



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή μελέτη

***“Απομόνωση οξυγαλακτικών βακτηρίων από παραδοσιακά
ζυμούμενα προϊόντα και μελέτη των βιοχημικών και των
βιολειτουργικών ιδιοτήτων τους”.***

ΣΚΛΗΒΑΝΙΤΗΣ Θ.ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΓΙΑΝΝΙΩΤΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΑΝΑΓΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Η Διπλωματική Εργασία αυτή, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με κατεύθυνση: "Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων".

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τη συνδρομή τους στην εκπόνηση της εργασίας αυτής:

Πρώτα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Έφη Τσακαλίδου, για τη σημαντική βοήθεια και τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές της. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός ότι με συμπεριέλαβε στο εν λόγω εργαστήριο, δίνοντάς μου την ευκαιρία να δουλέψω σε ένα χώρο με άριστη οργάνωση.

Τους κ. Γιαννιώτη Σταύρο ,Καθηγητή και κ. Ευστάθιο Πανάγου, Επίκουρο Καθηγητή για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής επίβλεψης και αξιολόγησης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, την Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη, για το γεγονός ότι με επέλεξε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια και την ολοκλήρωση της αυτής της μελέτης. Επιπλέον την ευχαριστώ για το χρόνο που μου διέθεσε και για όλα όσα με δίδαξε.

Την Δρ. Ράνια Αναστασίου, για την βοήθειά καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για την άψογη συνεργασία μας.

Την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη στήριξη και συμπαράστασή τους καθώς και για τη βοήθειά τους καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση νέων στελεχών και η μελέτη των βιοχημικών και των τεχνολογικών τους ιδιοτήτων που σχετίζονται με το δυναμικό εφαρμογής τους ως εναρκτήριοι καλλιέργειες τροφίμων. Τα στελέχη τα οποία επιλέχτηκαν για να εξεταστούν και να μελετηθούν οι τεχνολογικές και βιοχημικές τους ιδιότητες προήλθαν από : λούντζα Τήνου, σαλάμι Λευκάδος (Ντελημάρης), σαλάμι Ευρυτανίας (Στρεμμένος), λουκάνικο Καρδίτσας (Τσιανάβας), γιαούρτι Κέρκυρας, γιαούρτι Κορίνθου, γιαούρτι Λήμνου, ξινισμένο γάλα Κάτω Σουλίου, ξινισμένο γάλα Λαρίσης, ξινισμένο γάλα του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης επιλέχτηκαν για να εξεταστούν και να μελετηθούν οι τεχνολογικές και βιοχημικές ιδιότητες σε στελέχη της συλλογής ACA-DC του εργαστηρίου γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αυτά είναι 18 στελέχη *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus*, 27 στελέχη *Str.thermophilus* και 5 προβιοτικά στελέχη (*Streptococcus macedonicus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rennini*, *Lactobacillus acidipiscis*). Για τα 117 σε σύνολο στελέχη εξετάστηκαν οι βιοχημικές τους ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με την παρασκευή και την ωρίμανση ζυμούμενων προϊόντων όπως είναι η παραγωγή οξύτητας στο γάλα, η πρωτεολυτική και πεπτιδολυτική δραστηριότητα, ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και η ικανότητα παραγωγής πεπτιδίων που παρεμποδίζουν το ένζυμο ACE. Λόγω μεγάλου όγκου δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε επίσης rep-PCR για την ομαδοποίηση των στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν από τα αλλαντικά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Βάσει των αποτελεσμάτων της rep-PCR, επιλέχτηκαν στελέχη τα οποία εστάλησαν για ταυτοποίηση 16S rRNA.

Από το σύνολο των 117 οξυγαλακτικών στελεχών, τα 33 στελέχη είναι περισσότερο οξυπαραγωγικά. Όσον αφορά στην πρωτεολυτική δραστηριότητα, η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασε χαμηλά επίπεδα. Η πεπτιδολυτική δραστηριότητα που παρουσίασαν ήταν κατά την πλειοψηφία των στελεχών χαμηλή. Κανένα από τα στελέχη δεν παρουσίασε ισχυρό μεταβολισμό του κιτρικού οξέος. Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στον έλεγχο παραγωγής εξωπολυσακχαριτών. Κατόπιν όσον αφορά την παρεμποδιστική ικανότητα του ενζύμου ACE, 51 στελέχη ήταν δραστικά παρουσιάζοντας παρεμπόδιση υψηλότερη από 50%. Τέλος έγινε επιλογή συγκεκριμένων στελεχών σε αυτά με την μεγαλύτερη παρεμποδιστική ικανότητα τα οποία στάλθηκαν για αλληλούχιση του γονιδίου 16s rRNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ταυτοποιήθηκαν τα είδη: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* και *Streptococcus thermophilus*.

Abstract

Aim of this study was the isolation of new strains and the examination of their biochemical and technological properties, which are associated with their potential application as food starter cultures. Selected strains were examined for their technological and biochemical properties. Those lactic acid strains were isolated from : lountza cheese from Tinos, salami from Lefkada (Ntelimaris), salami from Haryana (Stremmenos), sausage from Karditsa (Tsianavas), yogurt from Corinthos, yogurt from Lemnos, soured milk from kato Souli, soured milk from Larissa and soured milk from the selection of the Dairy Laboratory of the Agricultural University of Athens. There were also examined the technological and the biochemical properties of the collection strains ACA-DC dairy laboratory of the Agricultural University of Athens. The last mentioned are 18 strains *Lactobacillus delbrueckii* ssp.bulgaricus, 27 strains *Str.thermophilus* and 5 probiotic strains (*Streptococcus macedonicus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rennini*, *Lactobacillus acidipiscis*). As result of these, 117 strains were isolated and examined for their biochemical properties directly related to the manufacture and curing fermented products such as their ability of production acids in milk, the proteolysis and peptidolysis, the catabolism of citric acid, the production of exopolysaccharides and capacity peptides that inhibit the enzyme ACE. Due to the large volume of samples was also performed rep-PCR for grouping strains were isolated from meats and dairy products. Based on the results of rep-PCR, selected strains sent for identification of 16S rRNA.

From all of the 117 strains,33 strains are producing more acid . As regards proteolysis, the majority of strains showed a low level. The peptidolysis was exhibited by the majority of low strains. None of the strains showed no strong acid citrate metabolism. All strains were positive for

production exopolysaccharides. Then regarding the inhibitory ability of the enzyme ACE, 51 strains were drastically Presenting inhibition higher than 50% .Finally specific strains were selected for those with the highest inhibitory capacity, which were sent for sequencing of the gene 16s rRNA. According to the results of the identified species: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	11
1.1	Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	11
1.1.1	Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	12
1.1.2	Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων	13
1.1.3	Τα κύρια Γένη Οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	14
1.2	Καλλιέργειες εκκίνησης.....	16
1.3	Κύριες βιοχημικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων	18
1.3.1	Πρωτεόλυση	18
1.3.2	Λιπολυτική δραστικότητα	20
1.3.3	Καταβολισμός του κιτρικού οξέος:	22
1.4	Προβιοτικά	23
1.4.1	Τρόπος δράσης των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου 24	
1.5	Βιοενεργά πεπτίδια:.....	25
1.5.1	Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY- 29	
1.6	Προϊόντα ζύμωσης:	31
2	Υλικά & Μέθοδοι	36
2.1	Δείγματα.....	36
2.2	Απομόνωση μικροοργανισμών από τα προϊόντα ζύμωσης	37
2.3	Έλεγχος μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα προϊόντα ζύμωσης.....	37
2.3.1	Χρώση Gram	37

2.3.2	Δοκιμή καταλάσης.....	38
2.4	Μελέτη τεχνολογικών ιδιοτήτων των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα προϊόντα ζύμωσης.....	39
2.4.1	Έλεγχος της ανάπτυξης παρουσία NaCl.....	39
2.4.2	Έλεγχος ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με pH 9,6 39	
2.4.3	Έλεγχος παραγωγής CO ₂	39
2.4.4	Οξυπαραγωγική ικανότητα σε γάλα	40
2.4.5	Πρωτεολυτική δραστικότητα	40
2.4.6	Πεπτιδολυτική δραστικότητα.....	41
2.4.7	Λιπολυτική δραστικότητα	41
2.4.8	Καταβολισμός του κιτρικού οξέος	42
2.4.9	Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών.....	42
2.4.10	Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY- . 43	
2.4.11	Απομόνωση βακτηριακού DNA.....	44
2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων rep- PCR.	45
2.5.1	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	46
2.5.2	Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης	48
2.5.3	Αλληλούχηση του γονιδίου του 16s r RNA :	49
1 μL	50	

3	Αποτελέσματα	51
3.1	Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά	51
3.2	Έλεγχος της παραγωγής οξύτητας σε γάλα.	53
3.3	Πρωτεολυτική και πεπτιδολυτική δραστικότητα.	57
3.4	Λιπολυτική δραστικότητα	71
	Μεταβολισμός κιτρικού οξέος.	76
3.5	Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών.....	82
3.6	Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY	82
3.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων rep PCR.....	89
3.8	Αλληλούχιση του γονιδίου του 16s r RNA :	94
4	Συμπεράσματα	96
5	Βιβλιογραφία	98

1 Εισαγωγή

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ομάδα από Gram θετικά, μη σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση, αρνητικά στην καταλάση, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) σε γαλακτικό οξύ και να παράγουν έτσι ενέργεια. Εμφανίζονται ως κόκκοι, κοκκοβάκιλλοι ή βάκιλλοι και βρίσκονται σε τρόφιμα (γαλακτοκομικά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, ποτά κ.α.). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella* (Stiles & Holzapfel 1997). Διαθέτουν χαμηλή αναλογία (%) των βάσεων γουανίνη - κυτοσίνη (G+C) στο μόριο του DNA τους που δεν υπερβαίνει το 55%. Ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους έχουν το εύρος των 30-40 °C και είναι ανθεκτικοί στα οξέα. Επίσης, έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν σάκχαρα κυρίως σε γαλακτικό οξύ μέσω ομοζυμωτικού (παραγωγή μόνο γαλακτικού οξέος) ή ετεροζυμωτικού (παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, CO₂ και αιθανόλης) μεταβολισμού. Χαρακτηρίζονται από απλό μεταβολισμό υδατανθράκων (άνθρακας ως πηγή ενέργειας) και πρωτεϊνών (άζωτο ως πηγή ενέργειας), από περιορισμένες ικανότητες βιοσύνθεσης και από μικρά γονιδιώματα (De Vuyst & Tsakalidou 2008).

Προκειμένου να παραχθεί μια ιδανική εναρκτήρια καλλιέργεια για μια συγκεκριμένη ζύμωση τροφίμων, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο προσδιορισμός και η περιγραφή της επιθυμητής της λειτουργικότητας. Πάνω σε αυτό στηρίζεται η επιλογή του πλέον κατάλληλου στελέχους ή του συνδυασμού στελεχών. Οι καινοτομίες στο πεδίο των ζυμούμενων τροφίμων που απαιτούν νέα είδη εναρκτήριων καλλιεργειών στηρίζονται ακόμα σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ επιστήμης και τεχνολογίας, ασφαλείας και

νομοθεσίας, αγοραστικής ανάγκης και βούλησης των καταναλωτών αλλά και σε οικονομικούς παράγοντες. Παρά το γεγονός ότι σήμερα η γενετική τροποποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι εφικτή και επιτρέπει τη δημιουργία στελεχών με συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες, η εφαρμογή τους δεν επιτρέπεται από την υπάρχουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Ακόμα και σήμερα η αναζήτηση εναρκτήριων καλλιεργειών βασίζεται στην εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών απομονωμένων από ζυμούμενα τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης. Οι καλλιέργειες ελέγχονται ως προς τις επιθυμητές μεταβολικές ιδιότητες αλλά και τις επιδόσεις τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων. Η μεγάλη ποικιλία των ζυμούμενων τροφίμων που υπάρχουν σήμερα αποτελεί απόδειξη του μεγάλου αριθμού καλλιεργειών που έχουν απομονωθεί με αυτόν τον τρόπο. Στην Ελλάδα υπάρχει μια πολύ μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών με έντονα διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα οποία αποδίδονται κυρίως στο γάλα, τις συνθήκες επεξεργασίας άλλα και την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (Carlice & Fitzgerald 1999).

1.1.1 Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η κλασική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βασίζεται σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, στα οποία περιλαμβάνονται η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα του κυττάρου και άλλα κυτταρικά χαρακτηριστικά. Στις τεχνικές ταξινόμησης έχουν προστεθεί και διάφορα μοριακά χαρακτηριστικά τους, όπως η ποσοστιαία ανά γραμμόμοριο περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), η δομή και η αλληλουχία στην 16S rRNA, οι ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των προϊόντων πολυμερισμού των γονιδίων. Φυλογενετικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στη υποομάδα των κλοστριδίων των Gram+ βακτηρίων. Αυτό ξεχωρίζει τα οξυγαλακτικά βακτήρια από τα είδη του γένους *Bifidobacterium*, που περιέχουν περισσότερο από 55% G + C/ mol στο

DNA τους και πλησιάζουν φυλογενετικά τους ακτινομύκητες (Schleifer & Ludwig 1995).

1.1.2 Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν τους υδατάνθρακες με δύο τρόπους, τον ομοζυμωτικό και τον ετεροζυμωτικό. Ο ομοζυμωτικός τρόπος (Homofermentation) προκαλεί γλυκόλυση των εξοζών και συμβαίνει στα είδη των γενών *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Pediococcus*. Χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση της 1,6-διφωσφο-φρουκτόζης (FDP) σε δύο ισο-τριόζες, την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη (GAP) και την φωσφο-διυδροξυ-ακετόνη, με τη δράση της 1,6-διφωσφορικής αλδολάσης. Από την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ, από το οποίο τελικά παράγεται γαλακτικό οξύ που είναι και το μόνο προϊόν αυτού του τρόπου ζύμωσης. Ο ετεροζυμωτικός τρόπος χαρακτηρίζεται από την οξείδωση της γλυκόζης προς 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, ακολουθούμενο από μια αποκαρβοξυλίωση. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ με τη δράση μιας φωσφοκετολάσης. Το αποτέλεσμα αυτού του τρόπου ζύμωσης της εξόζης παράγει CO₂, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσα μέρη. Εδώ ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά είδη του γένους *Lactobacillus*. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια έχουν επίσης την ικανότητα να χρησιμοποιούν εξωτερικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων για να αναγεννούν το NADH και να αποδίδουν επιπλέον ενέργεια (Leroy & De Vuyst 2004).

1.1.3 Τα κύρια Γένη Οξυγαλακτικών βακτηρίων

Στρεπτόκοκκοι

Οι στρεπτόκοκκοι έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα με επαρκείς πηγές πρωτεϊνών και υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των ιστών του εντερικού σωλήνα, του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, των λαχανικών κ.α. Ο *S. thermophilus* είναι το μοναδικό είδος των στρεπτόκοκκων που χρησιμοποιείται στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού. Αναπτύσσεται μεταξύ 40 και 50 °C και για τη βέλτιστη ανάπτυξή του χρειάζονται βιταμίνες του συμπλέγματος Β και κάποια αμινοξέα. Μαζί με τα είδη *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* και *Lactobacillus helveticus*, χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες εκκίνησης ανάμεικτων στελεχών, με βέλτιστη θερμοκρασία επώασης υψηλότερη των 40° C, όπως στο γιαούρτι και άλλα παρόμοια γαλακτοκομικά προάγοντα. Τα είδη *S. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* εμφανίζουν μία συνεργατική σχέση στην ανάπτυξή τους. Οι στρεπτόκοκκοι έχουν μορφή κόκκων που σχηματίζουν μεγάλες αλυσίδες και περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών, όπως τα ισχυρά παθογόνα βακτήρια *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* και *S. Agalactiae*.(Facklam 2002).

Γαλακτοβάκιλλοι

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι ομοζυμωτικοί και ετεροζυμωτικοί οργανισμοί και έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις. Είναι ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον και τροποποιούν στην όξινη περιοχή το pH των τροφίμων που περιέχουν ζυμώσιμους υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα να μπορούν να αναστείλουν ή και να εξοντώσουν άλλα βακτήρια. Χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης για τυριά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, κρασιά

κ.α. Ανάλογα με το χαρακτήρα της ζύμωσης, οι γαλακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς, προαιρετικά ετεροζυμωτικούς και υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς. Οι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα είδη *Lb. delbruekii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. farmicinis* και *Lb. kefirafaciens*. Το *Lb. acidophilus* χρησιμοποιείται στην παραγωγή ξινόγαλου και κατατάσσεται μαζί με το *Lb. jonsonii* στην κατηγορία των προβιοτικών βακτηρίων. Το *Lb. delbruekii* περιλαμβάνει τα υποείδη *Lb. delbruekii* subsp. *delbruekii bulgaricus* και *lactis*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή γιαουρτιών και τυριών. Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ, αλλά μπορούν να ζυμώσουν και το γλυκονικό οξύ παράγοντας CO₂. Ακόμα ζυμώνουν και τις πεντόζες προς παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα είδη *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* και *Lb. plantarum*. Ο *Lb. casei* ανιχνεύεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τον εντερικό σωλήνα κ.α. (Stiles & Holzapfel 1997).

Λακτόκοκκοι

Το γένος *Lactococcus* είναι σχετικά νέο, καθιερώθηκε μόλις το 1985 από τους Schleifer και συνεργάτες του, και τα περισσότερα είδη του ανήκαν παλιότερα στα γένη *Streptococcus* και. Οι λακτόκοκκοι είναι ομοζυμωτικά βακτήρια και παράγουν L (+) γαλακτικό οξύ. Τα κύτταρά τους έχουν ωοειδές σχήμα, μεγέθους μεταξύ 0,5 – 1,5 μm, και σχηματίζουν ζεύγη και κοντές αλυσίδες. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 30 °C και μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι και σε θερμοκρασία 10 °C, αλλά όχι στους 45 °C. Έχουν πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις και είναι αυξοτροφα για κάποια αμινοξέα και πρωτεΐνες. Στο γένος αυτό ανήκουν τα είδη *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* και *Lc. raffinolactis*. Τα *Lc. lactis* subsp. *lactis* και *cremoris* χρησιμοποιούνται

ευρύτατα στις ζυμώσεις των γαλακτοκομικών προϊόντων (Casalta & Montel 2008).

Leuconostoc

Τα είδη του γένους *Leuconostoc* είναι ετεροζυμωτικά βακτήρια και παράγουν D (+) γαλακτικό οξύ από τις πεντόζες. Έχουν πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν κάποια αμινοξέα, πεπτίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μεταλλικά ιόντα. Έχουν μορφή κοντών βακίλλων, μεγέθους μεταξύ 0,5 – 0,7 x 0,7 – 1,2 μm, και σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα είδη *Leuconostoc argentinum*, *carnosum*, *citreum*, *fallax*, *gelidum*, *lactis*, *mesenteroides* subsp. *cremoris*, *menteroides* subsp. *dextranicum*, *mesenteroides* subsp. *mesenteroides* και *pseudo-mesenteroides* (Ogier et al. 2008).

1.2 Καλλιέργειες εκκίνησης

Ως καλλιέργεια εκκίνησης ορίζεται το μικροβιακό παρασκεύασμα ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, το οποίο προστίθεται σε φρέσκο υλικό, με σκοπό την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης, μέσω της καθοδηγούμενης επιτάχυνσης της ζυμωτικής του λειτουργίας (Leroy & De Vuyst 2004). Σήμερα η παραγωγή προϊόντων ζύμωσης είναι ένας σημαντικός κλάδος της βιομηχανίας τροφίμων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν ταχύτερη οξίνιση του φρέσκου υλικού, μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Επίσης παράγουν αιθανόλη, βακτηριοσίνες, εξωπολυσακχαρίτες, ένζυμα και αρωματικές ενώσεις. Έτσι, ευνοούν τη συντήρηση και μικροβιακή σταθερότητα του τροφίμου, βελτιώνουν τη γεύση και συμβάλουν στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Caplice & Fitzgerald 1999). Ανάλογα με το προς παραγωγή γαλακτοκομικό προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν και οι κατάλληλες καλλιέργειες εκκίνησης. Οι καλλιέργειες εκκίνησης για τα γαλακτοκομικά προϊόντα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

1. **Μεσόφιλες καλλιέργειες (Mesophilic cultures)**, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 21 και 32 °C, στις οποίες ανήκουν τα είδη: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Caplice & Fitzgerald, 1999).

2. **Θερμόφιλες καλλιέργειες (Thermophilic cultures)**, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 38 και 46 °C, στις οποίες ανήκουν τα είδη: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbruekii* subsp. *lactis*, *L. casei* και *L. helveticus* (Caplice & Fitzgerald, 1999).

1.3 Κύριες βιοχημικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων

1.3.1 Πρωτεόλυση

Η πρωτεόλυση είναι ένα από τα κυριότερα βιοχημικά φαινόμενα που συνεισφέρουν στην ωρίμανση των τυριών και ειδικότερα στην ανάπτυξη του αρώματος/γεύσης και τη διαμόρφωση της υφής τους. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ελάχιστα πρωτεολυτικά. Διαθέτουν όμως ένα πρωτεολυτικό σύστημα ικανό να υδρολύει τις καζεΐνες προμηθεύοντας τα κύτταρα με τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη τους στο γάλα, καθώς τα αμινοξέα αυτά είτε δεν υπάρχουν στο γάλα είτε απατώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η ανάπτυξη τους σε χημικώς καθορισμένα υποστρώματα είναι γενικά αργή και είναι εμφανές ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν προσαρμοστεί σε πλούσια περιβάλλοντα αναπτύσσοντας συστήματα για την αποτελεσματικότερη εκμετάλλευση των πηγών αζώτου που υπάρχουν εκεί. Η μετατροπή των πεπτιδίων σε ελεύθερα αμινοξέα και η επακόλουθη χρησιμοποίησή τους, αποτελεί μία από τις κυριότερες δραστηριότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα αμινοξέα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται σε διάφορες διεργασίες όπως είναι η σύνθεση των πρωτεϊνών, η παραγωγή ενέργειας και η ανακύκλωση των αναγωγικών ισοδυνάμων (NADH) (Christensen et al. 1999).

Το πρώτο στάδιο για την αποικοδόμηση των καζεϊνών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια πραγματοποιείται από τις πρωτεϊνάσες που είναι αγκυροβολημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Cell Envelope Proteinases. CEP) και οι οποίες διασπούν τις πρωτεΐνες σε ολιγοπεπτίδια. Έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι των ενζύμων στα οξυγαλακτικά βακτήρια : η PrtP του *Lactococcus Lactis* και του *Lactocobacillus paracasei*, η PrtH του *Lactobacillus helveticus*, η PrtR του

Lactobacillus rhamnosus, η PrtS του *Streptococcus thermophilus* και η PrtB του *Lactobacillus bulgaricus*.(Frees et al. 2007).

Το δεύτερο σημαντικό τμήμα του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί τα διάφορα συστήματα μεταφοράς που διαθέτουν, τα οποία είναι απαραίτητα για την μεταφορά των προϊόντων αποικοδόμησης των καζεϊνών προς το κυτταρόπλασμα. Αυτά είναι τα εξής: α) το σύστημα μεταφοράς αμινοξέων, β) δύο συστήματα μεταφοράς δι- και τριπεπτιδίων (DtpT και DtpP) και γ) το σύστημα μεταφοράς ολιγοπεπτιδίων (Opp), το οποίο δέχεται πεπτίδια με 4 έως 18 αμινοξέα. Το σύστημα DtpP μεταφέρει δι-, τρι- και τετραπεπτίδια που περιέχουν σχετικά υδρόφοβα διακλαδισμένα αμινοξέα και παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια απέναντι στα τριπεπτίδια, ενώ το σύστημα DtpT δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια προς υδρόφιλα δι- και τριπεπτίδια.(Sanz et al. 2003). Το σύστημα μεταφοράς Opp είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υποστρώματα με καζεΐνη, ενώ το σύστημα DtpT δεν είναι. Τέλος αναλύοντας τα καζεϊνικά κλάσματα του γάλακτος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, υπολογίστηκε ότι τα ολιγοπεπτίδια που μεταφέρονται μέσω του συστήματος Opp αντιπροσωπεύουν το 98% της πηγής του αζώτου που χρησιμοποιούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια για την ανάπτυξη τους στο γάλα(Christensen et al. 1999)

Το τρίτο μέρος του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά τις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που διασπούν τα πεπτίδια προς μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα (Engels et al. 1997). Οι ενδοπεπτιδάσες, οι αμινοπεπτιδάσες(PepN, PepC) και η PepX είναι τα πρώτα ένζυμα που δρουν πάνω στα ολιγοπεπτίδια. Οι ενδοπεπτιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί στα οξυγαλακτικά βακτήρια (PepO, PepF, PepG, PepE) είναι όλες μεταλλοπεπτιδάσες με εξαίρεση την PepE του *Lactobacillus Helveticus*, της οποίας η ενεργότητα εξαρτάται από την θειόλη. Ένα κοινό

χαρακτηριστικό των ενδοπεπτιδασών είναι ότι δεν έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την καζεΐνη αλλά μπορούν να υδρολύουν εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς των παραγόμενων καζεϊνικών πεπτιδίων. Οι γενικές αμινοπεπτιδάσες *PerN* και *PerC* έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια και μπορούν να υδρολύουν ολιγοπεπτίδια. Αυτά τα ένζυμα απομακρύνουν αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο ενός μεγάλου εύρους πεπτιδίων που διαφέρουν τόσο σε μέγεθος όσο και σε σύσταση (Christensen et al. 1999).

1.3.2 Λιπολυτική δραστηριότητα

Η λιπόλυση αποτελεί ένα από τα κυριότερα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση των τυριών. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο την απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τα δι-, τρι- και μονογλυκερίδια του γάλακτος. Τα παραγόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα, των οποίων το μήκος της αλυσίδας τους, μπορούν να συμβάλουν ως έχουν στο άρωμα των ζυμώσιμων προϊόντων ή να μετατραπούν σε μεθυλοκετόνες και θειοεστέρες, ενώσεις που επίσης συμβάλλουν στην ανάπτυξη του αρώματος. Τον ίδιο ρόλο διαδραματίζουν και τα δ-κετοοξέα, τα δ-υδροοξέα και οι λακτόνες, τα οποία είναι και αυτά προϊόντα διάσπασης των τριγλυκεριδίων. Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ του ποσοστού των παραγόμενων ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι απαραίτητα για να δώσουν το επιθυμητό άρωμα στα τυριά και της ανάπτυξης ταγκής-δύσοσμης γεύσης ως αποτέλεσμα της υπέρμετρης λιπόλυσης (Collins et al. 2003).

Τα λιπολυτικά ένζυμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορούν να ταξινομηθούν σε στεράσες και λιπάσες, έχοντας ως κριτήρια διαχωρισμού τα εξής: α) Το μήκος της αλυσίδας του υδρολυομένου ακυλο-εστέρα, β) το φυσικοχημικό χαρακτήρα του υποστρώματος και γ) την ενζυμική κινητική. Οι εστεράσες υδρολύουν αλυσίδες ακυλοεστέρων μεταξύ 2-8 ατόμων άνθρακα,

ενώ οι λιπάσες υδρολύουν εστέρες με αλυσίδες 10 ή περισσότερων ατόμων άνθρακα. Επίσης, οι εστεράσες υδρολύουν υδατοδιαλυτά υποστρώματα, ενώ οι λιπάσες γαλακτοποιημένα υποστρώματα. Η ενζυμική κινητική των εστερασών και των λιπασών επίσης διαφέρουν. Οι εστεράσες έχουν κλασική κινητική Michaelis-Menten ενώ οι λιπάσες παρουσιάζουν επιφανειακή Michaelis-Menten κινητική. Γενικά, τα λιπολυτικά ένζυμα είναι εξειδικευμένα πάνω στους εξωτερικούς εστερικούς δεσμούς των τρι- ή διγλυκεριδίων(θέσεις sn-1 και sn-3). Αρχικά, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται προς 1,2- και 2,3- διγλυκερίδια και στην συνέχεια προς 2- μονογλυκερίδια. Το βουτυρικό οξύ, καθώς επίσης και άλλα μικρής και μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, βρίσκεται κυρίως στην θέση sn-3 και είναι αυτό που απελευθερώνεται κατά προτίμηση από τα λιπολυτικά ένζυμα (Collins et al. 2003).

Οι κυριότεροι λιπολυτικοί παράγοντες που επιδρούν κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών περιλαμβάνουν : α) την ενδογενή λιπάση, β) ανάλογα με το είδος του τυριού, τα λιπολυτικά ένζυμα που προστίθενται κατά την τυροκόμηση γ)τις λιπάσες που παράγονται από τα ψυχρότροφα βακτήρια και δ) τις λιπάσες/εστεράσες που παράγονται από τις εναρκτήριοιες καλλιέργειες αλλά και την δευτερογενή μικροχλωρίδα. Οι λιπάσες-εστεράσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται ότι είναι αποκλειστικά ενδοκυτταρικές και ενδεχομένως απαιτείται η αυτόλυση των κυττάρων για την απελευθέρωση και δράση των ενζύμων μέσα στην μάζα του τυριού. Έχει αποδειχθεί ότι οι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι που χρησιμοποιούνται(*Lb. Helveticus*, *Lb delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lb delbrueckii subsp lactis*, *Lb acidophilus*) παράγουν ενδοκυτταρικές εστεράσες ενώ η προαιρετικά ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι (π.χ *Lb. Casei*, *Lb. paracasei* και *Lb plantarum*) που κυριαρχούν στην NSLAB χλωρίδα σε πολλά είδη τυριών, είναι ελάχιστα λιπολυτικοί(Weeney & Ousa 2000).

1.3.3 Καταβολισμός του κιτρικού οξέος:

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν επίσης την ικανότητα να ζυμώνουν και άλλες ενώσεις εκτός από τα σάκχαρα, όπως είναι το κιτρικό οξύ. Το κιτρικό οξύ βρίσκεται σε πολλά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις των τροφίμων, όπως είναι το γάλα, τα φρούτα, τα λαχανικά αλλά κ ως πρόσθετο κατά την παρασκευή ζυμώσιμων λουκάνικων. Ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος μπορεί να γίνει μόνο από ένα περιορισμένο αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η αποικοδόμηση του οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό προϊόντων, όπως είναι το οξικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ, το διακετύλιο, η ακετόνη, η 2,3- βουτανοδιόλη και η ακεταλδεύδη. Ο σχηματισμός του διακετυλίου μπορεί να επιδράσει ιδιαίτερα στα ζυμώσιμα τρόφιμα. Η παρουσία του μπορεί να είναι επιθυμητή, όπως παράδειγμα το βούτυρο και στα τυριά αλλά και σε ανεπιθύμητα προϊόντα όπως η μπίρα, τα ζυμώσιμα αλλαντικά και το κρασί (Hugenholtz 1993; Palles et al. 1998; Starrenburg & Hugenholtz 1991).

Αρχικά, το κιτρικό οξύ μετατρέπεται σε οξαλοξικό οξύ και οξικό οξύ από το ένζυμο κιτρική λυάση. Αυτό το ένζυμο φαίνεται να το διαθέτουν μόνο τα βακτήρια τα οποία αποικοδομούν το κιτρικό οξύ, αφού δεν εντοπίστηκε σε οξυγαλακτικά βακτήρια που δεν το μεταβολίζουν. Το οξικό οξύ που παράγεται είναι χαρακτηριστικό προϊόν του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος. Σε στελέχη των γενών *Lactococcus* και *Leuconostoc* το οξαλοξικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται προς το πυροσταφυλικό οξύ. Από τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος παράγονται και άλλες ενώσεις όπως είναι η ακετόνη, το διακετύλιο και η 2,3 βουτανοδιόλη. Ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος δεν υποστηρίζεται από μόνος του την ανάπτυξη σε συγκεκριμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε ασυνεχείς καλλιέργειες όπου έχει

προσθεθεί κιτρικό οξύ ως η μόνη πηγή ενέργειας (Kimoto et al. 2000; Starrenburg & Hugenholtz 1991).

1.4 Προβιοτικά

Σήμερα ως προβιοτικά ορίζονται «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται ασκούν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου πέραν της εγγενούς επίδρασης της γενικής διατροφής (Guarner & Schaafsma 1998). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να δράσουν ευεργετικά απλά διαβαίνοντας τον πεπτικό σωλήνα. Τα όποια ευεργετικά αποτελέσματα πρέπει να τεκμηριώνονται με καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Σταδιακά ο ορισμός των προβιοτικών αλλάζει καθώς νέα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ακόμη και νεκρά κύτταρα προβιοτικών μικροοργανισμών έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Ως προβιοτικά χρησιμοποιούνται σήμερα διάφορα είδη και γένη μικροοργανισμών. Μεταξύ αυτών κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ειδικότερα οι γαλακτοβάκιλλοι και οι εντερόκοκκοι. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε μεγάλους πληθυσμούς στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Η επιλογή ενός μικροοργανισμού προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό στηρίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια. Οι μικροοργανισμοί πρέπει να μπορούν να επιβιώσουν στις συνθήκες του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος, άρα η ανθεκτικότητα τους σε χαμηλές τιμές pH αλλά και στα υδρολυτικά ένζυμα του πεπτικού σωλήνα καθώς και στα χολικά άλατα είναι σημαντική. Η ικανότητα προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο θεωρείται επίσης σημαντικό κριτήριο σε σχέση με την ικανότητα των προβιοτικών είτε να εμποδίζουν την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών είτε να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο έντερο και να λειτουργούν ανοσορυθμιστικά. Η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών ποικίλει. Φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από τα γαστρικά υγρά όσο και από τη διαδικασία παρασκευής των ίδιων των προβιοτικών. Η

ικανότητα προσκόλλησης εξαρτάται επίσης από τις συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους, τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και τη χρησιμοποίηση κρουοπροστατευτικών κατά τη λυοφιλίωση προκειμένου να συντηρηθεί. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γενικά ανθεκτικοί στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και ταυτόχρονα διαθέτουν τεχνολογικό δυναμικό. Έτσι εξηγείται η ευρεία χρήση τους ως προβιοτικά. Οι μικροοργανισμοί του γένους *Bifidobacterium* αντίθετα είναι ευαίσθητοι στο οξυγόνο και έχουν μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται λιγότερο από τους γαλακτοβακίλλους. (Tuomola, Ouwehand, & Salminen, 2000, Ouwehand, Salminen, & Isolauri, 2002).

1.4.1 Τρόπος δράσης των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου

α) Ρύθμιση της εντερικής χλωρίδας. Η αρχική ιδέα για τη δράση των προβιοτικών ήταν ότι αλλάζουν τη σύσταση της εντερικής χλωρίδας ευνοώντας την επικράτηση των ευεργετικών μικροοργανισμών (*lactobacilli*, *bifidobacteria*) έναντι των επιβλαβών (*coliforms*, *clostridia*), ιδιαίτερα όταν οι αρχικοί πληθυσμοί των πρώτων είναι χαμηλοί. Τα επίπεδα των λιγότερο επιθυμητών βακτηρίων μειώνονται είτε εξ αιτίας του ανταγωνισμού για διατροφικά στοιχεία αλλά και για σημεία προσκόλλησης στον εντερικό βλενογόνο είτε λόγω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. οργανικά οξέα, βακτηριοσίνες) από τα προβιοτικά.

β) Ανοσορυθμιστική δράση. Η εντερική χλωρίδα είναι ένα σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού του εντέρου. Είναι γνωστό ότι απουσία εντερικής χλωρίδας η μεταφορά των αντιγόνων αυξάνεται. Επηρεάζοντας την ανάπτυξη του λεμφοειδούς ιστού του εντέρου η εντερική χλωρίδα συμμετέχει στη ρύθμιση της συστημικής και τοπικής ανοσοαπόκρισης, συμπεριλαμβανομένης και της υπεραπόκρισης σε αντιγόνα που προέρχονται από μικροοργανισμούς και τρόφιμα. Ο αποικισμός του εντέρου σε ανθρώπινα βρέφη σχετίζεται άμεσα με την ωρίμαση των χημικών

ανοσοποιητικών μηχανισμών, και συγκεκριμένα της κυκλοφορίας των κυττάρων που εκκρίνουν IgA και IgM (Gronlund et al. 2000). Η θεραπεία με προβιοτικά στηρίζεται στην αποκατάσταση της μικροοικολογίας και της διαπερατότητας του εντέρου, στη βελτίωση της αμυντικής του λειτουργίας και στην εξάλειψη της φλεγμονώδους απόκρισης (Isolauri et al. 2001).

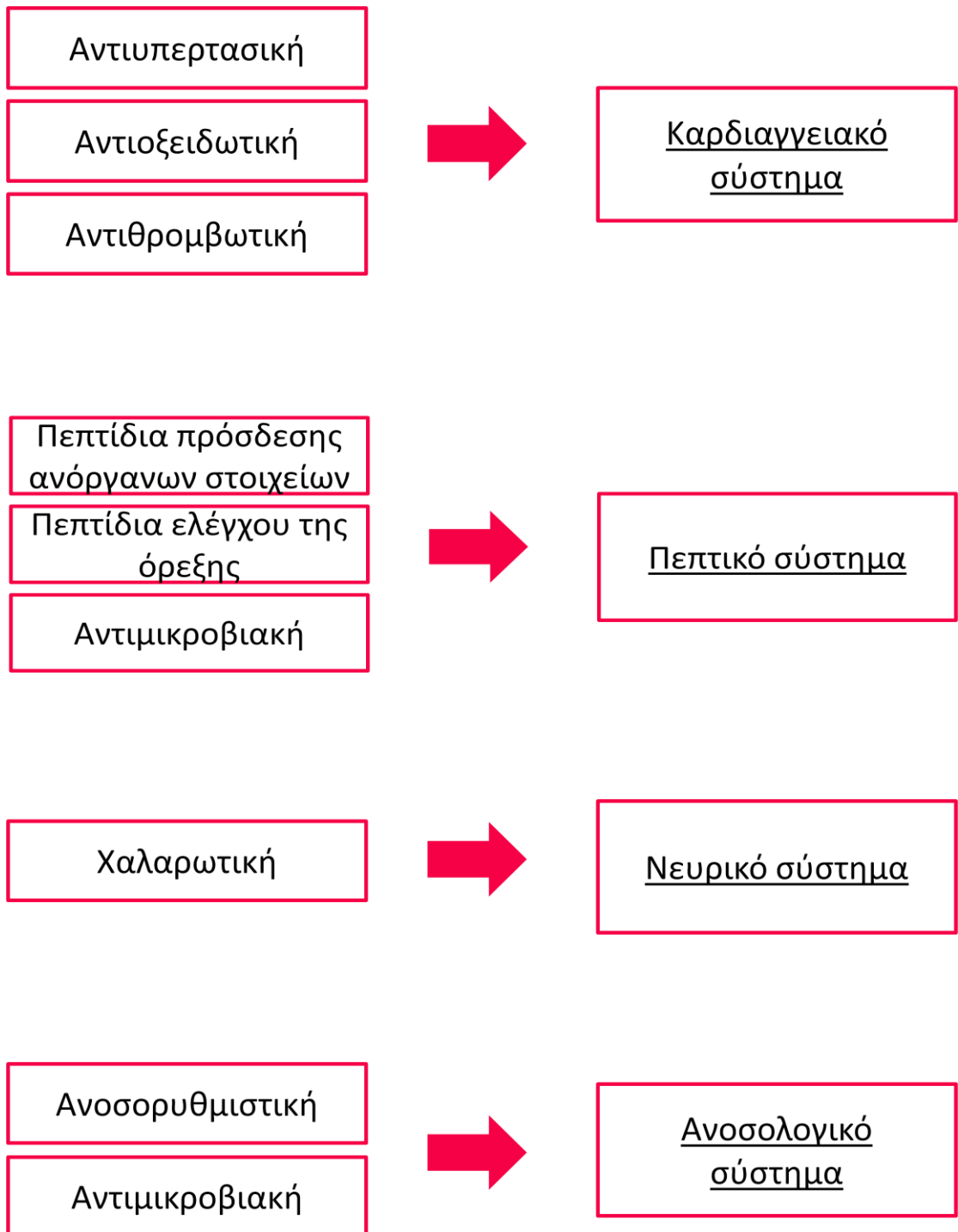
1.5 Βιοενεργά πεπτίδια:

Τις τελευταίες δεκαετίες αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ο ρόλος των πρωτεϊνών ως βιολογικά ενεργά συστατικά της τροφής διότι αποτελούν την κυριότερη πηγή βιοενεργών πεπτιδίων. Με τον όρο "βιολογικά ενεργά" ή "βιοενεργά" πεπτίδια αναφερόμαστε σε ειδικά πρωτεϊνικά κλάσματα, τα οποία συνδυάζουν τα οφέλη της διατροφικής αξίας των πρωτεϊνών από τις οποίες προέρχονται με τη θετική τους επίδραση στις βιολογικές διεργασίες του οργανισμού και την υγεία. Ο όρος βιοενεργά πεπτίδια χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Mellander το 1950 και αναφέρεται στα φωσφορυλιώμενα πεπτίδια που προέρχονταν από τις καζεΐνες του γάλακτος και τα οποία ενίσχυσαν την εναπόθεση ή κατακράτηση του ασβεστίου στα οστά παιδιών που εμφάνισαν ραχίτιδα (Pihlanto-lepp et al. 2001). Πηγές των βιοενεργών πεπτιδίων αποτελούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα και άλλα τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης όπως το ψάρι, το κρέας, το αυγό, η σόγια, το ρύζι και το σιτάρι (Hartmann & Meisel 2007). Το ενδιαφέρον για τη δράση των βιοενεργών πεπτιδίων είναι ιδιαίτερα έντονο από το 1979 έως και σήμερα, όπως αποδεικνύεται και από την αυξητική τάση των επιστημονικών δημοσιεύσεων τα τελευταία χρόνια στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Χρονολογική ανασκόπηση ταυτοποιημένων βιοενεργών πεπτιδίων του γάλακτος (Pihlanto-lepp et al. 2001)

<u>ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ</u>	<u>ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ</u>	<u>ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ</u>	<u>ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ</u>
<u>1950</u>	Φωσφοροπεπτίδια	α_s και β -καζεΐνη	Απορρόφηση ανόργανων στοιχείων
<u>1970</u>	Καζεΐνομορφίνες	α_s και β -καζεΐνη	Νευρικά κύτταρα
<u>1980</u>	Ανοσοπεπτίδια Καζεΐνοκινίνες Καζεΐνοξίνες Λακτορφίνες	α_s και β -καζεΐνη α_s και β -καζεΐνη κ- καζεΐνη α -& β - λακτογλοβουλίνη	Ανοσορύθμιση Αντιυπερτασική Νευρικά κύτταρα Νευρικά κύτταρα
<u>1990</u>	Λακτοφερρίσίνη Λακτοκινίνες	Λακτοφερίνη α -& β - λακτογλοβουλίνη	Αντιμικροβιακή δράση Αντιυπερτασική δράση

Τα βιοενεργά πεπτίδια επιδρούν σε όλα τα βασικά συστήματα ενός οργανισμού όπως το καρδιαγγειακό, το πεπτικό, το νευρικό και το ανοσολογικό σύστημα. Κάποια από αυτά αναπτύσσουν πολύπλευρη δράση εκδηλώνοντας ιδιότητες που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία περισσότερων του ενός συστημάτων. Η δράση, την οποία θα αναπτύξουν τα πεπτίδια αυτά, εξαρτάται μεταξύ άλλων από την σύνθεση τους δηλαδή το είδος των αμινοξέων που τα αποτελούν αλλά και από την αλληλουχία των αμινοξέων αυτών. Το μέγεθος των ενεργών αλληλουχιών ποικίλλει από 2 έως 20 αμινοξέα (Korhonen & Pihlanto 2006).



Σχήμα 1: Φυσιολογική δράση βιοενεργών πεπτιδίων (Korhonen & Pihlanto 2006).

Τα βιοενεργά πεπτίδια δύνανται να είναι φυτικής ή ζωικής προέλευσης. Πρωτεΐνες που περιέχουν βιοενεργά πεπτίδια έχουν βρεθεί στο γάλα, τα αυγά, το κρέας, το ψάρι, αλλά και η σόγια και το σιτάρι. Η πλειονότητα των βιοενεργών πεπτιδίων έχουν απομονωθεί κυρίως από το γάλα και από τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Hartmann & Meisel 2007). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την απομόνωση των βιοενεργών πεπτιδίων. Οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται ακόμα σε εργαστηριακό στάδιο ενώ σε βιομηχανικό επίπεδο παρασκευάζονται μόνο βιοενεργά πεπτίδια από τις καζεΐνες του γάλακτος με απώτερο σκοπό την χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Ως μέθοδος παραγωγής βιοενεργών πεπτιδίων αποτελεί η υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος με διάφορα ένζυμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως η πεψίνη, η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η παγκρεατίνη καθώς επίσης και ένζυμα που προέρχονται από βακτήρια ή μύκητες (Korhonen & Pihlanto 2006). Τα περισσότερα από τα βιοενεργά πεπτίδια που είναι γνωστά έχουν παραχθεί με την χρήση των ενζύμων όπως πεψίνη και θρυψίνη.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος θεωρούνται η κυριότερη πηγή βιοενεργών πεπτιδίων. Από τα προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων προκύπτει ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός βιοενεργών πεπτιδίων (Korhonen & Pihlanto 2006). Η παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων μπορεί να επιτευχθεί εντός του οργανισμού στο μαστικό αδένια των γαλακτοπαραγωγών ζώων ή στο γαστρεντερικό σύστημα των απόγονων τους κυρίως μέσω της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών του γάλακτος.

Οι πρωτεΐνες των τροφίμων εφοδιάζουν τον οργανισμό με αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την σωστή λειτουργία των διαφόρων συστημάτων του ενώ παράλληλα αποτελούν για αυτόν πηγή ενέργειας. Μόλις ενεργοποιηθούν τα βιοενεργά πεπτίδια είναι «εν δυνάμει» ρυθμιστές πολλών λειτουργιών του οργανισμού. Η δράση των βιοενεργών

πεπτιδίων αποτελεί στις ημέρες μας αντικείμενο εντατικής έρευνας παγκοσμίως. Τα στοιχεία που έχουν προκύψει από την έρευνα αυτή φανερώνουν την ύπαρξη ενός ευρέως φάσματος πεπτιδίων του γάλακτος που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν συγκεκριμένες φυσιολογικές λειτουργίες σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειραμάτων που διεξάγονται σε ζώα και ανθρώπους (Korhonen & Pihlanto 2006).

1.5.1 Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY-

Η υψηλή αρτηριακή πίεση είναι ένας βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η καρδιακή ανεπάρκεια. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται συνήθως οι αγγειοδιαστολείς, τα διουρητικά, οι αναστολείς διαύλου ασβεστίου, οι αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτασίνης II και οι ACE αναστολείς. Αυτές οι ουσίες παρεμβαίνουν διαφορετικά και αλληλεπιδρούν με βιοχημικές οδούς που ελέγχουν την πίεση του αίματος, των υγρών και την ισορροπία ηλεκτρολυτών, δηλαδή, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης, το σύστημα κινίνης-καλλικρεΐνης, το ουδέτερο σύστημα ενδοπεπτιδάσης και το σύστημα ενζύμου μετατροπής ενδοθηλίνης. Οι μεταβολικές οδοί που συνδέονται με τον έλεγχο της πίεσης του αίματος έχουν πρόσφατα αξιολογηθεί από τον (Venkatesan et al. 2004)). Το ένζυμο ACE είναι μια εξωπεπτιδάση που διασπά διπεπτίδια από την καρβόξυ-τελική πλευρά των διαφόρων ολιγοπεπτιδίων. Ειδικότερα, το ACE είναι ένα ένζυμο που έχει έναν βασικό ρόλο στο σύστημα ρενίνη-αγγειοτενσίνη, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση και την ισορροπία νερού και άλατος στο σώμα. Αύξηση στην πίεση του αίματος παρατηρείται όταν το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση της αγγειοτενσίνης I στην αγγειοτενσίνη II, η οποία είναι ένας ισχυρός αγγειοσυσταλτικός παράγοντας, και την αποικοδόμηση της βραδυκινίνης, η οποία έχει αγγειοδιασταλτική δράση, σε μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι χρειάζεται. Ως

μέρος του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης, το ACE υδρολύει ένα ανενεργό δεκαπεπτίδιο, την αγγειοτενσίνη I, στο ισχυρό αγγειοσυσταλτικό αγγειοτασίνη II. Το ACE είναι ευρέως κατανεμημένη σε πολλούς ιστούς, σε ορισμένες από τις οποίες άλλα συστατικά της ρενίνης-αγγειοτενσίνης ή το σύστημα κινίνης-καλλικρεΐνη δεν είναι παρόντες: Αυτό ενισχύει την ιδέα ότι το ACE έχει πιθανώς άλλους ρόλους εκτός από την παραγωγή της αγγειοτενσίνης II και την απενεργοποίηση της βραδυκινίνης. Αναστολείς του ενζύμου ACE ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο δηλητήριο του φιδιού. Από τότε, οι συνθετικοί αναστολείς του ACE όπως η καπτοπρίλη, εναλαπρίλη, λισινοπρίλη εναλαπρίλη χρησιμοποιούνται εκτενώς στη θεραπεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης, παρά τις ανεπιθύμητες παρενέργειες τους, όπως υπόταση, βήχα, αυξημένα επίπεδα καλίου, μειωμένη νεφρική λειτουργία, αγγειοοίδημα, κ.α.(Coates 2003) .

Κατά τα τελευταία έτη, η κατανάλωση του γιαουρτιού έχει αυξηθεί με ταχείς ρυθμούς λόγω του γεγονότος ότι αυτό το γαλακτοκομικό προϊόν ικανοποιεί πολλές από τις τρέχουσες διατροφικές ανάγκες. Είναι ένα έτοιμο προς κατανάλωση τρόφιμο με σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, η ζήτηση για τα λειτουργικά τρόφιμα έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης των καταναλωτών από τη σχέση μεταξύ διατροφής και υγείας (Φιτζέραλντ, Murray, & Walsh, 2004). Το γιαούρτι έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικό τρόφιμο για την παραγωγή αυτών των λειτουργικών τροφίμων, ειδικά όταν περιέχει προβιοτικά βακτήρια. Είναι επίσης δυνατό ότι οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του γιαουρτιού μπορεί να αυξηθεί, με βάση τα πεπτίδια που παράγονται κατά τη ζύμωση και την αποθήκευση. Πρόσφατα, μεγάλο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε πεπτίδια που μπορούν να μειώσουν την πίεση του αίματος σε υπερτασικούς ασθενείς, δεδομένου ότι η υπέρταση είναι μια ασθένεια που αυξάνεται με υψηλούς ρυθμούς,

ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες (Chockalingam et al. 2004; Venkatesan et al. 2004).

1.6 Προϊόντα ζύμωσης:

Η βιομηχανική παραγωγή ζυμώμενων προϊόντων βασίζεται στην χρήση εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών. Προκειμένου να παραχθεί μια εναρκτήρια καλλιέργεια κατάλληλη για μία συγκεκριμένη ζύμωση τροφίμου, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο προσδιορισμός και η περιγραφή της επιθυμητής της λειτουργικότητας. Παρόλο που υπάρχουν μέθοδοι για να κατασκευαστούν στελέχη με επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες η εφαρμογή τους δεν είναι αποδεκτή από την πλευρά του καταναλωτικού κοινού. Η αναζήτηση εναρκτήριων καλλιεργειών βασίζεται στην εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών απομονωμένων από τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης. Η επιλογή των κατάλληλων, κατά περίπτωση, καλλιεργειών γίνεται με βάση τις μεταβολικές τους δραστηριότητες αλλά και τις επιδόσεις τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων (Leroy & De Vuyst 2004).

Γαλακτομικά προϊόντα: Κατατάσσονται στην κατηγορία των βασικότερων ειδών διατροφής. Στη χώρα μας η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί παραδοσιακό τομέα δραστηριότητας. Ως οργανωμένος κλάδος αναπτύχθηκε μετά τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ξεκίνησαν τις δραστηριότητες τους μερικές από τις βασικότερες γαλακτοβιομηχανίες του κλάδου. Οι οικογενειακές επιχειρήσεις οι οποίες λειτουργούσαν έως τότε εξελίχθηκαν σε μεγάλες παραγωγικές μονάδες. Η σύγχρονη βιομηχανική παραγωγή αφορά κυρίως στο γάλα κατανάλωσης, το γιαούρτι και τα επιδόρπια γάλακτος.

Γάλα: Το γάλα κατέχει ξεχωριστή θέση ανάμεσα στα άλλα ζωικά και φυτικά τρόφιμα διότι είναι η αποκλειστική τροφή για τον άνθρωπο αλλά και για τα θηλαστικά ζώα, κατά το πρώτο στάδιο της ζωής τους. Από αυτό συμπεραίνεται ότι το γάλα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που

χρειάζεται ένας νέος οργανισμός για να αναπτυχθεί και ιδιαίτερα, επάρκεια πρωτεϊνών και αλάτων.

Γιαούρτι: Το γιαούρτι είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται ύστερα από ζύμωση του γάλακτος με ειδικά οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά είναι ένας συνδυασμός γαλακτοβακίλλου (*Lactobacillus bulgaricus*) και ενός στρεπτοκόκκου (*Streptococcus thermophilus*), τα οποία δρώντας από κοινού προκαλούν την πήξη του γάλακτος και διαμορφώνουν τα ιδιαίτερα γευστικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού.

Ξυνισμένο γάλα η ξινόγαλα: Είναι παραδοσιακό προϊόν ζυμώσεως του βουτυρογάλακτος ή του άπαχου γάλακτος. Η κατανάλωση του στη χώρα μας έμεινε σε χαμηλά επίπεδα. Τελευταία παρατηρείται τάση για διάδοση τέτοιου προϊόντος σε σύγχρονη μορφή. Κατά τον παραδοσιακό τρόπο το βουτυρόγαλα ή το γάλα αφήνεται να υποστεί γαλακτική ζύμωση από την φυσική οξυγαλακτική του χλωρίδα. Η πορεία της ζυμώσεως είναι συχνά ανώμαλη και η πιθανή ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων καθιστά την μέθοδο αυτή ανασφαλής. Η υγιεινή επιβάλλει θέρμανση του βουτυρογάλακτος ή του άπαχου γάλακτος στους 90-95 °C για 15min, ψύξη στους 25-28 °C και εμβολιασμό του με οξυγαλακτική καλλιέργεια σε αναλογία 10-15%. Η οξυγαλακτική καλλιέργεια είτε είναι οξύγαλα προηγούμενης μέρας είτε ειδικά προετοιμασμένη καλλιέργεια σε αποστειρωμένο βουτυρόγαλα ή γάλα με χρήση αφυδατωμένης μητρικής καλλιέργειας. Τα οξυγαλακτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι ο *Lactococcus cremoris*, ο *Lactococcus lactis* και ο *Leuconostoc citrovorum*. Μετά την προσθήκη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας γίνεται επώαση στους 28-30 °C και αφού πήξει θραύεται το πήγμα και το προϊόν μετατρέπεται σε παχύρευστο υγρό το οποίο σκευάζεται σε φιάλες και διακινείται σε θερμοκρασία ψύξεως.

Αλλαντικά: Η χώρα μας έχει παράδοση στην παραγωγή προϊόντων ωρίμανσης σε υψηλότερο επίπεδο από αυτό των άλλων μεσογειακών χωρών

και κυρίως της Ιταλίας. Στην χώρα μας η παραγωγή αφορούσε την κάθε οικογένεια ξεχωριστά και το κάθε σπίτι διέθετε την δική του πατροπαράδοτη τεχνογνωσία και παρήγαγε το δικό του αλλαντικό. Στον 20^ο αιώνα οπότε και άρχισε η μετακίνηση στα αστικά κέντρα αρχίζουν και εμφανίζονται τα πρώτα αλλαντοποιεία στα περισσότερα κρεοπωλεία. Στη σημερινή εποχή υπάρχουν μεγάλες βιομηχανίες που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παραγωγή αλλαντικών χωρίς όμως να προβλέπεται η συμβολή των μικρών παραγωγικών μονάδων οι οποίες θυμίζουν το παραδοσιακό στο συνολικό παραγόμενο προϊόν. Κρεατοσκευάσματα φυσικής ωρίμασης όπως ο παστουρμάς, η λούντζα, τα αυθεντικά σαλάμια Λευκάδος και ορισμένα σουτζούκια, παράγονται κυρίως σε κρεοπωλεία ή μικρά αλλαντοποιεία με τις περισσότερες αλλαντοβιομηχανίες να ρίχνουν περισσότερο βάρος στα σαλάμια αέρος. Τα κυριότερα κατασκευάσματα που παράγονται στην Ελλάδα είναι: σαλάμια αέρος, σουτζούκια, λούντζες, παστουρμάς και προσούτο Ευρυτανίας.

Σαλάμια αέρος : Παράγονται διάφοροι τύποι σαλαμιών αέρος, οι οποίοι διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς τον προσδιορισμό της περιοχής παραγωγής και λιγότερο ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Υπάρχουν διαφορές αφού άλλα είναι περισσότερο αλμυρά, πιο πικάντικα και άλλα πιο λιπαρά ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων κάθε περιοχής. Στη Λευκάδα και στην Ευρυτανία παράγονται τα ομώνυμα φυσικής ωρίμασης σαλάμια. Η τεχνολογία των παραγόμενων σαλαμιών αέρος στην Ελλάδα, τόσο όσο αφορά στη σύνθεση της πρώτης ύλης αλλά και όσον αφορά τις συνθήκες ωρίμασης προσομοιάζει τα ιταλικά προϊόντα.

Λούντζα: Κρεατοσκεύασμα ωρίμασης το οποίο παράγεται σε καθαρά τοπικό επίπεδο, κυρίως στα νησιά των Κυκλάδων και στην Κύπρο. Είναι ένα ολόκληρο κομμάτι χοιρινού κρέατος που αρχικά αλατίζεται και πασπαλίζεται με διάφορα μπαχαρικά με κυρίαρχο τον κόλιανδρο και μπαίνει στο κρασί για

10-15 μέρες. Μετά από αυτό ξεραίνεται σε συνθήκες ωρίμασης για ένα μήνα συνήθως. Στην περίπτωση της καπνιστής λούντζας, το κρεατοσκεύασμα καπνίζεται ελαφρά για 2-3 ώρες.

Σκοπός

Η οξυγαλακτική ζύμωση αποτελεί μία βιοχημική διεργασία, της οποίας τα πλεονεκτήματα ήταν γνωστά στον άνθρωπο εδώ και χρόνια. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τα πιο σημαντικά βακτήρια για τις ζυμώσεις των τροφίμων, συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών και ως εκ τούτου είναι οι πλέον καλύτερα μελετημένοι μικροοργανισμοί. Η αρχική επιλογή των καλλιιεργειών βασίστηκε κυρίως στην ικανότητα τους για ταχεία οξίνιση και την ανθεκτικότητά τους στους φάγους χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι τεχνολογικά σημαντικές βιοχημικές τους ιδιότητες. Η βιοποικιλότητα των εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά του αρχικού προϊόντος που το καθιστούσαν μοναδικό να έχουν χαθεί. Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση νέων στελεχών και η μελέτη των βιοχημικών και των τεχνολογικών τους ιδιοτήτων που σχετίζονται με το δυναμικό εφαρμογής τους ως εναρκτηρίες καλλιιεργειες τροφίμων. Παράλληλα γίνεται μελέτη των ίδιων ιδιοτήτων σε ήδη υπάρχοντα στελέχη της συλλογής του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2 Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Δείγματα

Μελετήθηκαν τα παρακάτω, ήδη υπάρχοντα, στελέχη της συλλογής του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ACA-DC) :

- 18 στελέχη *Lb. delbrueckii bulgaricus* της συλλογής ACA-DC.
- 27 στελέχη *Str. thermophilus* της συλλογής ACA-DC.
- 6 επιλεγμένα στελέχη με προβιοτικές ιδιότητες της συλλογής ACA-DC.

Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα όπως: Γιαούρτι, τυρί φέτα, τυρί κασέρι, τυρί φορμαέλλα και διάφορα άλλα τυριά Π.Ο.Π.

Επίσης μελετήθηκαν 4 δείγματα αλλαντικών και 6 δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων. Όλα τα δείγματα είχαν παρασκευασθεί ακολουθώντας παραδοσιακές τεχνολογίες χωρίς την προσθήκη συντηρητικών.

Αλλαντικά

1. Λούντζα Τήνου
2. Σαλάμι Λευκάδος (Ντελημάρης)
3. Σαλάμι Ευρυτανίας (Στρεμμένος)
4. Λουκάνικο Καρδίτσας (Τσιανάβας)

Γαλακτοκομικά προϊόντα

1. Γιαούρτι Κέρκυρας
2. Γιαούρτι Κορίνθου
3. Γιαούρτι Λήμνου
4. Ξινισμένο γάλα Εργαστηρίου

5. Ξινισμένο γάλα Κάτω Σουλίου
6. Ξινισμένο γάλα Λαρίσης

2.2 Απομόνωση μικροοργανισμών από τα προϊόντα ζύμωσης

Οι μικροβιακές ομάδες που καταμετρήθηκαν ήταν: οι θερμόφιλοι και μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και οι θερμόφιλοι και μεσόφιλοι κόκκοι. Δέκα g από το κάθε δείγμα ομοιογενοποιήθηκαν σε συσκευή stomacher 400 (Seward medical, London, UK) για 2-3 min σε σακούλα ομοιογενοποίησης με αποστειρωμένο διάλυμα reptime water (0,1% w/v πεπτόνης και 0,85% w/v NaCl). Ακολούθησαν 5 διαδοχικές αραιώσεις (από -1 έως -5) σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα ringer. Από κάθε αραιώση εξαπλώθηκαν 0,1 mL στο τρυβλίο με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε αναερόβιο κλίβανο στους 30 °C και 37 °C για 72 h.

Αποικίες από τα τρυβλία εμβολιάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν 10 mL αποστειρωμένο γάλα (10% w/v RSMP και 0,3% w/v yeast extract). Τα δείγματα επωάσθηκαν στους 30 °C και 37 °C μέχρι να πήξει το γάλα. Ελέγχθηκε η ανάπτυξη τους παρατηρώντας την πήξη του γάλακτος και τη δημιουργία ή όχι ορού σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Η αποστείρωση των υλικών έγινε στους 121 °C για 15 min (5 min για το γάλα) και σε υπερπίεση 1,5 bar. Τα υλικά στρώσης των τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι το MRS agar και το M-17 agar.

2.3 Έλεγχος μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα προϊόντα ζύμωσης.

2.3.1 Χρώση Gram

Η χρώση Gram αποτελεί μία διαφορετική μέθοδο χρώσης που χρησιμοποιείται στη μελέτη της μορφολογίας των βακτηρίων και τον έλεγχο

της καθαρότητάς τους. Η διαδικασία ξεκίνησε με επίστρωση του παρασκευάσματος με κρίκο σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σταθεροποίησή του με θέρμανση. Στη συνέχεια τα κύτταρα χρωματίστηκαν με crystal violet (κρυσταλλικό ιώδες) για 1 min ώστε να αποκτήσουν σκούρο μπλε χρώμα. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλύθηκε με νερό και ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος ιωδιούχου καλίου για 30 s. Το δείγμα αποχρωματίστηκε με αιθανόλη,. Κατά τον αποχρωματισμό απομακρύνθηκε η μωβ στρώση από τα Gram-αρνητικά βακτήρια, ενώ αντίθετα τα Gram-θετικά δεν αποχρωματίστηκαν και διατήρησαν το σκούρο μπλε χρώμα. Η αιθανόλη ξεπλύθηκε με νερό. Η μέθοδος ολοκληρώθηκε με προσθήκη σαφρανίνης για 30 s, η οποία βάφει τα Gram-αρνητικά κόκκινα. Έτσι με την χρώση κατά Gram διακρίνονται 2 κατηγορίες: Gram-θετικά που στο μικροσκόπιο εμφανίζονται με σκούρο μπλε χρώμα και τα Gram-αρνητικά που στο μικροσκόπιο εμφανίζονται κόκκινα. Ο έλεγχος της καθαρότητας των μικροοργανισμών με χρώση Gram γινόταν πριν από κάθε προσπάθεια καθαρισμού.

2.3.2 Δοκιμή καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που όταν παράγεται από τα βακτήρια καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο:



Το ένζυμο καταλάση περιέχει την αιμοπορφυρίνη. Η δομή της είναι χαρακτηριστική όχι μόνο για την καταλάση αλλά και για το κυτόχρωμα. Αρνητικά ως προς την καταλάση είναι τα οξυγαλακτικά και αρκετά αναερόβια βακτήρια, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Clostridium*. Για τη δοκιμή της καταλάσης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκε φρέσκια αποικία και 1 mL διαλύματος

H₂O₂ αραιωμένου 1:10 με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια έγινε παρατήρηση της δημιουργίας αφρισμού.

2.4 Μελέτη τεχνολογικών ιδιοτήτων των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα προϊόντα ζύμωσης

2.4.1 Έλεγχος της ανάπτυξης παρουσία NaCl

Φρέσκια καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 10 mL MRS broth (εμβόλιο 1%v/v) που περιείχε NaCl 2, 4 ή 6,5% w/v και επώαστηκε στους 30 ή 37 °C για 48 h. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν εμφανιστεί θόλωμα ή ίζημα στο υγρό θρεπτικό μέσο.

2.4.2 Έλεγχος ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με pH 9,6

Φρέσκια καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 10 mL MRS broth (εμβόλιο 1%v/v), του οποίου το pH έχει είχε ρυθμιστεί με διάλυμα 1N NaOH στο 9,6. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37 °C για 5 ημέρες. Θετική θεωρείται όταν εμφανιστεί θόλωμα ή ίζημα στο υγρό θρεπτικό μέσο.

2.4.3 Έλεγχος παραγωγής CO₂

Φρέσκια καλλιέργεια γαλακτοβακίλλων και κόκκων εμβολιάστηκε (1% v/v) σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL τροποποιημένου MRS broth (μίγμα πεπτονών (Mixed peptones),], γλυκόζη, φωσφορικό κάλιο, οξικό νάτριο, θεικό μαγνήσιο Magnesium sulphate, θεικό μαγγάνιο Manganese sulphate, Tween 80), στους οποίους είχαν τοποθετηθεί ανεστραμμένοι

σωλήνες Durham. Το συγκεκριμένο υλικό δεν περιέχει meat extract ούτε κιτρικό οξύ. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37 °C για 2-5 μέρες. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν παράγεται αέριο, το οποίο εγκλωβίζεται στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham.

2.4.4 Οξυπαραγωγική ικανότητα σε γάλα

Για να εξεταστεί η οξυπαραγωγική ικανότητα των καλλιεργειών μετρήθηκε το pH μετά από 6 h επώασης σε αποβουτυρωμένο εργαστηριακό γάλα (Reconstituted Skim Milk, RSM, 10% w/v) στους 30 ή στους 37 °C ανάλογα με την καλλιέργεια (εμβόλιο 1%, v/v).

2.4.5 Πρωτεολυτική δραστηριότητα

Οι καλλιέργειες ανανεώθηκαν δύο διαδοχικές φορές σε άπαχο γάλα (10% v/v) με εκχύλισμα ζύμης 0,3 % (w/v) και επώαστηκαν στους 30 ή 37 °C για 24 h. Η τελική ανάπτυξη έγινε σε 5 mL άπαχου γάλακτος (10% w/v, εμβόλιο 1% v/v) με επώαση στους 30 ή 37 °C για 24 h. Μετά το τέλος της ανάπτυξης προστέθηκαν 5 mL τριχλωροξικού οξέος (TCA) 12% w/v, τα δείγματα ομοιογενοποιήθηκαν με ανάδευση και παρέμειναν για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εν συνεχεία, 1 mL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια τύπου erpendorf και φυγοκεντρήθηκε (12.500 rpm/min για 5 min στους 10 °C) Το διάλυμα της ο-φθαλδουαλδεΐδης (OPA) παρασκευάστηκε λίγο πριν την ανάλυση με ανάμειξη 25 mL 100 mM τετραβορικού νατρίου, 2,5 mL 20% w/v SDS, 40 mg αντιδραστηρίου OPA (σε 1mL μεθανόλη) και 100 μL β-μερκαπτοαιθανόλης μέχρι τελικού όγκου 50 mL με απιονισμένο H₂O. Ποσότητα 50 μL από το υπερκείμενο αναμείχθηκε με 1 mL αντιδραστηρίου OPA, αναδεύτηκε καλά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 340 nm, μετά από 2 min έναντι τυφλού. Ως τυφλό της φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε δείγμα το οποίο περιείχε 50 μL απιονισμένου νερού και 1

mL αντιδραστηρίου OPA. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα λευκίνης σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη.

2.4.6 Πεπτιδολυτική δραστηριότητα

Για να γίνει η παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 min στους 4° C και στη συνέχεια εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα 0,9% w/v NaCl. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η λύση των κυττάρων με επαναιώρηση σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM φωσφορικού και όξινου φωσφορικού καλίου, pH 7,5 που περιείχε λυσοζύμη (τελική συγκέντρωση 2 mg/mL) και επώαση στους 37° C για 2 h. Μετά από τελική φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 15 min στους 4° C κρατήθηκαν τα υπερκείμενα που αποτέλεσαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα. Για τον προσδιορισμό της πεπτιδολυτικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε ένα συνθετικό υπόστρωμα και συγκεκριμένα η γλυκίνη-προλίνη-ρ-νιτροανιλίδιο . Κυτταρικό εκχύλισμα όγκου 25 μL και διάλυμα του υποστρώματος (25 μL, 20 mM σε μεθανόλη) επωάστηκαν σε 200 μL 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 7,0, για 1 h στους 37 C. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αντί του κυτταρικού εκχυλίσματος. Για τη μεταβολή της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο Sunrise Tecan, Ges, Austria και η φωτομέτρηση έγινε στα 410 nm. Με βάση τις τιμές της μεταβολής της απορρόφησης ανά min, η πεπτιδολυτική δραστηριότητα εκφράστηκε σε Units/mL δείγματος.

2.4.7 Λιπολυτική δραστηριότητα

Τα στελέχη ανανεώθηκαν σε MRS ή M17 ανάλογα με το εάν ήταν βάκιλλοι ή κόκκοι αντίστοιχα για 24 h στους 30 ή 37° C. Η τελική ανάπτυξη

έγινε σε 5 mL του ίδιου θρεπτικού υποστρώματος υπό τις ίδιες συνθήκες. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εξάπλωση σε τρυβλία με Nutrient Agar (1,5% agar w/v, pH 6,8) που περιείχε 1,0% w/v αραβικό κόμμι(gum Arabic) και 1,0% w/v τριβουτυρίνη . Το θρεπτικό υπόστρωμα ομοιογενοποιήθηκε σε συσκευή ULTRA TARRAX (20.500 rpm) για 5 min και αποστειρώθηκε στους 121° C σε υπέρ-πίεση 1,2 bar. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 7 μέρες στους 30 ή 37° C και κάθε μέρα γινόταν παρατήρηση για το σχηματισμό διαυγούς ζώνης γύρω από τις αποικίες.

2.4.8 Καταβολισμός του κιτρικού οξέος

Ο έλεγχος του καταβολισμού του κιτρικού οξέος πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή ανάπτυξης στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Simmons Citrate Agar, το οποίο περιέχει ως μοναδική πηγή άνθρακα το κιτρικό οξύ. Τα στελέχη ανανεώθηκαν δύο διαδοχικές φορές σε MRS ή M17 broth και επωάστηκαν στους 30° C ή 37° C για 7 μέρες. Θετικός στον καταβολισμό του κιτρικού οξέος θεωρείται ο μικροοργανισμός, όταν αναπτυχθούν αποικίες και το χρώμα του υποστρώματος μεταχρωματισθεί από πράσινο σε μπλέ.

2.4.9 Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών

Τα στελέχη ανανεώθηκαν σε MRS ή M17 ανάλογα με το εάν ήταν βάκιλλοι ή κόκκοι αντίστοιχα για 24 h στους 30 ή 37° C. Η τελική ανάπτυξη έγινε σε 5 mL του ίδιου θρεπτικού υποστρώματος υπό τις ίδιες συνθήκες. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εξάπλωση σε τρυβλία με Ruthenium milk agar (1.5% w/v agar) το οποίο περιέχει 10% w/v σκόνη γάλακτος skim milk powder, 1% w/v σουκρόζη, 1% w/v yeast extract και ,0.08 g/L ερυθρό του ρουθενίου (ruthenium red). Το θρεπτικό υπόστρωμα ομοιογενοποιήθηκε και

αποστειρώθηκε στους 121° C σε υπέρ-πίεση 1,2 bar. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 7 μέρες στους 30 ή 37° C και κάθε μέρα γινόταν παρατήρηση για το σχηματισμό αποικιών με κόκκινο χρώμα.

2.4.10 **Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY-**

Η τελική ανάπτυξη των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε 10% w/v γάλα RSM με 3% v/v εμβόλιο. Έγινε επώαση για 24 και 48 h και διακοπή της ανάπτυξης με επώαση στους 75 °C για 1 min σε υδατόλουτρο. Για να γίνει η παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 rpm για 20 min στους 5 °C. και τα υπερκείμενα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα PVDF με διάμετρο πόρου 0,45 μm. Στη συνέχεια τα δείγματα (όγκος 1 mL) λυοφιλώθηκαν για 24 h και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης 40 μL κάθε δείγματος αναμίχθηκαν με 100 μL 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος βορικού νατρίου, που περιείχε 0,3 M NaCl και 5 mM υποστρώματος hippuryl-histydil-leucine. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μL του ενζύμου ACE και έγινε επώαση για 90 min στους 37 °C. Για τη διακοπή της αντίδρασης προστέθηκαν 150 μL 1M HCl. Για την εκχύλιση του hippuric acid προστέθηκαν 1000 μL ethyl acetate σε κάθε δείγμα και στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν έντονα για 20 s και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 2.000 rpm. Μετά την φυγοκέντριση μεταφέρθηκαν 750 μL της οργανικής φάσης σε νέο μικροϋποδοχέα και στη συνέχεια επωάτηκαν στους 90 °C για 30 min έτσι ώστε να εξατμιστεί πλήρως το ethyl acetate. Ακολούθησε διάλυση του hippuric acid σε 800 μL απιονισμένου νερού. Τέλος τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 228 nm.

2.4.11 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Για να γίνει η παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 2 min στους 4° C. Μετά τη συλλογή των κυττάρων σε μικροϋποδοχεία τύπου errendorf όγκου 1,5 mL, προστέθηκε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 10000 rpm για 2 min, απόχυση του υπερκειμένου και προσθήκη 1,5 mL PBS και θέρμανση στους 65 °C για 10 min. Μετά από φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες, έγινε απόχυση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος. Προστίθενται 100 µL lysozyme (50 mg/mL), 10 µL mutanolysin (5 U/µL) και 10 µL RNAase (kit GenElute). Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 min με περιοδική ανάδευση των errendorfs. Σε απαγωγό προστίθεται 0,5 mL GES reagent γίνεται ανάδευση και έλεγχος της λύσης για 5 min. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για περίπου 5 min και προστίθεται 0,25 mL διαλύματος παγωμένου οξικού αμμωνίου(7,5 mol / L), έγινε ήπια ανάδευση και τοποθέτηση ξανά σε πάγο για περίπου 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται 0,5 mL χλωροφορμίου γίνεται ήπια ανάδευση και τοποθετείται ξανά σε πάγο για περίπου 10 min. Τέλος εντός του απαγωγού προστίθεται 0,5 mL χλωροφόρμιο και γίνεται ήπια ανάδευση ώστε να αναμιχθούν οι 2 φάσεις. Εκτός απαγωγού γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000 rpm για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται με πιπέτα σε καθαρό errendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 0,54 όγκοι παγωμένης ισοπροπανόλης και γίνεται ήπια ανάδευση μέχρι να κατακρημνισθεί το DNA. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 7000 rpm για 1 min και αποχύθηκε το υπερκείμενο. Προστίθεται 0,7 mL παγωμένης αιθανόλης και γίνεται ανάδευση ώστε να ξεκολλήσει το ίζημα του DNA στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση σε 6.500 rpm για 3 min και αποχύθηκε το υπερκείμενο. Γίνεται πλύσιμο με αιθανόλη συνολικά 5 φορές. Στο τελευταίο πλύσιμο, αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος γίνεται τοποθέτηση των errendorfs με ανοιχτά τα καπάκια σε κλίβανο στους

37 °C για 10 min με σκοπό να εξατμιστεί η αιθανόλη και γίνεται προσθήκη μικρού όγκου ρυθμιστικού διαλύματος TE buffer (40-60 μL).

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων *rep-PCR*.

Πρόκειται για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με χρήση ενός εκκινήτη με παλίνδρομη αλληλουχία που υβριδίζει σε διακριτές περιοχές ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού γονιδιόματος. Περιέχει διασκορπισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (dispersed repetitive sequences) που ανευρίσκονται και στους δυο κλώνους του πυρηνικού καθώς και στο πλασμιδιακό DNA του προκαρυωτικού γονιδιόματος. Η μέθοδος που αναφέρεται ως *rep-PCR* αναπτύχθηκε στηριζόμενη στην παρατήρηση της παρουσίας συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διασπαρμένων σε ολόκληρο το γονιδίωμα των κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων) αλλά και μυκήτων. Έτσι αναπτύχθηκαν αντίστοιχα οι *rep-PCR*, *ERIC-PCR* και *BOX-PCR* μεθοδολογίες για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Παρόλα αυτά ο όρος *rep-PCR* χρησιμοποιείται για να περιλάβει όλες τις παραπάνω μεθοδολογίες. Η μεθοδολογία αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη και γρήγορη. Πρωταρχική εφαρμογή αυτών έγινε στα πρότυπα γωνιώματα των *Escherichia coli* και *Salmonella*. Η οικογένεια των εκκινήτων REP έχει μήκος μεταξύ 33 και 40 bp, και δίνει 500 έως 1000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Τα ενισχυμένα θραύσματα όταν διαχωριστούν/αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση, αποτελούν ένα γονιδιωματικό δακτυλικό αποτύπωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση σε υποείδη και στελέχη (Rademaker et al. 2000).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι *rep-PCRs* με τον εκκινήτη BOXA1R και το OneTaq-quick load2xMastermix with standard buffer (New England

Biolands,UK) για την BOX-PCR. Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε σε όλα τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά (Πιν.2). Οι συνθήκες ήταν ίδιες και για τις δύο αντιδράσεις και ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα: 2 min στους 92 ° C, 30 κύκλοι με 30 s στους 92 ° C 2 min στους 40 °C, 3 min στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 3 min στους 72 °C. Στο πίνακα αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις.

Πίνακας 1: Περιγραφή αντιδραστηρίων για την rep-PCR

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Ποσότητα ανά αντίδραση</u>
2xReadyMix	12,5 μL
DNA template	1 μL (25 ng/μL)
BOXA1R (7.5 pMol/μL)	1 μL
ddH2O	10,5 μL
Τελικός όγκος	25 μL

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια :

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Running buffer). Σύσταση πυκνού (50×): 242 g Tris, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 mL Glacial acetic acid, απιονισμένο νερό (dd H₂O) έως τελικού όγκου 1000 mL.
- Αγαρόζη συγκέντρωσης 1,2% w/v των εταιριών BioRad και Nippon Genetics.
- 50 bp DNA Ladder της εταιρίας New England Biolabs (NEB).
- Βρωμιούχο αιθίδιο 6 μL (10 mg/mL)
- Διάλυμα φόρτωσης (6×(Loading Buffer) της εταιρίας NEB με σύσταση (1×): 2,5 % v/v Ficoll 400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,017% w/v SDS, 0,015% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης, με pH 8 στους 25 °C.

Διαδικασία :

- Έγινε διαλυτοποίηση με θέρμανση 1,44 g αγαρόζης σε 120 mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE.
- Προστέθηκαν 5 ή 10 μL EtBr, ανάλογα με τον όγκο της πήκτης, πριν τον πολυμερισμό της αγαρόζης και μεταφορά του μίγματος σε κατάλληλο καλούπι για να στερεοποιηθεί.
- Στη συνέχεια τοποθετείται σε απόσταση περίπου 2 cm από την άκρη του καλουπιού πλαστικής «χτένας», κάθετα στο υγρό, βυθισμένη σε αυτό, έτσι ώστε μετά τον πολυμερισμό, να δημιουργηθούν τα κατάλληλα μικρά «πηγαδάκια» στο πήκτωμα, σημεία στα οποία θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό δείγματα DNA.
- Μετά τον πολυμερισμό, η πήκτη τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (Running buffer), έτσι ώστε η πήκτη να βρίσκεται πλήρως βυθισμένο σε αυτό.
- Τα δείγματα φορτώνονται στα «πηγαδάκια» με μια πιπέτα. Πριν τη φόρτωση, στα δείγματα προστίθεται μικρή ποσότητα loading buffer το οποίο αυξάνει το ιξώδες τους, λόγω της φικόλης που περιέχει, με αποτέλεσμα τα δείγματα να καθιζάνουν στα «πηγαδάκια». Στο αρχικό πηγαδάκι, προστίθενται 4 μL από τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών.
- Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κατάλληλου τροφοδοτικού, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα δύο άκρα της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης είναι εμφανής χάρη στη χρωστική, κυανού της βρωμοφαινόλης, που περιέχει το loading buffer.
- Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται μετά την πάροδο επιθυμητού χρόνου, περίπου δύο ωρών, δεδομένου ότι έχει γίνει ο διαχωρισμός των ζωνών του DNA.

2.5.2 Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται ορατό με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV Transilluminator) ώστε να μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες που έχουν δημιουργηθεί. Εάν η απομόνωση DNA είναι επιτυχής, τα μόρια-DNA διακρίνονται ως πορτοκαλί ζώνες, λόγω της απορρόφησης του βρωμιούχου αιθιδίου. Η συσκευή συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι οι πηκτές αγαρόζης φωτογραφίζονται άμεσα. Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται επεξεργασία και αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν ώστε να επακολουθήσει τυποποίηση σε επίπεδο στελεχών με την βοήθεια του αλγορίθμου U.P.G.M.A. του προγράμματος Bionumerics.

Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Image Analysis:

Το πρόγραμμα Image Analysis συγκρίνει τις ζώνες των αγνώστων στελεχών με τους μάρτυρες των μοριακών μεγεθών και στηριζόμενο στην απόκλιση και την ποσότητα ζωνών, δημιουργεί ένα φυλογενετικό δέντρο στο οποίο ομαδοποιούνται τα στελέχη. Από αυτά επιλέχθηκαν ενδεικτικά κάποια στελέχη για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια 16s-rDNA PCR, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή τους.

2.5.3 Αλληλούχηση του γονιδίου του 16s r RNA :

Είναι μέθοδος για την μοριακή ταυτοποίηση οξυγαλακτικών στελεχών και βασίζεται στην ταυτοποίηση του οπερονίου του ριβοσωμικού DNA (rDNA) για την ανάλυση πληθυσμών. Οι φυλογενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν το γονίδιο 16S rRNA δίνουν σημαντικές ταξινομικές πληροφορίες, όμως εξαιτίας της καθολικής φύσης αυτού, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάκριση σε επίπεδο στελέχους παρά μόνο σε επίπεδο γένους και είδους. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί το rRNA όντας η πιο συντηρημένη (λιγότερο μεταβλητή) αλληλουχία DNA σε όλα τα κύτταρα λόγω της πολυπλοκότητας του ρόλου που εκτελεί στο κύτταρο. Ταυτόχρονα, μελέτες δείχνουν, ότι πολλές φορές οι αλληλουχίες αυτές δεν είναι κατάλληλες ως δείκτες φυλογενετικής ανάλυσης επειδή η ένθεση και η έλλειψη αρκετών νουκλεοτιδίων είναι ένα συχνό φαινόμενο στις αλληλουχίες αυτές.. Οι φυλογενετικές μελέτες χρησιμοποιούν το γονίδιο 16S rRNA, σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα και σε διαφορετικές ομάδες οργανισμών. Οι περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση των ειδών βασίζονται στην ενίσχυση του γονιδίου με τη μέθοδο της PCR, και έπειτα μπορεί να ακολουθήσει, η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) (Apostolidis et al. 2001, Thollesson et al, 1999).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε 16S rRNA-PCR με τους εκκινητές 16s F και 16s R (VBC- Bioteck, Vienna Austria) και την πολυμεράση της Kappa Biosystem Taq Invitrogen, Carlsbad, CA,USA. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 2 min στους 94 °C, 30 κύκλοι με 30 s στους 94 °C, 30 s στους 56 °C, 1 min και 20 s στους 72 °C. Μετά το πέρας των 30 κύκλων, ακλούθησαν 5 min στους 72 °C. Στον πίνακα 8 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 2: Περιγραφή αντιδραστηρίων για την 16s rRNA.

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Ποσότητα ανά αντίδραση</u>
Καπα Ταq ReadyMix	25 μ L
DNA template	1 μ L (25 ng/ μ L)
Primer F (7.5 pMol/ μ L)	1 μ L
Primer R (7.5 pMol/ μ L)	1 μ L
ddH ₂ O	10,5 μ L
Τελικός όγκος	50 μL

3 Αποτελέσματα

3.1 Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά

Η μελέτη των μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών αποτελεί μια σειρά κλασικών δοκιμών ταυτοποίησης. Οι δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται από πολύ παλιά από ερευνητές που ασχολούνται με θέματα ταξινόμησης και κατάταξης ομάδων μικροοργανισμών, δεν έχουν χάσει την αξία τους και την σημασία τους και αποτελούν βασικό κομμάτι για την ταυτοποίηση τους.

Συμφώνα με τις μορφολογικές και φυσιολογικές δοκιμές οι οποίες εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη των βακίλων και κόκκων που απομονώθηκαν από μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, αναπτύχθηκαν στους 45 °C μέσα σε διάστημα 2 ημερών. Όσον αφορά τους βακίλους στους 15 °C σε διάστημα 5 ημερών, 5 στελέχη δεν αναπτύχθηκαν. Επίσης 9 στελέχη από τους κόκκους δεν έδωσαν ανάπτυξη στους 10° C σε διάστημα 7 ημερών. Στη συνέχεια, όλα τα στελέχη των κόκκων αναπτύχθηκαν σε NaCl 2,4%(w/v), όμως σε συνθήκες NaCl 6,5% και σε pH 9,6, 6 στελέχη από τα 22 δεν αναπτύχθηκαν. Κανένα στέλεχος δεν παρήγαγε CO₂ από την γλυκόζη και δεν παρουσίασε κινητικότητα. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συμφωνούν με τα γενικά, τυπικά, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά που ισχύουν για την πλειοψηφία των ειδών των κόκκων και βακίλλων. Σε πολλές εργασίες ταυτοποίησης οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία έχουν απομονωθεί από ζώα, ψάρια, ζωικά καθώς και γαλακτομικά προϊόντα, η εφαρμογή μορφολογικών και φυσιολογικών δοκιμών αποδείχτηκε πολύτιμη αφού διαχώρισε αποτελεσματικά και αξιόπιστα την ομάδα των εντεροκόκκων από τα υπόλοιπα οξυγαλακτικά βακτήρια. (Sarantinopoulos et al. 2001).

Πίνακας 3: Προέλευση στελεχών και ομαδοποίηση σύμφωνα με την μορφολογία τους.

ΒΑΚΙΛΛΟΙ		ΚΟΚΚΟΙ			
Στελέχη	Προέλευση	Στελέχη	Προέλευση	Στελέχη	Προέλευση
311	Γιαούρτι, Κορίνθου	131	Γιαούρτι, Κέρκυρας	Σ1	Λούτζα, Τήνου
312		132		Σ2	
313		133		Σ3	
314		231		Σ4	
315		231(1)		Σ5	
411	Γιαούρτι, Λήμνου	232	Γιαούρτι, Κέρκυρας	Σ6	Σαλάμι, Λευκάδας
611	Ξινόγαλα, Λαρίσης	233	Γιαούρτι, Κορίνθου	Σ7	
612		331		Σ8	
613		332		Σ9	
614		333		Σ10	
711	Ξινόγαλα, Κορίνθου	431		Σ11	Σαλάμι, Στρεμμένος
811	Ξινόγαλα, Κ Σουλίου	432	Γιαούρτι, Λήμνου	Σ12	
815		433		Σ13	
911	Ξινόγαλα, Εργαστηρίου	434	"		
912		511	Ξινόγαλα, Εργαστηρίου		
913		512			
914		513			
915		523			
621	Ξινόγαλα, Λαρίσης	531		"	
622		534			
623		633	Ξινόγαλα, , Λαρίσης		
625		813	Ξινόγαλα Κ Σουλίου		
722	Ξινόγαλα, Κορίνθου				
723					
724					
735					
824	Ξινόγαλα, Κ Σουλίου				
921	Ξινόγαλα, Εργαστηρίου				
922					
923					
925					
931					
934					

3.2 Έλεγχος της παραγωγής οξύτητας σε γάλα.

Η γρήγορη μείωση του pH στα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών αποτελεί ένα στοιχείο αποφασιστικής σημασίας κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους, αφού η πτώση του pH είναι απαραίτητη για την πήξη του γάλακτος και ταυτόχρονα παρεμποδίζει ή μειώνει την ανάπτυξη της τυχαίας μικροχλωρίδας.

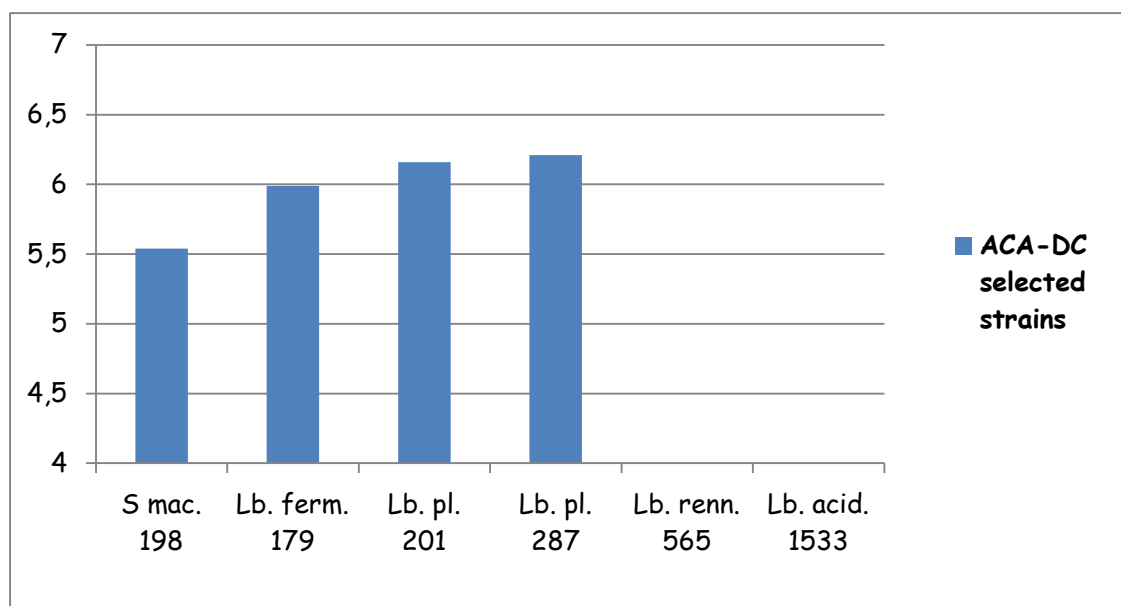
Το αρχικό pH του γάλακτος ήταν 6,6. Μετά από 6 h επώασης οι τιμές του pH κυμαίνονταν μεταξύ 4,9 και 6,6. Λαμβάνοντας υπόψη το είδος των στελεχών παρατηρείται ότι:

- Από τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, κανένα δεν παρουσίασε τιμή pH μικρότερη του 5,3.
- Από τα 22 στελέχη κόκκων τα οποία απομονώθηκαν επίσης από τα από τα ίδια μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, μόλις 3 παρουσίασαν τιμή pH κάτω από 5,3.
- Από τα 13 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τα αλλαντικά, μόνο τα 3 αναπτύχθηκαν και έδωσαν κατά μέσο όρο τιμή υψηλότερη από 5,3. Τα υπόλοιπα δεν αναπτύχθηκαν στο γάλα και δεν μπόρεσε να γίνει η μέτρηση.
- Από τα 18 υπάρχοντα στελέχη της Συλλογής *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, τα 10 έδωσαν τιμή pH χαμηλότερη του 5,3.
- Από τα 27 υπάρχοντα στελέχη της Συλλογής ACA-DC *Streptococcus thermophilus*, τα 17 δώσανε τιμή pH κατώτερη του 5,3.
- Τέλος από τα 4 προβιοτικά στελέχη ACA-DC κανένα δεν έδωσε τιμή pH χαμηλότερη του 5,3.

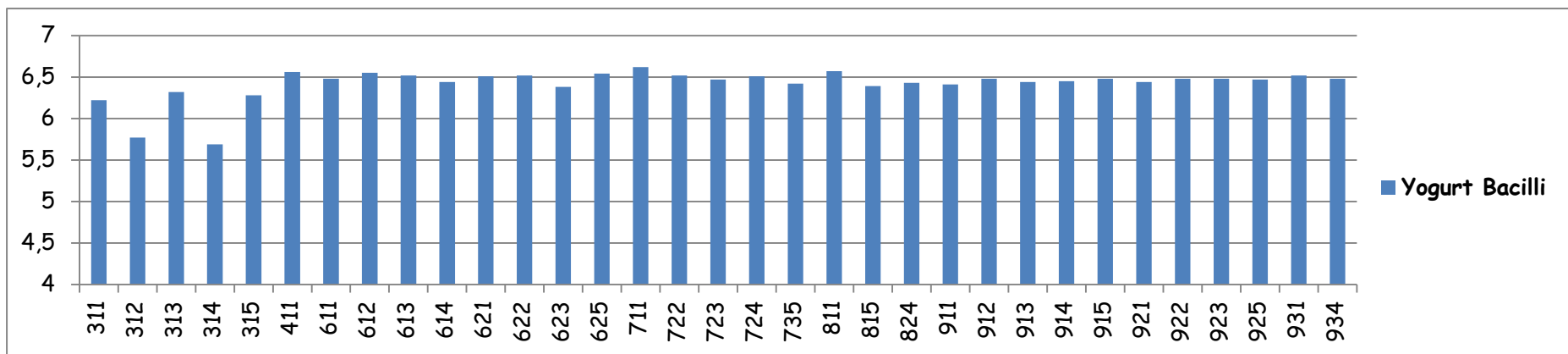
Ως εναρκτηρίες καλλιέργειες μπορούν να οριστούν τα στελέχη τα οποία παράγουν οξύ ικανό να προκαλέσει μείωση του pH του γάλακτος σε τιμές

χαμηλότερες από 5,3 μετά από 6 h επώασης στους 30-37 °C. Βέβαια, και τα στελέχη τα οποία παρήγαγαν ελάχιστη οξύτητα και το pH τους παρέμεινε μεγαλύτερο του 6,0 μετά από 6 h επώασης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στις ζυμώσεις των τυριών εφόσον παρουσιάζουν άλλες σημαντικές βιοχημικές και τεχνολογικές ιδιότητες (Beresford et al. 2001). Συνολικά μόλις τα 33 στελέχη ήταν με διαφορά τα περισσότερα οξυπαραγωγικά. Αυτά είναι κυρίως τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν και προκάλεσαν τιμή pH κάτω από 5,3 σε 6 h και συνεπώς θα μπορούσαν να αποτελέσουν εναρκτήριες καλλιέργειες.

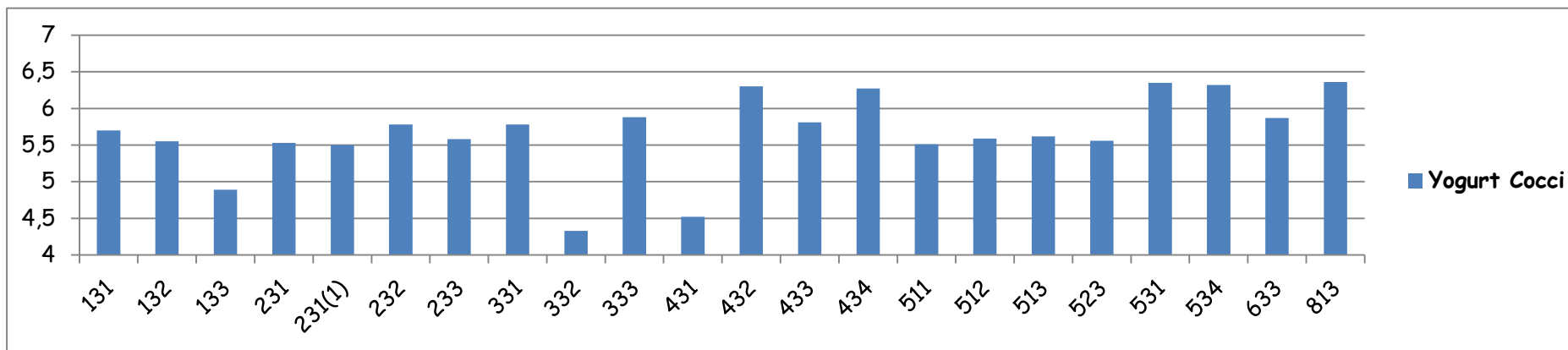
Τα αποτελέσματα της παραγωγής οξύτητας του γάλακτος στους 30 °C και 37 °C για τα απομονωμένα στελέχη μετά από 6 h επώασης παρατίθενται στα παρακάτω ραβδογράμματα:



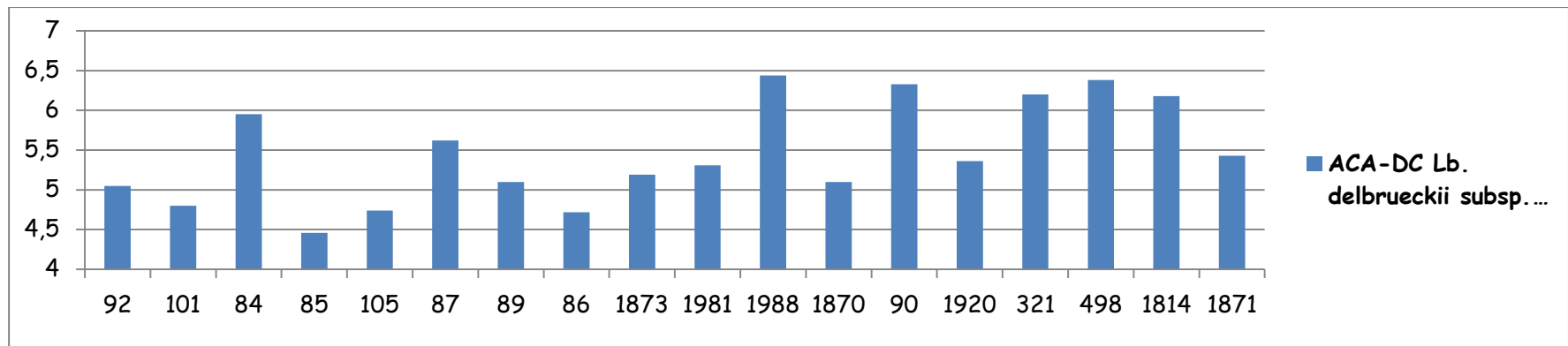
Σχήμα 2 Παραγωγή οξύτητας εκφρασμένη ως τιμή pH του γάλακτος μετά από 6 h ανάπτυξης των επιλεγμένων στελεχών προβιοτικών της συλλογής ACA-DC.



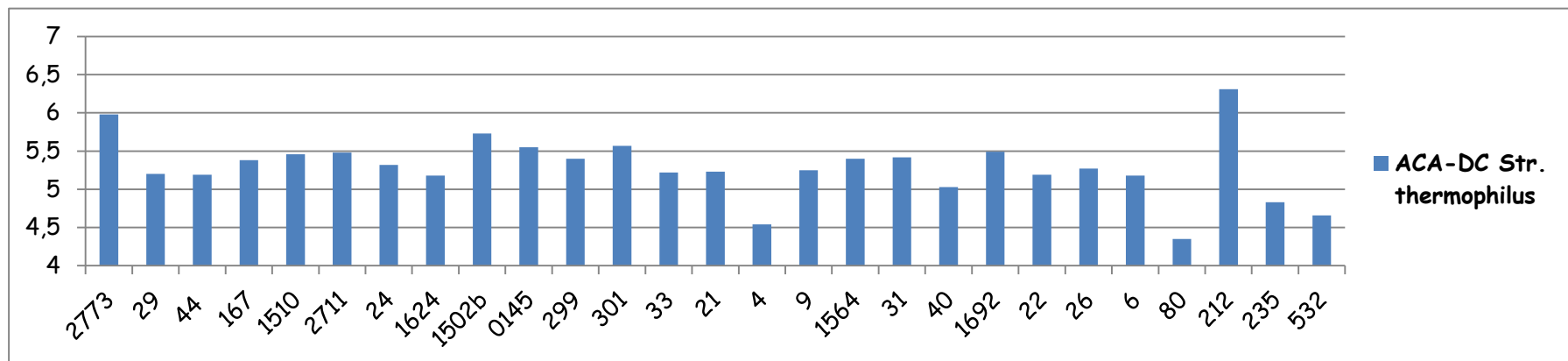
Σχήμα 3: Παραγωγή οξύτητας των 33 στελεχών βακίλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα



Σχήμα 4: Παραγωγή οξύτητας των 22 στελεχών κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.



Σχήμα 5: Παραγωγή οξύτητας των 18 στελεχών *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* της συλλογής ACA-DC



Σχήμα 6: Παραγωγή οξύτητας των 27 στελεχών *Streptococcus thermophilus* της συλλογής ACA-DC.

3.3 Πρωτεολυτική και πεπτιδολυτική δραστικότητα.

Οι πρωτεολυτικές και πεπτιδολυτικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι απλά σημαντικές για τη βακτηριακή ανάπτυξη στο γάλα, καθώς εμπλέκονται και στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, τόσο των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, όσο και των αλλαντικών ζύμωσης. Οι πρωτεΐνάσες του κυτταρικού τοιχώματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες τους που απελευθερώνονται στο πήγμα μετά την κυτταρική λύση παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση των καζεϊνών κατά την παρασκευή και ωρίμαση των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Από τα 117 στελέχη που εξετάσθηκαν, για τα 54 (46,2%) δεν ανιχνεύτηκε πρωτεολυτική δραστικότητα. Για άλλα 46 (39,3%) στελέχη η πρωτεολυτική δραστικότητα που ανιχνεύθηκε κυμαινόταν μεταξύ 0,01 και 2 mM ισοδύναμων λευκίνης και χαρακτηρίζεται ως χαμηλή. Τέλος μόλις για 17 (14,5%) στελέχη ανιχνεύθηκαν τιμές δραστικότητας μεγαλύτερες από 2 mM ισοδύναμων λευκίνης. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται η πρωτεολυτική δραστικότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για καθένα από τα στελέχη.

Πίνακας 3 : Πρωτεολυτική δραστικότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Στελέχη	Πρωτεολυτική δραστικότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)
311	0,279
312	0,600
313	0,186
314	0,792
315	0,826
411	0,508
611	0,000
612	0,427
613	0,817
614	0,290

711	0,068
811	0,000
815	0,000
911	2,100
912	0,436
913	0,286
914	0,000
915	0,000
621	0,000
622	0,000
623	0,417
625	0,000
722	0,119
723	1,857
724	0,000
735	0,000
824	0,000
921	0,000
922	0,000
923	0,000
925	0,000
931	0,000
934	0,000

Πίνακας 4: Πρωτεολυτική δραστικότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 22 στελέχη κόκκων των μη ταυτοποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

<u>Στελέχη</u>	Πρωτεολυτική δραστικότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)
131	8,603
132	7,183
133	3,659
231	8,550
231(1)	8,532
232	2,155
233	1,386
331	6,328
332	2,568
333	5,454
431	1,346
432	0,032
433	0,203

434	0,496
511	9,119
512	0,000
513	8,585
523	7,809
531	0,000
534	0,000
633	0,916
813	0,000

Πίνακας 5: Πρωτεολυτική δραστηριότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 13 στελέχη αλλαντικών.

Στελέχη	Πρωτεολυτική δραστηριότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)
Λούτζα, Τήνος	9,043
Λούτζα, Τήνος	0,965
Λούτζα Τήνος	0,406
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-

Πίνακας 6: Πρωτεολυτική δραστηριότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 18 στελέχη ACA-DC *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*.

Στελέχη	Πρωτεολυτική δραστηριότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)
92	2,57
101	3.32
84	8.10
85	1.19
105	8.40
87	10.4
89	3.72
86	2.75

1873	4.61
1981	3.46
1988	2,481
1870	5.12
90	0.00
1920	3.35
321	9,680
498	-
1814	4,911
1871	4.33

Πίνακας 7: Πρωτεολυτική δραστικότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 27 στελέχη ACA-DC *Streptococcus thermophilus*.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πρωτεολυτική δραστικότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)</u>
2773	0.18
29	0.17
44	0.09
0167	0.26
1510	1.00
2711	1.50
24	1.45
1624	1.45
1502b	1.49
0145	0.034
299	0.84
0301	0.87
33	0.00
21	1.74
4	1.04
9	1.35
1564	1.25
31	1.86
40	0.00
1692	0.73
22	1.94
26	0.18
6	1.14
80	0.70
212	0.00
235	1,140

532	4,906
27	0.00

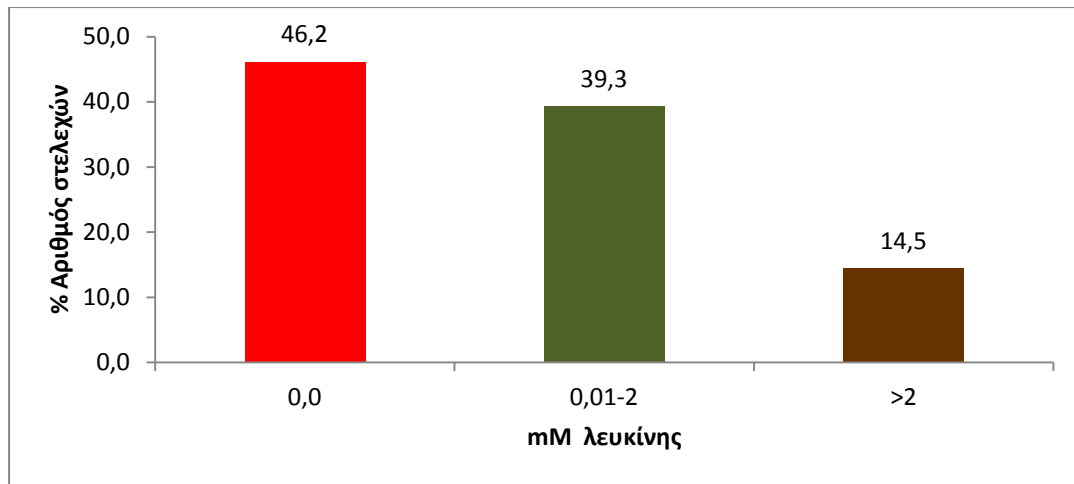
Πίνακας 8 Πρωτεολυτική δραστικότητα μετρημένη σε mM ισοδυνάμων λευκίνης για τα 4προβιοτικά στελέχη ACA-DC.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πρωτεολυτική δραστικότητα (Εκφρασμένη σε mM λευκίνης)</u>
198	0.00
179	0.00
201	0.00
287	0.00

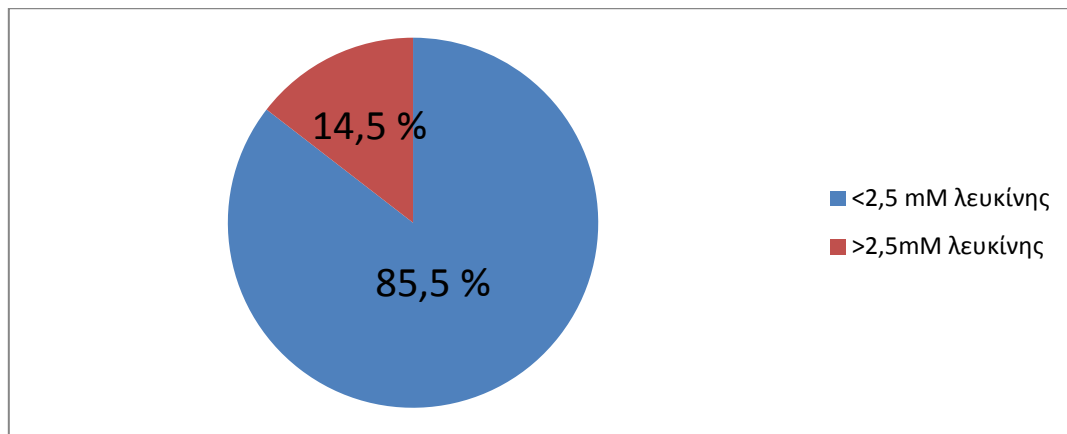
Τα στελέχη που εμφάνισαν με διαφορά την υψηλότερη απελευθέρωση των αμινομάδων (2,5-9,1) είναι τα παρακάτω:

- 11 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τους 22 κόκκους των μη ταυτοποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων.(Στελέχη: 131, 132, 133, 231, 231(1), 232, 331, 332, 333, 511, 513).
- 1 στέλεχος το οποίο απομονώθηκε από την λούντζα.
- 9 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από την συλλογή ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus*. (Στελέχη 92, 101,84, 105, 89, 86, 1873, 1981, 1870, 1920)

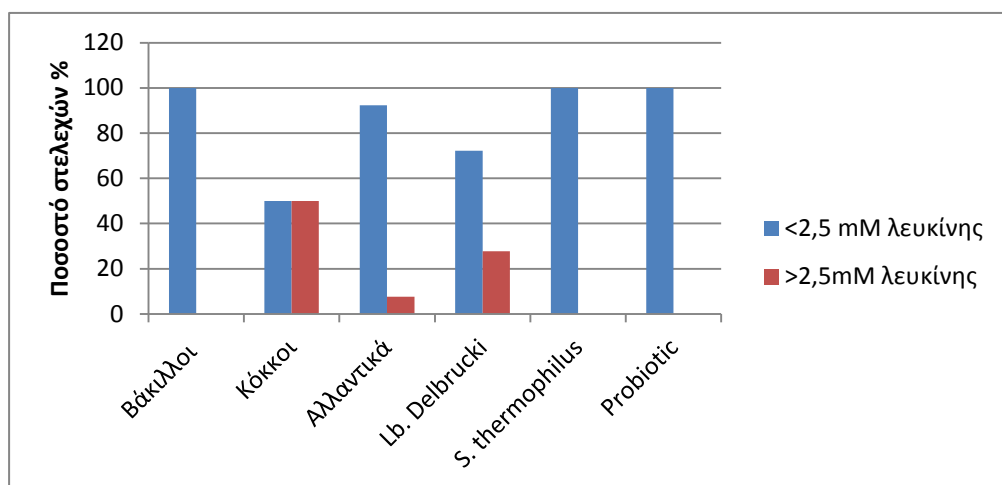
Στα παρακάτω σχήματα φαίνεται η κατανομή (%) των στελεχών ως προς την πρωτεολυτική δραστικότητα.



Σχήμα 7: Κατανομή (%) των στελεχών ως προς την πρωτεολυτική δραστικότητα.



Σχήμα 8: Ποσοτική απεικόνιση του συνόλου των στελεχών που παρουσίασαν την υψηλότερη απελευθέρωση των αμινομάδων (2,5 έως 9,1).



Σχήμα 9: Κατανομή (%) των στελεχών που παρουσίασαν την υψηλότερη απελευθέρωση των αμινομάδων (2,5 έως 9,1) ανά ομάδες.

Για τα περισσότερα στελέχη, τα οποία εξετάστηκαν για την πεπτιδολυτική δραστικότητα τους, δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα έναντι του 4-νιτροανιλιδίου της προλίνης και της γλυκίνης.

Πίνακας 9 Πεπτιδολυτική δραστικότητα μετρημένη για τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα σε Units/mL.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πεπτιδολυτική Δραστικότητα Εκφρασμένη σε Units/mL</u>
311	0,149
312	0,028
313	0,073
314	0,018
315	0,032
411	0,128
611	0,001
612	0,001
613	0,007
614	0,000
711	0,001
811	0,000
815	0,000
911	0,009
912	0,000
913	0,000
914	0,000
915	0,000
621	0,001
622	0,001
623	0,007
625	0,003
722	0,003
723	0,001
724	0,001
735	0,000
824	0,000
921	0,000
922	0,000
923	0,000
925	0,000
931	0,000
934	0,000

Πίνακας 10: Πεπτιδολυτική δραστικότητα μετρημένη για τα 22 στελέχη κόκκων των μη ταυτοποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων σε Units/mL.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πεπτιδολυτική Δραστικότητα Εκφρασμένη σε Units/mL</u>
131	0,0070
132	0,0120
133	0,0164
231	0,004
231(1)	0,010
232	0,1755
233	0,0034
331	0,00
332	0,0066
333	0,00
431	0,1032
432	0,0004
433	0,000
434	0,002
511	0,0004
512	0,0004
513	0,0008
523	0,0008
531	0,0008
534	0,0004
633	0,0007
813	0,0004
27	0,0004

Πίνακας 11: Πεπτιδολυτική δραστικότητα μετρημένη για τα 13 στελέχη αλλαντικών σε Units/mL.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πεπτιδολυτική Δραστικότητα Εκφρασμένη σε Units/mL</u>
Λούτζα, Τήνος	0,0005
Λούτζα, Τήνος	0,0011
Λούτζα Τήνος	0,0009
Λούτζα, Τήνος	0,0005
Λούτζα, Τήνος	0,0052
Σαλάμι, Λευκάδα	0,0345
Σαλάμι, Λευκάδα	0,1166
Σαλάμι, Λευκάδα	0,0461
Σαλάμι, Λευκάδα	0,0716

Σαλάμι,Στρεμμένος	0,0616
Σαλάμι,Στρεμμένος	0,0495
Σαλάμι,Στρεμμένος	0,0459
Σαλάμι,Στρεμμένος	0,0459

Πίνακας 12 Πεπτιδολυτική δραστικότητα μετρημένη για τα 18 στελέχη ACA-DC *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgarius* σε Units/mL.

<u>Στελέχη</u>	<u>Πεπτιδολυτική Δραστικότητα Εκφρασμένη σε Units/mL</u>
92	0,0902
101	0,0873
84	0,0550
85	0,0670
105	0,0043
87	0,0168
89	0,0473
86	0,0834
1873	0,0659
1981	0,1266
1988	0,1655
1870	0,1734
90	0,0368
1920	0,0000
321	0,0784
498	0,0050
1814	0,1166
1871	0,1955

Πίνακας 13: Πεπτιδολυτική δραστικότητα μετρημένη για τα 27 στελέχη ACA-DC *Streptococcus thermophilus* σε Units/mL.

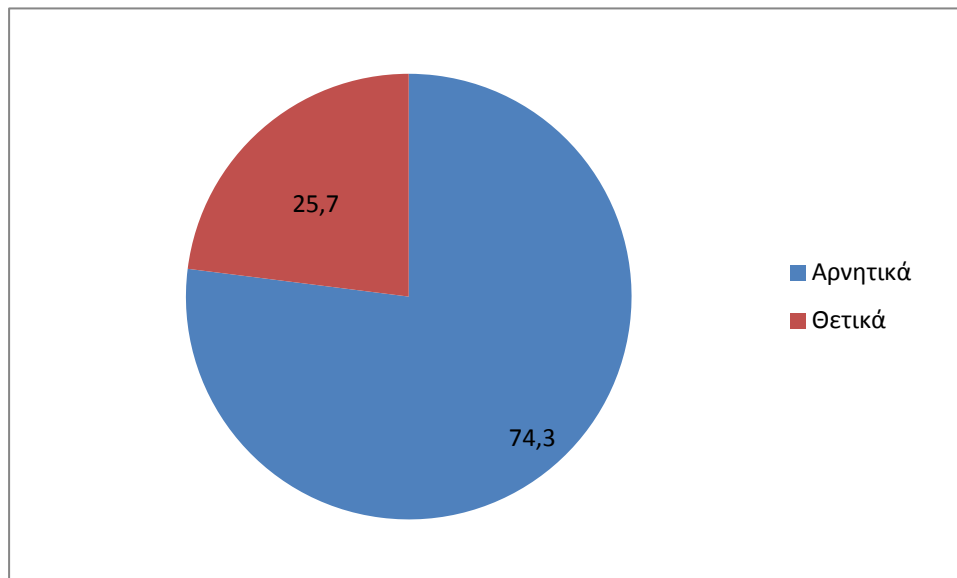
<u>Στελέχη</u>	<u>Πεπτιδολυτική Δραστικότητα Εκφρασμένη σε Units/mL</u>
2773	0,0239
29	0,0768
44	0,0448
0167	0,2073
1510	0,0836
2711	0,1711
24	0,0005
1624	0,2920

1502b	0,1936
0145	0,0000
299	0,1177
0301	0,2530
33	0,4077
21	0,5973
4	0,4759
9	0,5718
1564	0,0000
31	0,2655
40	0,0002
1692	0,2891
22	0,5868
26	0,1982
6	0,4614
80	0,2089
212	0
235	0,0000
532	0,0134
2773	0,0239

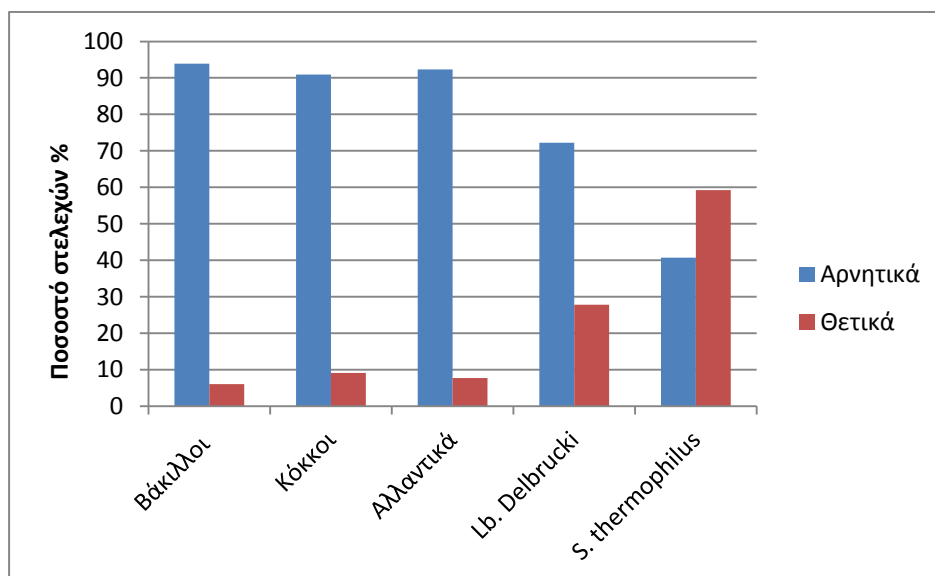
Τα στελέχη τα οποία παρουσίασαν ενεργότητα, η οποία κυμαίνεται από 0,1 έως 0.5973 είναι τα εξής:

- Μόλις 2 στελέχη από τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Στελέχη: 311, 411)
- Μόλις 2 στελέχη από τα, τα 22 στελέχη κόκκων τα οποία απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα. (Στελέχη 132, 232)
- Μόλις 1 στέλεχος από 13 στελέχη το οποία απομονώθηκε από τα αλλαντικά ζύμωσης, από το σαλάμι Λευκάδος..
- 5 στελέχη από 18 στελέχη της συλλογής ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus* (Στελέχη: 92,101, 84,85, 90)

- 16 στελέχη από τα 27 στελέχη της συλλογής ACA-DC *Str. Thermophilus*.
(Στελέχη: 0167,1510,2711,1624,1502, 299, 0301, 33, 21, 4, 9, 31, 1692, 22, 26, 6)

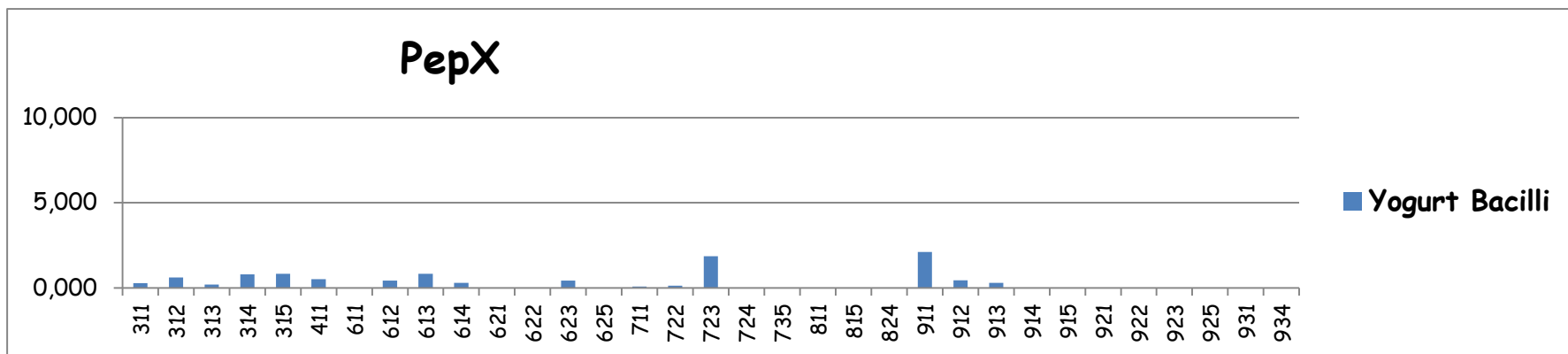


Σχήμα 10: Ποσοτική απεικόνιση του συνόλου των στελεχών που παρουσίασαν ενεργότητα από 0,1 έως 0.5973

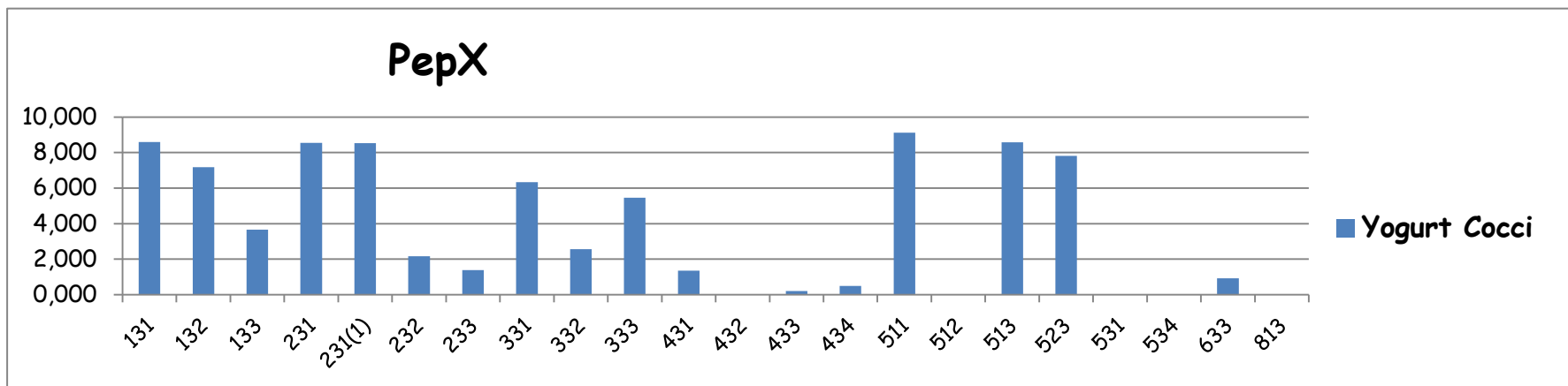


Σχήμα: Κατανομή (%) των στελεχών που παρουσίασαν ενεργότητα από 0,1 έως 0.5973

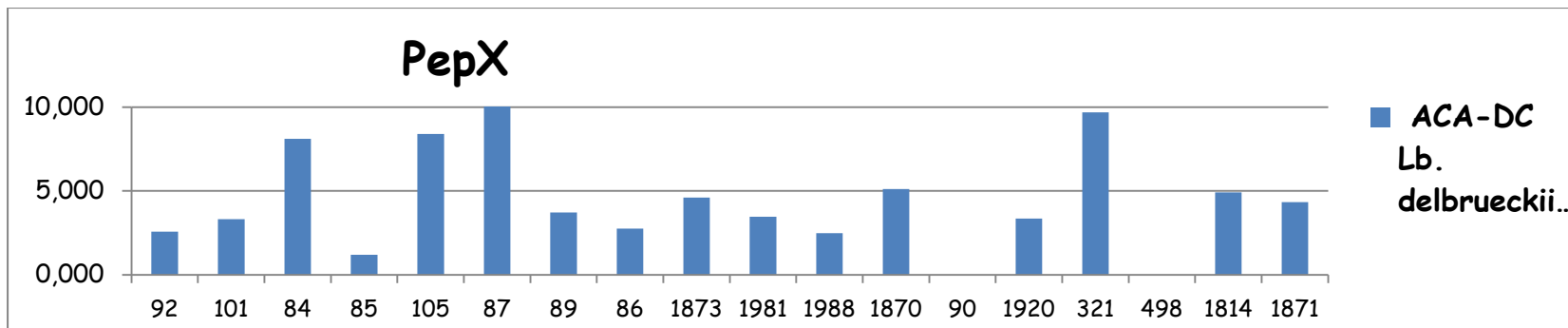
Στα παρακάτω ραβδογράμματα φαίνεται η πεπτιδολυτική δραστικότητα που παρουσίασε το κάθε στέλεχος ξεχωριστά.



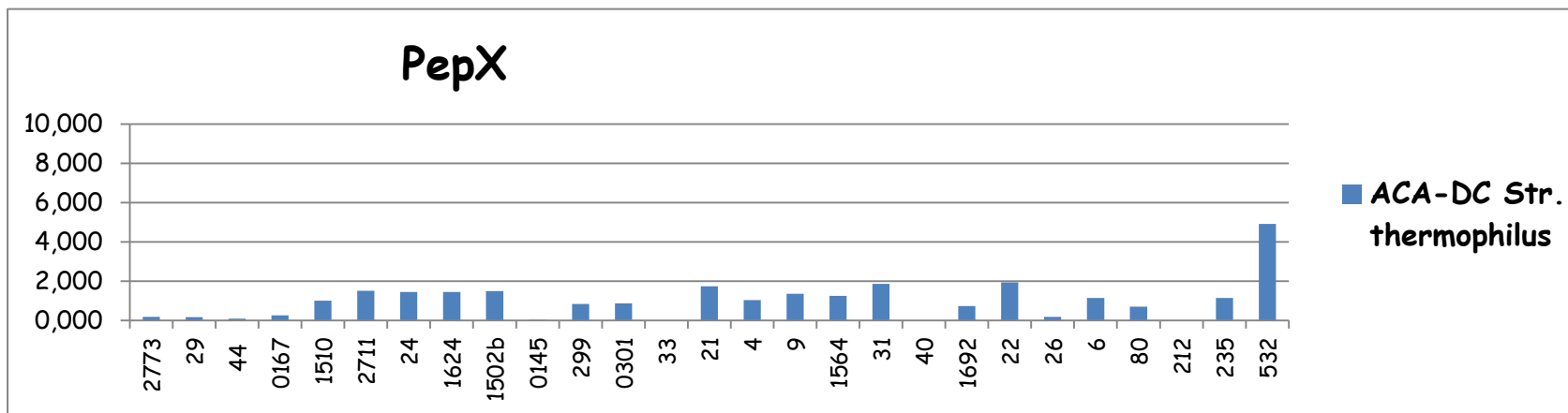
Σχήμα 11: Πρωτεολυτική δραστηριότητα σε Units/mL των 33 στελεχών βακίλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα



Σχήμα 12: Πρωτεολυτική δραστηριότητα σε Units/mL των 22 στελεχών κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα



Σχήμα 13: Πρωτεολυτική δραστηριότητα σε Units/mL των 18 στελεχών της συλλογής ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus*



Σχήμα 14: Πρωτεολυτική δραστηριότητα σε Units/mL των 27 στελεχών της συλλογής ACA-DC *Str. Thermophilus*

3.4 Λιπολυτική δραστηριότητα

Η λιπολυτική δραστηριότητα των στελεχών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή εξάπλωσης σε τρυβλία τα οποία περιείχαν τριβουτυρίνη.

Πίνακας 14: Λιπολυτική δραστηριότητα στα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστηριότητα</u> <u>(αρνητικό – θετικό)</u>
311	-
312	-
313	-
314	-
315	-
411	-
611	-
612	-
613	+
614	-
711	-
811	-
815	-
911	-
912	-
913	-
914	-
915	-
621	-
622	+
623	+
625	-
722	-
723	-
724	-
735	-
824	-
921	-
922	-

923	-
925	-
931	-
934	-

Πίνακας 15 Λιπολυτική δραστικότητα στα 22 στελέχη κόκκων των μη ταυτοποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστικότητα (αρνητικό – θετικό)</u>
131	+
132	+
133	+
231	+
231(1)	+
232	-
233	+
331	+
332	+
333	+
431	-
432	+
433	-
434	-
511	+
512	+
513	+
523	+
531	+
534	+
633	+
813	+

Πίνακας 16 Λιπολυτική δραστικότητα στα 13 στελέχη αλλαντικών

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστικότητα (αρνητικό – θετικό)</u>
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-

Λούτζα, Τήνος	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-

Πίνακας 17 Λιπολυτική δραστηριότητα στα 18 στελέχη ACA-DC *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστηριότητα (αρνητικό – θετικό)</u>
92	-
101	-
84	-
85	-
105	-
87	-
89	-
86	-
1873	-
1981	-
1988	-
1870	-
90	+
1920	-
321	-
498	-
1814	-
1871	-

Πίνακας 18: Λιπολυτική δραστηριότητα στα 27 στελέχη ACA-DC *Streptococcus thermophilus*.

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστηριότητα (αρνητικό – θετικό)</u>
2773	-
29	-
44	-

0167	-
1510	-
2711	-
24	-
1624	-
1502b	-
0145	-
299	-
0301	-
33	-
21	-
4	-
9	-
1564	-
31	+
40	-
1692	-
22	-
26	-
6	-
80	-
212	-
235	-
532	-
27	+

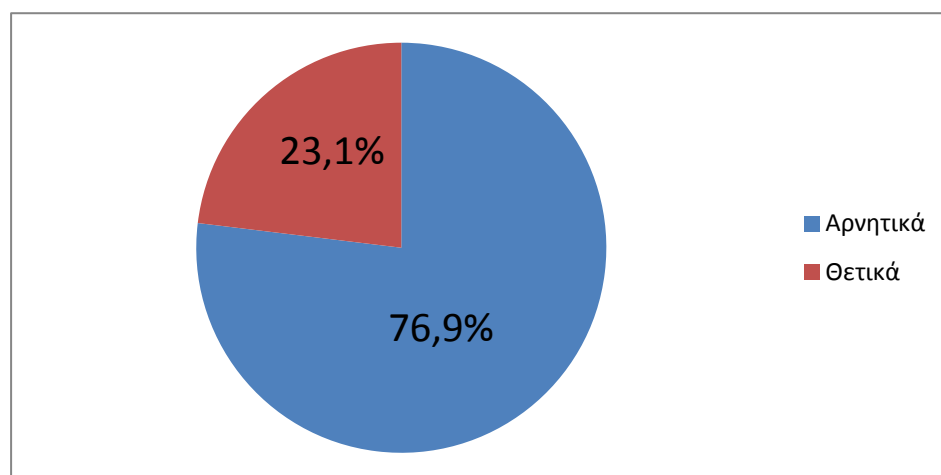
Πίνακας 19: Λιπολυτική δραστικότητα στα 4 προβιοτικά στελέχη ACA-DC

<u>Στελέχη</u>	<u>Λιπολυτική δραστικότητα (αρνητικό – θετικό)</u>
198	+
179	-
201	-
287	+

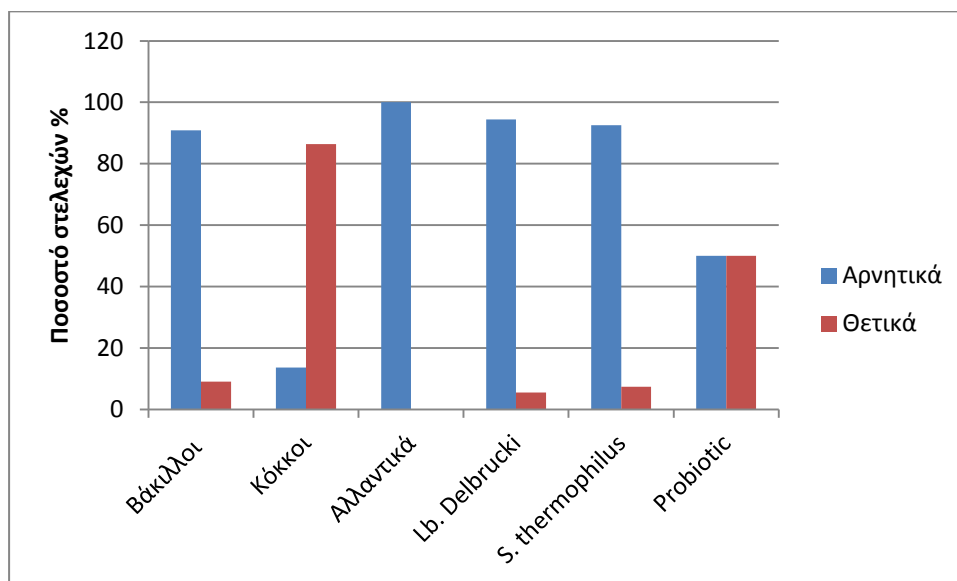
Με τη μέθοδο αυτή, από τα 117 στελέχη τα οποία εξετάσθηκαν, αυτά τα οποία παρουσίασαν λιπολυτική δράση είναι τα εξής:

- Από τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα γιαουρτιού μόλις τα 3 στελέχη παρουσίασαν λιπολυτική δραστικότητα. Στελέχη: 613, 621, 622
- Από τα 22 στελέχη κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα 19 στελέχη παρουσίασαν λιπολυτική δραστικότητα. Στελέχη: Όλα εκτός από τα 231, 432, 433.
- Κανένα από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά δεν παρουσίασε λιπολυτική δραστικότητα. Στέλεχος 90.
- Από τα 18 στελέχη ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus* μόλις 1 παρουσίασε λιπολυτική δραστηριότητα.
- Από τα 27 στελέχη ACA-DC *Str. thermophilus* μόλις 2 παρουσίασαν λιπολυτική δραστικότητα. Στελέχη: 31, 27.
- Τέλος, μόλις 2 προβιοτικά στελέχη ACA-DC παρουσίασαν λιπολυτική δραστικότητα. Στέλεχος 198, 287.

Τα αποτελέσματα αυτά σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι γενικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χαμηλή λιπολυτική δραστικότητα σε σχέση με άλλες μικροβιακές ομάδες (Asteri et al., 2011). Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η κατανομή των στελεχών (%) ως προς την λιπολυτική δραστικότητα.



Σχήμα 15: Ποσοτική απεικόνιση του συνόλου των θετικών και αρνητικών στελεχών ως προς τη λιπολυτική δράση



Σχήμα 16: Κατανομή (%) των θετικών και αρνητικών στελεχών ως προς την λιπολυτική δραστηριότητα, ανά ομάδα

Μεταβολισμός κιτρικού οξέος.

Ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος παίζει σημαντικό ρόλο στις ζυμώσεις των τροφίμων που πραγματοποιούνται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αφού συνήθως οδηγεί στο μετασχηματισμό προϊόντων όπως είναι το διακυτέλιο, η ακετονοϊίνη, το οξικό οξύ, η βουτανοδιόλη και η ακεταλεδεΐδη. Αυτά τα προϊόντα βοηθούν στο σχηματισμό του επιθυμητού αρώματος σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα. Ελέγχοντας την ικανότητα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος στα στελέχη που μελετήθηκαν, χρησιμοποιώντας το στερεό υπόστρωμα Simmons Citrate Agar προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 20: Καταβολισμός κιτρικού οξέος στα :33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα των γαλακτοκομικών προϊόντων.

<u>Στελέχη</u>	<u>Καταβολισμός κιτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
311	-
312	-

313	-
314	-
315	-
411	-
611	-
612	-
613	-
614	-
711	-
811	-
815	-
911	-
912	-
913	-
914	-
915	-
621	-
622	-
623	-
625	-
722	-
723	-
724	-
735	-
824	-
921	-
922	-
923	-
925	-
931	-
934	-

Πίνακας 21: Καταβολισμός κίτρικού οξέος στα 22 στελέχη κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα

<u>Στελέχη</u>	<u>Καταβολισμός κίτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
131	-
132	-
133	-
231	-
231(1)	-

232	-
233	-
331	-
332	-
333	-
431	-
432	-
433	-
434	-
511	-
512	-
513	-
523	-
531	-
534	-
633	-
813	-

Πίνακας 22: Καταβολισμός κίτρικού οξέος στα 13 στελέχη αλλαντικών

<u>Στελέχη</u>	<u>Καταβολισμός κίτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-
Λούτζα, Τήνος	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Λευκάδα	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-
Σαλάμι, Στρεμμένος	-

Πίνακας 23: Καταβολισμός κίτρικού οξέος στα 18 στελέχη *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* της συλλογής ACA-DC

<u>Στελέχη</u>	<u>Καταβολισμός κίτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
92	-

101	+
84	+
85	+
105	+
87	+
89	-
86	+
1873	+
1981	+
1988	+
1870	+
90	+
1920	-
321	-
498	-
1814	-
1871	-

Πίνακας 24: Καταβολισμός κίτρικού οξέος στα 27 στελέχη *Streptococcus thermophilus* της συλλογής ACA-DC

<u>Στελέχη</u>	<u>Καταβολισμός κίτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
2773	-
29	-
44	-
0167	-
1510	-
2711	-
24	+
1624	-
1502b	-
0145	-
299	+
0301	+
33	+
21	+
4	+
9	+
1564	+
31	+
40	+
1692	+

22	+
26	+
6	+
80	-
212	-
235	-
532	-

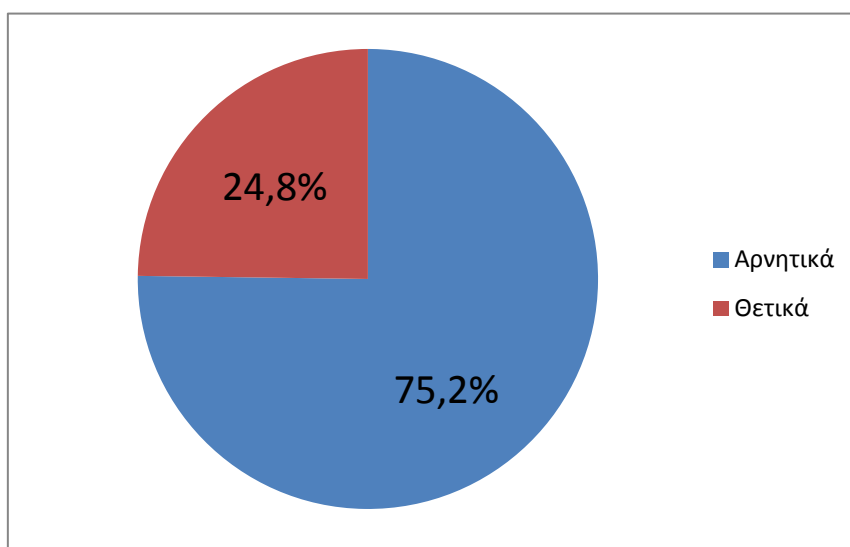
Πίνακας 25: Καταβολισμός κιτρικού οξέος στα 4 προβιοτικά στελέχη της συλλογής ACA-DC

<u>Στελέχη</u>	<u>Μεταβολισμός κιτρικού οξέος (αρνητικό – θετικό)</u>
198	+
179	+
201	+
287	+

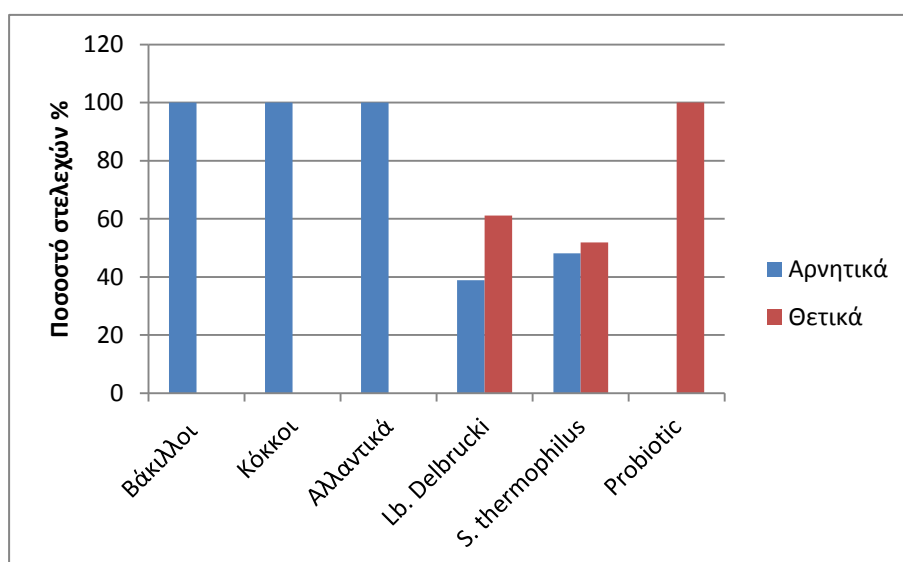
Από το σύνολο των 117 στελεχών που βρισκόντουσαν υπό εξέταση, τα στελέχη τα οποία καταβόλισαν το κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα και αναπτύχθηκαν στο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα του SCA(simons citrate agar) είναι τα εξής:

- Από τα 33 στελέχη βακίλλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα 22 στελέχη κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα , καθώς και από τα 13 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τα αλλαντικά κανένα δεν καταβόλισε το κιτρικό οξύ.
- Από τα 18 στελέχη ACA-DC *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, τα 11 καταβόλισαν το κιτρικό οξύ.Στελέχη: 101, 84, 85, 105, 87, 80, 1873, 1981, 1988, 1870, 90.
- Από τα 27 στελέχη ACA-DC *S.thermophilus*, τα 14 καταβόλισαν το κιτρικό οξύ.Στελέχη: 24, 299, 0301, 33, 21, 4, 9, 1564, 31, 40, 1692, 22, 26, 6).
- Τέλος, 4προβιοτικά στελέχη ACA-DC καταβόλισαν το κιτρικό οξύ.

Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένα από τα στελέχη δεν χρησιμοποίησε το κιτρικό οξύ ως πηγή ενέργειας, σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε να προκαλέσει αλλαγή του χρώματος του παραπάνω στερεού θρεπτικού υποστρώματος από πράσινο σε μπλέ. Αυτό σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα στελέχη τα οποία αναπτύχθηκαν, δεν έχουν ικανότητα καταβολισμού του κιτρικού οξέος σε πολύ μεγάλο βαθμό. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η κατανομή των στελεχών (%) ξεχωριστά ως προς τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος.



Σχήμα 17: Ποσοτική απεικόνιση του συνόλου των θετικών και αρνητικών στελεχών ως προς τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος.



Σχήμα 18: Κατανομή (%) των θετικών και αρνητικών στελεχών ως προς τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος ανά ομάδα.

3.5 Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών

Η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών των στελεχών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή εξάπλωσης σε τρυβλία με υπόστρωμα γάλακτος που περιείχε ρουθένιο (ruthenium). Και τα 117 στελέχη τα οποία εξετάστηκαν δωσαν αποικίες άσπρου χρώματος. Έτσι σύμφωνα με τον (Stingele 1996) όλα τα στελέχη παρουσίασαν παραγωγή εξωπολυσακχαριτών.

3.6 Παρεμποδιστική ικανότητα ενζύμου ACE -ACE INHIBITORY

Το ACE είναι ένα ένζυμο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο για την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και την εξισορρόπηση του νερού και του αλατιού στο ανθρώπινο σώμα. Αύξηση της αρτηριακής πίεσης παρατηρείται όταν το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση της αγγειοτενσίνης I σε αγγειοτενσίνη I I (Coates 2003). Σε πολλές επιστημονικές αναφορές φαίνεται ότι το όριο για ένα στέλεχος το οποίο μπορεί να παρεμποδίσει την δράση του ενζύμου ACE είναι 50%. Επίσης όσο μεγαλύτερο ποσοστό, τόσο καλύτερη παρεμπόδιση του ενζύμου γίνεται. (Quiros 2007)

Πίνακας 26 Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 33 στελεχών βακίλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

<u>Στελέχη</u>	<u>ACE-I (%)</u>
311	62,1
312	85,4
313	62,0
314	82,3
315	62,5
411	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
611	71,8
612	83,1
613	69,3
614	84,6
711	85,0
811	70,7
815	67,9

911	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
912	69,1
913	82,8
914	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
915	76,3
621	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
622	65,3
623	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
625	62,5
722	47,3
723	53,1
724	27,7
735	43,9
824	69,9
921	34,9
922	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
923	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
925	47,0
931	72,5
934	49,9

Πίνακας 27: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 22 στελεχών κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

<u>Στελέχη</u>	<u>ACE-I (%)</u>
131	62,5
132	40,7
133	89,5
231	88,3
231(1)	72,8
232	93,5
233	92,0
331	81,8
332	68,3
333	83,1
431	96,0
432	84,2
433	92,5
434	82,3
511	62,0
512	90,7
513	72,9

523	35,1
531	57,5
534	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
633	49,3
813	70,3

Πίνακας 28: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 13 στελέχη αλλαντικών

<u>Στελέχη</u>	<u>ACE-I (%)</u>
Λούτζα, Τήνος	9,043
Λούτζα, Τήνος	0,965
Λούτζα Τήνος	0,406
Λούτζα, Τήνος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Λούτζα, Τήνος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Λευκάδα	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Λευκάδα	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Λευκάδα	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Λευκάδα	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Στρεμμένος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Στρεμμένος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Στρεμμένος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ
Σαλάμι, Στρεμμένος	ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ

Πίνακας 29: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 18 στελεχών ACA-DC *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*

<u>Στελέχη</u>	<u>ACE-I (%)</u>
92	61,4
101	65,6
84	60,0
85	46,1
105	39,3
87	41,4
89	28,8
86	18,7
1873	49,9
1981	67,0
1988	67,5
1870	41,9
90	43,9
1920	66,1
321	-11,4

498	67,3
1814	59,7
1871	67,4

Πίνακας 30: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 27 στελεχών *ACA-DC Streptococcus thermophilus*.

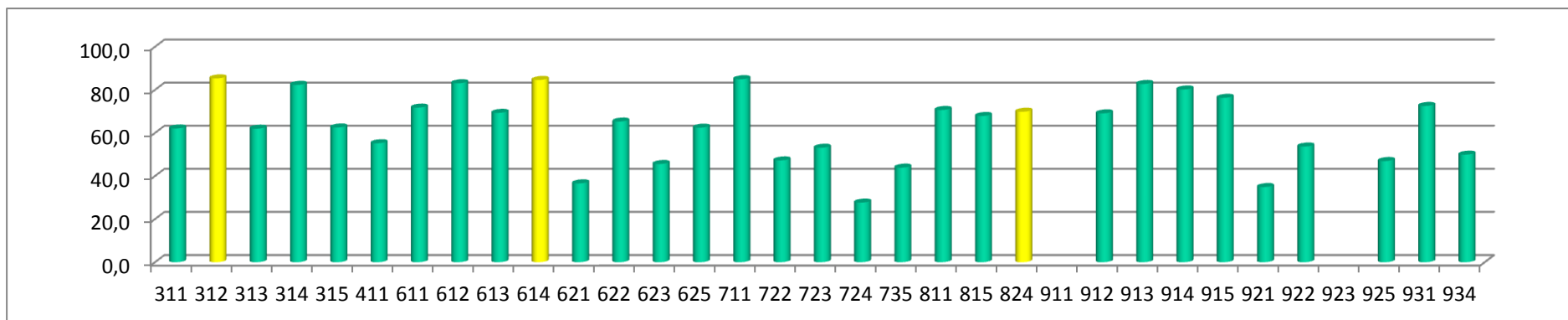
<u>Στελέχη</u>	<u>ACE-I (%)</u>
2773	-18,4
29	-46,5
44	-40,2
0167	19,9
1510	-40,1
2711	-29,8
24	-60,6
1624	-116,2
1502b	-29,0
0145	-55,4
299	-164,4
0301	-31,9
33	-44,7
21	-77,2
4	-57,5
9	-51,0
1564	-38,7
31	-71,2
40	-38,0
1692	-62,1
22	-28,8
26	-39,6
6	-10,1
80	20,5
212	0,00
235	1,140
532	4,906

Στη μελέτη αυτή για τα 117 στελέχη τα οποία εξετάσθηκαν, η μέτρηση έγινε 3 φορές για το καθένα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος %, ο οποίος

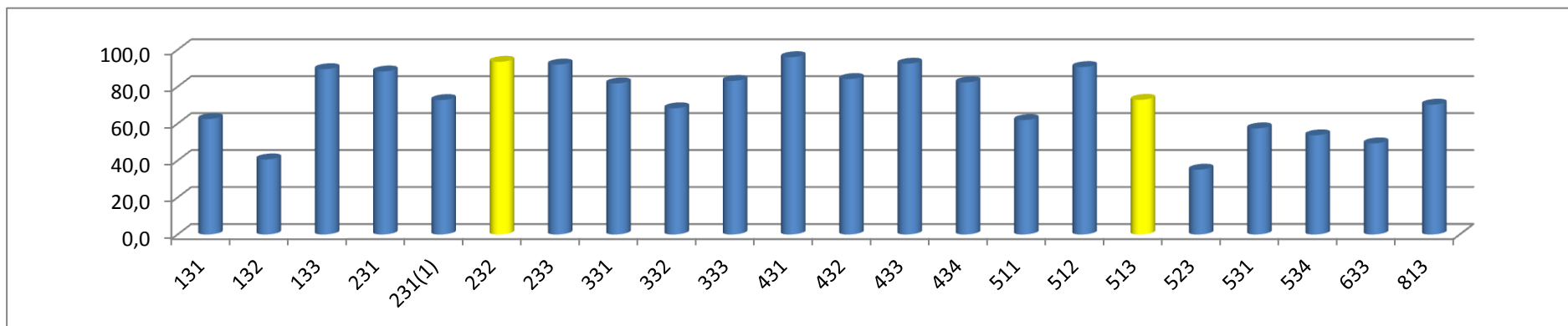
δείχνει κατά πόσο μπορεί να παρεμποδίσει το κάθε στέλεχος την δράση του ενζύμου ACE. Έτσι προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

- Από τα 33 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τους βακίλλους των γιαουρτιών, 23 στελέχη έδωσαν παρεμπόδιση πάνω από 50% και ειδικότερα 3 από αυτά παρεμπόδισαν 85%.Στελέχη: 312,614 711
- Από τα 22 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τους κόκκους των γιαουρτιών, 19 στελέχη έδωσαν παρεμπόδιση πάνω από 50% και ειδικότερα 3 από αυτά παρεμπόδισαν 95%.Στελέχη: 232, 233, 512
- Από τα 13 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τα αλλαντικά ζύμωσης, μόνο 3 έδωσαν παρεμπόδιση >0%, ενώ τα υπόλοιπα δεν έδωσαν καθόλου.
- Από τα 18 στελέχη της συλλογής ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus* τα 9 έδωσαν παρεμπόδιση πάνω από 50%. Στελέχη:91, 89, 101, 86, 84, 1873, 85, 321, 87).
- Από τα 27 στελέχη ACA-DC *Str. thermophilus* τα 22 έδωσαν παρεμπόδιση .0%, ενώ 5 δώσανε παρεμπόδιση κάτω από 40%.

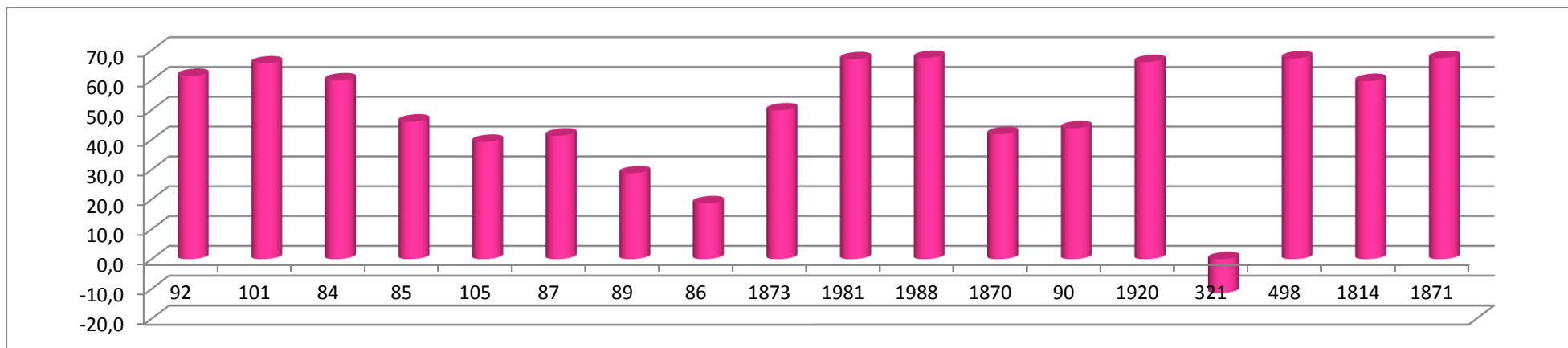
Στα παρακάτω ραβδογράμματα φαίνεται η παρεμποδιστική ικανότητα (%) που παρουσίασε το κάθε στέλεχος ξεχωριστά.



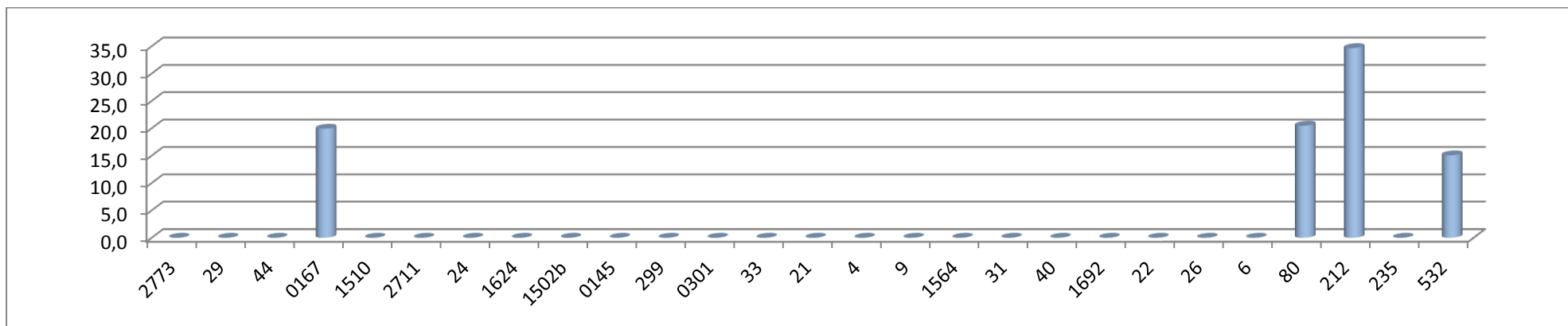
Σχήμα 19: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 33 στελεχών βακίλων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα



Σχήμα 20: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 22 στελεχών κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα.



Σχήμα 21: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 18 στελεχών της συλλογής ACA-DC *Lb. delbrueckii bulgaricus*

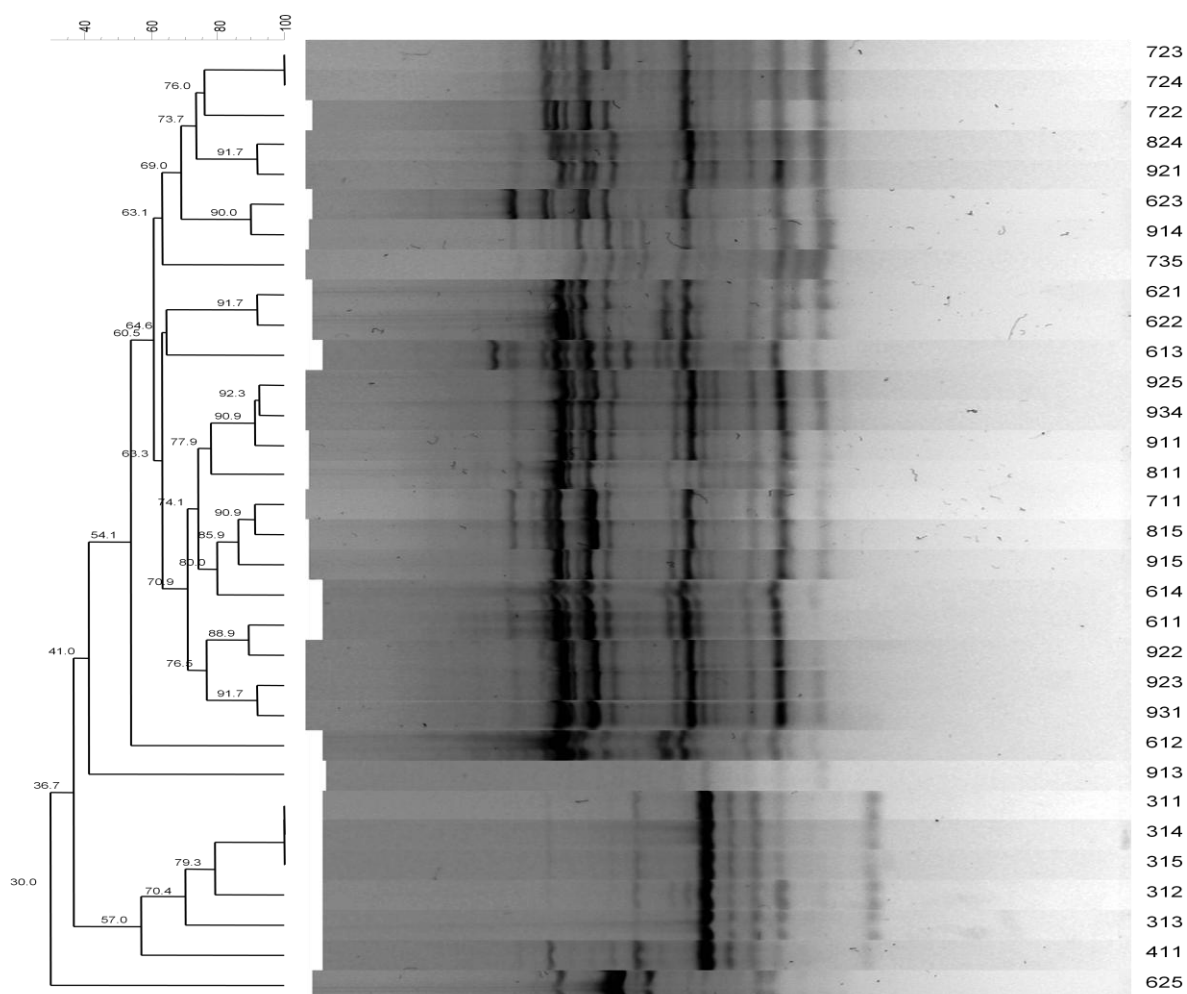


Σχήμα 22: Παρεμποδιστική ικανότητα (%) των 27 στελεχών της συλλογής ACA-DC *Str. Thermophilus*.

3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων *rep* PCR.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για τους 33 βακίλλους, οι οποίοι απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιήμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποθηκεύθηκαν και φωτογραφήθηκαν ώστε να επακολουθήσει διαφοροποίηση των στελεχών με την βοήθεια του αλγορίθμου U.P.G.M.A. του προγράμματος Bionumerics. Στη συνέχεια το πρόγραμμα Image Analysis δημιούργησε το φυλογενετικό δένδρο όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

Εικόνα 1: Ομαδοποίηση των 33 στελεχών βακίλλων από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, κατά συστάδες ανάλογα με το ποσοστό ομοιότητας



Στην παραπάνω εικόνα γίνεται η διαφοροποίηση των στελεχών με βάση το ποσοστό ομολογίας που έχουν μεταξύ τους στο φυλογενετικό δένδρο. Έτσι, δημιουργούνται οι παρακάτω ομάδες:

Α' ομάδα:

<u>Στέλεχος</u>
722
723
724
824
921

Β' ομάδα:

<u>Στέλεχος</u>
613
621
622

Γ' ομάδα:

<u>Στέλεχος</u>
623
914

Ε' ομάδα:

<u>Στέλεχος</u>
311
312
313
314
315
411

Ζ' ομάδα:

<u>Στέλεχος</u>
611
614
711
811
815
915
922
925
931
934

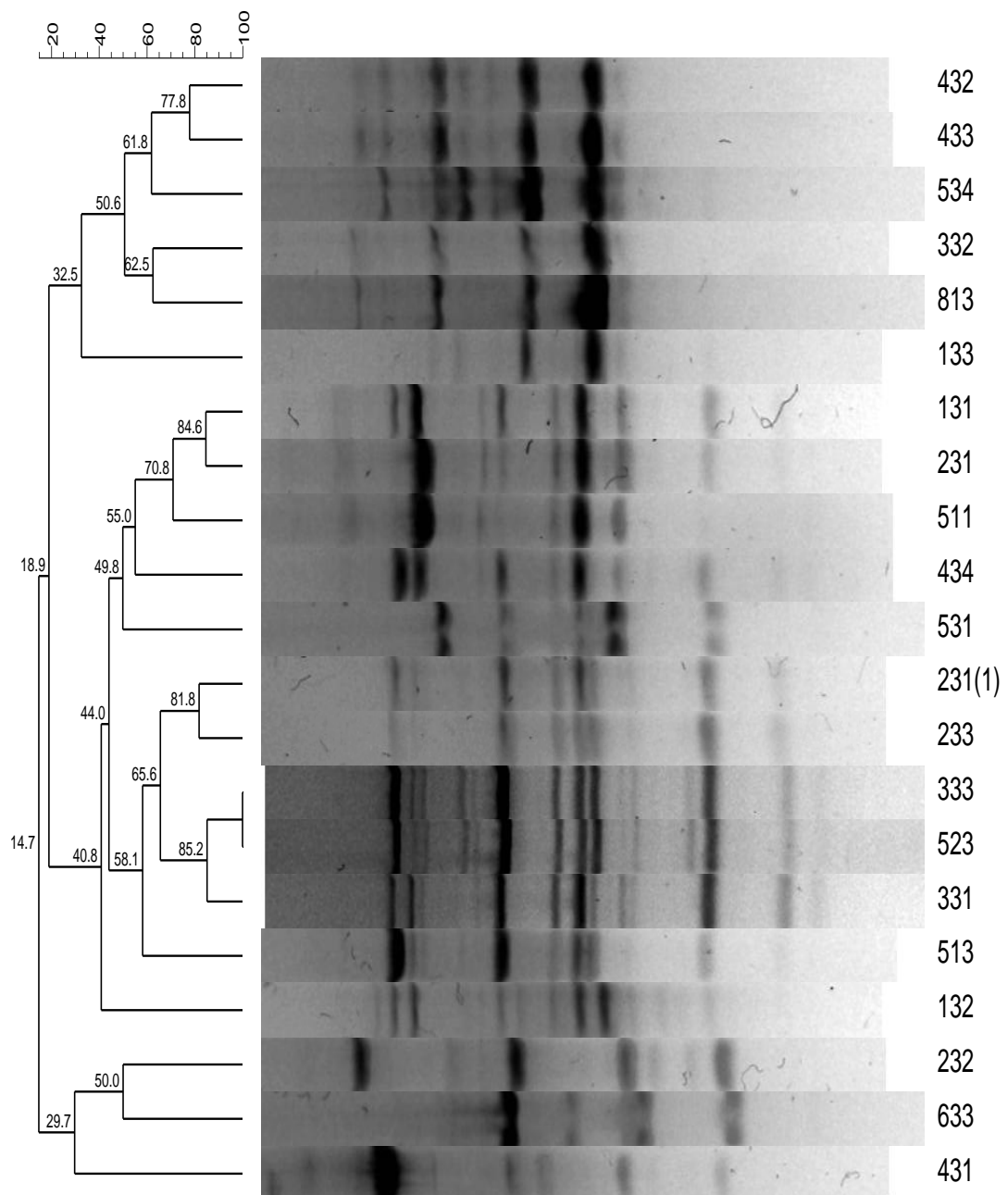
Από το φυλογενετικό δένδρο φαίνεται να υπάρχουν και κάποια στελέχη τα οποία δεν παρουσίασαν ποσοστό ομολογίας με κάποιο άλλο στέλεχος και έτσι μπορούν να καταταχθούν ξεχωριστά το καθένα. Αυτά είναι:

Στέλεχος

- 735
- 612
- 913
- 625

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία και για τα 22 στελέχη κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, το πρόγραμμα Image Analysis δημιούργησε το φυλογενετικό δένδρο όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

Εικόνα 2: Ομαδοποίηση των 22 στελεχών κόκκων, που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα κατά ομάδες ανάλογα με το ποσοστό ομοιότητας.



Από την παραπάνω εικόνα τα στελέχη μπορούν καταταχθούν, ανάλογα με το ποσοστό ομοιότητας που έχουν μεταξύ τους στο φυλλογενετικό δένδρο. Έτσι, δημιουργούνται οι παρακάτω ομάδες:

Α' ομάδα:

Στέλεχος
231(1)

233

331
333
523
231(1)

Β' ομάδα:

Στέλεχος
131

231

434
511

Γ' ομάδα:

Στέλεχος
432

433

534

Δ' ομάδα:

Στέλεχος
332
813

Από το φυλογενετικό δένδρο φαίνεται να υπάρχουν κ κάποια στελέχη τα οποία δεν παρουσίασαν ποσοστό ομοιότητας με κάποιο άλλο στέλεχος κ έτσι μπορούν να καταταχθούν ξεχωριστά το καθένα. Αυτά είναι:

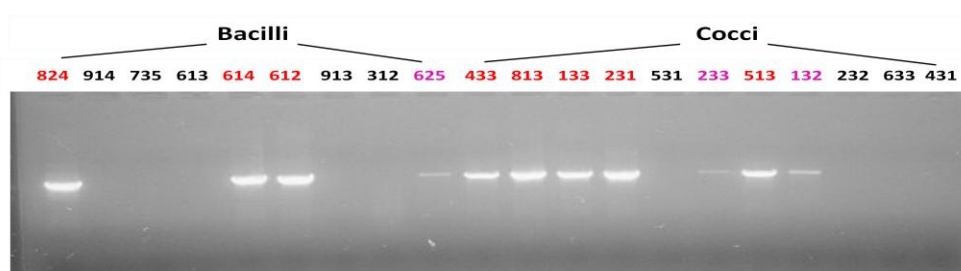
Στέλεχος

- 513
- 132
- 232
- 633
- 431
- 133
- 531

3.8 Αλληλούχιση του γονιδίου του 16s r RNA :

Από τις ομάδες που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της ger-PCR, επιλέχθηκαν 21 στελέχη με την υψηλότερη παρεμποδιστική ικανότητα ACE-I για να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο γένους και είδους. Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλληλούχισης του γονιδίου του 16s rRNA. Επιλεκτικά παρουσιάζεται μία φωτογραφία των προϊόντων PCR επιλεγμένων στελεχών. Οι φωτεινές ζώνες πάνω στην πηκτική αγαρόζη αντιστοιχούν στις ενισχυμένες περιοχές του DNA που προέκυψαν από την αντίδραση του πολυμερισμού. Για τα στελέχη που δεν είχαμε προϊόν πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε επανάληψη της αντίδρασης.

Εικόνα 3: Φωτογραφία προϊόντων PCR των βακίλλων και κόκκων οι οποίοι απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα..



Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών είναι τα παρακάτω:

<u>Στέλεχος</u>	<u>Ταυτοποίηση επιπέδου είδους</u>
824	<i>Lactobacillus plantarum</i>
914	<i>Lactobacillus plantarum</i>
735	<i>Lactobacillus plantarum</i>
613	<i>Lactobacillus plantarum</i>
614	<i>Lactobacillus plantarum</i>
612	<i>Lactobacillus plantarum</i>
913	<i>Lactobacillus plantarum</i>
312	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
625	<i>Lactobacillus casei</i>
433	<i>Enterococcus faecium</i>
813	<i>Enterococcus faecium</i>
133	<i>Enterococcus faecalis</i>
231	<i>Enterococcus faecalis</i>
531	<i>Enterococcus faecalis</i>
233	<i>Enterococcus faecalis</i>
513	<i>Enterococcus faecalis</i>
132	<i>Enterococcus faecalis</i>
232	<i>Streptococcus thermophilus</i>
633	<i>Lactococcus lactis</i>
431	<i>Streptococcus thermophilus</i>

4 Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την μελέτη των βιοχημικών, λειτουργικών και τεχνολογικών ιδιοτήτων σε στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από ζυμώμενα αλλαντικά και γαλακτοκομικά προϊόντα και σε επιλεγμένα στελέχη της συλλογής ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μελετήθηκαν συνολικά 117 στελέχη.

Η πλειοψηφία από αυτά βρέθηκε να έχει χαμηλή ικανότητα οξύνισης στο γάλα. Συγκεκριμένα, μόλις τα 33 στελέχη ήταν με διαφορά τα περισσότερα οξυπαραγωγικά. Όσον αφορά στην πρωτεολυτική δραστηριότητα, η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασε χαμηλά επίπεδα. Μόλις 17 στελέχη ήταν περισσότερο πρωτεολυτικά και εμφάνισαν με διαφορά την υψηλότερη απελευθέρωση των αμινομάδων από 2,5 έως 9,1 mM ισοδυνάμων λευκίνης. Η πεπτιδολυτική δραστηριότητα που παρουσίασαν ήταν κατά την πλειοψηφία των στελεχών χαμηλή. Μόλις σε 26 στελέχη κυμάνθηκε από 0,1 έως 0.5973. Κανένα από τα στελέχη δεν παρουσίασε ισχυρό μεταβολισμό του κιτρικού οξέος και μόνο το 27% των στελεχών ήταν θετικό. Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στον έλεγχο παραγωγής εξωπολυσακχαριτών.. Όσον αφορά στην παρεμποδιστική ικανότητα του ενζύμου ACE, 51 στελέχη ήταν δραστικά αφού παρουσίασαν παρεμπόδιση υψηλότερη από 50%.

Για τα 33 στελέχη βακίλλων και τα 22 στελέχη κόκκων που απομονώθηκαν από τα μη ταυτοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα που απομονώθηκαν από τα γαλακτοκομικά προϊόντα, πραγματοποιήθηκε ger-PCR και δημιουργήθηκαν ομάδες ομοιότητας των στελεχών. Από τις ομάδες που δημιουργήθηκαν, επιλέχθηκαν λόγω της υψηλότερης παρεμποδιστικής ικανότητας του ενζύμου ACE, 9 στελέχη βακίλλων και 11 στελέχη κόκκων. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν, τα στελέχη εστάλησαν για αλληλούχιση του

γονιδίου του 16S rRNA. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης, έδωσαν τα παρακάτω είδη: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* και *Streptococcus thermophilus*.

5 Βιβλιογραφία

- Apostolidis, a P., Mamuris, Z. & Triantaphyllidis, C., 2001. Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes. *Biochemical systematics and ecology*, 29(9), pp.901–909. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11445291>.
- Beresford, T.P. et al., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), pp.259–274. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000565>.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), pp.131–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488849>.
- Casalta, E. & Montel, M.-C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactococcus genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), pp.271–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976847> [Accessed July 30, 2014].
- Chockalingam, A. et al., 2004. Safety and efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors in symptomatic severe aortic stenosis: Symptomatic Cardiac Obstruction-Pilot Study of Enalapril in Aortic Stenosis (SCOPE-AS). *American heart journal*, 147(4), p.E19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077102> [Accessed July 30, 2014].
- Christensen, J.E. et al., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), pp.217–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532381>.
- Coates, D., 2003. The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(6), pp.769–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103031>.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), pp.841–866. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603001092> [Accessed July 24, 2014].

- Engels, W.J.M. et al., 1997. A Comparative Study of Volatile Compounds in the Water-soluble Fraction of Various Types of Ripened Cheese. , 6946(97), pp.255–263.
- Facklam, R., 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. , 15(4).
- Frees, D. et al., 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, 63(5), pp.1285–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302811> [Accessed July 30, 2014].
- Gronlund, A., Nilsson, E.D. & Rannik, U., 2000. Poster Session II . Atmospheric aerosols : physical properties. , 260, pp.690–691.
- Guarner, F. & Schaafsma, G.J., 1998. Probiotics. *International journal of food microbiology*, 39(3), pp.237–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553803>.
- Hansen, E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), pp.119–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222629>.
- Hartmann, R. & Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), pp.163–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292602> [Accessed July 15, 2014].
- Hugenholtz, J., 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), pp.165–178. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1016/0168-6445\(93\)90062-E](http://doi.wiley.com/10.1016/0168-6445(93)90062-E).
- Isolauri, E. et al., 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), p.444S–450S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157355>.
- Kimoto, H., Nomura, M. & Suzuki, I., 2000. Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp . *lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. , 9(1999), pp.857–863.

- Korhonen, H. & Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), pp.945–960. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605002426> [Accessed May 25, 2014].
- Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), pp.67–78. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403002085> [Accessed July 15, 2014].
- Ogier, J.-C. et al., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), pp.286–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897747> [Accessed July 30, 2014].
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. & Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), pp.279–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369194>.
- Palles, T. et al., 1998. Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. , (1991), pp.147–154.
- Pihlanto-lepp, A., Pahkala, E. & Ryh, E., 2001. A new type of ripened , low-fat cheese with bioactive properties. , 11, pp.441–447.
- Rademaker, J.L. et al., 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 2, pp.665–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758874>.
- Sanz, Y. et al., 2003. Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiology Letters*, 227(1), pp.33–38. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(03\)00662-1](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(03)00662-1) [Accessed July 30, 2014].
- Schleifer, K.H. & Ludwig, W., 1995. Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), pp.461–467. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202011804042> [Accessed July 30, 2014].

- Starrenburg, M.J. & Hugenholtz, J., 1991. Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and environmental microbiology*, 57(12), pp.3535–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), pp.1–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168311>.
- Tamime, A.Y., 2002. Fermented milks : a historical food with modern applications — a review. , pp.2–15.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, a C. & Salminen, S.J., 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International journal of food microbiology*, 60(1), pp.75–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014524>.
- Venkatesan, M. et al., 2004. Anisotropic Ferromagnetism in Substituted Zinc Oxide. *Physical Review Letters*, 93(17), p.177206. Available at: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.93.177206> [Accessed July 30, 2014].
- De Vuyst, L. & Tsakalidou, E., 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, 18(5), pp.476–485.
- Weeney, P.L.H.M.C.S. & Ousa, M.J.S., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening : A review. , 80, pp.293–324.