS broth καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης σε σύγκριση με το υπόστρωμα WFE για όλα τα στελέχη. Επιπλέον, μετά από επώαση των στελεχών LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε υπόστρωμα mMRS broth και MRS broth καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης από το υπόστρωμα WFE. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι το υπόστρωμα MRS είναι καλύτερο μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων και την παραγωγή βακτηριοσίνης (Todorov και Dicks 2006). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι συνθήκες που ευνοούν την κυτταρική ανάπτυξη θα βελτιωθούν πιθανώς και την παραγωγή βακτηριοσίνης. Επιπλέον ο τύπος και το επίπεδο των σακχάρων (π.χ. γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, κ.λπ.) που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα επηρεάζουν ουσιαστικά τη παραγωγή βακτηριοσίνης (Drosinos και συν., 2008). Ακόμη, είναι γνωστό ότι η κυτταρική ανάπτυξη του *Lactobacillus* επηρεάζεται άμεσα από της σύνθεσης του μέσου, μεταξύ άλλων παραγόντων. Δεδομένου ότι τα γαλακτικά βακτήρια είναι αρκετά απαιτητικά στις διατροφικές απαιτήσεις, ένα πλούσιο μέσο είναι εξαιρετικά απαραίτητο για τη καλή μικροβιακή ανάπτυξη (Brinques και συν., 2010). Σύμφωνα με τους M.C. Audisio και συν. 2001 υπήρχε υψηλή παραγωγή βακτηριοσίνης παρουσία φρουκτόζης και σακχαρόζης. Επομένως, ο τύπος και η ποσότητα της πηγής άνθρακα μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή βακτηριοσίνης.

Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης σε αλάτι στην παραγωγή βακτηριοσίνης και στην ανάπτυξη των στελεχών *L. plantarum*. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν οι 0% και 1.8%. Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορετικές συγκεντρώσεις σε αλάτι φαίνεται ότι δεν επηρέασαν την παραγωγή βακτηριοσίνης και την μικροβιακή ανάπτυξη των 6 βακτηριακών στελεχών. Σύμφωνα με Drosinos και συν., 2005, η παραγωγή βακτηριοσίνης μειώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης σε αλάτι από 2.5% σε 4.0%. Οι υψηλότερες τιμές παραγωγής βακτηριοσίνης παρατηρήθηκαν σε συγκέντρωση 2.5% οι οποίες δεν διέφεραν με τις τιμές στη συγκέντρωση 0%. Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται ότι η επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην παραγωγή βακτηριοσίνης εξαρτάται από το στέλεχος (Delgado και συν., 2007). Επιπλέον η επίδραση της συγκέντρωσης αλατιού στην παραγωγή βακτηριοσινών που παράγονται από γαλακτικά βακτήρια έχει αναφερθεί ότι μπορεί να είναι ευεργετική ή επιβλαβής. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση

NaCl δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή βακτηριοσίνης. (Aasen και συν., 2000; Nilsen και συν., 1998).

Τέλος, όσον αφορά τον χρόνο επώασης, στη παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι 12 και 21h. Μετά από επώαση των LQC 2422, 2441, 2485 και 2516 σε χρόνο 21h καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης από ότι σε 12h. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές μικροβιακής ανάπτυξης για τα συγκεκριμένα στελέχη μετά από επώαση 21h από ότι σε 12h. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η μέγιστη παραγωγή βακτηριοσίνης και η μέγιστη μικροβιακή ανάπτυξη καταγράφηκαν στο ίδιο χρονικό σημείο (Anastasiadou και συν. 2008).

## 5 Συμπεράσματα

Στις μέρες μας, όλο και περισσότεροι οι καταναλωτές τείνουν να αναζητούν φρέσκα και φυσικά προϊόντα, αποφεύγοντας τα επεξεργασμένα που περιέχουν χημικά πρόσθετα. Οι βακτηριοσίνες από γαλακτικά βακτήρια αυτή τη στιγμή τυγχάνουν μεγάλης προσοχής λόγω της πιθανής χρήσης τους ως φυσικά συντηρητικά σε τρόφιμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση παραμέτρων που σχετίζονται με την παρασκευή προζυμιού στην ενεργότητα πλανταρισίνης, στην ανάπτυξη και την τελική τιμή pH των 6 στελεχών του είδους *Lp. plantarum*. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν το θρεπτικό υπόστρωμα, η θερμοκρασία επώασης, η αρχική τιμή pH, η συγκέντρωση NaCl και ο χρόνος επώασης. Για πρώτη φορά χρησιμοποιείται ένα υδατικό εκχύλισμα αλεύρου σίτου ως μέσο ανάπτυξης στελεχών του είδους *Lp. plantarum*. Επιπλέον, είναι η πρώτη μελέτη στην οποία αξιολογείται η δυνατότητα παραγωγής πλανταρισινών σε υδατικό εκχύλισμα αλεύρου σίτου, χρησιμοποιώντας δε ως δείκτη μίγμα στελεχών του είδους *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα της μελέτης επέδειξαν έναν εξαρτώμενο από το στέλεχος τρόπο δράσης των πλανταρισινών. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα, η θερμοκρασία, η αρχική τιμή pH, ο χρόνος επώασης και τα βακτηριακά στελέχη είχαν σημαντική επίδραση στην ενεργότητα πλανταρισίνης, με το NaCl να χαρακτηρίζεται ως μη σημαντική παράμετρος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των στελεχών σε υδατικό εκχύλισμα αλεύρου σίτου οδήγησε σε αρκετά χαμηλότερες τιμές ενεργότητας πλανταρισίνης, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέσα.

## 6 Βιβλιογραφία

### 6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Aasen, I., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., Storrø, I., (2000), Influence of complex 304 nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* 305 CCUG 42687, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159-166.

Aasen, I.M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L., Storro, I., (2000), Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocins production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 53 159–166.

Akcelik, M., (2000), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı*, Ankara, Sim Matbaacılık, 357-363.

Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Settanni, L., (2013), Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours, *Food Microbiol*, 36, 343–354.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P., (2008), Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99, 5384–5390.

Andritsos, N., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., (2013), Quantifying *Listeria monocytogenes* prevalence and concentration in minced pork meat and estimating performance of three culture media from presence/absence microbiological testing using a deterministic and stochastic approach, *Food Microbiol*, 36, 395–405.

Audisto, M.C., Oliver, G., Apella, M.C., (2001), Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*, *Int J Food Microbiol*, 63(3):235–241.

Axelsson, L., (2004), *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Revised and Expanded*. Eds: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, 3rd ed. New York, Basel: Marcel Dekker, 20-87.

- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W. P., (1995), Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des sauerteigtypischen Stamme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. Getreide Mehl und Brot, 49, 370–374.
- Brinques, G. B., Peralba, M. C., & Ayub, M. A. Z., (2010), Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37, 205–212.
- Brummer, J.M., Lorenz, K., (1991), European developments in wheat sourdoughs, Cereal Food World, 36:310–14.
- 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.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., & Campo, C. A., (2011), Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production, Meat Science, 87, 321–329.
- Cintas, L., Casaus, P., Fernández, M. & Hernández, P., (1998), Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Food Microbiology, 15, 289-298
- Collins, B., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross R. P. Applications of lactic acid bacteriaproduced bacteriocins. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. 2010 (pp.89-110).
- Comasio, A., Verce, M., Van Kerrebroeck, S., & De Vuyst, L., (2020), Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins, Frontiers in Microbiology, 11.
- Corsetti, A and Settanni, L., (2007), *Lactobacilli* in sourdough fermentation. Food research international, 40(5), 539-558.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J., (2000), Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling, J Agric Food Chem, 48:3044–3051.



- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. & Gobbetti, M., (2001), Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95-104.
- Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C., (2012), Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105.
- De Vuyst, L and Vandamme, E. J., (1994), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications*, London: Blackie Academic and Professional.
- De Vuyst, L. and Neysens, P., (2005), The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 43-56.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., Crabbe, K., (1996), Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142, 817–827.
- De Vuyst, L., Harth, H., van Kerrebroeck, S., Leroy, F., (2016), Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities, *Int. J. Food Microbiol*, 239, 26– 34.
- De Vuyst, L., Leroy, F., (2007), Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 13, 194–199.
- 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(7), 666-675.
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Arroyo-Lopez, F.N., Garrido-Fernandez, A., (2005), Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol*, 22, 521–528.
- Delgado, A., Lopez, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., & Garrido-Fernandez, A., (2007), Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of

NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130, 193e201.

Divya, B. J., Kulangara Varsha, K., Madhavan Nampoothiri, K., Ismail, B. & Pandey, A., (2012), Probiotic fermented foods for health benefits. *Engineering in Life Sciences*, 12, 377-390.

Drosinos, E. H., Mataragas, M., Paramithiotis, S., (2008), Antimicrobial Activity of Bacteriocins and Their Applications, In: Toldra F. (eds) *Meat Biotechnology*. Springer, Valencia, p 375-397.

Drosinos, E.H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., Metaxopoulos, J., (2005), Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *J. Appl. Microbiol*, 99, 1314–1323.

El Sheikha, A. F., (2015), Bread: Between the heritage of past and the technology of present. *Bread and its fortification: Nutrition and health benefits, food biology series*, eds. CM Rosell, J. Bajerska, and AF El Sheikha, 1-25.

Ganzle, G. M., Hammes, W. P., Brandt, J.M., (2004), Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur. Food Res Technol*, 218: 333-338.

Gänzle, M. G., Weber, S. & Hammes, W. P., (1999), Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins, *International Journal of Food Microbiology*, 46, 207-217.

Gautam, N., Sharma, N., (2009), Bacteriocin: Safest approach to preserve food products, *Ind J of Microbiol* 49, 423 204–211.

Gerez, C. L., Font De Valdez, G. & Rollán, G., (2008), Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments, *Letters in Applied Microbiology*, 47, 427-432.

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.

- 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.
- Hammes W.P., Stolz P., Ganzle M.G., (1996), Metabolism of *lactobacilli* in traditional sourdough. *Advances in Food Science*, 18, 176-184.
- Hammes, W. P and Gänzle, M. G., (1998), Sourdough breads and related products. In B. J. B. Woods, *Microbiology of Fermented Foods*, 199–216.
- Hansen, A., Schieberle, P., (2005), Generation of aroma compounds during sourdough 741 fermentation: applied and fundamental aspects, *Trends in Food Science and Technology*, 742 16(1-3), 85–94.
- Hill, C., O’Keeffe, T., Ross, P., (2002), *Bacteriocins*, Elsevier Science, pp. 128-135.
- Himelbloom, B., Nilsson, L., Gram, L., (2001), Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by *Carnobacterium piscicola* strain A9b in laboratory media and model fish systems. *J. Appl. Microbiol*, 91, 506–513.
- Holzapel, W. H. & Wood, B. J., (2014), *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, John Wiley & Sons.
- 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.
- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S., Comi, G., (2009), Description of the microflora of sourdoughs by culture dependent and culture-independent methods, *Food Microbiol*, 26, 128–135.
- L homme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno B., Gobbetti, M., (2015), Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol*, 215, 161–170.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M., (2000), Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4084-4090.

- Leal-Sanchez, M.V., Jimenez-Diaz, R., Maldonado-Barragan, A., Garrido-Fernandez, A., Ruiz-Barba, J.L., (2002), Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 4465–4471.
- Leroy, F. & De Vuyst, L., (1999), Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 974–981.
- Lim, S. M., (2010), Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21, *Food Sci. Biotechnol*, 19:793–802.
- Mangalassary, S., Han, I., Rieck, J., Acton, J., Jiang, X., Sheldon, B., Dawson, P., (2008), Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna. *J. Food Protect*, 70, 2503–2511.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Metaxopoulos, J., (2003a), Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiology*, 20, 259–265.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H., (2003b), Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci*, 64, 265–271.
- McMullen, L. M., & Stiles, M. E. (1996). Potential use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection*, 58, 64–71.
- Messens, W., Neysens, P., Vansieleghe, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L., (2002), Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Appl. Environ. Microbiol*. 68, 1431–1435.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M., (2012), Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Appl. Environ. Microbiol*. 78, 1251–1264.
- Mokoena, M.P., (2017), Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22, 1255.

- 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.
- Müller, M. R., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F., (2001), Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiology*, 18, 217-227.
- Nettles, C.G and Barefoot, S.F., (1993), Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338-356.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., (1998), An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J Bacteriol.*180: 1848±1854.
- Ottogalli, G., Galli, A. & Foschino, R., (1996), Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Advances in Food Sciences*, 18, 131-144.
- Ouwehand, A. C and 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.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R., (2007), Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521–542
- Paramithiotis, S and Drosinos, E. H., (2017), The Sourdough Micro-ecosystem An Update. In *Fermented Foods. Part II* (pp. 263-283). CRC Press.
- Paramithiotis, S., (2001), Study on the symbiosis of wild yeasts and lactic acid bacteria in sourdough. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Athens, Athens, Greece.
- Paramithiotis, S., Müller, M. R., Ehrmann, M. A., Tsakalidou, E., Seiler, H., Vogel, R., & Kalantzopoulos, G., (2000), Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Systematic and applied microbiology*. 23(1), 156-164.
- Paramithiotis, S., Papadelli, M., Pardali, E., Mataragas, M., Drosinos, E.H., (2019), Evaluation of plantaricin genes expression during fermentation of *Raphanus sativus* roots with a

plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* starter. *Curr. Microbiol.* 76, 909– 916.

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.

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.

Reale, A., Di Renzo, T., Boscaino, F., Nazzaro, F., Fratianni, F., Aponte, M., (2019), Lactic acid bacteria biota and aroma profile of Italian traditional sourdoughs from the Irpinian area in Italy. *Front. Microbiol.* 10, 1621.

Robert, H., Gabriel, V., Fontagné-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.

Salovaara, H., (1988). Lactic acid bacteria in cereal-based products. In S. Salminen, & A. von Wright, *Lactic acid bacteria— Microbiology and functional aspects.* 115–137.

Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., (2008), Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2414–2423.

Schlech, W.F., III, Acheson, D., (2000), Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31, 770–775.

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(2), 1569-1578.

Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczyński, N., Spier, M. R., (2018), Overview of sourdough technology: From production to marketing. *Food and bioprocess technology.* 11(2), 242-270.

Şimşek, Ö., Çon, A. H. & Tulumog˘lu, Ş., (2006), Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control.* 17, 263- 270.

Śliżewska, K., Chlebicz-Wójcik, A., (2020), Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology* 9, 423.

- Spicher, G., (1999), Zur Geschichte des Sauerteiges. In G. Spicher, & H. Stephan (Eds.), Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie. 3–7.
- Stolz, P., (1999), Mikrobiologie des Sauerteiges. In G. Spicher, & H. Stephan (Eds.), Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie 5th ed. 35–60.
- Syrokou, M.K., Stasinopoulou, P., Paramithiotis, S., Bosnea, L., Mataragas, Papadopoulos, G.K., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., (2021), The Effect of Incubation Temperature, Substrate and Initial pH Value on Plantaricin Activity and the Relative Transcription of pln Genes of Six Sourdough Derived *Lactiplantibacillus plantarum* Strains. *Fermentation*. 7, 320.
- 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.
- Todorov, S., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B., Ivanova, I., (2000), Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 14 50–55.
- Todorov, S.D., (2008), Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria sp.* *Braz. J. Microbiol.* 39, 178–187.
- Todorov, S.D., (2009), Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*-Production, genetic organization and mode of action. *Braz. J. Microbiol.* 40, 209–221.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., (2005), *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzym. Microb. Technol.* 36, 318–326.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., (2006a), Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiol Res*, 161:102–108.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., (2006b), Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia* 61, 269–274.

Todorov, S.D., Holzapfel, W., Nero, L.A., (2016), Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. *Ann. Microbiol.* 66, 949–962.

Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G., Franco, B.D.G.M., (2011), Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)—From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.* 44, 1351–1363.

Verluyten, J., Meissen, W., De Vuyst, L., (2004), Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2271–2278.

Vogel, R. F., Knorr, R., Müller, M. R. A., Stendel, U., Gänzle, M. G., Ehmann, M.A., (1999), Non-dairy lactic fermentation: The cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* 76, 403–411.

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Walker, B., (2018), Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria, *AMB Express* 8 (10).

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Walker, B., (2018), Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express* 8, 10.

Zeuthen, P. & Bøgh-Sørensen, L., (2003), *Food preservation techniques*, Elsevier. Cambridge, England.

Zhou, K., Zeng, Y.T., Han, X.F., Liu, S.L., (2015), Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* BC-25 in response to temperature and pH in batch fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 176(6):1627–1637.

## 6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

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



## Παράρτημα Ι

Πίνακας Σ1: Ανάλυση Διακύμανσης για την ενεργότητα πλανταρισίνης (AU/mL).

| Πηγή        | Άθροισμα τετραγώνων | Df | Μέσο τετράγωνο | F-Ratio | P-Value |
|-------------|---------------------|----|----------------|---------|---------|
| NaCl        | 7585,19             | 1  | 7585,19        | 0,13    | 0,7174  |
| pH          | 1,25957E7           | 1  | 1,25957E7      | 217,59  | 0,0000  |
| Στέλεχος    | 1,34764E8           | 5  | 2,69527E7      | 465,60  | 0,0000  |
| Υπόστρωμα   | 5,95586E7           | 2  | 2,97793E7      | 514,43  | 0,0000  |
| Θερμοκρασία | 2,69208E7           | 2  | 1,34604E7      | 232,53  | 0,0000  |
| Χρόνος      | 3,77003E7           | 1  | 3,77003E7      | 651,26  | 0,0000  |

Πίνακας Σ2: Μέση τιμή ενεργότητας πλανταρισίνης (AU/ mL), με διαστήματα εμπιστοσύνης 95,0%. Οι μέσες τιμές ελήφθησαν από τις αλληλεπιδράσεις σε ζεύγη των παραμέτρων που σχετίζονται με τη παρασκευή προζυμίου. Οι παράμετροι είναι: 6 στελέχη *Lp. plantarum* (LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520), τρεις θερμοκρασίες επώασης (20, 30, 37 °C), τρία υποστρώματα (MRS broth, mMRS broth, WFE) και δύο αρχικές τιμές pH (5, 6) σε δύο χρόνους επώασης (12 και 21h).

| Επίπεδο                      | Μέση τιμή | Τυπικό Σφάλμα | Κατώτερο όριο | Ανώτερο όριο |
|------------------------------|-----------|---------------|---------------|--------------|
| <b>pH με Στέλεχος</b>        |           |               |               |              |
| 5; LQC 2441                  | 764,444   | 28,3549       | 708,87        | 820,019      |
| 5; LQC 2422                  | 764,444   | 28,3549       | 708,87        | 820,019      |
| 5; LQC 2516                  | 764,444   | 28,3549       | 708,87        | 820,019      |
| 5; LQC 2485                  | 760,0     | 28,3549       | 704,425       | 815,575      |
| 5; LQC 2320                  | 106,667   | 28,3549       | 51,092        | 162,241      |
| 5; LQC 2520                  | 106,667   | 28,3549       | 51,092        | 162,241      |
| 6; LQC 2441                  | 1133,33   | 28,3549       | 1077,76       | 1188,91      |
| 6; LQC 2422                  | 1120,0    | 28,3549       | 1064,43       | 1175,57      |
| 6; LQC 2516                  | 1124,44   | 28,3549       | 1068,87       | 1180,02      |
| 6; LQC 2485                  | 1124,44   | 28,3549       | 1068,87       | 1180,02      |
| 6; LQC 2320                  | 106,667   | 28,3549       | 51,092        | 162,241      |
| 6; LQC 2520                  | 106,667   | 28,3549       | 51,092        | 162,241      |
| <b>Στέλεχος με Υπόστρωμα</b> |           |               |               |              |
| LQC 2441; MRS broth          | 1120,0    | 34,7275       | 1051,94       | 1188,06      |
| LQC 2441; mMRS broth         | 1313,33   | 34,7275       | 1245,27       | 1381,4       |
| LQC 2441; WFE                | 413,333   | 34,7275       | 345,269       | 481,398      |
| LQC 2422; MRS broth          | 1106,67   | 34,7275       | 1038,6        | 1174,73      |
| LQC 2422; mMRS broth         | 1306,67   | 34,7275       | 1238,6        | 1374,73      |
| LQC 2422; WFE                | 413,333   | 34,7275       | 345,269       | 481,398      |
| LQC 2516; MRS broth          | 1106,67   | 34,7275       | 1038,6        | 1174,73      |
| LQC 2516; mMRS broth         | 1313,33   | 34,7275       | 1245,27       | 1381,4       |
| LQC 2516; WFE                | 413,333   | 34,7275       | 345,269       | 481,398      |
| LQC 2485; MRS broth          | 1100,0    | 34,7275       | 1031,94       | 1168,06      |
| LQC 2485; mMRS broth         | 1313,33   | 34,7275       | 1245,27       | 1381,4       |
| LQC 2485; WFE                | 413,333   | 34,7275       | 345,269       | 481,398      |
| LQC 2320; MRS broth          | 120,0     | 34,7275       | 51,9353       | 188,065      |

|                                 |         |         |         |         |
|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>LQC 2320; mMRS broth</b>     | 120,0   | 34,7275 | 51,9353 | 188,065 |
| <b>LQC 2320; WFE</b>            | 80,0    | 34,7275 | 11,9353 | 148,065 |
| <b>LQC 2520; MRS broth</b>      | 120,0   | 34,7275 | 51,9353 | 188,065 |
| <b>LQC 2520; mMRS broth</b>     | 120,0   | 34,7275 | 51,9353 | 188,065 |
| <b>LQC 2520; WFE</b>            | 80,0    | 34,7275 | 11,9353 | 148,065 |
| <b>Στέλεχος με Θερμοκρασία</b>  |         |         |         |         |
| <b>LQC 2441;20</b>              | 580,0   | 34,7275 | 511,935 | 648,065 |
| <b>LQC 2441;30</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2441;37</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2422;20</b>              | 560,0   | 34,7275 | 491,935 | 628,065 |
| <b>LQC 2422;30</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2422;37</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2516;20</b>              | 566,667 | 34,7275 | 498,602 | 634,731 |
| <b>LQC 2516;30</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2516;37</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2485;20</b>              | 573,333 | 34,7275 | 505,269 | 641,398 |
| <b>LQC 2485;30</b>              | 1120,0  | 34,7275 | 1051,94 | 1188,06 |
| <b>LQC 2485;37</b>              | 1133,33 | 34,7275 | 1065,27 | 1201,4  |
| <b>LQC 2320;20</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>LQC 2320;30</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>LQC 2320;37</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>LQC 2520;20</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>LQC 2520;30</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>LQC 2520;37</b>              | 106,667 | 34,7275 | 38,6019 | 174,731 |
| <b>Υπόστρωμα με Θερμοκρασία</b> |         |         |         |         |
| <b>MRS broth;20</b>             | 530,0   | 24,556  | 481,871 | 578,129 |
| <b>MRS broth;30</b>             | 913,333 | 24,556  | 865,204 | 961,462 |
| <b>MRS broth;37</b>             | 893,333 | 24,556  | 845,204 | 941,462 |
| <b>mMRS broth;20</b>            | 530,0   | 24,556  | 481,871 | 578,129 |
| <b>mMRS broth;30</b>            | 1106,67 | 24,556  | 1058,54 | 1154,8  |
| <b>mMRS broth;37</b>            | 1106,67 | 24,556  | 1058,54 | 1154,8  |
| <b>WFE;20</b>                   | 186,667 | 24,556  | 138,538 | 234,796 |
| <b>WFE;30</b>                   | 346,667 | 24,556  | 298,538 | 394,796 |
| <b>WFE;37</b>                   | 373,333 | 24,556  | 325,204 | 421,462 |
| <b>Στέλεχος με Χρόνο</b>        |         |         |         |         |
| <b>LQC 2441;12</b>              | 653,333 | 28,3549 | 597,759 | 708,908 |
| <b>LQC 2441;21</b>              | 1244,44 | 28,3549 | 1188,87 | 1300,02 |
| <b>LQC 2422; 12</b>             | 640,0   | 28,3549 | 584,425 | 695,575 |
| <b>LQC 2422; 21</b>             | 1244,44 | 28,3549 | 1188,87 | 1300,02 |
| <b>LQC 2516; 12</b>             | 644,444 | 28,3549 | 588,87  | 700,019 |
| <b>LQC 2516; 21</b>             | 1244,44 | 28,3549 | 1188,87 | 1300,02 |
| <b>LQC 2485; 12</b>             | 640,0   | 28,3549 | 584,425 | 695,575 |
| <b>LQC 2485; 21</b>             | 1244,44 | 28,3549 | 1188,87 | 1300,02 |
| <b>LQC 2320; 12</b>             | 80,0    | 28,3549 | 24,4254 | 135,575 |
| <b>LQC 2320; 21</b>             | 133,333 | 28,3549 | 77,7587 | 188,908 |
| <b>LQC 2520; 12</b>             | 80,0    | 28,3549 | 24,4254 | 135,575 |
| <b>LQC 2520; 21</b>             | 133,333 | 28,3549 | 77,7587 | 188,908 |

**Πίνακας Σ3:** Ανάλυση Διακύμανσης για τη μικροβιακή ανάπτυξη (log CFU/ mL).

| Πηγή        | Άθροισμα τετραγώνων | Df | Μέσο τετράγωνο | F-Ratio | P-Value |
|-------------|---------------------|----|----------------|---------|---------|
| NaCl        | 0,00166667          | 1  | 0,00166667     | 0,06    | 0,8052  |
| pH          | 16,5668             | 1  | 16,5668        | 604,45  | 0,0000  |
| Στέλεχος    | 0,203568            | 5  | 0,0407135      | 1,49    | 0,1921  |
| Υπόστρωμα   | 65,2847             | 2  | 32,6424        | 1190,97 | 0,0000  |
| Θερμοκρασία | 24,3975             | 2  | 12,1988        | 445,08  | 0,0000  |
| Χρόνος      | 25,0104             | 1  | 25,0104        | 912,52  | 0,0000  |

**Πίνακας Σ4:** Μέση τιμή μικροβιακής ανάπτυξης (log CFU/ mL) με διαστήματα εμπιστοσύνης 95,0%. Οι μέσες τιμές ελήφθησαν από τις αλληλεπιδράσεις σε ζεύγη των παραμέτρων που σχετίζονται με τη παρασκευή προζυμιού. Οι παράμετροι είναι: 6 στελέχη *Lp. plantarum* (LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520), τρεις θερμοκρασίες επώασης (20, 30, 37 °C), τρία υποστρώματα (MRS broth, mMRS broth, WFE) και δύο αρχικές τιμές pH (5, 6) σε δύο χρόνους επώασης (12 και 21h).

| Επίπεδο                         | Μέση τιμή | Τυπικό Σφάλμα | Κατώτερο όριο | Ανώτερο όριο |
|---------------------------------|-----------|---------------|---------------|--------------|
| <b>pH με Υπόστρωμα</b>          |           |               |               |              |
| 5; MRS broth                    | 8,71944   | 0,0137962     | 8,6924        | 8,74648      |
| 5; mMRS broth                   | 9,19153   | 0,0137962     | 9,16449       | 9,21857      |
| 5; WFE                          | 8,41847   | 0,0137962     | 8,39143       | 8,44551      |
| 6; MRS broth                    | 9,23681   | 0,0137962     | 9,20977       | 9,26385      |
| 6; mMRS broth                   | 9,23958   | 0,0137962     | 9,21254       | 9,26662      |
| 6; WFE                          | 8,68389   | 0,0137962     | 8,65685       | 8,71093      |
| <b>pH με Θερμοκρασία</b>        |           |               |               |              |
| 5;20                            | 8,54528   | 0,0137962     | 8,51824       | 8,57232      |
| 5;30                            | 8,92764   | 0,0137962     | 8,9006        | 8,95468      |
| 5;37                            | 8,85653   | 0,0137962     | 8,82949       | 8,88357      |
| 6;20                            | 8,82931   | 0,0137962     | 8,80227       | 8,85635      |
| 6;30                            | 9,24799   | 0,0137962     | 9,22095       | 9,27503      |
| 6;37                            | 9,08299   | 0,0137962     | 9,05595       | 9,11003      |
| <b>Υπόστρωμα με Θερμοκρασία</b> |           |               |               |              |
| MRS broth;20                    | 8,69812   | 0,0168968     | 8,66501       | 8,73124      |
| MRS broth;30                    | 9,13635   | 0,0168968     | 9,10324       | 9,16947      |
| MRS broth;37                    | 9,0999    | 0,0168968     | 9,06678       | 9,13301      |
| mMRS broth;20                   | 9,00437   | 0,0168968     | 8,97126       | 9,03749      |
| mMRS broth;30                   | 9,49167   | 0,0168968     | 9,45855       | 9,52478      |
| mMRS broth;37                   | 9,15062   | 0,0168968     | 9,11751       | 9,18374      |
| WFE;20                          | 8,35938   | 0,0168968     | 8,32626       | 8,39249      |
| WFE;30                          | 8,63542   | 0,0168968     | 8,6023        | 8,66853      |
| WFE;37                          | 8,65875   | 0,0168968     | 8,62563       | 8,69187      |

**Πίνακας Σ5:** Ανάλυση Διακύμανσης για την τελική τιμή pH.

| Πηγή | Άθροισμα τετραγώνων | Df | Μέσο τετράγωνο | F-Ratio | P-Value |
|------|---------------------|----|----------------|---------|---------|
| NaCl | 0,00831296          | 1  | 0,00831296     | 1,71    | 0,1911  |
| pH   | 21,622              | 1  | 21,622         | 4444,56 | 0,0000  |

|                    |           |   |            |         |        |
|--------------------|-----------|---|------------|---------|--------|
| <b>Στέλεχος</b>    | 0,0260093 | 5 | 0,00520185 | 1,07    | 0,3760 |
| <b>Υπόστρωμα</b>   | 1,83251   | 2 | 0,916257   | 188,34  | 0,0000 |
| <b>Θερμοκρασία</b> | 81,0773   | 2 | 40,5386    | 8333,00 | 0,0000 |
| <b>Χρόνος</b>      | 43,2375   | 1 | 43,2375    | 8887,76 | 0,0000 |

**Πίνακας Σ6:** Μέση τελική τιμή pH, με διαστήματα εμπιστοσύνης 95,0%. Οι μέσες τιμές ελήφθησαν από τις αλληλεπιδράσεις σε ζεύγη των παραμέτρων που σχετίζονται με τη παρασκευή του προζυμιού. Οι παράμετροι είναι: 6 στελέχη *Lp. plantarum* (LQC 2441, 2422, 2516, 2485, 2320, 2520), τρεις θερμοκρασίες επώασης (20, 30, 37 °C), τρία υποστρώματα (MRS broth, mMRS broth, WFE) και δύο αρχικές τιμές pH (5, 6), σε δύο χρόνους επώασης (12 και 21h).

| Επίπεδο                        | Μέση τιμή | Τυπικό Σφάλμα | Κατώτερο όριο | Ανώτερο όριο |
|--------------------------------|-----------|---------------|---------------|--------------|
| <b>pH με Στέλεχος</b>          |           |               |               |              |
| <b>5; LQC 2441</b>             | 3,99722   | 0,00821992    | 3,98111       | 4,01333      |
| <b>5; LQC 2422</b>             | 3,98194   | 0,00821992    | 3,96583       | 3,99806      |
| <b>5; LQC 2516</b>             | 3,95861   | 0,00821992    | 3,9425        | 3,97472      |
| <b>5; LQC 2485</b>             | 3,95389   | 0,00821992    | 3,93778       | 3,97         |
| <b>5; LQC 2320</b>             | 3,96528   | 0,00821992    | 3,94917       | 3,98139      |
| <b>5; LQC 2520</b>             | 3,94917   | 0,00821992    | 3,93306       | 3,96528      |
| <b>6; LQC 2441</b>             | 4,26417   | 0,00821992    | 4,24806       | 4,28028      |
| <b>6; LQC 2422</b>             | 4,27472   | 0,00821992    | 4,25861       | 4,29083      |
| <b>6; LQC 2516</b>             | 4,29944   | 0,00821992    | 4,28333       | 4,31556      |
| <b>6; LQC 2485</b>             | 4,29917   | 0,00821992    | 4,28306       | 4,31528      |
| <b>6; LQC 2320</b>             | 4,28806   | 0,00821992    | 4,27194       | 4,30417      |
| <b>6; LQC 2520</b>             | 4,27889   | 0,00821992    | 4,26278       | 4,295        |
| <b>Στέλεχος με Υπόστρωμα</b>   |           |               |               |              |
| <b>LQC 2441; MRS broth</b>     | 4,17      | 0,0100673     | 4,15027       | 4,18973      |
| <b>LQC 2441; mMRS broth</b>    | 4,14625   | 0,0100673     | 4,12652       | 4,16598      |
| <b>LQC 2441; WFE</b>           | 4,07583   | 0,0100673     | 4,0561        | 4,09556      |
| <b>LQC 2422; MRS broth</b>     | 4,17042   | 0,0100673     | 4,15069       | 4,19015      |
| <b>LQC 2422; mMRS broth</b>    | 4,155     | 0,0100673     | 4,13527       | 4,17473      |
| <b>LQC 2422; WFE</b>           | 4,05958   | 0,0100673     | 4,03985       | 4,07931      |
| <b>LQC 2516; MRS broth</b>     | 4,19625   | 0,0100673     | 4,17652       | 4,21598      |
| <b>LQC 2516; mMRS broth</b>    | 4,1275    | 0,0100673     | 4,10777       | 4,14723      |
| <b>LQC 2516; WFE</b>           | 4,06333   | 0,0100673     | 4,0436        | 4,08306      |
| <b>LQC 2485; MRS broth</b>     | 4,19083   | 0,0100673     | 4,1711        | 4,21056      |
| <b>LQC 2485; mMRS broth</b>    | 4,12125   | 0,0100673     | 4,10152       | 4,14098      |
| <b>LQC 2485; WFE</b>           | 4,0675    | 0,0100673     | 4,04777       | 4,08723      |
| <b>LQC 2320; MRS broth</b>     | 4,18      | 0,0100673     | 4,16027       | 4,19973      |
| <b>LQC 2320; mMRS broth</b>    | 4,12833   | 0,0100673     | 4,1086        | 4,14806      |
| <b>LQC 2320; WFE</b>           | 4,07167   | 0,0100673     | 4,05194       | 4,0914       |
| <b>LQC 2520; MRS broth</b>     | 4,17083   | 0,0100673     | 4,1511        | 4,19056      |
| <b>LQC 2520; mMRS broth</b>    | 4,10583   | 0,0100673     | 4,0861        | 4,12556      |
| <b>LQC 2520; WFE</b>           | 4,06542   | 0,0100673     | 4,04569       | 4,08515      |
| <b>Στέλεχος με Θερμοκρασία</b> |           |               |               |              |
| <b>LQC 2441;20</b>             | 4,5725    | 0,0100673     | 4,55277       | 4,59223      |
| <b>LQC 2441;30</b>             | 3,90208   | 0,0100673     | 3,88235       | 3,92181      |
| <b>LQC 2441;37</b>             | 3,9175    | 0,0100673     | 3,89777       | 3,93723      |
| <b>LQC 2422;20</b>             | 4,57208   | 0,0100673     | 4,55235       | 4,59181      |
| <b>LQC 2422;30</b>             | 3,90625   | 0,0100673     | 3,88652       | 3,92598      |
| <b>LQC 2422;37</b>             | 3,90667   | 0,0100673     | 3,88694       | 3,9264       |
| <b>LQC 2516;20</b>             | 4,55583   | 0,0100673     | 4,5361        | 4,57556      |
| <b>LQC 2516;30</b>             | 3,91458   | 0,0100673     | 3,89485       | 3,93431      |
| <b>LQC 2516;37</b>             | 3,91667   | 0,0100673     | 3,89694       | 3,9364       |

|                                 |         |            |         |         |
|---------------------------------|---------|------------|---------|---------|
| <b>LQC 2485;20</b>              | 4,55417 | 0,0100673  | 4,53444 | 4,5739  |
| <b>LQC 2485;30</b>              | 3,90167 | 0,0100673  | 3,88194 | 3,9214  |
| <b>LQC 2485;37</b>              | 3,92375 | 0,0100673  | 3,90402 | 3,94348 |
| <b>LQC 2320;20</b>              | 4,53958 | 0,0100673  | 4,51985 | 4,55931 |
| <b>LQC 2320;30</b>              | 3,93333 | 0,0100673  | 3,9136  | 3,95306 |
| <b>LQC 2320;37</b>              | 3,90708 | 0,0100673  | 3,88735 | 3,92681 |
| <b>LQC 2520;20</b>              | 4,56042 | 0,0100673  | 4,54069 | 4,58015 |
| <b>LQC 2520;30</b>              | 3,89167 | 0,0100673  | 3,87194 | 3,9114  |
| <b>LQC 2520;37</b>              | 3,89    | 0,0100673  | 3,87027 | 3,90973 |
| <b>Υπόστρωμα με Θερμοκρασία</b> |         |            |         |         |
| <b>MRS broth;20</b>             | 4,67167 | 0,00711866 | 4,65771 | 4,68562 |
| <b>MRS broth;30</b>             | 3,92563 | 0,00711866 | 3,91167 | 3,93958 |
| <b>MRS broth;37</b>             | 3,94187 | 0,00711866 | 3,92792 | 3,95583 |
| <b>mMRS broth;20</b>            | 4,51583 | 0,00711866 | 4,50188 | 4,52979 |
| <b>mMRS broth;30</b>            | 3,94646 | 0,00711866 | 3,93251 | 3,96041 |
| <b>mMRS broth;37</b>            | 3,92979 | 0,00711866 | 3,91584 | 3,94374 |
| <b>WFE;20</b>                   | 4,48979 | 0,00711866 | 4,47584 | 4,50374 |
| <b>WFE;30</b>                   | 3,85271 | 0,00711866 | 3,83876 | 3,86666 |
| <b>WFE;37</b>                   | 3,85917 | 0,00711866 | 3,84521 | 3,87312 |