

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΕΛΙΕΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΜΑΡΟΥΛΗ

Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

Ιόνιο Πανεπιστήμιο



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Ιανουάριος, 2022

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟ ΕΛΙΕΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Κοψαχείλης Νικόλαος

Λάππα Ιλιάδα

Παπαδάκη Αικατερίνη

Στην οικογένειά μου, τη Δήμητρα και το Θοδωρή, αρωγούς σε κάθε βήμα της ζωής μου...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα επιστημονική έρευνα μελετήθηκαν δύο στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένα από ελιές, και αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους σε συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης και λακτόζης τυρογάλακτος. Τα στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus pentosus* και έχουν ήδη χαρακτηριστεί ως δυνητικά προβιοτικές καλλιέργειες. Ελέγχθηκε η διαστελεχική παραλλακτικότητα των μικροοργανισμών ως προς την αποτελεσματικότητά τους σε ζύμωση του σακχάρου, καθώς και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας τους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, με σκοπό τη βελτίωση της διεργασίας της ζύμωσης. Με βάση τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε το στέλεχος *L. pentosus* B329 για την συνέχεια των πειραμάτων, ως ο μικροοργανισμός που έδωσε τις πιο επιθυμητές αποδόσεις ως προς τη βιομάζα, στους 37 °C.

Η παραγόμενη ξηρή βιομάζα συλλέχθηκε και τα κύτταρα λυοφιλιώθηκαν με σκοπό την δημιουργία «ready to use culture», με ταυτόχρονη μελέτη της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. Ο έλεγχος του πληθυσμού πραγματοποιήθηκε για 120 ημέρες μετά από αποθήκευση των λυοφιλιωμένων στελεχών στους 4 °C, και τα αποτελέσματα κρίθηκαν άκρως ικανοποιητικά, με πληθυσμούς $> 8 \log \text{ cfu/g}$. Στην συνέχεια αξιολογήθηκε η επιτυχής μεταβολική δραστηριότητα των λυοφιλιωμένων στελεχών ως προς τον καταβολισμό της λακτόζης σε αποπρωτεϊνόμενο τυρόγαλο. Συμπερασματικά, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν αρχικά, η αξιοποίηση του τυρογάλακτος ως μια άφθονη πηγή σακχάρου για την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηριακών καλλιεργειών, και κατόπιν η αξιολόγηση κατά πόσο τα συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή πρόσθετες καλλιέργειες, με απώτερο στόχο την ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα, αποσκοπώντας μελλοντικά στη δημιουργία καινοτόμων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

ABSTRACT

In the present study, two strains of lactic acid bacteria isolated from olives were studied in terms of their ability to grow on a synthetic substrate of lactose and whey lactose. The specific strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* have previously been characterized as potentially probiotic cultures. In order to optimize the fermentation process, the performance of microorganisms in sugar fermentation and their maximum biomass output were studied under two different temperatures (30 and 37 °C). Based on the results, strain *L. pentosus* B329 was selected for the further of experiments. The microorganism produced the highest biomass yields of cell biomass at 37 °C. The produced dry biomass was collected and the cells were lyophilized in order to produce a "ready to use culture" while studying the viability of the microorganisms. Strain viability was assessed for 120 days after lyophilized bacteria were stored at 4 °C, and the results were highly satisfactory, with populations of > 8 log cfu/g. The successful metabolic activity of lyophilized strains concerning lactose catabolism was also evaluated in deproteinized whey. In conclusion, the goal of this study was, firstly, to utilize cheese whey as an abundant source of sugar in order to develop beneficial bacterial cultures and, secondly, to determine whether these probiotic strains can be used as starter or adjunct cultures for inclusion in food beverages, aiming to create innovative products with high added value in the future.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	1
1.1 Τυρόγαλο	1
1.1.1 Διατροφικός ρόλος και σύσταση του τυρογάλακτος	2
1.1.2 Ρόλος τυρογάλακτος ως ρυπαντής και αξιοποίησή του	4
1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια	9
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.2.2 Εναρκτήριες καλλιέργειες	15
1.2.3 Εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα	19
1.3 Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί	23
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	23
1.3.2 Εφαρμογές προβιοτικών στελεχών στα τρόφιμα	26
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	 31
2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες προ-καλλιέργειας	31
2.2 Ζυμώσεις συνθετικής λακτόζης και λακτόζης τυρογάλακτος	31
2.3 Λυοφιλίωση και έλεγχος βιωσιμότητας στελεχών	33
2.4 Μελέτη ζύμωσης λακτόζης τυρογάλακτος από λυοφιλιωμένες καλλιέργειες	34
2.5 Αναλυτικές Μέθοδοι	34
2.5.1 Προσδιορισμός λακτόζης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	34
2.5.2 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας	35
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	 36
3.1 Παραγωγή βιομάζας από ζύμωση συνθετικού υποστρώματος λακτόζης	36
3.2 Παραγωγή βιομάζας από ζύμωση λακτόζης τυρογάλακτος	38
3.3 Παραγωγή λυοφιλιώμενης βιομάζας των οξυγαλακτικών στελεχών και μελέτη βιωσιμότητας	41
3.4 Δημιουργία και Μελέτη “Ready to use” εναρκτήριας καλλιέργειας	43
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	 44
 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	 45
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	45
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	46
 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	 46
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	 47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Τυρόγαλο

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 625/30-3-1978 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το τυρόγαλο είναι «το προϊόν που λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς και/ ή φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης». Απλούστερα, το τυρόγαλο είναι το όξινο διάλυμα που προκύπτει μετά την πήξη του γάλακτος και την απομάκρυνση του στερεού πηγματος, κατά την παρασκευή τυριού ή καζεΐνης (Εικόνα 1.1). Πρόκειται για το προϊόν που περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης και των οροπρωτεϊνών του γάλακτος, καθώς και διάφορα άλατα, ενώ η εκατοστιαία αναλογία των ολικών στερεών συστατικών του τυρογάλακτος (πρωτεΐνες, λακτόζη, λίπος, άλατα, γαλακτικό οξύ) εξαρτάται από το είδος του γάλακτος και το είδος του τυριού που παρασκευάζεται.

Κατά την τυροκόμηση του γάλακτος, ένα ποσοστό των συνολικών στερεών συστατικών του μεταφέρεται στο τυρί και παράλληλα και στο υποπροϊόν, δηλαδή το τυρόγαλο (περίπου το 50% των στερεών συστατικών του αγελαδινού, το 40% του πρόβειου και το 45% του γίδινου γάλακτος). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση για το τυρόγαλο αποτελεί το γεγονός ότι στο πρωτεϊνικό του τμήμα, δεν περιλαμβάνεται η καζεΐνη, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας διατροφικά και τεχνολογικά. Σε αυτό το τμήμα κυριαρχεί η β-λακτογλοβουλίνη καταλαμβάνοντας το 50,65% αυτού, ενώ σε σημαντική αναλογία απαντούν και η α-λακταλβουμίνη (17,32%) και οι ανοσογλοβουλίνες (12,42%). Αθροιστικά αυτές οι τρεις πρωτεΐνες αποτελούν το 80,39% των αζωτούχων ουσιών του τυρογάλακτος, είναι θερμοευαίσθητες και κατακρημνίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που δεν υφίσταται για τις υπόλοιπες (Ανυφαντάκης, 2004).

Το τυρόγαλο διακρίνεται σε δύο τύπους σύμφωνα με τη μέθοδο με την οποία λαμβάνεται, το «τυρόγαλο πυτιάς/ γλυκό τυρόγαλο» και το «όξινο τυρόγαλο». Το γλυκό τυρόγαλο προκύπτει μετά από πήξη γάλακτος με πυτιά ή από την παρασκευή καζεΐνης με χρήση πυτιάς και συνήθως είναι υποπροϊόν της τυροκομίας (pH 5,9-6,6), ενώ το όξινο (pH 4,3-4,6) είναι αυτό που λαμβάνεται κατόπιν οξίνισης του γάλακτος με οξέα, και συγκεκριμένα κατά την παρασκευή της καζεΐνης, όπως και από την παρασκευή φρέσκων τυριών με βιολογική οξίνιση.



Εικόνα 1.1: Διαχωρισμός τυρογάλακτος από καζεΐνη γάλακτος. (Καραδήμα, 2009)

1.1.1 Διατροφικός ρόλος και σύσταση του τυρογάλακτος

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος είναι μία πλήρης πρωτεΐνη, αφού περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, που ο ανθρώπινος οργανισμός αδυνατεί να συνθέσει μόνος του. Διαθέτει την υψηλότερη φυσική αναλογία αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσού, τα οποία είναι πολύ σημαντικά κατά τη διάρκεια αλλά και μετά την άσκηση, καθώς μεταβολίζονται ταχύτερα κατά την αύξηση των επιπέδων οξειδωσης, όπως δηλαδή συμβαίνει κατά την προπόνηση και την άσκηση. Πληθώρα αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσού, όπως η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη, μεταβολίζονται σχεδόν εξολοκλήρου στους μύες, γεγονός πολύ σημαντικό για τους αθλητές, καθώς συμμετέχουν στην πρωτεϊνική σύνθεση και συμβάλλουν στην ανάπτυξη και ανάπτυξη των μυών και τη γρηγορότερη αποκατάσταση των μυϊκών τραυματισμών μετά από έντονη άσκηση. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αποτελεί μία ιδιαίτερα εύπεπτη πρωτεΐνη, υψηλής βιολογικής αξίας, εύκολα αφομοιώσιμη με σημαντικά οφέλη για την υγεία, γεγονός που την καθιστά πολύτιμη, όχι μόνο για τους αθλητές, αλλά γενικά, για το ευρύ καταναλωτικό κοινό. Είναι μία πρωτεΐνη που ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και προσδίδει δύναμη και ενέργεια, αυξάνοντας παράλληλα τα επίπεδα γλουταθειόνης -ισχυρό αντιοξειδωτικό- του ανθρώπινου οργανισμού.

Πολλοί επιστήμονες τη χαρακτηρίζουν και ως τροφή μακροζωίας, αφού πειράματα που διεξήχθησαν στο πανεπιστήμιο της Νεμπράσκα στις ΗΠΑ, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος, παράτεινε τον χρόνο ζωής ποντικών κατά 60%. Έχει πλήθος ευεργετικών

επιδράσεων, μεταξύ αυτών και η οστική ανάπτυξη, η υπογλυκαιμική επίδραση, η αντιφλεγμονώδης προστασία, αλλά και η προστασία από μολύνσεις. Τα πεπτίδια της πρωτεΐνης τυρογάλακτος υποστηρίζουν την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος και συμβάλλουν στην εύρυθμη λειτουργία του ήπατος, ενώ τα γλυκομακροπεπτίδια που υπάρχουν στο τυρόγαλο διεγείρουν την έκκριση της χολοκυστοκίνης (ορμόνη που αυξάνει τον κορεσμό μετά το γεύμα με αποτέλεσμα να αισθανόμαστε πλήρεις), ενώ εμποδίζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό πέτρας στα δόντια. Παράλληλα, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος μπορεί να διατηρήσει ακόμη και τα επίπεδα του αζώτου στον οργανισμό σε φυσιολογικές τιμές, κατά τη διάρκεια διατροφών χαμηλής θερμιδικής αξίας, όταν αυτή αποτελεί τη μοναδική διατροφική πηγή πρωτεΐνης. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι τα τελευταία χρόνια διαπιστώνεται πως η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα του καρκίνου, και συνεπώς μπορεί ο άνθρωπος να την εκμεταλλευτεί για την πρόληψη του καρκίνου.

Η λακτόζη αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα του γάλακτος και περιέχεται στον ορό γάλακτος σε ποσοστά μέχρι και 50%. Πρόκειται για έναν δισακχαρίτη που συναντάται κυρίως στο γάλα των θηλαστικών και αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Το χαρακτηριστικό αυτό σάκχαρο συντίθεται αποκλειστικά από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Η λακτόζη πραγματοποιεί τη βιοσύνθεσή της, δαπανώντας τη γλυκόζη που μεταφέρεται στο μαστό διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος, καθώς αυτή, σε διαδικασία, εξελίσσεται στη συσκευή Golgi. Ένα μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε uridine diphosphate (UDP) γαλακτόζη, η οποία στη συνέχεια ενώνεται με ένα μόριο γλυκόζης, με τη δράση του ενζύμου λακτόζη-συνθετάση (lactose synthase) [σύμπλοκο αποτελούμενο από β -1,4-γαλακτοζυλτρανσφεράση (β -1,4-galactosyltransferase) και α -γαλακταλβουμίνη]. Η α -γαλακταλβουμίνη αποτελεί μοναδική πρωτεΐνη για το γάλα, όπου τροποποιεί τη δράση του ενζύμου γαλακτοζυλτρανσφεράση ώστε αυτό να καταλύει το σχηματισμό της λακτόζης από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο UDP γαλακτόζης. Στη συνέχεια η λακτόζη ελευθερώνεται με τα εκκριτικά κοκκία μαζί με τις πρωτεΐνες (Novak et al., 1999; Walstra, Wouters and Geurts, 2005; Crisà, 2013).

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η μέση σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών, αγελαδινών και πρόβειων τυριών, σύμφωνα με στοιχεία του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και όπως προκύπτει από τα δεδομένα στοιχεία το πρόβειο γάλα

υπερτερεί σημαντικά έναντι του αγελαδινού, σε ό,τι αφορά στην πρωτεΐνη και στο λίπος. Αναφορικά, σημειώνεται επίσης μεταφορά μεγαλύτερης ποσότητας λίπους στο τυρόγαλο στις περιπτώσεις των σκληρών τυριών απ' ό,τι των μαλακών.

Πίνακας 1.1: Σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών τυριών πρόβειου και αγελαδινού γάλακτος. (Ανυφαντάκης, 2004)

Συστατικά (%)	Λευκό τυρί άλμης		Κεφαλοτύρι		Γραβιέρα	
	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρόβειο
Ξηρή ουσία	6,44	7,87	6,55	8,10	6,90	8,74
Νερό	93,56	92,13	93,45	91,90	93,10	91,23
Λίπος	0,32	0,39	0,4	0,80	0,60	1,26
Πρωτεΐνες	0,82	1,61	0,80	1,55	0,90	1,52
Λακτόζη	4,80	5,33	4,85	5,25	4,90	5,27
Γαλακτικό οξύ	0,12	0,14	0,11	0,14	0,12	0,14
Ανόργανα άλατα	0,50	0,60	0,50	0,50	0,50	0,50

Στο τυρόγαλο, εκτός από τα κύρια συστατικά του γάλακτος, μεταφέρονται επίσης σε σημαντικές ποσότητες άλατα και βιταμίνες. Αξιοσημείωτη είναι η πληροφορία για το τυρόγαλο, ότι στη δομή των πρωτεϊνών του συμμετέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στην ενδεδειγμένη αναλογία και τις μεταξύ τους σχέσεις για τη διατροφή του ανθρώπου, γεγονός που τους προσδίδει εξαιρετική βιολογική αξία. Τα μεταλλικά άλατα του τυρογάλακτος είναι κυρίως χλωριούχο κάλιο και χλωριούχο νάτριο (σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%), μοιραζόμενα με άλατα ασβεστίου. Στον ορό γάλακτος απαντώνται σε πολύ μικρότερες αναλογίες και άλλα συστατικά, όπως γαλακτικό και κιτρικό οξύ, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις, όπως ουρία και ουρικό οξύ, και βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Siso, 1996; Venetsaneas et al., 2009).

1.1.2 Ρόλος τυρογάλακτος ως ρυπαντής και αξιοποίησή του

Ρυπαντική Δραστηριότητα

Ιστορικά, ο άνθρωπος αντιλαμβανόμενος από πολύ παλιά την πολύτιμη θρεπτική αξία του τυρογάλακτος, το αξιοποίησε παρασκευάζοντας διάφορα προϊόντα τύπου μυζήθρας, με αυτό ως πρώτη ύλη, και χορηγώντας το σε ζώα (κυρίως χοίρους) ως τροφή. Κατά την παρασκευή

μυζήθρας προκύπτει αρκετή ποσότητα τυρογάλακτος ως παραπροϊόν, το οποίο περιέχει σαφώς λιγότερη ποσότητα πρωτεϊνών, αλλά ικανή ποσότητα λακτόζης (4,5%-5% w/v) ώστε να ρυτάνει το περιβάλλον στο οποίο απορρίπτεται.

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή τυροκομικών και γαλακτοκομικών προϊόντων που προκύπτει με το πέρασ του χρόνου, βάσει της ζήτησης και των διατροφικών συνηθειών του σήμερα, έχει σαν αποτέλεσμα και την αναλόγως αυξανόμενη παραγωγή τυρογάλακτος. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά το έτος 2016, η παγκόσμια ετήσια παραγωγή τυρογάλακτος υπολογίστηκε περί τους 200.000.000 τόνους, με ετήσια γραμμική αύξηση ποσοστού 3% για τα τελευταία 21 χρόνια (Domingos et al., 2018).

Το τυρόγαλο εξαιτίας των οργανικών συστατικών και του γαλακτικού του οξέος διαθέτει μεγάλη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (BOD) με αποτέλεσμα να δημιουργεί μεγάλα προβλήματα στο βιότοπο, όταν απορρίπτεται σε υδάτινο περιβάλλον, προκαλώντας το φαινόμενο του ευτροφισμού. Μάλιστα είναι πολλές οι χώρες στις οποίες έχει απαγορευτεί η απόρριψη του τυρογάλακτος στο αποχετευτικό δίκτυο των πόλεων, εάν πρώτα δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία μείωσης του φορτίου οργανικής ουσίας του. Αξιοσημείωτο δε, είναι το γεγονός ότι υπολογίζεται πως, κατά μέσο όρο, ένα τυροκομείο επεξεργαζόμενο 100 τόνους γάλακτος την ημέρα, παράγει τυρόγαλα που ρυτάνει όσο περίπου τα απόβλητα πόλης 55.000 κατοίκων, ενώ απαντώνται και απόψεις ισχυριζόμενες ότι υφίσταται η αντιστοιχία ρύπανσης ενός λίτρου τυρογάλακτος ανά άτομο. Τα τελευταία χρόνια, για το λόγο αυτό, έχουν λάβει χώρα προσπάθειες για την καλύτερη δυνατή διαχείριση και αξιοποίηση του τυρογάλακτος, προς επίλυση του προβλήματος της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Η ανάγκη για εκμετάλλευση και βιοτεχνολογική αξιοποίηση του απορριπτόμενου τυρόγαλου επέφεραν την ανάπτυξη διαφορετικών τρόπων επεξεργασίας, όπως η αερόβια επεξεργασία, η αναερόβια επεξεργασία, η επεξεργασία με μεμβράνες, η κατασκευή κατάλληλων υγροτόπων, η πήξη /κροκίδωση /καθίζηση, βιοαποκατάσταση κ.α. (Καττή, 2010). Κατά την αερόβια επεξεργασία, παρουσιάζεται ανάπτυξη μικροοργανισμών σε πλούσιο σε οξυγόνο περιβάλλον, οι οποίοι θα κληθούν να μετατρέψουν τα οργανικά συστατικά του αποβλήτου σε CO₂, H₂O, NO₃, διασπάσιμα οργανικά υλικά και υπολειμματικό κυτταρικό υλικό. Με την παροχή οξυγόνου χορηγείται ενέργεια για τη βιοοξείδωση του υποστρώματος, κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του βιοαποικοδομούμενου BOD μετατρέπεται σε κυτταρική μάζα. Πρόκειται για μέθοδο

με υψηλή κατανάλωση ενέργειας, η οποία απαιτεί συνήθως μεγάλες εγκαταστάσεις υψηλού κόστους (Καττή, 2010). Η αναερόβια επεξεργασία τυροκομικών αποβλήτων, χαρακτηρίζεται ως η βασικότερη διεργασία που εφαρμόζεται, γεγονός που αιτιολογείται με βάση την υψηλή περιεκτικότητα των συγκεκριμένων αποβλήτων σε οργανικό φορτίο. Παρά ταύτα, η συμβατική τεχνική της μεθόδου της αναερόβιας επεξεργασίας μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά σε απόδοση, από τις υψηλές συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών και λιπιδίων που εμπεριέχονται στα απόβλητα. (Καττή, 2010).

Αξιοποίηση Παραπροϊόντος

Το τυρόγαλο πρόκειται για ένα παραπροϊόν ιδιαίτερα αξιόλογο διατροφικά. Είναι ένα παραπροϊόν πλούσιο σε υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνη, εν συναρτήσεως της επιβλαβούς ρύπανσης που επιφέρει η απόρριψή του σε υδάτινους βιότοπους, δε θα μπορούσε, παρά να δημιουργήσει την ανάγκη για αξιοποίησή του. Η παραλαβή καθαρής πρωτεΐνης τυρογάλακτος και των υψηλής διατροφικής αξίας παραπροϊόντων που προκύπτουν από την αξιοποίηση της λακτόζης, θα μπορούσαν να συγκροτήσουν μία εξαιρετικά επικερδή συμπληρωματική ενασχόληση, σε πολλές ήδη υπάρχουσες επιχειρήσεις.

Κατόπιν μελετών, η επιστημονική κοινότητα αποφάνθηκε ότι μία πιθανή οδός ανάπτυξης της βιοεπεξεργασίας θα μπορούσαν να αποτελέσουν οι μικροβιακές διεργασίες για τη μετατροπή του τυρογάλακτος σε πολύτιμα προϊόντα. Οι διεργασίες ζύμωσης θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά το οργανικό φορτίο (περιεκτικότητα σε λακτόζη), επιτρέποντας έτσι μια οικονομική και εφικτή εναλλακτική χρήση του ορού γάλακτος, μειώνοντας έτσι τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η ενσωμάτωση της βιολογικής διαδικασίας, σαν πρόσθετη λύση στο αρνητικό αυτό φαινόμενο, ορίζεται ως η ταυτόχρονη ενσωμάτωση περισσότερων από δύο μονάδων λειτουργιών σε μία μόνο διαδικασία, επιτρέποντας έτσι τη χρήση ενός πλούσιου σε οργανικά απόβλητα παραπροϊόντος, όπως το τυρόγαλο, για τη δημιουργία πολλαπλών πρόσθετων προϊόντων.

Μεταξύ των κυριότερων οδών αξιοποίησης του τυρογάλου προτείνονται διαδικασίες βιοδιύλισης που εφαρμόζουν την αξιοποίηση της λακτόζης και της πρωτεΐνης ορού γάλακτος προς τη διαμόρφωση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω ενζυμικών, μικροβιακών και χημικών μεθόδων. Πληθώρα επιστημόνων τα τελευταία χρόνια, μελετούν την παραγωγή

ενώσεων προστιθέμενης αξίας ως αποτέλεσμα ενζυμικής κατάλυσης ή μικροβιακών ζυμώσεων, όπου στο πλαίσιο αυτό, η παραγωγή γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, μικροβιακών λιπιδίων, μικροβιακής βιομάζας, πρωτεΐνης μονοκυττάρων, πολυ- υδροξυαλκανοϊκών, ενζύμων και ενδο-πολυσακχαριτών έχει εξεταστεί σε πολλές μελέτες που ασχολούνται με την εκμετάλλευση της λακτόζης από ορό γάλακτος (Banaszewska et al., 2014; Pescuma, de Valdez and Mozzi, 2015; Terrou et al., 2017), ενώ παράλληλα και η σύνθεση παραγώγων λακτόζης, κυρίως ως νέοι και στοχευμένοι πρεβιοτικοί ολιγοσακχαρίτες και εστέρες λιπαρών οξέων, προσέλκυσε επίσης πρόσφατα μεγάλο ενδιαφέρον (Villamiel et al., 2014; Chandra et al., 2018; Nooshkam, Babazadeh and Jooyandeh, 2018).

Η χρήση λακτόζης τυρογάλακτος έχει προταθεί ως εναλλακτικό υπόστρωμα για την ενζυμική σύνθεση πιθανών πρεβιοτικών, οδηγώντας σε μια πιο βιώσιμη και ανταγωνιστική διαδικασία στο πλαίσιο της έννοιας της βιοοικονομίας. Ένα εκ των προϊόντων της ζύμωσης της λακτόζης είναι η παραγωγή γαλακτο-ολιγοσακχαριτών (GOS), που προκύπτουν μέσω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (EC 3.2.1.23), αποδίδοντας ένα μείγμα ολιγο-, μονο- και δισακχαριτών (Charalampopoulos and Rastall, 2012). Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες εμφανίζονται φυσικά στο γάλα ζώων και ανθρώπων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά παράγονται κυρίως χημικά, με γλυκοζυλίωση ή ενζυμικές οδούς για την κάλυψη των απαιτήσεων της αγοράς. Το παγκόσμιο μέγεθος αγοράς των γαλακτο-ολιγοσακχαριτών εκτιμάται ότι ήταν στα 703,8 εκατομμύρια δολάρια το 2017, και αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά έως το 2025, εξαιτίας της συνεχώς αυξανόμενης ζήτησης για κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής (Adroit Market Research, 2021). Οι πρεβιοτικές ιδιότητες των γαλακτο-ολιγοσακχαριτών έχουν αποδειχθεί ευρέως σε *in vitro* μελέτες, σε ζώα και ανθρώπους.

Μία ακόμη πιθανή περίπτωση εκμετάλλευσης του τυρογάλακτος είναι μέσω της παραγωγής υδροξυαλκανοϊκών εστέρων (Polyhydroxyalkanoates, PHA), οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών, τα οποία αποτελούν ένα μεγίστης σημασίας περιβαλλοντικό πρόβλημα. Η χρήση της λακτόζης του ορού γάλακτος μπορεί δυνητικά να μειώσει το κόστος παραγωγής των PHA, επιλύοντας ταυτόχρονα ένα διττό περιβαλλοντικό πρόβλημα (Borges-Tiago, Tiago and Cosme, 2019). Συγχρόνως, οι εστέρες λακτόζης αντίστοιχα, κάνουν την εμφάνισή τους στη βιομηχανία των τροφίμων ως άοσμες, μη τοξικές και βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις υψηλής σημασίας (Nooshkam, Babazadeh and

Jooyandeh, 2018). Αν και οι εστέρες λακτόζης δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, έχουν βρει αρκετές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών (Staroń et al., 2018). Οι εστέρες αυτοί εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και σταθερότητας στα τρόφιμα, ενώ μπορούν να εφαρμοστούν ως εναλλακτικές λύσεις χαμηλών λιπαρών. Επιπλέον, εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις έναντι διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων, καθώς και φαρμακευτικών ιδιοτήτων, όπως η αντικαρκινική δραστηριότητα (Nooshkam, Babazadeh and Jooyandeh, 2018; Staroń et al., 2018).

Άλλη μέθοδος αξιοποίησης του τυρογάλακτος είναι αυτή της κρυσταλλοποίησης, κατά την οποία απομονώνεται η λακτόζη από αυτό, και έπειτα χρησιμοποιείται ως διατροφικό συμπλήρωμα σε παιδικά γάλατα, όπως και σε διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα, λόγω πλαστικότητας, ελαφριάς γεύσης και μειωμένης γλυκαντικής δύναμης (Yves, 1979). Με αναγωγή της λακτόζης προκύπτει η λακτιτόλη, η οποία χαρακτηρίζεται για τη γλυκαντική της δύναμη, ενώ με ισομερισμό της λακτόζης προκύπτει η λακτουλόζη, η γλυκύτητα της οποίας ανέρχεται στο 48 – 62 % της σακχαρόζης και χρησιμοποιείται σε συμπληρώματα διατροφής. Ωστόσο, διεξάγονται συνεχείς αναζητήσεις για νέες χρήσεις της λακτόζης, με την πλειοψηφία τους να βασίζεται στην απευθείας ζύμωση της. Η λακτόζη, μπορεί να υποστεί υδρόλυση, ως πηγή άνθρακα, από ορισμένους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η γλυκαντική αξία και η διαλυτότητα, ευνοώντας τη χρήση του τυρογάλακτος σε προϊόντα διατροφής. Επιπλέον, με ενζυμική και όξινη υδρόλυση επιτυγχάνεται η παραγωγή γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη, γεγονός που επιτρέπει την κατανάλωσή του από άτομα με δυσανεξία στο συγκεκριμένο σάκχαρο (Kosaric and Asher, 1985).

Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η ανάπτυξη διαφόρων μεθοδολογιών αξιοποίησης της παραγόμενης λακτόζης, οι οποίες περιλαμβάνουν τη βιο-επεξεργασία του τυρογάλαου και τη μετατροπή της λακτόζης σε αιθανόλη. Σε χώρες όπως η Ιρλανδία, οι Η.Π.Α και ιδιαίτερα η Νέα Ζηλανδία, χρησιμοποιείται περίπου το 50 % του παραγόμενου τυρογάλακτος για την παραγωγή αιθανόλης (Mawson et al., 1994). Επιπρόσθετα, το τυρογάλο εφαρμόζεται στη ζαχαροπλαστική-μαγειρική, σε αρτοποιασκευάσματα, χρησιμοποιείται για παραγωγή σκόνης τυρογάλακτος (30%), στην παρασκευή τυριών τυρογάλακτος, και για την παραγωγή λακτόζης (15%), ενώ η περίσσεια αξιοποιείται ως πρωτεϊνικό συμπύκνωμα (Siso, 1996; John, Nampoothiri and Pandey, 2007; Guimarães, Teixeira and Domingues, 2010).

Σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκαλέσει στον επιστημονικό κλάδο, η ιδιότητα των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος, να συμβάλουν στην παραγωγή προϊόντων με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος παρουσιάζουν φυσικοχημικές ιδιότητες που οδηγούν σε βελτιωμένη υφή και ποιότητα των τελικών προϊόντων, όσον αφορά τις δομικές και τις ρεολογικές λειτουργίες τους (Cinelli et al., 2014; Tarhan et al., 2016). Ορισμένες άλλες ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, όπως η λειτουργία τους ως επιφανειοδραστικά συστατικά, αφριστικοί και πηκτωματοποιητικοί παράγοντες, πυκνωτικοί παράγοντες και γαλακτωματοποιητές, μεταξύ άλλων, υποδεικνύουν τη στοχευμένη εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως συστατικά (Fu and Nakamura, 2017; Andoyo et al., 2018; Khalifa et al., 2018). Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μπορούν να αναπτύξουν μακρο-, μικρο- και νανο-δομές με πολλές, πολλά υποσχόμενες εφαρμογές στα τρόφιμα, όπως η χρήση τους ως φορείς διαφόρων βιο- ενώσεων ή θρεπτικών συστατικών.

Με βάση τις προαναφερθείσες τεχνολογίες, η ανάπτυξη τεχνικών επεξεργασίας των πρωτεϊνών και της λακτόζης του ορού γάλακτος, μπορεί να επιτρέψει περαιτέρω εφαρμογές που θα κατευθύνονται προς προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

1.2 Οξυγαλακτικά Βακτήρια

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ταξινόμηση

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria, LAB) τάσσονται σε μια οικογένεια των *Lactobacillaceae* που διαχωρίζονται σε δύο υποοικογένειες, με κριτήριο το σχήμα των κυττάρων τους:

1) *Streptococcaceae* (γένη: *Diplococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus*).

2) *Lactobacilleae* (γένος *Lactobacillus*), και αφορούν κυρίως τα γένη:

I. *Streptococcus*,

II. *Leuconostoc*,

III. *Pediococcus*,

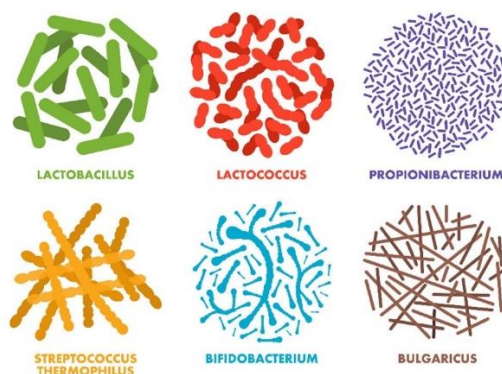
IV. *Lactobacillus*.

Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά

Το σχήμα των κυττάρων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ποικίλλει από σφαιρικό ως ραβδόμορφο με όλες τις ενδιάμεσες διαβαθμίσεις (Εικόνα 1.2). Οι βάκιλοι, ανάλογα με το είδος τους ή συχνά και με το στέλεχός τους, είναι μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους. Βάκιλοι μεγάλου μεγέθους είναι, ενίοτε, τα κύτταρα του είδους *Lactobacillus bulgaricus*, ενώ βάκιλοι μικρού μεγέθους είναι τα κύτταρα του *Lactobacillus plantarum*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το σχήμα των κυττάρων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και πολλές φορές ο μελετητής βρίσκεται σε δίλημμα να αποφανθεί αν το κύτταρο είναι κόκκος ή βραχύς βάκιλος.

Σε μια κλασσική προσέγγιση, ο Orla-Jensen (1942) , όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους οργανισμούς (ραβδία ή κόκκους) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Για τις σύγχρονες προσεγγίσεις, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη φυλογενετικές αναλύσεις και μοριακές τεχνικές, αυτός ο ορισμός θεωρείται μονοσήμαντος. Παρόλα αυτά, παραμένει γενικά αποδεκτός (Stiles and Holzapfel, 1997; Salminen and Wright, 2004).

Γενικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ανεξαρτήτως σχήματος, απαντούν σε αλυσίδες επιμήκεις ή βραχείες, ή σε ζεύγη, κατά περίπτωση, και σπανίως μεμονωμένα. Διαθέτουν ζυμωτικό μεταβολισμό, χαρακτηρίζονται όμως και ως προαιρετικώς αναερόβια (facultative anaerobes) ή μικροαερόφιλα. Σχεδόν όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν υπό αερόβιες συνθήκες (μέσα σε τρυβλία petri) με εξαίρεση ορισμένα είδη *Leuconostoc*, παρά το γεγονός ότι δεν είναι ικανά να οξειδώσουν τα συστατικά του υποστρώματος.

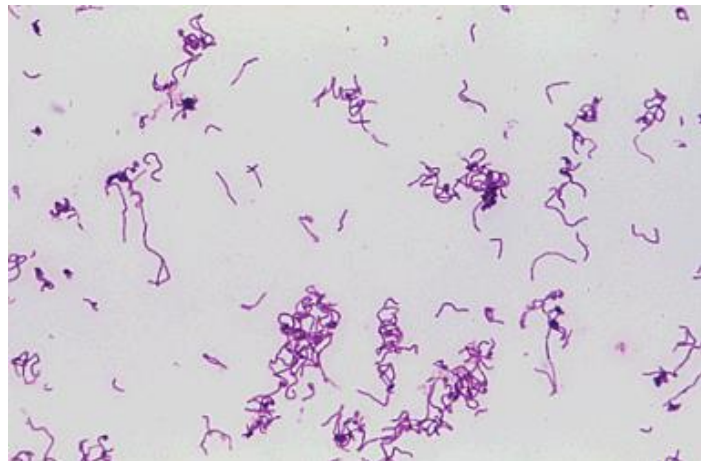


Εικόνα 1.2: Ενδεικτικά σχηματικά παραδείγματα διαφόρων οξυγαλακτικών βακτηρίων.

(Chomba, 2020)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνήθως διαθέτουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες, ενώ οι σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις τους περιλαμβάνουν πουρίνες, αμινοξέα και πυριμιδίνες (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Αναπτύσσονται μόνο σε πλούσια θρεπτικά υλικά, δεδομένου ότι έχουν μικρές συνθετικές ικανότητες. Πολλά πλεονεκτούν αναπτυξιακά σε στερεά θρεπτικά υλικά, εφόσον έχει εξασφαλισθεί στον ελεύθερο χώρο 5-20% CO₂. Όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μη σποριογόνα, θετικά κατά Gram (Εικόνα 1.3) και αρνητικά ως προς την καταλάση. Δεν πραγματοποιούν κίνηση, πλην ορισμένων περιπτώσεων βακίλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια. Η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 55% (Klein, 1998; Ανυφαντάκης, 2004).

Η συντριπτική πλειοψηφία οξυγαλακτικών βακτηρίων επίσης, δεν είναι παθογόνος, ούτε για τον άνθρωπο, ούτε για τα ανώτερα ζώα. Απαντούν όμως ως παράσιτα στο στόμα, στο αιδοίο και στον πεπτικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου, χωρίς να δημιουργούν ποτέ παθολογικές καταστάσεις. Παρουσιάζονται ακόμη και ως επίφυτα σε ορισμένα φυτά και σε ζυμωμένα φυτικά και ζωικά προϊόντα (ελιές, τουρσιά, ενσιρωμένες ζωτροφές, βουτυρόγαλα, κρέμα, γιαούρτι, τυρί, φέτα κ.τ.λ.).

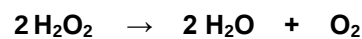


Εικόνα 1.3 *Lactobacillus* sp. κατόπιν χρώσης Gram. (Chaudhary, 2016)

Μεταβολικές δραστηριότητες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια σημειώνουν ποικίλα κοινά χαρακτηριστικά σε ό,τι αφορά το μεταβολισμό και τις θρεπτικές τους απαιτήσεις, παρότι παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους. Στο σύνολό τους, είναι προαιρετικά αναερόβια (Khalid, 2011), τα οποία

όμως αναπτύσσονται με ευκολία και υπό αερόβιες συνθήκες, χωρίς να είναι ικανά να συνθέσουν ATP διαμέσου αναπνοής. Το φαινόμενο αυτό, είναι απόρροια της αδυναμίας τους να συνθέτουν κυτοχρώματα και άλλα ένζυμα με συστατικό την αίμη. Έτσι δε μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και να αποδεσμεύσουν μέσω οξειδώσεως το σύνολο της ενέργειας που εγκλείει το μόριο των υδατανθράκων. Ορισμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορούν να οξειδώσουν, σε μικρή κλίμακα, ορισμένες ουσίες. Η διαδικασία αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες και με την παρέμβαση των φλαβοπρωτεϊνών ως ενζύμων, (με συνένζυμο τα FMN και FAD) (Carozzi et al., 2012), ενώ από τις οξειδώσεις αυτές προκύπτει σύνθεση ATP. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν επηρεάζεται από το οξυγόνο και είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου καταφέρνουν να εξασφαλίσουν ενέργεια μέσω ζυμώσεως των σακχάρων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εξαιτίας της αδυναμίας τους να συνθέσουν αίμη, είναι τα μόνα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν υπό αερόβιες συνθήκες και είναι αρνητικά ως προς την καταλάση (ένζυμο με συστατικό την αίμη). Στα αρνητικά ως προς την καταλάση μικρόβια η κατωτέρω αντίδραση, μέσω της οποίας διασπάται το τοξικό για τα κύτταρα υπεροξείδιο του υδρογόνου, δεν είναι εφικτή:



Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αντίθετα με όλα τα άλλα μικρόβια αλλά και με τους φυτικούς και τους ζωικούς ιστούς, εναιωρούμενα σε αραιό διάλυμα H_2O_2 δεν αποδεσμεύουν μοριακό οξυγόνο υπό μορφή φυσαλίδων. Αυτός είναι ο τρόπος δοκιμής της καταλάσης, μέσω της οποίας διαχωρίζονται τα οξυγαλακτικά βακτήρια από μεικτούς πληθυσμούς. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν είναι ικανά να συνθέσουν αιμίνη (hemin), πορφυρίνη δηλαδή, που είναι προσθετική ομάδα του συνόλου των ενζύμων μορφής αιμινο- πρωτεϊνών. Παρά ταύτα υπάρχουν ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια που μπορούν να συνθέσουν καταλάση αν τους χορηγηθεί εξωγενής αιμίνη (ερυθρά αιμοσφαίρια), διότι τα ίδια συνθέτουν την πρωτεΐνη- αποένζυμο (Zotta et al., 2018).

Οι αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων συνήθως παραμένουν μικρές (διαμέτρου λίγων χιλιοστών), γιατί η αποδεσμευόμενη για κυτταροπλαστική ενέργεια είναι περιορισμένη. Επιπλέον είναι συνήθως λευκές (Ismail, Yulvizar and Mazhitov, 2018) εξαιτίας της απουσίας των

κυτοχρωμάτων από τα κύτταρα. Σε κανένα είδος οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν υπάρχουν έγχρωμες αποικίες, ενώ το χρώμα που επικρατεί στα περισσότερα είναι το άσπρο της κιμωλίας. Υπάρχουν ορισμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία σχηματίζουν υπό αερόβιες συνθήκες μεγάλες αποικίες, που το μέγεθός τους όμως οφείλεται, κατά μεγαλύτερο ποσοστό, στη σύνθεση υπό των κυττάρων εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη (δεξτράνης ή λαιβάνης) σε βάρος της περιεχόμενης στο θρεπτικό υλικό σακχαρόζης. Σε άλλα θρεπτικά υλικά τα ίδια είδη σχηματίζουν μικρές αποικίες (ελλείπει σακχαρόζης). Όταν στο υπάρχον θρεπτικό υλικό ενσωματώνεται μια ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου, εξασφαλίζεται ουδέτερο pH και προσδίδεται γαλακτώδης εμφάνιση σε αυτό, κατόπιν της ζελοποίησής του, σε τρυβλία.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, λόγω της ικανότητας να σχηματίζουν οξέα και να αντέχουν στην αυξημένη συγκέντρωσή τους, μπορούν να επιβιώσουν σε μεικτούς πληθυσμούς και να υπερισχύσουν. Στην περίπτωση αυτή, τα ίδια δημιουργούν εκλεκτικό περιβάλλον και ταυτόχρονα ζυμώνουν φυτικές και ζωικές πρώτες ύλες, πλούσιες σε σάκχαρα (πίκλες, τουρσιά, βούτυρο, διάφορα τυριά, βουτυρόγαλα, γιαούρτι, ενσιρωμένα προϊόντα) προς τελικά προϊόντα χρήσιμα για τον άνθρωπο. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ως μια ομάδα βακτηρίων με αυξημένη οικονομική σημασία, για την παραγωγή των βιομηχανικών προϊόντων και την προσφορά τους στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, ιδιαίτερα για τη μικροβιολογία τροφίμων.

Ομοζυμωτική και ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση σακχάρων

Η γαλακτική ζύμωση σημασιολογικά κατατάσσεται δεύτερη μετά την αλκοολική ζύμωση, από άποψη οικονομικού ενδιαφέροντος. Πραγματοποιείται από βακτήρια θετικά κατά Gram, που κατά τη συντριπτική τους πλειοψηφία, δε συνθέτουν καταλάση.

Σύμφωνα με το μεταβολισμό τους, τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαιρούνται σε δύο ομάδες:

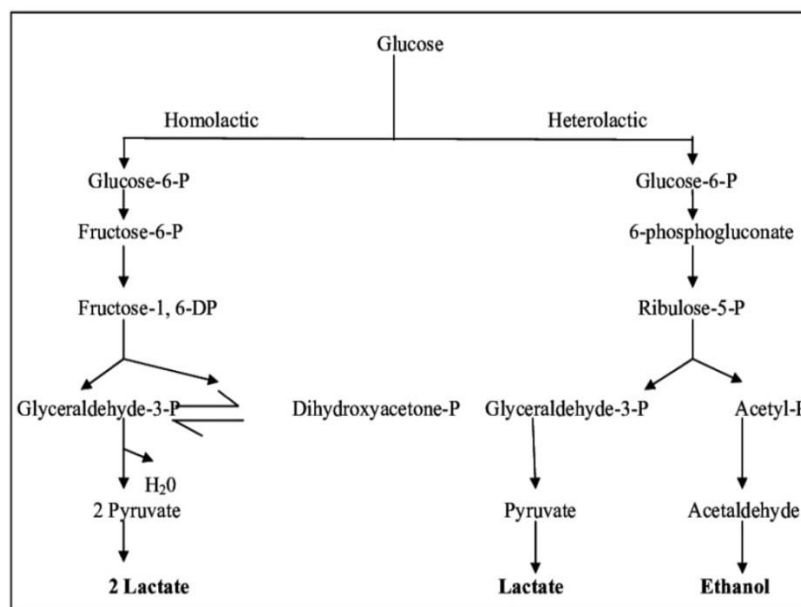
I. Τα ομοζυμωτικά (homofermenters) τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά προς γαλακτικό οξύ (Εικόνα 1.4).

II. Τα ετεροζυμωτικά (heterofermenters), εκ των οποίων όσα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο φωσφοκετολάση, μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης ή οξικού οξέος και CO₂ (Εικόνα 1.4). Στα ετεροζυμωτικά ανήκουν

τα είδη του γένους *Betacoccus* (*Leuconoctoc*) και ορισμένα είδη του γένους *Lactobacillus* (Khalid, 2011).

Τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν το 80-98% των σακχάρων τους σε γαλακτικό οξύ. Αυτό είναι αποτέλεσμα που προκύπτει μέσω της αντίδρασης της γαλακτικής αφυδρογονάσης, δεδομένου του γεγονότος ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί στερούνται δραστηριότητας φωσφοροκετολάσης. Τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, εν αντιθέσει με τα πρώτα, μετατρέπουν περίπου τη μισή ποσότητα των σακχάρων τους σε γαλακτικό οξύ, ενώ την άλλη μισή σε αιθανόλη, CO₂, αλλά και οξικό οξύ. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια παράγουν CO₂ ως προϊόν της ζύμωσης, λόγω του ότι αποκαρβοξυλιώνουν το 6 φωσφογλυκονικό οξύ. Σε αντίθεση τα ομοζυμωτικά παράγουν λίγο ή και καθόλου CO₂ (Khalid, 2011).

Η γαλακτική ζύμωση εφαρμόζεται στην παραγωγή πλήθους ζυμωμένων φυτικών (πράσινων και μαύρων ελιών, τουρσιών κ.τ.λ.) και ζωοκομικών (γαλακτοκομικών, σαλαμιών αέρος) προϊόντων, όπως και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. προϊόντα τομάτας) η γαλακτική ζύμωση λαμβάνει χώρα αυθόρμητα και είναι ανεπιθύμητη, αφού μειώνει την περιεκτικότητα των προϊόντων σε σάκχαρα.



Εικόνα 1.4: Μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθείται κατά την ομογαλακτική και ετερογαλακτική ζύμωση (Ray and Didier, 2014)

1.2.2 Εναρκτήριες καλλιέργειες

Ορισμός και βιομηχανική χρήση

Ο όρος «εναρκτήρια καλλιέργεια» ή «καλλιέργεια εκκίνησης» ορίζει το μικροοργανισμό που προστίθεται σε ένα υπόστρωμα τροφίμου, προκειμένου να επιφέρει επιθυμητές και προβλέψιμες αλλαγές στο τελικό προϊόν, όπως ενισχυμένη συντήρηση, βελτιωμένη θρεπτική αξία, τροποποιημένες οργανοληπτικές ιδιότητες. Η προσθήκη του εμβολίου εναρκτήριας καλλιέργειας παρέχει τη διασφάλιση ότι τα προϊόντα κατασκευάζονται με συνέπεια ως προς την ποιότητα και το χρόνο της ζύμωσης (Durso and Hutkins, 2003). Η εξέλιξη της βιοτεχνολογίας έχει επιφέρει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον σε βιομηχανική κλίμακα, αφού έχει δημιουργηθεί πλήθος νέων κατηγοριών τροφίμων, και άλλων προϊόντων, λόγω της διεύρυνσης του ρόλου των καλλιεργειών εκκίνησης. Αυτό που επιζητά η βιομηχανία τροφίμων είναι καλλιέργειες εκκίνησης, ασφαλείς (για την αποφυγή τροφικών δηλητηριάσεων και επιμολύνσεων), εύχρηστες και οικονομικά συμφέρουσες. Πολύ σοβαροί λόγοι ενδιαφέροντος της χρήσεως των καλλιεργειών εκκίνησης είναι η αύξηση του χρόνου συντήρησης, η προσθήκη ιδιοτήτων στο προϊόν, όπως η προβιοτική δράση, και η ανάπτυξη ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.

Κριτήρια χρήσης καλλιεργειών εκκίνησης

Τα κριτήρια χρήσης των οξυγαλακτικών καλλιεργειών εκκίνησης που πρέπει να πληρούνται είναι τα εξής:

- Να επικρατούν στη μικροχλωρίδα του τροφίμου και να μην επιτρέπουν με αυτό τον τρόπο εκτροπή της ζύμωσης.
- Να παράγουν, με γρήγορο ρυθμό και σε ποσότητα, γαλακτικό οξύ ή να παράγουν την επιθυμητή ποσότητα με συγκεκριμένο ρυθμό, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα.
- Να πολλαπλασιάζονται εύκολα.
- Να έχουν σταθερότητα στις επιθυμητές τους ιδιότητες κατά τον πολλαπλασιασμό και την αποθήκευσή τους.
- Να είναι απολύτως ασφαλή σε επίπεδο παθογένειας για τον άνθρωπο και να μην είναι τοξικά.

Μορφές καλλιέργειών εκκίνησης στη βιομηχανική αγορά

Η τεχνολογία επιβάλλει την παστερίωση του γάλακτος πριν αρχίσει η διαδικασία παρασκευής ενός γαλακτοκομικού προϊόντος. Αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο καταστρέφονται παθογόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων, ενώ παράλληλα έχει επιτευχθεί ευκολότερη ανάπτυξη προς το επιθυμητό αποτέλεσμα της μικροχλωρίδας της ζύμωσης. Μετά την ολοκλήρωση της παστερίωσης είναι το σημείο προσθήκης των εκάστοτε κατάλληλα επιλεγμένων καλλιεργιών, ενώ οι μορφές καλλιεργιών εκκίνησης που απαντώνται στην αγορά, είναι υγρή ή λυοφιλιωμένη μετά από τη συμπύκνωσή τους, ή χωρίς συμπύκνωση υγρή ή λυοφιλιωμένη (Robinson, 2002). Ειδικότερα, μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες καλλιεργιών:

- I. Υγρές καλλιέργειες: Τεχνολογικά, οι υγρές καλλιέργειες έχουν χάσει πλέον το ενδιαφέρον τους, αφού για να χρησιμοποιηθούν από το τυροκομείο χρειάζεται να υποστούν ανακαλλιέργεια ούτως ώστε να αποκτήσουν την ενδεδειγμένη ζωτικότητα. Περιέχουν περίπου 10^9 κύτταρα ανά mL και διατηρούνται υπό ψύξη, ενώ με την πάροδο του χρόνου χάνουν από τη ζωτικότητά τους, εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης του γαλακτικού οξέος επί των βακτηρίων. Συνεπώς ο λόγος που οι υγρές καλλιέργειες έχουν πάψει να είναι τόσο διαδεδομένες, είναι ότι στο τελικό προϊόν αυξάνεται η αντικειμενική του αξία, δηλαδή το τελικό του κόστος, (γεγονός που μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση άλλων μορφών καλλιέργειας εκκίνησης) λόγω του εξειδικευμένου προσωπικού που απαιτείται για τη διαχείρισή τους και της ανάγκης για ειδικό μικροβιολογικό εξοπλισμό.
- II. Λυοφιλιωμένες καλλιέργειες: Πρόκειται για καλλιέργειες που περιέχουν περίπου 10^8 με 10^9 κύτταρα ανά mL, από τις οποίες αφαιρείται η υγρασία σε δύο στάδια, με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Στο πρώτο στάδιο παρουσιάζεται κατάψυξη του υγρού που περιέχει τα ζωντανά κύτταρα στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στο δεύτερο στάδιο σημειώνεται εξάχνωση του μεγαλύτερου μέρους του νερού, σε συνθήκες υπό μειωμένη πίεση. Κατόπιν της διαδικασίας αφαίρεσης της ανεπιθύμητης υγρασίας, αποθηκεύονται στους $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου και διατηρούνται για αρκετούς μήνες. Έπειτα της κατάψυξης για κάθε νέα χρήση απαιτείται ανακαλλιέργεια για αναζωογόνηση του πληθυσμού και αύξηση των κυττάρων, προτού η καλλιέργεια αυτή ενσωματωθεί στο τρόφιμο. Ομοίως με την προηγούμενη κατηγορία, έτσι και οι

λυοφιλιωμένες καλλιέργειες απαιτούν εξειδικευμένο ανθρώπινο και υλικοτεχνικό δυναμικό, με αποτέλεσμα να κρίνονται σχεδόν εξίσου δαπανηρές.

- III. Συμπυκνωμένες καλλιέργειες: Οι συμπυκνωμένες καλλιέργειες αποτελούν τις πιο διαδεδομένες μεταξύ των εταιριών του χώρου. Οι κατεψυγμένες συμπυκνωμένες καλλιέργειες διαθέτουν 10^{10} με 10^{12} κύτταρα ανά γραμμάριο (cfu/g), ενώ οι λυοφιλιωμένες 10^{11} με 10^{12} cfu/g. Στην κατηγορία αυτή απαντώνται βακτήρια ιδιαίτερος ενεργά που δεν απαιτούν ενδιάμεσες ανακαλλιέργειες εμβολίων και παράλληλα διατηρούν το μεγάλο πλεονέκτημα για τις βιομηχανίες, να είναι έτοιμες για άμεσο εμβολιασμό στα ενδεχόμενα τρόφιμα. Σαν καλλιέργειες χαρακτηρίζονται εύκολες στο χειρισμό τους και διατηρούνται μακροχρονίως, όμως υποχρεωτικά, σε συνθήκες ψύξης.

Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση, ή αλλιώς ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αφυδάτωση σχεδόν όλων των θερμικά ευαίσθητων υλικών και αρωμάτων. Η ξήρανση με κατάψυξη επιφέρει προϊόντα ανώτερης ποιότητας και με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Ezhilarasi et al., 2013). Η λυοφιλίωση αποτελεί μια πολύ-επίπεδη διαδικασία που σταθεροποιεί τα υλικά σε όλα τα τέσσερα βασικά στάδια: κατάψυξη, εξάχνωση (πρωτογενή ξήρανση), στάδιο εκρόφησης (δευτερογενή ξήρανση) και τελικά αποθήκευση (Labconco Corporation, 1992).

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης πλεονεκτεί των υπόλοιπων μεθόδων αφυδάτωσης, καθώς προσφέρει τα εξής (Gaidhani et al., 2015):

- Ισχυρή ανθεκτικότητα συντήρησης λόγω της απομάκρυνσης του νερού σε ποσοστό 95%-99,5%.
- Οι οξειδώσιμες ουσίες προστατεύονται καλά υπό συνθήκες κενού.
- Ακριβής ποσότητα εναπόθεσης και ομοιόμορφο περιεχόμενο.
- Χαμηλές πιθανότητες επιμόλυνσης λόγω ασηπτικής προσέγγισης της διαδικασίας.
- Μηδαμινή απώλεια σε πτητικές χημικές ουσίες και σε ευαίσθητα στη θερμότητα θρεπτικά και αρωματικά συστατικά.
- Ελάχιστες αλλαγές στις ιδιότητες, καθώς η ανάπτυξη μικροβίων και η επίδραση του ενζύμου δεν μπορεί να είναι ασκείται σε χαμηλή θερμοκρασία.

- Μεταφορά και αποθήκευση σε κανονική θερμοκρασία.
- Γρήγορος χρόνος ανασύστασης.
- Τα συστατικά του αποξηραμένου υλικού παραμένουν ομοιογενώς διεσπαρμένα.
- Το προϊόν διαχειρίζεται σε υγρή μορφή.
- Η αποστείρωση του μικροοργανισμού ή του προϊόντος μπορεί να επιτευχθεί και να διατηρηθεί.

Προδιαγραφές καλλιέργειών εκκίνησης

Οι εμπορικές καλλιέργειες εκκινήτων θα πρέπει να πληρούν και να εφαρμόζουν τη νομοθεσία κάθε χώρας σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος (IDA, 2012). Στην Ευρώπη έχουν θεσμοθετηθεί μέσω της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, 2007), ενώ κατόπιν ελέγχων, δημιουργήθηκαν τα ειδικά τεκμήρια ασφαλείας «Qualified Presumption of Safety» (QPS). Η συσκευασία των καλλιέργειών εκκίνησης θα πρέπει να αναγράφει σημαντικά στοιχεία όπως:

- Το όνομα του προϊόντος και την εμπορική του ονομασία.
- Το είδος του προϊόντος για το οποίο προορίζεται.
- Τη σύνθεση και το είδος του περιεχόμενου μικροοργανισμού/ μικροοργανισμών.
- Την ημερομηνία λήξης.
- Τον κωδικό της παρτίδας.
- Τη χώρα προέλευσης.
- Τις συνθήκες αποθήκευσης.
- Το είδος και τη διάρκεια συντήρησης.
- Το είδος της συσκευασίας και το καθαρό βάρος του προϊόντος.
- Τα πλήρη στοιχεία επικοινωνίας του παρασκευαστή.
- Τα μικροβιολογικά στοιχεία κατάταξης των μικροοργανισμών.
- Την υγρασία (%), τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών (cfu/g), την απουσία/ εφαρμογή αερίου κατά την παραγωγή.

1.2.3 Εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τρόφιμα

Ο άνθρωπος μέχρι την εποχή του Antony van Leeuwenhoek (1632- 1723) αγνοούσε τελείως την ύπαρξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά και των άλλων μικροοργανισμών γενικότερα, και πολύ περισσότερο τις βιοχημικές τους δραστηριότητες διαμέσου των οποίων προκύπταν γαλακτικό οξύ ή άλλα παράγωγα από τους υδατάνθρακες των πρώτων υλών. Από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα και μετέπειτα, ο άνθρωπος άρχισε να μελετά μικροοργανισμούς (οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, μύκητες κτλ.) ως οντότητες, και τις βιοχημικές τους δραστηριότητες, μέσω των οποίων παρήγαγαν χρήσιμα γι' αυτόν προϊόντα (ζύθος, οίνος, άρτος, βουτυρόγαλα, τουρσιά κ.τ.λ.) ή προξενούσαν ήπιες ή θανατηφόρες νοσηρές καταστάσεις, κι αυτό χάρη στις κλασικές εργασίες των Pasteur, Koch, Hansen, Beijerinck και των τόσων άλλων ταλαντούχων θεμελιωτών της μικροβιολογίας.

Από τα αρχαία κιόλας χρόνια, ήταν γνωστό στον άνθρωπο ότι το γάλα, βρασμένο ή μη, όταν παρέμενε εκτεθειμένο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ξίνιζε μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έτσι, γρήγορα αναζητήθηκαν τρόποι διαχείρισης του προϊόντος αυτού, προκειμένου να διατηρείται περισσότερο. Ιστορικά, η παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, επήλθε από την ανάγκη του ανθρώπου για επιπλέον αντοχή και διατήρηση του γάλακτος στο πέρασ του χρόνου. Το γάλα διαχρονικά αποτελεί πολύτιμο αγαθό και κατατάσσεται στα τρόφιμα, υψηλής βιολογικής αξίας. Τελικώς, η ανάγκη αύξησης της διάρκειας ζωής του γάλακτος επέφερε προϊόντα γευστικότερα ή και πιο εύπεπτα, με τη βοήθεια των ωφέλιμων ζυμώσεων του.

Οι πιο συνήθεις καλλιέργειες εκκίνησης οξυγαλακτικών σε τέτοια τρόφιμα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2. Η πλειονότητα των τροφίμων αυτών είναι προϊόντα της κατηγορίας των γαλακτοκομικών, όπως τυρί, γιαούρτι, γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση, αλλά και άλλα προϊόντα ζύμωσης, προϊόντα ψαριών, τουρσί λαχανικών και ελιές, ακόμη και μεγάλη ποικιλία προϊόντων δημητριακών, είναι στις κατηγορίες τροφίμων που κατασκευάζονται σήμερα με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Τα προϊόντα αυτά στο παρελθόν προκύπταν μέσω «back slopping», μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείτο προσθήκη μικρής ποσότητας ζυμωμένων προϊόντων σε φρέσκα συστατικά και αφήνονταν να ζυμωθούν, ενώ τα επακόλουθα χαρακτηριστικά του εκάστοτε προϊόντος, συνδέονταν άμεσα με την καλύτερη προσαρμογή των στελεχών. Τα πρώτα αποτελέσματα των προϊόντων αυτών βασίζονταν στην αυθόρμητη

ζύμωση που πρόκυπτε από τη δραστηριότητα της φυσιολογικής μικροχλωρίδας της πρώτης ύλης και του περιβάλλοντός της. Σήμερα, το μεγαλύτερο μέρος των ζυμούμενων τροφίμων παρασκευάζεται με την προσθήκη επιλεγμένων και καλά καθορισμένων καλλιιεργειών εκκίνησης, με χαρακτηριστικά ιδανικά, για κάθε μεμονωμένο προϊόν (Robinson, 2002; Fox et al., 2004; Bintsis and Athanasoulas, 2015).

Πίνακας 1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παραγωγή ορισμένων προϊόντων ζύμωσης.

Προϊόν	Γένος LAB1	Αναφορά
Γαλακτοκομικά Προϊόντα		
Τυρί (Mesophilic starter)	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cream</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	(Robinson, 2002)
Τυρί (Thermophilic starter)	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	(Robinson, 2002)
Τυρί (Mixed starter)	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cream</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i>	(Robinson, 2002)
Γιαούρτι	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	(Robinson, 2002)
Ζυμωμένα γάλατα	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. johnsonii</i>	(Robinson, 2002)
Γάλα Acidophilus	<i>L. acidophilus</i>	(Robinson, 2002)
Βούτυρο & Βουτυρόγαλο	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cream</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> ,	(Robinson, 2002)
Κεφίρ	<i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranoformis</i> , <i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i>	(Kivanç and Yapıcı, 2015)
Τραχανάς	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cream</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i> , <i>leucis. menesteroides</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> and <i>L. acidophilus</i>	(Lazos Chavero, 2015)
Προϊόντα Ζυμούμενων Κρεάτων		
Αποξηραμένα λουκάνικα	<i>L. sake</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>P. acidilactici</i>	(Hugas and Monfort, 1997; Hammes and Hertel, 1998)
Σαλάμι Milan	<i>L. sake</i>	(Garofalo et al., 2016)
Σαλάμι Piacentino	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. acetobutylicum</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. brucei</i> , <i>L. versmoldensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. grass</i> , <i>L. reuteri</i>	(Saithong et al., 2010)
Ελληνικά αποξηραμένα ζυμωμένα λουκάνικα	<i>L. sake</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cream</i>	(Saithong et al., 2010)
Chrorizo	<i>L. sake</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. mesenteroides</i>	(Saithong et al., 2010)
Προϊόντα Ζυμούμενων Ψαριών		
Ψάρι Thai	<i>L. reuteri</i>	(Pundir and Jain, 2010)
Φρούτα & Λαχανικά εντός άλμης		
Λάχανο (Sauerkraut)	<i>L. mesenteroides</i> ,	(Wakil, Laba and Fasika, 2014)
Αγγούρι	<i>L. pentosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. mesenteroides</i>	(Çon and Karasu, 2009; Nilchian et al., 2016)
Ελιές	<i>L. pentosus</i>	(Vollmar and Meuser, 1992; Hurtado et al., 2012)

Ζυμούμενα Προϊόντα Δημητριακών		
Μαγιά	<i>L. hilgardii</i> <i>L. sanfransiscensis</i> , <i>L. reuteri</i> ,	(Palla et al., 2017) (Mheen and Kwon, 1984)
Kimchi	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. kimchi</i> , <i>L. sake</i>	(Choi et al., 2002) (Lee, Kim and Lee, 2013)
Bushera	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>S. thermophilus</i>	(Nuraida, Wachter and Owens, 1995)
Pozol	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. raffinolactis</i>	(Florou-Paneri, Christaki and Bonos, 2013b)

Ως δευτερογενείς καλλιέργειες, ή συμπληρωματικές καλλιέργειες ή πρόσθετα, ορίζονται οι καλλιέργειες που προστίθενται σκόπιμα σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας παραγωγής ζυμούμενου προϊόντος, και των οποίων πρωταρχικός ρόλος, δεν είναι η παραγωγή οξέος. Συμπληρωματικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τυριών, προκειμένου να εξισορροπηθεί μέρος της βιοποικιλότητας που απομακρύνεται στην παστερίωση και να βελτιωθεί η υγιεινή και η προσθήκη της καθορισμένης καλλιέργειας εκκίνησης. Πρόκειται κυρίως για μη εκκινητές, που έχουν σημαντική επίδραση στη γεύση και επιταχύνουν τη διαδικασία ωρίμανσης (Cogan et al., 2007; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν βακτηριοσίνες, και ειδικότερα πολυπεπτίδια, που συντίθενται ριβοσωμικά από βακτήρια που μπορούν να έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική επίδραση σε άλλα βακτήρια (McAuliffe, Ross and Hill, 2001; Ross et al., 2002). Γενικά, οι βακτηριοσίνες προκαλούν σταδιακά κυτταρικό θάνατο είτε αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων είτε διακόπτοντας τη μεμβράνη σχηματίζοντας πόρους (Twomey et al., 2002). Συνεπώς, οι βακτηριοσίνες είναι χρήσιμες για τις ζυμώσεις τροφίμων, αφού μπορούν να εμποδίσουν την αλλοίωσή τους ή και να αναστείλουν τα παθογόνα τους (Πίνακας 1.3). Η πιο κοινή βακτηριοσίνη είναι η νισίνη, όπου έχει αποκτήσει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων σε τουλάχιστον 50 χώρες, ιδίως σε μεταποιημένα τυριά, γαλακτοκομικά προϊόντα και κονσερβοποιημένα τρόφιμα.

Πίνακας 1.3 : Αποδεδειγμένα αποτελεσματικές, σε πολλά συστήματα τροφίμων, βακτηριοσίνες, με σκοπό χρήσης τον έλεγχο της αλλοίωσης των τροφίμων ή των παθογόνων βακτηρίων τους.

Βακτηριοσίνη	Στέλεχος LAB	Αναφορά
Lacticin 3147	<i>Lactococci</i>	(Ryan et al., 1996; Coakley, Fitzgerald and Ros, 1997; Morgan et al., 2001; Briand et al., 2006)
Macedovicin	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	(Georgalaki et al., 2002, 2013)
Reuterin	<i>L. reuteri</i>	(Cai et al., 2003)
Sakacin M	<i>L. sake</i> 148	(Parada et al., 2007)
Curvacin A Curvaticin L442 Lactocin AL705	<i>L. curvatus</i> LTH1174	(Castellano and Vignolo, 2006)
Pediocin PA-1/AcH	<i>P. acidilactici</i>	(Castellano et al., 2008)
Plantaricins (A, EF and JK)	<i>L. plantarum</i>	(Castellano et al., 2008)

Στα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν σημειωθεί αντιμυκητιακές δραστηριότητες (Dalié, Deschamps and Richard-Forget, 2010; Crowley, Mahony and van Sinderen, 2013; Cheong et al., 2014), ενώ ορισμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν επίσης την ικανότητα να μειώνουν τις μυκοτοξίνες παράγοντας αντι-μυκοτοξινογόνους μεταβολίτες, ή ακόμη και απορροφώντας τις ίδιες τις τοξίνες (Dalié, Deschamps and Richard-Forget, 2010).

Για να χρησιμοποιηθούν ως βιο-προστατευτικές καλλιέργειες εκκίνησης, πρέπει να απαρτίζονται από μια σειρά φυσικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, αλλά πρωτίστως, πρέπει να μπορούν να επιτύχουν ανάπτυξη και επάρκεια παραγωγής αντιμικροβιακών μεταβολιτών, οι οποίοι θα πρέπει να επιδεικνύονται στο συγκεκριμένο περιβάλλον τροφίμων (Cheong et al., 2014).

1.3 Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο όρος προβιοτικά (probiotics) είναι μία πρόσφατη σύνθετη λέξη που αποτελείται από το ελληνικό «προς + βίος» (προάγω τη ζωή) και δημιουργήθηκε για να συμπεριλάβει στην έννοιά του μικροοργανισμούς (ζύμες και βακτήρια), που επιδρούν ευεργετικά στον ανθρώπινο και τους ζωικούς οργανισμούς (Salminen et al., 1999; Pathmakanthan, 2000; Saarela et al., 2000; Marteau et al., 2001; Rafter, 2003; Brown and Valiere, 2004; Merk, Borelli and Kortling, 2005; Simons, Amansec and Conway, 2006). Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σαν όρος, το 1965, από τους Lily και Stillwell, με σκοπό να περιγράψει τις ουσίες που εκκρίνονται από έναν οργανισμό που διεγείρει την ανάπτυξη ενός άλλου. Ωστόσο, σαν ορισμός προοριζόταν αρχικά για χρήση σε προϊόντα ζωοτροφών (Sarao and Arora, 2017).

Ως προβιοτικά χαρακτηρίζονται μία ομάδα βακτηρίων που περιγράφονται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Υγείας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν όφελος στην υγεία του καταναλωτή. Τα πιο συνηθισμένα εμπορικά βακτήρια είναι των γενών *Bifidobacterium* ή *Lactobacillus* (Peery et al., 2012).

Ο Ρώσος Νομπελίστας Eli Metchnikoff ήταν ο πρώτος που παρατήρησε την ευεργετικότητα ορισμένων βακτηρίων, κατά τη διάρκεια της διδακτορικής του διατριβής “The prolongation of Life”, όταν συνειδητοποίησε ότι η διατροφή των Βούλγαρων με εμπλουτισμένο με *Lactobacillus* γιαούρτι, παράτεινε τον μέσο όρο ζωής τους. Παράλληλα (1906), ήταν που ο Henry Tissier (Γάλλος παιδίατρος) παρατήρησε ότι παιδιά που έπασχαν από διάρροια, υστερούσαν σε “bifid” (σχήματος Y) βακτήρια συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Έτσι και χορηγήθηκαν τέτοια βακτήρια πρώτη φορά, σε ασθενείς με διάρροια, για την αποκατάσταση της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας.

Εν τέλει, ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Η.Π.Α και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (FAO/WHO, 2001) κατέληξαν στην υιοθέτηση του χαρακτηρισμού των Guarner and Schaafsma (1998), οι οποίοι όρισαν ως προβιοτικά «τους ζωντανούς μικροοργανισμούς (ζύμες και βακτήρια) που χορηγούμενοι σε κατάλληλες ποσότητες, ασκούν ευεργετική δράση στον ξενιστή». Ένας πιο πρόσφατος ορισμός είναι αυτός που προτάθηκε από τους Galdeano et al., (2007), ο οποίος υπογραμμίζει την ανοσοτροποποιητική δράση των προβιοτικών και τα ορίζει

ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν περιέχονται σε τρόφιμα, είναι ικανά να επηρεάσουν τη σύσταση και τη λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας, να τροποποιήσουν την αντίδραση της φλεγμονής, να ενισχύσουν τον εντερικό φραγμό και να ενισχύσουν ή τροποποιήσουν τις ανοσοαποκρίσεις τόσο στον βλεννογόνο όσο και συστηματικά».

Τα κυριότερα προβιοτικά (FAO/WHO, 2001) είναι και αυτά με τη συχνότερη χρήση στα τρόφιμα για ανθρώπινη κατανάλωση (γέννη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*), δεδομένου ότι η πρόσληψη αυτών των μικροοργανισμών συνδέεται με σημαντικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου (Tuohy et al., 2003; Cox, Ingersoll and Ross, 2005; Gupta et al., 2011). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται θα πρέπει, αυστηρώς, να αναγνωρίζονται γενικά ως ασφαλείς (GRAS) (Gupta and Garg, 2009). Ο όρος GRAS καθιερώθηκε από τον FDA (1958) και περιγράφει ότι ένα χημικό ή μία ουσία έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή από ειδικούς και επομένως έχει εξαιρεθεί από τα συνήθη πρόσθετα τροφίμων του FFDCΑ που κατηγοριοποιεί πρόσθετα χαμηλότερων απαιτήσεων.

Τα είδη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* παράγουν γαλακτικό οξύ (FAO/WHO, 2001) και είναι Gram-θετικά βακτήρια, ενώ ορισμένα από αυτά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας σε ανθρώπους και ζώα (de Vrese and Schrezenmeir, 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται για χρόνια ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμωμένα τρόφιμα και ποτά, αφού είναι ικανά να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά, διατροφικά, τεχνολογικά χαρακτηριστικά και τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Florou-Paneri, Christaki and Bonos, 2013a).

Μηχανισμός δράσης των προβιοτικών

Τα προβιοτικά βακτήρια έχουν πολλαπλές και ποικίλες επιδράσεις στον ξενιστή. Διαφορετικοί οργανισμοί μπορούν να επηρεάσουν το εντερικό περιβάλλον, τη λειτουργία του επιθηλιακού και του βλεννογόνου και το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου. Οι πολυάριθμοι τύποι κυττάρων που επηρεάζονται από τα προβιοτικά περιλαμβάνουν επιθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα/ μακροφάγα, Β κύτταρα, Τ κύτταρα. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των προβιοτικών βακτηριακών γενών και των ειδών. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται σε διάφορους μηχανισμούς δράσης των προβιοτικών. Είναι σημαντικό να δοκιμάζεται μοριακά κάθε στέλεχος, αυτόνομα ή σε προϊόντα

σχεδιασμένα για μια συγκεκριμένη λειτουργία. Η μοριακή έρευνα των προβιοτικών μπορεί να αναδείξει κάθε τέτοια ιδιότητα του εκάστοτε στελέχους. Τα διαφορετικά προβιοτικά στελέχη έχουν συσχετιστεί με διαφορετικές επιδράσεις που σχετίζονται με την ειδική τους ικανότητα να εκφράζουν συγκεκριμένα επιφανειακά μόρια, ή να εκκρίνουν πρωτεΐνες και μεταβολίτες που αλληλοεπιδρούν άμεσα με κύτταρα ξενιστές.

Η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών σχετίζεται με την ικανότητά τους να επιβιώνουν στο όξινο και αλκαλικό περιβάλλον του εντέρου καθώς και με την ικανότητά τους να προσκολλώνται και να αποικίζουν στο παχύ έντερο. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα προβιοτικά βακτήρια είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, αλλά πιθανώς περιλαμβάνουν τη διέγερση ανοσοτροποποιητικών κυττάρων, την τροποποίηση του pH του εντέρου, τον ανταγωνισμό για τη σύνδεση των παθογόνων σε υποδοχείς, τον ανταγωνισμό με παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων, καθώς και για τις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες και τους αυξητικούς παράγοντες, ενώ πιθανολογείται να προκαλούν και παραγωγή λακτάσης (Parvez et al., 2006).

Σύμφωνα με διεθνείς μελέτες και τη βιβλιογραφία, τα προϊόντα με περιεχόμενους προβιοτικούς μικροοργανισμούς αποδίδουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Μερικά από τα οφέλη αυτά είναι διαπιστευμένα, ενώ άλλα μοιάζουν να ακολουθούνται από ένα ελπιδοφόρο μέλλον, βάσει των πειραμάτων σε ζώα που έχουν διεξαχθεί τα προηγούμενα χρόνια (Vasiljevic and Shah, 2008). Οι υγειονομικοί ισχυρισμοί θα πρέπει να τεκμηριώνονται επιστημονικά από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, να εκτελούνται από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες και να δημοσιεύονται σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (Ouwehand, Salminen and Isolauri, 2002).

Τα προβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τη βελτίωση της υγείας τόσο των ζώων όσο και των ανθρώπων μέσω της διαμόρφωσης του εντερικού μικροβίου. Σήμερα, πολλά στελέχη του γένους *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* είναι διαθέσιμα για ανθρώπινη χρήση, με σκοπό τη μείωση του κινδύνου γαστρεντερικών (GI) λοιμώξεων ή για τη θεραπεία τέτοιων λοιμώξεων (Salminen, Gueimonde and Isolauri, 2005). Μερικές από τις ευεργετικές επιδράσεις της προβιοτικής κατανάλωσης περιλαμβάνουν τη βελτίωση της εντερικής υγείας με τη ρύθμιση των μικροβίων και τη διέγερση και ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, τη σύνθεση και ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών ουσιών, τη μείωση των συμπτωμάτων δυσανεξίας στη λακτόζη και τη μείωση του κινδύνου ορισμένων άλλων ασθενειών (Nagpal et

al., 2007; Yadav, Jain and Sinha, 2007, 2007, 2008; Kumar, Behare, et al., 2009; Kumar, Mohania, et al., 2009; Kumar et al., 2010, 2011; Nagpal, Kumar and Arora, 2010; Nagpal and Kaur, 2011). Ορισμένα παραδείγματα ευεργετικών ιδιοτήτων των προβιοτικών προς τον οργανισμό και των πιθανών εμπλεκόμενων μηχανισμών τους, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4: Η επίδραση των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία.

Προβιοτική Επίδραση	Βιβλιογραφική Αναφορά
Αφομοίωση της χοληστερόλης	(Nuraida, Wacher and Owens, 1995), (Florou-Paneri, Christaki and Bonos, 2013a),
Περιορισμός δυσανεξίας στη λακτόζη	(Nuraida, Wacher and Owens, 1995), (Florou-Paneri, Christaki and Bonos, 2013b), (Pereira and Gibson, 2002)
Έλεγχος διαρροϊκών παθήσεων, ιογενούς, βακτηριακής ή αντιβιοτικής μορφής.	(Nuraida, Wacher and Owens, 1995), (Florou-Paneri, Christaki and Bonos, 2013a), (Hove, Nørgaard and Brøbech Mortensen, 1999), (Ehrmann et al., 2002), (Majamaa and Isolauri, 1997)
Δράση έναντι σε φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου	(Nuraida, Wacher and Owens, 1995),
Δράση έναντι σε αλλεργίες και ατοπικές δερματίτιδες	(Oksanen et al., 1990), (Cross, 2002),
Δράση έναντι σε καρκινογένεσεις του παχέος εντέρου	(Isolauri et al., 2000), (Hirayama and Rafter, 2000)
Έλεγχος παθογόνων βακτηρίων	(Sanders, 1998) (O'Sullivan, Meyer-Balzburg and Watkins, 2000)
Διέγερση ανοσοποιητικού συστήματος στην επιφάνεια του βλεννογόνου του εντέρου	(Elliason and Tatini, 1999)

1.3.2 Εφαρμογές προβιοτικών στελεχών στα τρόφιμα

Η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού για ζητήματα υγείας που σχετίζονται με τη διατροφή και τα αυξανόμενα στοιχεία σχετικά με τα οφέλη για την υγεία των προβιοτικών, έχουν αυξήσει τη ζήτηση των καταναλωτών για τρόφιμα εμπλουτισμένα με προβιοτικά. Στον Πίνακα 1.5 αναφέρονται προβιοτικά στελέχη με βιομηχανική χρήση.

Πίνακας 1.5: Διαδεδομένα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται από πληθώρα βιομηχανιών.

Στελέχη	Πηγή
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Chr. Hansen (Horsholm, Denmark)
<i>L. casei</i> strain Shirota	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>B. breve</i> strain Yakult <i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., Ltd (Tokyo, Japan)
<i>B. longum</i> SBT-2928 <i>L. acidophilus</i> R0011	Institut Rosell (Montreal, Canada)
<i>L. rhamnosus</i> R0052 <i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia, Inc. (Madison, WI)
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc. (Lincoln, NE)
<i>L. casei</i> DN014001 (Immunitas)	Danone Le Plessis- Robinson (Paris, France)
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech Inc. (London, Ontario, Canada)
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 <i>L. johnsonii</i> La1 (same as Lj1)	Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>L. plantarum</i> 299V	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. rhamnosus</i> 271 <i>L. reuteri</i> SD2112 (same as MM2)	BioGaia (Raleigh, NC)
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Ireland)
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., Ltd (Zama-City, Japan)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	Meiji Milk Products (Tokyo, Japan)
<i>L. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory (Houdan, France)
<i>L. paracasei</i> F19	Arla Dairy (Stockholm, Sweden)
<i>L. crispatus</i> CTV05	Gynelogix, Boulder, CO
<i>L. casei</i> DN 114	Danone, Paris, France
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	New Zealand Dairy Board

Διάφορα προϊόντα διατροφής, όπως γιαούρτι, κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, γάλα σε σκόνη, τυριά, παγωτά και χυμοί φρούτων (Nagpal, Kumar and Kumar, 2012) έχουν προταθεί ως φορείς προβιοτικών που απευθύνονται στον καταναλωτή. Έχει προταθεί ότι περίπου 10^9 CFU προβιοτικών μικροοργανισμών ανά ημέρα, είναι ποσότητα απαραίτητη ώστε να επιδράσουν ευεργετικά στην υγεία του ξενιστή. Με βάση την ημερήσια κατανάλωση προβιοτικών τροφίμων (100 g ή mL), έχει προταθεί ότι ένα προϊόν θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10^7 κύτταρα ανά g ή mL προβιοτικών, ένα επίπεδο που συνιστάται επίσης στην Ιαπωνία (Ross et al., 2002). Τα πιο δημοφιλή τρόφιμα που επιδέχονται προσθήκης προβιοτικών είναι το γάλα και το γιαούρτι που έχουν υποστεί ζύμωση, αν και μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά εμπορικά προϊόντα γιαουρτιού δεν κατάφεραν να παράσχουν επιτυχώς το απαιτούμενο επίπεδο βιώσιμων κυττάρων προβιοτικών βακτηρίων (Dave and Shah, 1997). Τα τυριά έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φρέσκα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (όπως το γιαούρτι) ως σύστημα παράδοσης βιώσιμων προβιοτικών στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα τυριά τείνουν να έχουν υψηλότερο pH και πιο σταθερή συνοχή, όπου η σύσταση του τυριού και η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, μπορούν να προσφέρουν προστασία στα προβιοτικά βακτήρια κατά τη διέλευσή τους στο γαστρεντερικό σωλήνα. Το τυρί έχει επίσης υψηλή ρυθμιστική ικανότητα σε σχέση με το γιαούρτι (Gardiner et al., 1998). Μια σύντομη αναφορά για την ποικιλία των προϊόντων που χρησιμεύουν ως φορείς προβιοτικών δίνεται στον Πίνακα 1.6.

Συνοπτικά, τα κύρια σημεία που πρέπει να αντιμετωπιστούν κατά την ενσωμάτωση των προβιοτικών στα τρόφιμα, είναι:

- η επιλογή ενός συμβατού συνδυασμού προβιοτικών στελεχών/ τύπων τροφίμων,
- η χρήση συνθηκών επεξεργασίας τροφίμων που είναι συμβατές με προβιοτική επιβίωση,
- η εξασφάλιση ότι η σύσταση των τροφίμων υποστηρίζει προβιοτική ανάπτυξη (εάν απαιτείται ζύμωση),
- η ορθή επιλογή συσκευασίας και περιβαλλοντικών συνθηκών για την εξασφάλιση επαρκούς προβιοτικής επιβίωσης στην αλυσίδα εφοδιασμού του προϊόντος και κατά την αποθήκευση στο ράφι, και τέλος,
- να διασφαλιστεί ότι η προσθήκη του προβιοτικού δεν επηρεάζει αρνητικά τη γεύση και την υφή του προϊόντος.

Πίνακας 1.6: Λεπτομέρειες για τα προϊόντα που αξιοποιούνται ως φορείς προβιοτικών

Τρόφιμο - Φορέας	Προϊόν	Προβιοτικά	Πηγές
Γαλακτο- κομικά Προϊόντα	<i>Sweet-acidophilus milk</i>	<i>L. gasseri</i>	(Usman and Hosono, 1999)
	Παγωτό	<i>L. johnsonii</i>	(Alamprese et al., 2002)
	Ρόφημα πρωτεΐνης	<i>L. casei</i>	(Drgalic, Tratnik and Bozanic, 2005)
	Τυρί πρωτεΐνης	<i>B. animalis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevi</i> , <i>L. paracasei</i>	(Madureira et al., 2005)
	Natural-set γιαούρτι	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	(Donkor et al., 2007)
	Χαμηλό σε λιπαρά τυρί <i>cheddar</i>	<i>L. casei</i>	(Ventura et al., 2008)
	Γιαούρτι	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>	(Sendra et al., 2008)
Προϊόντα Σόγιας	Γάλα σόγιας	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	(Donkor et al., 2007)
	Τυρί- κρέμα σόγιας	<i>L. acidophilus</i>	(Liong et al., 2009)
	Γάλα σόγιας	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> ,	(Yeo and Liong, 2010)
	Γάλα σόγιας	<i>L. acidophilus</i> ., <i>L. gasseri</i>	(Ewe, Wan-Abdullah and Liong, 2010)
	Γάλα σόγιας	<i>L. plantarum</i>	(Bao et al., 2012)
Προϊόντα Φυσικών Χυμών	Χυμός τομάτας	<i>L. casei</i> A4, <i>L. delbrueckii</i> D7	(Yoon, Woodams and Hang, 2004)
	Χυμός λάχανου	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i>	(Yoon, Woodams and Hang, 2005)
	Χυμός παντζαριού	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i>	(Yoon, Woodams and Hang, 2006)
	Χυμός πορτοκαλιού και ανανά	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> LA39	(Sheehan, Ross and Fitzgerald, 2007)

Τρόφιμο - Φορέας	Προϊόν	Προβιοτικά	Πηγές
	Χυμός καρότου	<i>B. lactis Bb-12, B. bifidum B7.1, B3.2</i>	(Kun et al., 2008)
	Χυμός τομάτας, πορτοκαλιού και σταφυλιού	<i>L. plantarum, L. acidophilus</i>	(Nagpal, Kumar and Kumar, 2012)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μικροοργανισμοί και συνθήκες προ-καλλιέργειας

Κατά την παρούσα μελέτη εξετάσθηκαν τα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus plantarum* B324 και *Lactobacillus pentosus* B329 τα οποία είναι απομονωμένα από ζυμούμενες ελιές (Argyri et al., 2013). Τα υπό μελέτη στελέχη έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί με μοριακές και φαινοτυπικές μεθόδους και ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (FMCC) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με ανανέωση των στελεχών σε δύο διαδοχικές καλλιέργειες των 24h και 16h και κατόπιν με έλεγχο τους ως προς την καθαρότητα με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking). Τα κύτταρα εμβολιάστηκαν (1%, v/v) σε 5 mL MRS broth (Difko, Belgium) και επώαστηκαν για 24h στους 30 °C. Ελέγχθηκαν μακροσκοπικά για την ανάπτυξη των ομοιογενών αποικιών από τυχόν επιμολύνσεις, αλλά και μικροσκοπικά με χρώση κατά Gram. Μετά τον πρώτο ενοφθαλμισμό, τα στελέχη ανανεώθηκαν διαδοχικά μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στη φάση αυτή, η επώαση έγινε σε κωνικές φιάλες των 250 mL χρησιμοποιώντας 50 mL MRS στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, πληθυσμοί της τάξης του $\sim 10^9$ cfu/ mL από κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια για τις εκάστοτε ζυμώσεις.

2.2 Ζυμώσεις συνθετικής λακτόζης και λακτόζης τυρογάλακτος

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν δύο ειδών ζυμώσεις που αφορούσαν παραλλαγές ως προς τα θρεπτικά υποστρώματα, με απώτερο στόχο τη διερεύνηση της ζυμωτικής ικανότητας των οξυγαλακτικών στελεχών. Κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υπόστρωμα λακτόζης με την εξής σύσταση: εκχύλισμα ζύμης (5 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.3 g/L) και CH_3COONa (5 g/L).

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε λακτόζη τυρογάλακτος. Πρόκειται για το υγρό ρεύμα που έχει απομείνει μετά την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος και συγκεκριμένα τύπου μυζήθρας. Ειδικότερα το τυρόγαλα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης αυτής, παραλήφθηκε από τοπική τυροκομική μονάδα (Τυροκομείο Γαλιατσάτος, Ραζάτα, Κεφαλονιά).

Το τυρόγαλα αρχικά επεξεργάστηκε με σκοπό τον διαχωρισμό της λακτόζης και της πρωτεΐνης. Για την πραγματοποίηση του διαχωρισμού ακολουθήθηκε η διαδικασία της πτώσης του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο (4.5), μέθοδος κατά την οποία οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την επίδραση της θέρμανσης. Κατόπιν, το υπερκείμενο κλάσμα διηθείται με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του πηγματος που έχει δημιουργηθεί. Το κλάσμα που προέκυψε με περιεκτικότητα ~ 50 g/L λακτόζη, στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες στους 30 °C και 37 °C με στόχο τη διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής βιομάζας των στελεχών. Συγκεκριμένα και στις δύο σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας σε γυάλινες φιάλες με πώμα (φιάλες τύπου Duran) του 1L και όσον αφορά το αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλα έγινε επίσης προσθήκη των αντίστοιχων συστατικών όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.1. Τα υποστρώματα εμβολιάστηκαν με 5% (v/v) από την εκάστοτε οξυγαλακτική προ-καλλιέργεια και οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό στατικές συνθήκες χωρίς ανάδευση. Η ρύθμιση του pH των υποστρωμάτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (48h) γινόταν με την προσθήκη KOH (5M) σε τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να παραμένει σταθερό στο 6.5.

Πίνακας 2.1: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος λακτόζης.

Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Λακτόζη (Lactose)	50
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammonium sulphate)	5
K ₂ HPO ₄ (Potassium phosphate dibasic)	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Magnesium sulphate)	0.3
CH ₃ COONa (Sodium acetate)	5

2.3 Λυοφιλίωση και έλεγχος βιωσιμότητας στελεχών

Στην παρούσα μελέτη έγινε εφαρμογή της μεθόδου της λυοφιλίωσης με σκοπό την ορθότερη αποθήκευση των δειγμάτων για περαιτέρω χρήση. Συγκεκριμένα η βιομάζα φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm για 10 min τα κύτταρα ξεπλύθηκαν διαδοχικά εις διπλούν με διάλυμα Ringer ($\frac{1}{4}$ strength) με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του υποστρώματος και έκτοτε έγινε η τελική συλλογή των κυττάρων. Στην συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε 5% διάλυμα σουκρόζης ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης πραγματοποιήθηκε υπό κενό σε σύστημα Freeze Dryer (BK-FD12P, Biobase Biodustry Co., Ltd) υπό τις εξής συνθήκες:

- διάρκεια ψύξης 2h,
- θερμοκρασία ψύξης - 50 °C,
- πίεση 0.8 mbar και
- χρόνος λυοφιλίωσης 24h.

Στη συνέχεια οι λυοφιλιωμένες καλλιέργειες (Εικόνα 2.1) αποθηκευτήκαν στους 4 °C. Η μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την απαρίθμηση του βακτηριακού πληθυσμού, πριν και αμέσως μετά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, για έως 4 μήνες. Για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε η κλασσική μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε υπόστρωμα MRS agar (Difco, Belgium). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για 72h, οπότε και καταμετρήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες και ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων εκφράστηκε σε log cfu/g.



Εικόνα 2.1: Λυοφιλιωμένα κύτταρα οξυγαλακτικών βακτηριών.

2.4 Μελέτη ζύμωσης λακτόζης τυρογάλακτος από λυοφιλιωμένες καλλιέργειες

Στο τελευταίο πειραματικό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ζυμωτικής ικανότητας και λειτουργικής σταθερότητας των οξυγαλακτικών στελεχών μετά και τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Στο κομμάτι αυτό επιλέχθηκε μόνο το λυοφιλιωμένο στέλεχος *Lb. pentosus* B329 για το οποίο είχαν παρατηρηθεί, συγκριτικά με το στέλεχος B324, τα μεγαλύτερα ποσοστά ζύμωσης της λακτόζης, αλλά και η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας. Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας σε αποπρωτεϊνομένο τυρόγαλο (~ 50 g/L λακτόζης) στους 37 °C όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.

2.5 Αναλυτικές μέθοδοι

2.5.1 Προσδιορισμός λακτόζης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η κατανάλωση της λακτόζης κατά τη διάρκεια των υγρών ζυμώσεων, τόσο στο συνθετικό υπόστρωμα όσο και στο τυρόγαλο, παράλληλα και με την καταγραφή της παραγωγής γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (Εικόνα 2.2). Για τις αναλύσεις και τη μέτρηση της παραγόμενης ουσίας, χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής διάθλασης (HPLC-RI) συνδυασμένος με στήλη Aminex HPX-87H column (300 mm length x 7,8 mm internal diameter). Η κινητή φάση ήταν 10 mM H₂SO₄ με ροή 0.6 mL/min και σε θερμοκρασία 65 °C (Papadaki, Tsimidou and Mantzouridou, 2018).



Εικόνα 2.2: Το όργανο της HPLC που πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις.

2.5.2 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας

Μέτρηση ξηρής βιομάζας

Για τον προσδιορισμό της παραγόμενης βιομάζας των στελεχών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στις δύο σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, τα δείγματα ελήφθησαν ανά προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα κατά το παρακάτω πρωτόκολλο:

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 5,000 rpm, στους 5 °C για 10 λεπτά, με σκοπό την κατακρήμνιση της βιομάζας και την απόρριψη του υπερκειμένου.

Κατόπιν, τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα από το υπόστρωμα. Στη συνέχεια, η βιομάζα που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε για ξήρανση στους 100 °C μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους για 24-48h. Τέλος, τα δείγματα ζυγίστηκαν (M) σε ζυγό ακριβείας (θερμοκρασία δωματίου) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Wu et al., 2011; Bao et al., 2012).

Η βιομάζα (Total Dry Weight, TDW) ή αλλιώς το ολικό ξηρό βάρος, αποδίδεται από τον τύπο:

$$TDW \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(M - M_0) g \times 1000 \frac{ml}{L}}{V ml}$$

Όπου:

- TDW: Συγκέντρωση Ολικού Ξηρού Βάρους (Βιομάζας) δείγματος (g/L)
- M_0 : Βάρος κενού προ-ζυγισμένου γυάλινου φιαλιδίου (g)
- M: Βάρος φιαλιδίου και βιομάζας μετά την ξήρανση (g)
- V: Όγκος δείγματος (mL)

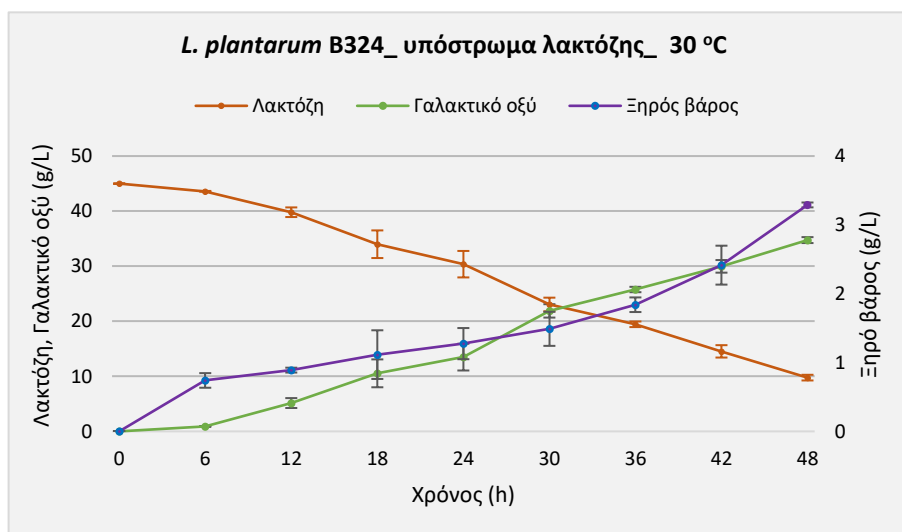
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

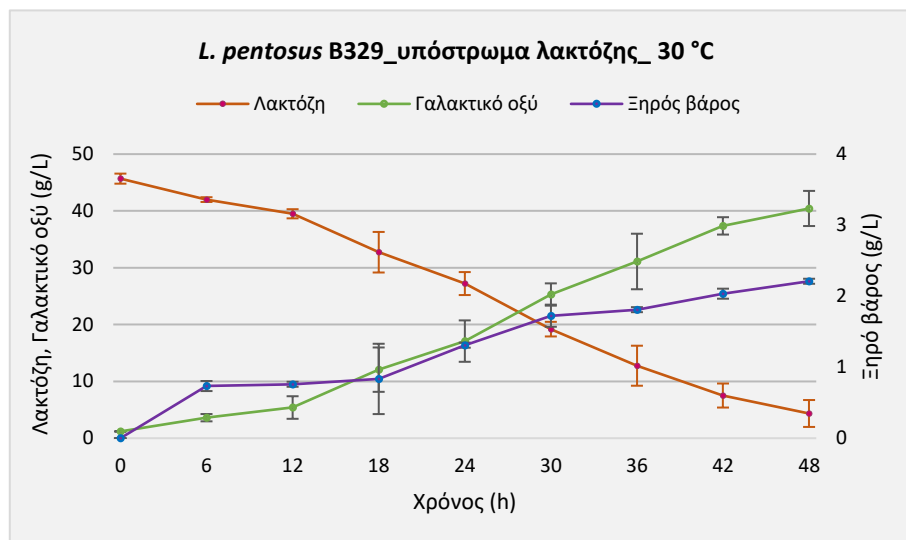
3.1 Παραγωγή βιομάζας μέσω ζύμωσης συνθετικού υποστρώματος λακτόζης

Η αξιοποίηση του κλάσματος της λακτόζης από τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες αξιολογήθηκε σε υγρές ζυμώσεις μέσω της μελέτης αύξησης της βακτηριακής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων παρατίθενται παρακάτω. Πιο αναλυτικά όσον αφορά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο συνθετικό υπόστρωμα στους 30 °C, το στέλεχος *L. plantarum* B324 κατανάλωσε 35,24 g/L λακτόζης με ταυτόχρονη παραγωγή 34,74 g/L. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το στέλεχος *L. pentosus* B329. Συγκεκριμένα η παραγωγή της βακτηριακής βιομάζας προσδιορίσθηκε στα 2,21 g/L (Διάγραμμα 3.1A) μετά από κατανάλωση 40 g/L της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης, παράγοντας παράλληλα 40,44 g/L γαλακτικό οξύ (Διάγραμμα 3.1B). Αντίθετα, στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C ο *L. plantarum* B324 έδειξε μικρή ικανότητα ζύμωσης με μόλις 15 g/L κατανάλωση λακτόζης, 8,66 g/L γαλακτικό οξύ και 1,19 g/L παραγόμενη βιομάζα (Διάγραμμα 3.2A). Παράλληλα, διαφορετικά αποτελέσματα καταγράφηκαν για το στέλεχος *L. pentosus* B329, όπου η θερμοκρασία φάνηκε να ευνοεί τη ζυμωτική ικανότητα του μικροοργανισμού, καθώς κατανάλωσε σχεδόν όλη την ποσότητα της λακτόζης με παραγωγή 44 g/L γαλακτικού οξέος και 3,36 g/L βακτηριακή βιομάζα (Διάγραμμα 3.2B).

A.

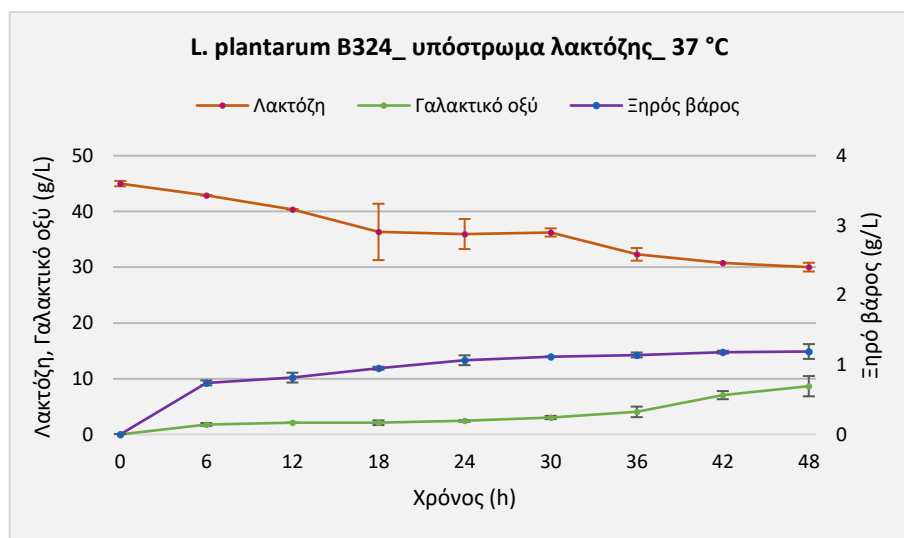


B.

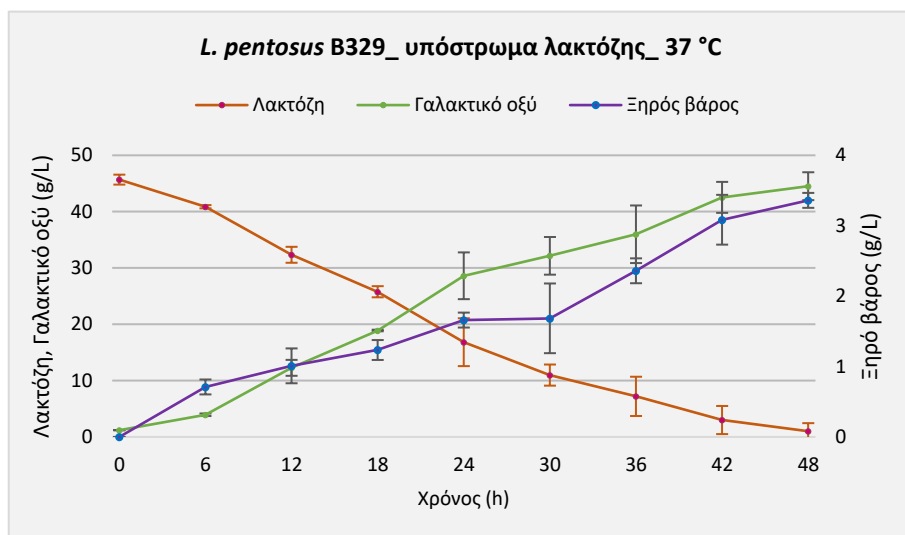


Διάγραμμα 3.1 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *L. plantarum* B324 (A) και *L. pentosus* B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~ 45 g/L στους 30 °C.

A.



B.



Διάγραμμα 3.2 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *L. plantarum* B324 (A) και *L. pentosus* B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~ 45 g/L στους 37 °C.

3.2 Παραγωγή βιομάζας μέσω ζύμωσης σε υπόστρωμα λακτόζης τυρογάλακτος

Ο προσδιορισμός και οι κινητικές των ζυμώσεων που αφορούν στην παραγωγή της βιομάζας σε υπόστρωμα τυρογάλακτος, παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.3 και 3.4 αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά και αναφορικά με τις ζυμώσεις στους 30 °C, το στέλεχος *L. plantarum* B324 κατανάλωσε 23,52 g/L σακχάρου, σχεδόν δηλαδή ποσοστό 50% της αρχικής συγκέντρωσης, με ανάλογη παραγωγή γαλακτικού οξέος στα 21,80 g/L και 1,5 g/L μικροβιακή βιομάζα (Διάγραμμα 3.3A). Αντίθετα, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του *L. pentosus* B324, καθώς φάνηκε ικανό να καταναλώσει 46 g/L σακχάρου με αντίστοιχη παραγωγή γαλακτικού οξέος και υψηλότερο ποσοστό παραγόμενης βιομάζας στα 2,45 g/L (Διάγραμμα 3.3B).

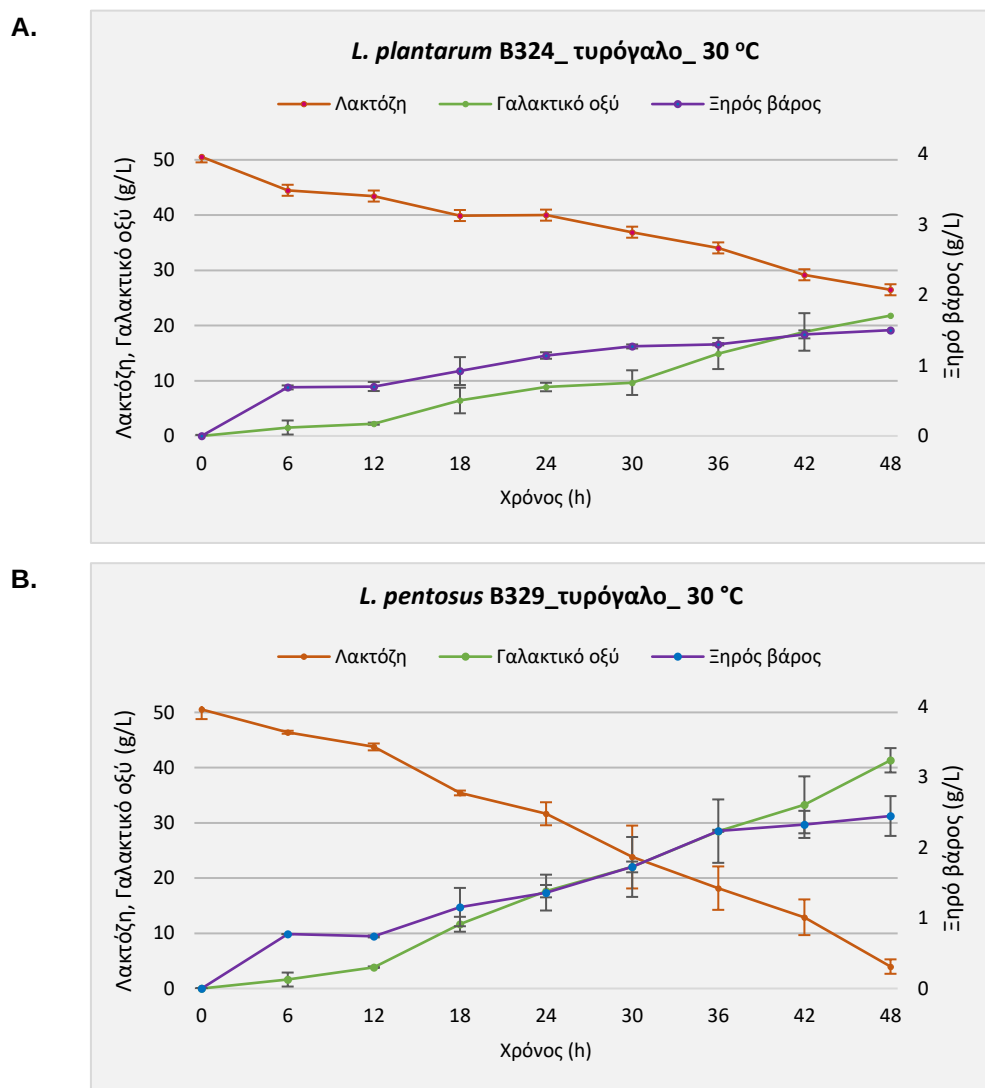
Στην περίπτωση των ζυμώσεων, όπου αξιολογήθηκε υψηλότερη θερμοκρασία, των 37 °C, το στέλεχος *L. plantarum* B324 έδωσε παρόμοια ποσοστά κατανάλωσης της λακτόζης σε ποσοστό ξανά 50%, καθώς προσδιορίστηκαν 23,29 g/L αζύμωτου σακχάρου (Διάγραμμα 3.4A). Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος ήταν στα 11,80 g/L με 1,36 g/L παραγόμενη βιομάζα. Επίσης παρόμοια αποτελέσματα με τις ζυμώσεις στους 30 °C καταγράφηκαν και για το στέλεχος *L. pentosus* B329 (Διάγραμμα 3.4B). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σχεδόν

πλήρης κατανάλωση του σακχάρου, η λακτόζη καταναλώθηκε σε ποσοστό 99% παράγοντας 46,21 g/L γαλακτικό οξύ και 3,12 g/L ξηρής βιομάζας.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα ως προς τη μεταβολική δραστηριότητα των δύο εξεταζόμενων μικροοργανισμών, το στέλεχος *L. pentosus* B329 χαρακτηρίστηκε εκείνο με την πιο επαρκή ζυμωτική ικανότητα της λακτόζης και παραγωγή βιομάζας ως προς την συνέχιση των πειραμάτων και τη μελέτη βιωσιμότητας.

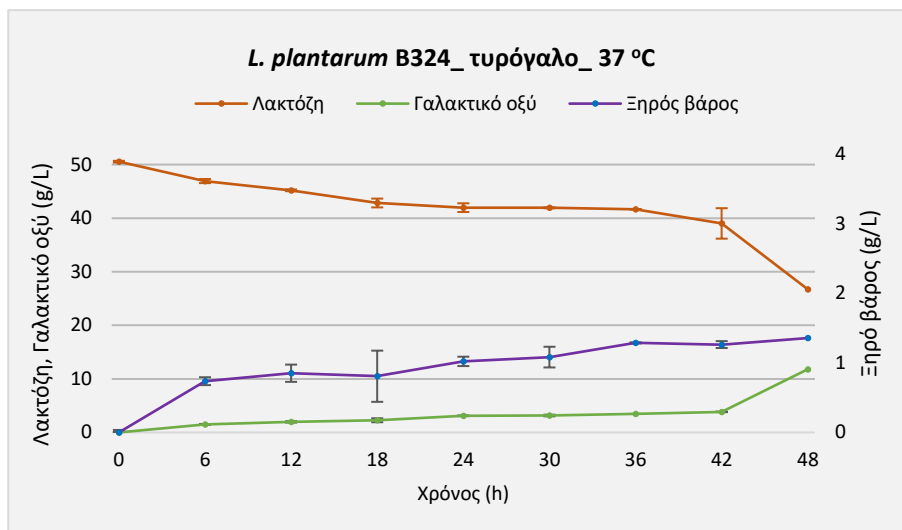
Γενικότερα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά η χρήση βιομηχανικών αποβλήτων με σκοπό την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας. Για παράδειγμα, οι Huang et al., (2017) μελέτησαν την ανάπτυξη προβιοτικών στελεχών από τα είδη *L. casei* και *P. freudenreichii* κατόπιν ξήρανσης με ψεκασμό σε τυρόγαλα, οι βακτηριακοί πληθυσμοί μετά από ζύμωση (1.6 ± 0.1) $\times 10^9$ και (5.0 ± 0.6) $\times 10^9$ cfu/mL αντίστοιχα, αποδίδοντας υψηλή παραγωγή βιομάζας, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη μεταβολίστηκε σε γαλακτικό και προπιονικό οξύ, αντίστοιχα από το κάθε στέλεχος. Αργότερα αξιοποίησαν γλυκό τυρόγαλα σε υπερσυμπυκνωμένη μορφή, προκειμένου να καλλιεργήσουν τον *L. casei* με σκοπό τη μελέτη της βιωσιμότητας και της ανθεκτικότητάς τους έναντι σε στρεσογόνες για το στέλεχος συνθήκες (θερμότητα, οξέα και χολικά άλατα) (Huang et al., 2018). Επιπλέον, οι Lavari et al., (2014, 2015) αξιοποίησαν το τυρόγαλο από διαφορετικά είδη τυριών προκειμένου να καλλιεργήσουν τα *L. paracasei*, *L. rhamnosus* και *L. gasseri*. Αξιολογώντας την ικανότητά τους για παραγωγή βιομάζας, παρατήρησαν ότι ανάλογα με το υπό εξέταση θρεπτικό μέσο η ανάπτυξη των στελεχών διαφοροποιήθηκε. Το *L. rhamnosus* κατάφερε να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε τουλάχιστον δύο από τα μέσα καλλιέργειας, ενώ η απόδοση των άλλων στελεχών ήταν λιγότερο ικανοποιητική. Επίσης η αντοχή στην ξήρανση με ψεκασμό σε διάλυμα τυρογάλακτος- αμύλου και η αμελητέα μείωση πληθυσμού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (2 μήνες), χαρακτήρισε το *L. rhamnosus* ως έναν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για περαιτέρω τεχνολογικές μελέτες. Στη μελέτη των Salma et al., (2017), χρησιμοποιήθηκε αποπρωτεϊνόμενο τυρόγαλο για την παραγωγή βιομάζας του *L. helveticus* όπου και απέδωσε 3,25 g/L ξηρής μικροβιακής βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων ανάπτυξης και θρεπτικών συστατικών, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης βιομάζας από 1,997 σε 3,25 g/L, βελτίωση της τάξεως του 62,74 %. Οι Manzoor et al., (2017) εκμεταλλεύτηκαν επίσης το τυρόγαλο για την ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας του στελέχους *L. plantarum*, όπου με προσθήκη επιπλέον

πηγών αζώτου, ιχνοστοιχείων και μετάλλων οδήγησε σε μέγιστη παραγωγή ξηρής κυτταρικής μάζας, ύψους 15,41 g/l. Πρόσφατα σε παρόμοια μελέτη, οι Cerdeira et al., (2019) επίσης αξιοποίησαν το τυρόγαλα, ώστε να μελετήσουν σε αυτό, δύο στελέχη του είδους *L. plantarum* ως προς την ανάπτυξη και αντοχή τους σε συνθήκες ζύμωσης κρασιού, με αρκετά ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως προς την ικανότητά τους για εφαρμογή σε μηλογαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης.

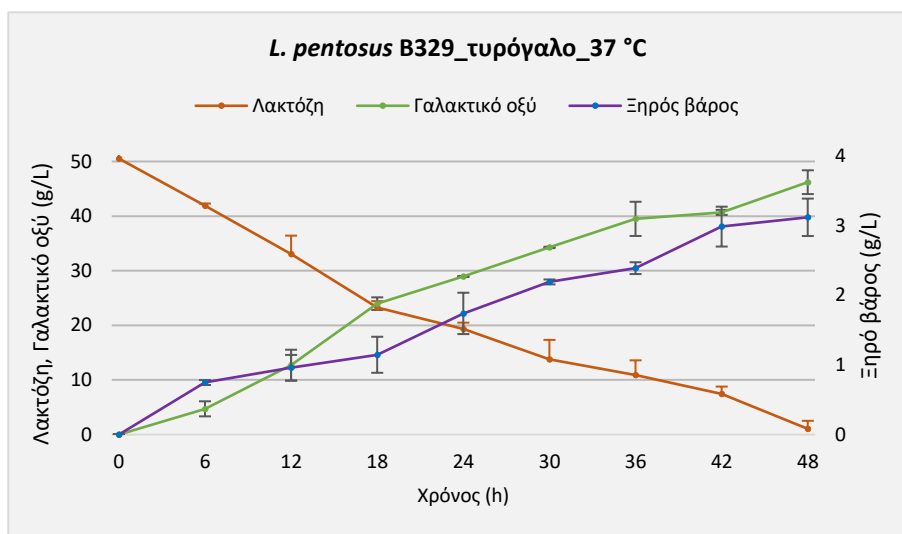


Διάγραμμα 3.3 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *L. plantarum* B324 (A) και *L. pentosus* B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε λακτόζη τυρογάλακτος αρχικής συγκέντρωσης ~ 50 g/L στους 30 °C.

A.



B.



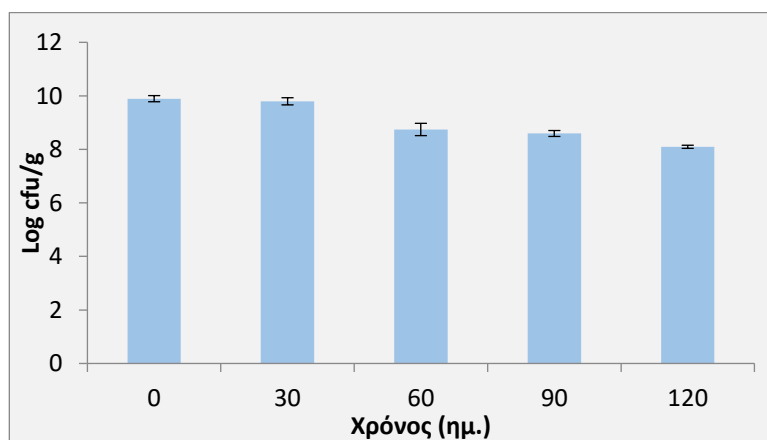
Διάγραμμα 3.4 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και της κατανάλωσης της λακτόζης του *L. plantarum* B324 (A) και *L. pentosus* B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε λακτόζη τυρογάλακτος αρχικής συγκέντρωσης ~ 50 g/L στους 37 °C.

3.3 Παραγωγή λυοφιλωμένης βιομάζας των οξυγαλακτικών στελεχών και μελέτη βιωσιμότητας

Η παραγωγή και βιωσιμότητα της λυοφιλωμένης βιομάζας του *L. pentosus* B329 παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.5. Ο πληθυσμός της καλλιέργειας πριν τη διαδικασία της λυοφιλίωσης είχε αρχικά καταγραφεί να είναι της τάξης των $10 \log \text{ cfu/g}$. Συνεπώς παρατηρήθηκε πως η διεργασία δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων αμέσως μετά την λυοφιλίωση, που αφορά στην ουσία το χρόνο μηδέν. Στη συνέχεια της μελέτης βιωσιμότητας παρατηρήθηκε επίσης, πως δεν υπήρχε ουσιαστική μείωση κατά τις πρώτες 30 ημέρες.

Αντίθετα τις ημέρες 60 – 90, ο πληθυσμός των στελεχών μειώθηκε κατά μέσο όρο 1,5 log cfu/g. Τέλος, στις 120 ημέρες η βιωσιμότητα των αρχικών καλλιιεργειών μειώθηκε περίπου κατά ποσοστό 16% για το B329, φτάνοντας τα 8 log cfu/g. Η βιωσιμότητα του στελέχους κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης κρίθηκε υψηλή, μετά τη διεργασία της λυοφιλίωσης, επιτρέποντας την περαιτέρω χρήση τους ως «probiotic culture».

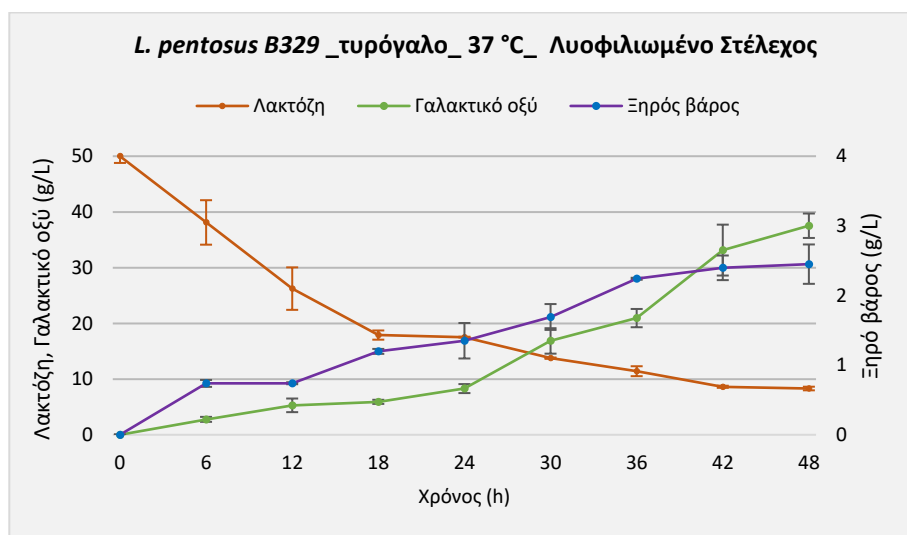
Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές παρόμοιες μελέτες με σκοπό την βελτίωση της βιωσιμότητας λυοφιλιωμένων στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, οι Savedboworn et al., (2019), προκειμένου να αντιμετωπίσουν το φαινόμενο της μείωσης του πληθυσμού προβιοτικών στελεχών, αξιοποίησαν την εμπλουτισμένη με πρεβιοτικά πρωτεΐνη ρυζιού, προκειμένου να προστατεύσουν τον *L. plantarum* κατά την αποθήκευσή του σε ψύξη, σε λυοφιλιωμένη μορφή. Μάλιστα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι λειτουργικές ιδιότητες του λυοφιλιωμένου προβιοτικού παρέμειναν σταθερές με τη βοήθεια του συγκεκριμένου προστατευτικού πρωτεΐνης ρυζιού. Αργότερα ο (Mostafa, 2020), μελετώντας λυοφιλιωμένα προβιοτικά οξυγαλακτικά ως προς τη βιωσιμότητά τους σε τσιπς πατάτας, αλλά και την επίδρασή τους στην οξείδωση του λαδιού, παρατήρησε ότι κατά την προσθήκη προστατευτικών μιγμάτων στη λυοφιλίωση, η μείωση των πληθυσμών κυμαινόταν από ~ 20% έως και ~ 92%, κατά περίπτωση στελέχους και σε σχέση με το κρυοπροστατευτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε. Αντίστοιχα, σε μελέτη που εκπόνησαν οι Zhen et al., (2020) μελετήθηκε η δράση διαφόρων κρυοπροστατευτικών, όσον αφορά τις επιδράσεις της επεξεργασίας θερμικού σοκ στο είδος *L. acidophilus*, μετά από τη διαδικασία της λυοφιλίωσης.



Διάγραμμα 3.5: Βιωσιμότητα λυοφιλιωμένης καλλιέργειας του προβιοτικού στελέχους *L. pentosus* B329 μετά από 120 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4 °C.

3.4 Δημιουργία και Μελέτη “Ready to use” εναρκτηρίας καλλιέργειας

Μετά και τη διαδικασία της λυοφιλίωσης ολοκληρώθηκε η παραγωγή των έτοιμων προβιοτικών καλλιεργειών και μελετήθηκε η λειτουργική σταθερότητά τους ξανά, στη νέα τους λυοφιλιωμένη μορφή, στη βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης, με βάση τα προηγούμενα πειράματα της μελέτης. Πιο αναλυτικά, αξιολογήθηκε η ζυμωτική ικανότητα του λυοφιλιωμένου μικροοργανισμού, ως προς την κατανάλωση της λακτόζης του τυρογάλακτος στους 37 °C και οι παρατηρήσεις αυτές αξιολογήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα από τις υγρές καλλιέργειες που μελετήθηκαν στην ενότητα 3.2. Συγκεκριμένα και όπως καταγράφεται στο Διάγραμμα 3.6, με βάση την κινητική της διεργασίας, τα προϊόντα της ζύμωσης έδωσαν 37.52 γαλακτικό οξύ και 2.45 g/L μικροβιακή βιομάζα μετά την κατανάλωση 41.70 g/L σακχάρου. Συγκεκριμένα, τα λυοφιλιωμένα κύτταρα κατανάλωσαν τη λακτόζη σε ποσοστό 83%, με μείωση της κινητικής μετά τις 24 ώρες ζύμωσης. Επιπλέον, μειωμένα παρατηρήθηκαν και τα ποσοστά παραγωγής του γαλακτικού οξέος, σε σχέση με την παραγωγή τους από τις μη λυοφιλιωμένες καλλιέργειες. Τέλος, σημειώθηκε και αντίστοιχη μείωση στην παραγωγή της μικροβιακής βιομάζας, της τάξης του 22% . Η ανάπτυξη λυοφιλιωμένης αρχικής καλλιέργειας του στελέχους *L. pentosus* B329 κρίθηκε άκρως επιτυχής, καθώς χρησιμοποιήθηκε εκ νέου και απευθείας σε αποπρωτεϊνόμενο τυρόγαλα, με πλήρως ικανοποιητικές ζυμωτικές επιδόσεις.



Διάγραμμα 3.6: Κινητική παραγωγής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης λυοφιλιωμένων κυττάρων του *L. pentosus* B329 κατά την υγρή ζύμωση σε λακτόζη τυρογάλακτος αρχικής συγκέντρωσης ~ 50 g/L στους 37 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι καθημερινές ανάγκες του σήμερα οδηγούν στην όλο και αυξανόμενη ανάπτυξη της βιομηχανικής τυροκομίας, συνθήκη που προκαλεί ακόμα στις μέρες μας, τεράστιες οικολογικές ανησυχίες. Παράλληλα, το τυρόγαλο βρίσκεται ακόμη περισσότερο στο επίκεντρο, λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας, αλλά και της εξελισσόμενης αξιοποίησής του, λόγω της ιδιαίτερης επίσης, τεχνολογικής του αξίας. Συγκεκριμένα, πληθώρα μελετών σήμερα εστιάζουν στην ανάκτηση της πρωτεΐνης του τυρογάλακτος και στη μετέπειτα χρήση της λακτόζης για παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κυρίως μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Μέσα σε όλα αυτά, ένα ακόμη επίκαιρο φαινόμενο της εποχής μας, είναι η αύξηση της κατανάλωσης προϊόντων με προβιοτικές ιδιότητες, γεγονός που αποδίδεται στη συνειδητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με το ρόλο των προβιοτικών στην υγεία, αφού είναι πλέον ευρέως αποδεδειγμένες και γνωστές οι ευεργετικές τους ιδιότητες.

Η σκέψη για εκμετάλλευση του πλούσιου οργανικού κλάσματος του τυρογάλακτος, ώθησε ώστε η παρούσα μελέτη να έχει ως κύριο στόχο την αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την παραγωγή προβιοτικών καλλιιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, το πλούσιο σε λακτόζη τυρόγαλο αξιοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη καλλιιεργειών εκκίνησης. Η συγκριτική αξιολόγηση δύο οξυγαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, ανέδειξε το στέλεχος *L. pentosus* B329, ως προς την παραγωγή βιομάζας, αλλά και την ικανότητά του να ζυμώνει σχεδόν πλήρως τη λακτόζη, τόσο στο συνθετικό υπόστρωμα όσο και στο τυρόγαλο. Άκρως ικανοποιητικά ήταν και τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της λυοφιλιωμένης μορφής του *L. pentosus* B329 ως προς τη ζυμωτική του ικανότητα. Τέλος, η μελέτη βιωσιμότητας που διεξήχθη όσον αφορά την αποθήκευση των λυοφιλιωμένων κυττάρων, έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και προϊδεάζει θετικά τη μελλοντική τους χρήση σε πληθώρα εφαρμογών. Συμπερασματικά, η παραγωγή προβιοτικών μικροοργανισμών με πρώτη ύλη το τυρόγαλο μπορεί να αποτελέσει μια βιώσιμη εναλλακτική μέθοδο αξιοποίησης του τυρογάλακτος, απόλυτα συμβατής με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1 Σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών τυριών πρόβειου και αγελαδινού γάλακτος.	4
1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παραγωγή ορισμένων προϊόντων ζύμωσης.	20
1.3 Αποδεδειγμένα αποτελεσματικές, σε πολλά συστήματα τροφίμων, βακτηριοσίνες, με σκοπό χρήσης τον έλεγχο της αλλοίωσης των τροφίμων ή των παθογόνων βακτηρίων τους.	22
1.4 Η επίδραση των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία.	26
1.5 Διαδεδομένα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούνται από πληθώρα βιομηχανιών.	27
1.6 Λεπτομέρειες για τα προϊόντα που αξιοποιούνται ως φορείς προβιοτικών.	29
2.1 Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος λακτόζης.	32

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

3.1 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης του <i>L. plantarum</i> B324 (A) και <i>L. pentosus</i> B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 30 °C.	37
3.2 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης του <i>L. plantarum</i> B324 (A) και <i>L. pentosus</i> B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε υπόστρωμα συνθετικής λακτόζης αρχικής συγκέντρωσης ~45 g/L στους 37 °C.	38
3.3 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης του <i>L. plantarum</i> B324 (A) και <i>L. pentosus</i> B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε λακτόζη τυρογάλακτος αρχικής συγκέντρωσης ~50 g/L στους 30 °C.	40
3.4 Κινητική παραγωγής ξηρής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης του <i>L. plantarum</i> B324 (A) και <i>L. pentosus</i> B329 (B) κατά την υγρή ζύμωση σε λακτόζη τυρογάλακτος αρχικής συγκέντρωσης ~50 g/L στους 37 °C.	41
3.5 Βιωσιμότητα λυοφιλιωμένης καλλιέργειας του προβιοτικού στελέχους <i>L. pentosus</i> B329 μετά από 120 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4 °C.	42
3.6 Κινητική παραγωγής βιομάζας, γαλακτικού οξέος και κατανάλωσης της λακτόζης λυοφιλιωμένων κυττάρων του <i>L. pentosus</i> B329 κατά την υγρή ζύμωση σε τυρόγαλα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης ~50 g/L στους 37 °C.	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

1.1 Διαχωρισμός τυρόγαλου από καζεΐνη γάλακτος.	2
1.2 Ενδεικτικά σχηματικά παραδείγματα διαφόρων οξυγαλακτικών Βακτηρίων.	10
1.3 <i>Lactobacillus</i> sp. κατόπιν χρώσης Gram (καλλιέργεια σε γιαούρτι).	11
1.4 Ομογαλακτική και ετερογαλακτική ζύμωση γαλακτικού οξέος.	14
2.1 Λυοφιλιωμένα κύτταρα οξυγαλακτικών βακτηρίων.	33
2.2 Το όργανο της HPLC που πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις.	34

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Συντομογραφία	Ολογράφως	Μετάφραση
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
BOD	Biological Oxygen Demand	Απαιτούμενο Διαλυμένο Οξυγόνο
CFU	Colony Forming Units	Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών
EFSA	European Food Safety	Ευρωπαϊκή Ασφάλεια Τροφίμων
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο Φλαβίνης Αδενίνης
FAO	Food and Agriculture Organization	Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FDA	Food and Drug Administration	Διοίκηση Τροφίμων και Φαρμάκων
FFDCA	Federal Food, Drug and Cosmetic	Ομοσπονδία Τροφίμων, Φαρμάκων και
FMN	Flavin Mononucleotide	Μονονουκλεοτίδιο Φλαβίνης
GI	Gastrointestinal	Γαστρεντερικός
GOS	Galacto- Oligosaccharides	Γαλακτο- Ολιγοσακχαρίτες
GRAS	Generally Recognized As Safe	Γενικώς Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή
HPLC	High Performance Liquid	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής
IDA	International Dairy Administration	Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος
LAB	Lactic Acid Bacteria	Οξυγαλακτικά Βακτήρια
PHA	Polyhydroxyalkanoates	Υδροξυλκανοϊκοί εστέρες
QPS	Qualified Presumption of Safety	Ειδικευμένο Τεκμήριο Ασφαλείας
TDW	Total Dry Weight	Συγκέντρωση Ολικού Ξηρού Βάρους
UDP	Uridine Diphosphate	Διφωσφορική ουριδίνη
WHO	World's Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adroit Market Research (2021) *Global Galacto Oligosaccharides Market Size, Share & Industry Forecast 2020-2028*, ADROIT MARKET RESEARCH, Your Knowledge Partner. Available at: <https://www.adroitmarketresearch.com/industry-reports/galacto-oligosaccharides-gos-market> (Accessed: 9 January 2022).

Alamprese, C. et al. (2002) 'Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations', *International Dairy Journal*, 12(2), pp. 201–208. doi:10.1016/S0958-6946(01)00159-5.

Andoyo, R. et al. (2018) 'Fractal Dimension Analysis of Texture Formation of Whey Protein-Based Foods', *International Journal of Food Science*, 2018, p. e7673259. doi:10.1155/2018/7673259.

Argyri, A.A. et al. (2013) 'Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests', *Food Microbiology*, 33(2), pp. 282–291. doi:10.1016/j.fm.2012.10.005.

Banaszewska, A. et al. (2014) 'Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry', *Journal of Dairy Science*, 97(4), pp. 1893–1908. doi:10.3168/jds.2013-7283.

Bao, Y. et al. (2012) 'In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk', *Annals of Microbiology*, 62(3), pp. 1311–1320. doi:10.1007/s13213-011-0377-4.

Bintsis, T. and Athanasoulas, A. (2015) 'Dairy Starter Cultures', in Papademas, P. (ed.) *Dairy Microbiology, a Practical Approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 114–154.

Borges-Tiago, M.T., Tiago, F. and Cosme, C. (2019) 'Exploring users' motivations to participate in viral communication on social media', *Journal of Business Research*, 101, pp. 574–582. doi:10.1016/j.jbusres.2018.11.011.

Briand, L.C. et al. (2006) 'Automated impact analysis of UML models', *Journal of Systems and Software*, 79(3), pp. 339–352. doi:10.1016/j.jss.2005.05.001.

Brown, A.C. and Valiere, A. (2004) 'Probiotics and Medical Nutrition Therapy', *Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University*, 7(2), pp. 56–68.

Cai, Z. et al. (2003) 'Hearts From Rodents Exposed to Intermittent Hypoxia or Erythropoietin Are Protected Against Ischemia-Reperfusion Injury', *Circulation*, 108(1), pp. 79–85. doi:10.1161/01.CIR.0000078635.89229.8A.

Capozzi, V. et al. (2012) 'Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), pp. 1383–1394. doi:10.1007/s00253-012-4440-2.

Castellano, P. et al. (2008) 'A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina', *Meat Science*, 79(3), pp. 483–499. doi:10.1016/j.meatsci.2007.10.009.

Castellano, P. and Vignolo, G. (2006) 'Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins', *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), pp. 194–199. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01933.x.

Cerdeira, V. et al. (2019) 'Design of a low-cost culture medium based in whey permeate for biomass production of enological *Lactobacillus plantarum* strains', *Biotechnology Progress*, 35(3), p. e2791. doi:10.1002/btpr.2791.

Chandra, R. *et al.* (2018) 'A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index', *Journal of Cleaner Production*, 183, pp. 1184–1196. doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.124.

Charalampopoulos, D. and Rastall, R.A. (2012) 'Prebiotics in foods', *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), pp. 187–191. doi:10.1016/j.copbio.2011.12.028.

Chaudhary, S.K. (2016) *Dahi(CURD) banne do | Blog de Surya Karan Chaudhary, youth4work.com*. Available at: <https://www.youth4work.com/es/y/sksuryakaran/Surya-Karan-Chaudhary-blog/4917-dahicurd-banne-do> (Accessed: 11 January 2022).

Cheong, E.Y.L. *et al.* (2014) 'Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese', *Food Control*, 46, pp. 91–97. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.011.

Choi, H.-J. *et al.* (2002) 'Weissella kimchii sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), pp. 507–511. doi:10.1099/00207713-52-2-507.

Chomba, C. (2020) *3 Steps to Choosing Your Best Probiotic for Women, Men & Entire Family, Velobiotics*. Available at: <https://velobiotics.com/blogs/news/3-steps-to-choosing-your-best-probiotic-for-men-women-and-entire-family> (Accessed: 11 January 2022).

Cinelli, P. *et al.* (2014) 'Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability', *Polymer Degradation and Stability*, 108, pp. 151–157. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.07.007.

Coakley, M., Fitzgerald, G. and Ros, R.P. (1997) 'Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), pp. 1434–1440. doi:10.1128/aem.63.4.1434-1440.1997.

Cogan, T.M. *et al.* (2007) 'Invited Review: Advances in Starter Cultures and Cultured Foods¹', *Journal of Dairy Science*, 90(9), pp. 4005–4021. doi:10.3168/jds.2006-765.

Çon, A.H. and Karasu, N. (2009) 'Determination of antagonistic starter cultures for pickle and olive fermentation processes', *Czech Journal of Food Sciences*, 27(No. 3), pp. 185–193. doi:10.17221/86/2008-CJFS.

Cox, J.C., Ingersoll, J.E. and Ross, S.A. (2005) 'A theory of the term structure of interest rates', in *Theory of Valuation*. WORLD SCIENTIFIC, pp. 129–164. doi:10.1142/9789812701022_0005.

Crisà, A. (2013) 'Milk Carbohydrates and Oligosaccharides', in *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 129–147. doi:10.1002/9781118534168.ch7.

Cross, M.L. (2002) 'Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(4), pp. 245–253. doi:https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x.

Crowley, S., Mahony, J. and van Sinderen, D. (2013) 'Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives', *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), pp. 93–109. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004.

Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. and Richard-Forget, F. (2010) 'Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review', *Food Control*, 21(4), pp. 370–380. doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.011.

Dave, R.I. and Shah, N.P. (1997) 'Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures', *International Dairy Journal*, 7(1), pp. 31–41. doi:10.1016/S0958-6946(96)00046-5.

Domingos, J.M.B. et al. (2018) 'Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture', *Chemical Engineering Journal*, 336, pp. 47–53. doi:10.1016/j.cej.2017.11.024.

Donkor, O.N. et al. (2007) 'Rheological Properties and Sensory Characteristics of Set-Type Soy Yogurt', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), pp. 9868–9876. doi:10.1021/jf071050r.

Drgalic, I., Tratnik, L. and Bozanic, R. (2005) 'Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey', *Le Lait*, 85(3), pp. 171–179. doi:10.1051/lait:2005009.

Durso, L. and Hutkins, R. (2003) 'STARTER CULTURES', in Caballero, B. (ed.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 5583–5593. doi:10.1016/B0-12-227055-X/01146-9.

EFSA (2007) *Qualified presumption of safety (QPS)* | EFSA, *efsa, European Food Safety Authority*. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps> (Accessed: 9 January 2022).

Ehrmann, M. a. et al. (2002) 'Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry', *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), pp. 966–975. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01608.x.

Elliason, D.J. and Tatini, S.R. (1999) 'Enhanced inactivation of Salmonella typhimurium and verotoxigenic Escherichia coli by nisin at 6·5°C', *Food Microbiology*, 16(3), pp. 257–267. doi:10.1006/fmic.1998.0226.

Ewe, J.-A., Wan-Abdullah, W.-N. and Liong, M.-T. (2010) 'Viability and growth characteristics of Lactobacillus in soymilk supplemented with B-vitamins', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), pp. 87–107. doi:10.3109/09637480903334163.

Ezhilarasi, P.N. et al. (2013) 'Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review', *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), pp. 628–647. doi:10.1007/s11947-012-0944-0.

FAO/WHO (2001) 'Joint FAO/WHO Expert Consultation on', p. 34.

FDA (1958) *Generally Recognized as Safe (GRAS)* (Center for Food Safety and Applied Center for Food Safety and Applied, FDA. FDA. Available at: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras> (Accessed: 11 January 2022).

Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E. (2013a) 'Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes"', in Kongo, J.M. (ed.) *Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients*, pp. 569–614.

Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E. (2013b) 'Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients', in Kongo, J.M. (ed.) *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. doi:10.5772/47766.

Fox, P.F. et al. (2004) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Academic Press.

Fu, W. and Nakamura, T. (2017) 'Explaining the texture properties of whey protein isolate/starch co-gels from fracture structures', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(4), pp. 839–847. doi:10.1080/09168451.2017.1282812.

- Gaidhani, K.A. et al. (2015) 'LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW', *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), pp. 516–543.
- Galdeano, C.M. et al. (2007) 'Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria', *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(5), pp. 485–492. doi:10.1128/CVI.00406-06.
- Gardiner, G. et al. (1998) 'Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), pp. 2192–2199. doi:10.1128/AEM.64.6.2192-2199.1998.
- Garofalo, C. et al. (2016) 'Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview'. Available at: <http://agris.upm.edu.my:8080/dspace/handle/0/14516> (Accessed: 8 January 2022).
- Georgalaki, M. et al. (2013) 'Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198', *Food Microbiology*, 33(1), pp. 124–130. doi:10.1016/j.fm.2012.09.008.
- Georgalaki, M.D. et al. (2002) 'Macedocin, a Food-Grade Lantibiotic Produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), pp. 5891–5903. doi:10.1128/AEM.68.12.5891-5903.2002.
- Guarner, F. and Schaafsma, G.J. (1998) 'Probiotics', *Food Microbiology*, 39, pp. 237–238.
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A. and Domingues, L. (2010) 'Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey', *Biotechnology Advances*, 28(3), pp. 375–384. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.002.
- Gupta, V. et al. (2011) 'Luminescent Graphene Quantum Dots for Organic Photovoltaic Devices', *Journal of the American Chemical Society*, 133(26), pp. 9960–9963. doi:10.1021/ja2036749.
- Gupta, V. and Garg, R. (2009) 'Probiotics', *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), pp. 202–209. doi:10.4103/0255-0857.53201.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. (1998) 'New developments in meat starter cultures', *Meat Science*, 49, pp. S125–S138. doi:10.1016/S0309-1740(98)90043-2.
- Hirayama, K. and Rafter, J. (2000) 'The role of probiotic bacteria in cancer prevention', *Microbes and Infection*, 2(6), pp. 681–686. doi:10.1016/S1286-4579(00)00357-9.
- Hove, H., Nørgaard, H. and Brøbech Mortensen, P. (1999) 'Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract', *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(5), pp. 339–350. doi:10.1038/sj.ejcn.1600773.
- Huang, S. et al. (2017) 'Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer', *Journal of Food Engineering*, 196, pp. 11–17. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.10.017.
- Huang, S. et al. (2018) 'Growth in Hyper-Concentrated Sweet Whey Triggers Multi Stress Tolerance and Spray Drying Survival in *Lactobacillus casei* BL23: From the Molecular Basis to New Perspectives for Sustainable Probiotic Production', *Frontiers in Microbiology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02548> (Accessed: 22 January 2022).
- Hugas, M. and Monfort, J.Ma. (1997) 'Bacterial starter cultures for meat fermentation', *Food Chemistry*, 59(4), pp. 547–554. doi:10.1016/S0308-8146(97)00005-8.
- Hurtado, A. et al. (2012) 'Lactic acid bacteria from fermented table olives', *Food Microbiology*, 31(1), pp. 1–8. doi:10.1016/j.fm.2012.01.006.

IDA (2012) *Safety demonstrations of MFC in fermented food products*, p. 455.

Ismail, Y.S., Yulvizar, C. and Mazhitov, B. (2018) 'Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130, p. 012019. doi:10.1088/1755-1315/130/1/012019.

Isolauri, E. et al. (2000) 'Probiotics in the management of atopic eczema', *Clinical & Experimental Allergy*, 30(11), pp. 1605–1610. doi:10.1046/j.1365-2222.2000.00943.x.

John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. (2007) 'Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), pp. 524–534. doi:10.1007/s00253-006-0779-6.

Khalid, K. (2011) 'An overview of lactic acid bacteria', *International Journal of Bioscience*, 1(3), pp. 1–13.

Khalifa, I. et al. (2018) 'Understanding the shielding effects of whey protein on mulberry anthocyanins: Insights from multispectral and molecular modelling investigations', *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, pp. 116–124. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.117.

Kivanç, M. and Yapıcı, E. (2015) 'Kefir as a Probiotic Dairy Beverage: Determination Lactic Acid Bacteria and Yeast', *ETP International Journal of Food Engineering* [Preprint]. doi:10.18178/ijfe.1.1.55-60.

Klein, A. (1998) 'Firm Performance and Board Committee Structure', *The Journal of Law and Economics*, 41(1), pp. 275–304. doi:10.1086/467391.

Kosaric, N. and Asher, Y.J. (1985) 'The utilization of cheese whey and its components', in *Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), pp. 25–60. doi:10.1007/BFb0009524.

Kumar, M., Mohania, D., et al. (2009) 'A probiotic fermented milk prepared by mixed culture reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in rats challenged with pathogens.', *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 4(3), pp. 211–218.

Kumar, M., Behare, P.V., et al. (2009) 'Health-promoting probiotic functional foods, Potential and prospects', *AgroFOOD Industry hi- tech*, 20, pp. 29–33.

Kumar, M. et al. (2010) 'Cancer-preventing attributes of probiotics: an update', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(5), pp. 473–496. doi:10.3109/09637480903455971.

Kumar, M. et al. (2011) 'Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB1-induced hepatocellular carcinoma', *Gene*, 490(1), pp. 54–59. doi:10.1016/j.gene.2011.09.003.

Kun, S. et al. (2008) 'Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains', *Process Biochemistry*, 43(8), pp. 816–821. doi:10.1016/j.procbio.2008.03.008.

Labconco Corporation (1992) *Lyph- Lock Freeze Dry Systems. A Complete Guide to laboratory lyophilization products*. Missouri, USA.

Lavari, L. et al. (2014) 'Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli', *Journal of Dairy Research*, 81(3), pp. 267–274. doi:10.1017/S0022029914000156.

Lavari, L. et al. (2015) 'Growth of Lactobacillus rhamnosus 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying', *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), pp. 322–330. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.066.

Lazos Chavero, E. (2015) 'Percepciones y responsabilidades sobre el deterioro ecológico en el sur de Veracruz'. Available at: <http://ru.iis.sociales.unam.mx/handle/IIS/4688> (Accessed: 11 January 2022).

Lee, K., Kim, H.-J. and Lee, E.-J. (2013) 'Mixed cultures of Kimchi lactic acid bacteria show increased cell density and lactate productivity', *African Journal of Biotechnology*, 12(25), pp. 4000–4005. doi:10.4314/ajb.v12i25.

Liong, M.-T. et al. (2009) 'Survival, growth characteristics and bioactive potential of *Lactobacillus acidophilus* in a soy-based cream cheese', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), pp. 1382–1391. doi:10.1002/jsfa.3598.

Madureira, A.R. et al. (2005) 'Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract', *International Dairy Journal*, 15(6), pp. 921–927. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.025.

Majamaa, H. and Isolauri, E. (1997) 'Probiotics: A novel approach in the management of food allergy', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(2), pp. 179–185. doi:10.1016/S0091-6749(97)70093-9.

Manzoor, A. et al. (2017) 'Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy', *Journal of Biological Engineering*, 11(1), p. 17. doi:10.1186/s13036-017-0059-2.

Marteau, P.R. et al. (2001) 'Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), pp. 430s–436s. doi:10.1093/ajcn/73.2.430s.

Mawson, R. et al. (1994) 'Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 5. Animal reproduction', *Die Nahrung*, 38(6), pp. 588–598. doi:10.1002/food.19940380607.

McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. (2001) 'Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action', *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), pp. 285–308. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x.

Merk, K., Borelli, C. and Korting, H.C. (2005) 'Lactobacilli – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract', *International Journal of Medical Microbiology*, 295(1), pp. 9–18. doi:10.1016/j.ijmm.2004.11.006.

Mheen, T.-I. and Kwon, T.-W. (1984) 'Effect of Temperature and Salt Concentration on Kimchi Fermentation', *Korean Journal of Food Science and Technology*, 16(4), pp. 443–450.

Morgan, S. m. et al. (2001) 'Evaluation of a spray-dried lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems', *Letters in Applied Microbiology*, 33(5), pp. 387–391. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.01016.x.

Mostafa, H. (2020) 'Lyophilized Probiotic Lactic Acid Bacteria Viability in Potato Chips and Its Impact on Oil Oxidation', *Foods*, 9(5), p. 586. doi:10.3390/foods9050586.

Nagpal, R. et al. (2007) 'Potential of probiotics and prebiotics for synbiotic functional dairy foods.', *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2, pp. 75–84.

Nagpal, R. and Kaur, A. (2011) 'Synbiotic Effect of Various Prebiotics on In Vitro Activities of Probiotic Lactobacilli', *Ecology of Food and Nutrition*, 50(1), pp. 63–68. doi:10.1080/03670244.2011.539161.

Nagpal, R., Kumar, A. and Arora, S. (2010) 'IN VITRO PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM INDIGENOUS FERMENTED MILK PRODUCTS', *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 5(2), pp. 103–110.

- Nagpal, R., Kumar, A. and Kumar, M. (2012) 'Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli', *Annals of Microbiology*, 62(4), pp. 1573–1578. doi:10.1007/s13213-011-0412-5.
- Nilchian, Z. *et al.* (2016) 'Improvement of Fermented Cucumber Characteristics by Starter Culture of *Lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophiles*', *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6(2), pp. 31–40.
- Nooshkam, M., Babazadeh, A. and Jooyandeh, H. (2018) 'Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system', *Trends in Food Science & Technology*, 80, pp. 23–34. doi:10.1016/j.tifs.2018.07.028.
- Novak, K.J. *et al.* (1999) 'The effects of aggressive policing of disorder on serious crime', *Policing: An International Journal of Police Strategies & Management*, 22(2), pp. 171–194. doi:10.1108/13639519910271229.
- Nuraida, L., Wachter, M.C. and Owens, J.D. (1995) 'Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(5), pp. 567–571. doi:10.1007/BF00286375.
- Oksanen, P.J. *et al.* (1990) 'Prevention of Travellers Diarrhoea by *Lactobacillus GG*', *Annals of Medicine*, 22(1), pp. 53–56. doi:10.3109/07853899009147242.
- Orla-Jensen, S. (1942) *The lactic acid bacteria: die echten Milchsäurebakterien*. Munksgaard.
- O'Sullivan, L.F., Meyer-Balzburg, H.F.L. and Watkins, B.X. (2000) 'Social cognitions associated with pubertal development in a sample of urban, low-income, African-American and Latina girls and mothers', *Journal of Adolescent Health*, 27(4), pp. 227–235. doi:10.1016/S1054-139X(99)00111-1.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002) 'Probiotics: an overview of beneficial effects', in Siezen, R.J. *et al.* (eds) *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 279–289. doi:10.1007/978-94-017-2029-8_18.
- Palla, M. *et al.* (2017) 'Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts of PDO Tuscan bread sourdough by culture dependent and independent methods', *International Journal of Food Microbiology*, 250, pp. 19–26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.015.
- Papadaki, E., Tsimidou, M.Z. and Mantzouridou, F.Th. (2018) 'Changes in Phenolic Compounds and Phytotoxicity of the Spanish-Style Green Olive Processing Wastewaters by *Aspergillus niger* B60', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), pp. 4891–4901. doi:10.1021/acs.jafc.8b00918.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2002) 'Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture', *Bioresource Technology*, 82(1), pp. 43–49. doi:10.1016/S0960-8524(01)00149-3.
- Parada, J.L. *et al.* (2007) 'Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, pp. 512–542. doi:10.1590/S1516-89132007000300018.
- Parvez, S. *et al.* (2006) 'Probiotics and their fermented food products are beneficial for health', *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), pp. 1171–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x.
- Pathmakanthan, S.M., C.A. Edwards, S. (2000) 'Probiotics: A Review of Human Studies to Date and Methodological Approaches', *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(2), pp. 10–30. doi:10.1080/089106000750060251.

- Peery, A.F. *et al.* (2012) 'Burden of Gastrointestinal Disease in the United States: 2012 Update', *Gastroenterology*, 143(5), pp. 1179-1187.e3. doi:10.1053/j.gastro.2012.08.002.
- Pereira, D.I.A. and Gibson, G.R. (2002) 'Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), pp. 4689-4693. doi:10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002.
- Pescuma, M., de Valdez, G.F. and Mozzi, F. (2015) 'Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp. 6183-6196. doi:10.1007/s00253-015-6766-z.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R. (2007) 'The genomics of lactic acid bacteria', *Trends in Microbiology*, 15(12), pp. 546-553. doi:10.1016/j.tim.2007.09.010.
- Pundir, R.K. and Jain, P. (2010) 'Change in microflora of sauerkraut during fermentation and storage', *IDOSI Publications*, 5(2), pp. 221-225.
- Rafter, J. (2003) 'Probiotics and colon cancer', *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 17(5), pp. 849-859. doi:10.1016/s1521-6918(03)00056-8.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2010) 'Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production.', *Annals of Biological Research*, 1(4), pp. 218-228.
- Ray, R.C. and Didier, M. (2014) *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. CRC Press.
- Robinson, R.K. (2002) *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. 3rd edn. Canada: John Wiley & Sons.
- Ross, R.P. *et al.* (2002) 'Cheese delivering biocultures--probiotic cheese - ProQuest', *Aust J Dairy Technol*, 57, pp. 71-78.
- Ryan, M.P. *et al.* (1996) 'An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147', *Applied and Environmental Microbiology* [Preprint]. doi:10.1128/aem.62.2.612-619.1996.
- Saarela, M. *et al.* (2000) 'Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties', *Journal of Biotechnology*, 84(3), pp. 197-215. doi:10.1016/S0168-1656(00)00375-8.
- Saithong, P. *et al.* (2010) 'Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented fish', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), pp. 553-557. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.06.004.
- Salma, J.B.P. *et al.* (2017) 'Deproteinized Cheese Whey Medium for Biomass Production of Probiotic *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), pp. 174-187.
- Salminen, S. *et al.* (1999) 'Probiotics: how should they be defined?', *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), pp. 107-110. doi:10.1016/S0924-2244(99)00027-8.
- Salminen, S. and Wright, A. von (2004) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition*. CRC Press.
- Salminen, S.J., Gueimonde, M. and Isolauri, E. (2005) 'Probiotics That Modify Disease Risk', *The Journal of Nutrition*, 135(5), pp. 1294-1298. doi:10.1093/jn/135.5.1294.
- Sanders, M.E. (1998) 'Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria', *International Dairy Journal*, 8(5), pp. 341-347. doi:10.1016/S0958-6946(98)00056-9.

Sarao, L.K. and Arora, M. (2017) 'Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), pp. 344–371. doi:10.1080/10408398.2014.887055.

Savedboworn, W. et al. (2019) 'Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*', *Food Science and Biotechnology*, 28(3), pp. 795–805. doi:10.1007/s10068-018-0523-x.

Sendra, E. et al. (2008) 'Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria', *Food Microbiology*, 25(1), pp. 13–21. doi:10.1016/j.fm.2007.09.003.

Sheehan, V.M., Ross, P. and Fitzgerald, G.F. (2007) 'Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), pp. 279–284. doi:10.1016/j.ifset.2007.01.007.

Simons, L.A., Amansec, S.G. and Conway, P. (2006) 'Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(8), pp. 531–535. doi:10.1016/j.numecd.2005.10.009.

Siso, M.I.G. (1996) 'The biotechnological utilization of cheese whey: A review', *Bioresource Technology*, 57(1), pp. 1–11. doi:10.1016/0960-8524(96)00036-3.

Staroń, J. et al. (2018) '5-HT1A receptor ligands and their therapeutic applications: review of new patents', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(9), pp. 679–689. doi:10.1080/13543776.2018.1514011.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997) 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), pp. 1–29. doi:10.1016/S0168-1605(96)01233-0.

Tarhan, O. et al. (2016) 'Rheological and structural characterization of whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis', *Food Hydrocolloids*, 61, pp. 211–220. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.04.042.

Terpou, A. et al. (2017) 'Sour milk production by wheat bran supported probiotic biocatalyst as starter culture', *Food and Bioprocess Processing*, 101, pp. 184–192. doi:10.1016/j.fbp.2016.11.007.

Tuohy, K.M. et al. (2003) 'Using probiotics and prebiotics to improve gut health', *Drug Discovery Today*, 8(15), pp. 692–700. doi:10.1016/S1359-6446(03)02746-6.

Twomey, D. et al. (2002) 'Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications', *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1), pp. 165–185. doi:10.1023/A:1020660321724.

Usman and Hosono, A. (1999) 'Viability of *Lactobacillus gasseri* and Its Cholesterol-Binding and Antimutagenic Activities During Subsequent Refrigerated Storage in Nonfermented Milk', *Journal of Dairy Science*, 82(12), pp. 2536–2542. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75507-4.

Vasiljevic, T. and Shah, N.P. (2008) 'Probiotics—From Metchnikoff to bioactives', *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 714–728. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.004.

Venetsaneas, N. et al. (2009) 'Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches', *Bioresource Technology*, 100(15), pp. 3713–3717. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.025.

Ventura, A. et al. (2008) 'Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters', *Cell*, 132(5), pp. 875–886. doi:10.1016/j.cell.2008.02.019.

Villamiel, M. *et al.* (2014) 'Production and Bioactivity of Oligosaccharides Derived from Lactose', *Food Oligosaccharides*, pp. 135–167. doi:10.1002/9781118817360.ch9.

Vollmar, A. and Meuser, F. (1992) 'Influence of starter cultures consisting of lactic acid bacteria and yeasts on the performance of a continuous sourdough fermenter', *Cereal chemistry (USA)*, 69(1), pp. 20–27.

de Vrese, M. and Schrezenmeir, J. (2008) 'Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics', in Stahl, U., Donalies, U.E.B., and Nevoigt, E. (eds) *Food Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), pp. 1–66. doi:10.1007/10_2008_097.

Wakil, S.M., Laba, S.A. and Fasika, S.A. (2014) 'Isolation and identification of antimicrobial-producing lactic acid bacteria from fermented cucumber', *African Journal of Biotechnology*, 13(25), pp. 2556–2564. doi:10.4314/ajb.v13i25.

Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J. (2005) *Dairy Science and Technology*. Boca Raton, USA: CRC Press.

Wu, H. *et al.* (2011) 'Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells', *Genes & Development*, 25(7), pp. 679–684. doi:10.1101/gad.2036011.

Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P.R. (2007) 'Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats', *Nutrition*, 23(1), pp. 62–68. doi:10.1016/j.nut.2006.09.002.

Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P.R. (2008) 'Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats', *Journal of Dairy Research*, 75(2), pp. 189–195. doi:10.1017/S0022029908003129.

Yeo, S.-K. and Liong, M.-T. (2010) 'Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), pp. 267–275. doi:10.1002/jsfa.3808.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. (2004) 'Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria', *Journal of Microbiology*, 42(4), pp. 315–318.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. (2005) 'Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria', *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), pp. 73–75. doi:10.1016/j.lwt.2004.04.008.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. (2006) 'Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria', *Bioresource Technology*, 97(12), pp. 1427–1430. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.018.

Yves V., B. (1979) 'Le lactoserum. Matière première noble pour les industries alimentaires humaines et animales', in *Le lactoserum. Matière première noble pour les industries alimentaires humaines et animales*. Revue Laitière Française, pp. 27–39.

Zhen, N. *et al.* (2020) 'Effects of heat shock treatment on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* after freeze-drying', *Food Research International*, 136, p. 109507. doi:10.1016/j.foodres.2020.109507.

Zotta, T. *et al.* (2018) 'Aerobic and respirative growth of heterofermentative lactic acid bacteria: A screening study', *Food Microbiology*, 76, pp. 117–127. doi:10.1016/j.fm.2018.02.017.

Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (2004) 'Τυροκομία', in *Τυροκομία: Χημεία - Φυσικοχημεία - Μικροβιολογία*. Β'. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., pp. 420–445.

Καραδήμα, Κ. (2009) *Εκτίμηση της Τοξικότητας των Διαφόρων Σταδίων Επεξεργασίας Αποβλήτων Τυροκομικών Μονάδων με Χρήση Βιοδεικτών*. Διατριβή επί διδακτορία. Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας. Available at: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/18713#page/1/mode/2up>.

Καπτή, Π.Π. (2010) *Πειραματική διερεύνηση παραγωγής βιοαερίου από μίγματα τυρογάλακτος με υγρά μηχανικού διαχωρισμού αποβλήτων χοιροστασίου διαφορετικής πυκνότητας στη μεσόφιλη περιοχή*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.