

ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

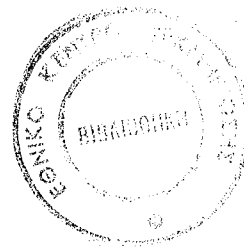


ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ  
ΚΑΙ  
ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ  
ΣΤΟ ΕΠΤΑΖΥΜΟ ΨΩΜΙ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΑΠΟ  
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ Ζ. ΚΑΤΣΑΜΠΟΞΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 1992

**ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ  
ΚΑΙ  
ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ  
ΣΤΟ ΕΠΤΑΖΥΜΟ ΨΩΜΙ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΑΠΟ  
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ Ζ. ΚΑΤΣΑΜΠΟΞΑΚΗ**

**ΑΘΗΝΑ 1992**

Αφιερώνεται  
στο  
Ζαχαρία και Αριστοτέλη

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν.5343/1932, άρθρο 202).



ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΧΩΡΙΔΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ  
ΕΠΤΑΖΥΜΟ ΨΩΜΙ:

Η έρευνα αυτή έγινε στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργ.  
Προϊόντων του ΕΒ.Ι.ΑΓ.Ε από τον Κων/νο Ζ. Κατσαμποξάκη και  
υποβλήθηκε στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την απόκτηση  
Διδακτορικού Διπλώματος.

1992 COPYRIGHT: Του συγγραφέα κ. Κων/νου Κατσαμποξάκη  
Ινστιτούτο Τεχν. Γεωργ. Προϊόντων,  
Σ. Βενιζέλου 1, 14123, Λυκόβρυση.  
Τηλέφωνα : 2816985, 2823437, 5734645

Εφιστάται η προσοχή ότι τα δικαιώματα πνευματικής  
ιδιοκτησίας αυτής της έρευνας ανήκουν στο συγγραφέα. Κανένα  
τμήμα ή μέρος αυτού του έργου δεν επιτρέπεται να  
αναδημοσιευθεί χωρίς την προηγούμενη άδεια του συγγραφέα.

Το αντίγραφο αυτό της διατριβής είναι διαθέσιμο στη  
βιβλιοθήκη του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και του Γεωργ.  
Πανεπιστημίου, για οιονδήποτε ήθελε να το συμβουλευθεί και  
να ενημερωθεί.

ΑΘΗΝΑ 1992

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στη σελίδα αυτή θα ήθελα να συμπεριλάβω τις ευχαριστίες μου στους παρακάτω:

Στον καθηγητή του Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών Γ. Μπαλατσούρα για την επιστημονική του καθοδήγηση και συμπαράσταση σε ολόκληρη τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Στους καθηγητές Γ. Καλατζόπουλο του Γεωργ. Πανεπιστημίου Αθηνών και Στ. Μαρράκη του Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για τη συνεργασία καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Στα υπόλοιπα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση αυτής της διατριβής και τις τυχόν παρατηρήσεις τους για τη βελτίωσή της.

Στη συνεργάτιδά μου στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Ν.Κακιωμένου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους αυτής της έρευνας.

Στους συναδέλφους ερευνητές του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Κ.Μαλλίδη, Γ.Νυχά, Ι.Αρκουδήλο και Δ. Παπανικολάου για την επιστημονική συνεργασία και την κάθε είδους πθική και τεχνική συμπαράσταση.

Στην Ε. Τσκαλίδου στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας για την ανάλυση των πρωτεϊνών ορισμένων μικροοργανισμών με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

Στη Π. Μήτσου για τη βοήθειά της στη δακτυλογράφηση του κειμένου της διατριβής.

Στο ΕΒ.Ι.ΑΓ.Ε και Ινστιτούτο Τεχν. Γεωργ. προϊόντων για την κάλυψη των σχετικών δαπανών της διατριβής στα πλαίσια εγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ .....	11
ΤΟ ΨΩΜΙ ΑΠΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΨΗ .....	11
Γενικά .....	11
Διογκωτικοί παράγοντες του ζυμαριού στην αρτοποιία	13
ΟΙ καθαρές ζύμες αρτοποιίας .....	13
Τα βακτήρια στην αρτοποιία .....	18
Η μικροχλωρίδα στις "όξινες μαγιές" .....	19
Παράγοντες που επηρεάζουν την όξινη ζύμωση .....	26
Φυσικοχημικές και βιοχημικές διεργασίες κατά την παραγωγή του ψωμιού.....	29
Το αλεύρι και τα άλλα προσθετικά και ενισχυτικά συστατικά .....	33
Τεχνολογία παρασκευής ψωμιού .....	35
Ανάμειξη συστατικών σχηματισμός του ζυμαριού .....	35
Μέθοδοι παρασκευής και επεξεργασίας ζυμαριού στο ψωμί σίτου.....	37
Μέθοδοι παρασκευής ψωμιού σίκαλης.....	39
Φούρνισμα του ψωμιού .....	40
ΤΟ ΡΕΒΙΘΙ ΑΠΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΨΗ .....	42
Ταξινόμηση στοιχεία παραγωγής .....	42
Χημική σύσταση .....	43
Πρωτεΐνες .....	44
Υδατάνθρακες .....	45
Λιπίδια, ανόργανα συστατικά, Βιταμίνες .....	46
Επεξεργασία και Χρήσεις .....	48
Παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων από ρεβίθι σε διάφορα μέρη του κόσμου .....	51
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
Σχεδιασμός της έρευνας .....	58

Μεθοδολογία .....	59
Πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν.....	61
Βρεπτικά υποστρώματα.....	62
Μέθοδοι ανάλυσης .....	67
Προσδιορισμός L-Γαλακτικού οξέος.....	67
Προσδιορισμός γλυκόζης.....	67
Ποιοτικός προσδιορισμός αερίων υπερκείμενης φάσης	68
Προσδιορισμός συνολικού όγκου αερίων ζύμωσης ...	69
S.D.S Polyacrylamide Gel Electrophoresis .....	71
Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	73
Ανάλυση πτητικών λιπαρών οξέων.....	74
API 50 CHL, API 20A.....	74
Φυσικοχημικές, οργανοληπτικές αναλύσεις στο ψωμί	75
Βασικές βιοχημικές δοκιμές.....	75

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ

ΕΠΩΡΑΣΗ ΑΛΕΣΜΕΝΩΝ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ ΣΕ ΝΕΡΟ.....	78
Πορεία της ζύμωσης ρεβιθιού και εξέλιξη μικροβιακού φορτίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες.....	78
Μελέτη της μικροχλωρίδας των σπόρων του ρεβιθιού....	88

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΤΟΥ ΖΥΜΑΡΙΟΥ ΣΤΟ ΕΠΤΑΖΥΜΟ...

Πρώτη απομόνωση του μικροοργανισμού.....	98
Περιγραφή και αναγνώριση του γένους .....	99
Ανάκτηση του Βάκιλλου του Επτάζυμου και από άλλα σπέρματα δημητριακών και οσπρίων.....	105
Ζύμωση υποστρώματος R.C.M και παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων από τα διάφορα στελέχη του Βάκιλλου του Επτάζυμου.....	108
Ηλεκτροφορητική ταυτότητα των στελεχών του BE με βάση τις Πρωτεΐνες του κυττάρου .....	114
Ταυτοποίηση του BE με βάση το σύστημα API και άλλες βιοχημικές δοκιμές.....	118

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ BE ΚΡΗΤΗΣ 1989

Επίδραση θερμοκρασίας στην ανάπτυξη.....	125
Παραγωγή αερίου κατά την ανάπτυξη σε R.C.M στους 42°C.....	131
Πορεία της ζύμωσης διαφόρων σαχάρων και αμύλου.....	137
Ανάπτυξη σε διαφορετικά επίπεδα χλωριούχου νατρίου.	143
Μικροβιακό φορτίο, σε σχέση με O.D & βιομάζα .....	147

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ

Γενικά.....	150
Μελέτη υποστρωμάτων για την ανάπτυξη του BE KP-89 .	150
Ανάπτυξη σε υπόστρωμα αλεύρου 5 και 10% .....	152
Συνεχόμενη καλλιέργεια σε υπόστρωμα αλεύρου 10%....	154
Παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης και συντήρηση σε καταψυγμένη μορφή .....	158
Παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης και συντήρηση σε ψύξη και σε λυοφιλιωμένη μορφή.....	163

#### ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΠΤΑΖΥΜΟ

ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΤΥΠΟ ΨΩΜΙΟΥ.....	167
---	-----

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	180
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	185
SUMMARY.....	187
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	203

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη χώρα μας υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός προϊόντων διατροφής που είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας εμπειρίας και παράδοσης. Τα προϊόντα αυτά αν και έχουν ιδιαίτερα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, έχουν συνήθως τοπικό χαρακτήρα και μέχρι σήμερα παραμένουν άγνωστα στο ευρύ κοινό. Η μελέτη των τροφίμων αυτών θα δώσει χρήσιμα στοιχεία από τεχνολογική και βιολογική σκοπιά και θα συντελέσει στη διάδοση και επέκταση της παρασκευής τους. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σήμερα όπου παρατηρείται μια στρόφη του ανθρώπου προς την παράδοση και τα παραδοσιακά προϊόντα. Το "Επτάξυμο" είναι μια ονομασία που αναφέρεται σ' ένα παραδοσιακό τύπο ψωμιού που παρασκευάζονταν στην Ελλάδα σε ορισμένες περιοχές όπως π.χ. την Κρήτη, νησιά του Αιγαίου και αλλού. Σήμερα εξακολουθεί να παρασκευάζεται σε ορισμένους φούρνους της Αθήνας και άλλων επαρχιακών πόλεων και προωθείται στην κατανάλωση σαν παξιμάδι.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το "Επτάξυμο" παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες και ως προς τον τρόπο παρασκευής και ως προς τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Η ιδιαιτερότητα ως προς τον τρόπο παρασκευής αναφέρεται στο γεγονός της μη χρησιμοποίησης της γνωστής μαγιάς αρτοποιίας για τη διόγκωση του ζυμαριού, αλλά ειδικής μαγιάς από ρεβίθι, που παρασκευάζεται παραδοσιακά με την παρακάτω διαδικασία:

Το ρεβίθι που χρησιμοποιείται στην παρασκευή της μαγιάς είναι αυτό που μπορεί να αγοράσει κανείς είτε τυποποιημένο και συσκευασμένο σε πλαστικές σακούλες είτε σε κατάσταση χύδην. Οι σπόροι του ρεβιθιού χονδραλέθονται και αναμειγνύονται με ζεστό νερό και λίγο αλάτι. Για την ανάμειξη του χονδραλεσμένου καρπού με νερό, χρησιμοποιούνται συνήθως στην πράξη από τους αρτοποιούς γυάλινα μπουκάλια άγκου 500ml περίπου. Σε αυτά εισάγονται 50-70gr καρπού και στη συνέχεια απογεμίζονται μέχρι το λαιμό με χλιαρό νερό βρύσης και μικρή ποσότητα NaCl (0.5% περίπου). Τα μπουκάλια αυτά διατηρούνται στη συνέχεια σε ζεστό μέρος συνήθως με

τοποθέτηση μέσα στο θερμοθάλαμο δίπλα στο φούρνο όπου η θερμοκρασία χώρου είναι αρκετά υψηλή και πλησιάζει τους 40°C. Στο χώρο αυτό παραμένουν αρκετές ώρες μέχρι να θεωρηθούν ότι είναι κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν.

Μετά από 3-5 ώρες γίνεται εμφανής οπτικά η έναρξη ζύμωσης του περιεχομένου υποστρώματος, από τις φυσαλίδες αερίου που σχηματίζονται στο εσωτερικό και ανέρχονται στην επιφάνεια όπου συσσωρεύονται και αρχίζουν να δημιουργούν επιφανειακό αφρισμό. Ο σχηματισμός επιφανειακού αφρισμού που διατηρείται και το πάχος του συνεχώς αυξάνει, είναι κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ζύμωσης. Συνήθως ο έντονος σχηματισμός αφρού που υπερεκχυλίζει το μπουκάλι και η χαρακτηριστική οσμή θεωρούνται ασφαλή κριτήρια από τους έμπειρους αρτοποιούς.

Στη φάση αυτή ολοκληρω το περιεχόμενο ενός μπουκαλιού αναμειγνύεται μαζί με ζεστό νερό και μερικά κιλά αλεύρι και σχηματίζεται ζυμάρι που αφήνεται να διογκωθεί σε ζεστό μέρος. Ακολουθεί δεύτερη και πολλές φορές και τρίτη φάση ανάμειξης με μεγαλύτερες ποσότητες αλεύρου - νερού και ενδιάμεσα στάδια επώασης διόγκωσης πριν από τη τελική φάση διαμόρφωσης της επιθυμητής φόρμας.

Το αλεύρι που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του "επτάζυμου" είναι συνήθως τύπου 70% ή 90%. Πολλές φορές χρησιμοποιείται μίγμα αυτών των τύπων, με αλεύρι από κριθάρι. Επειδή το επτάζυμο προωθείται στην κατανάλωση κυρίως σαν παξιμάδι, το ζυμάρι διαμορφώνεται τελικά σε επιμήκη τεμάχια που τοποθετούνται σε φόρμες για την τελική διόγκωση μέσα σε θερμοθαλάμους με αυξημένη υγρασία και θερμοκρασία. Μετά το ψήσιμο το ψωμί αφήνεται να κρυώσει και μετά γίνεται ο διαχωρισμός σε φέτες που εισάγονται μέσα σε ειδικούς φούρνους για να γίνει η αποξήρανση σταδιακά σε ρεύμα θερμού αέρα. Εκτός από τον παραπάνω χειρισμό, πολλές φορές η τελική ζύμη διαμορφώνεται σε πολύ λεπτά επιμήκη τεμάχια που μετά τη διόγκωση και το ψήσιμο κόβονται σε μικρά τεμάχια (μπουκιές), που αποξηραίνονται επίσης στο φούρνο σε παξιμάδι.

Είναι προφανές ότι στην αρχική φάση της επώασης του αλεσμένου ρεβιθιού μέσα στο νερό, αρχίζει ένας ανταγωνισμός

μεταξύ των διαφόρων μελών της χλωρίδας των σπόρων. Το άλεσμα των σπόρων διευκολύνει την εκχύλιση ορισμένων συστατικών μέσα στο νερό και μαζί με τη μικρή ποσότητα χλωριούχου νατρίου που έχει προστεθεί, διαμορφώνουν το υπόστρωμά ανάπτυξης. Ορισμένα συστατικά των σπόρων του ρεβιθιού σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία επώασης, επιδρούν πιθανόν επιλεκτικά για την επικράτηση της μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνη για τη διόγκωση του ζυμαριού και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ψωμιού που παρασκευάζεται στη συνέχεια. Το ψωμί ή το παξιμάδι που παρασκευάζονται με αυτόν τον τρόπο, έχουν ιδιαίτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά (άρωμα και γεύση) που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από τα αντίστοιχα που παρασκευάζονται με τις μαγιές αρτοποιίας. Γενικά το "Επτάζυμο" θεωρείται από τους αρτοποιούς σαν τύπος ψωμιού ανώτερης ποιότητας και εκτιμάται ιδιαίτερα από μια μεγάλη μερίδα καταναλωτών.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σήμερα το "Επτάζυμο" δεν παρασκευάζεται σε άλλα μέρη του κόσμου. Επίσης στη χώρα μας δεν παρασκευάζεται σε μεγάλη εμπορική κλίμακα όπως ίσως θα περίμενε κανείς. Κυρίως το βρίσκουμε στον τύπο "παξιμάδι" σε πολλούς φούρνους της Αθήνας και της Επαρχίας. Αυτό οφείλεται κυρίως στη διαδικασία του τρόπου παρασκευής που περιγράψαμε συνοπτικά παραπάνω η οποία παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες κυρίως ως προς το τελικό αποτέλεσμα που δεν είναι πάντοτε επιτυχημένο. Είναι μάλιστα πιθανόν η ονομασία "Επτάζυμο" να προέρχεται από τις λέξεις "επτά" και "ζυμώνω" δηλαδή ζυμώνω επτά φορές για να υποδηλώσει τις δυσκολίες στην παρασκευή και επιτυχία του ψωμιού αυτού.

Σκοπός της ερευνητικής αυτής εργασίας είναι να μελετηθεί ο παραδοσιακός αυτός τύπος ψωμιού που παράγεται στη χώρα μας, με τους παρακάτω βασικούς στόχους:

1. Την μελέτη της μικροχλωρίδας κατά τη φυσική ζύμωση του ρεβιθιού σε νερό για την παρασκευή της "μαγιάς".

2. Την απομόνωση, ταυτοποίηση και μελέτη του μικροοργανισμού που είναι υπεύθυνος για τη διόγκωση του ζυμαριού και πιθανόν και για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του επτάζυμου.



3. Την διερεύνηση της δυνατότητας παρασκευής καθαρής καλλιέργειας εκκίνησης (starter culture) σε εύχρηστη μορφή, για χρήση στην πράξη.

4. Την μελέτη ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών στο "επτάζυμο σε σύγκριση με τον παραδοσιακό τύπο ψωμιού.

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### ΤΟ ΨΩΜΙ ΑΠΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΨΗ

#### Γενικά

Η ιστορία της παρασκευής ψωμιού καλύπτει μεγάλη χρονική περίοδο και χάνεται στα βάθη των αιώνων. Η ανακάλυψη της διόγκωσης του ζυμαριού με τη ζύμωση, έγινε κατά τύχη από τον άνθρωπο όταν ήταν σε θέση να αλέθει τους σπόρους από διάφορα δημητριακά για παρασκευή διαφόρων ειδών τροφίμων. Ένα ξεχασμένο ζυμάρι που ζυμώθηκε αυτόματα από την ενδογενή μικροχλωρίδα και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για ψήσιμο έδωσε ψωμί με ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που δεν ήταν δυνατόν να αγνοηθούν από τον πρωτόγονο άνθρωπο. Ήταν η αρχή της ανακάλυψης της παρασκευής του ζυμωμένου ψωμιού.

Η παραγωγή όμως του ψωμιού σαν μια τέχνη άρχισε στους αρχαίους Αιγύπτιους πριν από 3500 χρόνια, που φαίνεται ότι είναι οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν και εφάρμοσαν τη ζύμωση και διόγκωση του ζυμαριού για να παρασκευάσουν ψωμί εύπεπτο και με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Στους Αιγύπτιους επίσης αποδίδεται η ανακάλυψη του φούρνου για το ψήσιμο του ψωμιού γύρω στο 2700 π.Χ.. Από το 1750 π.Χ. αναφέρεται ότι υπήρχαν επαγγελματίες φουρνάρηδες στην Αίγυπτο (Spicher, 1983), που ήταν εξοικειωμένοι στην παρασκευή ψωμιού με χρήση μαγιάς. Αναφέρεται επίσης ότι το 450 π.Χ. οι Αιγύπτιοι γνώριζαν τη διαδικασία της όξινης ζύμωσης στο ζυμάρι (Souring of doughs) και γύρω στο 100 π.Χ. η παρασκευή ψωμιού μετά από όξινη ζύμωση φαίνεται ότι ήταν γενικά γνωστή σε πολλά μέρη του κόσμου (Stokar, 1951).

Από τους Αιγύπτιους η τέχνη παρασκευής ψωμιού πέρασε στους Ιουδαίους, Έλληνες και Ρωμαίους. Οι αρχαίοι Έλληνες φαίνεται ότι ανέπτυξαν την τέχνη της παρασκευής ψωμιού περισσότερο, κυρίως ως προς το σχεδιασμό και την τελειοποίηση των φούρνων και τη διέδωσαν στους Ρωμαίους.

Στην εποχή του Ομήρου το ψωμί θεωρούνταν σαν τροφή των θεών. Στην εποχή του Σόλωνα η απόλαυση του ψωμιού ήταν μεγάλη πολυτέλεια. Από τους Έλληνες αναφέρεται επίσης ότι παρασκευάστηκε ξερή "μαγιά" με την παρακάτω μέθοδο: Την εποχή του τρυγητού με ανάμειξη αλεύρου από κεχρί και μούστου που ζυμώνονταν, παρασκεύαζαν ζυμάρι που το έπλασαν σε μικρούς βώλους και το άφηναν στον ήλιο να ξεραθεί. Για την παρασκευή του "ξημίτη" άρτου χρησιμοποιούσαν μετά ένα βόλο αποξηραμένης ζύμης (Χαραλαμπόπουλος, 1989).

Οι Ρωμαίοι είναι πιθανόν οι πρώτοι που παρασκεύασαν ψωμί σε εμπορική κλίμακα με χρήση "μαγιάς" από τη ζύμωση γλεύκους ή δημητριακών και έχει εκτιμηθεί ότι στη Ρώμη το 100 π.Χ. υπήρχαν περίπου 250 φούρνοι (Pederson, 1971).

Από τους Ρωμαϊκούς χρόνους μέχρι τα μέσα του 19ου αιώνα δεν υπήρχε παραγωγή "μαγιάς" που προορίζονταν ειδικά για χρήση στην αρτοποιία (Erkki Oura et al., 1982). Οι μαγιές που χρησιμοποιούνταν τότε στην αρτοποιία προέρχονταν βασικά από τη ζυθοποιία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ψωμί που παρασκευάζονταν στους αρχαίους χρόνους με φυσική ζύμωση όπως και το ψωμί που παρασκευάζεται και σήμερα με την όξινη ζύμωση, βασίζεται στην φυσική ενδογενή μικροχλωρίδα του ζυμαριού που είναι μικτή και αποτελείται από βακτήρια και ζύμες που παράγουν οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα, αλκοόλη και άλλες χημικές ουσίες που συνεισφέρουν στο άρωμα, την υφή και τη γεύση. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι μέχρι το 1860 μ.Χ., παρά τη σχετική πρόοδο που είχε σημειωθεί, δεν είχε κατανοηθεί πλήρως η βιολογική και βιοχημική φύση των ζυμώσεων. Ο Louis Pasteur με τις εργασίες του (1857-1863) ήταν ο πρώτος που απέδειξε το ρόλο των ζυμών και των άλλων μικροβίων στις ζυμώσεις. Αναφέρεται ότι ο Hansen του Carlsberg Laboratory στην Κοπεγχάγη άρχισε τη μελέτη για καθарές καλλιέργειες και τελικά το 1897 ο Buchner έκανε ζύμωση με χρήση εκχυλίσματος κυττάρων ζυμών (Erkki Oura et al., 1982). Με αυτές τις ερευνητικές εργασίες και άλλες παρόμοιες αναγνωρίστηκε η σημασία των ζυμών και των βακτηρίων στις ζυμώσεις και τέθηκαν οι βάσεις της επιστήμης της μικροβιολογίας και βιοχημείας.

## Διογκωτικοί παράγοντες του ζυμαριού στην αρτοποιία.

Οι διογκωτικοί παράγοντες που συντελούν στην διόγκωση του ζυμαριού στα διάφορα προϊόντα αρτοποιίας μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: τους βιολογικούς, τους χημικούς και τους φυσικούς. Η χημική διόγκωση επιτυγχάνεται με χρήση ειδικών αλάτων στο αλεύρι που παράγουν αέριο κατά το ψήσιμο (π.χ αμμωνία), ενώ η φυσική με απευθείας έγχυση αέρα ή ατμού στο ζυμάρι.

Η διόγκωση με βιολογική δράση, αναφέρεται στη μικροβιακή ζύμωση των σακχάρων του ζυμαριού, με παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και άλλων προϊόντων και συντελείται από ζύμες, βακτήρια ή συνδυασμένη δράση και των δύο. Κατά τον Frazier και Westhoff (1968), η διόγκωση του ζυμαριού γίνεται κυρίως από τις ζύμες που ζυμώνουν τα σάχαρα σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Άλλοι μικροοργανισμοί που παράγουν αέριο όπως π.χ. τα ετεροζυμωτικά γαλακτοβακτήρια, τα κολιβακτήρια και τα σαχαρολυτικά κλωστρίδια είναι πιθανόν να υπεισέρχονται στη διόγκωση του ζυμαριού.

Στους βιολογικούς διογκωτικούς παράγοντες του ζυμαριού στην αρτοποιία (Ζύμες, βακτήρια), θα γίνει λεπτομερής αναφορά στη βιβλιογραφία δεδομένου ότι έχουν και την πλέον άμεση σχέση με το αντικείμενο αυτής της μελέτης.

## Οι καθαρές ζύμες αρτοποιίας.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι "μαγιές" που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην αρτοποιία για την παραγωγή διαφόρων τύπων ψωμιού ήταν αυτές που αποκαλούμε σήμερα ξινά ζυμάρια "Sour doughs" και ήταν ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή του ψωμιού παραδοσιακά στο σπίτι. Συγκεκριμένα ήταν μια ποσότητα διογκωμένου ζυμαριού, που φυλάσσονταν από την προηγούμενη παρασκευή για να χρησιμοποιηθεί σαν "μαγιά" στην επόμενη κ.α.κ. Η διογκωτική δράση σε αυτήν την περίπτωση οφείλονταν στις φυσικές ζύμες αλλά και στα ετεροζυμωτικά βακτήρια που υπήρχαν στην ενδογενή μικροχλωρίδα.

Η παραγωγή εξειδικευμένων ζυμών για την αρτοποιία περιόρισε στη συνέχεια τη χρησιμοποίηση των "Ξινών μαγιών". Σήμερα οι Ξινές μαγιές χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία σε ορισμένες χώρες στην παρασκευή ορισμένων τύπων ψωμιού με ιδιαίτερα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Η παραγωγή των ζυμών αυτών με προσρισμό την αρτοποιία άρχισε στις αρχές του περασμένου αιώνα και αναπτύχθηκε σημαντικά μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Αναφέρεται π.χ. ότι στην Ολλανδία μια μορφή ζύμης αρτοποιίας σε συμπιεσμένη μορφή, που ήταν υποπροϊόν των αποστακτηρών οινοπνεύματος, διανεμόταν στην Ολλανδία τουλάχιστον από το 1781 (Kiby, 1912). Ο Olsen (1961), αναφέρει ότι σε μια επεξεργασία που εφαρμόζεται στη Βιέννη από το 1864, από τη ζύμωση 100 Kg σπόρων δημητριακών συνήθως κριθής, παράγονται 28 λίτρα αλκοόλης και 10-12 Kg ζύμης που χρησιμοποιείται στην αρτοποιία. Η νέα αυτή ζύμη αρτοποιίας είχε σημαντική θετική επίδραση στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ψωμιού. Η παραπάνω επεξεργασία βελτιώθηκε ακόμα περισσότερο με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τον Eusebious Brdun στην Κοπεγχάγη του 1877 (Erkki, 1982). Αυτή η μέθοδος βασίσθηκε στην παρατήρηση του Pasteur ότι οι ζύμες αναπτύσσονται καλύτερα όταν εισάγεται αέρας μέσα στο υπόστρωμα της ζύμωσης. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε ακόμα περισσότερο με αλλαγή του υποστρώματος από τους αλεσμένους σπόρους δημητριακών σε μελάσσες ζαχαροτεύτλων ενισχυμένες με αμμωνιακά άλατα και εφαρμόζεται μέχρι σήμερα σε ευρεία κλίμακα.

Οι ζύμες αρτοποιίας που παράγονται σήμερα βιομηχανικά, είναι στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* που έχουν αναπτυχθεί σε μελάσσες με αερόβια ζύμωση. Έχει επίσης αναφερθεί, ότι έχει χρησιμοποιηθεί περιστασιακά η ζύμη *Candida (torula)* (Burrows, 1970) καθώς επίσης και στελέχη του είδους *Saccharomyces carlsbergensis* (Koninklijke, 1967).

Οι "μαγιές" αρτοποιίας παράγονται κάθε χρόνο, σε ποσότητα περίπου 1.8 εκατομ. τόννους στον κόσμο (με 30% συνολικά στερεά) και είναι το πιο σημαντικό προϊόν των βιομηχανικών ζυμώσεων (Trivedi, 1986b). Έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 28-32°C και pH 4-5.

Η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως 5-7 στάδια

ζύμωσης, σε ζυμωτές προσδευτικά αυξανόμενου όγκου (Perpler, 1979). Η επεξεργασία αρχίζει με επιλεγμένα στελέχη της ζύμης *S.cerevisiae* που έχουν αποκτηθεί από καθαρές καλλιέργειες. Μερικές εκατοντάδες από αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για ασπτική εμβολιασμό ενός αποστειρωμένου υλικού σε φιάλη Pasteur, που περιέχει διαυγασμένο υπόστρωμα από μελάσσα τεύιλων και ζαχαροκαλάμου σαν πηγή άνθρακα ενισχυμένο με άλατα, βιταμίνες και άλλα θρεπτικά στοιχεία. Η ανάπτυξη γίνεται στους 30° C και μετά από 1-2 ημέρες ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης χρησιμοποιείται για εμβολιασμό του πρώτου μιας σειράς ζυμωτών προσδευτικά αυξανόμενου όγκου. Στα τελευταία στάδια της ζύμωσης η τροφοδοσία του θρεπτικού υλικού γίνεται προσδευτικά και σε συγχρονισμό με την ανάπτυξη της ζύμης (Fed-batch), κάτω από έντονα αερόβιες συνθήκες που ευνοούν την κυτταροπλασία. Σε ολόκληρη τη διαδικασία η τροφοδοσία, το pH, η θερμοκρασία και ο αερισμός είναι σε διαρκή έλεγχο - ρύθμιση ανάλογα με τον τύπο μαγιάς. Κατά τους Reed and Perpler (1973e), πρέπει το επίπεδο των ζαχάρων στο υπόστρωμα που ζυμώνεται να είναι χαμηλό, κάτω από 0.01%, για να καταπιεσθεί η αλκοολική ζύμωση και να ενισχυθεί η κυτταρική ανάπτυξη.

Τα κύτταρα της ζύμης μετά την πλήρη ανάπτυξη στο τελευταίο στάδιο, διαχωρίζονται σένα φυγοκεντρικό διαχωριστή και πλένονται επανειλημμένα με νερό για απομάκρυνση του υποστρώματος. Η "κρέμα ζύμης" που προκύπτει και περιέχει περίπου 18% στερεά ψύχεται στους 2-4°C και μετά φιλτράρεται (rotary vacuum filter) (Trivedi et al., 1984) για να δώσει προϊόν με 30% στερεά, που είναι σταθερό στους 0°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία. Μια ολοκληρωμένη διαδικασία ζύμωσης όπως αναφέρθηκε συνοπτικά παραπάνω, διαρκεί 5-7 ημέρες και αποδίδει 250.000 - 300.000 lb μαγιάς με 30 % στερεά και με εκκίνηση από μερικές εκατοντάδες κύτταρα. Οι καθαρές "μαγιές αρτοποιίας" παράγονται και διατίθενται σήμερα σε διάφορες μορφές.

Μαγιές σε συμπιεσμένη μορφή (κέικς), που είναι και η πιο δημοφιλής μορφή που χρησιμοποιείται σήμερα. Αφού αναπτυχθεί η ζύμη στους ζυμωτές, διαχωρίζεται, πλένεται και ανακτάται πάλι συνήθως με διήθηση υπό κενό. Στη συνέχεια αφού

προστεθούν γαλακτωματοποιητές (sorbitan monostearate) και αντιοξειδωτικές ουσίες διαμορφώνεται με εξώθηση σε επιμήκη τεμάχια ορθογώνιου διατομής και κόβεται σε μικρότερα τεμάχια βάρους 500-2500 γραμμαρίων. Η μαγιά αυτή μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C για μια περίοδο 6-8 ημερών χωρίς σημαντική απώλεια της ζυμωτικής της ικανότητας.

Η "Κρέμα ζύμης", είναι μια άλλη μορφή με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε στερεά (18 % περίπου). Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε υγρασία η μαγιά αυτή είναι υδαρής και διανέμεται συνήθως με βυτία σε αρτοβιομηχανίες.

Η "Ενεργή Ξερή ζύμη αρτοποιίας" (Active Dry Yeast), παράγεται με απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του νερού ώστε η περιεκτικότητα σε συνολικά στερεά να φθάσει στο 92-96%. Η σύσταση του τελικού προϊόντος είναι κοκκώδης ή σε λεπτότερο διαμερισμό και η συσκευασία γίνεται σε περιέκτες υπο κενόν ή σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, επιτρέπει τη διατήρηση σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος για 12 μήνες ή περισσότερο, χωρίς σημαντική απώλεια της ζυμωτικής ικανότητας. Πριν από τη χρήση τους οι ζύμες αυτές ενυδατώνονται με χλιαρό νερό που περιέχει μικρή ποσότητα ζάχαρης, για μικρό χρονικό διάστημα.

Η σύγκριση της ζυμωτικής ικανότητας μεταξύ της συμπιεσμένης ζύμης και της Ξερής επί τη βάση των ολικών στερεών συνήθως δείχνει μια 25-35% χαμηλότερη ικανότητα για την αποξηραμένη μορφή (Spicher, 1982).

Μια ακόμα πιο εξελιγμένη μορφή Ξερής ζύμης είναι αυτή που ονομάζεται "Instant Active dry Yeast", με 95% στερεά, και παράγεται από ειδικά στελέχη και βελτιωμένες τεχνικές αποξήρανσης. Η αποξήρανση στην περίπτωση αυτή γίνεται σε ξηραντήρα τύπου airlift fluid-bed dryer, σε θερμοκρασία 149-177°C σε πολύ μικρό χρόνο. Τα μικρά τεμαχίδια που προκύπτουν έχουν χαμηλή πυκνότητα είναι πορώδη με μεγάλη δραστική επιφάνεια και μπορούν να ενυδατωθούν γρήγορα (Instand). Αυτή η ιδιότητα κάνει δυνατή την ανάμειξη της ζύμης αυτής απευθείας με το αλεύρι χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη ενυδάτωση. Η ζύμη αυτή είναι πολύ σταθής παρουσία οξυγόνου και πρέπει να συσκευάζεται σε κενό αέρα ή

ατμόσφαιρα αζώτου. (Trivedi et al, 1984). Η ζυμωτική ικανότητα αυτής της ξερής ζύμης είναι ισοδύναμη με αυτήν της συμπιεσμένης μορφής (Finney, 1981). Η διάρκεια αποθήκευσης χωρίς σημαντική απώλεια της ζυμωτικής ικανότητας, είναι 20-22 μήνες στους 18°C (Spicher, 1982).

Η διάγκωση του ζυμαριού στο ψωμί επιτυγχάνεται με το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται με τη ζύμωση των ζαχάρων από τις ζύμες. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει στη σειρά 12 ενζυματικές αντιδράσεις όταν το ζυμούμενο υπόστρωμα είναι η γλυκόζη. Το αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων μπορεί να συνοψισθεί στην παρακάτω εξίσωση.



Απο την παραπάνω εξίσωση φαίνεται ότι κατά τη ζύμωση ενός mol γλυκόζης μένουν ως καθαρό ενεργειακό κέρδος δύο φωσφορικοί δεσμοί υψηλής ενέργειας. Δηλαδή δύο μόρια ADP μετατρέπονται σε δύο μόρια ATP. Το ένζυμο ATPase στις ζύμες, υδρολύει στη συνέχεια την περίσσεια ATP σε ADP και ανόργανο φωσφόρο με ελευθέρωση ενέργειας που χρησιμοποιείται στην επιτέλεση των διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου.

Θεωρητικά, το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τις ζύμες στους 25°C από 1 gr ζάχαρης είναι περίπου 280 ml. Στην πραγματικότητα ο όγκος του διοξειδίου είναι μικρότερος γιατί με ανάλωση των ζαχάρων σχηματίζεται επίσης ένας μεγάλος αριθμός από άλλες ουσίες εκτός του διοξειδίου και της ακλοόλης. Η διαλυτότητα του διοξειδίου στο νερό στους 25°C είναι 0.1449 %, όταν η ολική πίεση είναι 760 mm Hg. Η υδατική φάση στο ζυμάρι στη φάση της διάγκωσης είναι σύνθετο υπόστρωμα και περιέχει ζάχαρα, αιθανόλη, ανόργανα άλατα κλπ. Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου 55 mg διοξειδίου του άνθρακα διαλύονται σε 100 gr ζυμαριού ή περίπου το 7.5% του ολικού διοξειδίου που εκλύεται σε μια ώρα (Reed and Pepler, 1973).



## Τα βακτήρια στην αρτοποιία

Τα βακτήρια παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην αρτοποιία που γίνεται με περισσότερο παραδοσιακό τρόπο. Ακόμα και οι καθαρές εμπορικές μαγιές της αρτοποιίας (*S. cerevisiae*), περιέχουν ένα ποσοστό γύρω στο 5% απο γαλακτικά βακτήρια, που οφείλεται σε αναπόφευκτες επιμολύνσεις στη διαδικασία της παρασκευής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη φάση της ωρίμανσης του ζυμαριού τα βακτήρια έχουν λίγο χρόνο για να αναπτυχθούν και με τα προϊόντα του μεταβολισμού τους να συνεισφέρουν στη γεύση και στο άρωμα του ψωμιού (Sugihara, 1985).

Με την εκμηχάνιση της αρτοποιίας σήμερα και για οικονομικούς λόγους, επιζητείται η μείωση του χρόνου ζύμωσης και ωρίμανσης του ζυμαριού, με αποτέλεσμα τα κύτταρα των ζυμών να μη μπορούν να επιτελέσουν τις αναγκαίες μεταβολικές αντιδράσεις που είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη της γεύσης και του αρώματος του ψωμιού. Απο την άλλη μεριά η άνοδος του βιοτικού επιπέδου της ζωής, έχει αυξήσει την ζήτηση σε είδη ψωμιού καλύτερης γεύσης και ποιότητας. Πολλά τέτοια είδη ψωμιού παράγονται σήμερα εμπορικά σε πολλά μέρη του κόσμου με βακτηριακές ζυμώσεις ή συνηθέστερα με συνδυασμό ζυμών και βακτηρίων. Ένας τύπος ξινού ψωμιού ήταν πολύ διαδεδομένος στην κεντρική Ευρώπη καθώς επίσης και τις ΗΠΑ όπου και εξακολουθεί να παρασκευάζεται μέχρι σήμερα. Ο τύπος αυτός του ψωμιού παρασκευάζεται είτε με αλεύρι σίκαλης ολικής άλεσης είτε απο αλεύρι σίκαλης άλλου τύπου ή απο μίγμα αλεύρου σίτου και σίκαλης. Στη Δανία π.χ αναφέρεται ότι το ψωμί σίκαλης (Rye Bread) είναι ένα σημαντικό συστατικό του διαιτολογίου με μέση ετήσια κατανάλωση 39 κιλά ανά άνθρωπο (Lund and Hansen, 1987).

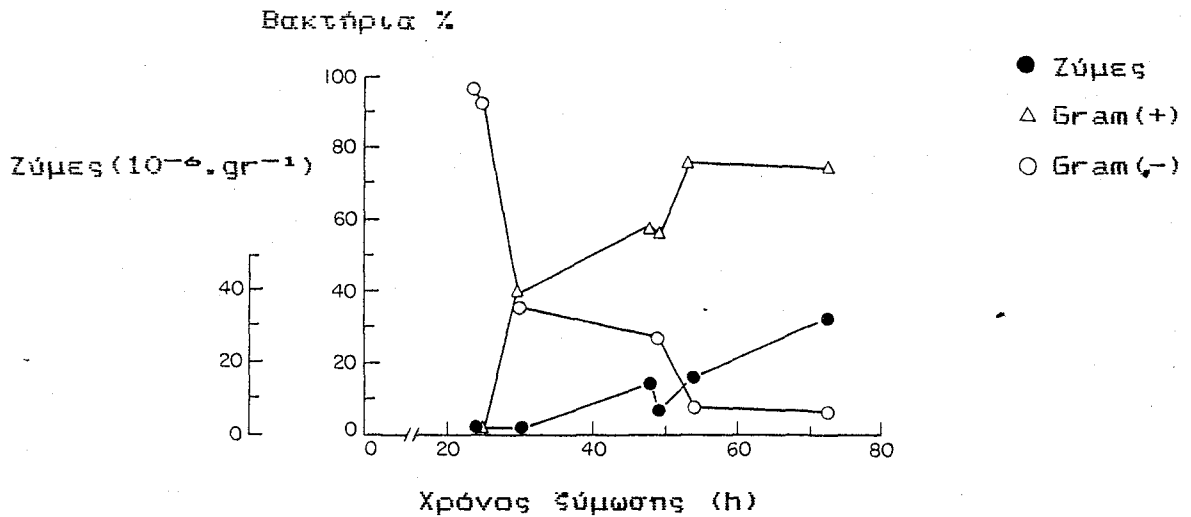
Για να παρασκευασθεί αυτός ο τύπος ψωμιού είναι απαραίτητη η χρήση ενός "όξινου ζυμαριού" (Sourdough), με την κατάλληλη μικροχλωρίδα που θα συνεισφέρει στη γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος. Αυτό το όξινο ζυμάρι είναι ένα μίγμα αλευριού σίκαλης με νερό, όπου τα γαλακτοβακτήρια

έχουν ξεκινήσει γαλακτική ζύμωση σε βάρος των ζαχάρων του υποστρώματος. Τα είδη της χλωρίδας στην περίπτωση αυτή, προέρχονται είτε από φυσική επιλογή και πολλαπλασιασμό αυτών που υπήρχαν αρχικά στο αλεύρι (αυτόματη ζύμωση) είτε από την προσθήκη μιας επιλεγμένης καλλιέργειας εκκίνησης (starter culture) με ένα ή περισσότερα είδη γαλακτικών βακτηρίων ή και ζυμών.

Όπως αναφέρεται από τους Lund & Hansen (1987), σχεδόν ολόκληρη η παραγωγή ψωμιού σίκαλης στην Δανία έχει βιομηχανοποιηθεί τα τελευταία χρόνια και έχει συγκεντρωθεί σε μεγάλες βιομηχανικές μονάδες. Ορισμένες από αυτές χρησιμοποιούν ακόμα την παραδοσιακή μέθοδο παρασκευής του όξινου ζυμαριού που βασίζεται στην αυτόματη ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα που αναπαράγεται για δεκαετίες. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι υπάρχει σήμερα αυξημένο ενδιαφέρον, για την παραγωγή και χρησιμοποίηση όξινων καλλιεργειών εκκίνησης (όξινες μαγιές), με σκοπό την αριστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης και των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος.

#### Η μικροχλωρίδα στις "όξινες μαγιές"

Όταν ένα ζυμάρι που έχει παρασκευασθεί από αλεύρι σίκαλης και νερό αφεθεί σε επώαση για αρκετές ώρες θα ξεκινήσει μια αυτόματη ζύμωση που οφείλεται στους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο αλεύρι. Σε αυτή τη ζύμωση αρχίζει μια προσδευτική επικράτηση των θετικών κατά Gram βακτηρίων σε βάρος των βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae και επικρατούν στην αρχή της ζύμωσης (Rohrich, 1953 . Lonner et al., 1986 . Kosmina, 1977 ). Με την επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων και την αύξηση της οξύτητας λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εξαφανίζονται όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικ.1. Αλλαγές στις ζύμες, στα θετικά κατά Gram και στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια στη διάρκεια αυτόματης ζύμωσης σε όξινο ζυμάρι (kosmina, 1977).

Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το ζυμάρι ανανεώνεται αρκετές φορές με προσθήκη νέας ποσότητας αλεύρου και νερού. Ο αριθμός των ζυμών αυξάνει επίσης αλλά ο αριθμός τους και η ταχύτητα αύξησης είναι μικρότερη από εκείνη των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Η πλειοψηφία των γαλακτικών βακτηρίων στα όξινα ζυμάρια ανήκει στο γένος *Lactobacillus*. Άλλα είδη βακτηρίων που έχουν επίσης αναγνωρισθεί ανήκουν στα γένη *Pediococcus*, *Leuconostoc* και *Streptococcus* (Rogos, 1974).

Με αυτή τη ζύμωση που γίνεται αυτόματα σένα μίγμα αλεύρου (κυρίως σίκαλης) και νερού γίνεται μια φυσική επιλογή των επιθυμητών ειδών μικροοργανισμών που θα δώσουν ένα τελικό προϊόν με την ονομασία "ξινό ζυμάρι" "sour dough" που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν "μαγιά" σε διαδικασία παρασκευής του όξινου τύπου ψωμιού.

Κατά τον Spicher (1986), σε ένα όξινο ζυμάρι που έχει ωριμάσει περιέχονται περίπου ανά gr: Γαλακτοβάκιλλοι από 10<sup>8</sup> έως 10<sup>10</sup> και ζύμες από 10<sup>6</sup> έως 10<sup>7</sup>. Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη της μικροχλωρίδας στα όξινα ζυμάρια (Sour doughs) είτε αυτή προέρχεται από αλεύρι σίκαλης, σίτου, ή μίγμα αυτών, καθώς επίσης και τη μικροχλωρίδα των διαφόρων καλλιιεργειών εκκίνησης (starters). Ο Spicher και

οι συνεργάτες του στο Detmold, μελετούν την όξινη ζύμωση για περισσότερο από 25 χρόνια και έχουν απομονώσει πολλά είδη γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών.

Η μελέτη της μικροχλωρίδας στις "όξινες μαγιές" είναι επίσης αντικείμενο της μελέτης και πολλών άλλων ερευνητών. Ο Lonner και οι συνεργάτες του (1986), μελέτησαν την μικροχλωρίδα σε μια τυπική όξινη μαγιά σκόλης από αυτόματη ζύμωση στην Σουηδία και βρέθηκαν να επικρατούν οι ομοζυωτικοί γαλακτοβάκιλλοι και ο *Pediococcus pentosaceus*. Σε παρόμοια εργασία στη Γερμανία (Spicher 1966) τα επικρατούντα γαλακτοβακτήρια ήταν *L. fermentum*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* και *pediococcus acidilactici*. Ο *L. brevis* έχει επίσης αναγνωρισθεί σαν επικρατούν είδος σε αυτόματα ζυμωμένα "όξινη μαγιά" (Heinz and Klaushofer, 1952).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της αυτόματης ζύμωσης διάφοροι παράγοντες, όπως π.χ. το είδος του αλεύρου, η θερμοκρασία, ο τρόπος παρασκευής του ζυμαριού και ο χρόνος επώασης επιδρούν αποφασιστικά στην ενδογενή μικροχλωρίδα των πρώτων υλών και καθορίζουν τα είδη των μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν.

Κατά την εμπορική παρασκευή του ψωμιού αυτού από σκόλη αποφεύγεται η χρησιμοποίηση "όξινης μαγιάς" που έχει υποστεί αυτόματη ζύμωση γιατί δεν είναι σταθερή και συχνά η τελική όξινση στο ζυμάρι δεν είναι ικανοποιητική με αποτέλεσμα η ποιότητα του τελικού προϊόντος να είναι υποβαθμισμένη (Spicher 1980).

Σήμερα σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης (Γερμανία - Δανία) και τις Η.Π.Α. είναι διαθέσιμες εμπορικά, έτοιμες "όξινες μαγιές" (commercial sour doughs) καθώς και καλλιέργειες εκκίνησης για όξινα ζυμάρια (sour dough starters) που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία.

Σημαντική είναι η έρευνα που έχει γίνει σε πολλές χώρες όπως π.χ. Γερμανία, Σουηδία, Ρωσία κ.ά. και αναφέρεται στη μελέτη της μικροχλωρίδας των εμπορικών "όξινων μαγιών". Οι "όξινες μαγιές εκκίνησης" που χρησιμοποιούνται από την αρτοποιία στη Γερμανία, βρέθηκε ότι περιέχουν μέχρι 9 διαφορετικά είδη γαλακτοβακίλλων (Spicher and Schorder, 1978). Μερικές από αυτές περιέχουν ένα ευρύ φάσμα από

ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια ενώ άλλες περιορισμένο αριθμό ειδών όπως φαίνεται στο επόμενο πίνακα.

Π Ι Ν Α Κ Α Σ 1

Βακτήρια και ζύμες που αναγνωρίστηκαν σε 8 εμπορικές διαφορετικές "όξινες μαγιές" στη Γερμανία (Spicher, 1983).

Είδος Μικροοργανισμού	"Όξινες μαγιές"							
	A	B	Γ	Δ	Ε	Ζ	Η	Θ
<b>Γαλακτ/λοι Ομοζυμωτικοί</b>								
<i>L.acidophilus</i>	-	+	-	-	-	+		+
<i>L.casei</i>	-	+	-	-	-			+
<i>L.plantarum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.farciminis</i>	-	+	+					+
<b>Γαλακτ/λοι Ετεροζυμ/κοί</b>								
<i>L.brevis</i>	-	+	+	-	-	+		
<i>L.brevis var.linderi</i>	-	+	-	-	-	-		+
<i>L.buchneri</i>	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>L.fermentum</i>	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>L.fructivorans</i>	+	-	-	+	-	-	+	+
<b>Ζύμες</b>								
<i>Sacch.cerevisiae</i>	+	-	-					
<i>Pichia saitoi</i>	+	+	-					
<i>Candida crusei</i>	-	+	-					
<i>Torulopsis holmii</i>	-	+	-					

Στη Δανία από το 1924 στις "όξινες μαγιές" κυριαρχούν δυο είδη ομοζυμωτικών γαλακτοβακίλλων (*L.plantarum*, *L.delbrueckii*) και τρία είδη ετεροζυμωτικών. (Lund and Hansen, 1987).

Σε μελέτη που έγινε στη Σουηδία πάνω στη μικροχλωρίδα σε 9 "όξινες μαγιές" που χρησιμοποιούνται από την αρτοποιία για την παρασκευή ψωμιού από αλεύρι σίκαλης-σίτου ή σίτου έγιναν 238 απομονώσεις. Οι 31 από τις απομονώσεις ανήκαν στην ομάδα *Thermobacterium* (*L.delbrueckii*, *L.bulgaricus*, *L.acidophilus*)

40 στην ομάδα *Streptobacterium* (*L.plantarum*, *L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.farciminis*) και 112 στην ομάδα *Betabacterium* (*L.fermentum*, *L.brevis* spp. *lindneri*, *L.viridescens*, *L.brevis*). Τέλος 55 απομονώσεις δεν μπόρεσαν να ταξινομηθούν σε κανένα από τα είδη *Lactobacillus*. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω "όξινες μαγιές" χρησιμοποιούνται από την Σουηδική αρτοποιία και ανανεώνονται συνεχώς για περισσότερο από 100 χρόνια.

Επίσης από τους Salovaara και Katumpra (1984), μελετήθηκε η μικροχλωρίδα σε 10 εμπορικές "όξινες μαγιές" εκκίνησης στην Πολωνία και 11 από οικιακές παρασκευές. Από τις 591 απομονώσεις οι 55 αναγνωρίστηκαν σαν γαλακτοβάκιλλοι με επικρατούντα είδη *L.acidophilus*, *L.plantarum* & *L.casei*. Σε παρόμοια μελέτη στην Ισπανία σε 3 εμπορικές "όξινες μαγιές" αναγνωρίστηκαν οι ζύμες *S.cerevisiae*, *Pichia polymorpha*, *Trichosporum margaritiferum*, *S.fructuum* και *Hansenula subpelliculosa* και από τους Γαλακτοβάκιλλους οι *L.plantarum* και *L.brevis*.

Κάποια περίοδο ήταν εμπορικά διαθέσιμη στη Γερμανία μια καλλιέργεια εκκίνησης, που περιείχε εκτός από τα γαλακτοβακτήρια και τις ζύμες και προπιονοβακτήρια (Spicher, 1983). Ο σκοπός της παρουσίας των προπιονοβακτηρίων ήταν η παραγωγή προπιονικού οξέος, για τη γνωστή του αντιμικροβιακή δράση. Ψωμί με 0.28% προπιονικό οξύ είχε αυξημένη διάρκεια ζωής λόγω της παρεμπόδισης ανάπτυξης των μυκήτων από το προπιονικό οξύ (Pelshenke, 1950). Αυτό όμως το αποτέλεσμα ήταν δυνατό μόνο όταν τα προπιονικά βακτήρια ήταν τουλάχιστον  $250 \cdot 10^6$  ανά g. ζύμης.

Σύμφωνα με το Spicher (1983), ο *L. brevis* var *lindneri* πρέπει να θεωρηθεί σαν ο πλέον αντιπροσωπευτικός μικροοργανισμός στην παραγωγή των "όξινων μαγιών" στην Κεντρική Ευρώπη. Είναι βάκιλλος που αναπτύσσεται δύσκολα στα συνήθη εργαστηριακά υλικά και ανευρίσκεται σε διάφορα στελέχη που χαρακτηριστικά ζυμώνουν μόνο τη γλυκόζη, μαλτόζη και μερικά τη φρουκτόζη (Spicher and Schoder, 1978).

Στην περιοχή του San Fransisco των Η.Π.Α παρασκευάζεται ένας ονομαστός τύπος όξινου ψωμιού γαλλικού τύπου. Για την παρασκευή του χρησιμοποιείται μια καλλιέργεια εκκίνησης που

περιλαμβάνει ετεροζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους και ζύμες (Kline and Sugihara 1971, Sugihara et al., 1971). Το είδος γαλακτοβακίλλου που κυριαρχεί ονομάζεται *L. sanfrancisco* και όταν ανακαλύφθηκε θεωρήθηκε νέο είδος και πήρε ονομασία της περιοχής. Αυτός ο γαλακτοβάκιλλος ζυμώνει μόνο τη μαλτόζη, απαιτεί για την ανάπτυξη του φρέσκο εκχύλισμα ζύμης, ακόρεστα λιπαρά οξέα, ατμόσφαιρα πλούσια σε CO<sub>2</sub> και όξινο περιβάλλον (pH 6.0 ή χαμηλότερο) (Kline et al., 1970. Sugihara et al., 1970). Κατά τη ζύμωση της μαλτόζης παράγεται γαλακτικό οξύ 70-80% και οξείκό 20-30%. Στον ίδιο τύπο ψωμιού υπάρχει μια ζύμη που αρχικά ταξινομήθηκε σαν *Torulopsis holmii*. Αργότερα επαναταξινομήθηκε από τον Yarrow (1978), σαν νέο είδος και ονομάστηκε *Candida milleri* sp. nov. Η σχέση μεταξύ του γαλακτοβακίλλου και ζύμης είναι σχεδόν πάντα 100:1 (Sugihara, 1985). Η ζύμη αυτή σε αντίθεση με το γαλακτοβάκιλλο δεν ζυμώνει μαλτόζη και από αυτή την άποψη οι δυο μικροοργανισμοί δεν δρούν ανταγωνιστικά στην ίδια πηγή άνθρακα. Σε αυτό το λόγο αποδίδεται και η ταυτόχρονη επιβίωσή τους για τόσα πολλά χρόνια. Αυτός ο τύπος παραδοσιακού ψωμιού στο San francisco παρασκευάζεται για περισσότερα από 150 χρόνια και θεωρείται μοναδικός.

Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα που περιλαμβάνει τη διαδικασία παρασκευής του ψωμιού αυτού, το ζυμάρι εκκίνησης περιέχει αλεύρι, νερό και μέρος από ώριμο ζυμάρι προηγούμενης παρασκευής. Το pH έχει ιδιαίτερη σημασία στην όλη διαδικασία παρασκευής του ψωμιού αυτού. Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αυτή η μικροχλωρίδα έχει επιβιώσει για τόσα πολλά χρόνια χωρίς να έχει επιμολυνθεί από άλλους μικροοργανισμούς. Χρειάζονται περίπου 8 ώρες για την ωρίμανση του ζυμαριού εκκίνησης και αυτή αναπαράγεται συνέχεια περίπου 3 φορές την ημέρα και κάθε ημέρα. Μετά την προπαρασκευή της τελικής ζύμης όπως περιγράφεται στον πίνακα και παραμονή 1 ώρα, τεμαχίζεται και πλάθονται τα ψωμιά που τοποθετούνται για ωρίμανση. Μετά από 7-8 ώρες περίπου είναι έτοιμα για φούρνισμα.

Π Ι Ν Α Κ Α Σ 2

Διαδικασία παρασκευής του όξινου τύπου ψωμιού "San Francisco" (Sugihara, 1985).

---

Παρασκευή ζύμης εκκίνησης	Παρασκευή ζύμης ψωμιού
100 μέρη απο προηγούμενο όξινο ζυμάρι	20 μέρη ζύμης εκκίνησης
100 μέρη αλεύρι (Με υψηλή γλουτένη)	100 μέρη αλεύρι (συνήθους τύπου)
46-52 μέρη νερό pH έναρξης 4.4 - 4.5 pH τελικό 3.8 - 3.9	60 μέρη νερό + 2 αλάτι pH έναρξης 5.2-5.3 pH κατά τη λήξη 3.9-4.0

---

Καθαρές καλλιέργειες εκκίνησης του *L. sanfrancisco* για εμπορική χρήση απο τα αρτοποιεία αναπτύχθηκαν απο τους Kline & Sugihara (1973, 1975). Αυτές οι καθαρές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε καθορισμένο θρεπτικό υλικό (Sugihara, 1985), συμπυκνώνονται με φυγοκέντρηση και σταθεροποιούνται είτε σαν καταψυγμένα συμπυκνώματα είτε λυοφιλιωμένα (freeze-dried). Απο τον Kline (1981) αναφέρεται επίσης μια καλλιέργεια εκκίνησης που αναπτύσσεται σε αραιό ζυμάρι με αλεύρι - νερό, σταθεροποιείται με 6% διζαχαρίτη και στη συνέχεια λυοφιλιώνεται.

Ο τύπος του ψωμιού San Francisco παρασκευάζονταν μέχρι πριν απο μερικά χρόνια μόνο στην περιοχή αυτή των Η.Π.Α όπου αποτελούσε το 20 % περίπου της συνολικής παραγωγής ψωμιού. Μετά την ανάπτυξη των καθαρών καλλιιεργειών εκκίνησης παρασκευάζεται σήμερα και σε άλλες περιοχές των Η.Π.Α και στην Ιαπωνία.

Επίσης 3 τύποι παραδοσιακού ψωμιού παράγονται στην Αίγυπτο με τις ονομασίες Balady, Fino, & Shamsy. Ο τύπος Balady αποτελεί το 90% όλων των εμπορικών τύπων ψωμιού. Ο τύπος Shamsy είναι ο παραδοσιακός τύπος που κυριαρχεί στις



οικιακές παρασκευές (El Gendy, 1983) και μαζί με τον τύπο Fino αντιπροσωπεύουν το 10% των εμπορικών τύπων ψωμιού. Για την παρασκευή του ψωμιού αυτού χρησιμοποιείται ώριμο ζυμάρι από προηγούμενη παρασκευή που ανανεώνεται με αλεύρι και νερό και τοποθετείται σε ζεστό μέρος μια ολοκληρω νύχτα. Ακολουθεί δεύτερη, τρίτη και τέταρτη φάση ζύμωσης πριν από το φούρνισμα που γίνεται συνήθως σε παραδοσιακούς φούρνους.

Η μικροχλωρίδα στη μαγιά εκκίνησης του τύπου Balady σύμφωνα με τον El Malek et al., 1974, αποτελείται από γαλακτοβακίλλους 63-64% , ζύμες 30-32%, στρεπτόκοκκους 1-2,5% μικρόκοκκους 1-2% και βάκιλλους 1-3%. Από τους Γαλακτοβάκιλλους ο *L.brevis*, *L.fermentum* & *L.plantarum* είναι πάντα παρόντες. Επίσης εμφανίζονται περιστασιακά *L.casei*, *L.helveticus*. Στη διάρκεια ωρίμανσης της ζύμης ο *L.brevis* επικρατεί και μετά από 2 ώρες αποτελεί το 75% των βακίλλων ενώ ο *L.fermentum* 21-23%. Άλλα είδη που αναπτύσσονται στη ζύμη είναι *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus varians*, *Bacillus subtilis* & *B.licheniformis*.

Το "Torsh" είναι ένα όξινο ζυμάρι που χρησιμοποιείται στο Ιράν για την παρασκευή ενός δημοφιλούς τύπου "Sangak" ψωμιού. Η μικροχλωρίδα του αποτελείται κυρίως από *L.mesenteroides*, *L.plantarum*, και *L.brevis* που αποτελούν το 77% της μικροβιακής χλωρίδας (Azar et al., 1977). Υπάρχει επίσης μικρός αριθμός από ετεροζυμωτικούς κόκκους (*P.cerevisiae*). Ζύμες ανευρίσκονται επίσης αλλά σε μικρούς αριθμούς και είναι συνήθως δυο είδη του γένους *Torulopsis*.

Τέλος στην Ιταλία παρασκευάζεται για αιώνες ένα γλυκό ψωμί (κέικ) με την ονομασία Panettone που το άρωμα και η γεύση του βασίζονται σε γαλακτική ζύμωση. Συνήθως παρασκευάζεται τις εορτές των Χριστουγέννων με μια περίπλοκη διαδικασία που διαρκεί 24 ώρες και περιλαμβάνει στη μικροχλωρίδα μια ζύμη (*S.exiguus*) και δυο ή περισσότερα γαλακτοβακτήρια με επικρατούντα τον *L.brevis* (Ottogalli and Galli, 1972).

#### Παράγοντες που επηρεάζουν την "όξινη ζύμωση"

Εκτός από τη μικροχλωρίδα που ασκεί αποφασιστικό ρόλο σε

ορισμένα χαρακτηριστικά κατά την "όξινη ζύμωση" και άλλοι παράγοντες όπως π.χ. η θερμοκρασία, ο τύπος και το είδος του αλεύρου, ο τρόπος παρασκευής της καλλιέργειας εκκίνησης κλπ. έχουν ιδιαίτερη σημασία και είναι αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών εργασιών.

O Lund και συνεργάτες του (1989), μελέτησαν την επίδραση της συνεκτικότητας του ζυμαριού που επηρεάζεται από τη σχέση αλεύρι-νερό (Dough yield), στην οξίνιση και στην παραγωγή πτητικών αρωματικών κατά την όξινη ζύμωση. Στη μελέτη χρησιμοποίησαν καθαρές καλλιέργειες από 4 ετεροζυμωτικούς και 3 ομοζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους και αλεύρι σίκαλης ολικής άλεσης για να παρασκευάσουν τη μητρική "όξινη μαγιά". Στη συνέχεια με ανάμειξη με αλεύρι και νερό σχηματίστηκαν δύο ζυμάρια, συμπαγές και ρευστό. Το πρώτο επώαστηκε για 20h στους 30°C χωρίς ανάδευση και το δεύτερο στην ίδια θερμοκρασία σε εργαστηριακό ζυμωτή και ταχύτητα ανάδευσης 600 rpm. Η παραγωγή οξέος ανά g ήταν υψηλότερη και η σχέση οξεικού προς γαλακτικό χαμηλότερη ρευστό ζυμάρι και στις ετεροζυμωτικές καλλιέργειες. Επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές στις πτητικές ουσίες μεταξύ στερεού και ρευστού ζυμαριού και μεταξύ των διαφόρων καλλιιεργειών.

Σε άλλη εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας ζύμωσης ( 25-30° C ), και δυο τύπων αλεύρου (Λευκό-Μαύρο), στις ιδιότητες του ζυμαριού και του ψωμιού, σε δυο εμπορικές "όξινες μαγιές" εκκίνησης (Salonaa and valjakka, 1987). Ο τύπος του αλεύρου ήταν ο πιο σημαντικός παράγοντας και στο μαύρο τύπο (τέφρα 1.64%) η συγκέντρωση του οξεικού οξέος στο ψωμί ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με το λευκό τύπο αλευριού (με τέφρα 0.86%). Η παραγωγή οξέων αυξήθηκε από από τους 25 στους 30° C κατά 30-50% αλλά δεν επηρεάστηκε από την προέλευση της μαγιάς. Ο ειδικός όγκος στο ψωμί ελαττώθηκε με την αύξηση της οξύτητας αλλά αυξήθηκε η διατηρησιμότητά του από 4 σε 8 ημέρες.

Τρία ετεροζυμωτικά και δυο ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν σαν καλλιέργειες εκκίνησης σε ρευστό ζυμάρι σίκαλης που ζυμώθηκε στους 25, 30, 35 και 40°C σε εργαστηριακό ζυμωτή (Hansen et al., 1989) και ερευνήθηκε η παραγωγή πτητικών μεταβολιτών και οξέων. Η πιο μεγάλη

ταχύτητα οξίνισης, παρατηρήθηκε στους 35°C όπου η οξύτητα σταθεροποιήθηκε μετά από 16 έως 20 ώρες.

Σε άλλη ερευνητική εργασία (Lonner and Akesson, 1989) μελετήθηκε η επίδραση 13 διαφορετικών ειδών ομοζυμωτικών και ετεροζυμωτικών βακτηρίων και μιας μικτής καλλιέργειας εκκίνησης από τη Δυτ. Γερμανία στις ιδιότητες του όξινου τύπου ψωμιού. Όλοι οι μικροοργανισμοί έδωσαν ικανοποιητική οξίνιση, όμως η ζύμωση με ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους έδωσε υψηλότερο ισοδύναμο οξύτητας και χαμηλότερες τιμές pH και ψωμί με πιο έντονη γεύση οξύτητας και οξείκου από τη ζύμωση με ομοζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους.

Σύμφωνα με τα συμπεράσματα άλλης ερευνητικής εργασίας τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος προκύπτουν όταν χρησιμοποιούνται κατά τη ζύμωση μικτές καλλιέργειες από ομο και ετεροζυμωτικά γαλακτοβακτήρια (Kosmina, 1977).

Οι Stegemann και Roßrich (1958), παρατήρησαν ότι όταν στην όξινη ζύμωση συμμετέχει μόνο καθαρή καλλιέργεια του ετεροζυμωτικού *L.brevis*, το ψωμί που προκύπτει έχει το επιθυμητό άρωμα αλλά υποβαθμισμένη ελαστικότητα στη ψίχα, ενώ όταν η ζύμωση γίνεται με τον ομοζυμωτικό *L.plantarum* συμβαίνει το αντίθετο.

Επίσης κατά τους Spicher και Stephan (1960) μόνο με την παρουσία των ετεροζυμωτικών εξασφαλίζεται το τυπικό άρωμα και γεύση του όξινου τύπου ψωμιού σίκαλης.

Το χλωριούχο νάτριο επηρεάζει επίσης την πορεία της "οξίνισης ζύμωσης" ακόμα και όταν βρίσκεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό π.χ. 0.1% του αλεύρου. Συνήθως αυξανόμενες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου εμποδίζουν το σχηματισμό των οξέων. (Spicher, 1983). Η ανοχή πάντως των γαλακτοβακίλλων στο αλάτι διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών. Οι ομοζυμωτικοί παρουσιάζουν συνήθως μεγαλύτερη ανεκτικότητα ενώ οι ετεροζυμωτικοί σε επίπεδο χλωριούχου νατρίου πάνω από 4% δεν είναι συνήθως ενεργοί στα "ξινά ζυμάρια".

Ο τύπος του αλεύρου, δηλαδή το ποσοστό του αλεύρου που παράγεται από 100 g σπόρων (extraction rate), επηρεάζει τη σύνθεσή του και έμμεσα την όξινη ζύμωση. Ένα αλεύρι υψηλού

ποσοτού παραγωγής, περιέχει περισσότερα ανόργανα άλατα Ca, Fe, P και βιταμίνες (B) και η ρυθμιστική ικανότητα του ζυμαριού που θα προκύψει είναι αυξημένη.

Τα παραγόμενα από τη ζύμωση γαλακτικό και αξείκο επηρεάζουν κυρίως την ανάπτυξη των ζυμών και η ανάπτυξή τους περιορίζεται γενικά σε pH κάτω από 3.7. Όταν όμως η ζύμωση είναι ομοζυμωτική οπότε παράγεται μόνο γαλακτικό τότε οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερα pH. Σε ετεροζυμωτικές ζυμώσεις όμως μια συγκέντρωση 1ml αξείκου ανά 100 g υποστρώματος (pH=3.6), αναφέρεται ότι είναι απαγορευτική για την ανάπτυξη των ζυμών (Spicher and Schroder, 1979).

#### Φυσικοχημικές και βιοχημικές διεργασίες κατά την παραγωγή του ψωμιού

Το άρωμα και η γεύση του ψωμιού οφείλονται στη συνδυασμένη δράση πολλών και διαφορετικών ουσιών που σχηματίζονται είτε στη διάρκεια της ζύμωσης είτε στη διάρκεια του φουρνίσματος.

Το ζυμάρι αποτελείται από το αλεύρι και ορισμένα άλλα προσθετικά που πρακτικά έχουν μικρή συμμετοχή στην ανάπτυξη του αρώματος. Το άμυλο και οι πρωτεΐνες είναι τα μέσα στα οποία διανέμονται οι αρωματικές ουσίες. Στη διάρκεια της ζύμωσης είτε αυτή επιτελείται από ζύμες ή από βακτήρια ή από συνδυασμένη δράση και των δυο σχηματίζεται ένας μεγάλος αριθμός λιγότερο ή περισσότερα πτητικών ουσιών όπως π.χ αλκοόλες, αλδεύδες, κετόνες, εστέρες, πτητικά λιπαρά και καρβοξυλικά οξέα κ.α.

Ορισμένες από αυτές τις ουσίες προφανώς συμμετέχουν σε διάφορες αντιδράσεις, κυρίως στο στάδιο του φουρνίσματος, που παράγουν αρωματικές ενώσεις. Τα άξινα ζυμάρια χαρακτηρίζονται από την παρουσία γαλακτικού, αξείκου και άλλων καρβοξυλικών οξέων σε διάφορες ποσότητες και αναλογίες ανάλογα με την επίδραση διαφόρων παραγόντων.

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Drews (1961), το 5-10% του γαλακτικού οξέος που βρίσκεται στο ψωμί έχει προκύψει από ενζυματική μετατροπή του μηλικού και του κιτρικού. Ο Heggman (1974), έχει προσδιορίσει τα ποσά των καρβοξυλικών οξέων σε

mg ανά 100g όξινου ψωμιού ως εξής: Μηλικό 90-200, κίτρικό 40-90, succinic 30-60 και μικρότερες ποσότητες φουμαρικού και οξαλικού. Η ολική ποσότητα οργανικών οξέων σε 100 g σπόρων σίκαλης είναι σύμφωνα με αναφορά του Schormuller και άλλων (1961), 475 mg με 143mg τρυγικό και 141 mg ηλεκτρικό οξύ.

Το μηλικό οξύ σε ώριμα όξινα ζυμάρια σίτου βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες ή απουσιάζει εντελώς. Όταν όμως η ζύμωση έχει γίνει από ζύμες η ποσότητά του αυξάνει. Ο *L. plantarum*, *L. case* & *L. brevis* διαθέτουν ενζυμικό σύστημα μετατροπής του μηλικού σε γαλακτικό και CO<sub>2</sub> (Schutz and Radler, 1974 . Hegazi and Elnaga, 1980). Το κίτρικό οξύ επίσης μετατρέπεται σε γαλακτικό και οξελικό στη διάρκεια της όξινης ζύμωσης από τα γαλακτικά βακτήρια (Drews, 1961) και ο *L. brevis* μπορεί να ζυμώσει το κίτρικό οξύ (Hegazi and Elnaga, 1980).

Το οξελικό οξύ είναι πτητικό και θεωρείται ιδιαίτερης σημασίας για την ανάπτυξη της γεύσης και του αρώματος. Μια σχέση μεταξύ γαλακτικού και οξελικού οξέος 1.5 προς 4.0 θεωρείται ότι δίνει ευχάριστη γεύση και άρωμα στα ψωμιά όξινης ζύμωσης.

Εκτός από τα παραπάνω σχηματίζονται επίσης σε μικρότερες ποσότητες ή ίχνη άλλα πτητικά λιπαρά οξέα όπως π.χ. το προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό, ισοκαπροϊκό που έχουν και αυτά σημαντική συμμετοχή στην ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης.

Τα γαλακτικά βακτήρια περιέχουν συνήθως πρωτεΐνες και πεπτιδάσες. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνει εφόσον προχωρεί η διαδικασία οξίνισης του ζυμαριού. Από τους Spicher και Nierle (1983), έχει αναφερθεί σχεδόν μια γραμμική αύξηση σε ελεύθερα αμινοξέα και ιδιαίτερα της λευκίνης, φαινυλ-αλανίνης, τυροσίνης, λυσίνης και ισολευκίνης. Οι *L. plantarum*, *L. brevis*, spp. *lindneri* & *L. fructivorans* σχηματίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων στους 35°C από ότι στους 25°C. Επίσης το υπόστρωμα ζύμωσης επηρεάζει το βαθμό της πρωτεόλυσης. Αλεύρι σίκαλης με υψηλή τέφρα στη διαδικασία οξίνισης δίνει υψηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων.

Ενας μεγάλος αριθμός φυσικοχημικών διεργασιών γίνεται στη διάρκεια του φουρνίσματος του ψωμιού. Στη φάση αυτή μπορούμε να διακρίνουμε τα παρακάτω στάδια (Spicher, 1983):

- (1). Το πρώτο στάδιο που η θερμοκρασία είναι 30-60°C ή 70°C και τα ένζυμα είναι ακόμα ενεργά.
- (2) Το δεύτερο στάδιο που η θερμοκρασία είναι από 55-60°C έως 70°C όπου έχουμε ζελατινοποίηση του αμύλου.
- (3) Ένα στάδιο εξάτμισης νερού από το τεμάχιο του ζυμαριού
- (4) Το τελικό στάδιο του καστανώματος της επιφάνειας (browning) και της ανάπτυξης των αρωματικών ουσιών.

Στη διάρκεια του πρώτου σταδίου που η θερμοκρασία δεν έχει ακόμα υπερβεί τους 45°C η ζύμωση από τις ζύμες ή τα βακτήρια συνεχίζεται με σχηματισμό CO<sub>2</sub> σε γρήγορους ρυθμούς. Επίσης η ενζυματική δραστηριότητα σε αυτό το στάδιο είναι αυξημένη. Επι πλέον η επίδραση της θερμοκρασίας που συνεχώς αυξάνει προκαλεί τη διόγκωση του CO<sub>2</sub> και περαιτέρω αύξηση του όγκου του ψωμιού μέσα στο φούρνο (oven spring). Σε θερμοκρασίες πάνω από 50°C η μικροβιακή δραστηριότητα εκμηδενίζεται και οι μικροοργανισμοί τελικά σκοτώνονται.

Ορισμένα ένζυμα όμως και κυρίως οι αμυλάσες του αλεύρου εξακολουθούν να ενεργούν και φθάνουν στο μέγιστο της δραστηριότητάς στους 60-70°C με αποτέλεσμα να έχουμε συσσώρευση υδατανθράκων δεξτρινών, μαλτόζης και γλυκόζης. Συνήθως τα ψωμιά με όξινη ζύμωση έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σαχάρων από τα ψωμιά που ζυμώθηκαν με ζύμες.

Η ζελατινοποίηση του αμύλου αρχίζει στους 55°C για το αλεύρι σίκαλης και στους 60°C για το αλεύρι σίτου και φθάνει στο μέγιστο αντίστοιχα στους 60 και 80°C (Spicher, 1983). Στη διαδικασία αυτή οι κόκκοι αμύλου διογκώνονται (κυρίως της αμυλοπηκτικής) και αυξάνεται ο όγκος τους κατά 25-50%. Με την αύξηση της θερμοκρασίας έχουμε μερική αποξήρανση και σταθεροποίηση της πορώδους δομής του ψωμιού. Η ζελατινοποίηση του αμύλου γίνεται με την επίδραση της θερμοκρασίας και του νερού που έχει προσροφηθεί στη γλουτένη του σίτου. Στη διάρκεια του φουρνίσματος και γύρω στους 70°C η γλουτένη αδρανοποιείται, το νερό απελευθερώνεται και η υφή της γίνεται σκληρή και κοκκώδης. Ένα μέρος του νερού που ελευθερώνεται απορροφάται κατά τη διαδικασία ζελατινοποίησης

του αμύλου. Με αυτό το τρόπο δημιουργείται και σταθεροποιείται η πορώδης ελαστική υφή της ψίχας του ψωμιού, δηλαδή από το άμυλο και την γλουτένη. Αντίθετα τα ψωμιά σίκαλης έχουν συνήθως μικρότερο όγκο επειδή έχουμε μόνο δομή του αμύλου και όχι γλουτένης που δεν υπάρχει στο αλεύρι σίκαλης.

Στην επιφάνεια του ζυμαριού κατά το φούρνισμα οι θερμοκρασίες είναι πολύ υψηλότερες από τα εσωτερικά και αυξάνουν γρήγορα με την απώλεια υγρασίας. Στους 110-140°C το άμυλο διασπάται μη ενζυματικά σε δεξτρίνες. Στους 140-150°C σχηματίζονται διάφορα προϊόντα καραμελοποίησης και στους 150-200°C αρωματικές ουσίες.

Επίσης σε αυτές τις θερμοκρασίες οι πρωτεΐνες διασπώνται και τα αμινοξέα και άλλα προϊόντα διάσπασης αντιδρούν με τα ζάχαρα και προκαλούν το μη ενζυματικό καστανόμα στην επιφάνεια του ψωμιού. Σε πρώτη φάση έχουμε αντίδραση μεταξύ αναγόντων ζαχάρων και αμινοξέων για να σχηματισθούν γλυκοζίτες αζώτου. Στη συνέχεια ακολουθεί μια πολύπλοκη σειρά χημικών αντιδράσεων με συμπυκνώσεις πολυμερισμούς με σχηματισμό διαφόρων ενώσεων που συμβάλλουν αποφασιστικά στην ανάπτυξη του χρώματος στην επιφάνεια του ψωμιού και του αρώματος.

Επίσης η καραμελοποίηση των ζαχάρων που γίνεται όταν η θερμοκρασία φθάσει στους 150° -400°C. έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη μιας σειράς πολυπλάκων αντιδράσεων που σχηματίζουν διάφορες ενώσεις μερικές των οποίων είναι αρωματικές όπως π.χ. απλές αλδεΐδες, κετόνες, φουρίνη, καθώς και πικρές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους. Το καλύτερο άρωμα του ψωμιού σίκαλης ή του ανάμεικτου τύπου αποδίδεται και στις υψηλές συγκεντρώσεις στο ζυμάρι πεντοζανών που αντιδρούν άμεσα με τα αμινοξέα (Spicher 1983).

Οι αρωματικές ουσίες του ψωμιού και οι διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό τους είναι αντικείμενο της μελέτης πολλών ερευνητών. Μια εμπειριστατωμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση στα συστατικά του αρώματος του ψωμιού, στις μεθόδους απομόνωσης και προσδιορισμού και στο σχηματισμό των αρωματικών ουσιών στην διάρκεια της ζύμωσης και του φουρνίσματος κλπ., είναι αυτή

που περιλαμβάνεται στα CRC-Critical Reviews in Food Technology (Maga, 1974). Ένας μεγάλος αριθμός πτητικών ουσιών (>200) έχει αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα στο ψωμί. Παντως θα πρέπει να σημειωθεί ότι από το μεγάλο αυτό αριθμό πτητικών ουσιών, μόνο μερικές έχουν την πλέον σημαντική συνεισφορά στην ανάπτυξη του αρώματος στους διάφορους τύπους ψωμιού.

**Το αλεύρι και άλλα προσθετικά και ενισχυτικά συστατικά.**

Το αλεύρι είναι το κύριο συστατικό σε όλες τις συνταγές παρασκευής ψωμιού. Στην ιδιότητά του να απορροφά νερό και να σχηματίζει μια συνεκτική και ελαστική μάζα, το "ζυμάρι", βασίζεται η παρασκευή του ψωμιού. Επι πλέον συνεισφέρει και είναι κυρίως υπεύθυνο για τις ιδιότητες και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφορετικά είδη και τύποι αλεύρων με διαφορετική σύνθεση και χαρακτηριστικά και ότι κάθε τύπος ψωμιού παρασκευάζεται με ένα ορισμένο τύπο αλεύρου. Το αλεύρι παράγεται με άλεση των σπόρων και ανάλογα με το ποσοστό που λαμβάνεται από 100 g σπόρων (extraction rate), λαμβάνονται διάφοροι τύποι αλεύρων με διαφορετική σύνθεση και θρεπτική αξία.

Το αλεύρι περιέχει γενικά, υδατάνθρακες σε μορφή αμύλου που είναι και το κύριο συστατικό, πρωτεΐνες, αμινοξέα, ανόργανα άλατα, και βιταμίνες. Το αλεύρι περιέχει επίσης πολυσαχαρίτες και ελεύθερα ζάχαρα. Τα ελεύθερα ζάχαρα που είναι συνήθως και άμεσα χρησιμοποιήσιμα από τις ζύμες ή τα βακτήρια κατά τη ζύμωση, στο αλεύρι σίτου κυμαίνονται από 1-2% ανάλογα με τον τύπο και το είδος του αλεύρου και είναι κυρίως γλυκόζη, φρουκτόζη, σαχαρόζη, μαλτόζη, ραφινόζη και μια σειρά ολιγοσαχαριτών της γλυκόζης ή φρουκτόζης (Erkki, et al., 1982).

Το αλεύρι περιέχει επίσης α- και β-αμυλάση που με το σχηματισμό του ζυμαριού μπορούν να επαναδραστικοποιηθούν και να υδρολύσουν μέρος της αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης σε μαλτόζη. Η ενζυματική δραστηριότητα στο αλεύρι σίκαλης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική.

Οι πρωτεΐνες του αλεύρου και κυρίως η γλουτένη είναι το



πιο σημαντικό λειτουργικό συστατικό που σχετίζεται με το σχηματισμό του ζυμαριού και τη διόγκωσή του κατά τη ζύμωση. Η περιεχομένη γλουτένη στο αλεύρι και τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά (ικανότητα δέσμευσης νερού - ελαστικότητα) είναι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ανάλογα με τον τύπο και το είδος του ψωμιού που θέλουμε να παρασκευάσουμε.

Το νερό που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του ζυμαριού πρέπει να είναι χαμηλής έως μέτριας σκληρότητας. Το αλάτι είναι ένα άλλο συστατικό που προστίθεται σε όλα τα προϊόντα αρτοποιίας για βελτίωση της γεύσης και για την ευνοϊκή του επίδραση στο σχηματισμό του ζυμαριού και τη διόγκωσή του. Υψηλή συγκέντρωση αλατιού μπορεί να παρεμποδίσει τις ενζυματικές αντιδράσεις. Γενικά το αλάτι προστίθεται σε ποσοστό 1.5-2 % επί του αλεύρου της συνταγής. Συνήθως στα άλευρα σίτου το ποσοστό αλατιού είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από ότι στα άλευρα σίκαλης, θεωρείται πάντως ότι περιεκτικότητα άλατος μεγαλύτερη από 1.5% αρχίζει να δρά παρεμποδιστικά στη ζυμωτική ικανότητα των ζυμών.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι συνήθως προστίθενται και ορισμένα άλλα συστατικά με σκοπό να βελτιώσουν τις λειτουργικές ιδιότητες του ζυμαριού και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Τέτοια συστατικά μπορεί να είναι λιπαρές ουσίες, ζάχαρα, σκόνη αποκορυφωμένου γάλακτος, σκόνη από αυγά, σιρόπια και άλλες ενισχυτικές ουσίες της υφής και του αρώματος.

Οι λιπαρές ουσίες έχουν γενικά ευνοϊκή επίδραση στη διατηρησιμότητα του ψωμιού, την υφή και τον όγκο του. Η κρούστα γίνεται πιο μαλακή και ελαστική. Συνήθως στην αρτοποιία χρησιμοποιούνται υδρογωμένα φυτικά έλαια με σημείο πήξης (30-40°C).

Τέλος, μια μεγάλη ποικιλία προσθετικών ουσιών όπως π.χ. ένζυμα, διογκωτικοί παράγοντες, γαλακτωματοποιητές, ζάχαρα, σιρόπια, προϊόντα γάλακτος, λεκιθίνη, οξειδωτικές και αναγωγικές ουσίες κ.α. έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία με σκοπό τη βελτίωση της αρτοποιητικής ικανότητας των διαφόρων αλεύρων και των παραγόντων της ζύμωσης. Το είδος και η ποσότητα αυτών των βελτιωτικών

ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία αναφέρονται συνήθως στους κώδικες τροφίμων των διαφόρων χωρών. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι σήμερα είναι διαθέσιμα στην αγορά τυποποιημένα μίγματα από τα παραπάνω προσθετικά και βελτιωτικά για άμεση χρήση από την αρτοποιία.

### Τεχνολογία παρασκευής ψωμιού

Η σύγχρονη παραγωγική διαδικασία των διαφόρων ειδών αρτοποιίας περιλαμβάνει τα παρακάτω βασικά στάδια:

- α) Προετοιμασία των πρώτων υλών (επιλογή, ποιοτικός έλεγχος, προετοιμασία, ζύγιση των διαφόρων συστατικών).
- β) Ανάμειξη σχηματισμός του ζυμαριού.
- γ) Επεξεργασία του ζυμαριού (διόγκωση, τεμαχισμός, διαμόρφωση σχηματισμός μονάδων αρτοποίησης, τελική διόγκωση)
- δ) Ψήσιμο στο φούρνο
- ε) Τελική επεξεργασία (ψύξη, συσκευασία, αποστείρωση ή παστερίωση κ.τ.λ.)

Διάφορες μηχανικές, φυσικές, χημικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές διεργασίες που υπεισέρχονται στην διαδικασία παρασκευής του ψωμιού μαζί με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, προκαλούν χημικές και δομικές αλλαγές στην υφή του ζυμαριού και μετατρέπουν τα βασικά συστατικά του (άμυλο - πρωτεΐνες), σε αφομοιώσιμες και οργανοληπτικά επιθυμητές μορφές.

### Ανάμειξη συστατικών σχηματισμός του ζυμαριού

Κατά το σχηματισμό του ζυμαριού είναι σημαντικό να αναμειχθούν με τον σωστό τρόπο οι διάφορες πρώτες ύλες με το νερό. Ο τύπος του αναμεικτήρα και οι συνθήκες κατά τη διαδικασία ανάμειξης των διαφόρων συστατικών παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας και κατά συνέπεια και στον τελικό όγκο και στην υφή του ψωμιού.

Εκτός από την ποιότητα των πρώτων υλών η θερμοκρασία κατά την ανάμειξη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο και εξαρτάται από τη θερμοκρασία του αλεύρου και κυρίως του νερού που

προστίθεται για το σχηματισμό του ζυμαριού. Πάντως η θερμοκρασία του νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 50°C άλλως υπάρχει κίνδυνος ζελατινοποίησης του αμύλου και βλάβης στις ζύμες ή τα βακτήρια.

Η ποσότητα του ζυμαριού που λαμβάνεται από 100 μέρη αλεύρου συν το βάρος όλων των άλλων συστατικών και του νερού που χρειάζεται, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και ονομάζεται απόδοση σε ζυμάρι (dough yield). Η απόδοση σε ζυμάρι επηρεάζει και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Κατά τον Spicher (1983), τα πιο μαλακά ζυμάρια δίνουν συνήθως καλύτερη διόγκωση και πιο αρωματικό ψωμί σε σύγκριση με τα πιο συνεκτικά.

Ο χρόνος ανάμειξης των διαφόρων συστατικών στο ζυμωτήριο για το σχηματισμό και την ανάπτυξη του ζυμαριού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως π.χ. είδος και ποιότητα αλεύρου, τύπος ζυμωτηρίου. Συνήθως τα ζυμάρια σίτου χρειάζονται μεγαλύτερους χρόνους από τα ζυμάρια σίκαλης (Spicher 1983). Η γλουτένη του σίτου είναι πιο σκληρή, δεν διογκώνεται αμέσως και χρειάζεται μεγαλύτερους χρόνους ανάμειξης σε ζυμωτήρια με μεγαλύτερες ταχύτητες περιστροφής. Η ανάπτυξη του ζυμαριού θεωρείται ότι έχει πρακτικά συμπληρωθεί όταν όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν έχουν διαβραχεί και κατανεμηθεί ομοιόμορφα.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία στη διάρκεια της ανάμειξης είναι σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην ανάπτυξη του ζυμαριού και μετά στην ωρίμανση, ζύμωση και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ζυμάρια για ψωμί σίτου πρέπει να έχουν μια θερμοκρασία 22-24°C ενώ για ψωμί σίκαλης και ανάμεικτου τύπου γύρω στους 28°C. Κατά τον Huber (1970), η χρησιμοποίηση χαμηλότερων θερμοκρασιών κατά 2-3°C, βελτιώνει τη γεύση και τη διατηρησιμότητα του ψωμιού. Ψωμί από αλεύρι σίτου που κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση του ζυμαριού εφαρμόστηκαν υψηλές θερμοκρασίες έχει μικρότερο όγκο, είναι δύσκολο να τεμαχισθεί και μπαγιατεύει γρηγορότερα (Spicher, 1983). Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι κάθε σύστημα ανάμειξης έχει τις δικές του άριστες θερμοκρασίες. Επίσης κάθε τύπος ζυμωτηρίου συντελεί σε μικρότερη ή μεγαλύτερη

αύξηση της θερμοκρασίας στη διάρκεια της επεξεργασίας. Σε ένα ταχυζυμωτήριο π.χ. με 1440 στροφές σε 1 min η θερμοκρασία μπορεί να αυξηθεί 9° (Huber, 1970).

Τέλος στη διάρκεια του σχηματισμού και της ανάπτυξης του ζυμαριού, η μηχανική επεξεργασία δεν συντελεί μόνο στην ανάμειξη και ομοιόμορφη κατανομή των διαφόρων συστατικών αλλά καθορίζει επίσης και το όριο των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Στο πρώτο στάδιο της ανάμειξης τα διάφορα συστατικά αναμειγνύονται μεταξύ τους και με το νερό που τα διαβρέχει χωρίς όμως να έχει πλήρως απορροφηθεί. Στο επόμενο στάδιο της ανάπτυξης, τα διάφορα συστατικά αντιδρούν με το νερό. Το άμυλο π.χ. απορροφά περίπου το 1/3 του βάρους του σε νερό. Οι πρωτεΐνες του αλεύρου και ειδικά η γλουτένη, απορροφούν επίσης 2-3 φορές του βάρους τους σε νερό και διογκώνονται. Ένα μέρος του νερού δεσμεύεται χημικά ενώ ένα άλλο μέρος συγκρατείται στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων ή δεσμεύεται με τριχοειδείς δυνάμεις.

Νεώτερες ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει ότι ορισμένες ουσίες του αλεύρου γνωστές πεντοζάνες, έχουν σημαντική επίδραση στην υφή και την ικανότητα συγκράτησης του νερού και του αέρα από τη ζύμη (Drews, 1971. Neucorn, 1972). Το αλεύρι περιέχει μόνο περίπου 1% διαλυτές πεντοζάνες, αλλά αυτές δεσμεύουν το ένα τρίτο του προστεθέντος νερού και σχηματίζουν και συμπαγή μάζα τύπου ζελέ. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα στα ζυμάρια από αλεύρι σίκαλης που είναι πλουσιότερο σε πεντοζάνες και στερείται γλουτένης καλής ποιότητας.

**Μέθοδοι παρασκευής και επεξεργασίας του ζυμαριού στο ψωμί σίτου.**

Στην περίπτωση αυτή η ανάμειξη των διαφόρων συστατικών μπορεί να γίνει απευθείας (Straight dough process) ή αφού πρώτα παρασκευασθεί μία "προ-ζύμη" (Sponge dough process).

Με τη μέθοδο της άμεσου παρασκευής, το αλεύρι, το νερό, το αλάτι, η "μαγιά" και όλα τα άλλα συστατικά προστίθενται συγχρόνως και ακολουθεί ο σχηματισμός, ανάπτυξη και ωρίμανση

του ζυμαριού. Η ποσότητα της "μαγιάς" που προστίθεται κυμαίνεται συνήθως από 0.5 - 4% στη μορφή της συμπιεσμένης ζύμης (compresses yeast) και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως π.χ. τις συνθήκες επεξεργασίας, την ποιότητα του αλεύρου και τη ζωτικότητα της μαγιάς.

Με τη μέθοδο της "προ-ζύμης", παρασκευάζεται κατ' αρχήν ένα ζυμάρι (sponge) με ανάμειξη μέρους του αλεύρου, του νερού και της μαγιάς και διατηρείται σε θερμοκρασία περίπου 25°C. Όταν η προ-ζύμη έχει πλήρως ζυμωθεί και ωριμάσει τότε αναμειγνύεται με το υπόλοιπο αλεύρι, το νερό και τα άλλα συστατικά και αναπτύσσεται το τελικό ζυμάρι. Η μέθοδος αυτή απαιτεί περισσότερο χρόνο πλύν όμως δίνει καλύτερη διόγκωση της ζύμης, μεγαλύτερο όγκο στο ψωμί και με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Επίσης η μεγαλύτερη διάρκεια της ζύμωσης ευνοεί την καλύτερη ανάπτυξη του αρώματος.

Τέλος στις μεγάλες αρτοποιητικές βιομηχανίες των Η.Π.Α από το 1950, παρασκευάζεται ένα ρευστό ζυμωμένο υπόστρωμα (pre-ferment) που μπορεί να μεταφερθεί με αντλίες και που χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την παρασκευή του τελικού ζυμαριού. Το υγρό αυτό υπόστρωμα περιέχει βασικά "μαγιά", ζάχαρα, ανόργανα άλατα και μέρος του αλεύρου της συνταγής, που μπορεί να φθάσει μέχρι και το 70% (Spicher, 1983). Η ρύθμιση του pH είναι ιδιαίτερης σημασίας και εξασφαλίζεται με την προσθήκη ρυθμιστικών ουσιών όπως ανοργάνων αλάτων, σκόνης αποκορυφωμένου γάλακτος ή αλεύρου (Gross et al., 1968). Η ζύμωση που γίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 30°C), ευνοεί την ανάπτυξη και βακτηριακής χλωρίδας που προέρχεται από το αλεύρι ή τη "μαγιά" που εκτός από τις ζύμες περιέχει και βακτήρια. Διάφορα είδη γαλακτοβακτηρίων που αναπτύσσονται συνήθως, παράγουν οργανικά οξέα και επιδρούν θετικά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Johnson et al., 1961).

Υγρά υποστρώματα χωρίς αλεύρι δεν αποδίδουν ικανοποιητική ανάπτυξη αρώματος. Η προσθήκη ποσότητας αλεύρου βελτιώνει τις ρεολογικές ιδιότητες, τη γεύση, τον τεμαχισμό και τη διατηρησιμότητα του τελικού προϊόντος. (Thompson, 1980).

## Μέθοδοι παρασκευής ψωμιού σίκαλης ή σίτου - σίκαλης με "όξινη ζύμωση"

Όταν στην παρασκευή του ζυμαριού έχει προστεθεί αλεύρι σίκαλης περισσότερο από 20% τότε είναι απαραίτητη η εφαρμογή διαδικασίας οξίνισης, που θα ευνοήσει την ανάπτυξη του χαρακτηριστικού αρώματος και γεύσης (γαλακτικό και οξικό οξύ) και θα εμποδίσει ανεπιθύμητες ζυμώσεις από άλλα βακτήρια και ζύμες. Σε συνάρτηση με τον τύπο του ψωμιού και την αναλογία του αλεύρου σίκαλης στη συνταγή το τελικό pH μπορεί να είναι 4.2-4.7 και ο βαθμός οξύτητας 6.0-14.0 (mL 0.1N NaOH/10g).

Για την εκκίνηση της διαδικασίας οξίνισης χρησιμοποιείται ένα ενοφθαλμίσμα (seed) που μπορεί να είναι:

(α) Ένα εμπορικό παρασκεύασμα με επιλεγμένη μικροβιακή χλωρίδα εκκίνησης, (commercial sour dough starter culture)

(β) Ένα μέρος από προηγούμενο όξινο ζυμάρι.

(γ) Ένα "όξινο ζυμάρι" που έχει υποστεί αυτόματη ζύμωση με τη φυσική χλωρίδα. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα σε χώρες της Κ. Ευρώπης σε ορισμένους τύπους ψωμιού.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι σήμερα είναι διαθέσιμες εμπορικά, καλλιέργειες εκκίνησης για "όξινη ζύμωση". Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι η χρησιμοποίηση καθαρών καλλιεργειών σε αυτήν την περίπτωση δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα επιτυχής σε σύγκριση π.χ. με τις καθарές "μαγιές" αρτοποιίας (Spicher, 1983).

Η οξίνιση επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους που διακρίνονται από την αναλογία αλεύρου με το νερό, το ποσό του ενοφθαλμίσματος (seed) της "όξινης μαγιάς" που χρησιμοποιείται, τη σχέση μεταξύ του αλεύρου του επομένου σταδίου και του ζυμαριού του προηγούμενου σταδίου, τη θερμοκρασία και το χρόνο ζύμωσης. Η παραδοσιακή επεξεργασία οξίνισης γίνεται σε πολλά διαδοχικά στάδια ενώ έχουν αναπτυχθεί και επεξεργασίες οξίνισης με λιγώτερα στάδια καθώς επίσης και μια διαδικασία σε υψηλό επίπεδο χλωριούχου νατρίου (Salt sour process).

## Φούρνισμα του ψωμιού (Baking)

Τα τεμάχια του ζυμαριού μετά την τελική τους διαμόρφωση και διογκωση που γίνεται μέσα σε ειδικούς θαλάμους με αυξημένη θερμοκρασία και υγρασία, μεταφέρονται στο φούρνο. Κατά το στάδιο αυτό που είναι το πιο ενεργοβόρο στη διαδικασία παρασκευής του ψωμιού, το διογκωμένο ζυμάρι μετατρέπεται σε ψωμί με τη σταθεροποίηση της υφής και το σχηματισμό διαφόρων αρωματικών ουσιών. Το διοξειδίο του άνθρακα που υπάρχει σε μορφή φυσαλίδων μέσα στη μάζα του ζυμαριού ή είναι διαλυμένο στην υγρή φάση διογκώνεται με τη θέρμανση και προκαλεί μια αύξηση του όγκου του τεμαχίου ζύμης κατά 40% περίπου και μια κατά 10% περίπου αύξηση της επιφάνειας της (Kriems, 1970). Οι συνθήκες που μπορούν να επηρεάσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ψωμιού στη φάση αυτή είναι η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, ο χρόνος φουρνίσματος, καθώς επίσης και ο τύπος του φούρνου.

Η θερμοκρασία φουρνίσματος συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 200-250°C. Το ψωμί σίτου χρειάζεται μια ομοιόμορφη θερμοκρασία στη διάρκεια του φουρνίσματος, ενώ της σίκαλης και τα ανάμεικτα σίκαλης υψηλότερη θερμοκρασία στην αρχή και βαθμιαία μείωση στη συνέχεια (Spicher, 1983). Στους παραδοσιακούς φούρνους με την άμεση θέρμανση, η πολύ υψηλή θερμοκρασία στην αρχή (350-450°C) και η γρήγορη πτώση της στους 150°C έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχυρού αρώματος.

Η θέρμανση του τεμαχίου του ζυμαριού κατά το φούρνισμα γίνεται με επαγωγή. Η θερμότητα μεταδίδεται από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του τεμαχίου. Η θερμοκρασία στο κέντρο ανεβαίνει αργά και σπανίως υπερβαίνει τους 100°C. Κατά τον Scheneeweiss (1965), πρέπει όταν η θερμοκρασία στο εσωτερικό του τεμαχίου έχει φθάσει στους 98°C, το τεμάχιο να αφηθεί ακόμα 10 min στο φούρνο.

Η σχετική υγρασία μέσα στο φούρνο είναι ιδιαίτερης σημασίας. Συνήθως για να προληφθεί ο γρήγορος σχηματισμός της κρούστας και να δοθεί ο χρόνος στο τεμάχιο να πάρει τον επιθυμητό όγκο διοχετεύεται ατμός χαμηλής πίεσης στο φούρνο στην αρχή του φουρνίσματος. Με αυτό τον τρόπο μια ποσότητα

ατμού συμπυκνώνεται στην επιφάνεια των τεμαχίων και την διατηρεί υγρή και ελαστική για ορισμένο χρόνο.

Η απόδοση σε ψωμί (bread yield) από 100Kg αλεύρι εξαρτάται κυρίως από τις απώλειες στη διάρκεια τού φουρνίσματος και δευτερευόντως από τις απώλειες στα προηγούμενα στάδια και κυρίως της ζύμωσης που κυμαίνονται από 1-3% επί του βάρους του αλεύρου. Είναι προφανές ότι στη διάρκεια του φουρνίσματος εξατμίζεται υγρασία από το ζυμάρι και μειώνεται το βάρος του (8-14%). Οι απώλειες βάρους κατά το φούρνισμα οφείλονται κατά 95% στην απώλεια υγρασίας και κατά 5% σε απώλεια άλλων πτητικών συστατικών.

Η περιεκτικότητα σε υγρασία στο ψωμί κυμαίνεται από 34-41% και είναι διαφορετική στο εσωτερικό (ψίχα) (Drews and Stephan 1963).



## ΤΟ ΡΕΒΙΘΙ ΑΠΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΨΗ

### Ταξινόμηση στοιχεία παραγωγής

Το ρεβίθι (*Cicer arietinum*) ανήκει στην οικ. Fabaceae. Συνήθως σπείρεται χύδην και σε γραμμές και το φυτό είναι χαμηλό με ξυλώδες διακλαδιζόμενο στέλεχος και σύνθετα φύλλα. Τα σπέρματα σχηματίζονται μέσα σε κάψες με χνοώδη επιφάνεια και υφάλμυρη γεύση. Κάθε κάψα περιέχει συνήθως 2 σπέρματα. Η συγκομιδή γίνεται το θέρος και συνήθως τα φυτά εκριζώνονται και αφού σχηματισθούν μικρά δέματα αφήνονται στο έδαφος για να αποξηραθούν τελείως. Τα σπέρματα διαχωρίζονται είτε με κτυπήματα με τα χέρια για να σπάσουν οι κάψες είτε με μηχανικά μέσα. Από την παραπάνω διαδικασία και λόγω της μορφολογίας του φυτού είναι προφανές ότι οι κάψες του φυτού και τα σπέρματα έρχονται σε επαφή με το έδαφος, από όπου και το πιθανότερο αντλούν την τελική τους μικροβιακή χλωρίδα. Τα ρεβίθια προωθούνται στην κατανάλωση είτε χύδην σε τσουβάλι είτε συσκευασμένα σε σακκούλες πολυαιθυλενίου.

Υπάρχουν ποικιλίες ρεβιθιών που διαφέρουν ως προς το μέγεθος των σπερμάτων (μεγαλόσπερμοι, μεσόσπερμοι, μικρόσπερμοι), ως προς το σχήμα (στρογγυλό, ακανόνιστο, με λιγώτερο ή περισσότερο ρυτιδωμένη επιφάνεια) και ως προς το χρώμα του περισπερμίου (λευκό, κιτρινωπό, πράσινο, καφέ, μαύρο). Στην Ελλάδα καλλιεργούνται κυρίως τα μεγαλόσπερμα ρεβίθια με λευκό ή κιτρινωπό περισπέρμιο και ανώμαλη εξωτερική επιφάνεια και καταναλώνονται ως όσπρια ή μεταποιούνται σε στραγάλια (Ηλιάδης, 1985).

Η ολική παγκόσμια παραγωγή ρεβιθιών κυμαίνεται γύρω στους 6.200 μετρικούς τόννους (MT) σύμφωνα με στοιχεία 1982 και κατανέμεται στις διάφορες περιοχές σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 3 (FAO Production year book, 1982)

Από την παγκόσμια παραγωγή το 90% παράγεται στην Ασία. Η Ινδία μόνη της συμμετέχει στην παγκόσμια παραγωγή με 75%. Άλλες χώρες που παράγουν σημαντικές ποσότητες ρεβιθιών είναι η Τουρκία, το Πακιστάν, το Μεξικό, η Αιθιοπία κ.α.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Παγκόσμια ετήσια παραγωγή ρεβιθιών

Περιοχή	Εκταση χιλ.εκτάρια	Παραγωγή χιλ.Μ.Τ.
Αφρική	387	301
Β.Κ.Αμερική	238	260
Ν.Αμερική	38	19
Ασία	9.413	5.492
Ευρώπη	137	85
Παγκόσμια	10.213	6.158

Το ρεβίθι μαζί με τα άλλα όσπρια, έχουν ιδιαίτερη σημασία στη διατροφή του ανθρώπου, σαν πηγές πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ανοργάνων στοιχείων και βιταμινών, σε ορισμένες κυρίως περιοχές του κόσμου όπου η παραγωγή κρέατος είναι περιορισμένη. Τα όσπρια συνήθως περιέχουν 2 έως 3 φορές περισσότερες πρωτεΐνες από τα δημητριακά. Ο συνδυασμός όσπριων και δημητριακών προμηθεύει συνήθως όλα τα απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα.

#### Χημική σύσταση

Επειδή τα σπέρματα του ρεβιθιού αποτελούν το υπόστρωμα και παρέχουν όλα τα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του επτάζυμου, θα δώσουμε ιδιαίτερη έμφαση στα βιβλιογραφικά στοιχεία που αναφέρονται στην χημική τους σύσταση.

Το σπέρμα του ρεβιθιού αποτελείται από τρία βασικά μέρη. Την εξωτερική στοιβάδα (περισπέρμιο), τις κοτυληδόνες και το έμβρυο. Το περισπέρμιο αποτελεί το 14.5-16.5 % του βάρους του σπόρου, οι κοτυληδόνες το 82.9-84.0 % και το έμβρυο 1.2-1.5 % (Chavan and Salunkhe, 1986). Το έμβρυο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπαρές ουσίες και ανόργανα στοιχεία, το περισπέρμιο σε κυτταρίνες και ασβέστιο και οι κοτυληδόνες σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες.

Τα βασικά θρεπτικά στοιχεία που περιέχονται στα σπέρματα του ρεβιθιού καθώς και η διακύμανσή τους εμφανίζονται στον πίνακα 4 (Chavan and Salunkhe, 1986. Singh et al., 1984 ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Χημική σύσταση σπερμάτων ρεβιθιού (gr/100gr)

Συνθεση %	Σπέρματα ολόκληρα		Αποφλοιωμένα	
	Διακύμανση	μ. όρος	Διακύμανση	Μ. όρος
Πρωτεΐνες (Nx6.25)	12.4-30.6	21.5	20.5-30.5	25.5
Ολ. υδατάνθρακες	52.4-70.9	61.7	63.0-65.0	64.0
Τέφρα	2.5-4.67	3.6	2.1-3.7	2.9
Λιπίδια	3.1-6.9	5.0	4.5-7.5	6.0
Ακατ. κυτταρίνη	1.2-13.5	8.0	0.9-1.5	1.2

#### Πρωτεΐνες

Απο τα στοιχεία του πίνακα 4 σημειώνουμε ιδιαίτερα το υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών στους σπόρους του ρεβιθιού ( 21.5%) που κατανέμονται κυρίως στις κοτυληδόνες και το έμβρυο. Παράγοντες όπως η ποικιλία και ορισμένοι περιβαλλοντολογικοί όπως εδαφικός τύπος, άρδευση, λίπανση επηρεάζουν το ποσοστό πρωτεϊνών των σπόρων. Πολλές ερευνητικές εργασίες της διεθνούς βιβλιογραφίας αναφέρονται σε αυτό το θέμα ( Singh et al., 1974, 1982. Gurta and Kapoor, 1980).

Η βιολογική αξία των πρωτεϊνών του ρεβιθιού, όπως προσδιορίζεται από διάφορες βιολογικές μεθόδους, αναφέρεται ότι είναι ανώτερη σε σχέση με την αξία των πρωτεϊνών άλλων σπέρτων ( Khan et al., 1979. Patwardham, 1962). Κατά τους Pak and Barja (1974), οι διάφορες ποικιλίες ρεβιθιών περιέχουν πρωτεΐνες με υψηλότερες τιμές T.D (True Digestibility), B.V (Biological Value) και N.P.U (Net Protein Utilization) από τις πρωτεΐνες ποικιλίας μπιζελιών (cowpeas) και υψηλότερες τιμές σε N.P.U από της σόγιας, του αρακά, των φασολιών και τις φακές. Θα πρέπει όμως να

σημειωθεί ότι και οι πρωτεΐνες των ρεβιθιών θεωρούνται ότι είναι ελλειμματικές σε αμινοξέα που περιέχουν θείο καθώς και τρυπτοφάνη, θρεονίνη και βαλίνη ( Rao and Subramanian, 1979. FAO Report 1970).

Οι πρωτεΐνες του εμβρύου είναι ανώτερης βιολογικής αξίας από επειδή τα ποσοστά της λυσίνης, της θρεονίνης και βαλίνης είναι υψηλότερα.

#### Υδατάνθρακες

Οι σπόροι του ρεβιθιού περιέχουν υδατάνθρακες σε ποσοστό 52.4-70.9% συνολικά και το άμυλο είναι ο υδατάνθρακας που κυριαρχεί, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα που περιλαμβάνει τις τιμές για τα διάφορα είδη υδατανθράκων που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Περιεκτικότητα % των σπερμάτων ρεβιθιού σε υδατάνθρακες  
(Chavan et al., 1986. Shobhana et al., 1976. Singh, 1984)

Συστατικό	%
Ολικός υδατάνθρακες	52.4 - 70.9
Άμυλο	37.2 - 50.8
Άμυλόζη, % συνόλου	31.8 - 45.8
Διαλυτά ζάχαρα	4.8 - 9.0
Αναγωγικά ζάχαρα	0.1
Ζαχαρόζη	0.7 - 2.9
Ραφινόζη	0.5 - 3.0
Βερμπασκόζη	0.1 - 4.5
Σταχυόζη	1.1 - 3.4
Μαννινοτριόζη	2.3
Ακατ. κυτταρίνη	7.1 - 13.5
Κυτταρίνη	7.1 - 9.7
Ημικυτταρίνη	3.5 - 8.5
Πηκτινικές ουσίες	1.5 - 3.8
Λιγνίνη	2.2 - 5.9

Το επίπεδο του αμύλου στα σπέρματα ρεβιθιού κυμαίνεται από 37.2-50.8% και των διαλυτών ζάχαρων από 4.8 - 9.0% . Τα ζάχαρα είναι κυρίως μη αναγωγικά όπως η σαχαρόζη και οι ολιγοσαχαρίτες ραφινόζη, βερμπασκόζη, σταχυόζη και μαννινοτριόζη. Τα αναγωγικά ζάχαρα ευρίσκονται σε πολύ χαμηλό επίπεδο 0.1% . Τα ρεβίθια είναι πιο πλούσια σε ολιγοσαχαρίτες σε σύγκριση με άλλα όσπρια (Sosulski et al., 1982). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ολιγοσαχαρίτες αυτοί της οικογένειας ραφινόζη που περιέχουν στο μόριό τους γαλακτόζη, για την πλήρη υδρόλυσή τους απαιτούν την επίδραση δυο ενζύμων της ιμπερτάσης και α-γαλακτοζοξειδάσης. Επειδή δε ο εντερικός σωλήνας του ανθρώπου και των ζώων δεν παράγει α-γαλακτοζοξειδάση (Gitzelman and Muricchio, 1965), η ζύμωση των ολιγοσαχαριτών αυτών γίνεται στο παχύ έντερο (large intestine) από μικροοργανισμούς που παράγουν μεγάλες ποσότητες υδρογόνου, διοξειδίου του άνθρακα και μικρές ποσότητες μεθανίου. Τα αέρια αυτά προκαλούν τυμπανισμό και άλλες εντερικές διαταραχές (Reddy et al, 1980).

Οι κυτταρίνες που είναι το τρίτο βασικό στατιστικό των υδατανθράκων στο ρεβίθι, κυμαίνονται από 7.1 έως 13.5% είναι συγκεντρωμένες κυρίως στο περισπέρμιο και αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Κατά τον Singh και συνεργάτες του (1983), οι κυτταρίνες του περισπέρμιου των ρεβιθιών έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα μείωσης του επιπέδου χοληστερίνης στο αίμα (hypocholesterolemic effect), σε σύγκριση π.χ. με μπιζέλια, φασόλια, φακές.

#### Λιπίδια, Ανόργανα συστατικά, Βιταμίνες

Τα ολικά λιπίδια στο ρεβίθι κυμαίνονται από 3.1-6.9% (πίνακας 4). Τα τριγλυκερίδια των λιπαρών οξέων και η λεκιθίνη είναι τα κυριώτερα είδη των λιπαρών ουσιών (Ghirardi et al., 1974). Τα οξέα που περιέχονται στον πίνακα 5. Μεταξύ των λιπαρών οξέων κυριαρχούν τα ακόρεστα (18:1, 18:2, 18:3) με ποσοστό 67.13% , ενώ τα κορεσμένα είναι μέχρι 10.42% . Μεταξύ δε των κορεσμένων κυριαρχεί το παλμιτικό και των ακόρεστων το λινολεϊκό οξύ. Κατά τους Murthy and Urs (1985),

τα λιπίδια των ρεβιθιών έδειξαν επίσης μειωτική επίδραση στο επίπεδο χοληστερίνης στον ορό αίματος σε πειραματόζωα.

Τα ρεβίθια θεωρούνται επίσης σαν καλή πηγή ανοργάνων στοιχείων όπως π.χ. ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, σιδήρου και καλίου. Οι τιμές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιλαμβάνονται στον πίνακα 6 ( Chavan et al.,1986. Shobhana et al.,1976 . Pak and Barja, 1974. Jambunathan and Singh, 1981).

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Περιεκτικότητα ρεβιθιών σε ανοργάνια στοιχεία  
ρεβιθιού (mgr/100gr.δείγματος)

Μεταλλικό στοιχείο	Διακύμανση
Φωσφόρος	244.0 - 458.0
Ασβέστιο	93.0 - 259.0
Μαγνήσιο	91.7 - 168.0
Σίδηρος	3.0 - 10.6
Χαλκός	0.6 - 2.1
Ψευδάργυρος	1.5 - 4.2
Νάτριο	9.8 - 150.1
Κάλιο	692.3 - 1028.4

Το ασβέστιο είναι κυρίως συγκεντρωμένο στο περίβλημα του σπέρματος (Sankar et al.,1981). Το ρεβίθι αναφέρεται επίσης σαν καλή πηγή σιδήρου. Κατά τον Cowan και συνεργάτες του (1967), η διαθεσιμότητα του σιδήρου είναι υψηλότερη στα ρεβίθια σε σύγκριση με άλλα όσπρια.

Βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την περιεκτικότητα των σπερμάτων του ρεβιθιού σε βιταμίνες περιλαμβάνει ο πίνακας 7 (Chavan et al,1986. Rao and belavady,1980. Aliya and geervani, 1981).

### ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Περιεκτικότητα σε βιταμίνες των σπερμάτων ρεβιθιού  
(mgr/100gr.)

Βιταμίνη	Διακύμανση
Θειαμίνη	0.28 - 0.40
Ριβοφλαβίνη	0.15 - 0.3
Πυριδοξίνη	0.55
Ασκ.οξύ	2.15 - 6.00
Νιασίνη	1.6 - 2.9
Καρωτένιο	0.12
Φυλλικό οξύ	0.15

#### Επεξεργασία και χρήσεις των σπερμάτων του ρεβιθιού

Τα ρεβίθια είτε χρησιμοποιούνται απευθείας ολόκληρα ή αποφλοιωμένα και μαγειρεύονται ως όσπριο είτε μετατρέπονται σε διάφορα προϊόντα πριν καταναλωθούν. Στις χώρες της Αφρικής και της Ασίας τα ρεβίθια αποφλοιώνονται και στη συνέχεια αλέθονται σε αλεύρι που χρησιμοποιείται στην παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων. Στη χώρα μας, αλλά και σε άλλα μέρη του κόσμου, τα ρεβίθια ολόκληρα ή αποφλοιωμένα χρησιμοποιούνται στην παραγωγή στραγαλιού.

Επίσης τα σπέρματα του ρεβιθιού συγκομίζονται όταν είναι ακόμα πράσινα και τρυφερά και είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, ζάχαρα, ανόργανα συστατικά και βιταμίνες (Ramanathan et al., 1970) και χρησιμοποιούνται σε μίγματα λαχανικών ή κονσερβοποιούνται σε άλμη. Τέλος σε ορισμένα μέρη του κόσμου αφήνονται να προβλαστήσουν ή να ζυμωθούν πριν χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων όπως θα αναφέρουμε παρακάτω.

Το μαγείρεμα ολόκληρων ή αποφλοιωμένων ρεβιθιών με βρασμό σε νερό για 1-2 ώρες μαζί με διάφορα καρυκεύματα είναι ένας παραδοσιακός τρόπος παρασκευής σε πολλά μέρη του κόσμου. Και στη χώρα μας υπάρχουν διάφοροι παραδοσιακοί τρόποι μαγειρέματος των ρεβιθιών. Συνήθως τα ρεβίθια ενυδατώνονται

με εμβάπτιση σε νερό για 6-12 ώρες, με ή χωρίς την προσθήκη σάδας, πριν από το μαγείρεμα.

Για την επιτάχυνση του χρόνου βρασμού των ρεβιθιών, αλλά και των άλλων οσπρίων γενικά, έχουν αναφερθεί διάφοροι χειρισμοί. Ο Chavan και οι συνεργάτες του (1980) χρησιμοποίησαν ένα διάλυμα με 1.5%  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 0.75% κιτρικό οξύ, για εμβάπτιση των σπόρων πριν από το μαγείρεμα. Εμβάπτιση των σπόρων για 6 h είχε σαν αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του χρόνου βρασμού κατά 80% .

Η προβλάστηση των σπερμάτων με εμβάπτιση σε νερό πριν από το μαγείρεμα, είναι επίσης μια κοινή παραδοσιακή τεχνική που εφαρμόζεται σε διάφορα μέρη του κόσμου. Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την επίδραση της προβλάστησης των σπόρων στη χημική σύνθεση, στην ποιότητα των πρωτεϊνών και στη συμπεριφορά κατά το μαγείρεμα των ρεβιθιών (Rao and Belavady, 1978 .Jaya et al., 1975, 1979, 1981. Azhar et al., 1972). Η προβλάστηση γενικά, επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του προϊόντος και συντελεί στη δραστική μείωση του χρόνου βρασμού. (Ganeshkumar et al., 1978). Επίσης η προβλάστηση συντελεί στην ελάττωση του πρωτεϊνικού азώτου των σπόρων, των κυτταρινών, των ολικών υδατανθράκων, των ζαχάρων και των ολιγοζαχαριτών καθώς επίσης και των μεταλλικών στοιχείων.

Εχουν επίσης γίνει αρκετές έρευνες σχετικά με τη χρήση του ρεβιθιού στην αποτελεσματική βελτίωση της θρεπτικής αξίας των δημητριακών καθώς επίσης και σε διάφορα μίγματα τροφών πρωτεϊνικής βάσης (Jaya and Venkataraman, 1979. Joseph et al., 1962. Angel and Del, 1978. Daniel et al., 1965, 1968. Shurpalekar et al., 1962. Guttikar et al., 1965. Doraiswamy et al., 1969). Έτσι π.χ. παρασκευάσθηκε τροφή πλούσια σε πρωτεΐνη, με ανάμειξη αλεύρων φιστικιού με χαμηλά λιπαρά, ρεβιθιού και ιχθυαλεύρων, με ενίσχυση σε βιταμίνες, και ασβέστιο. (Shurpalekar et al., 1962).

Επίσης ο Doraiswamy και άλλοι (1969), παρασκεύασαν από αλεύρι φιστικιού, βαμβακόσπορου και ρεβιθιού σε αναλογία (40:40:20) αντίστοιχα, τροφή πλούσια σε πρωτεΐνη κατάλληλη για παιδιά αφού ημερήσια δόση 45 gr από αυτή τη τροφή ενισχυμένη με ασβέστιο και βιταμίνες, βελτίωσε σημαντικά την ανάπτυξη και τη θρεπτική τους κατάσταση.



Από όλα τα παραπάνω συνάγεται ότι το ρεβιθάλευρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα μίγματα τροφών πλουσίων σε πρωτεΐνη με πολύ καλά αποτελέσματα.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης, η χρησιμοποίηση αλεύρων απο όσπρια για την ενίσχυση των πρωτεϊνών σε διάφορα προϊόντα αρτοποιίας (Luh et al., 1975). Το αλεύρι απο σόγια χρησιμοποιείται μάλιστα σήμερα σε πολλές περιπτώσεις. Αλευρα επίσης απο άλλα όσπρια και το ρεβίθι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο επίπεδο 5-10% στη παραγωγή ψωμιού αποδεκτού οργανοληπτικά (Hallab et al., 1974. Finney et al., 1982). Ο Hallab και οι συνεργάτες του αναφέρουν τη χρησιμοποίηση ρεβιθάλευρου σε ποσοστό μέχρι 50% για τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας ενός τύπου αραβικού ψωμιού (πλν. 8).

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Επίδραση της προστιθέμενης ποσότητας ρεβιθάλευρου στη θρεπτική ποιότητα του Αραβικού ψωμιού  
(Hallab et al., 1974)

Είδος ψωμιού	Πρωτεΐνη %	Λίπος %	Κυτ/ρίνη %	Τέφρα %	Εκχ/σμα ελεύθερο αζώτου %	Λυσίνη mgr/grN
Ψωμί μάρτυρας	11.57	1.03	2.97	1.80	82.63	140
Αλεύρι ρεβίθι	22.09	6.05	3.80	2.85	65.21	460
Ψωμί με:						
10% ρεβίθι	15.58	1.11	1.25	2.44	79.62	165
20% "	16.24	1.38	1.48	2.70	78.2	218
30% "	17.11	1.82	1.63	2.92	76.52	244
40% "	17.62	2.80	1.71	3.13	74.74	-
50% "	18.20	3.36	1.94	3.14	72.89	-

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η οργανοληπτική αξιολόγηση των παραπάνω τύπων ψωμιού έδειξε ότι το ρεβιθάλευρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι 20% για να είναι το τελικό προϊόν αποδεκτό οργανοληπτικά.

Σε άλλη ερευνητική εργασία, αναφέρεται ότι δεν βρέθηκαν

σημαντικές διαφορές στην ποιότητα του ψωμιού, όταν χρησιμοποιήθηκε ρεβιθάλευρο για την ενίσχυση σιτάλευρου (Youseff et al., 1976). Τέλος κατά τον Finney και άλλους (1982), αλεύρι από προβλαστημένα ρεβίθια μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποσοστό 15 έως 20% για ενίσχυση του αλεύρου σίτου και τη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ψωμιού.

Παρασκευή παραδοσιακών προϊόντων με ζύμωση δημητριακών και οσπρίων, σε διάφορα μέρη του κόσμου.

Η Ινδία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα σε ρεβίθι. Στη χώρα αυτή αλλά και σε άλλες χώρες της Ν.Α Ασίας το ρεβίθι σε συνδυασμό ή μη με δημητριακά, χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων που χρησιμοποιούνται κυρίως σαν εδέσματα. Αυτά τα προϊόντα διακρίνονται σε αυτά που σε κάποια φάση της διαδικασίας παρασκευής μεσολαβεί ζύμωση του υποστρώματος (ζυμωμένα) και σε αυτά που μετά την ανάμειξη των υλικών χωρίς ενδιάμεση ζύμωση, παρασκευάζονται απ'ευθείας π.χ. με τηγάνισμα, φούρνισμα κλπ.

Διάφορα είδη ζυμωμένων προϊόντων που παρασκευάζονται από όσπρια και δημητριακά ή συνδυασμό αυτών αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της διατροφής του ανθρώπου στη ΝΑ Ασία στην Εγγύς Ανατολή και σε χώρες της Αφρικής. Με τη ζύμωση επιτυγχάνονται επιθυμητές αλλαγές στη σύνθεση και υφή του μίγματος με αποτέλεσμα : α) τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ( Αρωμα, γεύση, εμφάνιση) της διατηρησιμότητας και της θρεπτικής αξίας β) την εξάλειψη δυσάρεστων οσμών και γ) τη μείωση του χρόνου μαγειρέματος. Γενικά η διαδικασία αυτή της παρασκευής κάνει τα προϊόντα αυτά περισσότερο αποδεκτά στον καταναλωτή σε σύγκριση με τα ακατέργαστα όσπρια (Reddy et al., 1980).

Οι Chavan και Kadam (1989) σε εργασία τους κάνουν εκτενή αναφορά στα διάφορα παραδοσιακά προϊόντα που παράγονται με ζύμωση δημητριακών καθώς και στη σχετική μικροχλωρίδα που εμπλέκεται στη διαδικασία παρασκευής όπου αυτή έχει μελετηθεί. Στον πίνακα 30 στο παράρτημα I, περιλαμβάνονται

συνοπτικά τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η χλωρίδα είναι μικτή από βακτήρια, ζύμες, μύκητες ή συνδυασμό αυτών. Τα πιο κοινά βακτήρια που απομονώθηκαν στις διάφορες ζυμώσεις δημητριακών ή μιγμάτων δημητριακών-οσπρίων, ανήκουν στα γένη *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* και *Bacillus*. Δεν αναφέρονται είδη του γένους *Clostridium*. Επίσης έχει διαπιστωθεί η παρουσία διαφόρων ειδών μυκήτων του γένους *Aspergillus* αλλά και *Faecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* και *Trichothecium*. Επίσης ζύμες των γενών *Torulopsis* και *Trichosporum* έχουν απομονωθεί σε ορισμένες ζυμώσεις.

Το *Tempreh* είναι ένα παραδοσιακό προϊόν που παρασκευάζεται στην Ινδονησία με ζύωση σόγιας ή άλλων οσπρίων με το μύκητα *Rhizopus oligosporus*. Πριν από τη ζύωση οι ξεροί σπόροι ενυδατώνονται για ορισμένο χρόνο μέσα σε νερό και απομακρύνονται οι εξωτερικοί φλοιοί. Το νερό της εμβάπτισης μπορεί να οξεινωθεί με γαλακτικό οξύ (*Steinkraus et al.*, 1960), με οξεικό οξύ ή εμβολιασμό με *L. plantarum* (*Steinkraus et al.*, 1965). Η οξίνιση του νερού εμβάπτισης θεωρείται αναγκαία από τους *David and Verna* (1981), για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης κατά τη ζύωση ανεπιθύμητων βακτηρίων. Από τους *Ashenafi and Busse* (1991), μελετήθηκε η μικροχλωρίδα σε οξεινωμένο ή μη νερό ενυδάτωσης σπόρων σόγιας, μπιζελιών, ρεβιθιών και horsebean για παραγωγή *Tempreh*. Η ενυδάτωση έγινε στους 30°C για 24h. Οι οξυγαλακτικοί στρεπτόκοκκοι βρέθηκαν να κυριαρχούν γενικά ενώ στο μη οξεινωμένο νερό αναπτύχθηκαν σε μεγάλους αριθμούς τα κολιβακτήρια και οι ζύμες. Η σύνθεση της χλωρίδας στη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Κατά τον *Mulyowidarsa* και άλλους (1989), στους 20°C επικρατούν οι *L. casei*, *Staph. epidermitis* ενώ στους 30°C *L. casei*, *S. faecium*, *S. dysgalactiae*. Κατά τον *Nout* και άλλους (1987), στους 25°C επικρατεί ο *L. plantarum* και στους 37°C *Pediococcus* spp.

Στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζεται η διαδικασία παρασκευής τριών παραδοσιακών τροφών από ρεβίθι στην Ινδία, με τα τοπικά ονόματα DHOKLA, KHAMAN και DOSA (*Chavan and*

Salunkhe, 1986). Στα προϊόντα αυτά χρησιμοποιείται ρεβιθάλευρο σε συνδυασμό με ριζάλευρο και ξινόγαλα. Το υπόστρωμα που διαμορφώνεται είναι σε ρευστή μορφή (χυλός) και αφήνεται να ζυμωθεί για 6-12 ώρες, συνήθως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

#### A) DHOKLA

ΑΛΕΥΡΙ ΑΠΟ ΡΕΒΙΘΙ (100gr)

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ 100ML ΝΕΡΟ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ 25% ΞΙΝΟΓΑΛΑ

ΕΠΩΑΣΗ 12 ΩΡΕΣ 32°C

ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΚΑΡΥΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΣΚΟΡΔΟ, ΑΛΑΤΙ, ΖΑΧΑΡΗ  
ΚΑΙ ΣΟΔΑ

ΚΤΥΠΗΜΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΥΛΟΥ

ΑΤΜΙΣΗ ΣΕ ΑΒΑΘΗ ΧΥΤΡΑ ΚΑΙ ΛΙΓΟ ΛΑΔΙ 10-15MIN

ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΡΤΥΜΑΤΩΝ

#### B) KHAMAN

ΑΛΕΥΡΙ ΑΠΟ ΡΕΒΙΘΙ + ΜΑΥΡΟ ΨΩΜΙ + ΡΥΖΙ  
(150gr) (150gr) (300gr)

ΧΟΝΔΡΟΑΛΕΣΜΑ

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ ΞΙΝΟΓΑΛΑ ΓΙΑ 8 ΩΡΕΣ

ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΚΑΡΥΚΕΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΟΔΑ

ΑΤΜΙΣΗ ΣΕ ΑΒΑΘΗ ΧΥΤΡΑ ΜΕ ΛΙΓΟ ΛΑΔΙ (10MIN)

ΚΟΨΙΜΟ ΣΕ ΤΕΜΑΧΙΑ

Γ) DOSA

ΑΛΕΣΜΕΝΟ ΡΕΒΙΘΙ + ΡΥΖΙ

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΣΕ ΝΕΡΟ ΓΙΑ 5 ΩΡΕΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ

ΑΛΕΣΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΥΛΟΥ

ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΚΑΡΥΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΤΗΓΑΝΙΣΜΑ ΜΕ ΛΙΓΟ ΛΑΔΙ ΣΕ ΛΕΠΤΕΣ ΠΙΤΕΣ

ΤΥΛΙΓΜΑ ΣΕ ΡΟΛΟ ΜΕ ΛΑΧΑΝΙΚΑ ΚΑΙ ΚΑΡΥΚΕΥΜΑΤΑ

Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν κατά τη ζύμωση των παραπάνω τροφών περιλαμβάνονται στον πίνακα 9.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

Παραδοσιακά είδη ζυμωμένων τροφίμων με ρεβίθι στην Ινδία και η μικροχλωρίδα που εμπλέκεται σε αυτά (Reddy et al., 1980).

Όνομασία	Υποστρώματα	Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται
Dhokla	ρύζι ή σίτος ρεβίθι	Leuconostoc mesenteroides Lactobacillus fermenti Streptococcus faecalis
Dosa	ρύζι+ρεβίθι	L. mesenteroides L. delbrueckii L. fermenti S. faecalis Bacillus sp. Yeasts
Khaman	ρεβίθι	L. mesenteroides L. fermenti L. lactis Pediococcus acidilactici Bacillus sp.

Έχει επίσης αναφερθεί ένα προϊόν που παρασκευάζεται με ζύμωση φιστικιού, ρεβιθιού, και σόγιας με την ονομασία miso. Το τελικό προϊόν είναι πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, ζαχάρων και ανοργάνων στοιχείων. Η ζύμωση που γίνεται με καθαρή καλλιέργεια συντελεί σε σημαντική αύξηση των αναγόντων ζαχάρων και γενικά στη βελτίωση της θρεπτικής αξίας (Rao et al., 1968, 1972).

Στην Ελλάδα παρασκευάζεται επίσης από ρεβίθι ένα παραδοσιακό έδεσμα με την ονομασία "Ρεβιθοκεφτέδες". Για την παρασκευή του τα ρεβίθια εμβαπτίζονται για 12 περίπου ώρες σε νερό, στη συνέχεια αλέθονται και αναμειγνύονται με διάφορα καρυκεύματα και αλεύρι. Παρασκευάζεται χυλός που σε μικρές ποσότητες τηγανίζεται σε καυτό λάδι. Το προϊόν αυτό δεν έχει μελετηθεί ως προς τη μικροχλωρίδα που πιθανά αναπτύσσεται στη φάση της ενυδάτωσης των σπόρων και που πιθανόν έχει επίδραση στην παραπέρα διαδικασία παρασκευής.

Εκτός από τις παραπάνω χρήσεις, που στη φάση της παρασκευής μεσολαβεί μια φάση επώασης για ζύμωση του υποστρώματος, το ρεβίθι σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές βρίσκει και άλλες χρήσεις. Στην Ινδία π.χ. αλεύρι από ρεβίθι μόνο του ή σε συνδυασμό με ριζάλευρο ή σιτάλευρο ή πατατάλευρο χρησιμοποιείται στην παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων. Αφού αναμειχθούν τα διάφορα συστατικά και προστεθούν καρυκεύματα και άλλα συστατικά, γίνεται συνήθως τηγάνισμα μέσα σε λάδι (Chavan and Salunkhe, 1986).

Επίσης από τους Zamora και Fields (1979) έχει μελετηθεί η ζύμωση μπιζελιών και ρεβιθιών με σκοπό την αύξηση της θρεπτικής τους αξίας. Συγκεκριμένα σπόροι από τα παραπάνω είδη αφού πλύθηκαν με νερό ξηράθηκαν στους 50-55°C, στη συνέχεια αλέστηκαν και παρασκευάστηκε ζυμάρι που ενισχύθηκε με ζάχαρη 5% και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25°C) για 4 ημέρες. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τα ρεβίθια και τα μπιζέλια ήταν ο *Lactobacillus casei*, *L.leichmanii*, *L.plnantarum*, *Pediococcus pentosaceus* & *P.acidilactici*. Ο *Lactobacillus helveticus* βρέθηκε μόνο στη ζύμωση των ρεβιθιών. Όλοι οι παραπάνω μικροοργανισμοί είναι

ομοζυμωτικό και συνετέλεσαν στη σημαντική αύξηση της οξύτητας και μείωση του pH. Δεν απομονώθηκαν καθόλου ετεροζυμωτικοί μικροοργανισμοί καθώς επίσης και παθογόνοι. Συγχρόνως με τη ζύμωση παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής θρεπτικής αξίας σε σύγκριση με το μάρτυρα. Στα ζυμωθέντα ρεβίθια παρατηρήθηκε επίσης μείωση της θειαμίνης και της ραφινόζης. Τέλος στα παραπάνω ζυμωθέντα προϊόντα δεν ανιχνεύθηκαν τοξικές ουσίες.

Από τον Verma (1984), μελετήθηκε η χρησιμοποίηση αλεύρου απο ρεβίθι σένα τύπο φρέσκου λουκάνικου στην Αγγλία. Αντικατάσταση του προστιθέμενου αμύλου μέχρι 30% με αλεύρι απο ρεβίθι δεν έδωσε σημαντικές διαφορές σε διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με τη διαφορά ότι τα λουκάνικα με αλεύρι απο ρεβίθι ήταν πιο μαλακά στην υφή.

Τέλος αναφέρεται χρήση του αλεύρου απο ρεβίθι στην παρασκευή διαφόρων μιγμάτων σούπας λαχανικών, ιδιαίτερα σε χώρες της Ν.Α. Ασίας και κυρίως στην Ινδία (Chavan and Salunkhe, 1986).

Απο την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αναφέρθηκε προηγουμένως μπορούν να συνοψισθούν τα παρακάτω:

Στην παρασκευή των διαφόρων τύπων ψωμιού σίτου, τόσο στη χώρα μας όσο και στις άλλες χώρες χρησιμοποιούνται οι καθαρές ζύμες αρτοποιίας που παρασκευάζονται σήμερα βιομηχανικά και διατίθενται στο εμπόριο σε διάφορες μορφές.

Σε χώρες της Ευρώπης (Γερμανία, Δανία) και στις ΗΠΑ παρασκευάζονται εμπορικά, διάφοροι τύποι ψωμιού σίκαλης ή σίτου-σίκαλης με χρήση "όξινης μαγιάς" που περιλαμβάνει μικτή χλωρίδα από ζύμες και γαλακτοβάκιλους. Η παρασκευή της "όξινη μαγιάς" με τον παραδοσιακό τρόπο βασίζεται στην αυτόματη ζύμωση από την ενδογενή μικροχλωρίδα, σε ένα ζυμάρι σίκαλης ή σίκαλης -σίτου.

Σήμερα είναι διαθέσιμες εμπορικά έτοιμες "όξινες μαγιές" με ελεγχόμενη μικροχλωρίδα καθώς και καλλιέργειες εκκίνησης για όξινες μαγιές.

Διάφοροι τύποι ψωμιού παρασκευάζονται με παραδοσιακή τεχνική σε πολλές χώρες σε περιορισμένη κλίμακα. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται σαν μαγιές "όξινα προζύμια" που αναπαράγονται συνεχώς για δεκαετίες.

Το ρεβίθι είναι ένα σημαντικό όσπριο ιδιαίτερα σε ορισμένες περιοχές του κόσμου. Είναι σημαντική πηγή διαιτητικών πρωτεϊνών, υδατανθράκων, βιταμινών της ομάδας Β, ανοργάνων στοιχείων και διαιτητικών ινωδών ουσιών όταν καταναλώνεται χωρίς αποφλοιωση.

Οι βασικές μέθοδοι επεξεργασίας των ρεβιθιών που περιλαμβάνουν άλεση, προβιάση, κονσερβοποίηση, μαγείρεμα και ζύμωση αποσκοπούν κυρίως βελτίωση της θρεπτικής και οργανοληπτικής τους αξίας.

Η ζύμωση του ρεβιθιού όπου αυτή γίνεται, είτε στο αλεύρι από ρεβίθι μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα υποστρώματα (δημητριακά, γάλα) έχει σκοπό να μεταβάλλει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και το τελικό μίγμα συνήθως υφίσταται πριν καταναλωθεί κάποιας μορφής θερμική επεξεργασία (ψήσιμο στο φούρνο, τηγάνισμα σε λάδι κλπ).

Στη βιβλιογραφία δεν αναφέρεται χρησιμοποίηση της μικροχλωρίδας του ρεβιθιού μετά από φυσική ζύμωση σε νερό, σαν καλλιέργεια εκκίνησης για παραγωγή ψωμιού.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Σχεδιασμός της έρευνας

Η υλοποίηση των ερευνητικών στόχων αυτής της μελέτης όπως έχουν αναφερθεί στην εισαγωγή, έγινε σε 5 διαδοχικές φάσεις με τα σχετικά πειράματα, όπως φαίνεται παρακάτω:

#### I. Μελέτη της ζύμωσης του αλεσμένου ρεβιθιού σε νερό.

1. Πορεία της ζύμωσης και της εξέλιξης του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού, στους 32, 37 και 42°C.
2. Μελέτη της ζύμωσης και της μικροχλωρίδας στους 37°C.

II. Απομόνωση, αναγνώριση και μελέτη του μικροοργανισμού που είναι υπεύθυνος για τη διάσπαση του ζυμαριού στο επτάζυμο.

1. Απομόνωση, περιγραφή και αναγνώριση του μικροοργανισμού που θα αναφέρεται σαν BE (Βάκιλλος Επτάζυμου).
2. Ανάκτηση του BE και από άλλους σπόρους δημητριακών και οσπρίων
3. Πορεία της ζύμωσης του υποστρώματος R.C.M από τα διάφορα στελέχη του BE.
4. Παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων.
5. Διαχωρισμός και μελέτη των πρωτεϊνών του κυττάρου με S.D.S Gel Electrophoresis
6. Μελέτη δυνατότητας χρησιμοποίησης διαφόρων πηγών άνθρακα από τα διάφορα στελέχη του BE με API 50CHL και API 20A

III. Μελέτη ορισμένων βιοχημικών χαρακτηριστικών του στελέχους BE Κρήτης 1989.

1. Ανάπτυξη σε Reinforced Clostridium medium σε διαφορετικές θερμοκρασίες (15, 25, 32, 37, 42, 45 και 50°C)
2. Παραγωγή αερίου (ποιοτική, ποσοτική) κατά την ανάπτυξη του BE σε R.C.M στους 42°C.

3. Πορεία ζύμωσης διαφόρων ξαχόρων και αμύλου σε R.C.M στους 42°C.

4. Ανάπτυξη σε διαφορετικά επίπεδα χλωριούχου νατρίου στους 42°C.

5. Εξέλιξη φορτίου σε R.C.M στους 42°C, σε συσχετισμό με την αύξηση της οπτικής πυκνότητας και την παραγωγή βιομάζας.

IV: Παραγωγή καλλιέργειας εκκίνησης από το στέλεχος BE Κρήτης 1989.

1. Μελέτη υποστρώματος αλεύρου ολικής άλεσης σε μορφή εναιωρήματος 5% και 10% για την ανάπτυξη του BE.

2. Παρασκευή και μελέτη καλλιέργειας εκκίνησης και συντήρηση υπο ψύξη, κατάψυξη και λυοφιλίωση.

V. Μελέτη ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών στο "Επτάζυμο" σε σύγκριση με τον παραδοσιακό τύπο ψωμιού.

#### Μεθοδολογία πειραμάτων

Για τη μελέτη της πορείας της ζύμωσης στο ρεβίθι χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο γυάλινες κωνικές φιάλες. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποστειρωμένο και περιείχε χλωριούχο νάτριο 0.5%. Ο καρπός είχε αλεσθεί σε μύλο της Pro-labo μέσα σε ανοξείδωτο δοχείο με σφαιρίδια και ζυγίζονταν απευθείας μέσα στη φιάλη ζύμωσης που μαζί με το νερό είχε προθερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία που επρόκειτο να μελετηθεί. Η αναλογία καρπού προς νερό ήταν 1:10 (w/v). Είχε προετοιμασθεί ανάλογος αριθμός φιαλών ώστε σε κάθε χρόνο ανάλυσης αποσύρονταν μία για τη διενέργεια των μετρήσεων.

Για τη μελέτη της μικροχλωρίδας η άλεση των σπόρων έγινε σε αποστειρωμένο δοχείο Blender με αποστειρωμένο νερό σε αναλογία 1:10 χωρίς προσθήκη χλωριούχου νατρίου. Το αλεσμένο δείγμα διανεμήθηκε στη συνέχεια μέσα σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που τοποθετήθηκαν σε επώαση στους 37°C.

Η μελέτη της πορείας ζύμωσης του υποστρώματος R.C.M από τα διάφορα στελέχη του BE, πραγματοποιήθηκε μέσα σε

γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου είχαν διανεμηθεί 12ml υποστρώματος και στη συνέχεια είχαν αποστειρωθεί. Ο εμβολιασμός των σωλήνων έγινε από καλλιέργεια 20 ωρών των διαφόρων στελεχών στο ίδιο υπόστρωμα με φορτίο περίπου  $8 \log/ml$  για όλα τα στελέχη. Όγκος ενοφθαλμίσματος 0.12ml ανά σωλήνα. Η επώαση των σωλήνων πραγματοποιήθηκε στους 42°C και πριν από τον εμβολιασμό οι σωλήνες είχαν προθερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία. Είχε προπαρασκευασθεί κατάλληλος αριθμός σωλήνων από κάθε στέλεχος ώστε σε κάθε χρόνο ανάλυσης αποσύρονταν 2 σωλήνες για την πραγματοποίηση των διαφόρων αναλύσεων και μετρήσεων. Η ίδια τεχνική εφαρμόσθηκε για τη μελέτη της ανάπτυξης του BE KP-89, σε διαφορετικές θερμοκρασίες, σε διαφορετικά επίπεδα NaCl καθώς και σε ορισμένα ζάχαρα σε R.C.M στους 42°C

Για τη μελέτη της πορείας ανάπτυξης στο υπόστρωμα R.C.M σε συσχετισμό με την αύξηση της οπτικής πυκνότητας και την παραγωγή βιομάζας το υπόστρωμα διανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αφού αποστειρώθηκε εμβολιάσθηκε με καλλιέργεια 20h του μικροοργανισμού, στο ίδιο θρεπτικό υλικό. Για τον υπολογισμό της βιομάζας ένας ορισμένος όγκος του θρεπτικού υλικού μεταφέρονταν σε προξυγισμένα πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρου. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν 3 φορές στις 5000 στροφές με δυο πλύσεις του ιζήματος με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια έγινε ξήρανση στους 65°C υπό κενό. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε φασματοφωτόμετρο SPECTRONIC 20 της BAUCH AND LOMB, σε κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1cm σε μήκος κύματος 600nm.

Για τις προκαταρκτικές δοκιμές της μελάσσας σαν υποστρώματος ανάπτυξης του BE, το αρχικό συμπυκνωμένο προϊόν αφού αραιώθηκε με νερό σε επίπεδα διαλυτών στερεών 0.75% και 1.5%, ενισχύθηκε με την προσθήκη NaCl 0.5% και μίγματος αμμωνιακών αλάτων 0.2% που αναφέρονται ότι χρησιμοποιούνται στη μελάσσα για την καλλιέργεια των ζυμών αρτοποιίας και εμβολιάσθηκε μετά την αποστείρωσή του με καθαρή καλλιέργεια του BE. Το θρεπτικό υπόστρωμα που παρασκευάσθηκε με αυτό το τρόπο είχε διανεμηθεί σε όγκο 15ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Στη συνέχεια αντί του μίγματος των αμμωνιακών αλάτων το

αραιωμένο προϊόν της μελάσσας ενισχύθηκε με την προσθήκη οξεικού νατρίου, υδροχλωρικής κυστεινης και αμύλου που περιλαμβάνονται στο υπόστρωμα R.C.M, στις ίδιες αναλογίες.

Για την παρασκευή των διαφόρων υποστρωμάτων αλεύρου, γίνονταν ζύγιση απευθείας μέσα σε νερό θερμοκρασίας περίπου 60°C με 0.5% χλωριούχο νάτριο και σχηματίζονταν εναιώρημα με έντονη ανάδευση. Ο εμβολιασμός από καθαρή καλλιέργεια του BE γίνονταν όταν η θερμοκρασία ήταν γύρω στους 45°C. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διαδικασία παρασκευής των υποστρωμάτων αλεύρου δεν τηρήθηκαν ασηπτικές συνθήκες.

Η τεχνική παρασκευής της καλλιέργειας εκκίνησης που συντηρήθηκε με ψύξη, κατάψυξη και λυοφιλίωση περιγράφεται αναλυτικά στα επι μέρους σχετικά πειράματα. Για την λυοφιλίωση της καλλιέργειας εκκίνησης χρησιμοποιήθηκε συσκευή SECFROID Ελβετικού οίκου κατασκευής. Η λυοφιλίωση γίνονταν μέσα σε ανοξείδωτους αβαθείς δίσκους με το δείγμα σε βάθεία κατάψυξη πριν από την τοποθέτηση στη συσκευή λυοφιλίωσης. Για την κατάψυξη των δειγμάτων στους -85°C καθώς και τη συντήρηση δειγμάτων και καλλιεργειών στην ίδια θερμοκρασία, χρησιμοποιήθηκε ο υπερκαταψύκτης της FORMA SCIENTIFIC BIO FREEZER.

Η παρασκευή των διαφόρων τύπων ψωμιού έγινε στο εργαστήριο. Η ανάμειξη των διαφόρων συστατικών για τη παρασκευή του ζυμαριού έγινε σε αναμείκτη της HOMBART N-506 τριών ταχυτήτων σε ανοξείδωτο δοχείο όγκου 4 λίτρων.

#### Πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν

Επειδή η έρευνα αυτή αναφέρεται βασικά στη μελέτη της μικροχλωρίδας του ζυμούμενου ρεβιθιού που χρησιμοποιείται στην πράξη για την παρασκευή του επτάζυμου, έγινε προμήθεια ρεβιθιών από περιοχή του Νομού Ηρακλείου Κρήτης την περίοδο 1989 & 1990. Η συγκομιδή έγινε απευθείας στο χωράφι και αφού τα σπέρματα διαχωρίστηκαν από τις κάψες και άλλα φυτικά υπολείμματα, συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακκούλες και συντηρήθηκαν μέχρι τη χρησιμοποίηση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έγινε επίσης προμήθεια ρεβιθιών από τις

περιοχές Αθήνου και Κορίνθου και συντήρηση με τον ίδιο τρόπο. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν επίσης και σπόροι από σιτάρι, καλαμπόκι και φασόλι. Ο τρόπος χειρισμού των σπόρων αυτών αναφέρεται στα επι μέρους πειράματα.

Για την παρασκευή ψωμιού ή άλλων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε κυρίως αλεύρι ολικής άλεσης που παρασκευάσθηκε στο εργαστήριο, καθώς επίσης και αλεύρι εμπορίου τύπος Νο.1, μύλων Αγ. Γεωργίου. Για την παρασκευή του αλεύρου ολικής άλεσης το σιτάρι αφού καθαρίσθηκε από ξένες ύλες, πλύθηκε αρκετές φορές με ζεστό νερό βρύσης. Στη συνέχεια απλώθηκε σε λεπτή στρώση σε ανοξείδωτους δίσκους και αποξηράνθηκε σε ρεύμα θερμού αέρα στους 70-80°C. Το ξηρό σιτάρι αλέσθηκε για παρασκευή αλεύρου σε εργαστηριακό μύλο της SAMAR F100.

#### Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή και η σύνθεσή τους σε (gr/lit) περιλαμβάνονται στον πίνακα 10.

Το βασικό υπόστρωμα που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και θεωρείται άριστο για την καλλιέργεια του Βάκιλλου του επτάζυμου είναι το Reinforced Clostridial Agar (R.C.A) σε στερεή μορφή και το Reinforced Clostridial Medium (R.C.M) σε υγρή μορφή. Το R.C.A. και R.C.M. που αναφέρεται στον πίνακα είναι τροποποιημένο σε σχέση με αυτό που αναφέρεται στο OXOID Manual 5th edition 1982 ως προς το επίπεδο της δεξτρόσης. Συγκεκριμένα στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν η περιεκτικότητα της δεξτρόσης ήταν 10gr/lit αντί 5gr/lit. Το R.C.A και R.C.M. περιλαμβάνουν στη σύνθεσή τους υδροχλωρική κυστεΐνη ένα ισχυρό αναγωγικό παράγοντα και γι αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για την καλλιέργεια και απορρόμηση των Κλωστριδίων, Γαλακτοβακίλλων καθώς και άλλων ανασεροβίων μικροοργανισμών.

Η ανάπτυξη των διαφόρων στελεχών του Βάκιλλου του επτάζυμου στο υγρό υπόστρωμα R.C.M γίνονταν μέσα σε ερμητικά κλειστά φιαλίδια όσο και ανοικτούς δοκιμαστικούς σωλήνες.

Για την πραγματοποίηση των διαφόρων πειραμάτων τα διάφορα στελέχη του Β.Ε συντηρήθηκαν με συνεχείς ανανεώσεις στο σε R.C.M μέσα γυάλινα φιαλίδια με βιδωτό πώμα και με 18ml περίπου υποστρώματος. Η καλλιέργεια του Β.Ε στο στερεό υπόστρωμα R.C.A πραγματοποιήθηκε συνήθως με την τεχνική της ενσωμάτωσης ή επιφανειακής στρώσης στη συνέχεια διπλής στρώσης από το ίδιο θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία που παρσκευάζονταν με αυτόν τον τρόπο τοποθετούνταν σε επώαση σε ατμόσφαιρα καθαρού αζώτου μέσα σε ειδικό κλίβανο αναερόβιωσης THELKO G.G.A της PRECISION SCIENTIFIC. Ο κλίβανος αυτός ήταν συνδεδεμένος εξωτερικά με αντλία κενού και οβίδα αζώτου. Επίσης για την επώαση σε αναερόβιες χρησιμοποιήθηκε το Gas generating Kit, anaerobic system, code No. Br 38 της Oxoid.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι για τη μελέτη της πορείας ζύμωσης διαφόρων ζαχάρων και συγκεκριμένα της γλυκόζης, φρουκτόζης, λακτόζης, σαχαρόζης καθώς και του αμύλου χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα R.C.M με τη σύνθεση που περιλαμβάνεται στον πίνακα και το ανάλογο ζάχαρο κάθε φορά σε επίπεδο 1% εκτός του αμύλου που ήταν σε επίπεδο 0.5%. Επίσης για τη μελέτη της δυνατότητας ανάπτυξης του Β.Ε σε αυξανόμενη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου χρησιμοποιήθηκε το ίδιο υπόστρωμα με συγκεντρώσεις NaCl από 0-5%.

Το Plate Count Agar (P.C.A) χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα γενικής χρήσης για την απαρίθμηση αερόβιων βακτηρίων.

Το Rose - Bengal Chloramphenicol Agar (R.B.C) είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση ζυμών και μυκήτων. Το υπόστρωμα έχει ουδέτερο pH (7.2-+0.2) και περιέχει το αντιβιοτικό chloramphenicol SR 78 της OXOID και τη χρωστική Rose Bengal που απορροφάται από τις αποικίες των ζυμών και μυκήτων, περιορίζει το μέγεθός τους και διευκολύνει την απαρίθμηση.

Το υπόστρωμα Violet Red Bile Agar (V.R.B.A) (CM 107 της OXOID) περιλαμβάνει στη σύνθεσή του 10gr/lit λακτόζη και συνιστάται ως εκλεκτικό υπόστρωμα για την πιθανή απαρίθμηση των κολιβακτηρίων στα γαλακτοκομικά και άλλα είδη τροφίμων, American Public Health Association (1972), I.D.F., (1958)

και Druce et al., (1957).

Το υπόστρωμα violet, Red, Bile, Glucose, Agar (V.R.B.G.A) CM 485 της OXOID, περιλαμβάνει στη σύνθεσή του αντί της λακτόζης γλυκόζη, σε επίπεδο 10gr/lit και σε αυτό διαφέρει ουσιαστικά από το προηγούμενο. Για τη μελέτη της αρνητικής κατά Gram χλωρίδας στα τρόφιμα, συνιστάται η χρησιμοποίηση του υποστρώματος V.R.B.A CM 107 της OXOID, για τα *Coli-aerogenes* που ζυμώνουν την λακτόζη και το V.R.B.G.A CM 485 τα εντεροβακτήρια που ζυμώνουν τη γλυκόζη. Για την απορίθμηση των μικροοργανισμών συνιστάται συνήθως η παρασκευή ενσωμάτωσης με 0.1 ή 1ml δείγματος και η επώαση για 20-24h στους 37°C

Το υπόστρωμα C.F.C είναι το *Pseudomonas Agar Base* CM449 της OXOID και συμπληρώνεται με το αντιβιοτικό C.F.C SR103 που περιέχει 0.005g Ceftrimide, 0.005 gr Fucidin και 0.025gr Cephaloridine σε μια αμπούλα. Το C.F.C Agar συνιστάται για την εκλεκτική απομόνωση γενικώς ειδών *Pseudomonas spp.* σε διάφορα είδη τροφίμων.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης το υπόστρωμα SFP AGAR που αναπτύχθηκε από τους Shahidi και Ferguson (1971), για την ποιοτική ανίχνευση της παρουσίας του *C. perfringens* στα τρόφιμα. Το υπόστρωμα αυτό περιέχει γαλάκτωμα κρόκου αυγού για τη διαπίστωση της υδρόλυση της λεκιθίνης, εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο και πυροθειώδες νάτριο που συντελούν στο χρωματισμό των αποικιών στο μαύρο λόγω της παραγωγής H<sub>2</sub>S

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένα υποστρώματα που ευνοούν τη σποριογονία των κλωστριδίων. Χρησιμοποιήθηκε κατ' αρχήν τροποποιημένο υπόστρωμα R.C.M. με μικρότερο ποσοστό γλυκόζης (0-3%) με ή χωρίς προσθήκη μικρής ποσότητας θειϊκού μαγγανίου. Επίσης παρασκευάστηκε υπόστρωμα RCA και RCM με εκχύλισμα εδάφους. Για το σκοπό αυτό 50gr εδάφους τοποθετήθηκαν σε πημό και εκχυλίστηκαν με ζεστό νερό βρύσης σε όγκο 1000ml. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη διάλυση των συστατικών του υποστρώματος. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το κλασσικό υπόστρωμα του Ellner's ειδικό για την σποριογονία του *Cl. perfringens* και τα θρεπτικά υποστρώματα που αναφέρονται από τους Kim et al.,

(1967) και Duncan και Strong (1968). Στο υπόστρωμα Duncan και Strong, το άμυλο διαλύεται χωριστά σε μικρή ποσότητα νερού και στη συνέχεια προστίθεται το θερμό διάλυμα με τα υπόλοιπα συστατικά.



ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Βασικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύνθεσή τους σε gr /lt

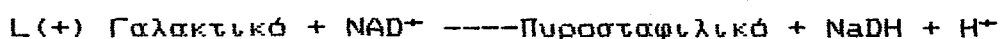
Είδος συστατικού της OXDID	Κωδικός υποστρώματος						
	RCA	RCM	PCA	RBC	VRBA	VRBGA	CFC
Yeast Extract	3	3	2.5		3	3	
Lab Lemco POWder	10	10					
Peptone	10	10		5	7	7	
Dextroze	10	10	1	10		10	
Soluble starch	1	1					
Sodium chloride	5	5			5	5	
Sodium acetate	3	3					
Cystein hydrochloride	0.5	0.5					
Agar	15	0.5	9	15.5	12	12	11
Tryptone			5				
Dipotassium phosphate				1			
Magnesium sulphate				0.5			
Rose Bengal (mgr)				50			
Chloramphenicol (mgr)				100			
Bile salts No.3					1.5	1.5	
Lactose					10		
Neutral red (mgr)					30	30	
Crystal violet (mgr)					2	2	
Casein hydrolysate							10
Potassium sulphate							10
Magnesium chloride							1.4
CFC SR103							*
Gelatin peptone							16

\* Cetrimide, Fusidin 10mgr Cephaloridin 50mgr

## Μέθοδοι ανάλυσης

### 1. Προσδιορισμός L-Γαλακτικού οξέος

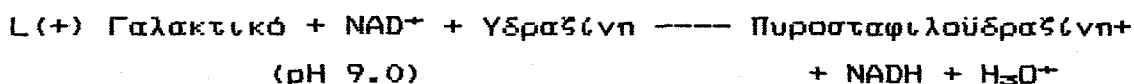
Η μέθοδος είναι ενζυματική και αναπτύχθηκε από Gutmann και Wahlefeld (1974). Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, το L-Γαλακτικό οξύ οξειδώνεται από το NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) παρουσία της αφυδρογονάσης του L-Γαλακτικού (L-LDH) σε πυροσταφυλικό σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Ο σχηματισμός του NADH μετράται με την αύξηση της απορρόφησης στα 340, 334 ή 365nm. Επειδή η παραπάνω αντίδραση είναι αμφίδρομη, για να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός πρέπει τα προϊόντα της αντίδρασης να δεσμεύονται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση προς τα δεξιά.

Για το σκοπό αυτό τα ιόντα υδρογόνου δεσμεύονται σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα και το πυροσταφυλικό με Υδραζίνη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.

LDH



Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του Γαλακτικού ήταν της Boehringer:

Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει φυγοκέντρηση του υποστρώματος ανάπτυξης στις 12.000 στρ./min και λήψη ποσότητας από την υπερκείμενη φάση για τον προσδιορισμό που δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 0.1gr L-Γαλακτικό ανά λίτρο. Για τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος K20 της HELLENIC LABWARE.

### 2. Προσδιορισμός Γλυκόζης

Η γλυκόζη προσδιορίσθηκε ενζυματικά, με τη μέθοδο που

αναπτύχθηκε από τον Werner και άλλους, (1970). Χρησιμοποιήθηκε το Kit GOD-PERID της Boehringer Mannheim GmbH Δυτ. Γερμανίας. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:

GOD



POD



GOD = Γλυκοξοξειδάση (Glucose Oxidase)

POD = Υπεροξειδάση (Peroxidase)

ABTS= Di-ammonium 2,2 azino-bis (3ethylbenzothiaroline -6-sulfonate)

Η γλυκόζη οξειδώνεται με GOD σε Γλυκονικό με ταυτόχρονη παραγωγή  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  αντιδρά με ABTS παρουσία POD για να σχηματισθεί χρωματισμένο σύμπλοκο. Όλα τα ένζυμα και η χρωμογόνο ουσία (ABTS) περιλαμβάνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer), με  $\text{pH}=7.0$ .

Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε σε φασματοφωτόμετρο SPECTRACOMP 602 της CARLO ERBA.

### 3. Προσδιορισμός αερίων υπερκεείμενης φάσης.

Ο βάκιλλος του επτάζυμου είναι έντονα ετεροαερωτικός. Κατά τη ζύμωση του υποστρώματος R.C.M, παράγεται μεγάλη ποσότητα αερίων. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αερίων στη διάρκεια της ζύμωσης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του μικροοργανισμού μέσα σε κλεισμένα ερμητικά φιαλίδια με ελαστικό πώμα τύπου πενικιλίνης. Τα παραγόμενα αέρια της ζύμωσης δεν βρίσκουν δίοδο διαφυγής και συγκεντρώνονται στην υπερκεείμενη αέρια φάση. Για την ανάλυση λαμβάνονταν με σύριγγα 1ml από την υπερκεείμενη αέρια φάση και έγχυση απευθείας στο χρωματογράφο.

Χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος της Perkin Elmer εφοδιασμένος με μονάδα επεξεργασίας δεδομένων, αθόνη

παρουσίασης των δεδομένων της ανάλυσης και ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (T.C). Η ανάλυση έγινε σε κολώνα (A) Porapak (50/80) 12ft x 1/8" συνδεδεμένης εν σειρά με κολώνα (B) Molecular Sieve SA (60/80) 15ft x 1/8". Ο προγραμματισμός θερμοκρασίας φούρνου κατά την ανάλυση ήταν 37°C για 3.8min και μετά άνοδος στους 100°C με βήμα 25°C/min και παραμονή για 4 min. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κολώνα (B) μπορεί με ένα χειροκίνητο μοχλό να απομονωθεί από την εν σειρά σύνδεση και μετά να επανασυνδεθεί. Η δυνατότητα αυτή χρησιμοποιείται στη μέθοδο αυτή για να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των αερίων διοξειδίου, αζώτου και οξυγόνου. Συγκεκριμένα με χαμηλή θερμοκρασία φούρνου (37°C) και τις κολώνες εν σειρά περνούν στην κολώνα (B) Molecular Sieve, όλα τα αέρια εκτός του CO<sub>2</sub>, που παραμένει κοντά στην έξοδο της κολώνας (A). Τα αέρια που έχουν περάσει στην κολώνα (B) είναι πρώτο το υδρογόνο και μετά το οξυγόνο και αζώτο. Στο χρόνο αυτό απομονώνεται η κολώνα (B) και αρχίζει η άνοδος της θερμοκρασίας του φούρνου. Το CO<sub>2</sub> είναι το πρώτο που περνά από την κολώνα (A) στον ανιχνευτή. Αμέσως μετά επανασυνδέεται η κολώνα (B) και εμφανίζονται με σειρά οι κορυφές του υδρογόνου που εμφανίζεται ανάστροφη λόγω αντίθετης πολικότητας μετά του οξυγόνου και του αζώτου.

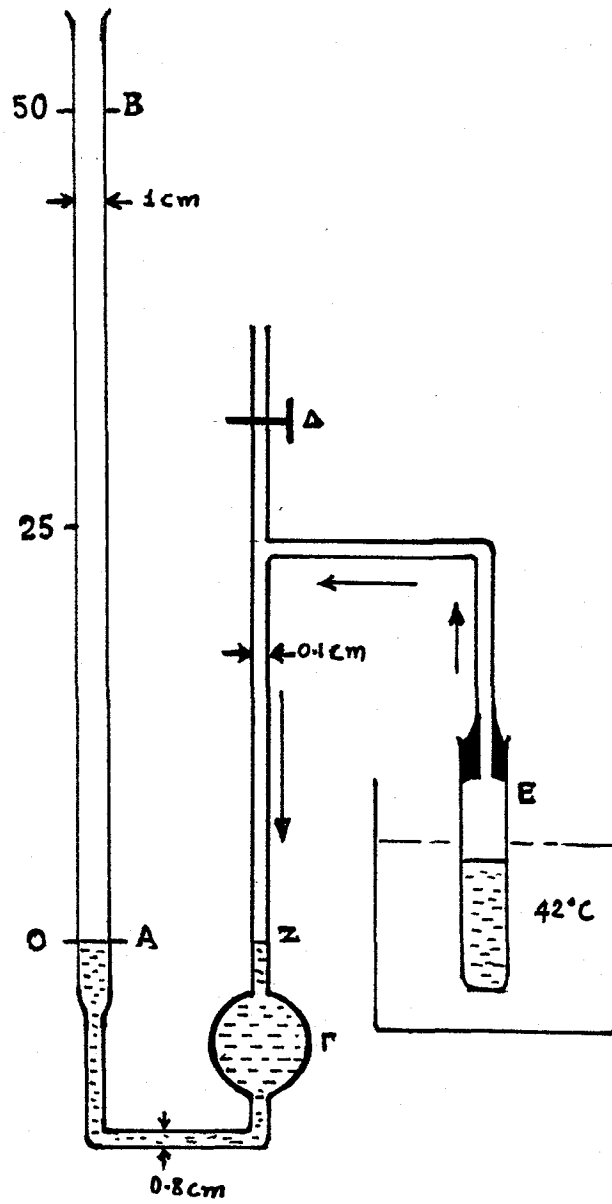
#### 4. Προσδιορισμός του συνολικού όγκου αερίων ζύμωσης

Για τον προσδιορισμό του όγκου των αερίων που παράγονται κατά τη ζύμωση του υγρού υποστρώματος R.C.M. στους 42°C, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή του σχεδιαγράμματος 1. Η συσκευή αυτή κατασκευάστηκε εξ ολοκλήρου στο εργαστήριο με σύνδεση διαφόρων γυάλινων υλικών σε συστοιχία 3 μονάδων και είναι ελαφρώς τροποποιημένη σε σύγκριση με αυτήν που έχει αναφερθεί από τους Sandine et al., (1957) και Stadhouders et al., (1965) και προορίζεται για την εκτίμηση του όγκου του CO<sub>2</sub> που παράγεται από τις καλλιέργειες εκκίνησης στην παρασκευή τυριών.

Η φιάλη υποδοχής του υποστρώματος (E) είναι δοκιμαστικός σωλήνας με εσωτερικώς εσφυρισμένα χείλη στην κορυφή όπου

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1

Συσκευή προσδιορισμού συνολικού όγκου αερίου που παράγεται κατά τη ζύμωση υγρού υποστρώματος RCM από BE



εφαρμόζεται το γυάλινο πώμα με το σωληνωτό σύστημα διαφυγής των παραγομένων κατά τη ζύμωση αερίων.

Ο όγκος του υποστρώματος ζύμωσης που μελετήθηκε ήταν 20ml και η θερμοκρασία επώασης που επιτυγχάνεται με εμβάπτιση σε υδρόλουτρο, 42°C. Το τμήμα AB της συσκευής περιλαμβάνει έναν κατακόρυφο σωλήνα σε μορφή προχοΐδας βαθμολογημένο από 0 έως 50ml. Κατά την έναρξη της μέτρησης το κάτω μέρος της συσκευής μαζί με τη μικρή σφαιρική φιάλη γεμίζονται με νερό μέχρι την απόφυση μηδέν της προχοΐδας με τη στρόφιγγα (Δ) ανοικτή. Μετά την τοποθέτηση του ενοφθαλμίσματος στη φιάλη Ε και την έναρξη της επώασης (2-3 min), κλείνεται η στρόφιγγα Δ. Με την έναρξη της ζύμωσης τα παραγόμενα αέρια ακολουθούν τη διαδρομή που φαίνεται στο σχεδιάγραμμα και συμπιέζουν τη στάθμη του νερού στο σημείο (Ζ) προς τα κάτω με αντίστοιχη άνοδο στο σημείο (Α) προς τα πάνω. Η σφαιρική φιάλη (Γ) έχει αρκετό όγκο ώστε να μπορεί να καλύψει και τα 50ml της προχοΐδας. Στη διάρκεια της ζύμωσης, ο παραγόμενος όγκος αερίων μπορεί να διαβασθεί απευθείας πάνω στη βαθμολογημένη κλίμακα της προχοΐδας. Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε συστοιχία 3 μονάδων και τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες ζύμωσης.

## 5. S.D.S Polyacrylamine Gel Electrophoresis

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, συνήθως το Sodium Dodecylsulfate (SDS) για να σχηματίσουν αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα. Η ποσότητα SDS που σχηματίζει το σύμπλοκο με την πρωτεΐνη και επομένως καθορίζει το φορτίο της είναι χονδρικά ανάλογη με το μέγεθος της.

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι με τη μέθοδο της Gel ηλεκτροφόρησης ο διαχωρισμός των διαφόρων πρωτεϊνών εξαρτάται βασικά από το φορτίο, το μέγεθος και σχήμα του μορίου της πρωτεΐνης. Τα περισσότερο φορτισμένα είδη μετακινούνται γρηγορότερα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Αντίθετα τα μεγάλα μόρια και αυτά που έχουν σφαιρικό σχήμα

επιβραδύνονται σένα μικρότερο ή μεγαλύτερο ποσοστό απο το πλέγμα του ακρυλικού ζελέ. Επομένως η τελική ηλεκτροφορητική ταχύτητα διαχωρισμού θα εξαρτηθεί απο την αλληλεπίδραση των δυο αυτών παραγόντων.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει κάτω απο συνθήκες αδρανοποίηση τους ή όχι. Ρυθμιστικά διαλύματα που δεν συντελούν στην αδρανοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων χρησιμοποιούνται συνήθως όταν επιθυμείται η διατήρηση της βιολογικής τους δράσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που συντελούν στην αδρανοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων. Στην περίπτωση αυτή το SDS, σχηματίζει σύμπλοκο με το αδρανοποιημένο πρωτεϊνικό μόριο, που έχει φορτίο σχεδόν σταθερό για τις περισσότερες πρωτεΐνες και κατά συνέπεια ο διαχωρισμός εξαρτάται μόνο απο το μέγεθος του και απο τους πόρους του πολυακρυλαμινικού ζελέ. Οι πόροι του ζελέ συσχετίζονται με την συγκέντρωση της ακρυλαμίνης. Μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμίνης συντελεί στη δημιουργία ζελέ με μικρότερους πόρους και ενδείκνυνται για πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους.

Για το διαχωρισμό και μελέτη των κυτταρικών πρωτεϊνών του βάκιλλου του επτάζυμου με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή LKB-2050-001. Η μονάδα αυτή έχει πάρα πολύ μικρό μέγεθος και είναι κατάλληλη για το γρήγορο διαχωρισμό δειγμάτων πρωτεΐνης μικρού όγκου καθώς και νουκλεϊνικών οξέων.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος των διαφόρων στελεχών του Βάκιλλου του επτάζυμου ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα R.C.M στους 42°C για 20h. Τα κύτταρα του μικροοργανισμού διαχωρίσθηκαν απο το υπόστρωμα καλλιέργειας με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15min στους 4°C. Ακολούθησε πλύσιμο δυο φορές με τις ίδιες συνθήκες με αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια σχηματίσθηκε εναιώρημα των κυττάρων σε 50mM-Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα buffer, με τιμή pH=7.5 και ακολούθησε σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων για 5 min με υπέρηχους υπο ψύξη. Μετά απο νέα φυγοκέντρηση στις 12.000

στροφές για 30 min στους 4°C η υπερκείμενη φάση ορίζεται σαν ενδοκυτταρικό εκχύλισμα (I.E) (El Soda and Desmazeaud, 1982). Το ενδοκυτταρικό εκχύλισμα αναμειγνύεται στη συνέχεια σε αναλογία 1:1, με ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl με pH 6.8 που περιέχει γλυκερίνη, μερκαπτασιθανόλη και τη χρωστική κυανού της βρωμοφαινόλης. Ακολουθεί τοποθέτηση σε υδατόλουτρο 100°C για 5min και ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη φάση αυτή το δείγμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.

Για την απόκτηση του πρωτεϊνογράμματος των διαφόρων στελεχών του βάκιλλου του επτάζυμου, έγινε η ηλεκτροφόρηση με 12.5% ακρυλαμίδης σε 25 mM-Tris-0.19M -glucine, pH=8.3, παρουσία S.D.S με βάση τη μέθοδο που έχει αναφερθεί αρχικά από τον Laemmli (1970).

Για την ανάγνωση του φάσματος των πρωτεϊνών (scanning) που διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της S.D.S Gel Electrophoresis χρησιμοποιήθηκε το όργανο Helena- France Jr.Plus.

#### 6. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Για τον προσδιορισμό των διαλυτών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry et al., (1951) όπως τροποποιήθηκε από τον Peterson (1977), με χρησιμοποίηση του S.D.S (Sodium Dodecylsulfate) για τη διευκόλυνση της διαλυτοποίησης των σχετικά μη διαλυτών λιποπρωτεϊνών. Σύμφωνα με την αρχή αυτής της μεθόδου ένα αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού σχηματίζει σύμπλοκα με τους πεπτιδικούς δεσμούς και αναπτύσει κυανού χρώμα όταν προστίθεται το αντιδραστήριο της φαινόλης. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση σε κατάλληλο μήκος κύματος μεταξύ 500-800 nm. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης μπορεί να προσδιορισθεί από καμπύλη αναφοράς. Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε το Kit της SIGMA DIAGNOSTICS που περιλαμβάνει το αντιδραστήριο LOWRY, το αντιδραστήριο DOC (sodium deoxycholate), το T.C.A, (Trichloroacetic), το αντιδραστήριο FOLIN CIOCALTEU PHENOL και το Standard πρωτεΐνης.



## 7. Ανάλυση πτητικών λιπαρών οξέων

Τα πτητικά λιπαρά οξέα σαν προϊόντα μεταβολισμού των ετεροζυμωτικών βακτηρίων έχουν ιδιαίτερη σημασία απο τεχνολογική άποψη. Στην περίπτωση των διαφόρων στελεχών του Βάκιλλου του επτάζυμου έγινε ο προσδιορισμός των πτητικών λιπαρών οξέων που παράγονται κατά την ανάπτυξη στο υγρό υπόστρωμα R.C.M σε διάφορες θερμοκρασίες καθώς επίσης σε υπόστρωμα αλεύρου και στο ψωμί.

Για την προετοιμασία του δείγματος στα υγρά υποστρώματα, γίνονταν γίνονταν φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10min και στη συνέχεια απευθείας ανάλυση της υπερκεκλιμένης φάσης σε χρωματογράφο (G.L.C), (Drucker and Tavakkol, 1985). Στο ψωμί μετά από οξείνιση του δείγματος, έγινε εκχύλιση των λιπαρών οξέων με αιθέρα.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε αέριο χρωματογράφο της Perkin - Elmer μοντέλο sigma 3, εφοδιασμένο με μονάδα επεξεργασίας δεδομένων sigma 10 και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη εσωτερικής διαμέτρου 1/4 ίντσας, 6 ποδών με υλικό πλήρωσης DEGS, 15% CHROM-W-HP, 100/120 mesh. Χρησιμοποιήθηκε σαν φέρον αέριο το ήλιο, με ροή 40ml/min. Η θερμοκρασία Detector injector ήταν 220°C και θερμοκρασία φούρνου προγραμματισμένη από 120° στους 135° με βήμα 1°C/min.

Η αναγνώριση των λιπαρών οξέων στα δείγματα έγινε με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστών λιπαρών οξέων στο χρωματογράφο κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης.

## 8. API 50 CHL και API 20A

Είναι γνωστό ότι το API SYSTEM γενικά, περιλαμβάνει διάφορα βιοχημικά tests, τυποποιημένα κατά τέτοιο τρόπο για τις διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών, ώστε να διευκολύνεται η αναγνώρισή των επι μέρους ειδών. Για τα διάφορα στελέχη του βάκιλλου του επτάζυμου χρησιμοποιήθηκαν τα API 50CHL που είναι εξειδικευμένα για το γένος

Lactobacillus και τα API 20A για την αναγνώριση των αναεραβίων βακτηρίων. Και στις δύο περιπτώσεις βασική προϋπόθεση για τη διενέργεια των δοκιμών είναι η χρησιμοποίηση καθαρής καλλιέργειας από τον μελετούμενο μικροοργανισμό.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών έγινε σε υγρό υπόστρωμα R.C.M μέσα σε φιαλίδια με βιδωτό καπάκι για 20 ώρες στους 42°C. Ακολούθησε φυγοκέντριση μέσα στα φιαλίδια στις 4.000 στροφές για 15 min για τη συλλογή των κυττάρων, που αφού πλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό, χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό του συστήματος API σύμφωνα με τις τεχνικές οδηγίες κάθε συστήματος.

#### 9. Φυσικοχημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις στο ψωμί

Η μέτρηση της ξηράς ουσίας έγινε με ξήρανση 10gr του δείγματος στους 105°C για 24 ώρες.

Η μέτρηση του pH έγινε σε ομογενοποιημένο με νερό δείγμα σε αναλογία 1:3.

Στο δείγμα που μετρήθηκε το pH έγινε στη συνέχεια φυγοκέντριση στις 4000 στροφές/min για 10 min και στην υπερκεείμενη φάση προσδιορίσθηκε η ογκομετρούμενη οξύτητα και τα αναγόντα ζαχάρα με την κλασσική μέθοδο Loorff-Schoorl.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έγινε από ομάδα ερευνητών του Ινστιτούτου Τεχνολογίας με τη μέθοδο της προτίμησης σε μια κλίμακα αρεσκείας 7 σημείων καθώς και με τη μέθοδο της τριγωνικής δοκιμής (Triangle Test).

Στο ψωμί έγινε επίσης ανάλυση των πτητικών λιπαρών οξέων στο χρωματογράφο της Perkin Elmer σε στήλη SP 1000. Στην περίπτωση αυτή τα λιπαρά οξέα εκχυλίστηκαν από την ψίχα του ψωμιού σε αιθέρα.

#### 10. Βασικές βιοχημικές δοκιμές

Οι βασικές βιοχημικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω και περιγράφονται αναλυτικά στο βιβλίο "Microbiological Methods από Collin and Lyne

1979.

Voges Proskauer test (V.P. Test): Με αυτή τη δοκιμή ανιχνεύεται ποιοτικά ο σχηματισμός ασετοΐνης από τη γλυκόζη. Η ασετοΐνη οξειδώνεται με την προσθήκη αντιδραστήριου σε διακετύλιο που παράγει ένα κόκκινο χρώμα με τα κατάλοιπα γουανιδίνης που υπάρχουν στο υπόστρωμα ανάπτυξης.

Υδρόλυση αμύλου: Παρασκευάζεται starch agar, εμβολιάζεται με το μελετώμενο μικροοργανισμό για 3-5 days στους 32-37°C. Για την παρασκευή του υποστρώματος προστίθενται 20ml διαυγούς διαλύματος αμύλου 10% σε 100ml λυωμένου nutrient agar πριν από το στρώσιμο των τρυβλίων. Στη συνέχεια το τρυβλίο κατακλύζεται με διάλυμα ιωδίου που αντιδρά με το άμυλο και δίδει σκούρο χρώμα. Καθαρές ζώνες γύρω από τις περιοχές ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι θετική ένδειξη υδρόλυσης του αμύλου.

Χρησιμοποίηση κιτρικού: Εμβολιάζουμε σε υγρό υπόστρωμα Koser με βελόνα. Το ενοφθάλμισμα πρέπει να είναι μικρό άλλως πιθανόν το αποτέλεσμα να βρεθεί εσφαλμένα θετικό. Επιάζουμε στους 30-35°C και παρατηρούμε τυχόν ανάπτυξη.

Υδρόλυση καζεΐνης: Χρησιμοποιείται υπόστρωμα skim milk που εμβολιάζεται από το μικροοργανισμό. Η υδρόλυση της καζεΐνης είναι θετική αν παρατηρηθούν καθαρές ζώνες γύρω από τις αποικίες.

Παραγωγή αμμωνίας από αργινίνη: Παρασκευάζεται M.R.S broth αλλά το κιτρικό αμμώνιο αντικαθίσταται με 0.3% υδροχλωρική αργινίνη. Διανομή 5-10ml υπεστρώματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστείρωση. Εμβολιασμός και επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες. Για την ανίχνευση της παρουσίας αμμωνίας χρησιμοποιούνται λίγες σταγόνες αντιδραστήριου Nessler. Η ανάπτυξη καφέ χρώματος είναι ένδειξη θετική για την παραγωγή αμμωνίας.

Σχηματισμός ινδόλης: Αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός για 2-5 μέρες σε Tryptone broth (Tryptone 10gr/lit, NaCl 5gr/lit). Ανίχνευση παραγωγής ινδόλης με τη μέθοδο Kovac's.

Παραγωγή λεκιθινάσης: Παρασκευάζεται θρεπτικό υπόστρωμα Egg yolk salt broth (0.5-1.0ml egg yolk προστίθενται σε 10ml nutrient broth + 1% χλωριούχο νάτριο). Εμβολιάζουμε και

επώαζουμε για 5 μέρες στους 37°C.

Αναγωγή νιτρικών: Παρασκευάζεται nitrate broth. Εμβολιάζεται ο μελετούμενος μικροοργανισμός για 24h περίπου στην άριστη θερμοκρασία. Για το BE το υπόστρωμα αυτό ενισχύθηκε με γλυκόζη σε επίπεδο 1%.

Υδρόλυση ζελατίνης: Για τη μελέτη της υδρόλυσης ζελατίνης παρασκευάστηκε ελαφρώς τροποποιημένο υπόστρωμα, nutrient gelatin με gr/lit: (Lam-Lemco 3, Peptone 5, Yeast extract 3, χλωριούχο νάτριο 5, cysteine 0.5 και Gelatin 120). Εμβολιάστηκε ο βάκιλλος του επτάζυμου με το υπόστρωμα μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και έγινε επώαση στους 42°C για 24h. Για τον έλεγχο της υδρόλυσης ή μη της ζελατίνης τοποθετείται ο σωλήνας με δεύτερο μάρτυρα στο ψυγείο. Η μη στερεοποίηση του υποστρώματος σε σύγκριση με το μάρτυρα είναι ένδειξη υδρόλυσης της ζελατίνης. Σε περίπτωση που γίνει στερεοποίηση και στους δυο σωλήνες αφήνουμε να αποψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετρούμε το χρόνο που χρειάστηκε για τη ρευστοποίηση του υλικού. Χρόνος μικρότερος από το μισό περίπου του μάρτυρα είναι ένδειξη μερικής υδρόλυσης της ζελατίνης.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός από τα παραπάνω βιοχημικά tests πραγματοποιήθηκαν επίσης τα tests καταλάσης και χρώσης Gram καθώς και η χρώση σπορίων με το πράσινο του μαλαχίτη.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΩΑΣΗ ΑΛΕΣΜΕΝΩΝ ΡΕΒΙΘΙΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ

Πορεία της ζύμωσης ρεβιθιού και εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, η ζύμωση του ρεβιθιού από τους αρτοποιούς για την παρασκευή της "μαγιάς", γίνεται μέσα σε γυάλινα μπουκάλια που τοποθετούνται για επώαση σε θερμό μέρος. Στο πείραμα αυτό μελετήθηκαν τρεις θερμοκρασίες επώασης (32, 37 και 42°C). Η ζύμωση έγινε σε γυάλινες κωνικές φιάλες μέσα σε νερό που ήταν αποστειρωμένο και περιείχε χλωριούχο νάτριο 0.5 % . Ο αλεσμένος καρπός ζυγίζονταν απευθείας μέσα στη φιάλη ζύμωσης που μαζί με το νερό είχε προθερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία που επρόκειτο να μελετηθεί. Κατά την άλεση των σπόρων δεν τηρήθηκαν ασηπτικές συνθήκες.

Στα σχεδιαγράμματα 1 και 2 εμφανίζεται η πορεία του pH και της οξύτητας κατά τη ζύμωση αλεσμένου ρεβιθιού στους 32°C, 37°C, και 42°C. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα σημεία των διαγραμμάτων αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους έξι επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν την περίοδο 1989 και 1990.

Όπως φαίνεται στα σχεδιαγράμματα, στους 32°C δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην τιμή του pH και της οξύτητας μέχρι τις 12 ώρες της επώασης ενώ στις υψηλότερες θερμοκρασίες οι μεταβολές αρχίζουν από τις 6 ώρες. Από τις 6-12 ώρες της επώασης παρατηρείται μια απότομη μεταβολή στις τιμές του pH και της οξύτητας που είναι μεγαλύτερη στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Στις 24 ώρες τα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 37 και 42°C, έχουν φθάσει στην ελάχιστη τιμή pH και στη μέγιστη της ογκομετρούμενης οξύτητας. Στην συνέχεια μέχρι τις 30 ώρες δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή. Αντίθετα στους 32°C η πτώση του pH και η άνοδος

της οξύτητας συνεχίζονται μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Στις 30 ώρες παρατηρείται μια τελική τιμή pH μεταξύ 4,6 και 4,9 και οξύτητα σε γαλακτικό μεταξύ 0.23 και 0.32% ανάλογα με τη θερμοκρασία.

Με την έναρξη της ζύμωσης του υποστρώματος που διαμορφώνεται μέσα στις κωνικές φιάλες, αρχίζει να σχηματίζεται στρώμα επιφανειακού αφρού. Στην παρακάτω φωτογραφία Α φαίνεται ο σχηματισμός του επιφανειακού αφρού σε 3 κωνικές φιάλες που έχουν επωασθεί για 12 ώρες στους 32, 37, και 42°C. Ο σχηματισμός φυσαλίδων στο εσωτερικό των φιαλών ζύμωσης αρχίζει να γίνεται εμφανής στις 6 περίπου ώρες στους 42°C και περισσότερο καθυστερημένα στις χαμηλότερες θερμοκρασίες και σφείλεται στην δραστηριότητα ενός μόνον μικροοργανισμού όπως θα διαπιστώσουμε στη συνέχεια της μελέτης. Οι φυσαλίδες που δημιουργούνται μέσα στο υπόστρωμα, ανέρχονται στην επιφάνεια συσσωρεύονται και δημιουργούν παχύ στρώμα επιφανειακού αφρισμού που είναι και κύριο χαρακτηριστικό αυτού του συστήματος ζύμωσης, μαζί με την έντονη χαρακτηριστική οσμή.

Στη φωτογραφία Β εμφανίζεται ο τρόπος παρασκευής της μαγιάς από ρεβίθι με τον παραδοσιακό τρόπο μέσα σε μπουκάλι. Ο σχηματισμός του επιφανειακού αφρισμού είναι χαρακτηριστικός και σε αυτή την περίπτωση. Ο αφρός αυξάνει συνεχώς σε πάχος με την πρόοδο της ζύμωσης και τελικά υπερεκχυλίζει τη φιάλη ζύμωσης. Φαίνεται ότι η ζύμωση του ρεβιθιού μέσα σε μπουκάλι, μια τεχνική που έχει αποκτηθεί από την εμπειρία στην πράξη, περιορίζει την επαφή του υποστρώματος με τον αέρα και κατά κάποιο τρόπο επιδρά επιλεκτικά μαζί με την υψηλή θερμοκρασία στην ανάπτυξη της επιθυμητής μικροχλωρίδας.

Στα σχεδιαγράμματα 3, 4 και 5 εμφανίζεται η εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου στις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Στα σχεδιαγράμματα 3 και 4 εμφανίζεται η εξέλιξη του μικροβιακού πληθυσμού σε P.C.A και R.C.A αντίστοιχα, κατά την επώαση των τρυβλίων σε αερόβιες συνθήκες και στο διάγραμμα 5 σε R.C.A σε αναερόβιες συνθήκες.

Όπως φαίνεται στα σχεδιαγράμματα αυτά το αρχικό

μικροβιακό φορτίο στα σπέρματα του ρεβιθιού είναι αρκετά χαμηλά (2 log./gr). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα σπέρματα του ρεβιθιού είναι ένα ξηρό προϊόν με πολύ χαμηλή ενεργότητα νερού όπου μόνο σπόρια ή άλλες ανθεκτικές μορφές μικροοργανισμών μπορούν να επιζήσουν. Μέχρι τις 3-6 ώρες επώασης ανάλογα και με τη θερμοκρασία δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του μικροβιακού φορτίου (induction period). Στο διάστημα αυτό επαναδραστικοποιούνται οι διάφορες ανθεκτικές μορφές των μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας για να δώσουν στη συνέχεια μια απότομη αύξηση του συνολικού μικροβιακού φορτίου, που είναι πιο έντονη στο συνολικό αναερόβιο πληθυσμό.

Στα σχεδιαγράμματα 3,4 που εμφανίζουν την εξέλιξη του συνολικού αερόβιου πληθυσμού σε δυο θρεπτικά υποστρώματα παρατηρείται ότι από τις 6 έως τις 12 ώρες το μικροβιακό φορτίο αυξάνεται κατά 4-5 log. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ 37°C & 42°C ενώ παρατηρείται μια μικρή υστέρηση στην αύξηση του φορτίου στους 32°C. Στις 24 ώρες ο συνολικός αερόβιος πληθυσμός όπως απεικονίζεται και στα δυο θρεπτικά υλικά βρίσκεται προς το τέλος της λογαριθμικής φάσης στους 42°C και αρχίζει ήδη η φάση της φθοράς. Τέλος μπορεί να σημειωθεί ότι δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την εξέλιξη του συνολικού αερόβιου πληθυσμού όπως αυτός απεικονίζεται στα δυο θρεπτικά υλικά δηλαδή το P.C.A και R.C.A. Το P.C.A είναι υπόστρωμα γενικής χρήσης για την απαρίθμηση αερόβιων βακτηρίων, ενώ το R.C.A περιέχει υδροχλωρική κυστεΐνη ένα ισχυρό αναγωγικό παράγοντα, και ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που προτιμούν αναερόβιες συνθήκες.

Ως προς την αντίστοιχη εξέλιξη του αναερόβιου πληθυσμού σε R.C.A όπως εμφανίζεται στο διάγραμμα 5, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στην περίπτωση αυτή η επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη του φορτίου είναι εμφανής. Στους 42°C και στις 12 ώρες επώασης ο αναερόβιος πληθυσμός έχει φθάσει στο 9log/ml και βρίσκεται προς το τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης. Στους 37°C η εξέλιξη παρουσιάζεται παραπλήσια ενώ στους 32°C η εκθετική φάση αρχίζει ουσιαστικά

στις 9 ώρες και συνεχίζεται μέχρι το τέλος της επώασης. Στις 30 ώρες επώασης ο συνολικός αναερόβιος πληθυσμός είναι περίπου στο ίδιο επίπεδο ( $8-9 \log/ml$ ) και στις 3 θερμοκρασίες της επώασης.

Απο τα παραπάνω αποτελέσματα τονίζεται ιδιαίτερα η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη του αναερόβιου πληθυσμού και στην περίοδο προσαρμογής που απαιτείται για επαναδραστικοποίηση της μικροχλωρίδας. Με την ανάμειξη των αλεσμένων σπόρων στο νερό δημιουργείται ένα εναιώρημα με αρχική τιμή pH γύρω στο 6.3 και πολύ χαμηλή οξύτητα (0.04%). Είναι προφανές ότι ορισμένα διαλυτά συστατικά των σπόρων, υδατάνθρακες, αμινοξέα, άλατα κλπ. εκχυλίζονται στην υγρή φάση. Η υψηλή σχετικά θερμοκρασία επώασης ( $32-42^\circ C$ ) διευκολύνει αυτή τη διαδικασία. Κατά τον Faki et al. (1983), ένα εκχύλισμα σπόρων ρεβιθιού σε 70 % αιθανόλη έδωσε 7.1 % ελεύθερα ζάχαρα (γαλακτόζη, σαχαρόζη, γλυκόζη, ραφινόζη, σταχυόζη, βερμπασκόζη). Επίσης έχει ήδη αναφερθεί ότι τα διαλυτά ζάχαρα στο ρεβίθι, κυμαίνονται μεταξύ 4.8-9.0% (Chavan et al., 1986) και είναι κυρίως μη αναγωγικά όπως η σαχαρόζη και άλλοι πολυσαχαρίτες όπως ραφινόζη, σταχυόζη κ.ά. Τα διαλυτά στερεά μαζί με τα άλλα θρεπτικά συστατικά που εκχυλίζονται στην υγρή φάση (αμινοξέα, ανόργανα άλατα κ.λ.π), διαμορφώνουν ένα αρκετά πλούσιο υπόστρωμα, που φαίνεται ότι είναι ικανό να συντελέσει στην επαναδραστικοποίηση της ενδογενούς μικροχλωρίδας από την κατάσταση λήθαργου που μπορεί να πει κανείς ότι βρίσκεται στο ξηρό αυτό προϊόν και να στηρίξει την περαιτέρω ανάπτυξή της. Η ταχύτητα εκχύλισης των διαφόρων συστατικών προφανώς σχετίζεται με τη θερμοκρασία και επηρεάζει την περίοδο προσαρμογής των διαφόρων μελών της μικροχλωρίδας. Η περίοδος προσαρμογής εξαρτάται επίσης από τις συνθήκες και το χρόνο που χρειάζεται για να βλαστήσουν τα σπόρια των σποριογόνων μικροοργανισμών.

Από τους Zamora και Fields (1979), μελετήθηκε επίσης η ζύμωση των ρεβιθιών στους  $25^\circ C$ , με σκοπό την αύξηση της θρεπτικής τους αξίας. Στην περίπτωση αυτή τα ρεβίθια μετά από πλύσιμο σε νερό βρύσης και ξήρανση στους  $50-55^\circ C$



αλέσθηκαν και στη συνέχεια σχηματίστηκε το υπόστρωμα ζύμωσης με ανάμειξη με νερό σε αναλογία 1:4 και ενίσχυση με 5% ζαχαρόζη. Στο υπόστρωμα αυτό η τιμή pH διαμορφώθηκε στο 4 και οξύτητα 0.9% μετά από 4 μέρες ζύμωσης στην παραπάνω θερμοκρασία. Από τη μελέτη της μικροχλωρίδας προέκυψε ότι τα γαλακτοβακτήρια επικρατούν τις τελευταίες μέρες της ζύμωσης. Είναι προφανές ότι οι διαφορές αυτές οφείλονται στη διαφορετική σύνθεση και χειρισμό του υποστρώματος ζύμωσης.

Η μεταβολή της τιμής του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας μετά από τη ζύμωση δημητριακών ή και σπυριών έχει επίσης μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Από τον Fields και άλλους (1981), μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας στερεών προς νερό (1:1,5 έως 1:4), στο pH και την ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη ζύμωση αραβοσίτου για 4 μέρες στους 37°C. Στο τέλος της ζύμωσης η τιμές του pH και της οξύτητας διακυμάνθηκαν αντίστοιχα από 3.4-3.7 και 1.12-2.33. Με λιγώτερο νερό στο σύστημα καταμετρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές οξύτητας.

Από τους Hamad και Fields (1979), μελετήθηκε η ζύμωση σε διάφορα υποστρώματα δημητριακών σε νερό (1:4 w/v) στους 22, 25 και 37°C. Μεγαλύτερη οξύτητα (1.46) και χαμηλότερη τιμή pH (3.6), παρατηρήθηκε στην υψηλότερη θερμοκρασία. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από, τον Au και Fields (1981), για το σόργο και από τον Tongnual και Fields (1979), για το ρύζι.

Τέλος από τον Chavan και άλλους (1988), παρατηρήθηκαν παραπλήσιες τιμές pH και οξύτητας κατά τη ζύμωση σόργου ή μίγματος σόργου - μπιζελιών σε νερό (1:3) για πέντε μέρες στους 30°C. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η τελική τιμή pH είναι χαμηλότερη και οξύτητας υψηλότερη σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν κατά τη ζύμωση των ρεβιθιών σε αυτή τη μελέτη. Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί κυρίως στο διαφορετικό χειρισμό του δείγματος και τις συνθήκες ζύμωσης, που είχαν σαν αποτέλεσμα την επικράτηση διαφορετικής μικροχλωρίδας.

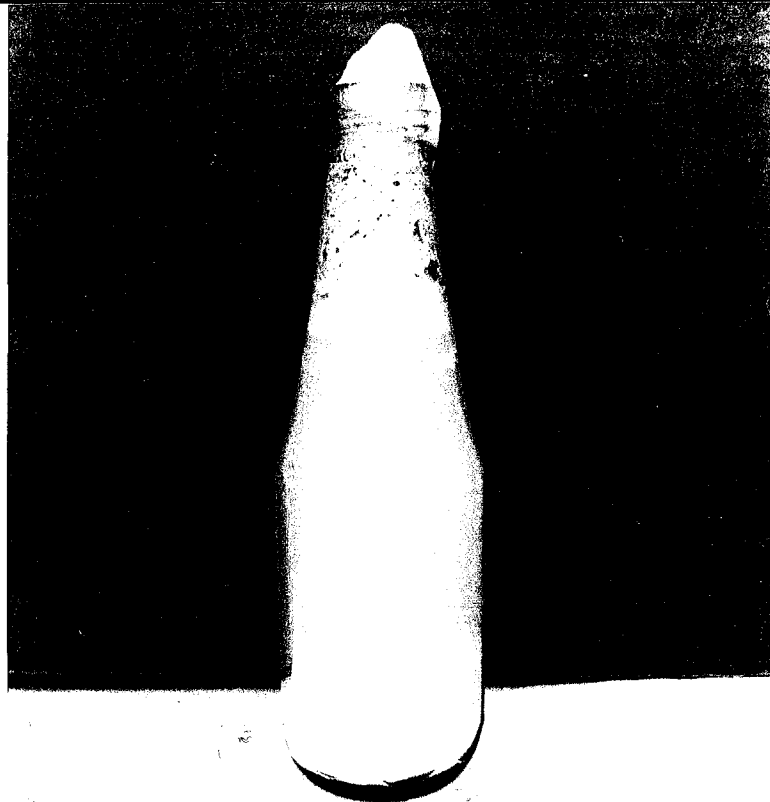
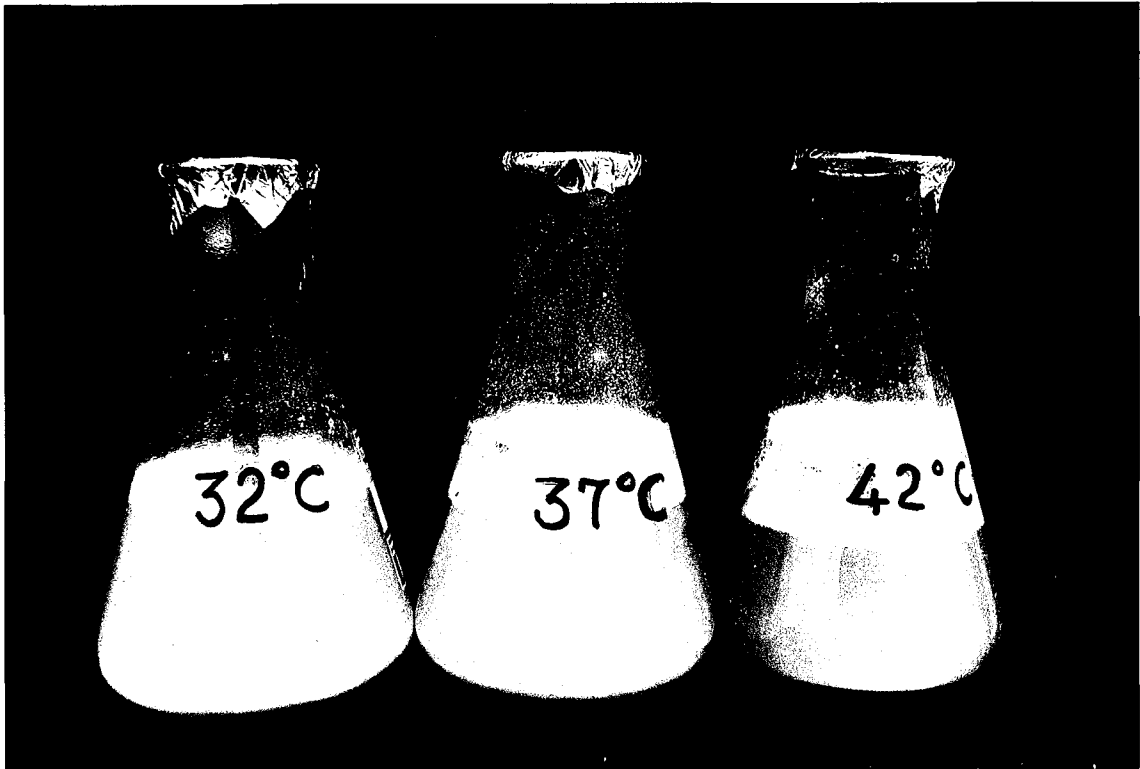
Θα πρέπει τέλος να σημειώσουμε ότι στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η ζύμωση του αλεσμένου ρεβιθιού σε νερό όπως περίπου γίνεται στην πράξη για την παρασκευή της "μαγιάς"

στο "επτάζυμο ψωμί". Η προπαρασκευή του δείγματος των σπόρων όπως γίνεται στην πράξη με χονδρόαλεσμα, δεν αποκλείει την επιμόλυνσή τους με διάφορα είδη μικροοργανισμών από τον περιβάλλοντα χώρο. Επομένως γεννάται το εύλογο ερώτημα αν ο μικροοργανισμός ή μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διάγνωση του ζυμαριού και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, προέρχονται από τα ρεβίθια δηλαδή τη μικροχλωρίδα που επικάθεται στην επιφάνεια των σπόρων ή από τυχόν επιμολύνσεις στη διάρκεια προετοιμασίας τους για ζύμωση. Στο ερώτημα αυτό θα απαντήσουμε στα επόμενα στάδια της μελέτης. Πάντως η παρασκευή της μαγιάς όπως γίνεται από τους αρτοποιούς στην πράξη ή όπως γίνεται στις διάφορες οικιακές παρασκευές δεν είναι πάντοτε επιτυχής. Υποκειμενικά κριτήρια επιτυχίας της "μαγιάς" είναι ο έντονος σχηματισμός επιφανειακού αφρισμού και η έντονη χαρακτηριστική οσμή. Διάφοροι όμως αστάθμητοι παράγοντες όπως π.χ. επιμολύνσεις κατά την προπαρασκευή των σπόρων αλλά και η θερμοκρασία, επιδρούν αποφασιστικά στην εξέλιξη της μικροχλωρίδας κατά τη ζύμωση κυρίως ως προς το είδος των μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ 1

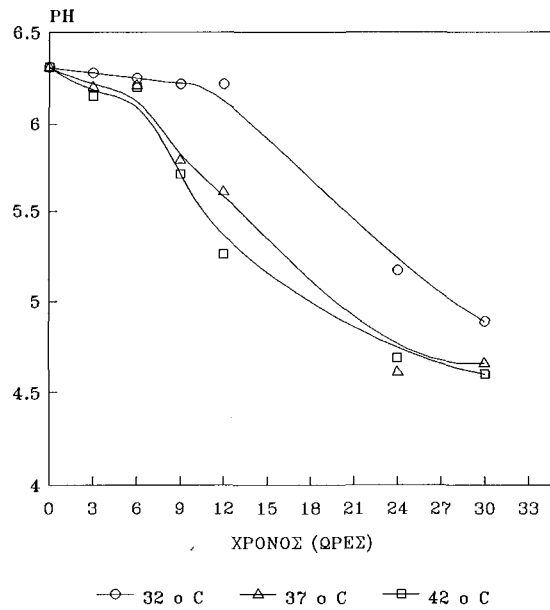
- A = Ζύμωση ρεβιθιού για 12 ώρες στους 32, 37 και 42°C  
B = Παραδοσιακός τρόπος ζύμωσης ρεβιθιού σε μπουκάλι για την παρασκευή της καλλιέργειας εκκίνησης

A



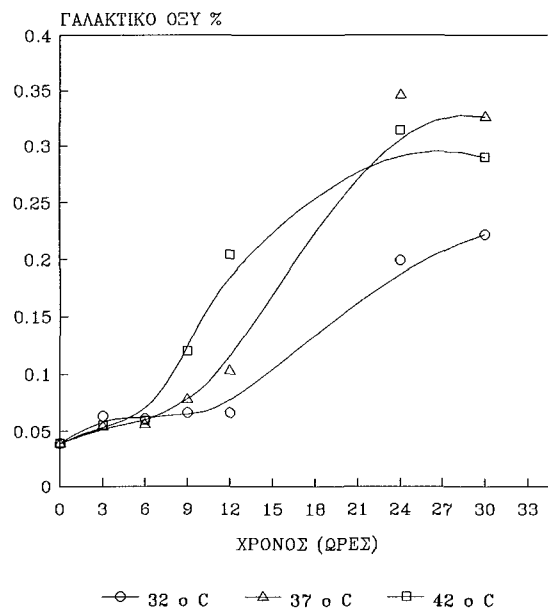
B

ΠΟΡΕΙΑ ΡΗ  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



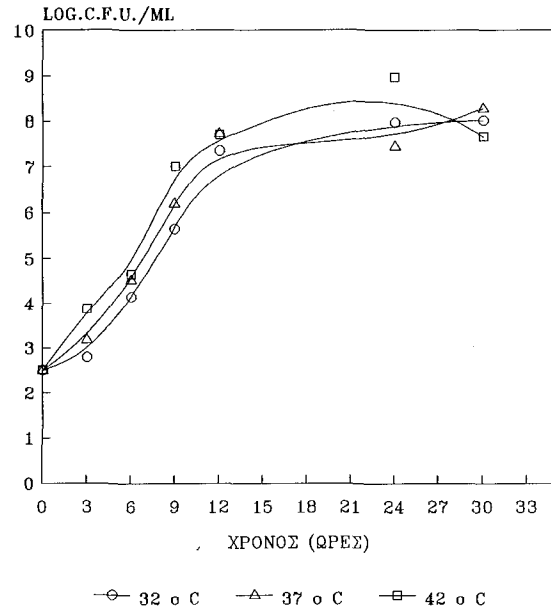
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1

ΠΟΡΕΙΑ ΟΞΥΤΗΤΑΣ  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



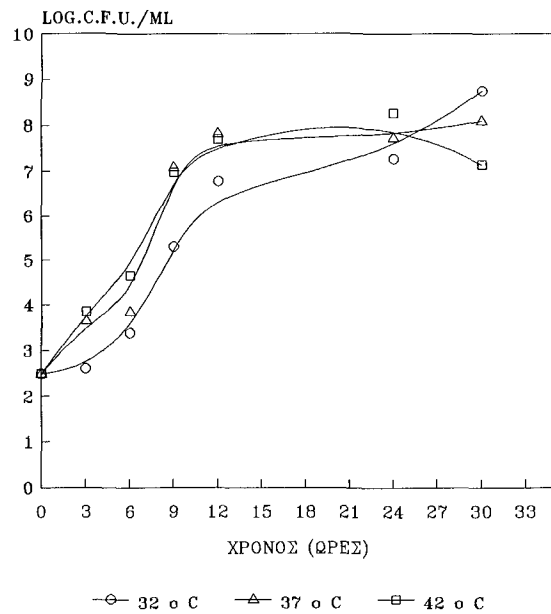
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2

ΑΕΡΟΒΙΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΕ ΡCΑ  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



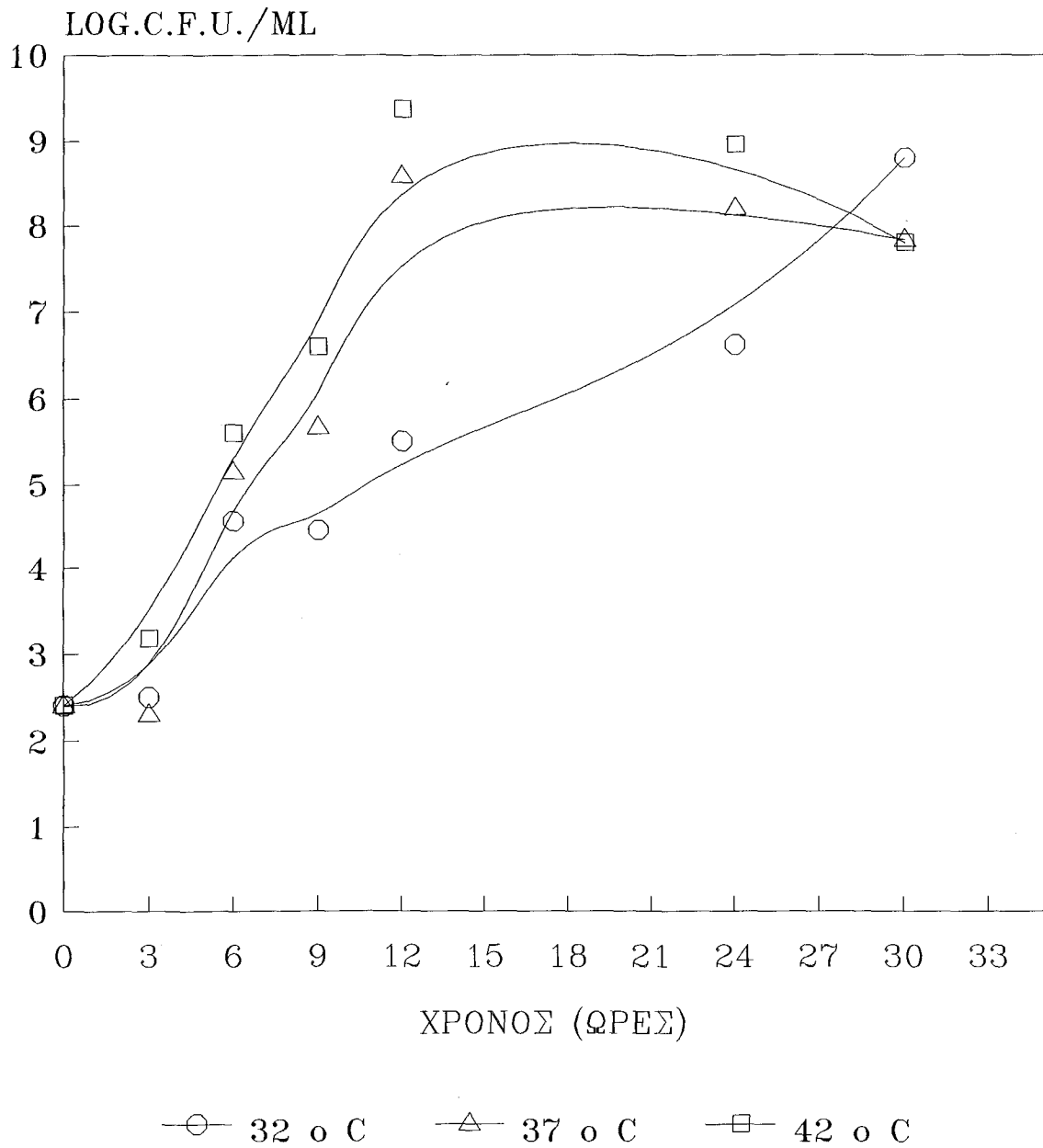
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3

ΑΕΡΟΒΙΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΕ RCA  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4

ΑΝΑΕΡΟΒΙΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΣΕ RCA  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5

## Μελέτη της μικροχλωρίδας των σπόρων ρεβιθιού

Στο πείραμα αυτό, για να αποφευχθεί η τυχόν επιμόλυνση των σπόρων από μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος χώρου και να μελετηθεί η φυσική τους μικροχλωρίδα, το άλεσμα έγινε μέσα σε αποστειρωμένο δοχείο blender μαζί με αποστειρωμένο νερό. Στην περίπτωση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε με το νερό χλωριούχο νάτριο για να αποφευχθεί η τυχόν επιλεκτική του δράση. Η επώαση του αλεσμένου μίγματος έγινε μέσα σε γυάλινες κωνικές φιάλες στους 37°C. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρεβίθια περιοχής Ηρακλείου Κρήτης συγκομιδής 1989 και 1990.

Στο σχεδιάγραμμα 6 εμφανίζεται η πορεία του pH και της οξύτητας κατά τη ζύμωση του ρεβιθιού στο πείραμα αυτό. Όπως φαίνεται δεν υπάρχει ουσιαστική μεταβολή στις αρχικές τιμές της οξύτητας και του pH μέχρι τις 6 και 9 ώρες αντίστοιχα. Στη συνέχεια παρατηρείται μια απότομη άνοδος στην τιμή της οξύτητας που γίνεται μέγιστη στις 12 ώρες της επώασης. Η πτώση του pH αρχίζει από τις 9 και συνεχίζεται μέχρι τις 24 ώρες. Η εξέλιξη του pH και της οξύτητας δεν διαφέρει από εκείνη του προηγούμενου πειράματος όπου δεν τηρήθηκαν ασηπτικές συνθήκες κατά το άλεσμα των σπόρων και στο νερό της ζύμωσης είχε χρησιμοποιηθεί 0.5 % NaCl.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τα δυο βασικά θρεπτικά υποστρώματα δηλαδή του R.C.A για καταμέτρηση του συνολικού αναερόβιου πληθυσμού και του P.C.A. για την καταμέτρηση του συνολικού αερόβιου πληθυσμού και τέσσερα άλλα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα με σκοπό τη διαπίστωση της παρουσίας ή της απουσίας ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 11. Από τα αποτελέσματα αυτά σημειώνεται η απουσία των ζυμών στη ζύμωση αυτή καθώς και ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως είναι οι ψευδομονάδες, τα κολιβακτήρια, και τα εντεροβακτήρια.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 11

Χρησιμοποίηση εκλεκτικών υποστρωμάτων για τη μελέτη της μικροχλωρίδας στους σπόρους ρεβιθίου Κρήτης 1989 & 1990

Κωδικός*	Εκλεκτικότητα	Παρουσία	Απουσία
R.B.C	Ζύμες - μύκητες	-	+
C.F.C	Ψευδομονάδες	-	+
V.R.B.A	Κολιβακτήρια	-	+
V.R.B.G.A	Εντεροβακτήρια	-	+

\* Βλέπε υλικά και μέθοδοι

Στο σχεδιάγραμμα 7 εμφανίζεται η εξέλιξη του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού κατά τη ζύμωση των αλεσμένων σπόρων στους 37°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων από τη ζύμωση ρεβιθιών 1989 και 1990.

Το μικροβιακό φορτίο στο χρόνο μηδέν είναι πολύ χαμηλό. Η ανάπτυξη σε P.C.A και R.C.A κατά την επώαση των τρυβλίων σε αερόβιες συνθήκες εμφανίζεται με λίγες αποικίες στις 3,6 και 9 ώρες της ζύμωσης. Από τις 12 ώρες που ο αερόβιος πληθυσμός είναι στο επίπεδο περίπου 5 log/ml αυξάνει συνεχώς μέχρι και τις 30 ώρες και φθάνει στο επίπεδο 8.5 log/ml.

Από την ανάπτυξη σε υπόστρωμα R.C.A σε αναερόβιες συνθήκες δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση μέχρι και τις 12 ώρες της ζύμωσης. Στη συνέχεια όμως μέχρι τις 24 ώρες παρατηρείται μια απότομη άνοδος του αναερόβιου πληθυσμού στο επίπεδο 9 log/ml. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή επικρατεί βασικά ένα είδος αποικιών που αναπτύσσονται μέσα στο υπόστρωμα R.C.A δεδομένου ότι στην περίπτωση αυτή εφαρμόσθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης και δεύτερης επιφανειακής στρώσης. Οι αποικίες αυτές είναι φακοειδείς έως αστεροειδείς και περιβάλλονται χαρακτηριστικά από μεγάλο αριθμό μικρών φυσαλίδων αερίου. Συνήθως δε το αέριο που



παράγεται, στην προσπάθειά του να βρεί διέξοδο προς τα έξω σχηματίζει ρωγμές στο θρεπτικό υλικό.

Απο τις αποικίες που αναπτύχθηκαν σε R.C.A και P.C.A κατά την επώαση των τρυβλίων σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C, με βάση τα άμεσα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (σχήμα, χρώμα, υφή κλπ) έγιναν 20 απομονώσεις για τα ρεβίθια περιόδου 1989 και 14 απομονώσεις για τα ρεβίθια της περιόδου 1990. Τα στελέχη των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν επανακαλλιεργήθηκαν και καθαρίστηκαν στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα όπου έγινε και η αρχική απομόνωση. Απο τις αποικίες που αναπτύχθηκαν σε R.C.A με ενσωμάτωση, διπλή στρώση και επώαση των τρυβλίων σε ατμόσφαιρα αζώτου, έγιναν τρεις απομονώσεις για τα ρεβίθια 1989 και 1990.

Στους πίνακες 12 και 13 περιλαμβάνεται το υπόστρωμα, ο χρόνος απομόνωσης και ορισμένα άλλα στοιχεία για τα στελέχη των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν απο τα ρεβίθια Κρήτης 1989 και 1990. Από τα στοιχεία που περιλαμβάνονται στους πίνακες αυτούς τονίζεται η απουσία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και η επικράτηση ενός μικροοργανισμού στην αναερόβια χλωρίδα. Στην αερόβια χλωρίδα επικρατούν οι σποριογόνοι καταλάση θετικοί βάκιλλοι του γένους *Bacillus*.

Απο τη δειγματοληψία που έγινε στο χρόνο μηδέν δηλαδή πριν ακόμα αρχίσει η επώαση, δεν παρατηρήθηκε ουσιαστικά ανάπτυξη σε κανένα θρεπτικό υπόστρωμα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι τα περισσότερα μέλη της μικροχλωρίδας στα ξερά ρεβίθια επιζούν σε χαμηλούς αριθμούς σε μορφή σπορίων που δεν βλαστάνουν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα για να δώσουν ορατές αποικίες.

Οι πρώτες μεμονωμένες αποικίες σε P.C.A και R.C.A κάτω απο αερόβιες συνθήκες εμφανίζονται στις 3,6 και 9 ώρες της ζύμωσης στους 37°C. Οι αποικίες αυτές είναι συνήθως μεγάλες ακανόνιστες, εξαπλούμενες κατά την επώαση με τάση πλήρους κάλυψης του τρυβλίου και ανήκουν σε σποριογόνους συνήθως κινητικούς βάκιλλους του γένους *Bacillus*.

Στα ρεβίθια Κρήτης 1990 στις 6,9,12 και 24h της επώασης εμφανίζονται επίσης αερόβιοι βάκιλλοι με μεταχρωματικά κοκκία (ψευδοπυρήνες), έντονο πολυμορφισμό, θετικοί κατά

Gram και οσμή συνήθως ευχάριστη. Σπόρια δεν παρατηρήθηκαν στους βακίλλους αυτούς που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* ή *Corynebacterium*.

Και στα ρεβίθια Κρήτης της περιόδου 1989 απομονώθηκαν επίσης παρόμοια στελέχη μικροοργανισμών στις 6 και 12 ώρες της επώασης.

Σποριογόνοι βάκιλλοι του γένους *Bacillus*, κινούμενοί ή μη εμφανίζονται επίσης στις 12, 24 και 30 ώρες της επώασης στα ρεβίθια και των δυο περιόδων, σε όλα τα τρυβλία που επώασθηκαν σε αερόβιες συνθήκες.

Στις 12 ώρες της επώασης απομονώθηκαν επίσης κόκκοι θετικοί κατά Gram με πιθανή κατάταξη στο γένος *Micrococcus*. Επίσης απομονώθηκε σε R.C.A κόκκος, θετικός κατά Gram καταλάση αρνητικός του γένους *Pediosoccus*, κατά την επώαση των τρυβλίων σε αναερόβιες συνθήκες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι απομονώθηκαν κόκκοι σε μεγάλους αριθμούς, σε δείγματα ζυμαριού από φούρνο της Αθήνας που παρασκευάζει επτάζυμο, στα οποία είχε παρατηρηθεί εκτροπή της ζύμωσης. Το ψωμί που παρασκευάστηκε από αυτό το ζυμάρι ήταν έντονα όξινο και δεν είχε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του επτάζυμου.

Τέλος θα πρέπει να σημειώσουμε ότι από τις 6 ώρες της ζύμωσης εμφανίζεται στη μικροχλωρίδα αναερόβιος βάκιλλος που αναπτύσσεται στο υπόστρωμα R.C.A, θετικός κατά Gram και καταλάση αρνητικός, με έντονα μεταχρωματικά κοκκία. Στις 24 ώρες της επώασης κυριαρχεί σε μεγάλους αριθμούς ( $10^8-10^9/ml$ ). Είναι το μόνο μέλος της μικροχλωρίδας που παράγει αέριο σε μεγάλες ποσότητες. Η παραγωγή αερίου που εμφανίζεται με τη μορφή φυσαλίδων που ανέρχονται στην επιφάνεια και δημιουργούν παχύ στρώμα αφρού οφείλεται σε αυτόν τον μικροοργανισμό. Ο βάκιλλος αυτός όπως επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια της μελέτης ανήκει στο γένος *Clostridium*.

Οι βάκιλλοι από τη μικροχλωρίδα των ρεβιθιών 1989 και 1990 που αναγνωρίστηκαν σαν σποριογόνοι, υποβλήθηκαν σε μια σειρά μικροβιολογικών δοκιμών που περιλαμβάνονται στον πίνακα 14 και ταυτοποιήθηκαν. Όπως φαίνεται στον πίνακα επικρατούν τα είδη *B. coagulans* και *B. megaterium*.

Έχει αναφερθεί στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας ότι η ζύμωση των σπερμάτων δημητριακών ή οσπρίων ή και μιγμάτων αυτών γίνεται σε πολλά μέρη του κόσμου με σκοπό τη βελτίωση της θρεπτικής τους αξίας και των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Σε ορισμένα από αυτά τα υποστρώματα ζύμωσης χρησιμοποιείται και το ρεβίθι. Συνήθως μετά τη ζύμωση, το υπόστρωμα υφίσταται διάφορες επεξεργασίες (τηγάνισμα, ψήσιμο στο φούρνο) για την παρασκευή διαφόρων παραδοσιακών προϊόντων και εδεσμάτων. Κατά τους Chavan και Kadam (1989), σε πολλές περιπτώσεις η ζύμωση είναι φυσική και γίνεται από τη μικροχλωρίδα που επικάθεται στην επιφάνεια των σπόρων. Η χλωρίδα είναι συνήθως μικτή από βακτήρια και ζύμες ή και μύκητες.

Τα πλέον κοινά βακτήρια που έχουν απομονωθεί σε αυτές τις ζυμώσεις ανήκουν στα γένη *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* και *Bacillus*. Κατά τον Reddy και άλλους (1980), οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε τρία υποστρώματα ζύμωσης με ρεβίθι, ρύζι - ρεβίθι και ρύζι ή σιτάρι με ρεβίθι, είναι οι *L. mesenteroides*, *L. fermenti*, *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *S. faecalis*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus* sp. και ζύμες.

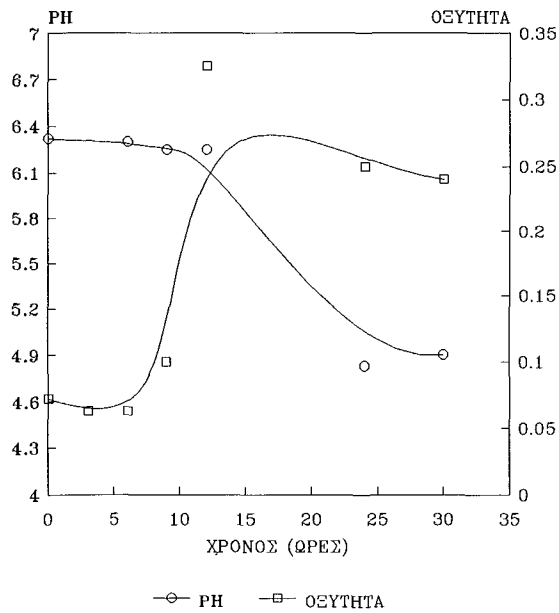
Σε ένα υπόστρωμα ζύμωσης από ρεβίθι (βλέπε προηγούμενο κεφάλαιο), που μελετήθηκε από τους Zamora και Fields (1979), απομονώθηκαν μόνο οι ομοζυμωτικοί *L. casei*, *L. leichmanii*, *L. plantarum*, *p. pentosaceus*, *P. acidilactici* και *L. helveticus*. Δεν απομονώθηκαν παθογόνοι, όμως κολιβακτήρια αναπτύχθηκαν σε μεγάλους αριθμούς τη δεύτερη μέρα της ζύμωσης και εξαλείφθηκαν την τέταρτη μέρα. Από τον Fields και άλλους (1981), απομονώθηκαν οι *L. fermentum*, *L. cellobiosus* και *P. acidilactici* από ένα ζυμούμενο υπόστρωμα αραβοσίτου (corn meal). Τα κολιβακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες αν και υπήρχαν στην αρχή εξαφανίστηκαν από το σύστημα τη δεύτερη μέρα της ζύμωσης. Ο ετεροζυμωτικός *L. mesenteroides* επικρατεί σε ένα υπόστρωμα ζύμωσης από ρύζι και black gram που μελετήθηκε από τον Steinkraus και άλλους, 1967. Ο *S. faecalis* και *P. cerevisiae* αναπτύχθηκαν επίσης στα τελευταία στάδια της ζύμωσης.

Τέλος από τους Ashenafi & Busse (1991), μελετήθηκε η μικροχλωρίδα κατά την ενυδάτωση σπερμάτων σόγιας, μπιζελιών, ρεβιθιού και Horsebean στους 30°C για 24 ώρες μέσα σε νερό οξινισμένο ή όχι με οξεϊκό οξύ. Οι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι επικράτησαν γενικά. Κολιβακτήρια και ζύμες βρέθηκαν επίσης σε μεγάλους αριθμούς στο μη οξινισμένο νερό της ενυδάτωσης. Κατά τους Mulyowidarsa και άλλους (1989), που μελέτησαν επίσης την ενυδάτωση, στους 20°C επικρατούν οι *L. casei* και *Str. epidermitis* ενώ στους 30°C οι *L. casei*, *Str. faecium*, *Str. dysgalactiae*. Άλλοι ερευνητές (Nout et al. 1987), αναφέρουν ότι στους 25°C επικρατεί ο *L. plantarum* ενώ στους 37°C *Pediococcus* spp.

Συμπερασματικά, η μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται σε υποστρώματα νερού - δημητριακών ή και οσπρίων σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι μικτή και ποικίλει από υπόστρωμα σε υπόστρωμα ανάλογα με το είδος των σπερμάτων και τις συνθήκες χειρισμού και επώασης. Εν τούτοις θα μπορούσε να σημειωθεί ότι στις ζυμώσεις αυτές επικρατούν συνήθως τα γαλακτοβακτήρια, με αποτέλεσμα σημαντική πτώση του pH και αντίστοιχη αύξηση της οξύτητας σε αντίθεση με το μελετούμενο σύστημα ζύμωσης όπου επικρατεί είδος του γένους *Clostridium* και το pH δεν κατέρχεται συνήθως κάτω από 4.4.

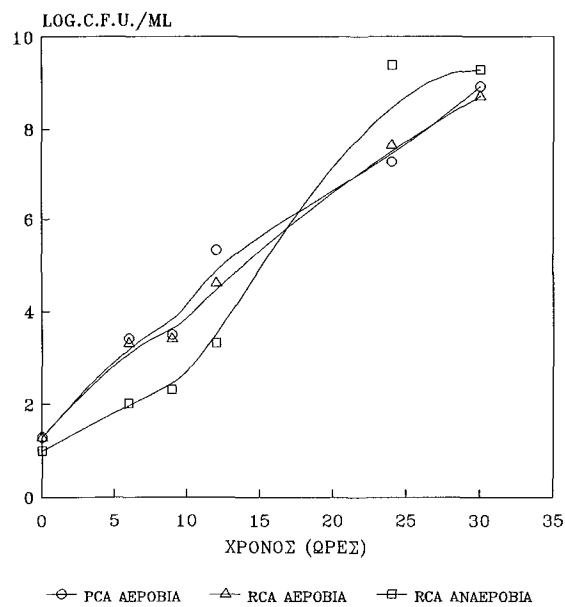
Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε καμία από αυτές τις μελέτες δεν αναφέρονται βακτήρια του γένους *Clostridium* σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας.

ΠΟΡΕΙΑ ΡΗ ΟΞΥΤΗΤΑΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ  
ΑΠΟ ΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟΥΣ 37 °C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6

ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ  
ΑΕΡΟΒΙΑ (PCA, RCA) ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ RCA  
ΖΥΜΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΡΕΒΙΘΙΟΥ ΣΤΟΥΣ 37 °C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7

ΠΙΝΑΚΑΣ 12

Γενικά χαρακτηριστικά και αναγνώριση του γένους στα διάφορα στελέχη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν κατά τη ζύμωση σπερμάτων ρεβιθίου περιόδου 1989

α/α	Υπόστρωμα και χρόνος (h) απομόνωσης	Ανάπτυξη αερόβια(+) αναερόβια(-)	Βάκιλλος Κόκκος	Άλλα Χαρακτηριστικά	Χρώση Gram	Παραγωγή Σπορίων	Κατάσταση Παραγωγή Αερίου RCM	Αναγνώριση του γένους
1	RCA-3-(h)	+	B	M,Δ	+	-	-	Lactobacillus sp.
2	PCA-6(h)	+	B	Δ,T,A	+	+	+++	Bacillus sp.
3	RCA-6(h)	+	B	Δ,T,M	+	-	-	Lactobacillus sp
4	PCA-12(h)	+	B	M,Δ	+	+	+++	Bacillus sp
5	PCA-12(h)	+	B	M,Δ	+	+	+++	Bacillus sp.
6	PCA-12(h)	+	B	Δ,T,M	+-	+	+	Bacillus sp.
7	PCA-12(h)	+	B	M,Δ,Λ,K	+	+	++	Bacillus sp.
8	RCA-12(h)	+	B	Δ,T,M	+	-	+++	Corynebacterium sp.
9	RCA-12(h)	+	B	M,Δ,Λ,K	+	+-	+++	Kurthia ή Bacillus
10	RCA-12(h)	+	B	Δ,A,M	+-	-	+++	Corynebacterium sp
11	RCA-12(h)	+	K	M,Δ	+	-	+++	Micrococcus sp.
12	PCA-24(h)	+	B	M,Δ,K	+	+	+++	Bacillus sp.
13	PCA-24(h)	+	B	M,Δ	+	+	+-	Bacillus sp
14	PCA-24(h)	+	B	M,Λ,Π	+-	+	+	Bacillus sp.
15	RCA-24(h)	+	B	M,Δ,K	+-	+	+++	Bacillus sp.
16	RCA-24(h)	+	B	Δ,A,M	+-	-	-	Lactobacillus sp
17	RCA-24(h)	+	B	M,Δ,Λ,K	+	+-	+++	Kurthia ή Bacillus
18	PCA-30(h)	+	B	Λ,A	+	+	++	Bacillus sp.
19	PCA-30(h)	+	B	M,Δ,Λ,Π	+-	+	+	Bacillus sp.
20	RCA-6,12,24,30	-	B	M,Δ,M	+	+	-	+++ Clostridium sp.

\*

B=Βάκιλλοι K=Κόκκοι M=Μονοί T=Τριάδες β=Μικροί Βάκιλλοι  
 Κ=Κκινούμενοι Λ=Λεπτοί Δ=Διάδες Α=Αλυσίδες Π=Πολυμορφισμός  
 Γ=Μεταχρωματικά κοκκία, Ψευδοσπυρήνες, στο κυτταρόπλασμα

ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Γενικά χαρακτηριστικά και αναγνώριση του γένους των διαφόρων στελεχών μικροοργανισμών που απομονώθηκαν κατά τη ζύμωση σπερμάτων ρεβιθίου περιόδου 1990.

α/α	Υπόστρωμα χρόνος (h) απομόνωσης	Αερόβια (+) Αναερόβια (-)	Βάκιλλος Κόκκος	Άλλα Χαρακτ/κά Gram	Χρώση Σπορίων	Παραγωγή Κατάσση Αερίου RCM	Αναγνώριση του γένους		
1	PCA-3h	+	B	M, Δ, K	+	+	+++	-	Bacillus sp.
2	PCA-6h	+	B	M, Δ, K	+	+	+++	-	Bacillus sp.
3	PCA-6h	+	B	M, Δ, A, B, Π	+	-	+++	-	Corynebacterium sp.
4	RCA-9h	+	B	M, Δ, A, B, Π	+	-	-	-	Lactobacillus sp.
5	RCA-24h	+	B	M, Δ, A, B, Π	+	-	+++	-	Corynebacterium sp.
6	PCA-12h	+	B	M, Δ, T, G	+	-	+++	-	Corynebacterium sp.
7	RCA-12h	+	B	M, Δ, T, G	+	-	++	-	Corynebacterium sp.
8	PCA-12h	+	B	Δ, T, A, K	+	+	+	-	Bacillus sp.
9	PCA-24h	+	B	Δ, T, A, K	+	+	+	-	Bacillus sp.
10	PCA-30h	+	B	Δ, T, A, K	+	+	+	-	Bacillus sp.
11	RCA-12h	+	K	Δ, A	+	-	-	-	Pediococcus sp.
12	RCA-12h	+	K, β	Δ, T	+	-	+++	-	Micrococcus sp.
13	RCA-6h	-	B	M, Δ, G	+	+	-	+++	Clostridium sp.
14	RCA-9h	-	K	A, T	+	-	-	-	Pediococcus sp.

\*

B=Βάκιλλοι K=Κόκκοι M=Μονοί T=Τριάδες β=Μικροί Βάκιλλοι

K=Κινούμενοι Δ=Διπλοί Δ=Διάδες A=Αλυσίδες Π=Πολυμορφισμός

G=Μεταχρωματικά κοκκία, Ψευδοφυρίες, στο κυτταρόπλασμα

ΠΙΝΑΚΑΣ 14

Ταυτοποίηση διαφόρων στελεχών του γένους *Bacillus* που απομονώθηκαν από τη μικροχλωρίδα σπερμάτων ρεβιθιού την περίοδο 1989 & 1990.

Ετος	Υπόστρωμα Χρόνος (h)	Διάφορα τεστ που έγιναν												Ταυτοποίηση
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1989	PCA-(6h)	+++	-	+	+		-		+	-	-		-	<i>B.firmus</i>
1989	PCA-(12h)	+	-	+	+		-		+	-	+		-	<i>B.megaterium</i>
1989	PCA-(12h)	++	++	+	+		-		+	-				<i>B.coagulans</i>
1989	PCA-(12h)	+++	+	+	+		-		+	-				<i>B.coagulans</i>
1989	PCA-(12h)	+++	++	+	+	+	-		+	-		+		<i>B.licheniformis</i>
1989	PCA-(24h)	++	-	+	+		-		+	-	+		-	<i>B.larvae</i>
1989	PCA-(24h)	+	-	+	-		-		+	-	+		+	<i>B.firmus</i>
1989	PCA-(24h)	+++	-	+	+		-		+	-	-		-	<i>B.megaterium</i>
1989	PCA-(30h)	++	-	+	+		-		+					<i>B.firmus</i>
1989	PCA-(30h)	+	++	+	+		-	-	+	-				<i>B.alvei</i>
1990	PCA-(3h)	+++	+	+	+		-		-	-				<i>B.coagulans</i>
1990	PCA-(6h)	++	++	+	+		-		-	-				<i>B.coagulans</i>
1990	PCA-(12h)	+++	-	+	+		-		+	-	+		+	<i>B.megaterium</i>
1990	PCA-(24h)	+	-	+	+	+			+	-	+		+	<i>B.megaterium</i>
1990	PCA-(30h)	+	-	+	+	+			+	-	+		+	<i>B.megaterium</i>

1=Καταλάση  
 2=Voges - Proskauer (V.P)  
 3=Ανάπτυξη αναερόβια  
 4= " 50°C  
 5= " 7% NaCl  
 6=Αέριο και οξύ από γλυκόζη

7=Ανάπτυξη pH=5.7  
 8=Υδρόλυση αμύλου  
 9=Ανάπτυξη 65°C  
 10=Χρησιμοποίηση κιτρικού  
 11=Υδρόλυση καζεΐνης  
 12=pH σε V.P broth <6.0(+)



## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΟΓΚΩΣΗ ΤΟΥ ΖΥΜΑΡΙΟΥ ΣΤΟ ΕΠΤΑΖΥΜΟ

### Πρώτη απομόνωση του μικροοργανισμού

Απο τα αποτελέσματα της μελέτης της μικροχλωρίδας που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο είναι φανερό ότι μόνο ένας μικροοργανισμός που απομονώθηκε σε ρεβίθια Κρήτης 1989 και 1990, είναι ετεροζυμωτικός και παράγει αέριο κατά τη ζύμωση του ρεβιθιού. Κανένα απο τα υπόλοιπα μέλη της μικροχλωρίδας που απομονώθηκαν δεν παράγει αέριο όπως διαπιστώθηκε απο την ανάπτυξη των καθαρών καλλιιεργειών σε υγρό υπόστρωμα R.C.M (βλέπε πίνακες 12 και 13). Για την ανάπτυξη σε στερεό υπόστρωμα R.C.A απαιτείται επώαση σε αναερόβιες συνθήκες. Ο μικροοργανισμός αυτός κωδικοποιείται στη φάση αυτή ως BE = Βάκιλλος του Επτάζυμου.

Ο BE απομονώθηκε για πρώτη φορά σε πείραμα ζύμωσης ρεβιθιού Κρήτης 1989. Ο ίδιος μικροοργανισμός απομονώθηκε και από διογκωμένο ζυμάρι με "μαγιά" από ρεβίθι που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή ψωμιού. Το ψωμί αυτό έδωσε τα γνωστά χαρακτηριστικά του επτάζυμου (γεύση, άρωμα, υφή). Με το πείραμα αυτό επιβεβαιώθηκε ότι ο BE είναι υπεύθυνος για τη διογκωση του ζυμαριού στο "επτάζυμο". Επίσης ο BE απομονώθηκε και από δείγμα διογκωμένου ζυμαριού από εμπορικό φούρνο της Αθήνας που παρασκευάζει επτάζυμο σε παξιμάδι με την παραδοσιακή "μαγιά" από ρεβίθι. Τέλος θα πρέπει να αναφέρουμε ότι έγινε και μία δοκιμαστική παρασκευή επτάζυμου σε αυτόν το φούρνο με καθαρή καλλιέργεια του στελέχους BE KP-89 και τη διαδικασία παρασκευής που εφαρμόζει στην πράξη. Το ψωμί που παρασκευάστηκε σε παξιμάδι, δεν ήταν διαφορετικό από αυτό της δικής του παρασκευής.

Μια μέθοδος εύκολης και γρήγορης απομόνωσης του Βάκιλλου του "επτάζυμου" απο το ρεβίθι που αναπτύχθηκε και εφαρμόζεται στο εργαστήριο είναι η παρακάτω. Μέσα σε φιαλίδια που περιέχουν περίπου 18 ml υγρό υπόστρωμα R.C.M και κλείνουν ερμητικά με βιδωτό καπάκι μεταφέρονται ασηπτικά 6-8 ολόκληροι σπόροι απο το ρεβίθι που θέλουμε να απομονώσουμε

το μικροοργανισμό. Τα φιαλίδια τοποθετούνται για επώαση στους 45°C. Η χρήση του υποστρώματος R.C.M που ευνοεί την ανάπτυξη των αναερόβιων, σε συνδυασμό με τη χρησιμοποίηση κλειστών φιαλιδίων που εμποδίζει τη διαφυγή του παραγόμενου κατά τη ζύμωση CO<sub>2</sub>, δημιουργούν έντονα αναγωγικές συνθήκες που αποκλείουν την ανάπτυξη αερόβιας μικροχλωρίδας και ο ενδιαφέρων μικροοργανισμός επικρατεί. Η υψηλή θερμοκρασία επώασης (45°C), στην οποία αναπτύσσεται ο BE, είναι ένας επιπλέον παράγοντας επιλογής.

Μετά απο 20 περίπου ώρες επώασης στους 45°C, στα φιαλίδια έχει αναπτυχθεί και επικρατήσει ο ενδιαφέρων μικροοργανισμός σε επίπεδο περίπου 8-9 log/ml και έχει δημιουργήσει χαρακτηριστικό στρώμα επιφανειακού αφρισμού. Επί πλέον το παγιδευμένο CO<sub>2</sub> έχει δημιουργήσει μεγάλη εσωτερική πίεση με αποτέλεσμα κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου να παρατηρείται υπερχύλιση του αφρού. Τονίζεται επίσης ιδιαίτερα το εξής φαινόμενο. Εάν πλησιάσουμε το στόμιο φιαλιδίου με R.C.M στο οποίο έχει αναπτυχθεί ο βάκιλλος του επτάζυμου σε φλόγα Bunsen, παρατηρούμε στιγμιαία ανάφλεξη στο εσωτερικό. Αυτό σημαίνει την παρουσία μέσα στην υπερκεείμενη αέρια φάση μέσα στο φιαλίδιο ενός αερίου που αναφλέγεται, όπως θα διαπιστώσουμε στα επόμενα κεφάλαια της μελέτης.

Για να επιτύχουμε καθαρή καλλιέργεια απο το BE αρκεί στη συνέχεια να κάνουμε καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα R.C.A κάτω απο αναερόβιες συνθήκες και νέα μεταφορά πάλι σε R.C.M απο μεμονωμένες αποικίες. Η τεχνική αναερόβιωσης που εφαρμόζουμε στο εργαστήριο στην περίπτωση αυτή, είναι της ενσωμάτωσης ή επιφανειακής στρώσης σε RCA, δεύτερη στρώση απο το ίδιο υλικό και επώαση σε ατμόσφαιρα καθαρού αζώτου.

#### Περιγραφή και αναγνώριση του γένους του BE

Ο BE είναι μη κινούμενος σε ραβδοειδή μορφή βάκιλλος, θετικός κατά Gram, μονός ή κατά ζεύγη. Όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία (A), μέσα στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται έντονα μεταχρωματικά κοκκία (granules, ψευδοπυρήνες) που φαίνονται εντονότερα σε γηρασμένα κύτταρα. Επίσης στη φωτογραφία (B) φαίνεται ότι ο BE σχηματίζει

κάψουλα (capsule) που περιβάλλει τα κυτταρικά τοιχώματα. Οι κάψουλες σχηματίζονται από πολλούς μικροοργανισμούς (Bacillus spp, Leucopostoc spp, Clostridium spp κ.α) και είναι συνήθως οργανικά πολυμερή (πολυζαχαρίτες). Τα πολυμερή αποτίθενται έξω από τα κυτταρικά τοιχώματα και σχηματίζουν στοιβάδα που περιβάλλει το κύτταρο και συνήθως μένει προσκολλημένη σε αυτό.

Όταν αναπτύσσεται μέσα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με ενσωμάτωση, σχηματίζει χαρακτηριστικές φακοειδείς, αστεροειδείς ή και ακανόνιστες αποικίες όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 όπου παρουσιάζονται σε μεγένθυση διάφορα είδη αποικιών του BE. Είναι χαρακτηριστική η έναρξη παραγωγής και εξάπλωση φυσαλίδων αερίου μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το χρώμα των αποικιών αυτών μέσα στο R.C.A είναι χαρακτηριστικά υποκίτρινο. Όταν ο BE αναπτύσσεται επιφανειακά σχηματίζει αποικίες υποστρόγγυλες με ακανόνιστη περιφέρεια

Μέσα σε υγρό υπόστρωμά R.C.M αναπτύσσεται μόνο στο εσωτερικό και κάτω από την επιφάνεια. Η ζύμωση του υποστρώματος που περιέχει γλυκόζη, συνοδεύεται από το σχηματισμό άφθονων φυσαλίδων αερίου που ανέρχονται στην επιφάνεια και δημιουργούν στρώμα επιφανειακού αφρού. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο παρατηρείται κατά τη ζύμωση του ρεβιθιού.

Η ανάπτυξή του σε στερεό υπόστρωμα R.C.A με ενσωμάτωση και στη συνέχεια διπλή στρώση απαιτεί επι πλέον επώαση σε ατμόσφαιρα αζώτου. Σε προσπάθεια ανάπτυξης του BE σε τρυβλία με R.C.A που είχαν προετοιμασθεί όπως προηγούμενα αλλά τοποθετήθηκαν σε επώαση στους 42°C σε αερόβιες συνθήκες, παρατηρήθηκε ότι ενώ το υπόστρωμα παρουσίασε περίπου την ίδια εικόνα όπως κατά την επώαση σε ατμόσφαιρα αζώτου, δεν παρατηρήθηκαν οι ορατές χαρακτηριστικές αποικίες του B.E. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο B.E αναπτύσσεται κατ' αρχήν αλλά η παραγωγή αερίου που προσπαθεί να διαφύγει καταστρέφει τη δομή του υποστρώματος και η είσοδος του αέρα εμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη των κυττάρων, με αποτέλεσμα να μη σχηματίζονται ορατές αποικίες του μικροοργανισμού.

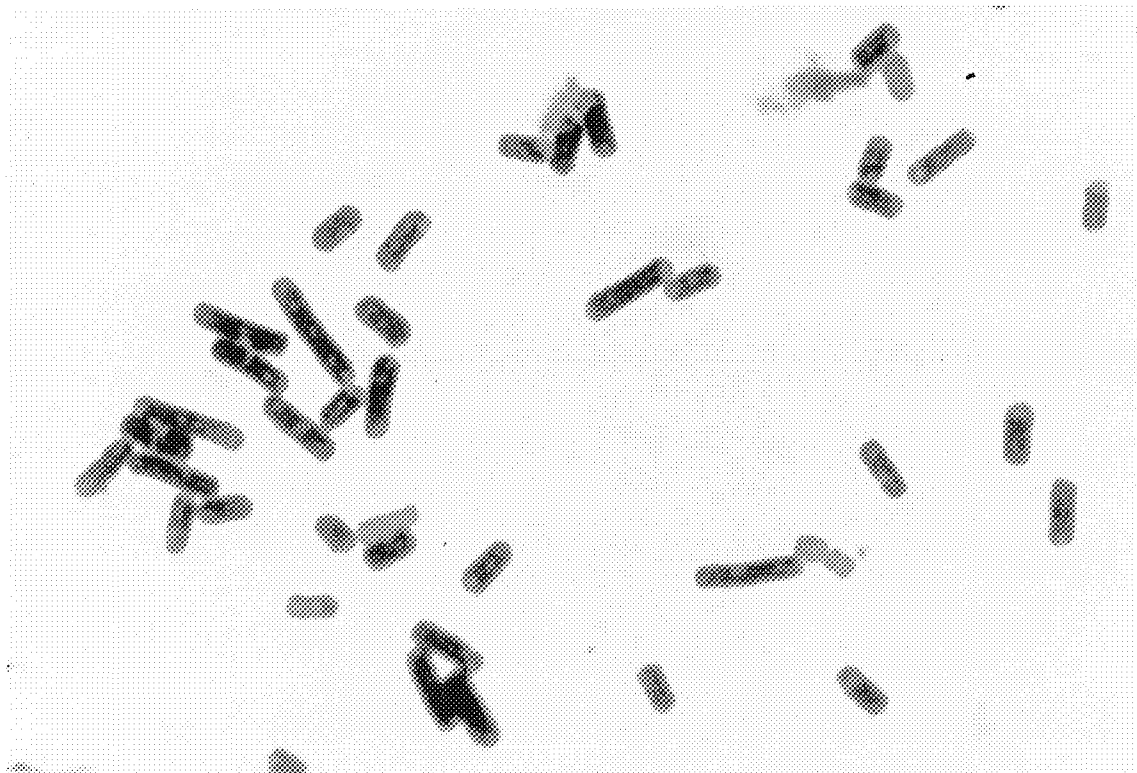
Σε υπόστρωμα R.C.A αναπτύσσεται επιφανειακά μόνο σε συσκευή Gas pack ατμόσφαιρα διοξειδίου και υδρογόνου καθώς και σε

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ 2

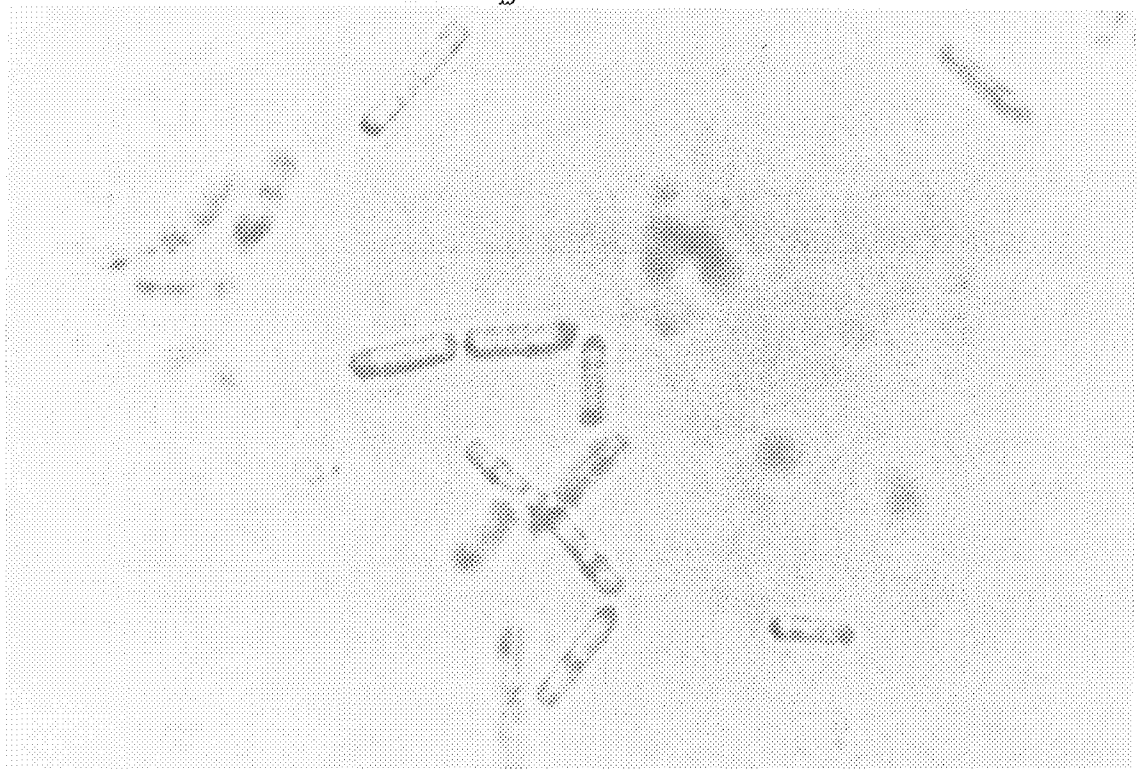
A = Κύτταρα του ΒΕ ΚΡΗΤΗΣ 89 σε χρώση Gram

B = Κύτταρα του ΒΕ ΚΡΗΤΗΣ 89 σε υγρό παρασκευήσρα

A

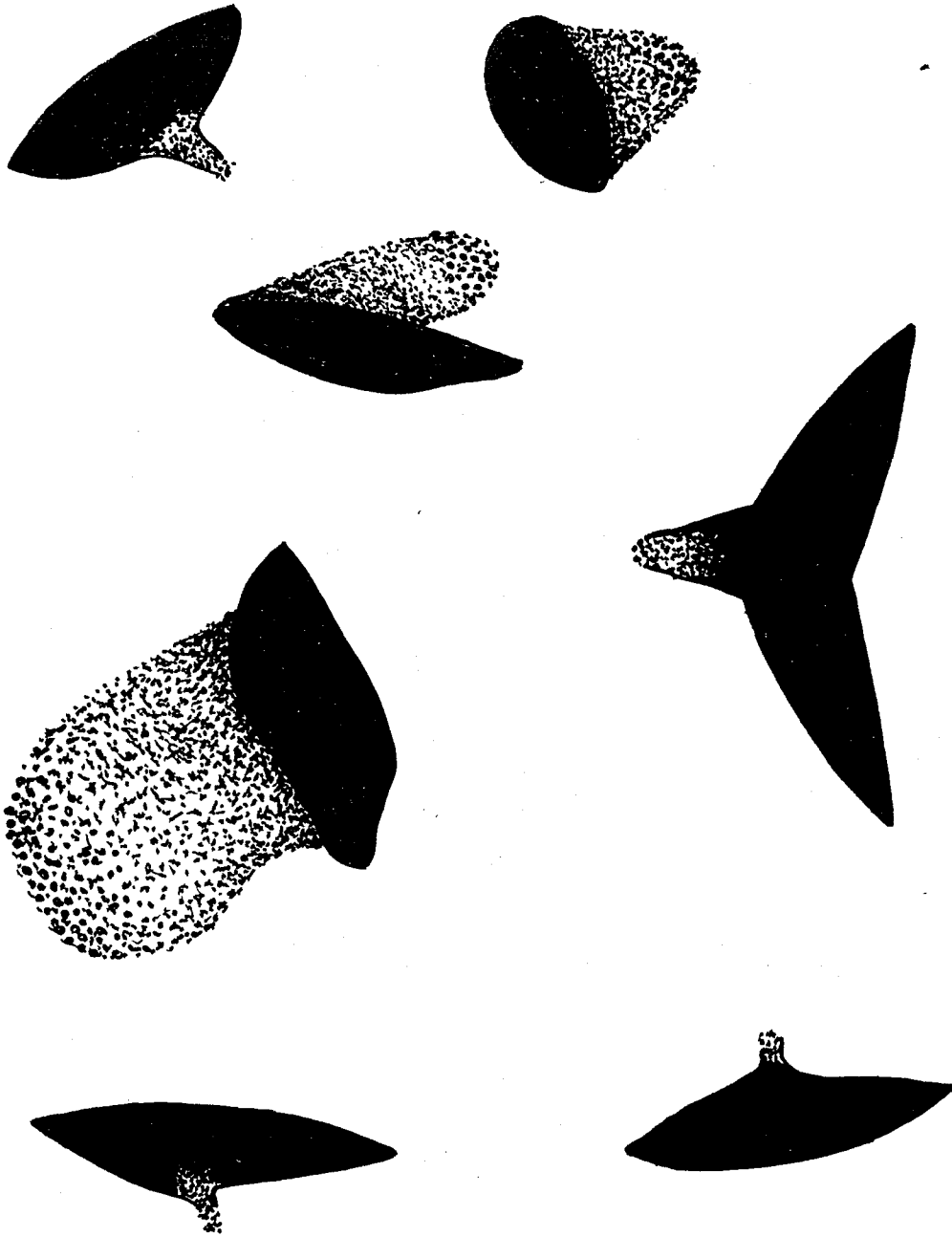


B



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2

Μορφολογία διαφόρων αποικιών του ΒΕ ενσωματωμένων μέσα  
σε στερεό θεπτικό υπόστρωμα



κλίβανο αναερόβιωσης σε ατμόσφαιρα καθαρού αζώτου. Για τους παραπάνω λόγους ο ΒΕ πρέπει να θεωρηθεί σαν αναερόβιος μικροοργανισμός.

Με βάση τα κύρια χαρακτηριστικά του ΒΕ ότι δηλαδή είναι θετικός κατά Gram, καταλάση αρνητικός που αναπτύσσεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε συνδυασμό και το γεγονός της μη παρατήρησης σπορίων, είχε θεωρηθεί αρχικά ότι ο ΒΕ ανήκει στο γένος *Lactobacillus*. Με την πρόοδο όμως της μελέτης ορισμένα νέα χαρακτηριστικά του ΒΕ όπως διαπιστώθηκαν από τα διάφορα βιοχημικά τεστ όπως θα δούμε στη συνέχεια (π.χ. παραγωγή υδρογόνου και βουτυρικού οξέος), αποτέλεσαν ισχυρή ένδειξη ότι ΒΕ ανήκει στο γένος *Clostridium*.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχουμε παρατηρήσει σπόρια στις διάφορες καλλιέργειες του ΒΕ, ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα θρεπτικά υποστρώματα που ευνοούν την σποριογένεση. Αναφέρεται όμως στις κλείδες του Bergey ότι σε ορισμένα είδη κλωστριδίων (π.χ. *C. clostridioforme*, *C. perfringens*, *C. gammosum* κ.α) σπανίως παρατηρούνται σπόρια. Στις περιπτώσεις αυτές η ανάπτυξη τους μετά από θέρμανση για 10min στους 70°C ή 80°C, είναι έμμεση απόδειξη ότι υπάρχουν σπόρια. Ειδικά για το *C. perfringens* υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών που αναφέρονται κυρίως στη χρήση ειδικών υποστρωμάτων που ευνοούν τη σποριογονία. Αναφέρονται όμως και στελέχη του βακτηρίου αυτού στα οποία δεν έχουν παρατηρηθεί σπόρια (Goldner et al., 1986).

Με το σκεπτικό ότι εφόσον ο ΒΕ παράγει σπόρια θα πρέπει αυτά να υπάρχουν στο υλικό που τον ανακτούμε αρχικά, δηλαδή στα ξερά ρεβίθια, έγινε το παρακάτω πείραμα. Σε 6 φιαλίδια με βιζωτό πόμα που περιείχαν υπόστρωμα RCM, μεταφέρθηκαν 6-7 σπόροι ρεβιθιού. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο και θερμάνθηκαν στις παρακάτω θερμοκρασίες για τους αντίστοιχους χρόνους. Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας υπήρχε αντίστοιχο φιαλίδιο μάρτυρας με εμβαπτισμένο υδραργυρικό θερμόμετρο. Η καταμέτρηση του χρόνου γίνονταν από τη στιγμή που το φιαλίδιο μάρτυρας

έφθανε στην επιθυμητή θερμοκρασία.

Φιαλίδιο θερμοκρασία (+-1°C) Χρόνος (min)

---

1	65°C	10
2	70°C	10
3	75°C	10
4	80°C	10
5	85°C	5
6	90°C	5

---

Μετά την επίτευξη του θερμικού χειρισμού ακολουθούσε γρήγορη ψύξη στους 40°C και τοποθέτηση για επώαση στους 42°C σε σύγκριση με αντίστοιχο μάρτυρα χωρίς θέρμανση. Στα φιαλίδια που δεχθήκαν θερμικό χειρισμό μέχρι 85°C για 5min αναπτύχθηκε και απομονώθηκε ο BE και αυτό αποτελεί μια ισχυρή έμμεση ένδειξη ότι ο BE παράγει σπόρια ή άλλες ανθεκτικές μορφές αναπαραγωγής.

Επίσης έγινε θέρμανση με τον ίδιο τρόπο τριών φιαλιδίων με RCM που είχαν εμβολιασθεί με τον BE και επώασθεί στους 42°C για 20h, στους 75°C, 80°C για 5min. Στη συνέχεια ακολούθησε γρήγορη ψύξη και επανεμβολιασμός από τα φιαλίδια αυτά σε άλλα φιαλίδια με RCM που τοποθετήθηκαν εκ νέου για επώαση στους 42°C. Από το φιαλίδιο που είχε θερμανθεί στους 75°C για 5min ο BE αναπτύχθηκε και πάλι. Αυτό το γεγονός αποτελεί επίσης ισχυρή ένδειξη ότι και στο υπόστρωμα RCM υπάρχει πιθανόν ένας μικρός αριθμός σπορίων που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν σε άμεσες μικροσκοπήσεις ή ακόμα και όταν χρησιμοποιηθούν ειδικές χρώσεις για τα σπόρια όπως π.χ. η χρώση με πράσινο του μαλαχίτη.

Από Cato και Salmon (1976), αναφέρεται ότι σε μερικά είδη κλωστριδίων παρατηρούνται σπόρια σε λυοφιλιωμένες καλλιέργειες ενώ αυτό δεν είναι δυνατό στις αρχικές νωπές απομονώσεις. Είναι πιθανόν στην περίπτωση αυτή η λυοφιλίωση να καταστρέφει έναν αριθμό από τα βλαστικά κύτταρα και επομένως να αυξάνει το ποσοστό των σποριογόνων.

Κατά τον Zeicus και άλλους (1980), ένα είδος κλωστριδίου το *Butyribacterium methylotrophicum*, παράγει μη τυπικά σπόρια σε ένα υπόστρωμα που περιέχει 100mM methanol και εκχύλισμα εδάφους. Το είδος αυτό διαφέρει από όλα τα άλλα είδη του γένους *Clostridium* επειδή χρησιμοποιηθεί μεθανόλη για την ανάπτυξη του και τη μετατρέπει σε βουτυρικό.

Τα πλέον συνηθισμένα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την σποριογονία του *C.perfringens* είναι αυτό του Ellners 1956 και ο ζωμός SEC του Angelotti και άλλων (1962). Ο Kim άλλοι (1967), αναφέρουν επίσης την ανάπτυξη ενός τροποποιημένου υποστρώματος που ευνοεί την σποριογονία περισσότερο από το SEC. Οι Duncan και Strong 1968, αναφέρουν επίσης ένα τροποποιημένο υπόστρωμα για την σποριογονία του *C.perfringens* που έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα μέχρι σήμερα. Το υπόστρωμα αυτό καθώς επίσης το Ellners medium και ένα τροποποιημένο RCM και RCA με εκχύλισμα εδάφους (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι), έχουν χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο πλην όμως δεν κατέστη δυνατή η παρατήρηση σπορίων του BE. Στο τροποποιημένο υπόστρωμα RCM με εκχύλισμα εδάφους, επίσης δεν παρατηρήθηκαν σπόρια αλλά υψηλός ρυθμός ανάπτυξης του BE. Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί στην εκχύλιση από το έδαφος ορισμένων συστατικών, πιθανόν ανοργάνων αλάτων, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Σε άλλη ερευνητική εργασία από τον Roberts 1967, που συγκρίνονται διάφορα υποστρώματα για την σποριογονία των μεσόφιλων κλωστριδίων μεταξύ των οποίων και το RCM, αναφέρεται ότι το Cooked Meat Medium (CMM) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Πάντως και στο RCM τα περισσότερα είδη που δοκιμάστηκαν έδειξαν από καλή έως μέτρια σποριογένεση.

#### Ανάκτηση του BE και από άλλους σπόρους δημητριακών και οσπρίων

Έχει ήδη αναφερθεί ο BE είναι ένας μικροοργανισμός που επιζεί και συντηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω στην επιφάνεια των σπόρων του ρεβιθιού. Ήδη αυτό έχει διαπιστωθεί σε δείγμα ρεβιθιού περιόδου 1989 από το οποίο μπορούμε κα



ανακτούμε τον ΒΕ μέχρι σήμερα δηλαδή για τρία περίπου χρόνια. Επειδή όμως το ρεβίθι είναι ένα ποώδες φυτό που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του εδάφους είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι ο ΒΕ υπάρχει στο έδαφος από όπου μεταδίδεται στο φυτό και τους σπόρους του ρεβιθιού, οπότε είναι πιθανόν να συμβεί το ίδιο και με τους σπόρους άλλων φυτών. Αν ο ΒΕ δεν απομονωθεί από τους σπόρους άλλων δημητριακών και οσπρίων αυτό θα σημαίνει ότι το ρεβίθι σαν φυτό παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο επιλογής και φιλοξενίας του εν λόγω μικροοργανισμού.

Με το παραπάνω σκεπτικό έγινε πείραμα απομόνωσης του ΒΕ από τα παρακάτω είδη σπόρων και χώρους προέλευσης:

Ρεβίθια Κρήτης		1989, 1990	
"	Κορίνθου	1989	
"	Λήμνου	1989	
Φασόλια περιτοχής Πελοποννήσου		1989	
Αραβόσιτος	"	"	1989
Σίτος	"	"	1989

Για την απομόνωση του ΒΕ εφαρμόσθηκε η μέθοδος που έχει ήδη περιγραφεί στο προηγούμενο κεφάλαιο δηλαδή της ασηπτικής μεταφοράς ολόκληρων σπόρων (8-10) σε υπόστρωμα RCM μέσα σε φιαλίδια με βιδωτό καπάκι και στη συνέχεια επώασης στους 45°C.

Σε όλα τα δείγματα σπόρων που έγινε ο παραπάνω χειρισμός παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του χαρακτηριστικού επιφανειακού αφρισμού που είναι πρώτη ένδειξη της παρουσίας του ΒΕ στα δείγματα αυτά. Επίσης κατά το άνοιγμα των φιαλιδίων παρατηρήθηκε το φαινόμενο της ανάφλεξης κατά το πλησίωμα σε φλόγα λύχνου bunsen. Σε άμεση μικροσκοπική παρατήρηση εμφανίσθηκαν οι γνωστοί βάκιλλοι με μικρές διαφορές ως προς το μέγεθος, σχήμα και την παρουσία των διαθλαστικών κοκκίων. Ακολούθησε η γνωστή διαδικασία απομόνωσης, καθαρισμού και διατήρησης των στελεχών αυτών του ΒΕ σε RCA και RCM για παραπέρα μελέτη.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των διαφόρων

στελεχών του ΒΕ σε RCA με ενσωμάτωση έδωσε την ίδια μορφή των χαρακτηριστικών αποικιών του ΒΕ όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Με το πείραμα αυτό επιβεβαιώθηκε η αρχική υπόθεση ότι ο ΒΕ είναι κοινός μικροοργανισμός στη φύση που υπάρχει πιθανόν στο έδαφος. Επιζεί πάνω στα Ξερά σπέρματα διαφόρων φυτών και το ρεβίθι δεν είναι η αποκλειστική πηγή προέλευσής του. Εκείνο όμως που θα πρέπει να τύχει ιδιαίτερης προσοχής και περαιτέρω μελέτης, είναι πώς και με ποιά μορφή επιζεί για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα αυτός ο μικροοργανισμός πάνω στους Ξερούς σπόρους όπου η ενεργότητα του νερού είναι πολύ χαμηλή, αν αυτό δεν συμβαίνει με τη μορφή των σπορίων.

Ζύμωση του υποστρώματος RCM και παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων από τα διάφορα στελέχη του BE.

Τα διάφορα στελέχη του BE που απομονώθηκαν από τους διάφορους σπόρους που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο πείραμα παρουσιάζουν κατά αρχήν ομοιότητες ως προς ορισμένα μορφολογικά και βιοχημικά tests όπως π.χ. βάκιλλοι θετικοί κατά Gram με μεταχρωματικά κοκκία στο κυτταρόπλασμα, έντονα ετεροζυμωτικοί στο υπόστρωμα RCM με έντονη παραγωγή αερίου και σχηματισμό επιφανειακού αφρισμού, παραγωγή αερίου στην υπερκείμενη φάση που αναφλέγεται κλπ. Με βάση αυτές τις ομοιότητες έχουμε καταλήξει κατά αρχήν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού και συγκεκριμένα του BE. Για επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής μελετήθηκε για τα στελέχη αυτά, η πορεία της ζύμωσης του υποστρώματος RCM και η παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων καθώς και οι πρωτεΐνες του κυττάρου όπως θα δούμε παρακάτω.

Η μελέτη της πορείας της ζύμωσης του υποστρώματος RCM από τα διάφορα στελέχη του BE, έγινε μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε 2 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα περιλαμβάνονται στον πίνακα 15, με την εξέλιξη του pH, της σφαιμετρούμενης οξύτητας, της οπτικής πυκνότητας και των μεταβολιτών του γαλακτικού, βουτυρικού και οξικού οξέος.

Η πορεία του pH δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Σε όλους τους χρόνους της ανάλυσης οι τιμές του pH είναι παραπλήσιες σε όλα τα στελέχη. Η τελική τιμή του pH των 24 ωρών, διαμορφώνεται από 4.52-4.70 και δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Για τις τιμές της οξύτητας ισχύουν οι ίδιες παρατηρήσεις. Στις 24 ώρες οι τιμές της οξύτητας στο υπόστρωμα διαμορφώθηκαν από 0.603-0.756% .

Ως προς την αύξηση της οπτικής πυκνότητας ενώ παρουσιάζονται μικροδιαφορές στις πρώτες ώρες της ζύμωσης φαίνεται ότι οι διαφορές αυτές αμβλύνονται προς το τέλος της ζύμωσης.

Τα αποτελέσματα του ενζυματικού προσδιορισμού του

γαλακτικού οξέος που περιλαμβάνονται στον πίνακα δείχνουν ότι το επίπεδο γαλακτικού οξέος σε σύγκριση με το χρόνο μηδέν, παραμένει σχεδόν σταθερό μέχρι τις 6 ώρες της ζύμωσης. Το επίπεδο αρχίζει να αυξάνει από τις 12 ώρες και έχει αυξηθεί εμφανώς στις 24 ώρες της ζύμωσης δηλαδή όταν αυτή έχει ουσιαστικά περατωθεί. Εκείνο πάντως που σημειώνεται ιδιαίτερα είναι ότι ένα τελικό επίπεδο γαλακτικού οξέος 0.4mg/ml δηλαδή 0.04%, είναι χαμηλό σε σύγκριση με την τελική σγκομετρουμένη οξύτητα, που διαμορφώνεται κυρίως από την παρουσία του βουτυρικού και του οξεικού οξέος όπως φαίνεται στον ίδιο πίνακα. Το επίπεδο του οξεικού οξέος για όλα γενικά τα στελέχη, είναι χαμηλό σε όλους τους χρόνους της ανάλυσης. Αντίθετα το βουτυρικό οξύ παρουσιάζει συνεχή αύξηση στη διάρκεια της ζύμωσης σε όλα τα στελέχη και το τελικό επίπεδο στις 24 ώρες δηλαδή στο τέλος της ζύμωσης, είναι από 0.49- 0.59% . Συμπεραίνεται λοιπόν ότι το βουτυρικό είναι το πλέον σημαντικό οξύ που παράγεται από τα διάφορα στελέχη. Ακολουθεί το οξεικό και σε πολύ μικρές ποσότητες το γαλακτικό.

Η ανάλυση των πτητικών λιπαρών οξέων για τα διάφορα στελέχη του BE έγινε σε αέριο χρωματογράφο της Perkin-Elmer όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Στο σχεδιάγραμμα 8 περιλαμβάνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα του υποστρώματος RCM στο χρόνο μηδέν (Μάρτυρας) και από ένα χρωματογράφημα μετά την ανάπτυξη των διαφόρων στελεχών για 24 ώρες στο ίδιο υπόστρωμα. Η ανάπτυξη των διαφόρων στελεχών στην περίπτωση αυτή έγινε μέσα σε φιαλίδια με βιδωτό πώμα.

Στο χρωματογράφημα του μάρτυρα παρατηρούμε 7 συνολικά κορυφές. Η κορυφή 1 οφείλεται στο διαλύτη δηλαδή το νερό και η μεγάλη κορυφή 3 που κυριαρχεί σε έκταση στο χρωματογράφημα είναι οξεικό οξύ και οφείλεται στο οξεικό νάτριο που περιέχεται στα συστατικά του υποστρώματος RCM. Οι υπόλοιπες κορυφές οφείλονται σε διάφορα πτητικά συστατικά του υποστρώματος.

Αν συγκρίνουμε το χρωματογράφημα του μάρτυρα με τα χρωματογραφήματα των άλλων στελεχών παρατηρούμε την εμφάνιση μιας νέας κορυφής (β) που δεν υπήρχε στο μάρτυρα και που

είναι μεγαλύτερη σε έκταση από όλες τις άλλες καθώς επίσης και 3 ακόμα νέες (α, γ, δ) κορυφές. Στα χρωματογραφήματα αυτά μπορεί επίσης να παρατηρηθεί η αύξηση σε έκταση της κορυφής (3) που αναγνωρίσθηκε σαν οξεικό οξύ. Η νέα κορυφή (β) έχει αναγνωρισθεί και οφείλεται στο βουτυρικό οξύ ενώ οι κορυφές (γ) και (δ) οφείλονται με μεγάλη πιθανότητα στα ισοκαπροϊκό και καπροϊκό οξύ. Η κορυφή (α) οφείλεται σε άλλο πτητικό μεταβολίτη. Εκένο πάντως που θα πρέπει να τονισθεί είναι ότι τα χρωματογραφήματα των διαφόρων στελεχών δεν διαφέρουν ουσιαστικά μεταξύ τους ως προς το είδος των λιπαρών οξέων που παράγονται κατά τη ζύμωση του υποστρώματος RCM, και αυτό αποτελεί μία ακόμα ένδειξη ότι πρόκειται για στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού.

Από τα αποτελέσματα που περιλαμβάνονται στον πίνακα 16 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το βουτυρικό και το οξεικό οξύ αποτελούν το 98% περίπου των συνολικών πτητικών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη ζύμωση του υποστρώματος. Το βουτυρικό οξύ κυριαρχεί και αποτελεί το 78% περίπου της συνολικής έκτασης όλων των κορυφών και φαίνεται ότι συνεισφέρει σημαντικά στη διαμόρφωση του χαρακτηριστικού αρώματος και γεύσης του ψωμιού αυτού. Ακολουθεί το οξεικό με 20% περίπου και μόνο 2% όλα τα υπόλοιπα πτητικά λιπαρά οξέα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15

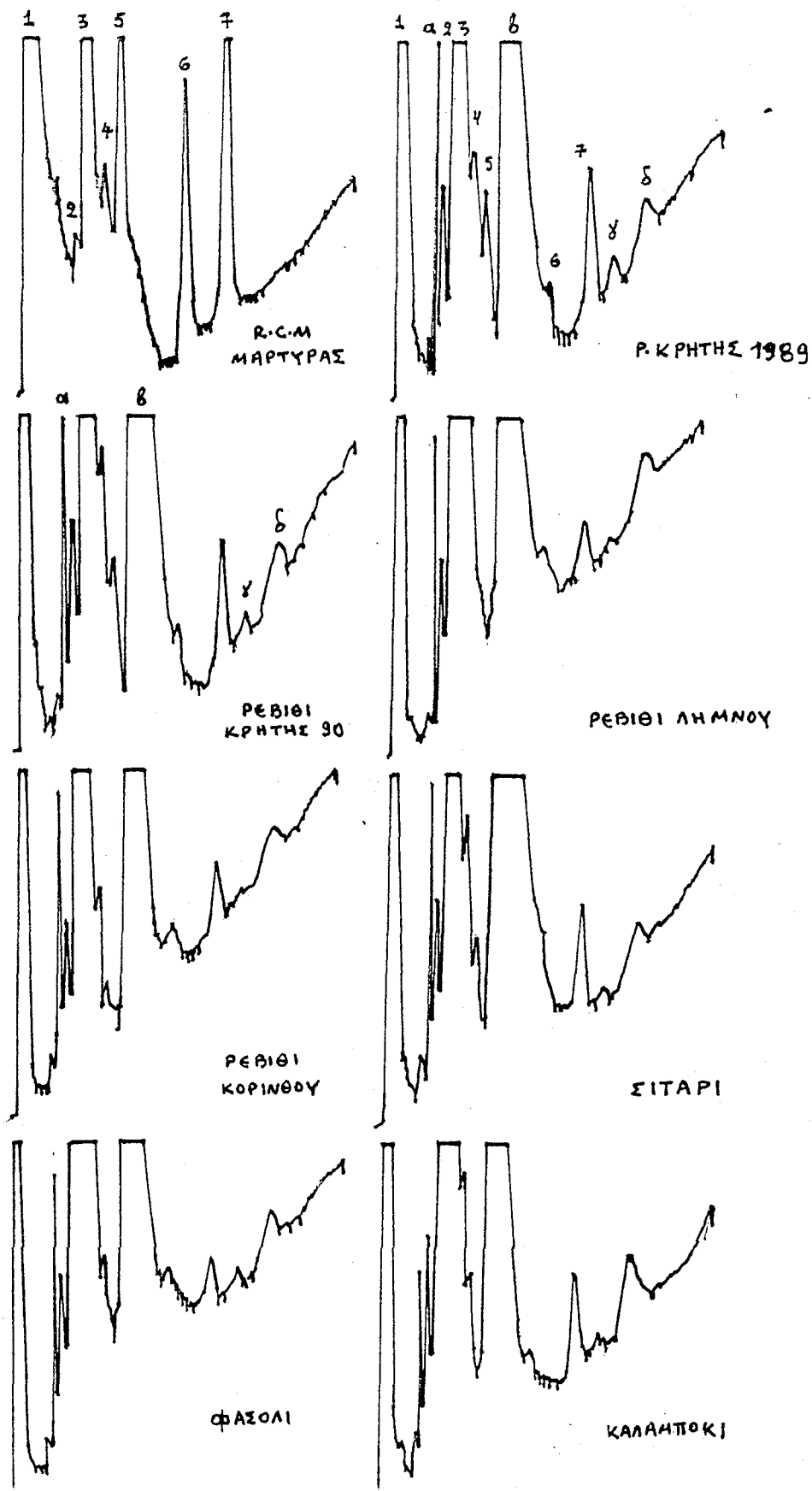
Πορεία pH, Ογκ. οξύτητας, O.D, Γαλακτικού, Βουτυρικού και Οξεικού οξέος κατά τη ζύμωση υποστρώματος RCM από τα διάφορα στελέχη του BE

Είδος Μέτρησης	Χρόνος Ώρες	Ρεβέθι Κρήτης 1989	Ρεβέθι Κρήτης 1990	Ρεβέθι Λήμνου	Ρεβέθι Κορίνθου	Σίτος	Φασόλι	Αραβό- τος
pH	0	5.79	5.80	5.76	5.77	5.78	5.76	5.77
	3	5.54	5.42	5.52	5.63	5.54	5.44	5.61
	6	5.03	4.96	5.07	5.12	5.04	4.93	4.98
	12	4.72	4.80	4.84	4.81	4.82	4.76	4.71
	24	4.57	4.66	4.70	4.68	4.67	4.62	4.52
Οξύτητα %	0	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198
	3	0.234	0.270	0.243	0.216	0.225	0.243	0.207
	6	0.360	0.387	0.378	0.342	0.378	0.405	0.378
	12	0.552	0.486	0.522	0.531	0.531	0.531	0.522
	24	0.756	0.603	0.684	0.648	0.702	0.666	0.630
O.D	3	0.471	0.668	0.750	0.325	0.538	0.668	0.288
	6	1.032	1.081	1.125	1.125	1.229	1.114	1.167
	12	1.097	1.097	1.229	1.229	1.301	1.222	1.201
	24	1.161	1.155	1.301	1.301	1.398	1.276	1.301
Γαλακτι- κό mg/ml	0	0.218	0.217	0.187	0.201	0.229	0.215	0.187
	3	0.214	0.192	0.208	0.208	0.211	0.229	0.237
	6	0.201	0.206	0.193	0.198	0.212	0.235	0.395
	12	0.398	0.258	0.251	0.350	0.134	0.330	0.397
	24	0.412	0.393	0.327	0.392	0.329	0.395	0.401
Βουτυρι- κό %	3	0.06	0.10	0.08	0.04	0.07	0.08	0.02
	6	0.28	0.32	0.43	0.24	0.31	0.37	0.25
	12	0.38	0.42	0.40	0.50	0.45	0.45	0.35
	24	0.49	0.50	0.58	0.59	0.52	0.55	0.53
Οξεικό %	3	0.18	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6	0.19	0.12	0.17	0.00	0.05	0.05	0.00
	12	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.03
	24	0.13	0.12	0.12	0.13	0.08	0.14	0.08

\* Οι μετρήσεις είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Β

Χρωματογραφήματα λιπαρών οξέων σε RCM κατά την ανάπτυξη του ΒΕ για 24 ώρες στους 42°C



ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Εκταση κορυφών και αναλογική συγκέντρωση % του οξεικού και βουτυρικού οξέος από τα χρωματογραφήματα των διαφόρων στελεχών του ΒΕ σε RCM στις 24h.

Στέλεχος	Peak Area		Συγκέντρωση %	
	Οξεικού	Βουτυρικού	Οξεικού	Βουτυρικού
Μάρτυρας R.C.M	25.5	0	-	0
P.Κρήτης 1989	40.4	49.9	23.1	74.8
P.Κρήτης 1990	46.7	68.9	23.8	74.3
P.Λήμνου	35.4	79.0	12.5	86.0
P.Κορίνθου	28.9	59.2	9.0	89.5
Σιτάρι	44.4	90.2	17.8	80.2
Φασόλι	36.5	48.5	19.2	78.7
Καλαμπόκι	36.6	47.9	19.6	78.5



Ηλεκτροφορητική ταυτότητα των διαφόρων στελεχών του ΒΕ με βάση το σύνολο των πρωτεϊνών του κυττάρου.

Έχει διαπιστωθεί ότι το σύνολο των πρωτεϊνών του κυττάρου των μικροοργανισμών δίδει ένα σταθερό ηλεκτροφορητικό προφίλ που είναι χαρακτηριστικό σε κάθε είδος ή στέλεχος (ταυτότητα) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει την αξιοπιστία άλλων δοκιμών που γίνονται για ταυτοποίηση.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για την αναγνώριση και ταξινόμηση των βακτηρίων καθώς επίσης και για τη διάκριση μεταξύ στελεχών που ανήκουν στο ίδιο γένος (Kestersand Ley, 1975, 1980). Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πάνω σε ένα πολυακρυλαμίδικό ζελέ βελτίωσε την τεχνική αυτή και πολλαπλασίασε τη χρήση και τις εφαρμογές της.

Σύμφωνα με την αρχή αυτής της μεθόδου οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, συνήθως το Sodium Dodecylsulfate που σχηματίζει αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με τα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν συνήθως προηγουμένως αδρανοποιηθεί. Στην περίπτωση αυτή το φορτίο είναι σχεδόν σταθερό για τις περισσότερες πρωτεΐνες και κατά συνέπεια ο διαχωρισμός εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους και από τους πόρους του πολυακρυλαμινικού ζελέ.

Στην περίπτωση της μελέτης των πρωτεϊνών του κυττάρου των διαφόρων στελεχών του ΒΕ, η ηλεκτροφόρηση έγινε με 12.5% ακρυλαμίνη παρουσία SDS στη συσκευή LKB-2050-001. Η τεχνική προετοιμασίας του δείγματος περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Στην παρακάτω φωτογραφία 3, φαίνεται το ηλεκτροφορητικό προφίλ των κυτταρικών πρωτεϊνών των στελεχών του ΒΕ, μετά το διαχωρισμό τους σε πολυακρυλαμίδικό ζελέ. Στην ίδια φωτογραφία περιλαμβάνεται το προφίλ ενός γνωστού μίγματος πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού βάρους (μόρτυρας).

Επίσης στο σχεδιάγραμμα 9, εμφανίζονται τα αντίστοιχα πρωτεϊνογράμματα που έγιναν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο

υλικά και μέθοδοι.

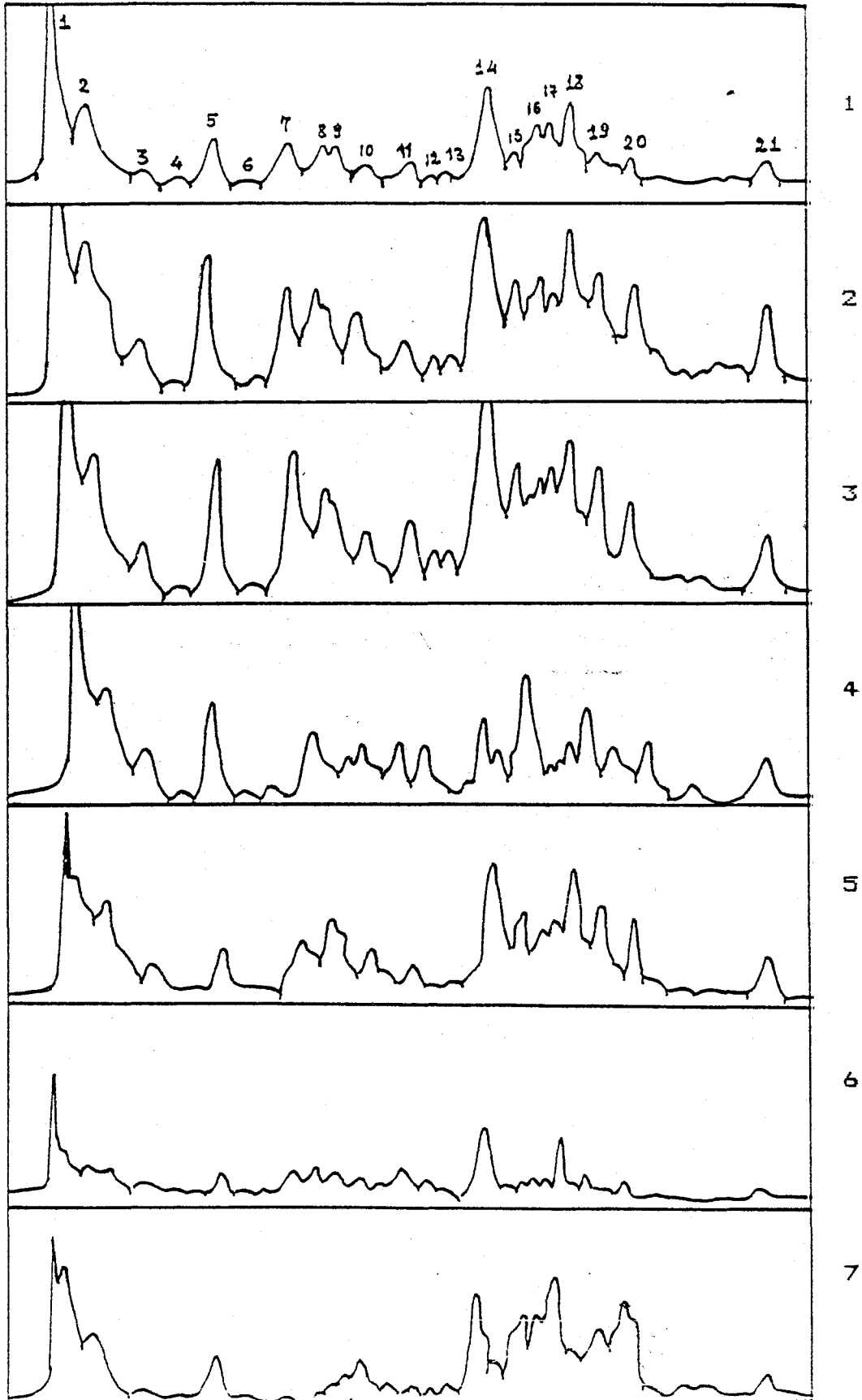
Όπως φαίνεται στην φωτογραφία το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που διαχωρίστηκαν με βάση τις γνωστές πρωτεΐνες του μάρτυρα, κυμαίνεται περίπου από 90.000 έως 18.500.

Επίσης όπως φαίνεται στη φωτογραφία αλλά και στο σχεδιάγραμμα εμφανέστερα, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ του πρωτεϊνογράμματος των κυττάρων των διαφόρων στελεχών του ΒΕ. Αν πάρουμε ως μέτρο σύγκρισης το πρωτεϊνόγραμμα του στελέχους Κρήτης 1989 όπου έχουν καταγραφεί περίπου 21 διαφορετικά ίχνη πρωτεϊνών, μπορεί να παρατηρηθεί ομοιότητα για όλα τα στελέχη στις Κορυφές 1-5 που αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες με το μικρότερο μοριακό βάρος, στις κορυφές 14-19 που αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες μέσου μοριακού βάρους και στην κορυφή 21 που είναι και η πρωτεΐνη με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Ειδικότερα στα στελέχη με κωδικούς, ΡΚ-89, ΡΚ-90, Ρεβίθι Λήμνου, Σιτάρι και Αραβόσιτος τα πρωτεϊνογράμματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Μικρές διαφορές παρουσιάζει το Ρεβίθι Κόρινθος και το Φασόλι.

Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα γενικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που έχουν ήδη αναφερθεί, συνηγορούν στην αρχική υπόθεση ότι πρόκειται για το ίδιο είδος μικροοργανισμού και πιθανά για διαφορετικά στελέχη.

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9

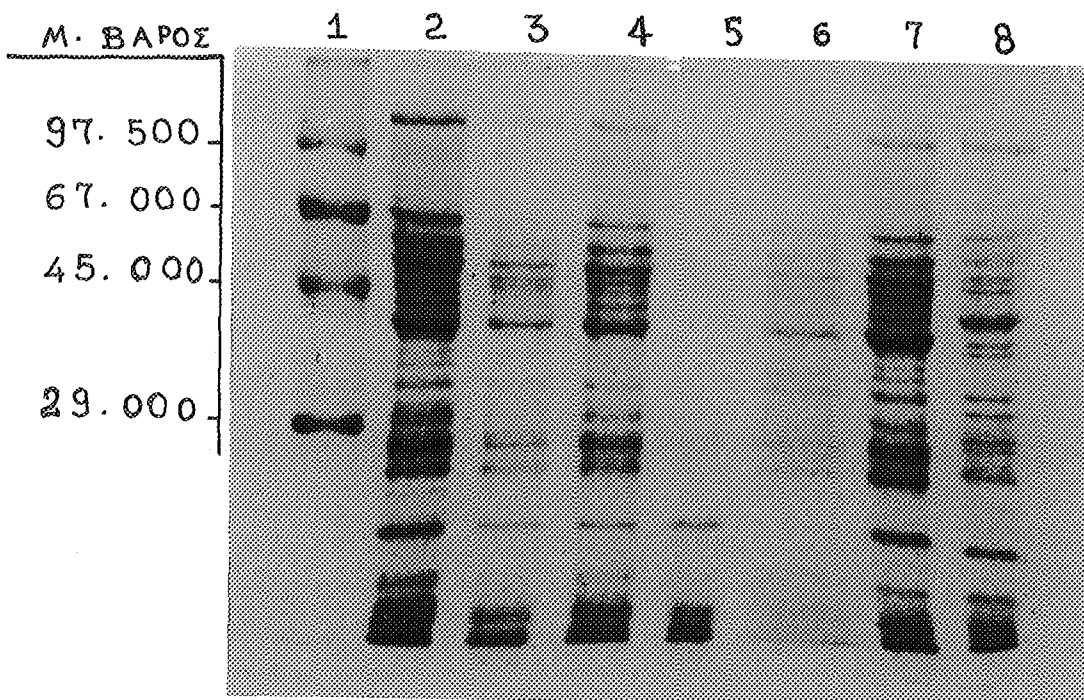
Πρωτεϊνογράμματα του ενδοκυτταρικού εκχυλίσματος των διαφόρων στελεχών ΒΕ (1=ΚΡ 89, 2=ΚΡ 90, 3=ΛΗΜΝΟΥ 4=ΚΟΡΙΝΘΟΥ, 5=ΣΙΤΟΣ, 6=ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΣ, 7=ΦΑΣΟΛΙ)



ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ 3

Διαχωρισμός των πρωτεϊνών του κυττάρου των διαφόρων στελεχών του ΒΕ σε SDS Gel Electrophoresis

- |                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| 1 = STANDARD ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ | 2 = ΒΕ ΚΡΗΤΗΣ 89  |
| 3 = ΒΕ ΚΡΗΤΗΣ 90       | 4 = ΒΕ ΣΙΤΟΣ      |
| 5 = ΒΕ ΦΑΣΟΛΙ          | 6 = ΒΕ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΣ |
| 7 = ΒΕ ΛΗΜΝΟΣ          | 8 = ΒΕ ΚΟΡΙΝΘΟΣ   |



Ταυτοποίηση του ΒΕ με βάση το σύστημα API και άλλες βιοχημικές δοκιμές.

Για την παραπάνω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα τυποποιημένα Test της API System S.A, με τα οποία μπορεί να γίνει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός βιοχημικών δοκιμών για ένα μικροοργανισμό εύκολα και γρήγορα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στην αρχή τα API 50CH που προορίζονται για την αναγνώριση των γαλακτικών βακτηρίων και στη συνέχεια τα API 20A για την αναγνώριση αναεροβίων γενικά βακτηρίων. Ο τρόπος και η τεχνική χρήσης των παραπάνω αναφέρονται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Τα περισσότερα Test του API 20A, περιλαμβάνονται και στο API 50CH. Δεν περιλαμβάνεται ο σχηματισμός ινδόλης, η ζύμωση της ουρίας και η υδρόλυση της ζελατίνης.

Στους παρακάτω πίνακες 17 και 18 εμφανίζονται οι διάφορες πηγές άνθρακα που περιέχονται στο σύστημα API 50CH και στο API 20A καθώς και η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους (προφίλ) από τα διάφορα στελέχη του ΒΕ.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 17 (API 50 CH) φαίνεται χαρακτηριστικά ότι μεταξύ των διαφόρων στελεχών υπάρχουν μικροδιαφορές ως προς το είδος των υδατανθράκων που χρησιμοποιούν. Σε όλα τα στελέχη παρατηρείται η ζύμωση της πεντόζης Ριβόζη και των εξοζών, γαλακτόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και ~~ραμν~~ραμνόζη. Επίσης όλα τα στελέχη έχουν τη δυνατότητα ζύμωσης της ινδοσιτόλης και της Ν ακετυλο-γλυκοσαμίνης.

Από τους διζαχαρίτες τα περισσότερα στελέχη χρησιμοποιούν τη μαλτόζη, τη λακτόζη, τη μελιβιόζη, τη ζαχαρόζη και την τρεχαλόζη. Επίσης τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν τον τριζαχαρίτη ραφινόζη. Σημειώνεται ιδιαίτερα η ζύμωση του αμύλου από όλα τα στελέχη καθώς επίσης και του γλυκογόνου που είναι πολυζαχαρίτης των ζώικών ιστών και είναι ανάλογος με την αμυλοπηκτίνη του αμύλου. Επίσης όλα τα στελέχη σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό υδρολύουν την εσκουλίνη και χρησιμοποιούν την σαλισίνη.

Τα αποτελέσματα για το API 20A που περιλαμβάνονται στον πίνακα 18 είναι παρόμοια γενικά με αυτά του API 50CH. Επι πλέον όλα τα στελέχη είναι αρνητικά στο σχηματισμό υδρόλης και στη ζύμωση της ουρίας. Η υδρόλυση της ζελατίνης είναι θετική για τα περισσότερα στελέχη. Πάντως η δοκιμή της υδρόλυσης της ζελατίνης έγινε και με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Γλικά και μέθοδοι και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υδρόλυση είναι μερική και ποτέ πλήρης.

Τα βασικά βιοχημικά χαρακτηριστικά του στελέχους BE KP-89 ανακεφαλαιώνονται στον πίνακα 19, σε σύγκριση με εκείνα του είδους *C. perfringens* όπως αναφέρονται στις κλειδες του Bergey's. Όπως φαίνεται υπάρχει ταυτότητα σε όλα τα χαρακτηριστικά μεταξύ του BE και *C. perfringens* εκτός από την αναγωγή των νιτρικών όπου η δοκιμή για το BE βρέθηκε έντονα θετική και τη ζύμωση της σαλισίνης που ήταν ασθενώς θετική. Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι η δοκιμή των νιτρικών δεν συμπεριλαμβάνεται στις κλειδες του Bergey μεταξύ αυτών που απαιτούνται για την αναγνώριση του *C. perfringens*.

Επίσης η σύγκριση των αποτελεσμάτων του πίνακα 18 με δεδομένα της API για αναερόβιους μικροοργανισμούς σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, έδωσε αναγνώριση των διαφόρων στελεχών, στο είδος *C. perfringens*. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι για την αναγνώριση αυτή, η παραγωγή σπορίων από τα στελέχη του BE θεωρείται θετική σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο και παρά το γεγονός ότι δεν έχουν μέχρι σήμερα παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι το στέλεχος BE KP-89 είχε αποσταλεί για αναγνώριση στην Αγγλία, στο Leathehead Food Research Association. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα API ATB 32 A για αναερόβιους μικροοργανισμούς και τα αποτελέσματα στον υπολογιστή έδωσαν αναγνώριση στο *C. perfringens*.

Η παραγωγή  $H_2S$  και η υδρόλυση της λεκιθίνης είναι δύο χαρακτηριστικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν ένα περιορισμένο αριθμό κλωστριδίων. Από τα κλωστρίδια που παράγουν λεκιθινάση και υδρόθειο μόνο το *C. perfringens* είναι μη

κινούμενος βάκιλλος που ζυμώνει την λακτόζη (Hall et al., 1969). Το εκλεκτικό υπόστρωμα SPS AGAR για την ποιοτική αναγνώριση του *C.perfringens* στα τρόφιμα βασίζεται σε αυτές τις ιδιότητες. Η ανάπτυξη του BE KP 89 σε αυτό το υπόστρωμα έδωσε τις χαρακτηριστικές μαύρες αποικίες και επιβεβαίωσε την υδρόλυση της λεκιθίνης. Αναφέρεται επίσης στις κλείδες του Bergey's 1989, ότι τα περισσότερα στελέχη του *C.perfringens* σχηματίζουν εξωκυτταρική στοιβάδα (capsule) που αποτελείται κυρίως από πολυσαχαρίτες. Η ιδιότητα αυτή που χαρακτηρίζει τον BE είναι μια επι πλέον ισχυρή ένδειξη για την αναγνώριση του.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τις κλείδες του Bergey's το *C.perfringens* και το *C.absonum* έχουν πολλά κοινά φαινολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Το *C.absonum* όπως και το *C.perfringens* σποριογονεί σπάνια σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα. Αναφέρεται όμως ότι ο μικροοργανισμός επιζεί σε αυτά μετά από θέρμανση στους 80°C για 10 min όπου θεωρείται ότι καταστρέφονται όλες οι βλαστικές μορφές των κυττάρων. Επίσης το κλωστρίδιο αυτό υδρολύει βραδέως την ζελατίνη και ζυμώνει τη σαλισίνη. Η ζύμωση της σαλισίνης και η μη παραγωγή υδρόθειου είναι η βασικές διαφορές μεταξύ του *C.absonum* και *C.perfringens*. Ως προς τη δοκιμή της σαλισίνης η αντίδραση στο API 50CH βρέθηκε ασθενώς θετική για τα διάφορα στελέχη του BE.

Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω δεδομένα θεωρούμε ότι ο βάκιλλος του Επτάζυμου είναι στέλεχος του είδους *C.perfringens*. Το στέλεχος αυτό πρέπει να θεωρηθεί μη σποριογόνο και μη τοξινογόνο και πιθανόν απομονώνεται για πρώτη φορά. Η παραγωγή εντεροτοξίνης από τα διάφορα στελέχη του *C.perfringens* που είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση των τροφικών δηλητηριάσεων που συνδέονται με το μικροοργανισμό αυτό, πιστεύεται γενικά ότι παράγεται στη φάση της σποριογονίας και ελευθερώνεται με τη λύση του κυττάρου. Κατά τον Goldner και άλλους (1986), σε ορισμένα στελέχη του *C.perfringens* παρατηρήθηκε παραγωγή τοξίνης απουσία σποριογονίας όταν καλλιεργήθηκαν σένα χημικά καθορισμένο υπόστρωμα. Πάντως η παραγωγή ή μη τοξίνης από το BE πρέπει

μελετηθεί και να επιβεβαιωθεί.

Στη συνέχεια αυτής της έρευνας που αφορά τη μελέτη του στελέχους ΒΕ ΚΡ-1989 θα χρησιμοποιείται αυτός ο κωδικός αριθμός, που αναφέρεται στο Βάκιλλο του Επτάζυμου απομόνωσης από ρεβίθια Κρήτης περιόδου 1989.



ΠΙΝΑΚΑΣ 17

Πηγές άνθρακα που περιλαμβάνονται στο API 50CH και δυνατότητα χρησιμοποίησής\*\*τους από τα διάφορα στελέχη του BE

α/α	Είδος πηγής άνθρακα	Ενζύμα που εμπλέκονται	#Στελέχη που μελετήθηκαν							
			1	2	3	4	5	6	7	
1.	Glycerol	Dehydrogenase	4	3	5	2	5	1	3	*
2.	Erythritol	"								1=Ρεβ.Κρήτης 89
3.	D-Arabinose	Dehydrogenase, Kinase	3	5	4	1	5	1	5	2=Ρεβ.Κρήτης 90
4.	L-Arabinose	"								3=Ρεβ.Αθήνων
5.	Ribose	Kinase	5	5	5	5	5	5	5	4=Ρεβ.Κορίνθου
6.	D-Xylose	Isomerase, Dehydrogenase								5=Σιτάρι
7.	L-Xylose	"								6=Φασόλι
8.	Adonitol	Dehydrogenase								7=Αραβόσιτος
9.	β Methyl-xyloside	Hylanase								
10.	Galactose	Kinase	5	5	5	5	5	5	5	
11.	D-Glucose	"	5	5	5	5	5	5	5	
12.	D-Fructose	"	5	5	5	5	5	5	5	
13.	D-Mannose	"	5	5	5	5	5	5	5	
14.	L-Sorbose	Dehydrogenase								
15.	Rhamnose	Isomerase								
16.	Dulcitol	Dehydrogenase								
17.	isositol	"	5	5	5		5	5	5	
18.	Mannitol	"								
19.	Sorbitol	"	5		5					
20.	α Methyl-D-mannoside	X, Mannosidase								
21.	α Methyl-D-glucoside	X Glucoside	5	5						
22.	N Acetyl glucosamine	Kinase	5	5	4	5	5	5	5	
23.	Amygdaline	β Glucosidase		3		5				
24.	Arbutine	"		4		5			4	
25.	Esculine	"	5	5	4	5	5	4	3	
26.	Salicine	"	4	5	2	3	2	2	2	
27.	Cellobiose	"	3	5	1	5	1	5	1	
28.	Maltose	X Glucoside	5	5	5	3	5	5	5	
29.	Lactose	β Galactosidase	5	5	4		5	5	5	
30.	Melibiose	X Galactosidase	4	4	4		3		3	
31.	Saccharose	Invertase	5	5	5	5	4	5	5	
32.	Trehalose	X Glucosidase (trehalase)	5	5	4	2	4	3	5	
33.	Inuline	Endofructosidase	4	5	2					
34.	Melezitose	X Glucosidase								
35.	D-Raffinose	X Galactosidase, β fructosidase	5	5	5	2	4	4	4	
36.	Amidon	Amylase	5	5	4	2	5	5	5	
37.	Glycogene	Endoglucanase	5	5	5		5	5	5	
38.	Xylitol	Dehydrogenase								
39.	β Gentiobiose	β Glucosidase		5		5				
40.	D-Turanose	X-Glucosidase	5	5	2		4	2		
41.	D-Lyxose	Isomerase								
42.	D-Tagatose	Kinase								
43.	D-Fucose	"								
44.	L-Fucose	"	2		4		5		4	
45.	D-Arabitol	Dehydrogenase								
46.	L-Arabitol	Kinase								
47.	Gluconate									
48.	2 ceto-gluconate									
49.	5 ceto-gluconate									

\*\* 5-3=Αντιδραση θετικη, 2=αντιδραση(+), 1=Αντιδραση(-)



ΠΙΝΑΚΑΣ 19

Κύρια χαρακτηριστικά του BE KR-89 και σύγκριση με κλείδες του BERGEY'S για το είδος *C. perfringens*

α/α	Χαρακτηριστικό	BE	<i>C. perfringens</i> BERGEY'S
1.	Παραγωγή σπορίων	+	+
2.	Παραγωγή αερίου κατά τη ζύμωση γλυκόζης	+	+
3.	Παραγωγή βουτυρικού, οξεικού, γαλακτικού	+	+
4.	Ανάπτυξη σε ανασερόβιες συνθήκες	+	+
5.	Ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες	-	-
6.	Ανάπτυξη στους 15°C	-	-
7.	Ανάπτυξη στους 45°C	+	+
8.	Ανάπτυξη στους 50°C	-	-
9.	Κίνηση κυττάρων	-	-
10.	Χρώση Gram	+	+
11.	Τέστ καταλάσης	-	-
12.	Υδρόλυση αργινίνης	-	-
13.	Υδρόλυση αμύλου	+	+
14.	Παραγωγή διοξειδίου άνθρακα	+	+
15.	Παραγωγή υδρογόνου	+	+
16.	Παραγωγή υδρόθειου	+	+
17.	Test ασετοΐνης	-	-
18.	Υδρόλυση εσκουλίνης	+-	-
19.	Παραγωγή ινδόλης	-	-
20.	Υδρόλυση ζελατίνης	+-	+
21.	Αναγωγή νιτρικών	+	-
22.	Υδρόλυση λεκιθίνης	+	+
23.	Ζύμωση σαλισίνης	+-	-
24.	Παραγωγή οξέος από γλυκόζη	+	+
25.	Ζύμωση λακτόζης	+	+
26.	Ζύμωση σαχαρόζης	+	+
27.	Ζύμωση μαλτόζης	+	+
28.	Υδρόλυση γλυκερίνης	+-	+
29.	Ζύμωση μαννόζης	+	+
30.	Σχηματισμός κάψουλας (capsule)	+	+

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΒΕ ΚΡΗΤΗΣ 1989

### Επίδραση θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του ΒΕ ΚΡ-89

Έχει παρατηρηθεί και στην πράξη ότι στη διαδικασία της παρασκευής της μαγιάς από ρεβίθι είναι απαραίτητο να διατηρηθεί η φιάλη ζύμωσης σε αρκετά θερμό μέρος για να ευνοηθεί η γρήγορη ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού. Σκοπός του πειράματος είναι να μελετηθεί η ανάπτυξη του παραπάνω στελέχους του ΒΕ σένα εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών και να επισημανθεί η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν είναι 15, 25, 32, 37, 42, 45 και 50°C.

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το RCM με επίπεδο γλυκόζης 1.5%. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε μέσα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σώληνες σε τρεις επαναλήψεις, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Σε κάθε χρόνο ανάλυσης προσδιορίζονταν η οπτική πυκνότητα (O.D), η οξύτητα, το pH, η γλυκόζη. Το γαλακτικό, το βουτυρικό και το οξείκό οξύ προσδιορίστηκαν επίσης σε ορισμένες θερμοκρασίες και χρόνους ανάλυσης. Τα αποτελέσματα σαν μέσοι όροι τριών επαναλήψεων εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα 10, 11, 12, 13, 14 και 15.

Στο σχεδιάγραμμα 10 εμφανίζεται η αύξηση της οπτικής πυκνότητας στο υπόστρωμα RCM κατά την ανάπτυξη του ΒΕ στις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Στους 15°C και μετά από 72 ώρες επώασης δεν παρατηρείται αύξηση στην O.D ούτε εμφανής ζύμωση του υποστρώματος. Άρα ο ΒΕ ΚΡ 89 θα πρέπει να θεωρηθεί ότι δεν αναπτύσσεται στη θερμοκρασία αυτή. Στους 25°C παρατηρείται μια πολύ βραδεία αύξηση της οπτικής πυκνότητας που γίνεται εμφανής μετά τις 48 ώρες επώασης. Από τους 32°C η αύξηση της οπτικής πυκνότητας του υποστρώματος επιτελείται με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό μέχρι τους 45°C. Φαίνεται χαρακτηριστικά ότι στους 42°C στις 8-12 ώρες της επώασης, η οπτική πυκνότητα λίγο υπολείπεται από την τελική μέγιστη τιμή (0.95). Ο ΒΕ ΚΡ 89 αναπτύσσεται ταχύτατα στους

42 και 45°C, είναι δηλαδή θερμοφίλος μικροοργανισμός. Πάντως από τα αποτελέσματα του διαγράμματος θα πρέπει να θεωρήσουμε σαν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του στελέχους BE KP 89 τους 42°C. Στους 50°C ενώ παρατηρείται μια σχετική ανάπτυξη μέχρι τις 12 ώρες στη συνέχεια η ανάπτυξη φαίνεται ότι επιβραδύνεται στη θερμοκρασία αυτή. Επομένως ως προς τους 50°C θα πρέπει να θεωρηθεί ότι το στέλεχος BE KP 89 αναπτύσσεται βραδέως.

Τα αποτελέσματα του σχεδιαγράμματος 11 που περιλαμβάνει την εξέλιξη του pH συναρτήσει του χρόνου στις διάφορες θερμοκρασίες, επιβεβαιώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα. Το pH του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε είναι 5.75. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα στους 15°C δεν υπάρχει ουσιαστικά μεταβολή του pH του υποστρώματος στη διάρκεια της επώασης. Στους 25°C η πτώση του pH είναι βραδεία ενώ στους 32°C ταχύτερη. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες η πτώση του pH επιτελείται σε γρηγορότερους ρυθμούς. Έτσι στους 42°C και 45°C η τιμή του pH έχει φθάσει την ελάχιστη που είναι μεταξύ 4.6-4.7 ήδη από τις 8 ώρες της επώασης.

Στο σχεδιάγραμμα 12 εμφανίζεται η πορεία της ογκομετρομένης οξύτητας στο υπόστρωμα RCM στις διάφορες θερμοκρασίες σε γαλακτικό οξύ % . Στους 15°C δεν παρατηρείται ουσιαστικά αύξηση στην οξύτητα του υποστρώματος. Στους 25°C η αύξηση είναι ελάχιστη και παρατηρείται μετά από επώαση 72h. Στους 50°C η οξύτητα αυξάνει ελάχιστα στις πρώτες ώρες και στη συνέχεια παραμένει σε χαμηλό επίπεδο μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η αύξηση της οξύτητας επιτελείται με γρήγορους ρυθμούς στους 37, 42 και 45°C. Στις 6 ώρες διαμορφώνεται από 0.13 έως 0.24% στις 12 ώρες 0.28-0.34% και στις 24 ώρες 0.34-0.36% . Στους 32°C η οξύτητα αυξάνεται συνεχώς και σταδιακά μέχρι και τις 30 ώρες της επώασης στο 0.3% ,οπότε και εγγίζει την τελική μέγιστη στη θερμοκρασία αυτή.

Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα 13 που περιλαμβάνει το επίπεδο του γαλακτικού οξέος στις 24 ώρες σε όλες τις θερμοκρασίες, η μέγιστη τιμή γύρω στο 0.5 mg/ml παρατηρείται μεταξύ 42 και 45°C. Το επίπεδο αυτό του γαλακτικού οξέος δεν

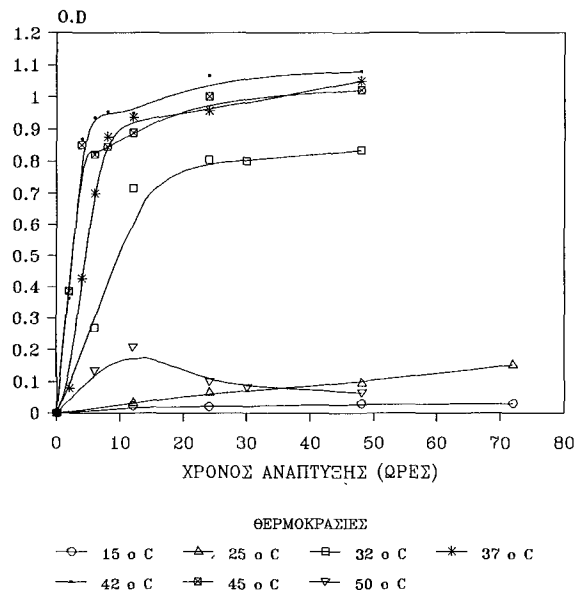
είναι σημαντικό σε σύγκριση με την ολική οξύτητα.

Στο σχεδιάγραμμα 14 φαίνεται η % περιεκτικότητα του υποστρώματος σε βουτυρικό, οξεικό και γαλακτικό οξύ μετά από 24 ώρες στους 32 37 42 και 45°C. Είναι χαρακτηριστική η σημαντική συνεισφορά του βουτυρικού οξέος στη διαμόρφωση της τελικής οξύτητας. Ακολουθεί το οξεικό και τελευταίο το γαλακτικό οξύ. Το επίπεδο του βουτυρικού είναι υψηλότερο στις υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ στους 42°C φαίνεται ότι παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα οξεικού και γαλακτικού οξέος.

Το θρεπτικό υπόστρωμα RCM που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό περιείχε γλυκόζη σε επίπεδο 15%. Στο διάγραμμα 12 εμφανίζεται η μείωση του επιπέδου της γλυκόζης στο RCM στις διάφορες θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Στους 15°C όπου ο BE δεν αναπτύσσεται το επίπεδο της γλυκόζης εμφανίζεται αμετάβλητο ουσιαστικά. Μικρές μεταβολές του επιπέδου γλυκόζης παρατηρούνται στους 50°C και στους 25°C όπου η ανάπτυξη του BE είναι βραδεία. Στους 37, 42 και 45°C όπου ο BE αναπτύσσεται σε γρήγορους ρυθμούς παρατηρείται και μια ανάλογη μείωση του επιπέδου της γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα. Πάντως στο τέλος της επώασης δηλαδή τις 48 ώρες για τις παραπάνω θερμοκρασίες τα 2/3 περίπου της γλυκόζης που υπήρχε αρχικά έχουν αναλωθεί από τον B.E KP 89.

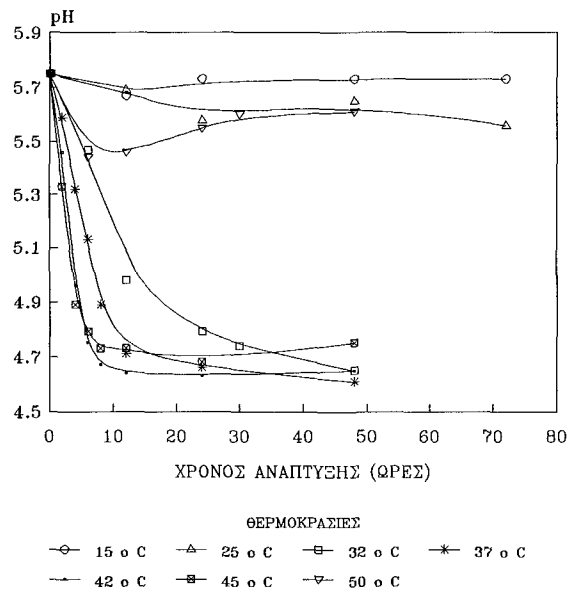
Ο BE KP 89 αναπτύσσεται ταχύτερα στους 42-45°C και σε υπόστρωμα RCM αναπτύσσει ελάχιστη τιμή pH 4.6-4.7 σε 10-12 ώρες. Αντίθετα η ανάπτυξη άλλων ειδών του γένους *Clostridium* επιτελείται με πολύ βραδύτερους ρυθμούς. Όπως αναφέρεται π.χ. στο *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* στο κεφάλαιο για το γένος *Clostridium* από τους Cato και άλλους 1986, τα διάφορα στελέχη του *C.perfringens* σε υπόστρωμα Peptone Yeast Broth στους 45°C δίδουν pH 4.8-5.6 μετά από επώαση 7 ημερών.

ΑΥΞΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ RCM  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89  
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



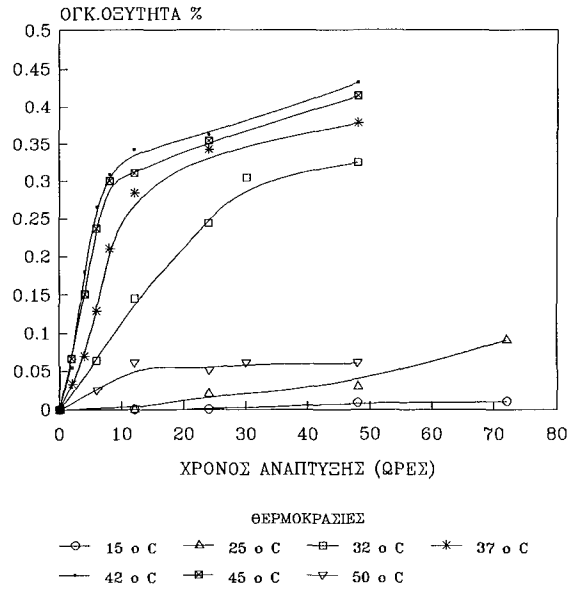
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10

ΠΟΡΕΙΑ ΡΗ ΣΕ RCM  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89  
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



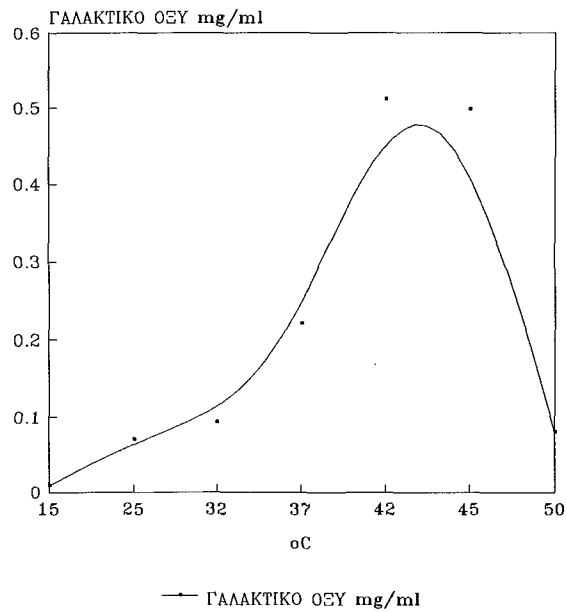
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΟΣΥΤΗΤΑΣ ΣΕ RCM  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89  
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12

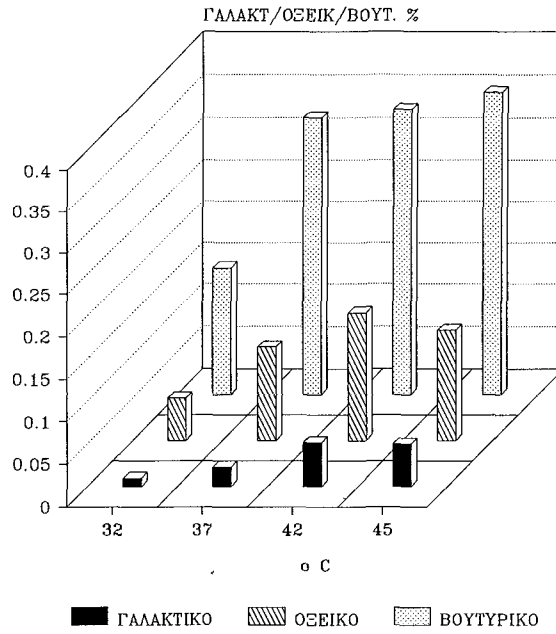
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ RCM  
ΜΕΤΑ 24 ΩΡΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89  
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13

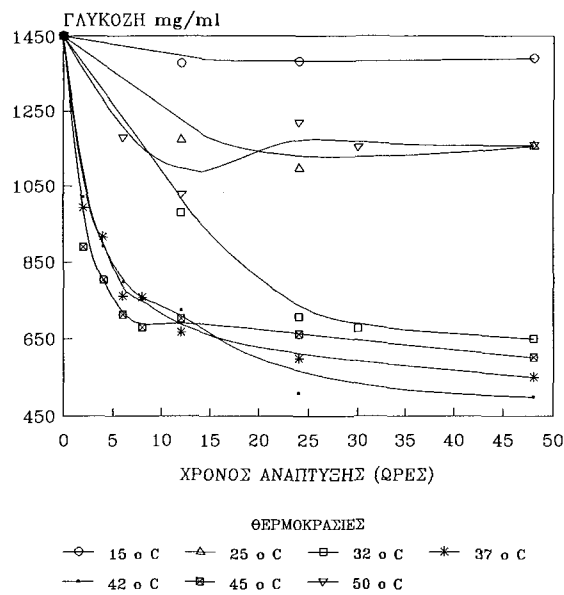


ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΕΙΚΟ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ RCM  
 ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΩΡΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ-89  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14

ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ RCM  
 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15

Παραγωγή αερίου κατά την ανάπτυξη του BE KP 89 σε RCM στους 42°C.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι από τα διάφορα μέλη της μικροβιακής χλωρίδας του ρεβιθίου μόνο ο BE είναι έντονα ετεροαυμωτικός και παράγει άφθονο αέριο τόσο κατά την ανάπτυξή του στο φυσικό υπόστρωμα από ρεβίθι όσο και στο RCM με ταυτόχρονη ανάπτυξη έντονου επιφανειακού αφρισμού. Επίσης έχει παρατηρηθεί στην πράξη αλλά και στα εργαστήρια στα διάφορα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, ότι στην υπερκεείμενη αέριο φάση του υποστρώματος και όταν η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε κλειστό φιαλίδιο συγκεντρώνεται κάποιο αέριο, προϊόν μεταβολισμού του BE που αναφλέγεται όταν το φιαλίδιο κατά το άνοιγμα πλησιάζει σε φλόγα bunsen.

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να μελετηθεί ποσοτικά αλλά και ποιοτικά το αέριο που παράγεται κατά τη ζύμωση στο υπόστρωμα RCM και σε επίπεδο γλυκόζης 1% στους 42°C. Για τη μελέτη της ποσοτικής παραγωγής στη διάρκεια της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή που περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι σε συστατικά 3 μονάδων. Ο όγκος του υποστρώματος ζύμωσης ήταν 20ml και το ενοφθάλμισμα 0.2ml από καλλιέργεια 20h του BE στους 42°C.

Στο σχεδιάγραμμα 16 εμφανίζεται η παραγωγή αερίου στη διάρκεια της ζύμωσης του υποστρώματος τόσο συνολικά όσο και σε ml/h. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα σημεία του διαγράμματος είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα έχουμε μια συνεχή αύξηση του παραγόμενου όγκου αερίου που στις 15h της ζύμωσης είναι γύρω στα 45 κυβικά εκατοστά συνολικά. Επειδή σε το επίπεδο γλυκόζης στο ζυμούμενο υπόστρωμα είναι 1% και ο όγκος του 20ml, έχουμε μια παραγωγή αερίου γύρω στα 200ml ανά γραμμάρια γλυκόζης.

Όπως φαίνεται στο ίδιο σχεδιάγραμμα η ταχύτητα παραγωγής αερίου αυξάνει συνεχώς μέχρι τις 5 ώρες που φθάνει τη μέγιστη τιμή της (8ml/h) και στη συνέχεια αρχίζει να

μειώνεται σταδιακά μέχρι μηδενισμού της γύρω στις 15h. Ο ρυθμός παραγωγής αερίου σχετίζεται προφανώς με το ρυθμό της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Για την ποιοτική ανάλυση των παραγόμενων αερίων στη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του ΒΕ σε RCM μέσα σε κλειστά ερμητικά φιαλίδια με ελαστικό πώμα στους 42°C. Για την τοποθέτηση του πώματος και τη στερέωσή του με δακτύλιο αλουμινίου χρησιμοποιήθηκε ειδικό εργαλείο. Το ενοφθάλμιμα του ΒΕ από καλλιέργεια 20h σε RCM τοποθετήθηκε μέσα στα φιαλίδια με αποστειρωμένη σύριγγα. Παρασκευάστηκε κατάλληλος αριθμός φιαλιδίων ώστε σε κάθε χρόνο ανάλυσης αποσύρονταν μία φιάλη για την πραγματοποίηση των αναλύσεων σε αέριο χρωματογράφο. Για την ανάλυση κάθε δείγματος λαμβάνονταν με σύριγγα δείγμα από την υπερκείμενη αέρια φάση (Head space) και γίνονταν απευθείας έγχυση σε χρωματογράφο της Perkin Elmer και σε κολώνα Porapak Q εν σειρά με κολώνα Molecular Sieve. Οι συνθήκες ανάλυσης περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

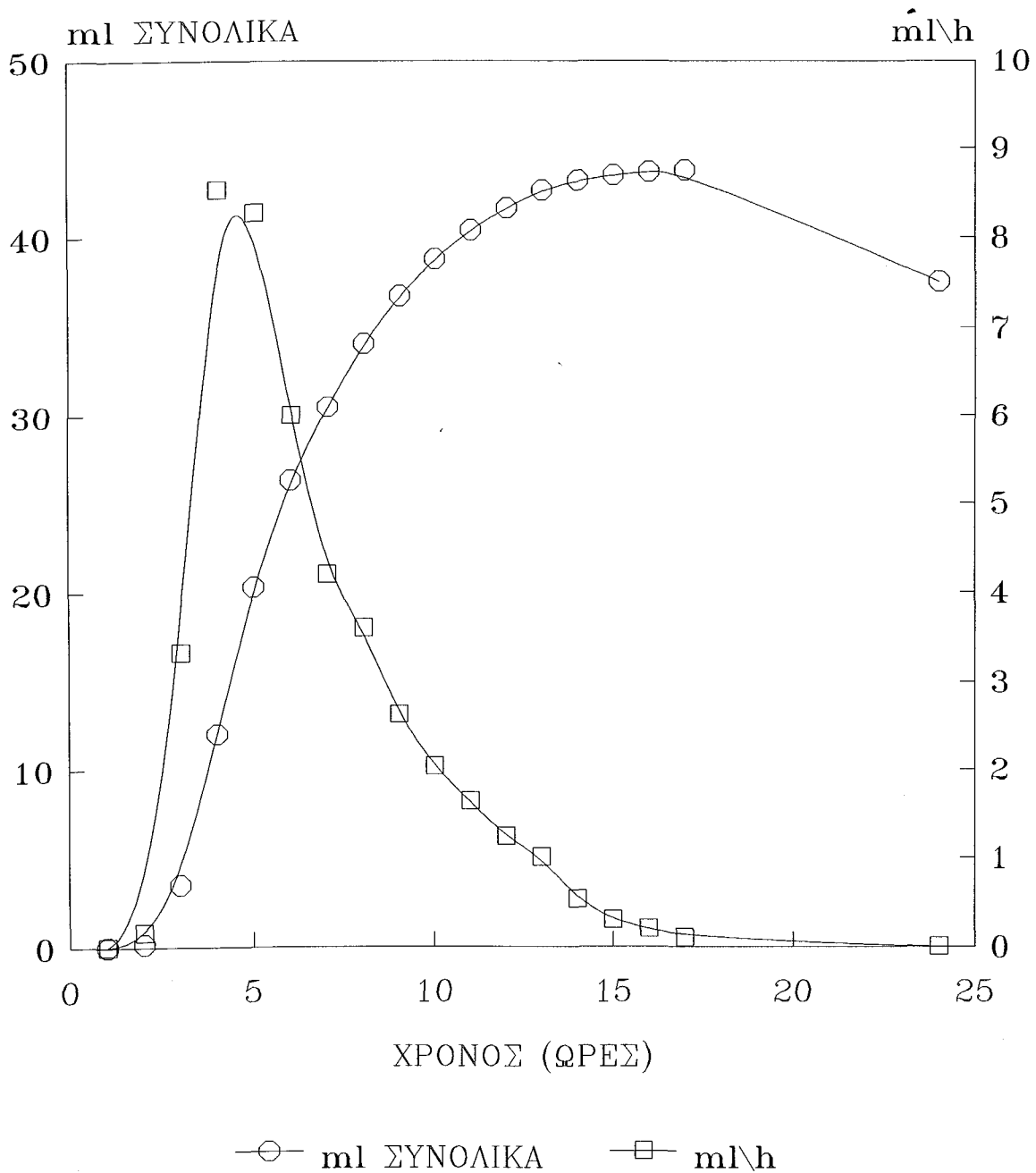
Στο σχεδιάγραμμα 17 περιλαμβάνεται ένα χρωματογράφημα ατμοσφαιρικού αέρα (Α), με τις 3 χαρακτηριστικές κορυφές του CO<sub>2</sub> του αεργόνου και του αζώτου, καθώς επίσης και ένα χρωματογράφημα της υπερκείμενης φάσης μετά 24 ώρες ανάπτυξης του ΒΕΚΡ-89 (Β). Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο χρωματογράφημα (Β), η κορυφή του CO<sub>2</sub> έχει μεγαλύτερη έκταση σε σύγκριση με τις κορυφές του αεργόνου και του αζώτου. Επίσης παρουσιάζεται και μια καινούργια κορυφή που εμφανίζεται ανεστραμμένη λόγω αντίθετης πολικότητας. Η κορυφή αυτή έχει αναγνωρισθεί και οφείλεται στο υδρογόνο. Παρατηρείται επίσης μια άγνωστη κορυφή μικρής έκτασης στο τέλος του χρωματογραφήματος που πιθανόν οφείλεται σε κάποιο υδρογονάνθρακα μικρού Μ.Β.

Στον πίνακα 20 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σύνθεση της υπερκείμενης αέριας φάσης (Head Space) του υποστρώματος R.C.M κατά την ανάπτυξη του ΒΕΚΡ-89 σε ερμητικά κλειστά φιαλίδια όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στον πίνακα περιλαμβάνονται οι τιμές της % έκτασης των κορυφών του CO<sub>2</sub>, του υδρογόνου, του αεργόνου και του αζώτου, στη διάρκεια της

ζύμωσης του υποστρώματος στους 42°C. Στο χρόνο μηδέν (0), παρουσιάζεται η σύνθεση της υπερκεείμενης αέριας φάσης όπως διαμορφώθηκε μετά την αποστείρωση των φιαλιδίων και πριν από την τοποθέτηση του ενοφθαλμίσματος. Όπως φαίνεται η σύνθεσή αυτή είναι διαφορετική από εκείνη του ατμοσφαιρικού αέρα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την ζύμωση του υποστρώματος τα παραγόμενα αέρια ( διοξείδιο και υδρογόνο) επειδή δεν βρίσκουν οδόν διαφυγής συγκεντρώνονται στην υπερκεείμενη αέρια φάση του κλειστού φιαλιδίου υπο πίεση και μεταβάλλουν την αρχική % σύνθεση. Παρατηρείται λοιπόν μια συνεχής μείωση του ποσοστού του αζώτου και του οξυγόνου και αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα και του υδρογόνου. Το διοξείδιο του άνθρακα παρουσιάζει μια γρήγορη αύξηση στις 3 πρώτες ώρες της ζύμωσης και στη συνέχεια αυξάνεται με βραδύτερο ρυθμό μέχρι τις 12 ώρες. Στις 24 ώρες παρατηρείται μια μικρή μείωση. Αντίθετα το υδρογόνο, παρουσιάζει συνεχή γραμμική αύξηση μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η μείωση του επιπέδου του οξυγόνου και αζώτου που παρατηρείται οφείλεται αποκλειστικά στην αλλαγή της σύνθεσης της υπερκεείμενης φάσης λόγω αύξησης του διοξειδίου και υδρογόνου. Η άγνωστη μικρή κορυφή που εμφανίζεται στις 3 ώρες δεν παρουσιάζει σημαντική αύξηση στη διάρκεια της ζύμωσης.

Επιβεβαιώνεται λοιπόν από την πείραμα αυτό ότι κατά τη ζύμωση της γλυκόζης παράγεται άφθονο αέριο που αποτελείται κυρίως από CO<sub>2</sub> και δευτερευόντως από υδρογόνο. Η σχέση στο τέλος της ζύμωσης μεταξύ διοξειδίου και υδρογόνου όπως φαίνεται στον πίνακα είναι περίπου 4:1. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία του υδρογόνου στην υπερκεείμενη φάση είναι αυτή που δημιουργεί την ανάφλεξη κατά την προσέγγιση σε φλόγα υγραερίου.

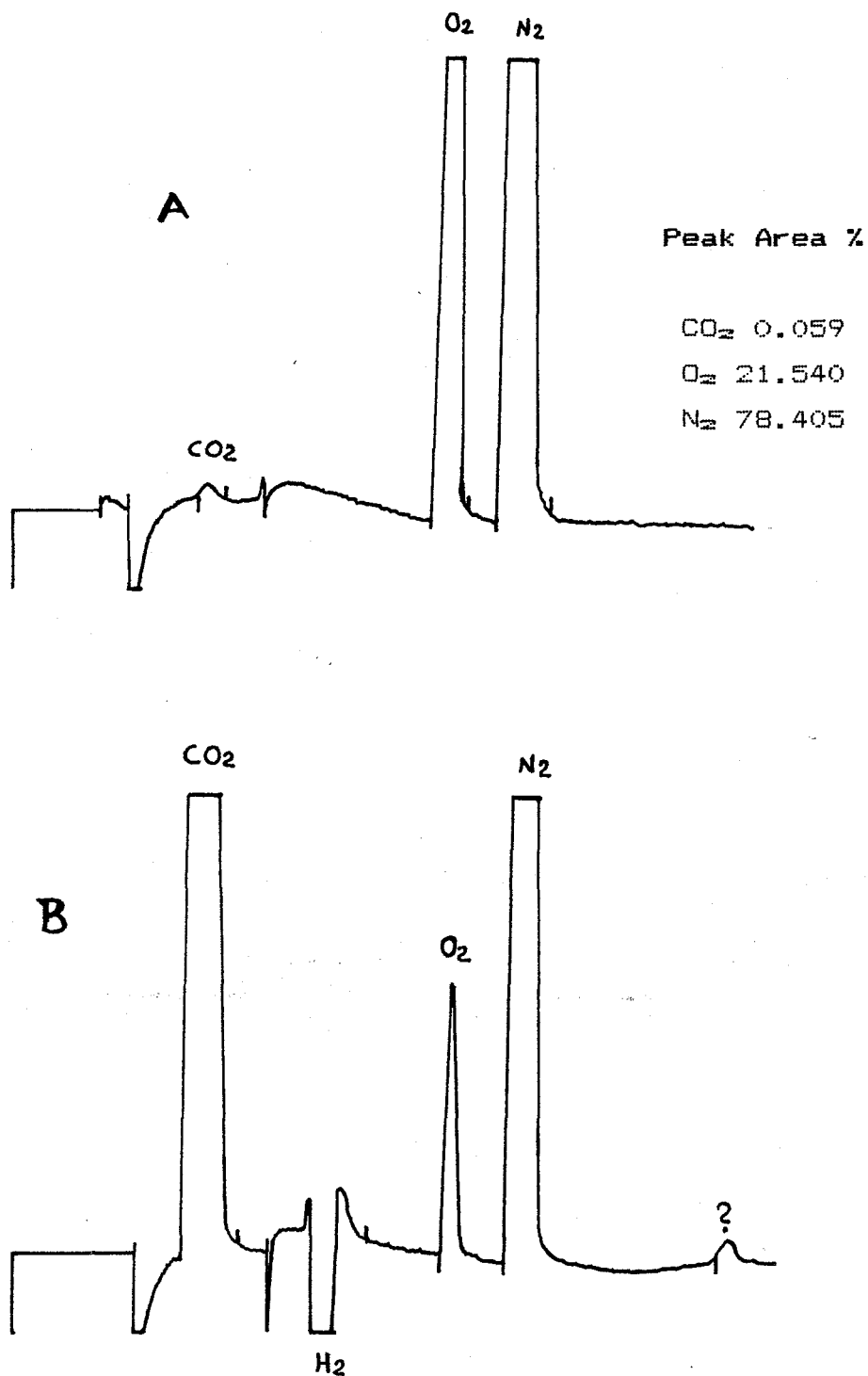
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΕΡΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ  
 ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΕ RCM ΣΤΟΥΣ 42 °C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17

Δύο τυπικά χρωματογραφήματα (G.L.C) του ατμοσφαιρικού αέρα (A) και της υπερκείμενης αέριας φάσης (Head space) (B) από την ανάπτυξη του ΒΕ ΚΡ-89 σε κλειστό φιαλίδιο με RCM στους 42°C για 24 ώρες



ΠΙΝΑΚΑΣ 20

Σύνθεση της υπερκεείμενης αέριας φάσης ( Head space ), κατά την ανάπτυξη του ΒΕΚΡ-89 σε R.C.M στους 42°C, μέσα σε ερμητικά κλειστό φιαλίδιο.

Χρόνος σε ώρες	Peak Area %				
	CO <sub>2</sub>	Υδρογόνο	Οξυγόνο	Αζωτο	Άγνωστος
0	3.59	-	5.57	90.84	-
3	45.08	2.70	3.53	48.78	ζχνν
6	53.24	6.25	2.09	38.42	ζχνν
12	67.21	10.91	0.31	21.58	ζχνν
24	60.40	14.29	0.78	24.54	ζχνν

Πορεία ζύμωσης διαφόρων ζαχάρων και του άμυλου απο τον  
BE-KF-89.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο βάκιλλος του επτάζυμου έχει την ικανότητα να ζυμώνει ένα ευρύ φάσμα ζαχάρων καθώς επίσης και το άμυλο. Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να μελετηθεί η πορεία της ζύμωσης ορισμένων απλών βασικών ζαχάρων (Γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) των διζαχαριτών (ζαχαρόζη, λακτόζη) καθώς επίσης και του άμυλου στους 42°C.

Σαν υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε το RCM με προσθήκη των ζαχάρων που αναφέρθηκαν προηγουμένα σε επίπεδο 1% , εκτός απο το άμυλο που χρησιμοποιήθηκε σε επίπεδο 0.5% . Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα είχε διανεμηθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες και το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Στα σχεδιαγράμματα 18-22 εμφανίζεται η πορεία της ζύμωσης με την εξέλιξη της οπτικής πυκνότητας (O.D), της οξύτητας, και του pH στο υπόστρωμα ζύμωσης καθώς επίσης του γαλακτικού οξέος που προσδιορίσθηκε ενζυματικά και του βουτυρικού και οξεικού με G.L.C. Όλα τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων.

Στο διάγραμμα της O.D παρατηρείται μια πολύ γρήγορη αύξηση στις 3 ώρες της ζύμωσης σε όλα τα ζάχαρα που μεταφράζεται σε γρήγορη αύξηση του μικροβιακού φορτίου. Η αύξηση της O.D είναι ταχύτερη στο υπόστρωμα με γλυκόζη ή ζαχαρόζη ή λακτόζη παρά στο υπόστρωμα με φρουκτόζη ή γαλακτόζη. Η O.D αυξάνει στη συνέχεια με ταχύ ρυθμό απο τις 3 στις 6 ώρες και στη συνέχεια βαθμιαία μέχρι και τις 48 ώρες. Η O.D στο υπόστρωμα με γαλακτόζη τόσο στη διάρκεια όσο και στο τέλος της ζύμωσης είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με την O.D στα άλλα υποστρώματα. Στις 24 ώρες η O.D διαμορφώνεται στη γλυκόζη 1.0, στη φρουκτόζη 0.98, στη ζαχαρόζη 1.1, στη λακτόζη 0.99, στο άμυλο 1.02 και στη γαλακτόζη 0.78.

Στην αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας που εμφανίζεται



στο σχεδ.19, θα μπορούσε να σημειώσει κανείς τη βαθμιαία αύξησή της σε ολόκληρη τη διάρκεια της ζύμωσης καθώς επίσης και το εμφανώς χαμηλότερο επίπεδο οξύτητας στα υποστρώματα με λακτόζη ή γαλακτόζη. Το τελικό επίπεδο της οξύτητας στο υπόστρωμα με γλυκόζη, φρουκτόζη ή σαχαρόζη είναι αντίστοιχα 0.38, 0.40 και 0.42% σε γαλακτικό οξύ. Στα υποστρώματα με γαλακτόζη, λακτόζη και άμυλο είναι αντίστοιχα 0.28, 0.29 και 0.24% .

Στο σχεδιάγραμμα που εμφανίζει την παραγωγή γαλακτικού οξέος όπως αυτό προσδιορίσθηκε ενδυματικά, παρατηρείται επίσης μια γρήγορη αύξηση μέχρι τις 24 ώρες στα υποστρώματα με τα ζάχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σαχαρόζη. Το τελικό επίπεδο γαλακτικού οξέος είναι 0.75 έως 0.82 mgr/ml. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι ελάχιστη στο υπόστρωμα με λακτόζη (0.05mgr/ml) και μικρή σε αυτό με γαλακτόζη (0.24mgr/ml). Εκείνο πάντως που έχει ιδιαίτερη σημασία και θα πρέπει να τονισθεί και πάλι είναι ότι μόνο το 20% περίπου της ολικής οξύτητας αποτελεί το γαλακτικό οξύ. Αυτό είναι περισσότερο εμφανές στο σχεδιάγραμμα 20 που περιλαμβάνει την % περιεκτικότητα σε βουτυρικό, οξελικό και γαλακτικό οξύ στις 24 ώρες της ζύμωσης. Μεγαλύτερες ποσότητες βουτυρικού, οξελικού και γαλακτικού οξέος παράγονται από φρουκτόζη, γλυκόζη και σαχαρόζη και μικρότερες από γαλακτόζη και λακτόζη.

Τέλος στο σχεδιάγραμμα που εμφανίζει την εξέλιξη του pH μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι μέχρι τις 9 ώρες ζύμωσης έχει φθάσει σχεδόν στην ελάχιστη τιμή. Στη συνέχεια η αύξηση της οξύτητας δεν συντελεί σε αντίστοιχη μείωση του pH πιθανόν λόγω ρυθμιστικής ικανότητας του υποστρώματος. Είναι εμφανής επίσης η χαμηλότερη τιμή του pH στο υπόστρωμα με γλυκόζη, φρουκτόζη και σαχαρόζη (4.6), σε σύγκριση με τη γαλακτόζη, λακτόζη και άμυλο όπου διαμορφώνεται σε υψηλότερο επίπεδο (4,8-5.1).

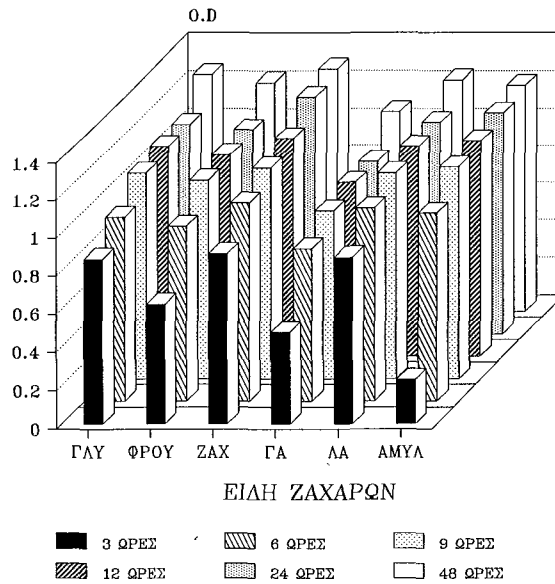
Όσο αφορά το άμυλο, παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητα του υποστρώματος αυξάνει με ταχύ ρυθμό και στις 48 ώρες έχει φθάσει περίπου στο ίδιο επίπεδο με εκείνο που εμφανίζεται στο διάγραμμα και αναφέρεται στη γλυκόζη και σαχαρόζη.

Αντίθετα η πτώση του pH συντελείται σε βραδύτερο ρυθμό και το τελικό pH είναι υψηλότερο σε σύγκριση με τις περιπτώσεις των άλλων ζαχάρων που μελετήθηκαν. Η οξύτητα όμως αυξάνει κανονικά και εκείνο που μπορεί να παρατηρήσει κανείς είναι ή μικρή κάμψη μετά τις 12 ώρες της ζύμωσης.

Τα περισσότερα είδη του γένους *Clostridium* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν και να παράγουν αξύ από ένα μεγάλο αριθμό ζαχάρων. Όπως αναφέρεται στο *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* από τους Cato & άλλους 1986, η πλειονότητα των ειδών του γένους *Clostridium* ζυμώνει το άμυλο ενώ μόνο 2-3 είδη του γένους *Lactobacillus* έχουν αυτή την ιδιότητα. Η υδρόλυση του αμύλου αναφέρεται θετική (+) για το *C. perfringens*. Επίσης και τα δύο είδη ζυμώνουν τα ζάχαρα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα.

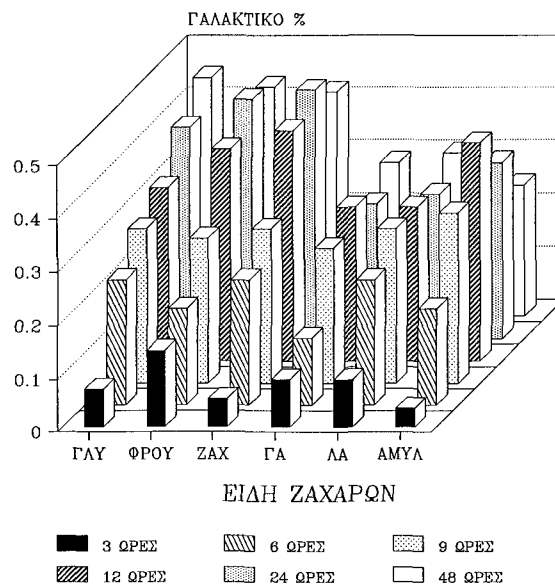
Η χρησιμοποίηση του αμύλου από το BE KP 89 είναι μια σημαντική ιδιότητα σε συσχέτισμό με την παραγωγή του επτάζυμου. Μερική υδρόλυση του αμύλου πιθανόν να έχει ευνοϊκή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Μια μεγαλύτερη υποβάθμιση της δομής της αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης είναι όμως πιθανόν να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη δομή και ιδιότητες του ζυμαριού και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ψωμιού που παράγεται. Ο βαθμός της επίδρασης του BE στο άμυλο του ζυμαριού είναι ένας τομέας που χρειάζεται παραπέρα μελέτη.

ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΕ RCM  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΖΑΧΑΡΩΝ  
 ΑΠΟ ΒΕ ΚΡ-89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



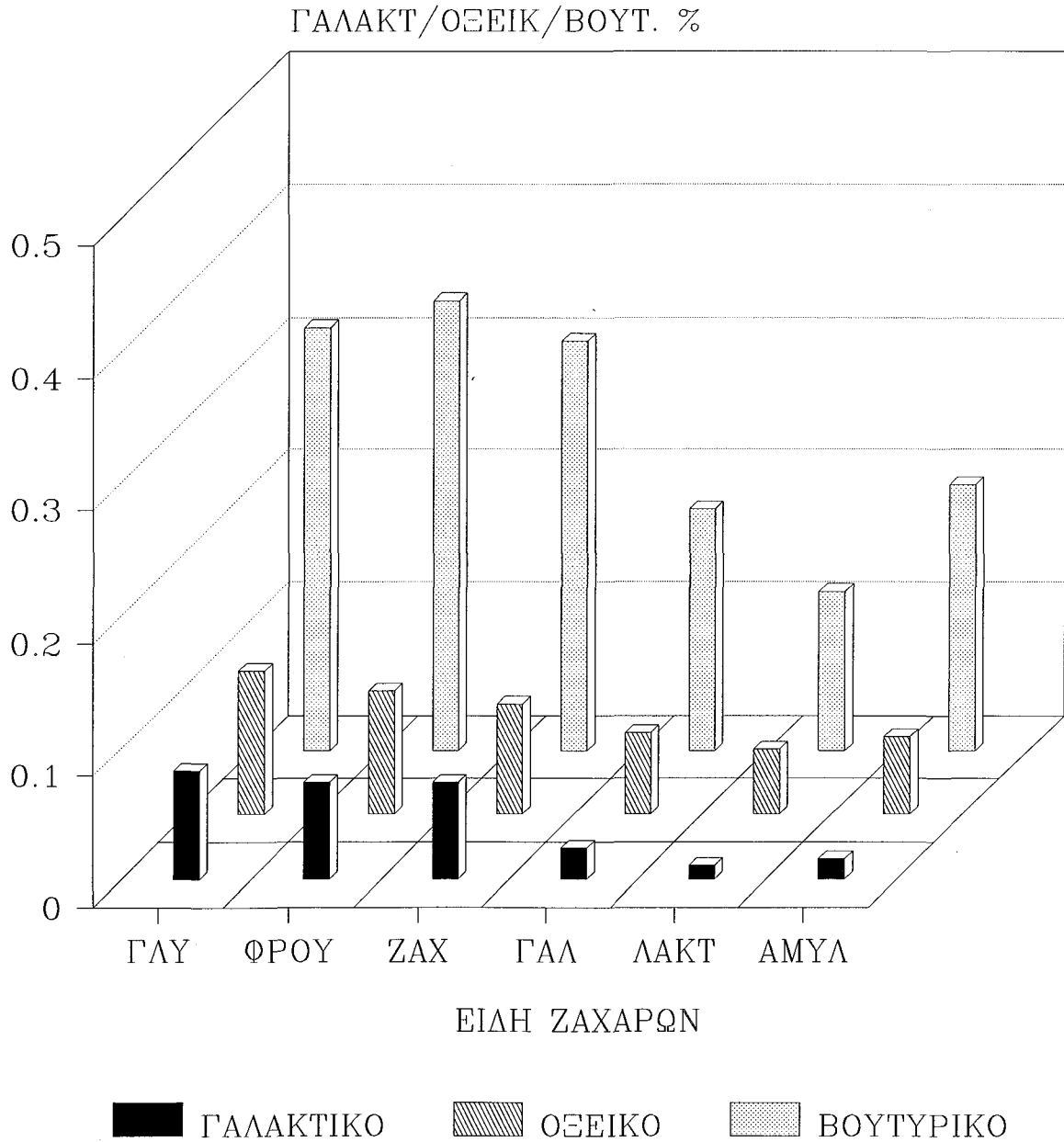
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18

ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΕ RCM  
 ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΖΑΧΑΡΩΝ  
 ΑΠΟ ΒΕ ΚΡ-89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



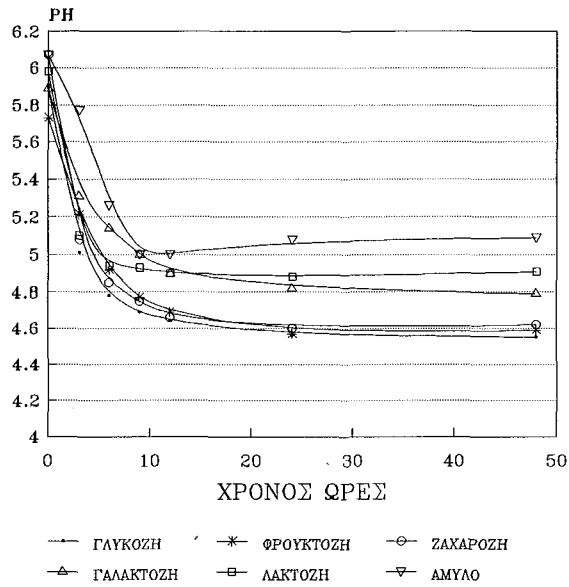
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19

ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΕΙΚΟ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ RCM  
 ΜΕΤΑ ΑΠΟ 24 ΩΡΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
 ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ-89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



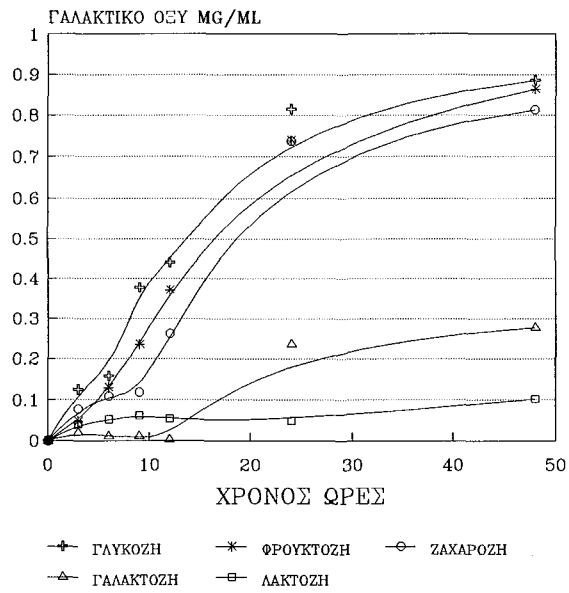
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20

**ΠΟΡΕΙΑ ΡΗ**  
**ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΖΑΧΑΡΩΝ**  
**ΑΠΟ ΒΕ-ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 ° C**



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**  
**ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΖΑΧΑΡΩΝ**  
**ΑΠΟ ΒΕ-ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 ° C**



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22

Ανάπτυξη του ΒΕ ΚΡ 89 στο υπόστρωμα RCM με διαφορετικά επίπεδα NaCl.

Στην πράξη κατά την παρασκευή της αρχικής καλλιέργειας εκκίνησης, συνήθως στο νερό μαζί με το αλεσμένο ρεβίθι προστίθεται και μικρή ποσότητα NaCl. Επίσης στο υπόστρωμα RCM που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα για την ανάπτυξη του ΒΕ περιέχεται NaCl σε επίπεδο 0.5% . Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να μελετηθεί η επίδραση του NaCl στην πορεία ανάπτυξης του ΒΕ στο υπόστρωμα RCM σε επίπεδο γλυκόζης 1% και στους 42°C. Το χλωριούχο νάτριο χρησιμοποιήθηκε σε επίπεδα 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 και 5% .

Τα αποτελέσματα που είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων εμφανίζονται στα σχεδιαγράμματα 23, 24, 25 και 26.

Στο διάγραμμα 23 που εμφανίζεται η αύξηση της οπτικής πυκνότητας (O.D) συναρτήσει του χρόνου στα διάφορα επίπεδα του NaCl μπορούν να παρατηρηθούν τα εξής: Αν και ο ΒΕ αναπτύσσεται στο υπόστρωμα αυτό και χωρίς NaCl σε γρήγορο ρυθμό, φαίνεται ότι το NaCl σε επίπεδο 0.5% ευνοεί την πιο γρήγορη ανάπτυξή του. Στα επίπεδα NaCl 1 και 2% ο ΒΕ αναπτύσσεται με επιβραδυνόμενο ρυθμό και ακόμη περισσότερο στο επίπεδο 3% . Σε επίπεδο NaCl 4% η ανάπτυξη του ΒΕ αρχίζει να παρεμποδίζεται σημαντικά και γίνεται εμφανής μόνο μετά τις 12h επώασης. Σε επίπεδο NaCl 5% η ανάπτυξη έχει παρεμποδιστεί εντελώς μέχρι και τις 48h επώασης.

Στο διάγραμμα 24 που εμφανίζει την πορεία του pH συναρτήσει του χρόνου, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων NaCl 0, 0.5 και 1% . Η μείωση του pH επιτελείται πολύ γρήγορα τις πρώτες ώρες της επώασης και μέχρι τις 12h που έχει φθάσει σχεδόν τη χαμηλότερη τιμή. Στο επίπεδο 2% παρατηρείται μια βαθμιαία πτώση του pH σε ολόκληρη τη διάρκεια της επώασης και η τελική τιμή του είναι πολύ κοντά με τα χαμηλότερα επίπεδα. Στο επίπεδο όμως 4% παρατηρείται μια στασιμότητα μέχρι τις 12 h επώασης και στη συνέχεια μια απότομη πτώση προς το τέλος της επώασης.

Στο διάγραμμα 25 όπου εμφανίζεται η αύξηση της οξύτητας

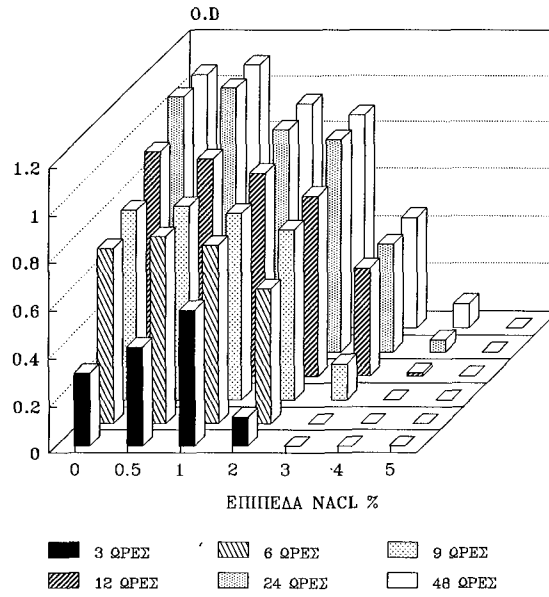
στο υπόστρωμα μπορεί να παρατηρηθεί μια ανάλογη συμπεριφορά. Η αύξηση της οξύτητας φαίνεται ότι ήταν σχετικά ταχύτερη στο επίπεδο NaCl 0.5% και η τελική τιμή της ελαφρά υψηλότερη σε σύγκριση με τα επίπεδα 0,1 και 2% . Παρατηρείται επίσης μια απότομη αύξηση της οξύτητας στο επίπεδο 3% μετά τις 24 h επώασης με την τελική τιμή να είναι κοντά στις τελικές τιμές των πιο χαμηλών επιπέδων του NaCl. Αντίθετα στο επίπεδο 4% η τελική τιμή της οξύτητας είναι σημαντικά χαμηλότερη από τα προηγούμενα επίπεδα χλωριούχου νατρίου.

Τέλος στο διάγραμμα 26 που περιλαμβάνει το επίπεδο του γαλακτικού που προσδιορίσθηκε ενζυματικά στις 24h της ανάπτυξης φαίνεται χαρακτηριστικά το υψηλότερο επίπεδο σε χλωριούχο Νάτριο 0.5% σε σύγκριση με όλα τα άλλα επίπεδα.

Μια άλλη παρατήρηση που θα θέλαμε επίσης να σημειώσουμε είναι ότι σε άμεσες μικροσκοπήσεις που γίνονταν στη διάρκεια της επώασης παρατηρήθηκε ότι σε επίπεδο NaCl 0% ο BE παρουσίαζε εικόνα με μακρύτερα κύτταρα χωρίς μεταχρωματικά κοκκία ενώ σε υψηλότερα επίπεδα NaCl τα κύτταρα ήταν μικρότερα κατά μήκος και με περισσότερα ενδοκυτταρικά μεταχρωματικά κοκκία (ψευδοπυρήνες).

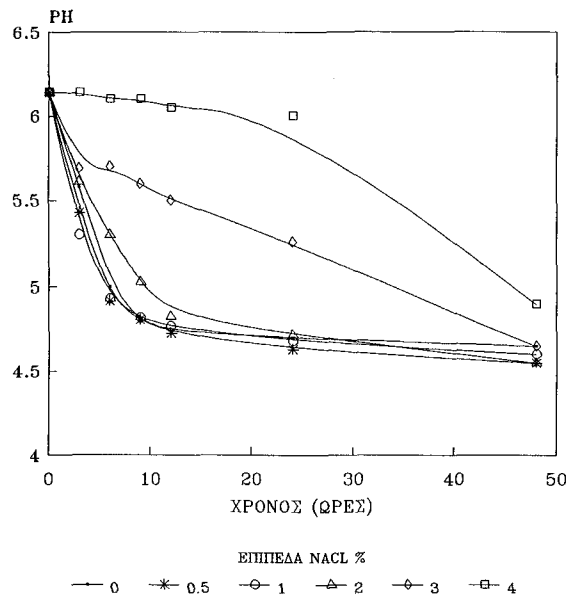
Τέλος θα πρέπει να σημειώσουμε ότι το επίπεδο χλωριούχου νατρίου 5% που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του BE, είναι χαμηλότερο από αυτό που αναφέρεται για το *C.perfringens* στο Bergery's Manual 1986, και είναι 6.5% .

ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΕ RCM  
 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ NaCl ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕ-ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23

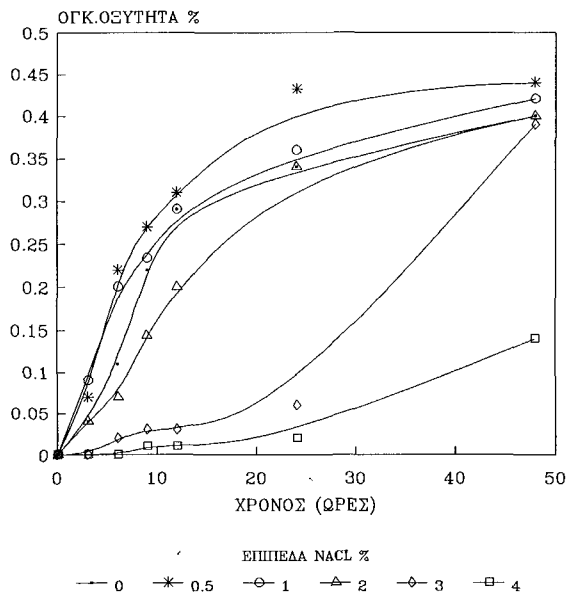
ΠΟΡΕΙΑ ΡΗ ΣΕ RCM  
 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ NaCl ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕ-ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24

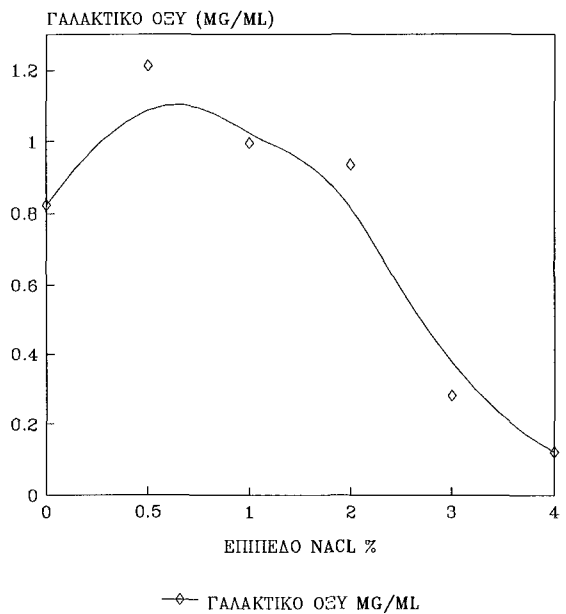


ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΣΕ RCM  
 ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ NaCl ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕ-ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 ο C



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25

ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ ΣΕ RCM  
 ΜΕΤΑ 24 ΩΡΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΒΕ-ΚΡ 89  
 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ NaCl



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26

Εξέλιξη μικροβιακού φορτίου του BE KP 89 σε υπόστρωμα RCM στους 42°C, σε συσχέτισμό με την αύξηση της O.D και την παραγωγή βιομάζας.

Για την παραπάνω μελέτη που έγινε σε τρεις επαναλήψεις, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Στο σχεδιάγραμμα 27 εμφανίζεται η εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου με την αντίστοιχη αύξηση της οπτικής πυκνότητας και της βιομάζας. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα η διάρκεια της φάσης προσαρμογής του BE (lag phase) στο υπόστρωμα είναι πολύ μικρή και ήδη από τη δεύτερη ώρα της επώασης αρχίζει η λογαριθμική φάση. Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί κυρίως στο γεγονός ότι το ενοφθάλμισμα ήταν δραστική καλλιέργεια 20h του BE KP 89 και το υπόστρωμα κατά τον εμβολιασμό είχε προθερμανθεί στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής του. Στις 5-6 ώρες της επώασης ο BE έχει ήδη εισέλθει στην επιβραδυνόμενη και στατική φάση της ανάπτυξης και μετά τις 12 ώρες ακολουθεί η φάση της παρακμής ή θανάτου.

Η αντίστοιχη αύξηση της οπτικής πυκνότητας που εμφανίζεται στο ίδιο διάγραμμα ακολουθεί μια γρήγορη απότομη αύξηση μέχρι τις 5 ώρες ανάπτυξης και στη συνέχεια βαθμιαία αύξηση μέχρι και το τέλος της επώασης. Όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας μπορεί να παρατηρηθεί ότι μέχρι τις 12h επώασης η βιομάζα αυξάνει κατακόρυφα και στη συνέχεια δεν παρατηρείται παραπέρα αύξηση. Στο χρόνο αυτό η παραγωγή βιομάζας (1,2mgr/ml) έχει φθάσει στο ανώτατο σχεδόν επίπεδο με αντίστοιχη οπτική πυκνότητα γύρω στα 1.15.

Η σχέση μεταξύ των τιμών της οπτικής πυκνότητας (X) και των αντιστοίχων τιμών της βιομάζας (mgr/ml) (Ψ), μέχρι και τις 12 ώρες της επώασης, δίνεται από την εξίσωση:

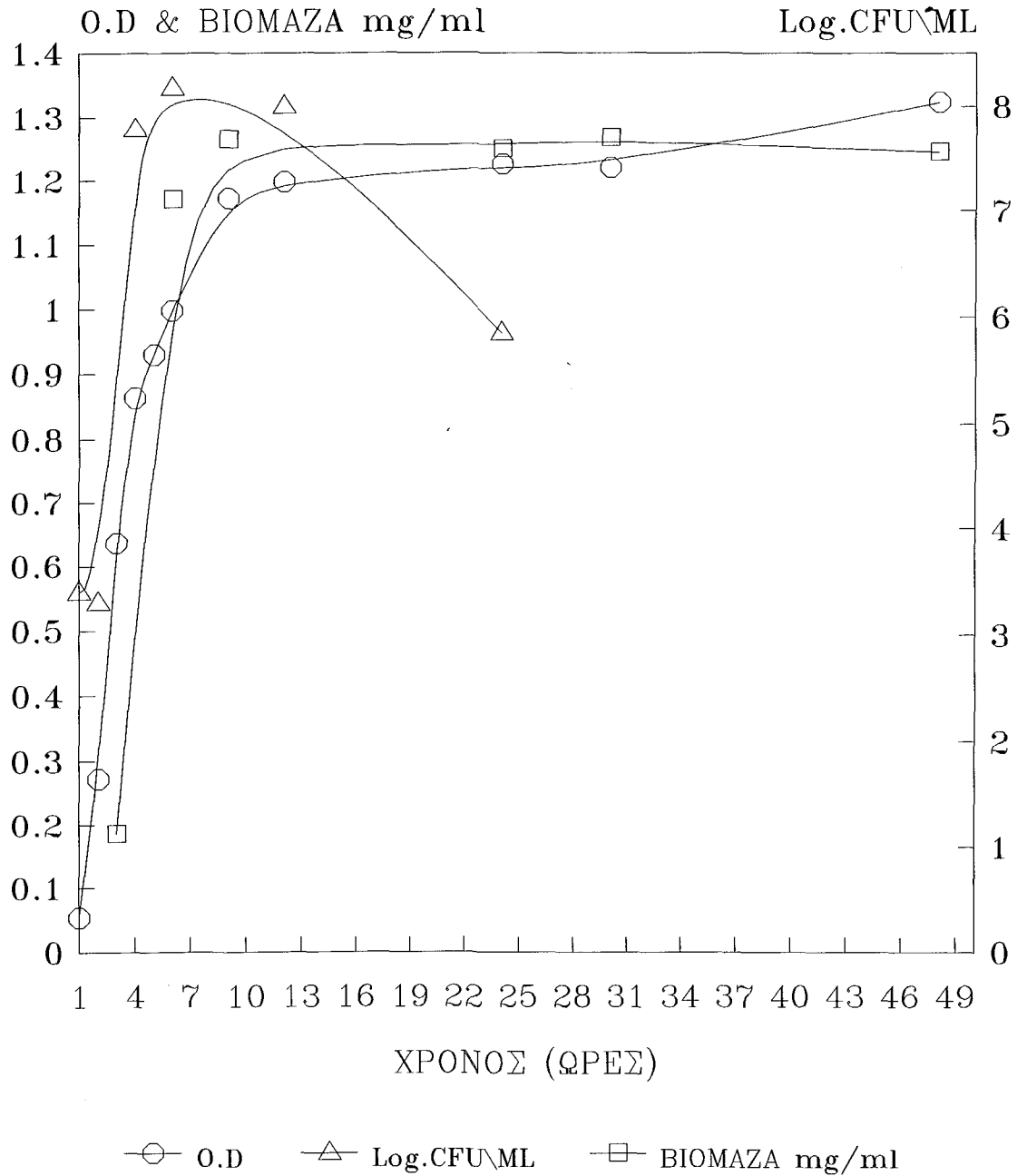
$$\Psi = 1,15X - 0,144 \text{ με } R=0,920$$

Η σχέση μεταξύ των τιμών της οπτικής πυκνότητας (X) και των αντιστοίχων τιμών του φορτίου (log c.f.u/ml) (Ψ), μέχρι και τις 12ώρες της επώασης, δίνεται από την εξίσωση:

$$\Psi = 5.25X + 2.680 \text{ με } R=0,974$$

Από τις παραπάνω εξισώσεις και τους αντίστοιχους συντελεστές (R), παρατηρείται μια ικανοποιητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ μέχρι και τις 12 ώρες της επώασης μεταξύ των τιμών της οπτικής πυκνότητας και των αντίστοιχων τιμών της βιομάζας και του φορτίου.

ΕΞΕΛΙΞΗ Ο.Δ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΙ  
 ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΑΠΟ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΕ RCM ΣΤΟΥΣ 42 οC



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ (STARTER CULTURE) ΓΙΑ ΤΟΝ ΒΑΚΙΛΛΟ ΤΟΥ ΕΠΤΑΖΥΜΟΥ

### Γενικά.

Το δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης έχει σαν αντικείμενο τη μελέτη της παρασκευής καλλιέργειας εκκίνησης για το βάκιλλο του Επτάζυμου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην πράξη για τον τύπο αυτό του ψωμιού. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να εξευρεθεί κατ' αρχήν ένα κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ΒΕ. Το υπόστρωμα αυτό πρέπει να περιέχει όλα εκείνα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, να είναι εύχρηστο, χαμηλής τιμής και επι πλέον κατάλληλο για κατανάλωση και από τον άνθρωπο. Αφού εξευρεθεί το κατάλληλο υπόστρωμα θα πρέπει να μελετηθεί η πορεία της ανάπτυξης του ΒΕ σε αυτό για να διαπιστωθούν όλα εκείνα τα στοιχεία που θα είναι απαραίτητα για την τυχόν χρησιμοποίησή του σε μεγάλη κλίμακα. Για να ολοκληρωθεί όμως η διαδικασία της παρασκευής καλλιέργειας εκκίνησης θα πρέπει να μελετηθούν τεχνικές και μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας εκκίνησης, η αποτελεσματικότητά της κατά την πρακτική εφαρμογή, η διάρκεια ζωής κλπ. Στο μέρος αυτό της μελέτης καταβάλλεται προσπάθεια να δοθεί όσον το δυνατόν πληρέστερη απάντηση στα ερωτήματα αυτά.

### Μελέτη υποστρωμάτων για την ανάπτυξη του ΒΕ-ΚΡ 89

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάπτυξη των ζυμών αρτοποιίας είναι η μελάσσα, το κύριο δηλαδή υποπροϊόν της ζαχαρουργίας που είναι σχετικά χαμηλής τιμής και επι πλέον διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε μελάσσα ελληνικών ζαχαρουργείων που είχε συντηρηθεί στους 0°C. Το προϊόν αραιωμένο 1:10 έδωσε επίπεδο διαλυτών στερεών 7.3% και pH=8.55.

Σε όλους τους χειρισμούς που έγιναν στη μελάσσα (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι), ακόμα και όταν το υπόστρωμα ενισχύθηκε

με αμμωνιακά άλατα, εκχύλισμα ζύμης και υδροχλωρική κυσταΐνη ο ΒΕ δεν αναπτύχθηκε. Για το λόγο αυτό πρέπει να θεωρηθεί ότι στο υπόστρωμα της μελάσας, υπάρχει κάποιου τοξικός παράγοντας που εμποδίζει την ανάπτυξη του ΒΕ ΚΡ 89.

Με το δεδομένο ότι ο ΒΕ αναπτύσσεται σε αλεσμένο ρεβίθι σε νερό με προσθήκη μικρής ποσότητας NaCl, έγιναν στη συνέχεια ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα για να διαπιστωθεί αν ο ΒΕ μπορεί να αναπτυχθεί και σε αραιό εναιώρημα αλεύρου. Εξάλλου αναφέρεται και στη βιβλιογραφία η χρήση παρόμοιου υποστρώματος για την παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης του *L. sanfrancisco*. Χρησιμοποιήθηκε κατ' αρχήν το τυποποιημένο σκληρό αλεύρι εμπορίου No.1, σε μορφή εναιωρήματος 5% σε νερό με 0.5% NaCl και προσθήκη γλυκόζης 0.5% σε σύγκριση με μάρτυρα χωρίς γλυκόζη. Η θερμοκρασία επώασης ήταν 42°C.

Διαπιστώθηκε η σύντομη έναρξη της χαρακτηριστικής ζύμωσης του ΒΕ με την ανάπτυξη του επιφανειακού αφρισμού και στους δύο χειρισμούς. Το αρχικό pH του υποστρώματος ήταν 7.4 και το τελικό μετά από 24 ώρες οπότε η ζύμωση είχε ουσιαστικά περατωθεί 3.94 στο υπόστρωμα με γλυκόζη και 4.20 στο μάρτυρα. Όπως διαπιστώθηκε και από τον ενζυματικό προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος η γλυκόζη ευνόησε την παραγωγή του γαλακτικού οξέος, που βρέθηκε αντίστοιχα 0.4 και 0.12 mgr/ml. Αυτό πιθανόν οφείλεται και στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων εκτός από το ΒΕ. Πάντως η ένταση της ζύμωσης όπως διαπιστώθηκε από το πάχος του σχηματιζόμενου επιφανειακού αφρισμού δεν φαίνεται να ήταν μεγαλύτερη στο υπόστρωμα με την προσθήκη γλυκόζης.

Στη συνέχεια έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές με τη χρήση αλεύρου σίτου ολικής άλεσης που είναι πλουσιότερο σε θρεπτικά συστατικά (ιχνοστοιχεία, άλατα και βιταμίνες) και έχει μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα για να διαπιστωθεί η συμπεριφορά του κατά τη ζύμωση σε μορφή εναιωρήματος. Το αλεύρι αυτό της ολικής άλεσης παρασκευάστηκε στο εργαστήριο όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που θα αναφερθούν στη συνέχεια. Σε μορφή εναιωρήματος που παρασκευάστηκε όπως προηγουμένως, διαπιστώθηκε ότι υποστηρίζει την ταχύτερη

ανάπτυξη του BE χωρίς καμιά άλλη προσθήκη. Το υπόστρωμα αυτό είναι φθινό, παρασκευάζεται εύκολα και προσφέρεται ακόμα και για την παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης όπως θα δούμε στη συνέχεια.

#### Ανάπτυξη του BE σε υπόστρωμα αλεύρου 5 και 10%.

Χρησιμοποιήθηκε αλεύρι σίτου ολικής άλεσης για την παρασκευή εναιωρήματος 5% και 10% κατά βάρος, σε νερό βρύσης με προσθήκη 0.5% NaCl. Η ζύμωση έγινε σε ογκομετρική φιάλη των 2 λίτρων στους 42°C. Ο όγκος ενοφθαλμίσματος ήταν 30ml από καλλιέργεια 20h του BE σε RCM, με φορτίο 7-8 log/ml. Σε προκαθορισμένους χρόνους στη διάρκεια της ζύμωσης γίνονταν λήψη δείγματος μετά από ανάδευση για τον προσδιορισμό του pH, της οξύτητας, του βουτυρικού και του οξικού (G.L.C), του γαλακτικού οξέος (ενζυματικά). Σε κάθε χρόνο γίνονταν επίσης μέτρηση του φορτίου σε RCA με επώαση σε ανασερόβιες συνθήκες καθώς επίσης σε PCA και RBC σε αερόβιες συνθήκες. Το πείραμα της ζύμωσης επαναλήφθηκε δυο φορές και τα αποτελέσματα που αναφέρονται στα παρακάτω διαγράμματα είναι οι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων.

Στο σχεδιάγραμμα 28 εμφανίζεται η πορεία του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας σε γαλακτικό % στα δύο υποστρώματα. Είναι εμφανής η γρήγορη πτώση του pH από την αρχική τιμή 6.6, σε επίπεδο κάτω του 4.5 στις 6h της ζύμωσης, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο επιπέδων του αλεύρου. Στη συνέχεια η πτώση του pH μέχρι το τέλος της ζύμωσης είναι ελάχιστη. Αντίθετα η οξύτητα στο υπόστρωμα 5%, αυξάνει βαθμιαία σχεδόν μέχρι τις 24h ζύμωσης σένα τελικό επίπεδο γύρω στο 0.38%, ενώ στο υπόστρωμα 10% η αύξηση της οξύτητας είναι ταχύτερη και το τελικό επίπεδο υψηλότερο (0.52 %). Η ποσότητα του γαλακτικού οξέος που παράγεται είναι ελάχιστη, περίπου 0.06mg/ml στο τέλος της ζύμωσης και στα δύο επίπεδα αλεύρου. Επομένως η συνεισφορά του στη διαμόρφωση της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας είναι αμελητέα.

Στο σχεδιάγραμμα 29 εμφανίζεται η πορεία του βουτυρικού

και του αμεικτού αμεικτού στα δύο υποστρώματα και αποδεικνύεται η σημασία τους στη διαμόρφωση της αμεικτότητας. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα η ποσότητα του βουτυρικού αυξάνει γρήγορα μέχρι τις 12 ώρες της ζύμωσης και στα δύο υποστρώματα ενώ το αμεικτό αμεικτό αυξάνεται με πολύ βραδύτερο ρυθμό. Η ποσότητα και των δύο αμεικτών είναι συνεχώς μεγαλύτερη στο υπόστρωμα με το υψηλότερο επίπεδο αλεύρου. Στο τέλος της ζύμωσης διαμορφώνεται μια σχέση μεταξύ βουτυρικού και αμεικτού αμεικτού γύρω στο 3:1.

Στο σχεδιάγραμμα 30 εμφανίζεται το επίπεδο της γλυκόζης που προσδιορίσθηκε στο υπερκείμενο του εναιωρήματος ζύμωσης καθώς επίσης και το επίπεδο των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Η γλυκόζη προσδιορίσθηκε ενζυματικά και οι πρωτεΐνες με τη μέθοδο Lowry. Όπως φαίνεται η γλυκόζη παρουσιάζει μια μικρή αύξηση στις 6h της ζύμωσης και δραστηκή μείωση στις 12h και 24h της ζύμωσης στο επίπεδο 5% ενώ στο 10% παρουσιάζει συνεχή άνοδο μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Το ποσοστό των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στο τέλος της ζύμωσης και στα δύο υποστρώματα έχει αυξηθεί σε σχέση με το χρόνο μηδέν αλλά η αύξηση αυτή δεν φαίνεται ιδιαίτερα σημαντική. Η πρωτεολυτική επομένως δράση του BE είναι περιορισμένη.

Στο σχεδιάγραμμα 31 εμφανίζεται η εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου στα δύο υποστρώματα σε RCA με αναερόβια επώαση στους 42°C που οφείλεται αποκλειστικά στον B.E. Παρατηρούμε ότι με ένα αρχικό φορτίο γύρω στο 4-4.5 Log/ml φθάνουμε στο 8.5 log/ml στις 6 ώρες επώασης που όπως φαίνεται είναι περίπου και το τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Στις 12h επώασης έχει ήδη τελειώσει η στατική φάση της ανάπτυξης και στις 24h παρατηρείται μικρή κάμψη του μικροβιακού φορτίου. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι στο επίπεδο αλεύρου 10% η ανάπτυξη του BE KP 89 επιτελείται με ελαφρά γρηγορότερο ρυθμό.

Εκείνο όμως που θα πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα είναι ότι παρά το γεγονός ότι το υπόστρωμα αλεύρου παρασκευάστηκε χωρίς να αποστειρωθεί και δεν τηρήθηκαν ιδιαίτερα ασηπτικές συνθήκες σε όλη τη φάση της ανάμιξης των υλικών, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη τόσο στο υπόστρωμα P.C.A και M.R.S όσο και στο εκλεκτικό για ζύμες - μύκητες R.B.C, που



περιλαμβάνονταν στις μικροβιολογικές μετρήσεις. Αυτό σημαίνει ότι όταν δοθεί προβάδιμα στο BE με ένα αρχικό φορτίο γύρω στο  $10^4$ - $10^5$  ανά ml, παρεμποδίζεται εντελώς η ανάπτυξη άλλων βακτηρίων αλλά και των ζυμών.

Συνεχής καλλιέργεια του BE σε υπόστρωμα αλεύρου 10%.

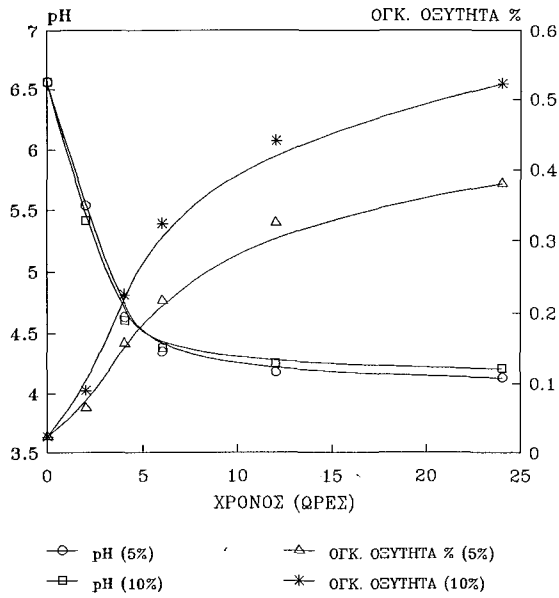
Όπως έχει αναφερθεί και στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας τα ρευστά υποστρώματα αλεύρου χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία κυρίως από τις μεγάλες βιομηχανίες στην παρασκευή ψωμιού. Τα υποστρώματα αυτά περιέχουν βασικά τη μαγιά, ένα μικρό μέρος του αλεύρου της συνταγής και έχουν ενισχυθεί με ανόργανα άλατα και ζάχαρα. Η επώαση γίνεται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία (περίπου  $30^{\circ}\text{C}$ ) και μετά την ανάπτυξη της χλωρίδας προστίθεται το υπόλοιπο αλεύρι και τα άλλα συστατικά και παρασκευάζεται το τελικό ζυμάρι. Επειδή ο βάκιλλος του επτάζυμου αναπτύσσεται ταχύτατα σε αραιό εναιώρημα αλεύρου και η τεχνική αυτή είναι εφαρμόσιμη στην πράξη, μελετήθηκε η δυνατότητα συνεχούς ανάπτυξης του BE σε υπόστρωμα αλεύρου ολικής άλεσης 10% με 0.5% NaCl. Η καλλιέργεια έγινε μέσα σε κωνική φιάλη των 500 ml σε όγκο υποστρώματος 400 ml και σε θερμοκρασία  $45^{\circ}\text{C}$ . Η επιλογή της υψηλής αυτής θερμοκρασίας έγινε με σκοπό τον περιορισμό της ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών για τους οποίους η θερμοκρασία αυτή είναι απαγορευτική.

Ο εμβολιασμός έγινε με καθαρή καλλιέργεια του BE και το αρχικό φορτίο υπολογίζεται από  $10^5$  έως  $10^6$  ανά ml. Ο χρόνος επώασης ήταν 4 ώρες και στο διάστημα αυτό γίνονταν περιοδικές ανασεύσεις του περιεχομένου της κωνικής φιάλης. Στο τέλος του χρόνου επώασης γίνονταν μέτρηση της τιμής του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας και καταμέτρηση του φορτίου σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Στη συνέχεια η φιάλη της ζύμωσης τοποθετούνταν στους  $0^{\circ}\text{C}$  μέχρι την επομένη (20h), οπότε απορρίπτονταν τα 300ml του περιεχομένου και γίνονταν ανασύσταση του υποστρώματος στον αρχικό όγκο με τις ίδιες αναλογίες αλεύρου και NaCl. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε κυκλικά επί 13 ημέρες και τα αποτελέσματα των

αναλύσεων περιλαμβάνονται στον πίνακα 21.

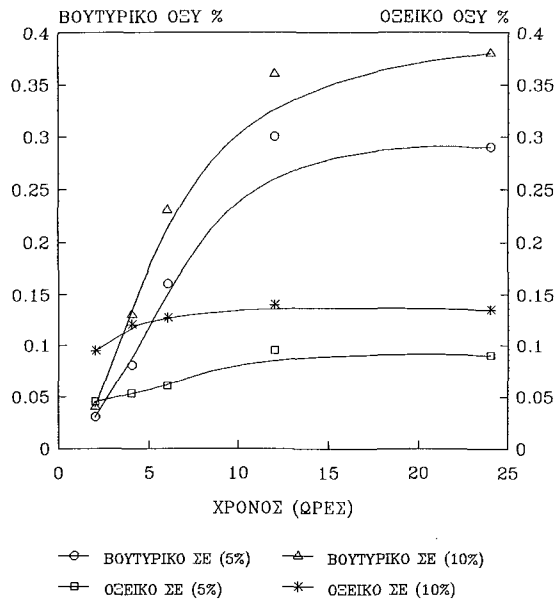
Όπως φαίνεται στον πίνακα η τιμή του pH στις 4 ώρες της ζύμωσης διαμορφώθηκε από 4.53 έως 4.78 στη διάρκεια των 13 ημερών. Η διακύμανση αυτή δεν είναι σημαντική. Η αντίστοιχη διακύμανση της οξύτητας ήταν επίσης μικρή από 0.24 έως 0.32%. Η τιμή του pH μετά την ανασύσταση του υποστρώματος ήταν  $5.5 \pm 0.1$  και σγκομετρούμενη οξύτητα  $0.082 \pm 0.01$ . Το φορτίο σε R.C.A σε αναερόβιες συνθήκες που οφείλεται αποκλειστικά στα BE, από 5.39 log/ml στο χρόνο μηδέν ανήλθε στο 7.58-8.91 log/ml στις 4 ώρες της ζύμωσης. Κάτω από τις συνθήκες που έγινε η συνεχόμενη αυτή καλλιέργεια του BE χωρίς να τηρούνται ασηπτικές συνθήκες, τονίζεται η απουσία αεροβίων μικροοργανισμών σε M.R.S και P.C.A και ζυμών σε R.B.C. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί σημαίνει ότι μπορεί να διατηρηθεί μια συνεχής καλλιέργεια του BE στο υπόστρωμα αυτό για αρκετές ημέρες χωρίς να υπάρχουν προβλήματα επιμολύνσεων. Είναι αυτονόητο ότι η καλλιέργεια μπορεί να είναι απόλυτα συνεχής χωρίς να μεσολαβεί αναγκαστικά χρόνος περιορισμού της ανάπτυξης με ψύξη όπως έγινε στο πείραμα αυτό.

ΠΟΡΕΙΑ pH ΟΞΥΤΗΤΑΣ  
ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΛΕΥΡΟΥ 5% ΚΑΙ 10% ΚΑΤΑ  
ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 οC



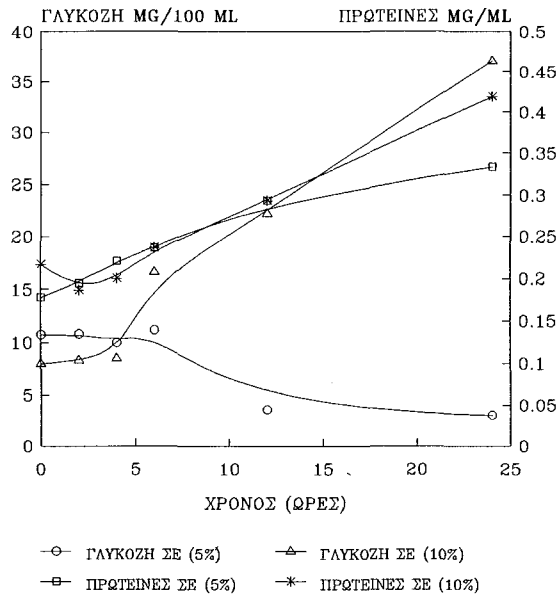
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28

ΠΟΡΕΙΑ ΟΞΕΙΚΟΥ ΚΑΙ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ  
42 οC ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΛΕΥΡΟΥ 5% ΚΑΙ 10%



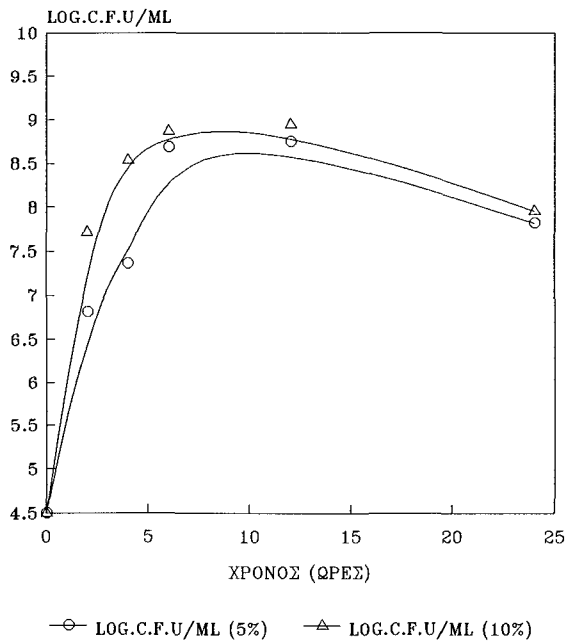
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29

ΠΟΡΕΙΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ-ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ  
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ  
42 οC ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΛΕΥΡΟΥ 5% ΚΑΙ 10%



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 30

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΕ ΚΡ 89 ΣΤΟΥΣ 42 οC  
ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΛΕΥΡΟΥ 5% ΚΑΙ 10%



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 31

ΠΙΝΑΚΑΣ 21

ρΗ, Οξύτητα και μικροβιακό φορτίο κατά τη συνεχή καλλιέργεια του ΒΕ ΚΡ-89 σε υπόστρωμα αλεύρου 10% στους 45°C

Χρόνος ημέρες	ρΗ	Ογκ.οξύτητα γαλακτικό %	Log αριθμού μικροοργανισμών/ml			
			RCA	MRS	PCA	RBC
0	6.65	0.050	5.39	-	-	-
1	4.72	0.262	7.58	-	-	-
2	4.53	0.320	8.40	-	-	-
3	4.64	0.270	7.60	-	-	-
4	4.56	0.282	8.32	-	-	-
5	4.63	0.279	7.75	-	-	-
8	4.70	0.270	8.91	-	-	-
9	4.78	0.240	8.56	-	-	-
10	4.66	0.320	8.34	-	-	-
11	4.70	0.260	7.96	-	-	-
12	4.65	0.279	8.08	-	-	-
13	4.68	0.265	8.30	-	-	-

RCA: Διπλή στρώση επώαση αναερόβια σε ατμόσφαιρα αζώτου στους 42°C

MRS, PCA: Επιφανειακή στρώση επώαση αερόβια στους 37°C

RBC: Επιφανειακή στρώση επώαση αερόβια στους 25°C

\* Η τιμή του ρΗ και της ογκ. οξύτητας προσδιορίζονταν κάθε ημέρα στο τέλος του χρόνου επώασης (4h).

Η τιμή του ρΗ στην έναρξη του χρόνου επώασης μετά την ανανέωση του υποστρώματος ήταν 5.5+-0.1 και η οξύτητα 0.082

\*\* Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων.

### Παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης σε καταψυγμένη μορφή

Όπως επιβεβαιώθηκε από το προηγούμενο πείραμα, για την ανάπτυξη του BE KP 89, άριστο υπόστρωμα αποτελεί εναιώρημα αλεύρου ολικής άλεσης σε νερό, σε επίπεδο 5-10% με προσθήκη NaCl 0.5%. Το υπόστρωμα αυτό είναι εύχρηστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή μιας καλλιέργειας εκκίνησης του BE για εφαρμογή στην πράξη. Η καλλιέργεια αυτή εκκίνησης θα μπορούσε να συντηρηθεί υπο ψύξη, κατάψυξη ή σε λυοφιλιωμένη μορφή. Στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας έχουν αναφερθεί διεξοδικά οι μορφές και η διαδικασία παρασκευής των ζυμών αρτοποιίας καθώς επίσης και των καλλιεργειών εκκίνησης σε όξινες μαγιές.

Στην περίπτωση όμως του BE έχουμε εντελώς διαφορετικά δεδομένα. Έχουμε ένα βάκιλλο που αναπτύσσεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες, με ιδιαίτερες απαιτήσεις ως προς τη θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά και μη γνωστή συμπεριφορά σε συνθήκες ψύξης, κατάψυξης, λυοφιλίωσης κλπ. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η χρησιμοποίηση καλλιεργειών εκκίνησης στην αρτοποιία σε καταψυγμένη μορφή κυρίως για την παρασκευή ξινών ζυμαριών (sour doughs).

Για να μελετηθεί η συμπεριφορά του BE KP 89 στο υπόστρωμα αλεύρου σε υπερκαταψυγμένη μορφή έγιναν κατ' αρχήν ορισμένες προκαταρκτικές δοκιμές με επιτυχία. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του BE με εμβολιασμό καθαρής καλλιέργειας σε υπόστρωμα αλεύρου 10% με 0.5% NaCl στους 42°C. Στη λογαριθμική φάση της ζύμωσης (4 h) προστέθηκε επί πλέον αλεύρι και μετά από νέα διόγκωση του ζυμαριού, το δείγμα τοποθετήθηκε σε βαθειά κατάψυξη στους -80°C. Μετά από 22 ημέρες συντήρησης στη θερμοκρασία αυτή, το ζυμάρι αποψύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε σαν καλλιέργεια εκκίνησης σε παρασκευή ψωμιού με τα χαρακτηριστικά του επτάζυμου.

Στο τελικό πείραμα για τη μελέτη καλλιέργειας εκκίνησης του BE σε υπερκαταψυγμένη μορφή ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Σε κωνική φιάλη του 1 λίτρου αναμείχθηκε αλεύρι σίτου ολικής άλεσης 100gr μαζί με 5gr χλωριούχο νατρίο. Στη

συνέχεια συμπληρώθηκε μέχρι 1 λίτρο με ζεστό νερό βρύσης και ακολούθησε καλή ανάδευση για παρασκευή εναιωρήματος. Μετά τον εμβολιασμό του περιεχομένου με καλλιέργεια του BE KP-89 20h σε RCM (όγκος ενοφθαλμίσματος 35ml περίπου), η φιάλη επώασθη στους 42°C. Υστερα από δυο ώρες, οπότε η ζύμωση του υποστρώματος ήταν σε έντονη εξέλιξη, πραγματοποιήθηκε μεταφορά του περιεχομένου της κωνικής σε άλλη, όγκου 2 λίτρων, και προστέθηκαν επιπλέον 100gr αλεύρι και 5gr χλωριούχου νατρίου. Μετά από δύο ώρες επώασης οπότε η ζύμωση του υποστρώματος εξακολουθούσε να είναι έντονη με τον χαρακτηριστικό σχηματισμό του επιφανειακού αφρισμού, το περιεχόμενο της κωνικής αφού αναδεύθηκε καλά, μοιράσθηκε σε 8 γυάλινα δοχεία (250ml περίπου). Σε κάθε δοχείο προστέθηκαν 100gr αλεύρι και μετά από καλή ανάδευση και ομογενοποίηση του περιεχομένου τοποθετήθηκαν στους 42°C με το καπάκι στριμμένο ελαφρά για να επιτρέψει διαφυγή των αερίων της ζύμωσης. Σε 90 min, οπότε η υδαρής ζύμη μέσα σε κάθε δοχείο είχε διογκωθεί τόσο, ώστε να καλύψει τον όγκο του, έγινε καλό κλείσιμο και τοποθέτηση στους -80°C

Πριν από την τοποθέτηση στη βαθεία κατάψυξη σε ένα δοχείο έγινε ομογενοποίηση του περιεχομένου, μέτρηση pH, οξύτητας και καταμέτρηση του φορτίου σε RCA σε ανασερόβιες συνθήκες. Τέλος θα πρέπει να σημειώσουμε ότι στην όλη διαδικασία της παρασκευής της καταψυγμένης μαζιάς δεν τηρήθηκαν ασηπτικές συνθήκες.

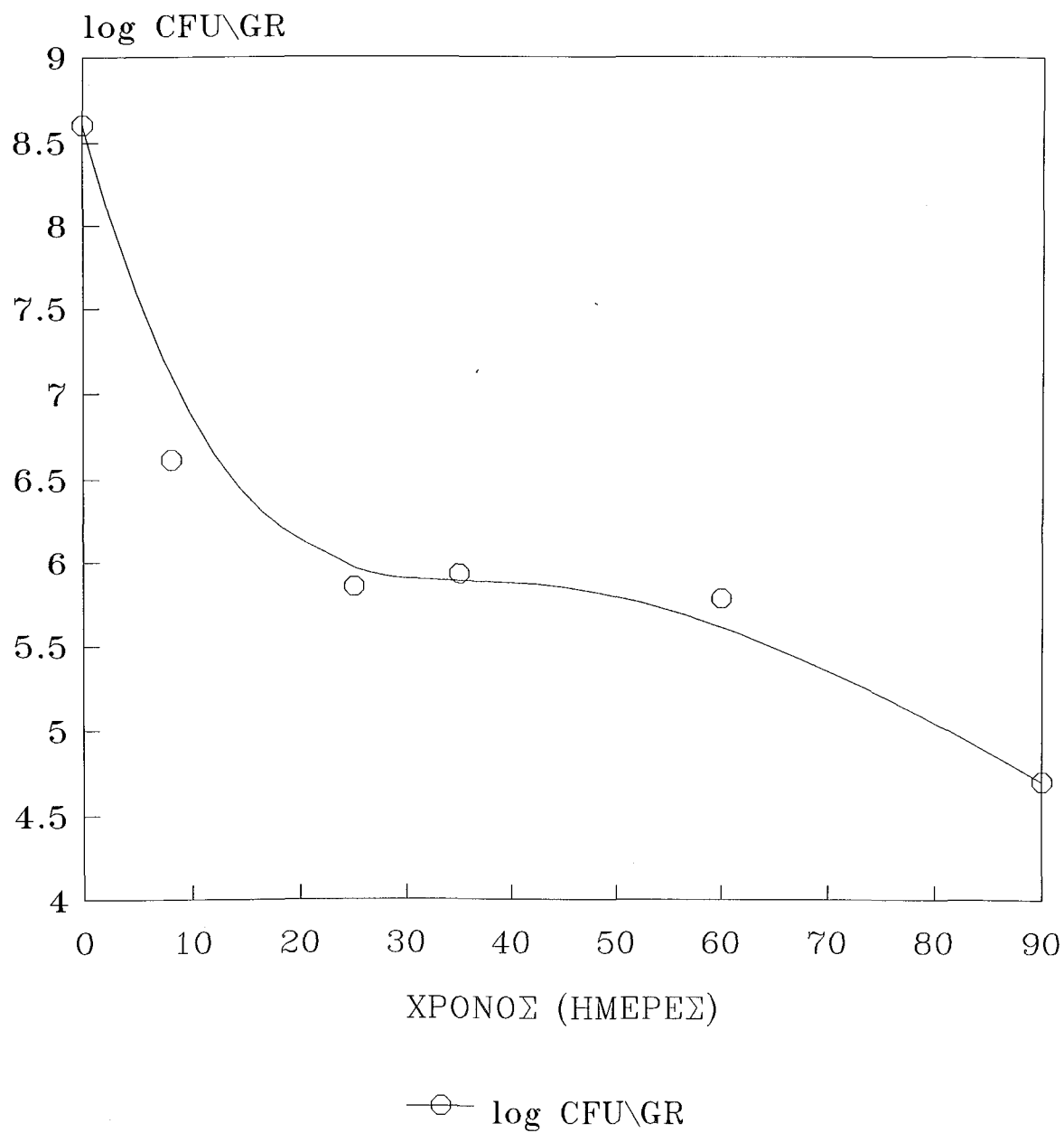
Στη διάρκεια της αποθήκευσης και σε τακτά διαστήματα αποσύρονταν ένα δοχείο από τη βαθεία κατάψυξη και εμβαπτίζονταν σε χλιαρό νερό μέχρι την απόψυξή του. Στη φάση αυτή καταμετρήθηκε το φορτίο σε RCA σε ανασερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια μετά από προσθήκη 100ml ζεστού νερού και 50g αλεύρου ολικής άλεσης το δοχείο τοποθετήθηκε σε επώαση στους 45°C. Όταν η υδαρής ζύμη είχε πλήρως διογκωθεί (4.5-5.0 h), παρασκευάστηκε το τελικό ζυμάρι με προσθήκη επι πλέον αλεύρου και ποσότητας NaCl. Το ζυμάρι αυτό τοποθετούνταν σε φόρμες αλουμινίου για την τελική διόγκωση με επώαση στην ίδια θερμοκρασία. Το ψήσιμο γίνονταν στους 200-210°C σε φούρνο με ανεμιστήρα για ομοιόμορφη κατανομή της

θερμοκρασίας επί 25-30 min. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε διάστημα συντήρησης 90 ημερών, πραγματοποιήθηκαν πέντε παρασκευές ψωμιού όπως αναφέρθηκε προηγουμένα με επιτυχία και με άριστα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Στο σχεδιάγραμμα 32 εμφανίζεται το φορτίο της καλλιέργειας εκκίνησης στο χρόνο μηδέν πριν από την τοποθέτηση στην κατάψυξη και μετά ανά διαστήματα, μέχρι και τις 90 μέρες της συντήρησης. Η καταμέτρηση του φορτίου γίνονταν μετά την πλήρη απόψυξη και πριν από τη διαδικασία παρασκευής του τελικού ζυμαριού. Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα η διαδικασία της κατάψυξης της καλλιέργειας εκκίνησης στους  $-80^{\circ}\text{C}$  παρά το γεγονός ότι έγινε σχετικά γρήγορα είχε σαν αποτέλεσμα μια άμεση μείωση του φορτίου από 8Log σε 6Log/gr. Στη συνέχεια όμως η μείωση του φορτίου μέχρι της 60 μέρες δεν είναι σημαντική ενώ στους 3 μήνες το φορτίο φαίνεται ότι έχει μειωθεί σημαντικά.



ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ  
(RCA-ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ) ΚΑΤΑΨΥΓΜΕΝΗΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΒΕ-89



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 32

Παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης και συντήρηση σε ψύξη και σε λυοφιλιωμένη μορφή.

Για την παρασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε αλεύρι ολικής άλεσης και η ίδια διαδικασία, όπως και στην περίπτωση της συντήρησης σε βαθεία κατάψυξη, μέχρι που ο όγκος του ζυμούμενου υποστρώματος έφθασε τα 2 λίτρα και η ζύμωσή του βρισκόταν σε έντονη φάση. Στη συνέχεια το περιεχόμενο των 2 λίτρων χωρίσθηκε σε 2 ίσα μέρη.

Το ένα λίτρο διανεμήθηκε σε 5 γυάλινα δοχεία με προσθήκη 130gr επι πλέον αλεύρου σε κάθε δοχείο. Δηλαδή σε όγκο 200ml η συνολική ποσότητα αλεύρου ήταν 150gr. Μετά απο καλή ανάμειξη με το καπάκι σε χαλαρό στρίψιμο, τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε επώαση στους 45°C. Σε δυο επι πλέον ώρες, οπότε το ζυμάρι μέσα σε δοχείο είχε διόγκωθεί και καλύψει τον όγκο του, τοποθετήθηκαν στους 2±2°C. Πριν απο την τοποθέτηση στο ψυγείο έγινε καταμέτρηση του pH, της οξύτητας και του μικροβιακού φορτίου σε RCA σε αναερόβιες συνθήκες.

Στη διάρκεια της συντήρησης και για 15 ημέρες, ανά διαστήματα αποσύρονταν ένα βάξο απο τη συντήρηση και τοποθετούνταν σε χλιαρό νερό για ανύψωση της θερμοκρασίας του περιεχομένου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια γίνονταν δειγματοληψία για προσδιορισμό του pH καθώς και του φορτίου σε R.C.A αναερόβια σε ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά στο περιεχόμενο του βάξου γίνονταν προσθήκη 50gr αλεύρου ολικής άλεσης και 150ml ζεστού νερού βρύσης, ακολουθούσε ομογενοποίηση του περιεχομένου και τοποθέτηση στους 42°C για διόγκωση του περιεχομένου ρευστού ζυμαριού. Η διαδικασία παρασκευής του ψωμιού ήταν ίδια όπως στην περίπτωση της συντήρησης σε κατάψυξη.

Το δεύτερο λίτρο του υποστρώματος μεταφέρθηκε σε ανοικτό αναξειδωτο δοχείο όπου έγινε προσθήκη 400gr επι πλέον αλεύρου ολικής άλεσης, ανάμειξη και τοποθέτηση στους 42°C για διόγκωση. Στη φάση της έντονης διόγκωσης το περιεχόμενο του δοχείου μοιράσθηκε σε δυο αναξειδωτους αβαθείς δίσκους λυοφιλικής που τοποθετήθηκαν στους -80°C για 20h περίπου.

Πριν από την τοποθέτηση στην κατάψυξη έγινε δειγματοληψία για προσδιορισμό pH, οξύτητας και συνολικού φορτίου σε R.C.A, σε αναερόβιες συνθήκες. Τελικά οι δυο δίσκοι τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης για 24h περίπου. Το Ξερό προϊόν συσκευάστηκε σε πλαστικές σακούλες υπο κενό για τη μελέτη της συμπεριφοράς στη διάρκεια της συντήρησης.

Ανά διαστήματα στο περιεχόμενο μιας σακούλας (100gr περίπου), γίνονταν προσθήκη 100ml αποστειρωμένου ζεστού νερού μέσα σε γυάλινο δοχείο. Στη φάση αυτή γίνονταν ανάδευση ομογενοποίηση και δειγματοληψία για τον προσδιορισμό του φορτίου σε RCA σε ατμόσφαιρα αζώτου όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις. Στη συνέχεια το δοχείο τοποθετούνταν για επώαση στους 42°C για την πρώτη διόγκωση και στην εν συνεχεία παρασκευή του τελικού ζυμαριού και του ψωμιού όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Στο σχεδιάγραμμα 33 εμφανίζεται η εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου στην καλλιέργεια εκκίνησης του BE KP 89 σε μορφή αραιού ζυμαριού, που συντηρήθηκε για 15 ημέρες σε απλή ψύξη. Στο διάστημα αυτό έγιναν πέντε παρασκευές ψωμιού με επιτυχία. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα το φορτίο που στο χρόνο μηδέν ήταν στο επίπεδο 8.5 Log/g μέχρι και τη δωδεκάτη μέρα της συντήρησης παρουσίασε μείωση περίπου 1.5 λογάριθμο. Στη συνέχεια μέχρι τις 15 μέρες μειώθηκε κατά 3 ακόμα λογαρίθμους. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το pH του ζυμαριού που στην αρχή της συντήρησης ήταν 5.1, αυξήθηκε στο 5.23 στο τέλος της συντήρησης, δηλαδή δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

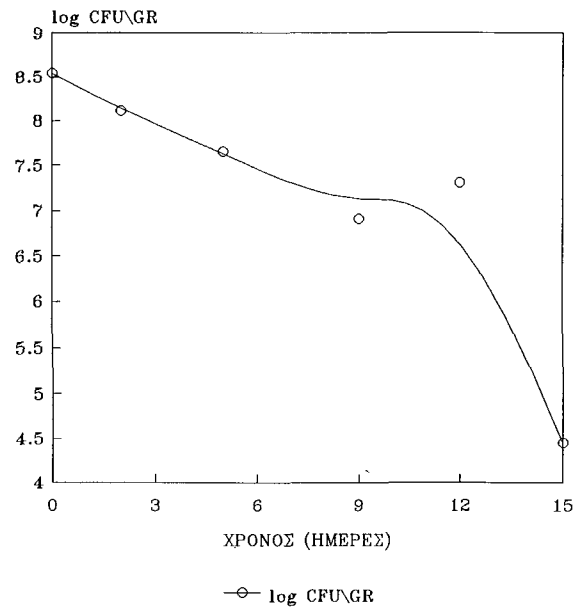
Από την καλλιέργεια εκκίνησης σε λυοφιλιωμένη μορφή που παρασκευάστηκε και συντηρήθηκε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έγιναν σε διάστημα συντήρησης τριών μηνών πέντε παρασκευές ψωμιού, με καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Το αρχικό φορτίο της μαγιάς αυτής πριν από την τοποθέτηση στην κατάψυξη και τη λυοφιλίωση που ακολούθησε προσδιορίστηκε στο επίπεδο 8log/gr περίπου δηλαδή όσο και της καλλιέργειας που συντηρήθηκε υπο ψύξη. Κατά τις πρώτες αρτοποιήσεις, στη δειγματοληψία που γίνονταν στο ανασυσταμένο ζυμάρι για τον προσδιορισμό του φορτίου σε RCA αναερόβια, δεν καταμετρήθηκε

κανένα φορτίο ακόμα και στις πρώτες αραιώσεις του δείγματος. Ο βάλκιλλος του επτάζυμου όμως υπήρχε γιατί από το ζυμάρι που γίνονταν η δειγματοληψία μετά από διόγκωση παρασκευάζονταν ψωμί με τα χαρακτηριστικά του επτάζυμου. Για το λόγο αυτό στις 45 και 90 ημέρες της συντήρησης, 25 gr αποξηραμένης καλλιέργειας αραιώθηκαν σε 250 ml αποστειρωμένο νερό μέσα σε κωνική φιάλη που τοποθετήθηκε σε επώαση στους 45°C. Κάθε ώρα γίνονταν δειγματοληψία για τον προσδιορισμό του φορτίου σε RCA αναερόβια.

Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα 34, μέχρι και τις δύο ώρες δεν καταμετρήθηκε κανένα φορτίο. Το φορτίο εμφανίζεται στις 3 ώρες σε επίπεδο 4.5 log/gr και στη συνέχεια αυξάνεται γρήγορα στις επόμενες ώρες της επώασης. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η μη καταμέτρηση φορτίου κατά τις πρώτες μετρήσεις, οφείλονταν στο γεγονός ότι η δειγματοληψία στο ζυμάρι γίνονταν αμέσως σχεδόν μετά την ανασύστασή του και δεν δίνονταν ο απαιτούμενος χρόνος στην αφυδατωμένη μορφή του BE ή και τα τυχόν σπόριά του, να ενεργοποιηθούν και να βλαστήσουν. Η στρώση σε ένα στερεό θρεπτικό υπόστρωμα στη συνέχεια δεν ευνοούσε την συνέχιση αυτής της διαδικασίας, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να καταμετρηθεί φορτίο. Συμπερασματικά στη λυοφιλιωμένη αυτή καλλιέργεια εκκίνησης, πρέπει να θεωρηθεί ότι υπάρχει ένα φορτίο του BE στο επίπεδο 4-5 log/gr.

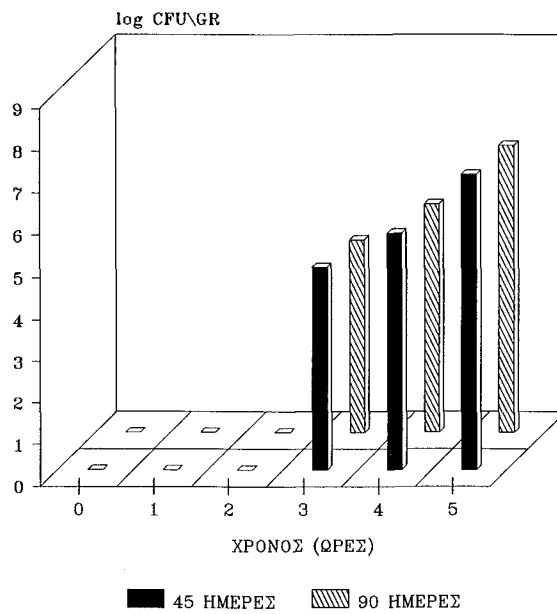
Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι μια καλλιέργεια εκκίνησης του BE KP 89 μπορεί να παρασκευασθεί με μία καθορισμένη διαδικασία σε υπόστρωμα αλεύρου ολικής άλεσης. Το διογκωμένο αραιό ζυμάρι που παρασκευάζεται τελικά, μπορεί να συντηρηθεί με απλή ψύξη για μικρό χρονικό διάστημα και με κατάψυξη ή λυοφιλίωση για μεγαλύτερη διάρκεια και να χρησιμοποιηθεί σαν "μαγιά" στην παρασκευή επτάζυμου.

ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ  
(RCA-ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ  
ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ-89 ΥΠΟ ΨΥΞΗ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 33

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΣΕ ΛΥΟΦΑΙΩΜΕΝΗ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΒΕ ΚΡ-89  
ΣΤΙΣ 45 ΚΑΙ 90 ΗΜΕΡΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 34

## ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟ "ΕΤΑΖΥΜΟ" ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΤΥΠΟ ΨΩΜΙΟΥ

Για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν ορισμένα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο επτάζυμο που παρασκευάζεται με τον παραδοσιακό τρόπο και με καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης καθώς επίσης στο ψωμί που παρασκευάζεται στους φούρνους της Αθήνας και στο εργαστήριο με καθαρή "μαγιά" αρτοποιίας.

Στα πλαίσια της παραπάνω μελέτης πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα:

1. Απο ρεβίθι εμπορίου έγινε παρασκευή "μαγιάς" με τον παραδοσιακό τρόπο μέσα σε μπουκάλι όπως περιγράφεται στον πρόλογο της μελέτης. Απο τα ρεβίθια αυτά έγινε επίσης πρόσφατη απομόνωση και καθαρισμός του ΒΕ όπως αναφέρεται στο σχετικό κεφάλαιο της μελέτης. Παρασκευάστηκε ψωμί στο εργαστήριο με καθαρή καλλιέργεια και με την παραδοσιακή "μαγιά" με την ίδια ακριβώς διαδικασία και αναλογίες συστατικών. Το αλεύρι που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα απο αλεύρι ολικής άλεσης και αλεύρι Νο.1 εμπορίου μύλων Αγίου Γεωργίου, σε σχέση 1:1. Το ψωμί αξιολογήθηκε οργανοληπτικά απο 17 άτομα με ένα τριγωνικό τεστ (triangle test) σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο που υπάρχει στο παράρτημα της μελέτης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δοκιμή αυτή έγινε δυο φορές όταν το ψωμί ήταν πρόσφατης παρασκευής καθώς επίσης και μετά απο δυο μέρες συντήρησης. Επίσης πραγματοποιήθηκαν ορισμένες φυσικοχημικές αναλύσεις. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε δυο επαναλήψεις.

Ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνονται στον πίνακα 22 και συγκεκριμένα το pH, την οξύτητα, τη ξηρά ουσία και τα ανάγοντα ζάχαρα, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του ψωμιού παρασκευάστηκε με παραδοσιακή "μαγιά" και με καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ. Τα αποτελέσματα της τριγωνικής δοκιμής που περιλαμβάνονται στον πίνακα 23 επιβεβαιώνουν ότι δεν υπάρχει οργανοληπτικά αντιληπτή διαφορά μεταξύ των παραπάνω ειδών ψωμιού. Επίσης

όπως φαίνεται στην εικόνα 1 όπου εμφανίζονται οι τομές των δυο ειδών ψωμιού, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ως προς το βαθμό διόγκωσης και τη δομή της ψίχας. Σημειώνεται η ομοιόμορφη και λεπτή κατανομή των πόρων στην ψίχα του ψωμιού (κυψέλωση), που είναι και χαρακτηριστική γενικά στο "επτάζυμο ψωμί".

Με το πείραμα αυτό διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στο "επτάζυμο" που παρασκευάζεται με τον παραδοσιακό τρόπο με καλλιέργεια εκκίνησης από ρεβίθι και στο "επτάζυμο" με παρασκευή από μια καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης του Βάκιλλου του Επτάζυμου που θα μπορούσε ίσως να χρησιμοποιηθεί και σε εμπορική ακόμα κλίμακα.

2. Παρασκευάστηκε ψωμί με καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ όπως προηγουμένως και ψωμί με αποξηραμένη "μαγιά" εμπορίου με τις ίδιες αναλογίες συστατικών. Στα δυο είδη ψωμιού έγιναν φυσικοχημικές αναλύσεις και οργανοληπτική αξιολόγηση σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο που περιλαμβάνεται στο παράρτημα της μελέτης.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 24 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών αναλύσεων, (μ.όροι 3 επαναλήψεων), υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς το pH την οξύτητα και τα ανάγοντα ζάχαρα. Συγκεκριμένα στο "επτάζυμο" διαμορφώνεται χαμηλότερη τιμή pH και υψηλότερη ογκομετρούμενη οξύτητα σε σύγκριση με το ψωμί από τη ζύμη αρτοποιίας. Επίσης τα ανάγοντα ζάχαρα εμφανίζονται με ελαφρώς υψηλότερη τιμή στο "επτάζυμο" και αυτό θα πρέπει να αποδοθεί κυρίως στην έντονη αμυλολυτική δράση του ΒΕ.

Ως προς το βαθμό προτίμησης σε κλίμακα αρεσκείας 7 σημείων, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων της αξιολόγησης. Αυτό σημαίνει ότι η προτίμηση των δοκιμαστών κατανεμήθηκε ομοιόμορφα μεταξύ των δυο ειδών ψωμιού.

Στο σχεδιάγραμμα 35 περιλαμβάνονται δύο χρωματογραφήματα από την ανάλυση των πτητικών λιπαρών οξέων στους δύο τύπους ψωμιού. Η ανάλυση έγινε σε υγρό χρωματογράφο της Perkin Elmer Sigma 3, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και

μέθοδοι. Όπως φαίνεται στο πρώτο χρωματογράφημα το οξείκό και βουτυρικό οξύ που είχαν προσδιορισθεί στα υγρά υποστρώματα ζύμωσης του ΒΕ, υπάρχουν και στο ψωμί και προφανώς επιδρούν σημαντικά στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής γεύσης του επτάζυμου. Η ποσοτική σχέση μεταξύ τους, όπως προκύπτει από την έκταση των δύο κορυφών, είναι 1:9. Αντίθετα, όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα Β, στο ψωμί με τη "ζύμη αρτοποιίας" δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες από αυτά αλλά και άλλα πτητικά λιπαρά οξέα.

Απο τα αποτελέσματα της τριγωνικής δοκιμής που περιλαμβάνονται στον πίνακα 25 είναι καταφανής η οργανοληπτική διαφορά μεταξύ των δυο ειδών ψωμιού. Απο τους 12 συνολικά δοκιμαστές οι 11 βρήκαν το διαφορετικό δείγμα και σημείωσαν ότι σε αυτό τους βοήθησε κυρίως η οσμή και μετά η γεύση.

Στην εικόνα 2 που περιλαμβάνει τα αντίγραφα των τομών του ψωμιού μπορεί να παρατηρηθεί η διαφορά στο μέγεθος και την κατανομή των πόρων, στην ψίχα του ψωμιού. Στο ψωμί απο "ζύμες" οι πόροι είναι συγκριτικά μεγαλύτεροι και περισσότερο ανομοιόμορφα κατανεμημένοι.

3. Παρασκευάστηκε ψωμί με καθарές καλλιέργειες απο διάφορες απομονώσεις του Βάκιλλου του Επτάζυμου και έγινε σύγκριση των οργανοληπτικών και φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά στελέχη απομονώσεις απο σπέρματα ρεβιθιών διαφορετικής προέλευσης, ακολουθήθηκε η αυτή διαδικασία παρασκευής του ψωμιού και χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες αναλογίες συστατικών. Όπως φαίνεται στον πίνακα 26 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών αναλύσεων δεν υπάρχουν γενικά σημαντικές διαφορές ως προς τα διάφορα χαρακτηριστικά. Η οξύτητα εμφανίζεται ελαφρώς υψηλότερη στο ψωμί απο ΒΕ ΚΡ 89 και 90 αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι σημαντική. Το ίδιο συμπέρασμα συνάγεται και απο τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης που περιλαμβάνονται στον πίνακα. Οι μέσοι όροι του βαθμού



προτίμησης δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Δεν υπάρχουν επίσης σημαντικές διαφορές ως προς το βαθμό διόγκωσης και την κατανομή των πόρων στη ψίχα των ψωμιών όπως φαίνεται στις εικόνες 3 και 4.

4. Τέλος πραγματοποιήθηκε μια σειρά αναλύσεων σε δείγματα ψωμιού από φούρνους διαφόρων περιοχών της Αθήνας καθώς και σε ορισμένα δείγματα οικιακών παρασκευών. Επίσης σε δείγματα επτάζυμο από φούρνους και δειγμάτων εργαστηρίου. Στους πίνακες 28 και 29 του παραρτήματος I, περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών.

Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 27 που περιλαμβάνει τους μέσους όρους και τις τυπικές αποκλίσεις των αναλύσεων, η τιμή του pH είναι σημαντικά χαμηλότερη και της οξύτητας σημαντικά υψηλότερη στο επτάζυμο σε σύγκριση με το ψωμί αρτοποιίας. Οι τιμές των αναγόντων σαχάρων δεν διαφέρουν σημαντικά. Όπως φαίνεται στον πίνακα 28 που περιλαμβάνει τα αναλυτικά αποτελέσματα των αναλύσεων ορισμένα δείγματα (2,5,7,13,16,18) παρουσίασαν πολύ υψηλό ποσοστό αναγόντων σαχάρων. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην προσθήκη κάποιας γλυκαντικής ουσίας κατά την παρασκευή του ψωμιού.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά "Επτάζυμου" ψωμιού από παραδοσιακή "μαγιά" από ρεβέθι και από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ

Είδος ανάλυσης	Ψωμί από παραδοσιακή "μαγιά"	Ψωμί από καθαρή καλλιέργεια	Διαφορά
pH	5.27	5.29	n.s
Οξύτητα *	5.90	6.20	n.s
Ξηρά ουσία %	62.20	61.70	n.s
Ανάγ. Ζάχαρα %	2.67	2.60	n.s

n.s = Μη σημαντική διαφορά

\* = Εκφράζεται σε ml N/10 NaOH για 10 gr ψωμιού

ΠΙΝΑΚΑΣ 23

Αποτελέσματα Τριγωνικής Δοκιμής (Triangle Test) για τη διαπίστωση διαφοράς μεταξύ ψωμιού από "μαγιά" από ρεβέθι και από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ

Συνολικός αριθμός δοκιμαστών	Αριθμός δοκιμαστών που βρήκαν το διαφορετικό δείγμα	Συμπέρασμα
17	6	n.s

n.s = Μη σημαντική διαφορά

ΠΙΝΑΚΑΣ 24

Φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά "Επτάζυμου" ψωμιού και ψωμιού από Ξερή μαγιά αρτοποιίας

Είδος ανάλυσης	Ψωμί από "Επτάζυμο"	Ψωμί από Ξερή μαγιά αρτοποιίας	Διαφορά
pH	5.30	5.75	**
Οξύτητα	5.85	3.40	**
Γαλακτικό mg/ml	0.22	0.14	-
Ξηρά ουσία %	64.10	62.60	n.s
Ανάγ. Ζάχαρα %	2.08	1.78	*
Hedonic	5.70	5.80	n.s

n.s = Μη σημαντική διαφορά

Οξύτητα = Εκφράζεται σε ml N/10 NaOH για 10 gr ψωμιού

\* \*\* = Σημαντικές διαφορές

Hedonic = Κλίμακα αρεσκείας 7 σημείων, με 7 6 5 μου αρέσει πάρα πολύ πολύ λίγο, 4 με αφήνει αδιάφορα και 3 2 1 δεν μου αρέσει λίγο πολύ πάρα πολύ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 25

Αποτελέσματα Τριγωνικής Δοκιμής (Triangle Test) για τη διαπίστωση διαφοράς μεταξύ "επτάζυμου" ψωμιού και ψωμιού από Ξερή μαγιά αρτοποιίας

Συνολικός αριθμός δοκιμαστών	Αριθμός δοκιμαστών που βρήκαν το διαφορετικό δείγμα	Συμπέρασμα
12	11	***

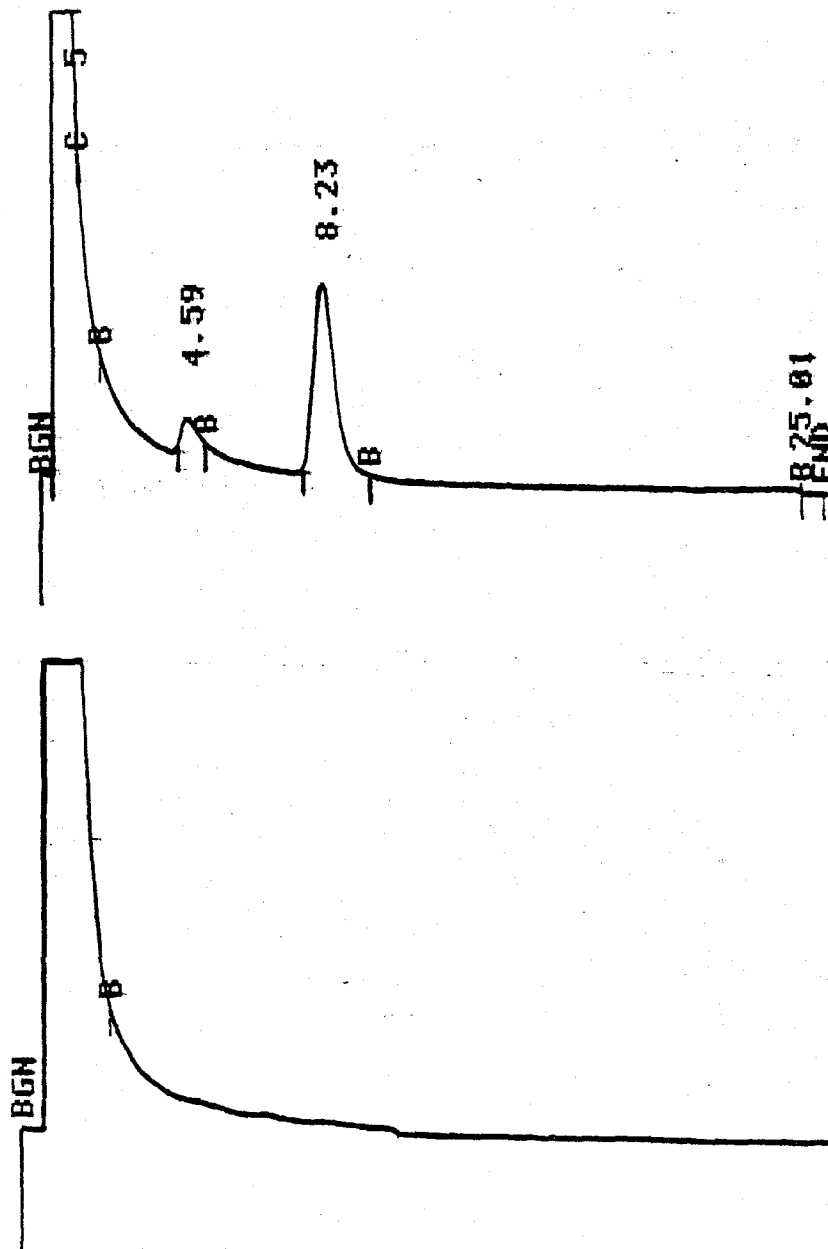
\*\*\* = Σημαντική διαφορά  $p=0.01$

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 35

Χρωματογράφημα πτητικών λιπαρών οξέων σε δείγματα ψωμιού.  
Στήλη 10% SP-1000 /1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> σε 100/120 Chromosorb W AW  
6ftx4mm γυάλινη, θερμοκρασία ισόθερμος 160°C, Ανιχνευτής  
ιονισμού φλόγας

A = Ψωμί με καθαρή καλλιέργεια του BE KP-89

B = Ψωμί με καθαρή Ζύμη αρτοποιίας



ΠΙΝΑΚΑΣ 26

Φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά "επτάζυμου"  
ψωμιού από διάφορα στελέχη του ΒΕ

Είδος ανάλυσης	Στέλεχος του ΒΕ				Διαφορά
	Κρ.1989	Κρ.1990	Λήμνου	Κορίνθου	
pH	5.22	5.20	5.18	5.17	n.s
Οξύτητα	4.60	4.65	4.45	4.55	n.s
Ξηρά ουσία	64.90	67.5	62.5	66.50	n.s
Ανάγ. ζάχαρα %	1.88	1.95	1.93	1.97	n.s
Hedonic	6.18	6.07	6.00	6.08	n.s

Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων

n.s = Μη σημαντικές διαφορές

Οξύτητα = ml N/10 NaOH για 10 gr ψωμιού.

Hedonic = Κλίμακα αρεσκείας 7 σημείων, με 7 6 5 μου αρέσει πάρα πολύ-πολύ-λίγο, 4 με αφήνει αδιάφορο και 3 2 1 δεν μου αρέσει λίγο-πολύ-πάρα πολύ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 26

Μέσοι όροι τιμών Ξηράς ουσίας, pH, ογκομετρούμενης οξύτητας και αναγόντων ζαχάρων δειγμάτων ψωμιού από φούρνους διαφόρων περιοχών της αθήνας και δειγμάτων επτάζυμου.

Είδος ανάλυσης	Ψωμί αρτοποιίας		Ψωμί επτάζυμο		Διαφορά
	X	SD	X	SD	
Ξηρά ουσία	64.50	4.13	65.20	4.14	n.s
pH	5.51	0.17	5.18	0.09	*
Οξύτητα %	4.48	0.89	6.74	1.45	*
ανάγ. ζάχαρα %	3.31	1.11	3.28	0.45	n.s

Οξύτητα και ανάγοντα ζάχαρα επί Ξηρού βάρους

X = Μέσος όρος

SD = Τυπική απόκλιση

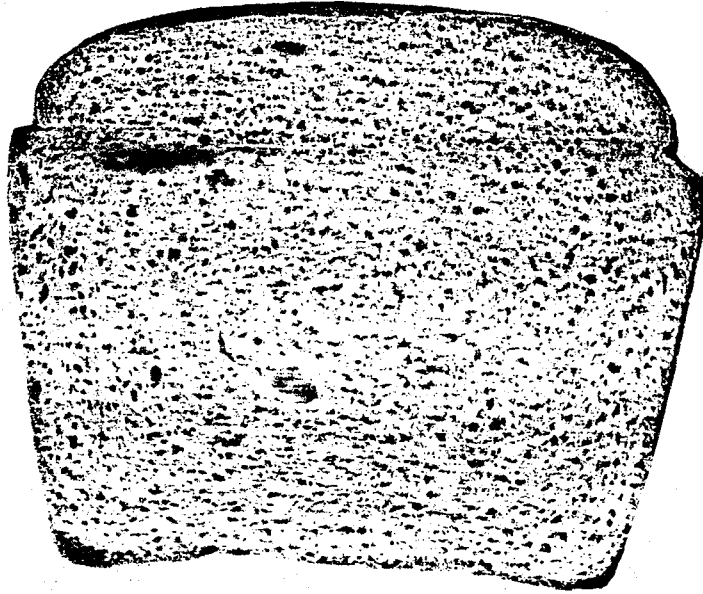
n.s = Μή σημαντική διαφορά

\* = Σημαντική διαφορά

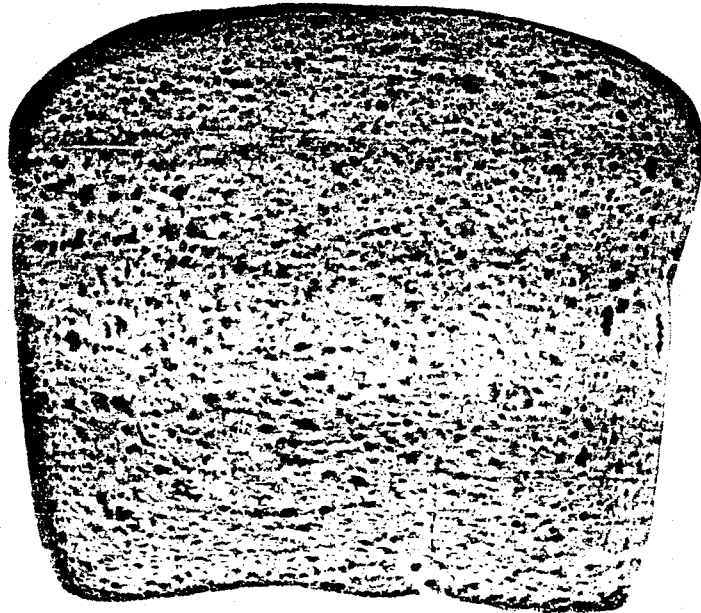
ΕΙΚΟΝΑ 1

Φωτοαντίγραφο τομής ψωμιού από παραδοσιακή "μαγιά"  
από ρεβίθι (Α) και από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ (Β)

A



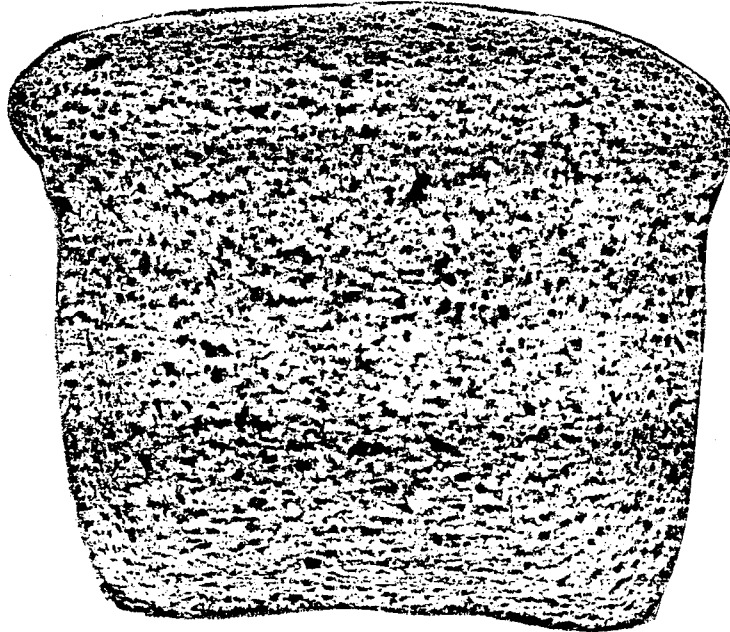
B



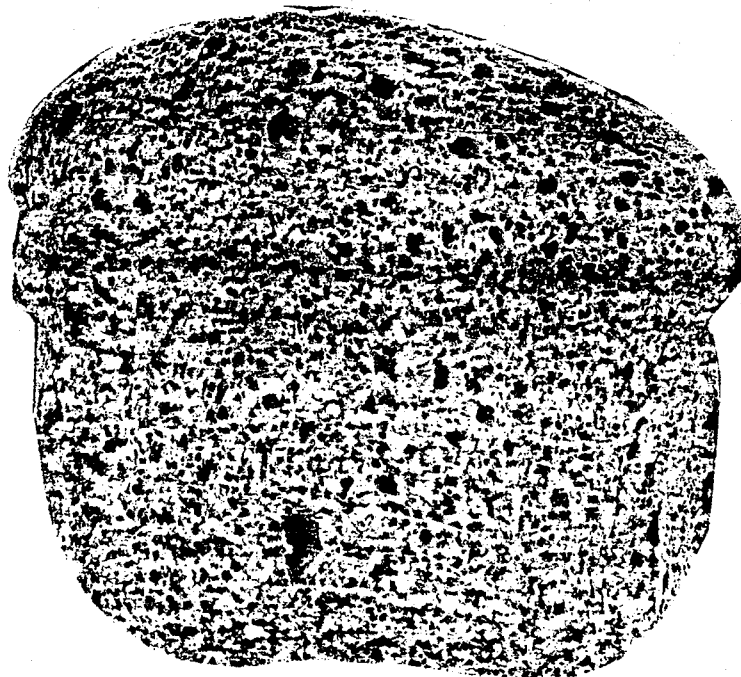
ΕΙΚΟΝΑ 2.

Φωτοαντίγραφο τομής ψωμιού από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ (Α) και από ξηρή (λυοφιλιζέ) μαγιά αρτοποιίας (Β)

A



B

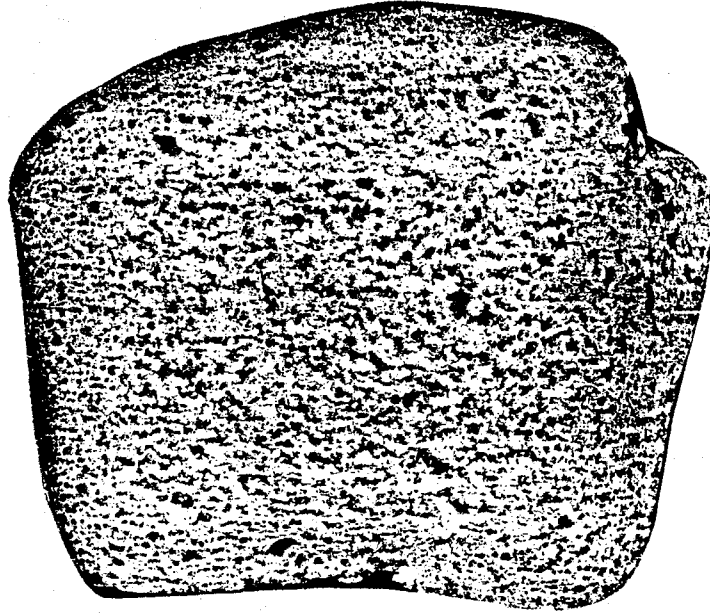




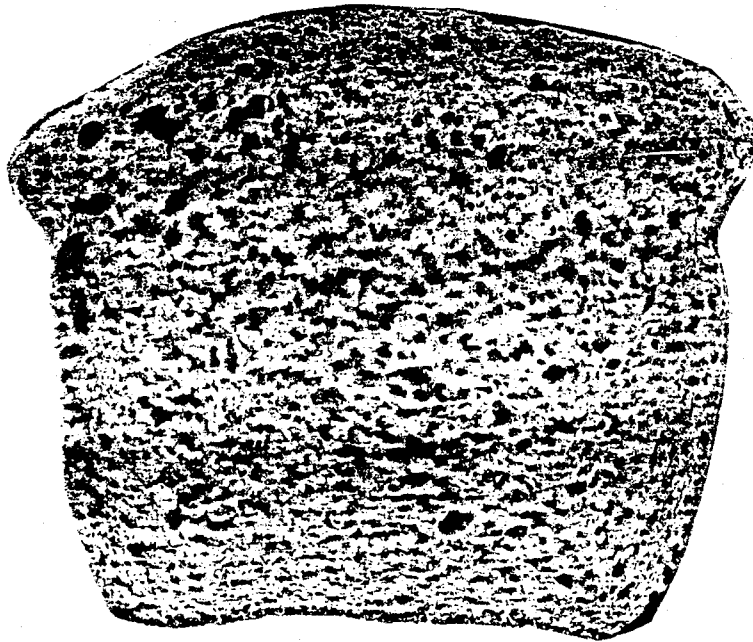
ΕΙΚΟΝΑ 3

Φωτοαντιγράφο τομής ψωμιού από καθαρή καλλιέργεια του  
BE KP-89 (A) και από καθαρή καλλιέργεια του BE<sup>+</sup> KP-90'

A



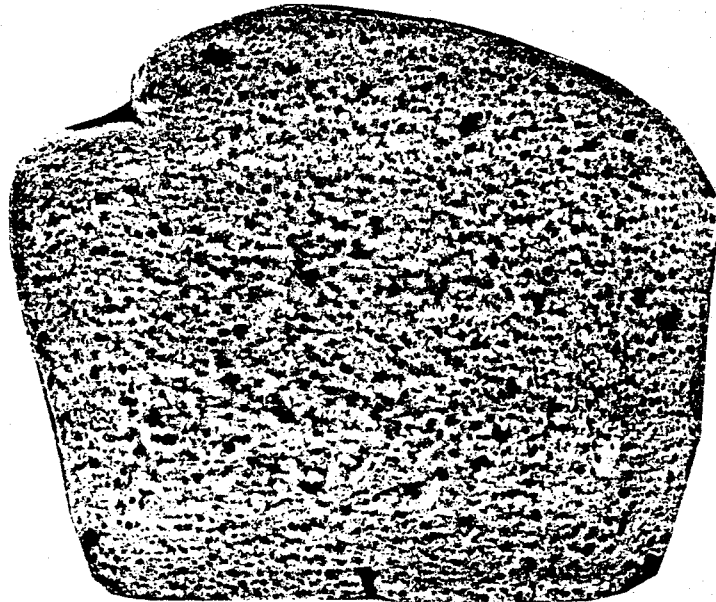
B



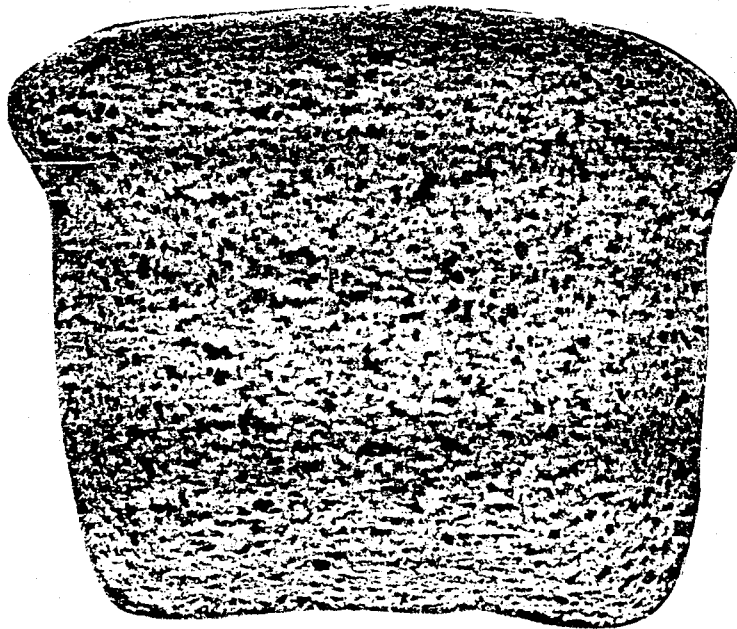
ΕΙΚΟΝΑ 4

Φωτοαντίγραφο τομής ψωμιού από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ  
ΛΗΜΝΟΣ (Γ) και από καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ ΚΟΡΙΝΘΟΣ (Δ)

A



B



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα βασικά συμπεράσματα αυτής της ερευνητικής εργασίας όπως προκύπτουν από τα αποτελέσματα και τη συζήτηση που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια είναι τα εξής:

Η ζύμωση του αλεσμένου ρεβιθιού σε νερό με μικρή ποσότητα χλωριούχου νατρίου όπως γίνεται στην πράξη από τους αρτοποιούς για την παρασκευή του "επτάζυμου", επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και ως προς την εξέλιξη των τιμών του pH και της Οξύτητας και κυρίως ως προς την εξέλιξη της αναερόβιας μικροχλωρίδας (Βάκιλλος Επτάζυμου) που παίζει και τον αποφασιστικό ρόλο για το είδος αυτό του ψωμιού. Θερμοκρασίες από 42-45°C θεωρούνται ιδανικές στην περίπτωση αυτή για τη σωστή εξέλιξη της ζύμωσης και την επικράτηση της επιθυμητής μικροχλωρίδας.

Στη μικροχλωρίδα που αναπτύχθηκε κατά τη ζύμωση ρεβιθιών στους 37°C, δεν βρέθηκαν ζύμες και αρνητικά κατά Gram βακτήρια (εντεροβακτήρια, κολιβακτήρια, ψευδομονάδες).

Στην αερόβια μικροχλωρίδα επικρατούν είδη του γένους *Bacillus* και δευτερευόντως εμφανίζονται είδη του γένους *Lactobacillus*, *Corynebacterium* και *Micrococcus*.

Στην αναερόβια μικροχλωρίδα επικρατεί ένα είδος θετικού κατά Gram βακτηρίου, ο βάκιλλος του επτάζυμου (BE), που ανήκει στο γένος *Clostridium* και είναι το μοναδικό μέλος της μικροχλωρίδας που παράγει αέριο. Περιστασιακά στην αναερόβια χλωρίδα εμφανίζεται και κόκκος σε αλυσίδες θετικός κατά Gram που ανήκει στο γένος *Pediococcus*.

Η τυχόν επικράτηση κόκκων στη μικροχλωρίδα σε βάρος του BE, έχει σαν αποτέλεσμα την εκτροπή της ζύμωσης και μη παραγωγή του επτάζυμου. Στο γεγονός αυτό οφείλονται οι περιστασιακές αποτυχίες που παρατηρήθηκαν στην παραγωγή του επτάζυμου σε εμπορικό φούρνο της Αθήνας.

Ο βάκιλλος του επτάζυμου απομονώθηκε τόσο από τη μικροχλωρίδα των σπερμάτων του ρεβιθιού όσο και από διογκωμένο ζυμάρι από εμπορικό φούρνο που παράγει επτάζυμο και από διογκωμένο ζυμάρι με "μαγιά" που είχε παρασκευασθεί

στο εργαστήριο.

Ο βάκιλλος του επτάζυμου είναι θετικός κατά Gram μη κινούμενος σε ραβδοειδή μορφή, μονός ή κατά ζεύγη που παρουσιάζει μέσα στο κυτταρόπλασμα έντονα μεταχρωματικά κοκκία (ψευδοπυρήνες) που φαίνονται εντονότερα σε γηρασμένα κύτταρα. Επίσης σχηματίζει εξωκυτταρική στοιβάδα που αποτελείται κυρίως από πολυσαχαρίτες και περιβάλλει το κύτταρο (capsule).

Σε υγρά υποστρώματα αναπτύσσεται στο βάθος ενώ σε στερεά απαιτεί επώαση κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Δεν έχουν παρατηρηθεί σπόρια από το BE τόσο σε συνηθισμένα θρεπτικά υποστρώματα όσο και σε εκλεκτικά που χρησιμοποιήθηκαν για αποριογονία. Εν τούτοις ο BE θεωρήθηκε αποριογόνος επειδή επέζησε σε θερμικούς χειρισμούς (85°C για 10min) που θεωρούνται καταστρεπτικοί για τις βλαστικές μορφές των μικροοργανισμών.

Ο BE απομονώθηκε τόσο από ρεβίθια όσο και από σπέρματα άλλων δημητριακών και οσπρίων και φαίνεται ότι είναι κοινός μικροοργανισμός στη φύση που υπάρχει πιθανόν στο έδαφος. Επιζεί πάνω στα ξερά σπέρματα διαφόρων φυτών και το ρεβίθι φαίνεται ότι δεν είναι η αποκλειστική πηγή της προέλευσής του. Όλα τα στελέχη του BE που απομονώθηκαν από διάφορες πηγές παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά κατά τη ζύμωση υγρού υποστρώματος RCM και παράγουν κυρίως βουτυρικό οξύ και δευτερευόντως οξικό και γαλακτικό.

Η μελέτη των πρωτεϊνών του κυττάρου των διαφόρων απομονώσεων του BE, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδικό ζελέ, έδειξε μεγάλες ομοιότητες στο ηλεκτροφορητικό τους προφίλ και είναι ισχυρή ένδειξη ότι πρόκειται για στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού.

Η μελέτη της δυνατότητας χρησιμοποίησης διαφόρων πηγών άνθρακα από τα διάφορα στελέχη του BE με χρησιμοποίηση των τυποποιημένων API system S.A απέδειξε ομοιότητες αλλά και μικροδιαφορές μεταξύ τους ως προς το είδος και τον αριθμό των υδατανθράκων που μπορούν να ζυμώσουν. Πάντως όλα τα στελέχη ζυμώνουν την πεντόζη, ριβόζη της εξόζης, γαλακτόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, ραμνόζη και τους διζαχαρίτες μαλτόζη,

λακτόζη, μελιβιόζη, ζαχαρόζη και τρεχαλόζη. Επίσης όλα τα στελέχη ζυμώνουν το άμυλο.

Με βάση τα αποτελέσματα του συστήματος API και άλλες βιοχημικές δοκιμές σύμφωνα με τις κλείδες του Bergey 1989, το στέλεχος του BE ΚΡΗΤΗΣ 1989 ταυτοποιήθηκε στο είδος *C. perfringens*. Ο BE ΚΡ-89 είναι πιθανόν νέο μη σποριογόνο και μη τοξινογόνο στέλεχος του είδους αυτού. Σημειώνεται όμως η παραδοχή αυτή πρέπει να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτη κυρίως από γενετική σκοπιά.

Η μελέτη της ανάπτυξης του στελέχους BE ΚΡ-89 σε θερμοκρασίες από 15-50°C έδειξε τα εξής: Στους 15°C δεν αναπτύσσεται. Η ανάπτυξη αρχίζει με πολύ βραδύ ρυθμό στους 25°C και συνεχώς αυξανόμενο στους 32, 37, και 42°C. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 42-45°C. Στους 50°C η ανάπτυξη περιορίζεται σημαντικά.

Ο BE ΚΡ 89 ζυμώνει τα ζάχαρα ζαχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, γαλακτόζη και το άμυλο και παράγει κυρίως βουτυρικό οξύ και δευτερευόντως οξείκό και γαλακτικό. Επίσης παράγει άφθονο αέριο τόσο κατά την ανάπτυξη στο φυσικό υποστρώμα από ρεβίθι όσο και στο υγρό υπόστρωμα RCM. Η συνολική παραγωγή αερίου στο υπόστρωμα RCM με επίπεδο γλυκόζης 1%, βρέθηκε γύρω στα 200ml ανά γραμμάριο γλυκόζης σε θερμοκρασία ζύμωσης 42°C και θερμοκρασία χώρου γύρω στους 25°C. Ο ρυθμός παραγωγής αερίου σε αυτήν τη θερμοκρασία ζύμωσης, αυξάνει συνεχώς μέχρι τις 5 ώρες που φθάνει και τη μέγιστη τιμή. Ως προς το είδος των αερίων που παράγονται κατά τη ζύμωση βρέθηκε ότι είναι κυρίως διοξείδιο του άνθρακα και δευτερευόντως υδρογόνο σε μια αναλογία 4:1.

Η ανάπτυξη του BE σε υπόστρωμα RCM με αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl έδειξε ότι αναπτύσσεται με ταχύ ρυθμό σε επίπεδο 0.5%. Ο ρυθμός ανάπτυξης αρχίζει να μειώνεται σταδιακά από επίπεδο 2% μέχρι και 4%. Σε επίπεδο 5% δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη.

Υπόστρωμα αλεύρου ολικής άλεσης σε μορφή εναιωρήματος σε επίπεδα 5 και 10% και χλωριούχο νάτριο 0.5% χωρίς καμία άλλη προσθήκη έδωσε άριστα αποτελέσματα για την ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας του BE. Στο επίπεδο 10% ο ρυθμός

ανάπτυξης είναι ελαφρώς μεγαλύτερες και οι ποσότητες βουτυρικού και οξείκου οξέος που παράγονται είναι μεγαλύτερες σε σύγκριση με το επίπεδο 5%. Το υπόστρωμα αλεύρου είναι εύχρηστο, χαμηλής τιμής και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πράξη για την παρασκευή καλλιέργειας εκκίνησης του ΒΕ. Το υπόστρωμα μελάσας που μελετήθηκε δεν έδωσε καλά αποτελέσματα.

Συνεχόμενη καλλιέργεια του ΒΕ ΚΡ 89 σε εναιώρημα αλεύρου 10% και 0.5% NaCl, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία επί 12 ημέρες στο εργαστήριο. Η τεχνική αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην πράξη στην παρασκευή του επτάζυμου.

Με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος αλεύρου ολικής άλεσης παρασκευάστηκε με μια ορισμένη διαδικασία καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης του ΒΕ ΚΡ 89 που συντηρήθηκε υπο απλή ψύξη, κατάψυξη και λυοφιλίωση. Η διάρκεια της συντήρησης της καλλιέργειας υπο απλή ψύξη στους 2-4°C ήταν 15 ημέρες στη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκαν 6 παρασκευές ψωμιού με επιτυχία. Το φορτίο της "μαγιάς" αυτής μειώθηκε σταδιακά μέχρι και τις 12 μέρες της συντήρησης. Η "μαγιά" υπο κατάψυξη συντηρήθηκε για 90 ημέρες στους -80°C. Στο διάστημα αυτό έγιναν με επιτυχία 5 παρασκευές επτάζυμου ψωμιού.

Λυοφιλιωμένη καλλιέργεια του ΒΕ σε εναιώρημα αλεύρου έχει επίσης συντηρηθεί για 3 μήνες και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε παρασκευή επτάζυμου ψωμιού.

Το ψωμί που παρασκευάστηκε με παραδοσιακή "μαγιά" από ρεβίθι δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με ψωμί που παρασκευάστηκε με καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ ως προς ορισμένα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επομένως μια καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης του ΒΕ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε εμπορική κλίμακα για την παρασκευή του επτάζυμου.

Επίσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε επτάζυμο που παρασκευάστηκαν από καθαρές καλλιέργειες διαφόρων στελεχών του ΒΕ. Αντίθετα παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς το pH την οξύτητα και τα ανάγοντα ζάχαρα μεταξύ ψωμιού που παρασκευάστηκε με καθαρή καλλιέργεια του ΒΕ και

ψωμιού απο αποξηραμένη "μαγιά" (Magic) εμπορίου. Επίσης οι διαφορές μεταξύ των δυο αυτών ειδών ψωμιού έγιναν αντιληπτές από τους δοκιμαστές κυρίως ως προς την οσμή και τη γεύση, σένα τριγωνικό τέρστ που πραγματοποιήθηκε.

Εκτός από τις οργανοληπτικές διαφορές μεταξύ επτάζυμου και του κοινού ψωμιού της αρτοποιίας, υπάρχουν επίσης σημαντικές διαφορές και ως προς ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα στο επτάζυμο παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές pH και υψηλότερες οξύτητας καθώς και ελαφρώς μεγαλύτερο επίπεδο αναγόντων ζαχάρων, σε σύγκριση με τον παραδοσιακό τύπο ψωμιού.

Τέλος τα πτητικά λιπαρά οξέα βουτυρικό και οξείκό που προσδιορίσθηκαν στο επτάζυμο, πρέπει να συνεισφέρουν σημαντικά στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής του γεύσης. Δεν διαπιστώθηκε η παρουσία των οξέων αυτών στο κοινό ψωμί αρτοποιίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φυσική μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται κατά τη ζύμωση αλεσμένων ρεβιθιών μέσα σε νερό, χρησιμοποιείται στην Ελλάδα σαν καλλιέργεια εκκίνησης για την παρασκευή ενός παραδοσιακού τύπου ψωμιού που ονομάζεται "επτάζυμο" και έχει ιδιαίτερα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Στην έρευνα αυτή μελετήθηκε η μικροχλωρίδα αυτής της φυσικής ζύμωσης, με βασικό σκοπό την απομόνωση και αναγνώριση των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη διάγνωση του ζυμαριού και για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ψωμιού αυτού.

Κατά τη ζύμωση ρεβιθιών στους 37°C δεν απομονώθηκαν ζύμες και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Στην αερόβια μικροχλωρίδα επικρατούν διάφορα είδη του γένους *Bacillus*. Είδη *Lactobacillus*, *Corynebacterium* και *Micrococcus* απομονώθηκαν επίσης από τρυβλία με Ρ.Ο.Α και Ρ.Ο.Α σε αερόβιες συνθήκες.

Ενας θετικός κατά Gram ραβδόμορφος βάκιλλος που παράγει αέριο απομονώθηκε σε Ρ.Ο.Α κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Ο ίδιος βάκιλλος απομονώθηκε επίσης από διαλογμένο ζυμάρι εμπορικού φούρνου που παράγει επτάζυμο καθώς και από διαλογμένο ζυμάρι επτάζυμου που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Καθαρή καλλιέργεια από αυτόν το βάκιλλο χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή ψωμιού με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του επτάζυμου και επιβεβαιώθηκε η συνεισφορά του στη διάγνωση του ζυμαριού και την ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης. Σπόρια δεν παρατηρήθηκαν σε αυτόν το βάκιλλο ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκαν ειδικά υποστρώματα σποριογονίας. Εν τούτοις ο μικροοργανισμός επέζησε μετά από τη θέρμανση των σπερμάτων του ρεβιθιού στους 85°C για 5min, όπου καταστρέφονται οι βλαστικές μορφές των μικροοργανισμών και βάση αυτής της δοκιμής θεωρήθηκε σποριογόνος.

Τα κύτταρα του βακίλλου αυτού σε Ρ.Ο.Μ είναι ραβδόμορφα μη κινούμενα με εσωτερικά μεταχρωματικά κοκκία και εξωκυτταρική κάψουλα. Καλλιέργεια σε υγρό υπόστρωμα Ρ.Ο.Μ σχηματίζει έντονο επιφανειακό αφρισμό και διαμορφώνει τιμή pH 4.4-4.6 μετά από 20h στους 42°C. Η άριστη θερμοκρασία



ανάπτυξης είναι 42°C. Δεν αναπτύσσεται στους 15°C και στους 50°C η ανάπτυξη περιορίζεται σημαντικά.

Η ανάπτυξη φαίνεται ότι ευνοείται σε 0.5% NaCl, περιορίζεται σε 2% και παρεμποδίζεται εντελώς σε επίπεδο 5%. Η ζαχαρόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η λακτόζη και το άμυλο ζυμώνονται και παράγεται κυρίως βουτυρικό και δευτερευόντως οξείκό και γαλακτικό οξύ. Επίσης παράγεται μεγάλη ποσότητα αερίου που αποτελείται από διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο σε σχέση 4:1.

Με τη χρησιμοποίηση του συστήματος API20A και άλλων βιοχημικών δοκιμών, ο βάκιλλος αυτός ταυτοποιήθηκε σαν *Clostridium perfringens*.

Διαφορετικά στελέχη από τον παραπάνω μικροοργανισμό απομονώθηκαν από σπέρματα ρεβιθιών διαφορετικής προέλευσης καθώς και δημητριακών και οσπρίων. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες στα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά και στο πρωτεϊνόγραμμα του κυττάρου με ηλεκτροφόρηση.

Παρασκευάστηκε καθαρή καλλιέργεια εκκίνησης του βακίλλου του επτάζυμου σε υπόστρωμα αλεύρου ολικής άλεσης 10% και 0.5% NaCl. Αυτή η καλλιέργεια συντηρήθηκε με ψύξη (2-4°C) για 14 ημέρες και με κατάψυξη και λυοφιλίωση για 3 μήνες.

Μεταξύ του "επτάζυμου" και του κοινού ψωμιού αρτοποιίας βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα οργανοληπτικά και ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Τα πτητικά λιπαρά οξέα βουτυρικό και οξείκό που προσδιορίστηκαν στο επτάζυμο, πρέπει να συνεισφέρουν σημαντικά στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής του γεύσης. Επίσης στο Επτάζυμο η τιμή του pH είναι χαμηλότερη και της οξύτητας υψηλότερη σε σύγκριση με τον παραδοσιακό τύπο ψωμιού.

## SUMMARY

The natural microflora from fermented Chickpea seeds (*Cicer arietinum*) has been used in Greece as starter for the production of a traditional type of bread with special organopeptic characteristics named "Eptazymo".

The microflora of this natural fermentation was studied in this project. The main purpose was to examine the microbial association and to identify the microorganisms which were responsible for the leavening and the quality characteristics of this type of bread.

Gram negative bacteria and yeasts were not isolated during fermentation at 37°C. *Bacillus* spp were found to be dominant in plates incubated aerobically. Species of *Lactobacillus*, *Corynebacterium* and *Micrococcus* were also isolated.

A gram positive, gas producing rod was isolated under anaerobic conditions in Reinforced Clostridium Agar. Gas production was not observed in any other member of the microflora. The same microorganism was also isolated from a commercial dough used for "eptazymo" production and from a similar one prepared in laboratory. A pure culture from this microorganism was used successfully for "Eptazymo" production and so its main contribution to dough leavening and flavor development was confirmed.

Using API 20A system and other biochemical tests this microorganism was characterized as *Clostridium perfringens*. Spores were not seen in vivo or in the usual in vitro conditions even when different sporulation media were used. However the microorganism survived a thermal treatment at 85°C for 5 min. Cells in Reinforced Clostridium Medium appeared as straight rods, nonmotile with internal granules and extracellular capsules. Cultures in the same broth were turbid with a ropy sediment and have a pH of 4.4-4.6 after incubation for 20h at 42°C. The temperature for optimum growth was found to be 42°C. Growth was not observed at 15°C and it was restricted at 50°. Growth was favored by 0.5%

NaCl but inhibited by 2% and stopped completely by 5%. Sucrose, glucose, fructose, Lactose, Galactose and starch were fermented and butyric, acetic and lactic were the main fatty acids produced during fermentation.

The gas produced in RCM broth (200 ml per gr Glucose) was composed by CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in a proportion 4:1.

Different strains of the above species were isolated from Chickpea seeds, cereals and legumes with significant similarities in their biochemical characteristics and their electrophoretic internal cell protein pattern.

A starter culture for "Eptazymo" production was successfully prepared by using as culture substrate, flour of 100% extraction rate in a dispersion form in water with 0.5% NaCl. The starter was preserved under refrigeration (2-4°C) for two weeks and under deep freezing and lyophilization for 3 months.

Organoleptic differences were found between "Eptazymo" and commercial bread from yeasts. It is believed that butyric and acetic acid which were determined in "Eptazymo", contribute significantly in taste and aroma development.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALIYA, S. AND GEERVANI, P. 1981. An assessment of the protein quality and vitamin B content of common used fermented products of legumes and millets. *J.Sci.Food Agric.*32:837.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1972. 13th ed. APHA Inc. New York p 63.
- ANGEL, A.R. AND DEL, S.A. 1978. Nutritional evaluation of cereal legume mixtures using normal and genetically improved cereals and chickpea. *Int.Cong.Food Sci. Techol. Abstr.*p 285.
- ANGELLOTTI, R.H.E., HALL, M.J., FOTER, K. AND LEWIS, K.H. 1962. Quantitation of *C. perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*10:193.
- ASHENAFI, M. AND BUSSE, M. 1991. The microflora of soak water during tempeh production from various beans. *J. of Applied Bacter.*70:334.
- AU, P.N., AND FIELDS, M.L. 1981. Nutritive quality of fermented foods. *J.Food Sci.* 46: 652.
- AZAR, M., TER-SARKISSIAN, N., GHAVIFEK, H., FERGUSON, T. AND GHASSEMI, H. 1977. *J.Fd.Sci.Techol. (India).* 14:251.
- AZHAR, S., SRIVASTAVA, A.K. AND KRISHNAMURTI, C.R. 1972. Compositional changes during germination of *Cicer arietinum*. *Phytochemistry* 11:3173.
- BARBER, S. ET AL. 1983. Microflora of the sour dough of wheat flour bread. I. Identification and functional properties of microorganisms of industrial sour doughs. *Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos* 23:552.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. 1989. Ed. by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, vol. 1-5. E. Gato, W.L. George and S.M. Finegold, p.1141, The Genus *Clostridium*.

- BURROWS, S. 1970. In "The yeasts" ( A.H.Rose and J. S. Harrison,eds) 3,p.349 Academic Press,London.
- CHAVAN, J.K., JAWALE, H.K., SHERE, D.M., JADHAV, S.J. & KADAM, S.S. 1983. Effect of presoak treatments on the cooking quality of legume seeds, Indian Food Packer. 37:78.
- CHAVAN, J.K., SHERE, D.M., JAWALE, H.K. AND SALUNKHE, D.K. 1983. Effects of soak treatment to legume seeds on the cooking quality of resultant dhal. India J.Nutr.Diet. 20:249.
- CHAVAN, J.K. AND KADAM, S.S. 1989. Nutritional improvement of cereals by fermentation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 28:349.
- CHAVAN, J.K. AND SALUNKHE, D .K.1986. Biochemistry and Technology of chickpea (*Cicer Arietinum*) seeds. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 25:107.
- CHAVAN, U.D., CHAVAN, J.K., AND KADAM, S.S. 1988. Effect of fermentation on soluble proteins and in vitro protein digestibility of sorghum, green gram and sorghum-green gram blends. J.Food Sci. 53:1574.
- COLLINS, C.H. AND LYNE, P.M. 1979 . Microbiological Methods 4th ed. Butterworths London U.K.Chapter 9:167.
- COWAN, J.W., ESFAHANI, M., SALJI, J.P. & NAHAPETIAN, A.1967. Nutritive value of Middle East Foods.III.Physiological availability of iron in selected foods common to the Middle East. J.Sci.Food Agric. 18:227.
- DANIEL, V.A., DESAI, B.L.M., URS, T.S., VENKATARAO, S., SWAMINATHAN, M. AND PARPIA, H.A.B. 1968. The supplementary value of Bengal gram, red gram and soybean as compared with milk powder to poor Indian diets based on ragi, kaffir corn and pearl millet. Indian J.Nutr.5:283.
- DANIEL, V.A., LEELA, R., URS, T.S., VENKATARAO, S., RAJALAKSHMI, D., SWAMINATHAN, M. AND PARPIA, H.A.B. 1965. The supplementary value of the proteins of soybean as compared with those of Bengal gram, red gram and skim milk powder to poor Indian diet based on the rice and wheat. J.Nutr. 2:128.

- DAVID, I.M. AND VERMA, J. 1981. Modification of Tempeh with the addition of Bakla (*Vicia faba*). *J. Food Techn.* 16:39.
- DORAISWAMY, T.R., DANIEL, V.A. AND SWAMINATHAN, M. 1969. Effect of supplementary protein food based on a blend of cotton seed, groundnut and Bengal gram flours and fortified with vitamins and minerals on the growth, nutritional status, and nitrogen balance in children subsisting on poor kaffir corn diet. *J. Nutr. Diet.* 6:336.
- DREWS, E. 1971. *Brot Geback* .25:1.
- DREWS, E. & STEPHAN, M. (1956). *Brot Geback* 10,1-4.
- DRUCE, R.G., BEBBINGTON, N.N., ELSON, K., HARCOCMBE, J.M. AND THOMAS, S.B. 1957. *J. Appl. Bacteriol.* 20:1.
- DRUCKER, D.B. AND TAVAKKOL, A. 1985. *Chemical Methods In Bacterial Systematics—Chromatographic Analysis of Volatile End Products of Gram-positive Bacteria.* Booked by M. Coodfellow and Minnikin, D.E, Academic Press p.300.
- DUNCAN, C.L. AND STRONG, D.H. 1968. Improved medium for sporulation of *C.perfigens*. *Appl. Microbiol.* 16:82.
- EL FAKI, H.A., DESIKACHAR, H.E.R., PARAMAHANS, S.V. AND THARANATHAN, R.N. 1983 . Carbohydrate make up of chick pea cow and horse gram. *Starch.* 35:163.
- EL-GENDY, S.M. 1983. Fermented foods of Egypt and Middle East. *J. Food. Protection.* 46:358.
- EL-GENDY, S.M., ABDEL-CALIL, H., SHAHIN, Y. AND HEGARI, F. 1983. Acetoin and Diacetyl production by Homo- and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *J. Food Protection.* 46:420.
- ELLNER, P.D. 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *C.perfigens*. *J. Bacteriol.* 71:495.
- ERKKI OURA., HEIKKI SUOMALAINEN AND VISKAPI, P. 1982. *Economic Microbiology vol.7, Fermented Foods, ed., by A.H. Rose, Academic Press, Chapter 4, Breadmaking p.88.*
- FAO, *Production Year Book, Food and Agriculture Organization Rome. 1982.*
- FAO, *Food and Agriculture Organization, Amino Acid Content of*

- Foods, FAO, Rome. 1970.
- FIELDS, M.L., HAMAD, A.M., AND SMITH, D.K. 1981. Natural lactic acid fermentation of corn meal. *J. Food Sci.* 46:900
- FINNEY, P.L., BEGUIN, D., AND HUBBARD, J.D. 1982. Effect of germination on bread baking properties of mung bean (*Phaseolus aureus*) and garbanzo bean (*Cicer arietinum*), *Cereal Chem.* 59:521.
- FRAZIER, W.C., AND WESTHOFF, D.G. 1978. *Food Microbiology* 3rd edition Mc Graw Hill Book Company U.S.A
- GANESHKUMAR, K., VENKATARAMAN, L.V., JAYA, T.V. & KRISHNAMURTHY, K.S. 1978. Cooking characteristics of some germinated legumes: changes in phytins, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> and pectin, *J. Food Sci.* 43:85.
- GHIRARDI, P., MARZO, A. AND FERRARI, G. 1974. Lipid classes and total fatty acids pattern of *Cicer arietinum* *Phytochemistry.* 13:755.
- GITZELMAN, R. AND MURICCHIO, S. 1965. The handling of soy galactosidase by a normal and galactosemic child *Pediatrics.* 36:231.
- GOLDNER, S.B., SOLBERG, M., JONES, G. AND POST, L.S. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *C. perfringens*. *Appl. Env. Microb.* 52:407.
- GROSS, A., REDFERN, S., BELL, R.L. AND FISHER, F. 1968. *Cereal Sci. Today.* 13:346.
- GUPTA, Y.P & KAPOOR, A.C. 1980. Chemical composition and protein quality of various grain legumes. *Indian J. Agric. Sci.* 50:393.
- GUTMAN, I. & WAHLEFELD, A.W. 1974. 4-(+)-Lactate determination with Lactate-dehydrogenase and NAD. "Methods of Enzymatic analysis (ed Bermeyger H.U) Academic Press. N.Y. London
- GUTTIKAR, M.N., MYNA PANEMANGALORE, RAO, N.M., RAJALAKSHMI, D., RAJAGOPALAN, R. AND SWAMINATHAN. M. 1965. Studies of processed protein foods based on blends of groundnut, Bengal gram soy bean and sesame flours and fortified with mineral and vitamins I. Preparation, chemical composition and shelf life. *J. Nutr. Diet.* 2:21.
- GUTTIKAR, M.N., MYRA PANEMANGALORE, RAO, N.M., RAJALAKSHMI, D.,

- RAJAGOPALAN, R. & SWAMINATHAN, M. 1965. Studies on processed protein foods based on blends of groundnut, Bengal gram soy bean and sesame flours and fortified with minerals and vitamins. III. Supplementary value to Indian kaffir corn diet, *J. Nutr. Diet.* 2:28.
- HALLAB, A.H., KHATCHADOURJAN, A.H. AND JABR, I. 1974. The nutritive value and organoleptic properties of white arabic bread supplemented with soybean and chickpea, *Cereal Chem.* 51:106.
- HALL, W.M., WITZEMAN, J.S. AND JAMES, R. 1969. The detection and Enumeration of *C. perfringens* in Foods. *J. Food Sci.* 34:212.
- HAMAD, A.M., AND FIELDS, M.L. 1979. Evaluation of the protein quality and available lysine of germinated and fermented cereals. *J. Food Sci.* 44:456.
- HANSEN, A. AND LUND, B. 1987. Volatile compounds in rye sourdough. In "Martens, M., Dalen, G.A. Russwurm, H. (Eds), Flavours Science and Technology. John Wiley. p.656.
- HANSEN, A., LUND, B. & LEWIS, M.J. 1989. Flavour of Sourdough Rye bread crumb. *Lebensm., Wiss., Technol.* 22:141.
- HANSEN, A., LUND, B. & LEWIS, M.J. 1989. Flavour production and acidification of sourdoughs in relation to starter culture and fermentation temperature, *Lebensm., Wiss. und Technol.* 22:145.
- HEGAZI, F.Z. AND ABO-ELNAIGA, J.G. 1980. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2.* 135:212.
- HEINZ, VON L. AND KLAUSHOFER. 1952. Studien über die des Sauerteiges. *Mitteilungen der Versuchsstation für das Garungs-gewerbe* 6:105.
- HERRMANN, K. 1974. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 155:220.
- ΗΛΙΑΔΗΣ, Γ.Κ. (1985). Αειολόγηση 10 Μεγάλοσπερμων ποικιλιών ρεβιθιού με βάση την παραγωγή καρπού και την προσαρμοστικότητα τους. *Γεωργ. Έρευνα.* 9:27.
- HUBER, H. (1970). *Brot Gebäck* 24, 46-52.
- JAMBUNATHAN, R. AND SINGH, U. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivars III. Mineral and trace element composition, *J. Agric. Food Chem.* 29:1091.
- JAYA, T.V., KRISHNAMURTHY, K.S. AND VENKATARAMAN, L.V. 1975.



- Effect of germination and cooking on the protein efficiency ratio of some legumes, *Nutr.Rep.Int.* 12:175.
- JAYA, T.V. & VENKATARAMAN, L.V. 1979. Effect of germination on the supplementary value of chickpea and green gram protein to those of rice and wheat, *Nutr.Rep.Int.* 19:777.
- JAYA, T.V. & VENKATARAMAN, L.V. 1980. Effect of germination on the nitrogenous constituents, essential amino acids, carbohydrates, enzymes and antinutritional factors in chickpea and green gram. *Food Packer.* 34:3.
- JAYA, T.V. & VENKATARAMAN, L.V. 1981. Influence of germination on the carbohydrate digestibility (in vitro) of chickpea (*Cicer arietinum* L) and green gram (*Phaseolus aureus* L) *Indian J.Nutr.Diet.* 18:62.
- JOHNSON, J.A., MILLER, B.S. AND CURNUTTE, B. 1961. *Agric.Food Chem.* 6:384.
- JOSEPH, K., NARAYANARAO, M., SWAMINATHAN, M., SANKARAN, A.N., JAYARAJ, A.P. AND SUBRABYAN, V. 1962. The supplementary value of certain processed protein foods based on blends of ground soybean, sesame, chickpea (*Cicer arietinum* L) flours and skim milk powder to a maize-tapioca diet *Br.J.Nutr.* 16:49.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1958. General Secretariat, 10 rue Ortelins, Brussels 4.
- KERSTERS, K. AND LEY, D. 1980. Classification and Identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. In, *Microbiological Classifications and Identifications* eds. Good Fellow M. Board, R.G. p.273-297, London Academic Press.
- KHAN, M.A., JACOBSEN, I. AND EGGUM, B.O. 1979. Nutritive value of some improved varieties of legumes. *J.Sci.Food Agric.* 30:395.
- KIBY, N. 1912. "Handbuch der Presshefenfabrikation" Friedrich Vieweg and Sohn, Braunschweig.
- KIM, C.H., CHENEY, R. AND WOODBURN, M. 1967. Sporulation of *C.perfigens* in a modified medium and selected foods. *Appl.Microbiol.* 15:871.
- KLINKE, L. 1981. U.S Patent No 4,243,687, January 6.

- KLINE, L. AND SUGIHARA, T.F. 1973,1975. U.S Patent No 3,374,743,May 22 and No 3,891,773 June 24.
- KLINE, L., SUGIHARA, T.,F., AND McCREADY,L.B .1970. Nature of the San Francisco sour dough French bread process: I.Mechanics of the process.Baker's Digest. 44:48.
- KLINE,L., AND SUJIHARA,T.F.1971. Microorganisms in the San Francisco sour dough bread process.II.Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for souring activity.Appl.Microb. 21:459.
- KONINKLIJKE N.V.1967. Nederlandsche Gist-en Spiritus fabriek British Patent.
- KOSMINA, N.P.1977. Biochemie der Brothstellung VEB Fachbuchverlag-Leipzig.
- KRIEMS, P.1970. Ber S. Welt-Getreide- und Brotkongress 125:141.
- LAEMMLI, U.K.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature 227:680.
- LONNER, C., WELANDER,T., MOLIN,N., DOSTALEK,M., & BLICKSTAD, E. 1986. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish Rye meal. Food Microbiol. 3:3.
- LONNER, C. AND AKESSON, K.P., 1989. Effects of lactic acid bacteria on the properties of sour dough bread, Food Microb.6:19.
- LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J.,FARR,A.L. & RANDALL,R.J. 1951. Protein measurment with Folin phenol reagent J.of Biolog. Chemistry. 193:265.
- LUH, B.S., SAIPUI, M. & RUCKER, R.B. 1975. Physiological qualities and functional properties of lima bean protein for bread improvement,in Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds.Part 2,Friedman,m.,Ed.,Marcel Dekker, New York,235.
- LUND,B. AND HANSEN,A.1987. Fermentation of Rye Sourdough. Ugeskrift for Jordbrug.Selected Research Reviews p.47
- LUND,B., HANSEN,A. AND LEWIS, M.J. 1989. The influence of dough yield on acidification and production of volatiles

- in sourdoughs.
- MAGA JOSEPH, A. 1974. Bread Flavor. CRC Critical Reviews in Food Technology p55.
- MALEK ABD EL. Y., EL-LEITHY, M. A. AND AWAD, Y. N. 1974. Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. 3:148.
- MARKOVA, J., HONISCHOVA, E. AND HAMPL, J. 1970. Aromastoffe des Brotes und der Zwischenproducte seiner Erzeugung. Brot und Gebach. 24:166.
- ΜΠΑΝΑΤΣΟΥΡΑΣ, Γ., Αθήνα. 1990. Μικροβιολογία Τροφίμων.
- MULYOWIDARSO, R. K., FLEET, G. H. AND BUCKLE, K. A. 1989. The microbial ecology of soybean soaking for tempeh fermentation, Int. J. Food Microb. 8:35.
- MURTHY, K. S. AND URS, M. K. 1984. Effect of Bengal gram (*Cicer arietinum*) proteins and lipids on serum cholesterol levels in rats. J. Food Sci. 22:54.
- NEUCOM, H. 1972. Getreide Mehl Brot 26:299.
- NOUT, M. J. R., BEIRNICK, G. AND BONANTS-VAN LAAR-HOVEN, T. M. G. 1987. Growth of *Bacillus cereus* in soybean tempeh, Int. J. Food Microb. 4:293.
- OTTOGALLI, G. & GALLI, A. 1972. Istituto de Microbiologia Agraria e Tecnica, Universita di Milano, Italia, manuscript.
- OXOID MANUAL-of culture media, ingredients and other laboratory services, 5th edition. 1982. Published by Oxoid Limited Basingstone U.K.
- PAK, N AND BARJA, I. 1974. Composition, content of toxic substances, protein quality and protein value of greenpeas, chickpeas and lentils grown in Chile, Cienciae Invest, Agraria 1:105.
- PATWARDHAN, V. N. 1962. Pulses and beans in human nutrition Am. J. Clin. Nutr. 11:12.
- PEDERSON, C. S. 1971. Microbiology of Food Fermentation. Chapter 8 The Avi Publ. Co., Inc., Westport, Conn., USA.
- PEPPLER, H. J. 1974. Production of Yeasts and Yeast products. In "Microbial Technology, Vol. 1 ed. PEPPLER, H. J. & PERLMAN, D p. 157. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- RADLER, F. & GERWARTH, B. 1971. Über die Bildung von flüchtigen Gärungsnebenprodukten durch Milchsäurebakterien. Archiv

- T.fur Mikrobiologie. 76:299.
- RAMANATHAN, L.A. & BHATIA, B.S. 1970. Dehydrated green Bengal gram (*Cicer aritetinum* L), J.Sci.Technol. 7:208.
- RAO, P.U. & BELAVADY, B. 1980. Effect of different agronomic practices on the protein and vitamin content of Bengal gram (*Cicer arietinum* L). Indian J.Nutr.Diet. 17:6.
- RAO, N.M., DWARAKANATH, C.T. & RAMACHANDRA RAO, T.N. 1968. Development of pre-digested protein rich food based on Indian oil seed cakes and pulses, Part I., J.Food Sci.Technol. 5:198.
- RAO, N.M. & RAMACHANDRA RAO, T.N. 1972. Nutritional evaluation of pre-digested protein-rich foods (miso-like products) and the effect of their supplementation to poor rice diet Part III. J.Food Sci.Technol. 9:127.
- RAO, K. AND SUBRAMANIAN, N. 1970. Essential amino acid composition of commonly used Indian pulses by paper chromatography. J.Food Sci.Technol. 7:31.
- RAO, U.P AND BELAVADY, B. 1978. Oligosaccharides in pulses: varietal differences and effect of cooking and germination. J.Agric.Food Chem. 26:316.
- REDDY, N.R., PIERSON, M.D., SATHE, S.K. & SALUNKHE, D.K. 1980. Legume-based fermented foods: their preparation and nutritional quality, Crit.Rev.Food Sci.Nutr. 17:335.
- REDDY, N.R., SALUNKHE, D.K. & SHARMA, R.P. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black gram and a fermented product of black gram rice blends. J.Food Sci. 45:1161.
- REED, G. & PEPPLER, H.J. 1973b. Biochemicals aspects of yeasts In "Yeast Technology" p.33 AVI Publ Co., Inc., Westport, Conn.
- REED, G. & PEPPLER, H.J. 1973e. Baker's yeast production. In "Yeast Technology" p.53 AVI Publ. Co., Inc., West-Port, Conn
- ROBERTS, T.A. 1967. Sporulation of Mesophilic clostridia. J. Appl.Bacteriol. 30:430.
- ROGOSA, M. 1974. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" ed BUCHANAN, R.E & GIBBONS, N.E, p.576.

- Williams and Wilkins Co., Maryland.
- ROHRICH, M. 1953. Beitrage zur Kenntnis der Biologie und Biochemie der Sauerteiggarung. II. Mitt: Unter Suchungen uber den biochemischen Mechanismus der bakteriellen Sauerteiggarung. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 96: 24.
- ROTHER, M. 1974. In "Handbuch der Aromaforschung-Aroma von Brot". Akademie-Verlag, Berlin.
- SALOVARAA, H. & VALJAKKA, T. 1987. The effect of fermentation Temperature, flour type and starter on the properties of sour wheat bread. Int. J. Fd Sci. and Technol. 22: 591.
- SALOVARAA, H. & KATUNPAA, H. 1984. An Approach to the classification of Lactobacilli isolated from finish sour rye dough ferments. Acta Alimentaria Polonica 10: 231.
- SALUNKHE, D.K., SATHE, S.K. & REDDY, N.R. 1982. Legume lipids in Chemistry and Biochemistry of Legumes, Arora, S.K., Ed., Oxford nad IBH Publishing, New Delhi, 51.
- SANDINE, W.E., ELIKER, P.R. & ANDERSON, A.W. 1957. Milk Prod. J. 48: 12
- SANKAR RAD, D.S. & DEOSTHALE, Y.G. 1981. Mineral composition of four Indian legumes, J. Food Sci. 46: 1962
- SCHNEEWEISS, R. 1965. Ber 2 Tagung Int. Probleme der modernen Getreideverarbeitung und Getreidechemie p. 260.
- SCHORMULLER, J., BRANDENBURG, N. & LANGER, H. 1961. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 115: 226.
- SCHUTZ, M. & RADLER, F. 1974. Arch. Mikrobiol. 96: 329.
- SEDMAK, J.I. & GROSSBERG, S.E. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. Anal. Biochem. 79: 544.
- SHAHIDI, S.A. & FERGUSON, A.B. 1971. New Qualitative and Confirmatory media for Rapid Analysis of Food for C. perfringens. Appl. Microbiol. 21: 500.
- SHIEBERLE, P. & GROSCH, W. 1984. Identifizierung von Aromastoffen aus der krumme von Roggenbrot-Vergleich mit den Aromastoffen der kruste 2. Lebensm. Unters. Forsch. vol 178: 479.
- SHOBHANA, SANGAWAN, P.S., NAINAWATEE, H.S. & LAL, B.M. 1976. Chemical composition of some improved varieties of pulses

- J. Food Sci. Technol. 13:49.
- SHURPALEKAR, S.R., LAHIRY, N.L., MOORJANI, M.N., SWAMINATHAN, M., SREENIVASAN, A. AND SUBRAHMANYAN, V. 1962. Chemical composition and shelf life of a protein food based on low fat ground flour, Bengal gram flour and fish flour, Food Sci. 11:39.
- SHURPALEKAR, S.R., MOORJANI, M.N., LAHIRY, N.L., INDIRAMMA, K., SWAMINATHAN, M., SREENIVASAN, A. & SUBRAHMANYAN, V. 1962. Supplementary value of proteins of fish flour and the protein efficiency ratio of a protein food containing groundnut, Bengal gram and flour, Food Sci. 11:42.
- SINGH, L., SARMA, D., & DEODHAR, A.D. 1974. Effects of environment on the protein content of seeds and implication in pulse improvement, Indian J. Genet. Plant Breed. 34:764.
- SINGH, R., GEORGE, M. & SONI, G.L. 1983. Role of dietary fiber from pulses as hypocholesterolemic agent, J. Food Sci. Technol. 20:228.
- SINGH, U., SAHRAWAT, K.Z. & JAMBUNATHAN, R. 1984. Use of hydrogen peroxide for the digestion and determination of total nitrogen in chickpea (*Cajanus cajan* L.) J. Sci. Food Agric. 35:640.
- SINGH, D.P., SWARNKER, K.C. & VERMA, M.M. 1975. Interaction of N, P and S on nodulation, protein and S containing amino acid contents in *Cicer arietinum*. Proc. Nat. Acad. Sci. India 45:303.
- SINGH, U. & JAMBUNATHAN, R. 1982. Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Qual. Plant Foods Hum. Nutr. 31:347.
- SOSULSKI, F.W., ELKOWICZ, L. AND REICHERT, R.D. 1982. Oligosaccharides in eleven legumes and their classified protein and starch fractions, J. Food Sci. 47:498.
- SPICHER, G. 1960. The stimulators in sourdough. Brot Geback 14:32.
- SPICHER, G. 1966. Die Mikroflora des Saurteiges. Z. B1 Bakt. II 120:685.

- SPICHER, G. 1982. Eigene neue Aspekte der Biologie der Sauerteiggärung. Getreide, Mehl und Brot. 36:12.
- SPICHER, G. 1983. Biotechnology, food and feed production with microorganisms, chapter 1, p. 3-80. Baked goods ed. by H.J. Rehm and G. Reed, Verlag Chemie.
- SPICHER, G. 1986. Zur Frage der Bewertung von Sauerteig- Starterkulturen, Sauerteigen in Trockenform und sauerteighaltigen bzw. 3. Mitt. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 82:39
- SPICHER, G. AND LONNER, C. 1985. Microflora of sourdough XXI. Lactobacillus species of sourdough from Swedish bakeries. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. 181:9.
- SPICHER, G. AND SCHRODER, R. 1978. Die Mikroflora des saurteiges. IV. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 167:342.
- SPICHER, G. AND NIERLE, W. 1983. Proteolytische Aktivität im Verlaufe der Sauerteiggärung. Getreide, Mehl und Brot. 10:305.
- SPICHER, G. AND RABE, E. 1980. Die Mikroflora des Sauerteiges. XI. Mitt: Der Einfluss der Temperatur auf die Lactat / Acetat - Bildung in mit heterofermentativen Milchsaurebakterien angestellten saurteigen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 171:437.
- SPICHER, G. & RABE, E. 1983. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176:190.
- SPICHER, G., RABE, E., SOMMER, R., & STEPHAN, H., M. 1982. The microflora of sourdough. XIII. Behaviour of Lactobacillus brevis var. Lindneri in the acidification and baking-test in presence of homofermentative lactobacilli. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung. 173:21
- SPICHER, G. 1986. Zur Frage der Bewertung von Sauerteig Starterkulturen, Sauerteigen in Trockenform und sauerteighaltigen Fetigmehlen bzw. Deutsche Lebensmittel Rundschau. 82:39
- SPICHER, G. & STEPHAN, H. (1960). Brot und Gebäck. 14:47.
- STADHOUDERS, J. & MOL, J.J. 1965. Neth. Milk Dairy 19:306.
- STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A., & INGRAHAM, J.L. 1976. General Microbiology, 4th edition published by: The Macmillan

- Press LMP, London and Basinstoke
- STEGEMAN, J. ANDROHLICH, M. 1958. Uber Vermehrung der Sauerteigorganismen im Verlaufe der Teiggarung bei Kontinuierlicher fuhrung. Brot und Geback.12:65.
- STEINKRAUS, K.H., VAN VEEN, A.G., AND THIEBEAN, D.B. 1967. Studies on idli, an Indian fermented black gram-rice food Food Technol.21:916.
- STEINKRAUS, K.H., HWA, Y.B., VAN BUREN, J.P., PROVIDENTI, M.I. AND HAND, D.B. 1960. Studies on tempeh an Indonesian soybean food. Food Res. 25:777.
- STEINKRAUS, K.H., VAN BUREN, J.P., HACKLER, L.R. AND HAND, D.B. 1965. A pilot process for the production of dehydrated tempeh. Food Techn.19:63.
- STOKAR, W., VON. 1951. In " Die Urgeschichte den Brotes" I.A. Barth, Lcipzig.
- SUBRAHMANYAN, V., JOSEF. K., PANEMANGALORE, M., SUBRAHMANYAN, N., RAJAGOPALAN, R., SREENIVASAN, A. & SWAMINATHAN, M. 1962. Chemical composition and shelf life of a high protein food based on groundnut protein isolate, Food Sci.11:197.
- SUGIHARA, T.F. 1985. Microbiology in Breadmaking. In "Microbiology of Fermented Foods", vol 1 ed.by B.Wood, p.249, Elsevier Applied Sci.Publishers.London.
- SUGIHARA, T.F., KLINE, L., AND MILLER, M.W.1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough process. I.Yeasts responsible for the leavening Action. Appl.Microb.21:456.
- SUGIHARA, T.F., KLINE, L. AND McREADY.1970. Nature of the San Francisco sour dough French process. II. Microbiological aspects.Baker's Digest.44:51.
- THOMSON, D.R.1980. Baker's Dig.54:28.
- TONGNUAL, P.T. AND FIELDS, M.L. 1979. Fermentation and relative nutritive value of rice meal and chips. J.Food Sci. 44:1784.
- TRIVEDI, N.1986b. Use of mikroorganisms in the production of Unigue ingredients.In "Biotechnology in Food Processing" e.d HARLANDER, S.K & LABUSE, T.P. p.115.Noyes Publ. Park



- Ridge, N.J.
- TRIVEDI, N., COOPER, E.J., & BRUINSMA, L. 1984. Development and applications of quick-rising yeast. *Food Technol.* 38:51.
- VERMA, M.M. 1984. The use of chickpea flours in sausages, *J. Sci. Food Agric.* 35:948.
- WERNER, W.H., REY, G. & WIELINGER, H. 1970. Test combination of glucose. *Z. Analyst. Chem.* 252:224.
- ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ, Γ. 1989. Το Αρχαίο Ελληνικό Ψωμί, Γεύση, τεύχος 13:15
- YARROW, D. 1978. *Candida milleri* sp. nov. *J. System. Bacteriology.* 28:608.
- YOUSSEFF, S.A.M., SALEM, A. AND ABDEL-RAHMAN, A.H.Y. 1976. Supplementation of bread with soy bean and chickpea flours, *J. Food Technol.* 11:599.
- ZAMORA, A.F. AND FIELDS, M.L. 1979. Nutritive quality of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chickpeas (*Cicer arietinum* L), *J. Food Sci.* 44:234.
- ZAMORA, A.F. AND FIELDS, M.L. 1979. Microbiological and toxicological evaluation of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chickpeas, (*Cicer arietinum* L), *J. Food Sci.* 44:928.
- ZIMMERMAN, G., WEISSMANN, S. AND YANNAI, S. 1967. The distribution of protein, lysine and methionine and antitryptic activity in the cotyledons of some leguminous seeds. *J. Food Sci.* 32:129.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 28

Ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σε δείγματα ψωμιού από αρτοποιεία διαφόρων περιοχών της Αττικής και σε δείγματα σικλιακών παρασκευών

α/α	Ξηρά ουσία %	pH	Όγκομ. Οξύτητα % σε προϊόν		Ανάγοντα ζάχαρα % σε προϊόν	
			Νωπό	Ξηρό	Νωπό	Ξηρό
1	62.4	5.21	3.10	4.97	1.35	2.16
2	62.3	5.47	2.90	4.65	3.10	4.97
3	62.1	5.68	3.20	5.15	0.99	1.59
4	67.9	5.46	3.10	4.56	1.70	2.50
5	62.7	5.77	2.60	4.15	3.20	5.10
6	59.5	5.68	2.60	4.37	2.02	3.39
7	66.8	5.44	3.30	4.94	2.75	4.12
8	66.0	5.23	3.10	4.69	2.40	3.64
9	68.9	5.71	2.90	4.21	2.50	3.63
10	56.1	4.50	5.50	9.80	1.10	1.96
11	69.7	5.60	2.40	3.44	1.92	2.75
12	54.7	5.79	2.30	4.20	1.84	3.36
13	67.8	5.47	3.10	4.57	3.04	4.48
14	64.2	5.36	2.90	4.51	1.80	2.80
15	71.3	5.61	2.60	3.65	1.70	2.38
16	64.6	5.42	3.50	5.42	2.98	4.61
17	66.7	5.46	1.60	2.40	1.60	2.40
18	59.9	5.64	3.40	5.68	3.34	5.57
19	60.0	5.50	3.40	5.67	1.70	2.83
20	65.8	5.63	2.00	3.04	1.50	2.28
21	61.6	5.20	3.70	6.00	2.30	3.73
22	69.3	5.50	2.60	3.75	1.84	2.65
Χ	64.5	5.51	2.87	4.48	2.12	3.31
SD	4.13	0.17	0.52	0.89	0.70	1.11

\* Το δείγμα Νο.10 είναι όξινο ψωμί σικλιακής παρασκευής δεν συμμετέχει στη διαμόρφωση των μέσων όρων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 29

Ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά "Επτάζυμου" σε ψωμί και σε παξιμάδι\*

α/α	Ξηρά ουσία %	pH	Όγκομ. Θξύτητα % σε προϊόν		Ανάγοντα ζάχαρα % σε προϊόν	
			Νωπό	Ξηρό	Νωπό	Ξηρό
1	62.2	5.29	5.20	8.36	2.67	4.29
2	61.6	5.27	5.00	8.12	2.60	4.22
3	63.9	5.24	5.00	7.82	2.02	3.16
4	59.9	5.25	4.80	8.01	2.11	3.52
5	62.4	5.27	3.80	6.34	1.88	3.01
6	61.6	5.25	4.10	7.63	2.00	3.25
7	71.1	5.20	4.40	6.20	1.96	2.76
8	65.7	5.16	4.60	7.00	1.85	2.82
9	70.6	5.14	5.80	8.21	2.26	3.20
10	72.2	5.10	6.00	8.31	2.53	3.50
11	92.4	5.21	3.60	3.90	2.74	2.96
12	93.4	5.14	4.30	4.60	3.03	3.24
13	94.0	4.98	4.10	4.36	3.17	3.27
14	93.0	4.98	6.24	6.70	3.09	3.22
15	92.2	5.18	4.32	4.68	3.68	3.99
16	64.00	5.23	4.70	7.34	1.92	3.00
17	64.10	5.21	4.90	7.64	1.94	3.03
18	70.50	5.21	4.20	5.96	2.05	2.91
19	62.70	5.19	4.30	6.86	1.86	2.97
χ	65.2	5.18	4.70	6.74	2.39	3.28
SD	4.14	0.09	0.72	1.45	0.55	0.45

\* Τα δείγματα Νο 11-15 είναι σε παξιμάδι, δεν συμμετέχουν στη διαμόρφωση του μέσου όρου της Ξηράς ουσίας.

Indigenous Cereal and Cereal-Legume-Based Fermented Foods and Beverages<sup>28-53</sup>

Product	Substrates	Microorganisms involved	Nature of use	Regions
<i>Dhokla</i>	Rice or wheat and Bengal gram	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermenti</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> ,	Breakfast or snack food	Northern India
<i>Idli</i>	Rice and black gram	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermenti</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , yeasts	Breakfast food	India, Sri Lanka
<i>Miso</i>	Wheat/rice/barley and soybeans	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus halophilus</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Saccharomyces rouxii</i> , other yeasts	Seasoning	Japan, China, Taiwan, U.S.
<i>Shoyu</i> (soy sauce)	Wheat and soybeans	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>Pediococcus halophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ,	Seasoning	Japan, China, Taiwan, U.S.
<i>Dosa</i>	Rice and Bengal gram	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus fermenti</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , yeasts	Breakfast and snack food	India
<i>Kecap</i>	Wheat and soybean	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Hansenula</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.,	Flavoring agent	Indonesia and vicinity
<i>Tao-si</i> <i>Taotjo</i>	Wheat and soybeans Roasted wheat meal or glutinous rice and soybeans	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Seasoning Condiment	Philippines East India
<i>Tauco</i>	Cereals and soybeans	<i>Rhizopus oligosporus</i> or <i>Aspergillus oryzae</i>	Seasoning	Indonesia, West Java
Sierra rice	Rough rice	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	Brownish-yellow dry rice	Ecuador
<i>Rabdi</i>	Maize	Not known	Semisolid mash eaten with vegetables	India
<i>Pito</i>	Maize, Guineacorn	Not known	Liquid drink	Nigeria
<i>Bouza</i>	Wheat	Not known	Thick, acidic liquid	Egypt
<i>Jalebies</i>	Wheat flour	<i>Saccharomyces bayanus</i> , lactic acid bacteria	Pretzel-like syrup-filled confection	India, Nepal, Pakistan
<i>Minchin</i>	Wheat gluten	<i>Paecilomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Syncephalastum</i> , <i>Penicillium</i> , and <i>Trichothecium</i> spp.	Solid as condiment	China
<i>Nan</i>	Unbleached wheat flour	Not known	Solid as snack	India, Pakistan, Afghanistan, Iran
<i>Kurdi</i> <i>Tarhana</i>	Wheat Parboiled wheat meal and yogurt (2:1)	Not known Lactic acid bacteria	Solid, fried crisp, salty noodles Solid powder, dried seasoning for soups	India Turkey
<i>Kishk</i>	Wheat, milk	Lactic acid bacteria, <i>Bacillus</i> spp.	Solid, dried balls, dispersed rapidly in water	Egypt, Syria, Arab world
<i>Hamanatto</i>	Wheat flour	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp.	Raisin-like soft, flavoring agent, for meat, fish as snack	Japan
<i>Burukutu</i>	Sorghum and cassava	Lactic acid bacteria, <i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Creamy drink with suspended solids	Nigeria
<i>Injera</i>	Sorghum, maize, wheat, or barley	<i>Candida guilliermondii</i>	Bread-like staple	Ethiopia
<i>Merissa</i> <i>Munkoya</i>	Sorghum Kaffir corn, millet or maize plus roots of <i>munkoyo</i>	<i>Saccharomyces</i> sp. Not known	Liquid drink Liquid drink	Sudan Africa
Sorghum beer	Sorghum	Lactic acid bacteria, yeasts	Liquid drink, acidic, weakly alcoholic	South Africa
<i>Bogobe</i> <i>Kisra</i>	Sorghum Sorghum	Not known Lactic acid bacteria	Soft porridge staple Staple as bread	Botswana Nigeria
<i>Dalaki</i> <i>Feni</i>	Sorghum Sorghum	Not known Not known	Thick porridge Breakfast, snack food	Nigeria India
<i>Braga</i> <i>Darassum</i> <i>Thumba</i>	Millet Millet Millet	Not known Not known <i>Endomycopsis fibuliger</i>	Liquid drink Liquid drink Liquid drink	Romania Mongolia Eastern India

## ΠΙΝΑΚΑΣ 30 (ΣΥΝΕΧΕΙΟ)

### Indigenous Cereal and Cereal-Legume-Based Fermented Foods and Beverages<sup>28-53</sup>

Product	Substrates	Microorganisms involved	Nature of use	Regions
<i>Ang-kak</i>	Rice	<i>Monascus purpureus</i>	Dry red powder as colorant	China, southeast Asia, Syria
<i>Busa</i>	Rice or millet	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.,	Liquid drink	Egypt
<i>Lao-chao</i>	Rice	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus chinensis</i> , <i>Chlamydomucor oryzae</i> , <i>Saccharomycopsis</i> sp.	Paste, soft, juicy, glutinous consumed as such, as dessert or combined with eggs, seafoods	China, Indonesia
<i>Puto</i>	Rice	Lactic acid bacteria	Solid paste as seasoning agent, snack	Cambodia, Philippines
<i>Tapé</i>	Rice or cassava	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hansenula anomala</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Chlamydomucor oryzae</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Endomycopsis fibuliger</i>	Soft, solid staple	Indonesia
<i>Anarshe</i>	Rice	Not known, (lactic acid bacteria)	Breakfast, sweetened snack food	India
<i>Torani</i>	Rice	<i>Hansenula anomala</i> , <i>Candida quilliermondii</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> ,	Liquid as seasoning for vegetables	India
<i>Kanji</i>	Rice and carrots	<i>Hansenula anomala</i>	Liquid added to vegetables	India
<i>Banku</i>	Maize cassava	Lactic acid bacteria, yeasts	Dough as staple	Ghana
<i>Chicha</i>	Maize	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., yeasts, bacteria	Spongy, eaten with vegetables	Peru
<i>Jaminbang</i>	Maize	Yeasts, bacteria	Bread, cake-like	Brazil
<i>Kaanga-Kopuwai</i>	Maize	Bacteria, yeasts	Soft, slimy eaten as vegetables	New Zealand
<i>Kenkey</i>	Maize	Not known	Mush, steamed eaten with vegetables	Ghana
<i>Mahewu</i>	Maize	Lactic acid bacteria	Liquid, sour, nonalcoholic drink	South Africa
<i>Ogi</i>	Maize, sorghum	Lactic bacteria, <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , and <i>Penicillium</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida mycoderma</i>	Paste as staple or breakfast, weaning babies	Nigeria, West Africa
<i>Pazol</i>	Maize	Molds, yeasts, bacteria	Spongy dough, water diluted and drunk as basic food	Southeastern Mexico

Όνοματεπώνυμο.....Ημερομηνία.....

**ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ**

Σας δίνονται τρία διαφορετικά δείγματα ψωμιού (Α,Β,Γ) εκ των οποίων τα δύο είναι όμοια και το τρίτο διαφέρει. Μπορείτε να διακρίνεται το δείγμα που είναι διαφορετικό; Κριτήρια που πιθανόν να σας βοηθήσουν είναι η οσμή το άρωμα η γεύση αφού τα δοκιμάσετε και η δομή της ψίχας.

Αν δεν μπορείτε να διακρίνετε το διαφορετικό δείγμα σημειώστε όχι, στο διπλανό τετράγωνο.

-----  
-----

Αν διακρίνετε το διαφορετικό δείγμα σημειώστε τον κωδικό του στο διπλανό τετράγωνο.

-----  
-----

Στην περίπτωση αυτή σε ποιά από τα παρακάτω χαρακτηριστικά διαφέρει το δείγμα αυτό.

- Οσμή :
- Άρωμα:
- Γεύση:
- Δομή ψίχας:
- Αλλα και ποιά:

Όνοματεπώνυμο.....Ημερομηνία.....

### ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Σας παρακαλούμε αφού αξιολογήσετε την οσμή και τη γεύση των παρακάτω δειγμάτων ψωμιού, να τα βαθμολογήσετε σύμφωνα με την παρακάτω κλίμακα αρεσκείας.

- 7 = Μου αρέσει πάρα πολύ
- 6 = Μου αρέσει πολύ
- 5 = Μου αρέσει λίγο
- 4 = Με αφήνει αδιάφορο
- 3 = Δεν μου αρέσει λίγο
- 2 = Δεν μου αρέσει πολύ
- 1 = Δεν μου αρέσει πάρα πολύ

Βαθμολογία:

Δείγμα Α =

Δείγμα Β =

Δείγμα Γ =

Δείγμα Δ =