



Τεχνολογικό  
Πανεπιστήμιο  
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών  
Επιστημών και  
Διαχείρισης  
Περιβάλλοντος

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**ΤΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ  
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΜΟΥΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

*Αγαθοκλέα Νεοφύτου*

**Λεμεσός, Ιούνιος 2018**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria – LAB), έχουν χρησιμοποιηθεί από τη νεολιθική εποχή, για τη διατήρηση και τη παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων. Η ζύμωση από βιοχημικής άποψης, είναι μια μεταβολική διαδικασία παραγωγής ενέργειας από οργανικές ενώσεις χωρίς τη συμμετοχή εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός στελεχών LAB από "άγριες" καλλιέργειες για τη μελέτη των τεχνολογικών τους χαρακτηριστικών και για τη πιθανή χρήση τους ως εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση των τροφίμων. Στη παρούσα έρευνα, αρχικά μελετήθηκαν τα μορφολογικά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά 43 στελεχών LAB με πιο κλασσικές μεθόδους (τεστ καταλάσης, CO<sub>2</sub>, ανάπτυξη σε θερμοκρασίες, 10, 15, 45 ° C, χρώση Gram) και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν τα βασικότερα τεχνολογικά τους χαρακτηριστικά όπως η πρωτεόλυση, η λιπόλυση, η ικανότητα παραγωγής οξύτητας στο γάλα, η παραγωγή διακετυλίου, ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος και η αυτολυτική ικανότητα των κυττάρων.

Στα αποτελέσματα των μορφολογικών χαρακτηριστικών επιβεβαιώθηκε ότι και τα 43 στελέχη ήταν οξυγαλακτικά βακτήρια (θετικά κατά Gram, κόκκοι, ράβδοι ή κοκκοβάκιλλοι, και αρνητικά στη καταλάση). Επίσης, χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους ταυτοποίησης ανακαλύφθηκε πως από τις οινολάσπες το 88.0 % των στελεχών ανήκαν στα γένη *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus buchneri*, όπου το 12.0 % ήταν *Leuconostoc mesenteroides*. Στα τραπέζια διαλογής σταφυλιών (ποιότητας Ξυνιστέρι) το 93.5 % των στελεχών ανήκαν στο γένος *Weissella cibaria* και μόλις το 6.5 % στο γένος *Leuconostoc mesenteroides*. Παράλληλα, από το ζυμούμενο αιγινό γάλα το 91.0 % των στελεχών ήταν του γένους *Weissella cibaria*, και το 9.0 % των βακτηρίων του γένους *Weissella confusa*.

Στον έλεγχο της οξίνισης του γάλακτος, παρατηρήθηκε αλλαγή στο pH στα γένη *Lactobacillus plantarum* μετά από 24h επώασης στους 37 ° C και ελάχιστη έως και καθόλου παραγωγή οξέος στα γένη *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella cibaria* και *Weissella confusa*. Ωστόσο, κανένα από τα 43 στελέχη δεν έδωσε τιμές pH μικρότερες από 5 μετά από 6h και 24h επώασης στους 37 ° C.

Στον έλεγχο της πρωτεόλυσης, παρατηρήθηκε ελάχιστη πρωτεολυτική δραστηριότητα στα περισσότερα στελέχη του γένους *Lactobacillus plantarum* με τη μεγαλύτερη ζώνη πρωτεόλυσης

να είναι στα 6 mm και με τη μικρότερη να είναι στα 2 mm. Επιπλέον, με τη μέθοδο O-PA, η μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα παρουσιάστηκε στο στέλεχος *Weissella cibaria* strain *BP36* με συγκέντρωση αμινοξέων 23.55 ppm γλυκίνης.

Για τον έλεγχο της λιπόλυσης, δεν παρατηρήθηκε θετική δραστηριότητα σε κανένα στέλεχος των γενών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella cibaria* και *Weissella confusa*. Αρνητική δραστηριότητα των στελεχών αυτών παρατηρήθηκε επίσης και στον έλεγχο παραγωγής διακετυλίου στο γάλα (<0.5 mg/100 ml γάλακτος). Επιπλέον, στον έλεγχο καταβολισμού του κιτρικού οξέος, το μοναδικό στέλεχος που ήταν θετικό και έδειξε να αναπτύσσεται στο ειδικό υπόστρωμα ήταν αυτό της *Weissella cibaria* qz140. Τέλος, η μεγαλύτερη αυτολυτική ικανότητα παρατηρήθηκε στα στελέχη *Lactobacillus buchneri* strain *LAB* (O31), με ποσοστό αυτολυτικής δραστηριότητας ~ 43 % (fair) και *Lactobacillus plantarum* strain *SM31* (O3), με ποσοστό ~ 33 % (poor).

## ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) have been used since the Neolithic era to preserve and produce fermentation foods. From a biochemical point of view, fermentation is a metabolic process of energy production from organic compounds without the involvement of exogenous oxidizing agents. The aim of this research was to isolate and characterize LAB strains from "wild" cultures and also to study their basic technological characteristics if there is any possibility to be used as commercial cultures for the fermentation of food. In the present study, the morphological and physiological characteristics of 43 LAB strains were characterized using more classical methods (catalase test, CO<sub>2</sub>, growth at temperatures, 10,15,45 ° C, Gram staining) and then they were identified using molecular techniques. In addition, their basic technological features, such as proteolysis, lipolysis, acidity in milk, diacetyl production, citric acid catabolism, and cell autolysis have been studied.

The results of the physiological and morphological characteristics confirmed that all 43 strains were lactic acid bacteria (Gram positive, catalase negative, coccus, rods or coccobacilli). Also, using molecular identification methods, was discovered that the 88.0 % of lees samples belonged to the genera of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*, where 12.0 % belonged to the genus *Leuconostoc mesenteroides*. At the grape sorting tables (Xinisteri quality), 93.5 % of the bacteria were strains of the genus *Weissella cibaria* and only 6.5 % were strains of the genus *Leuconostoc mesenteroides*. At the same time, from the fermented goat milk 91.0 % of strains belonged to the genus *Weissella cibaria*, and 9.0 % to the genus *Weissella confusa*.

In milk acidification test, change was observed in pH in the strains of *Lactobacillus plantarum* after 24 hours of incubation at 37 ° C and little to no acid production in the genera *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa*. However, none of the 43 strains gave pH values less than 5 after 6h and 24h incubation at 37 ° C.

In proteolysis test, minimal activity was observed mostly in *Lactobacillus plantarum* strains with the largest proteolysis zone being at 6 mm and the smaller being at 2 mm. In addition, in O-PA test, the greatest proteolytic activity was present in the strain *Weissella cibaria* strain BP36 with an amino acid concentration of 23.55 ppm.

In lipolysis, the strains of the genera *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* gave negative results. The same negative results were observed in diacetyl production test, which found to be <0.5 mg / 100 ml of milk. In addition, for the catabolism test of citric acid, the only strain shown to be positive and grow well on the substrate was *Weissella cibaria qz140*. Finally, the greatest autolytic activity was observed in *Lactobacillus buchneri strain LAB (C31)*, with a percentage of self-activity around 43 % (fair) followed by the *Lactobacillus plantarum strain SM31 (O3)* approximately 33 % (poor).