

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΖΥΜΕΣ ΣΤΑ ΤΥΡΙΑ –
Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΦΕΤΑΣ**

ΤΣΙΑΜΠΑΛΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

Λάρισα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σολωμάκος Νικόλαος: Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής (Επιβλέπων)

Γκόβαρης Αλέξανδρος: Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

Πεξαρά Ανδρεάνα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

[.....ἐλθόντες δ' εἰς ἄντρον ἐθιεύμεσθα ἕκαστα. ταρσοὶ μὲν τυρῶν βριῖθον, στείνοντο
δὲ σηκοὶ ἀρνῶν ἢ δ' ἐρίφων· διακεκριμέναι δὲ ἕκασται ἔρχατο, χωρὶς μὲν πρόγονοι,
χωρὶς δὲ μέτασαι, χωρὶς δ' αὖθ' ἔρσαι. ναῖον δ' ὀρῶ ἄγγεα πάντα, γαυλοὶ τε σκαφίδες
τε, τετυγμένα, τοῖς ἐνάμελγεν**Οδύσσεια, ραψωδία ι στίχοι 216-249]**

Ζύμες στα τυριά – Η περίπτωση της Φέτας

Περίληψη

Σημαντικοί όροι: ζύμες, ζύμωση-ωρίμανση, αλλοιώσεις, φέτα

Η σχέση των ζυμών με την ασφάλεια των τροφίμων είναι αντικείμενο εξέτασης, επικεντρώνοντας την προσοχή στο γεγονός ότι, παρά την ευρεία διασπορά τους, σπανίως σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις. Ωστόσο, εξαιρέσεις όπως η *Candida albicans* και η *Cryptococcus neoformans* αναφέρεται ότι προκαλούν λοιμώξεις. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αναδεικνύονται ως πηγή ζυμών, με επίκεντρο την επίδρασή τους στην παραγωγή τυριών. Οι ζύμες μεταφέρονται στο τυρί από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένου του φρέσκου γάλακτος και του εξοπλισμού. Η χρήση καλλιεργούμενων στελεχών ζυμών στην παραγωγή τυριών επισημαίνει τις πρακτικές επιτάχυνσης της διαδικασίας ωρίμανσης.

Οι ζύμες συμβάλλουν στη ζύμωση του τυριού, μετατρέποντας τη λακτόζη και τη γαλακτόζη σε προϊόντα όπως γαλακτικό οξύ, CO₂ και H₂O. Οι απαιτήσεις των ζυμών εντός του τυριού διαφέρουν, με ορισμένα είδη όπως η *Kluyveromyces marxianus* να αναπτύσσονται επιβιώνοντας στις συνθήκες του. Στην επιφάνεια των τυριών, οι ζύμες είναι ανθεκτικές σε χαμηλές θερμοκρασίες και χαμηλό pH.

Διάφορες τεχνικές προσδιορισμού των ζυμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα εξετάζονται, καλύπτοντας συμβατικές και μοριακές-βιολογικές μεθόδους. Η παρουσία ζυμών σε λευκά τυριά άλμης, κυρίως η Φέτα, παρουσιάζεται αναλυτικά, ενώ επισημαίνεται η σημασία τους ως αλλοιωτικών οργανισμών με επιπτώσεις στα χαρακτηριστικά των τυριών.

Προβλήματα όπως άσχημα αρώματα, πρόωγη διόγκωση και αλλαγές στην εμφάνιση συνδέονται με την παρουσία ζυμών. Η δημιουργία βιογενών αμινών από τους ζύμες μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στα τυριά. Μέτρα πρόληψης προτείνονται, επικεντρώνοντας στην αντικατάσταση ζυμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε τυριά άλμης. Επισημαίνεται η χρήση παστεριωμένου γάλακτος για την απενεργοποίηση των ζυμών, ενώ αναλύονται διάφοροι κίνδυνοι, μικροβιολογικοί, χημικοί και φυσικοί, που ενδέχεται να προκαλέσουν μόλυνση από ζύμες. Η χρήση φυσικών μεθόδων απολύμανσης σε εγκαταστάσεις παραγωγής τροφίμων είναι αναγκαία, ενώ προβληματίζεται η ανάγκη για "καθαρές ετικέτες" σε γαλακτοκομικά προϊόντα.

Yeasts in cheeses – The Feta cheese situation

Abstract

Keywords: yeasts, fermentation-ripening, spoilage, Feta cheese

The relationship between yeasts and food safety is the subject of examination, focusing on the fact that, despite their widespread presence, they rarely relate to foodborne infections. However, exceptions such as *Candida albicans* and *Cr. neoformans* can cause infections. Dairy products are highlighted as a source of yeasts, with a focus on their influence on cheese production. Yeasts are transferred to cheese from various sources, including fresh milk and equipment. The use of cultivated yeast strains in cheese production highlights practices that accelerate the maturation process.

Yeasts contribute to the fermentation of cheese, converting lactose and galactose into products such as lactic acid, CO₂, and H₂O. The requirements of yeasts within the cheese vary, with some species like *K. marxianus* thriving in these conditions. On the surface of cheeses, yeasts are resistant to low temperatures and low pH.

Various techniques for yeast determination in dairy products are examined, covering conventional and molecular-biological methods. The presence of yeasts in white brined cheese Feta, is presented in detail, emphasizing their significance as spoilage organisms with implications for cheese characteristics.

Problems such as off-odors, premature swelling, and changes in appearance are linked to the presence of yeasts. The production of biogenic amines by yeasts can cause abnormalities in cheeses. Prevention measures are proposed, focusing on replacing yeasts that cause alterations in brined cheeses. The use of pasteurized milk to deactivate yeasts is highlighted, while various risks, microbiological, chemical, and physical, that may lead to yeast contamination are analyzed. The use of natural sanitation methods in food production facilities is necessary, and there is concern about the need for "clean labels" on dairy products.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
Κατάσταση πινάκων και διαγραμμάτων	ii
1. Εισαγωγή	2
1.1. Ζύμες - Τηλεομορφή και Αναμορφή	5
1.2 Ζύμες και ασφάλεια τροφίμων.....	5
1.3 Πηγές ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα	6
2. Οι ζύμες των τυριών	8
2.1 Οι ζύμες στο εσωτερικό του τυριού.....	8
2.2. Οι ζύμες στην επιφάνεια των τυριών.....	8
2.3. Ο ρόλος των ζυμών στην ωρίμανση των τυριών	10
2.3.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i> (αναμορφή: <i>Candida kefir</i>)	11
2.3.2 <i>Geotrichum candidum</i> (τηλεομορφή: <i>Galactomyces candidus</i>)	12
2.3.3. <i>Debaryomyces hansenii</i> (αναμορφή: <i>Candida famata</i>).....	14
2.3.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> (αναμορφή: <i>Candida lipolytica</i>).....	15
2.4 Αναγνώριση κι εντοπισμός των ζυμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα	16
2.4.1. Συμβατικές και Μοριακές-Βιολογικές Μεθοδολογίες για τον Προσδιορισμό των Ειδών.....	16
2.4.2. Μοριακές-Βιολογικές Μεθοδολογίες για τον Προσδιορισμό σε Επίπεδο Γένους.....	17
2.4.3 Νέες τεχνολογίες "Omics"	18
3. Η παρουσία των ζυμών στις διάφορες κατηγορίες τυριών	19
3.1. Σκληρά τυριά.....	19
3.2. Ημισκληρά τυριά.....	20
3.3. Μαλακά τυριά	21
3.4. Λευκά τυριά άλμης.....	22
3.4.1 Σημαντικά Γένη Ζυμών που Εμφανίζονται σε Λευκά Τυριά Άλμης	22
3.5 Τυριά που ωριμάζουν με ανάπτυξη μυκήτων	24
3.6 “Μπλε τυριά”	25
3.7 Τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων.....	26
4. Οι Ζύμες ως αλλοιωτικοί οργανισμοί.....	29
4.1 Ανώμαλες οσμές	29
4.2 Δημιουργία κοιλοτήτων και πρόιμη διόγκωση	30
4.3 Μεταβολές στην εμφάνιση	30
4.4 Σχηματισμός βιογενών αμινών.....	31

5. Η περίπτωση της Φέτας	31
5.1 Μελέτη ανάπτυξης ζυμών στη φέτα	31
5.2 Επίδραση του pH, του NaCl, του a_w και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των ζυμών 34	
6. Μέτρα για την πρόληψη και την αντικατάσταση των ζυμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε τυριά άλμης.....	36
6.1 Ποιοτική εξασφάλιση.....	36
6.2. Οδοί μόλυνσης	37
6.3. Διαδικασίες Απολύμανσης και Καθαρισμού	37
6.4. Βίο-Προστατευτικές Καλλιέργειες	38
7. Συμπεράσματα.....	39
Βιβλιογραφία	41

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

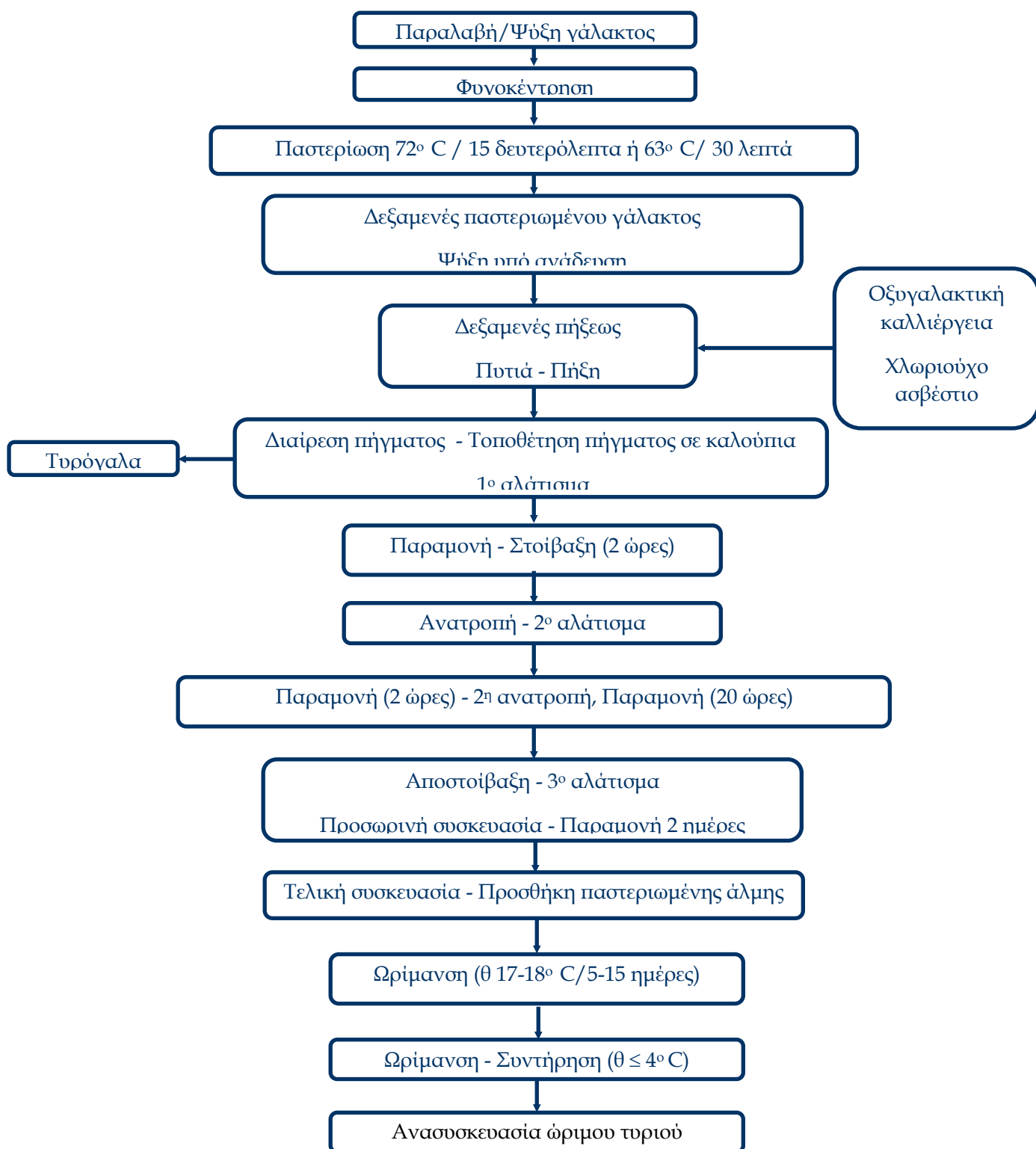
Κατάσταση πινάκων και διαγραμμάτων

Πίνακας 1	Χαρακτηριστικά της Φέτας (ΠΟΠ) (ΕΦΕΤ, 2012)	Σελ. 4
Πίνακας 2	Συγκριτικός πίνακας φυσιολογικών επιπέδων συνολικών ζυμών σε διάφορα τυριά και οι συνηθέστερες ζύμες που εντοπίζονται σε αυτά.	Σελ. 28
Πίνακας 3	Σύγκριση των συνολικών αριθμών ζυμών και των ειδών ζυμών στην Φέτα, σε διάφορα στάδια επεξεργασίας.	Σελ. 33
Πίνακας 4	Μέσες καταμετρήσεις ζυμών ($\log \text{cfu/g} \pm \text{standard deviation}$) σε 3 τυροκομικές μονάδες (Α, Β, Γ) (Manolopoulou et.al., 2003)	Σελ. 33
Πίνακας 5	Αλλοιωτικές ζύμες σε λευκά τυριά άλμης (Geronikou et al. 2020)	Σελ. 34
Διάγραμμα 1	Διάγραμμα ροής παρασκευής φέτας (ΕΦΕΤ, 2012)	Σελ. 3
Διάγραμμα 2	Μέσες καταμετρήσεις ζυμών σε δείγματα 3 τυριών πριν (ημέρα 0) και μετά (ημέρα 7) την επώαση στους 25°C (Wyder et.al., 1999)	Σελ. 11
Διάγραμμα 3	Διαδοχή ζυμών και βακτηρίων στην επιφάνεια τυριού που ωριμάζει με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων και η αλλαγή του pH (Fröhlich-Wyder et al, 2003).	Σελ. 24

1. Εισαγωγή

Η φέτα, ένα παραδοσιακό ελληνικό τυρί, είναι ένα από τα παλαιότερα και πιο δημοφιλή είδη λευκού τυριού άλμης, και έχει λάβει το καθεστώς “Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης” (ΠΟΠ) (European Commission, 2002). Είναι ένα μαλακό λευκό τυρί γνωστό για την σταθερή δομή λεία υφή του, με ξινή και ελαφρώς οξεία γεύση (Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011). Παραδοσιακά, παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή μίγμα αιγοπρόβειου γάλακτος (έως 30%) (Πίνακας 1). Ωστόσο, σήμερα, η εμπορική παραγωγή του τυριού Φέτα περιλαμβάνει τη χρήση παστεριωμένου γάλακτος και καλλιέργειες εκκίνησης *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Manolopoulou κ.ά., 2003, Rantsiou κ.ά., 2008). Η διαδικασία παρασκευής του τυριού φέτας περιλαμβάνει πήξη και στράγγιση του τυροπήγματος, ακολουθούμενη από αλάτισμα και τεμάχισμα. Μετά από αυτό, το τυρί τοποθετείται σε άλμη με περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο 7% για ωρίμανση, για περίπου 15 ημέρες σε θερμοκρασία 17–18°C. Το τελικό στάδιο ωρίμανσης πραγματοποιείται σε βαρέλια σε συνθήκες ψύξης για τουλάχιστον 60 ημέρες (Rantsiou κ.ά., 2008, Litopoulou-Tzanetaki και Tzanetakis, 2011) (Διάγραμμα 1).

Υπάρχουν διάφορα είδη τυριών που έχουν μοναδικό μικροβιακό πληθυσμό στην επιφάνειά τους, που αποτελείται από μύκητες, ζύμες, μικρόκοκκους και κορυνοβακτήρια. Οι ζύμες βρίσκονται συνήθως σε αυτόν τον μικροβιακό πληθυσμό επειδή μπορούν να ανεχθούν χαμηλά επίπεδα pH και έλλειψη υγρασίας. Μπορούν επίσης να επιβιώσουν σε συνθήκες με υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού και χαμηλές θερμοκρασίες κατά την αποθήκευση. (Fleet, 1990). Οι ζύμες υπάρχουν φυσικά στο περιβάλλον τυροκομίας και μπορούν να μολύνουν το μη παστεριωμένο γάλα, τον αέρα, τα εργαλεία τυροκομίας, το αλάτι και το τυρόγαλα (Lenoir, 1984). Έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια ποικιλία ειδών ζύμης, με περισσότερα από 10 στελέχη ταυτοποιημένα. Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν τα *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon cutaneum (beigelii)*, *Yarrowia lipolytica* (Callon, Chataud, Vanderbecken & Larpent, 1994; Choisy, Gueguen, Lenoir, Schmidt & Tourneur, 1987; Kaminarides & Anifantakis, 1989; Kammerlehner, 1995; Lenoir, Lamberet, Schmidt & Tourneur, 1985; Nahabieh & Schmidt, 1990; Rohm, 1991).



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής φέτας (ΕΦΕΤ, 2012)

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά της Φέτας (ΠΟΠ) (ΕΦΕΤ, 2012)

ΟΝΟΜΑ	ΦΕΤΑ Π.Ο.Π
ΣΥΝΘΕΣΗ	Αιγοπρόβειο γάλα, με αναλογία μέχρι 30% σε γίδινο, οξυγαλακτική καλλιέργεια, πυτιά, χλωριούχο ασβέστιο, αλάτι
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
Ενέργεια	237 Kcal/100 γραμ.
Πρωτεΐνες	16,5%
Λίπος	19%
Υγρασία (μέγιστη)	56%
NaCl (μέγιστη)	2,5%
Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	43%
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	Δοχεία των 5, 8 ή 16 κιλών σε άλμη, ξύλινα βαρέλια
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	Διατηρείται σε ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ} \text{C}$)
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΝΟΜΗΣ	Υπό ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ} \text{C}$)
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΗΣΗΣ	Μπορεί να συνοδεύσει όλα τα ελληνικά γεύματα, χρησιμοποιείται επιπλέον σαν πρόγευμα, καθώς επίσης και σε συνταγές μαγειρικής
ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	Ορίζεται από τον παρασκευαστή

Η μεταβολική δραστηριότητα των ζυμών μπορεί να έχει θετικές και αρνητικές επιπτώσεις στο τυρί. Ορισμένες ζύμες μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση, οδηγώντας σε προβλήματα όπως διόγκωση στο τυρί. Ωστόσο, οι ζύμες μπορούν επίσης να συμβάλουν στη διαδικασία ωρίμανσης του τυριού. Για παράδειγμα, είδη όπως το *K. marxianus* μπορούν να καταναλώσουν λακτόζη και να δημιουργήσουν μια πιο ανοιχτή δομή στα μπλε τυριά. (Choisy κ.ά., 1987). Αυτή η διαδικασία ζύμωσης παράγει διοξείδιο του άνθρακα και αρωματικές ενώσεις όπως η αιθανόλη και η ακεταλδεΐδη (Devoyod, 1990; Lenoir κ.ά., 1985). Οι ζύμες συμβάλλουν επίσης στην ωρίμανση του τυριού μέσω της λιπολυτικής τους δράσης. Το *Yarrowia lipolytica* είναι γνωστό ότι έχει την υψηλότερη λιπολυτική δράση μεταξύ των διαφόρων ειδών (Choisy κ.ά., 1987). Πολλές ζύμες φέρουν επίσης πρωτεολυτικά ένζυμα, με είδη όπως τα *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*,

Candida pseudotropicalis και *Debaromyces hansenii* να έχουν υψηλή πρωτεολυτική δράση (El Soda, 1986). Οι πεπτιδάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλακτος, υπάρχουν στα περισσότερα είδη ζύμης και παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. (Choisy κ.ά., 1987; Lenoir κ.ά., 1985). Η πεπτιδολυτική δραστηριότητα των ζυμομυκήτων είναι επίσης σημαντική για τη διάσπαση των πικρών πεπτιδίων και την απελευθέρωση μικρότερων πεπτιδίων και αμινοξέων (Lenoir κ.ά., 1985). Το *G. candidum* είναι ιδιαίτερα γνωστό είδος για την εμφάνιση αυτής της δραστηριότητας (Devoiyod, 1990). Συμπερασματικά, οι ζύμες είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του τυριού.

1.1. Ζύμες - Τηλεομορφή και Αναμορφή

Η προέλευση της λέξης «ζύμη» και των ισοδύναμων της σε διάφορες γλώσσες έχει τις ρίζες της στις έννοιες «αφρός» και «ανυψώνω», οι οποίες παραπέμπουν άμεσα στις διαδικασίες ζύμωσης που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή μπύρας και ψωμιού. Οι ζύμες νοούνται συνήθως ως μύκητες που αναπαράγονται με ασεξουαλικά μέσα, όπως η εκβλάστηση ή η σχάση, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυρίως μεμονωμένων κυττάρων (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011).

Οι μύκητες διαθέτουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό με το οποίο μπορούν να τους αποδοθούν δύο έγκυρα ονόματα. Το κύριο όνομα βασίζεται στη σεξουαλική κατάσταση ή την τηλεομορφή, ενώ ένα δευτερεύον έγκυρο όνομα μπορεί να προέρχεται από την ασεξουαλική κατάσταση ή αναμορφή. Αυτή η διπλή ονοματολογία προκύπτει λόγω της απουσίας τηλεομορφών για πολλούς μύκητες ή της αβεβαιότητας γύρω από το εάν μια συγκεκριμένη τηλεομορφή αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένο αναμορφή. Έτσι, ελλείψει γνώσης για την τηλεομορφή, ένα είδος μπορεί να περιγραφεί χρησιμοποιώντας ένα αναμορφικό γένος (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011).

1.2 Ζύμες και ασφάλεια τροφίμων

Σε αντίθεση με τα βακτήρια, τους ιούς και ορισμένους μύκητες, οι ζύμες δεν συνδέονται συνήθως με εστίες τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας ή άλλες τροφιμογενείς νόσους. Οι

άνθρωποι συνήθως καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες διαφόρων ειδών ζύμης ως μέρος της καθημερινής πρόσληψης τροφής χωρίς να αντιμετωπίζουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία τους. Οι Fleet και Balia (2006) πραγματοποίησαν μια ανασκόπηση σχετικά με το θέμα των ζυμών και της ασφάλειας των τροφίμων. Μερικά άτομα μπορεί να εμφανίσουν αλλεργικές αντιδράσεις όταν υπάρχει κάποιο είδος ζύμης στο φαγητό τους. Ενώ τα περισσότερα είδη ζύμης δεν είναι επιθετικά ή μολυσματικά, δύο είδη, η *Candida albicans* και η *Cryptococcus neoformans*, αναγνωρίζονται ως ευκαιριακά παθογόνα που μπορούν να προκαλέσουν διάφορες λοιμώξεις στον άνθρωπο, επηρεάζοντας τους βλεννογόνους, το δέρμα, το αναπνευστικό και το νευρικό σύστημα. Αυτά τα δύο είδη δεν συνδέονται συνήθως με τα τρόφιμα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει αυξανόμενες αναφορές ανθρώπινων λοιμώξεων που προκαλούνται από άλλα είδη ζυμών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που βρίσκονται συνήθως στα τρόφιμα (όπως *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula spp.*) (Fleet and Balia 2006, Jacques and Casaregola 2008). Γενικά, τα υγιή άτομα δεν θεωρείται ότι κινδυνεύουν από αυτές τις λοιμώξεις, καθώς επηρεάζουν κυρίως άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως καρκινοπαθείς, άτομα με AIDS, νοσηλευόμενους ασθενείς και όσους λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και αντιβιοτικά ευρέος φάσματος. Ωστόσο, αυτές οι αναδυόμενες τάσεις εγείρουν ανησυχίες σχετικά με τη συνολική ασφάλεια των ζυμών και τους παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένειά τους (Enache-Angoulvant και Hennequin 2005, Fleet and Balia 2006, Murphy and Kavanagh 1999).

1.3 Πηγές ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Οι ζύμες είναι απίστευτα ευέλικτοι οργανισμοί που μπορούν να ευδοκιμήσουν σε ένα ευρύ φάσμα περιβάλλοντος. Ως αποτέλεσμα, οι ζύμες από διάφορες πηγές μπορούν να βρουν το δρόμο τους στο τυρί κατά τη διαδικασία παραγωγής. Αυτές οι πιθανές πηγές περιλαμβάνουν το φρέσκο γάλα, τις επιφάνειες του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριού και το συνολικό περιβάλλον επεξεργασίας.

Όταν πρόκειται για τον αριθμό των ζυμών στο μη παστεριωμένογάλα, συνήθως εμπίπτουν στην περιοχή από 10^1 έως 10^3 CFU/mL (Lavoie, Touchette, St-Gelais, & Labrie, 2012). Ορισμένες ζύμες που βρίσκονται στο μη παστεριωμένογάλα περιλαμβάνουν τις *Kluyveromyces sp.*, *G. candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *D. hansenii* και *Pichia sp.* (Boutrou

& Gueguen, 2005; Büchl and Seiler, 2011; Buehler et.al., 2017; Irlinger et.al, 2015). Αυτά τα ίδια είδη έχουν επίσης εντοπιστεί σε καλλιέργειες ορού γάλακτος και γάλακτος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριού (Binetti et.al., 2013) (Πίνακας 2).

Μια μελέτη με χρήση της τεχνολογίας της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) της κοινότητας των ζυμών που παρουσιάζεται σε ένα περιβάλλον επεξεργασίας γαλακτοκομικών αποκάλυψε ότι τα ίδια είδη ζύμης υπήρχαν τόσο στο περιβάλλον όσο και στα τυριά *pasta-filata* που προέκυψαν, αν και σε ποικίλες ποσότητες (Stellato et. al., 2015). Η άλμη είναι μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή ζυμών που μπορεί να ανεχθεί υψηλά επίπεδα χλωριούχου νατρίου. Οι πληθυσμοί ζυμών στην άλμη έχουν καταγραφεί έως και 10^3 - 10^9 cfu/mL, με το γένος *Debaryomyces* να είναι το πιο κυρίαρχο (Πίνακας 2) (Bockelmann, 2011, Bokulich and Mills, 2013, Garnier et.al., 2017, Mounier et al., 2006, Vermote et.al, 2018, Viljoen et.al., 2003). Μελέτες έχουν επίσης εντοπίσει άλλα είδη ζύμης που είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στο NaCl, όπως το *Yamadazyma triangularis* και το *Sterigmatomyces halophilus* (Kragelund Haastруп et al., 2018, Stellato et al., 2015). Επιπλέον, τα ξύλινα ράφια που χρησιμοποιούνται στην αίθουσα ωρίμανσης παίζουν κρίσιμο ρόλο στη μεταφορά ζυμών (Montel et al., 2014) και ο αέρας σε δωμάτια ωρίμανσης με υψηλή υγρασία μπορεί να περιέχει έως και 120 ζύμες ανά κυβικό μέτρο (Agroscope, αδημοσίευτο).

Πέραν του φαινομένου του φυσικού ενοφθαλμισμού, υπάρχει η δυνατότητα ενοφθαλμισμού του γάλακτος και των επιφανειών του τυριού με τη χρήση εμπορικών καλλιεργειών ζυμών (Bockelmann, 2011). Αυτές οι καλλιέργειες, που προστίθενται στο γάλα του δοχείου, περιλαμβάνουν τη ζύμη *G. candidum* για την παραγωγή τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων (Cogan et al., 2014). Επίσης, προστίθενται και άλλα είδη ζυμών όπως *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* και *Saccharomyces cerevisiae*, που ζυμώνουν τη λακτόζη για την παραγωγή μαλακών τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων και μπλε τυριών (Cantor et.al., 2017; Irlinger et.al., 2017).

Στη βιομηχανική παραγωγή τυριών ξινού τυροπήγματος, όπως το γερμανικό Harzer, προστίθενται οι ζύμες *D. hansenii* και *Candida krusei* στο γάλα του δοχείου. Επιπλέον, το ήδη ώριμο τυρί προστίθεται στο φρέσκο τυρόπηγμα για ταχύτερη διαδικασία ωρίμανσης (Bockelmann et.al., 2010).

Στελέχη της ζύμης *D. hansenii* μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στην επιφάνεια του τυριού για να επιταχύνουν τη δημιουργία του φλοιού (Wyder and Teuber, 2001). Παρόλα αυτά, τα στελέχη ζυμών που περιέχονται στο προϊόν συνήθως δεν γίνονται σημαντικό μέρος του μικροβιώματος και απομονώνονται μόνο στα πρώτα στάδια ωρίμανσης (Cogan et al., 2014, Mounier et al., 2006). Συνεπώς, η "παλαιά-νέα" μέθοδος επικάλυψης, όπου τα νέα τυριά ενοφθαλμίζονται με επίχρισμα από παλαιότερα τυριά, παραμένει δημοφιλής παρά τον κίνδυνο εξάπλωσης του επιθυμητού μικροβιώματος και παθογόνων, όπως το *Listeria monocytogenes*.

2. Οι ζύμες των τυριών

2.1 Οι ζύμες στο εσωτερικό του τυριού

Εντός του τυριού, οι προϋποθέσεις για την ανάπτυξη της ζύμης εμφανίζουν κυρίως διαφοροποιήσεις ως προς την διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Οι ζύμες που είναι αερόβιες επιβιώνουν, αλλά η ανάπτυξή τους παραμένει περιορισμένη. Στο εσωτερικό ενός τυριού, μόνο οι ζύμες που μπορούν να ζυμώνουν την υπολειπόμενη λακτόζη και/ή γαλακτόζη, όπως η *K. marxianus*, έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν. Παρόλα αυτά, ο πληθυσμός μυκήτων στον πυρήνα του τυριού μπορεί να παρουσιάζει ομοιόμορφη εικόνα με αυτήν της επιφάνειας, ιδίως στα μπλε τυριά (Gkatzionis et.al., 2014). Οι παραδοσιακές ποικιλίες τυριού μπορεί να περιλαμβάνουν ζύμες που συμβάλλουν στη διαδικασία ωρίμανσης. Στα τυριά τύπου φέτα, τα *K. lactis* και *Pichia fermentans*, που και τα δύο έχουν ικανότητα ζύμωσης, συνθέτουν την τυπική μυκητιακή κοινότητα, με το *D. hansenii* να εμφανίζεται επίσης, ως είδος ζύμης που απαντάται στα τυριά άλμης (Rantsiou, et.al., 2008, Šuranská et al., 2016).

2.2. Οι ζύμες στην επιφάνεια των τυριών

Το οικοσύστημα του τυριού αποτελεί ένα εξειδικευμένο περιβάλλον που φιλοξενεί ζύμες, βακτήρια και μύκητες. Οι ζύμες μπορεί να είναι είτε προαιρετικά αναερόβιες είτε αερόβιες (Fröhlich-Wyder, 2003). Αυτές που βρίσκονται στην επιφάνεια του τυριού πρέπει να μπορούν να αναπτυχθούν υπό χαμηλές τιμές pH, χαμηλές θερμοκρασίες, μειωμένη ενεργότητα νερού και υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού. Τα περισσότερα είδη

ζύμης αναπτύσσονται σε τιμές pH περίπου 2,0-2,5, αλλά ευδοκιμούν καλύτερα σε εύρος 4,5-7,0. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η βέλτιστη ανάπτυξη συμβαίνει στο εύρος 20-30°C, αλλά πολλές ζύμες αναπτύσσονται επίσης μεταξύ 2°C και 10°C. Οι ζύμες είναι συνήθως ανθεκτικές στη χαμηλή ενεργότητα του νερού σε σύγκριση με τα βακτήρια και έχουν περιορισμένο εύρος ανάπτυξης στα επίπεδα a_w 0,85–0,92. Ορισμένα είδη ζύμης έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα ανθεκτικά στο αλάτι, επιβιώνοντας σε συγκεντρώσεις NaCl έως 20–24% (w/w), αντιστοιχώντας σε a_w 0,79–0,84 (Fleet, 2011, Monnet et.al., 2014). Η επιφάνεια του τυριού παρέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των ζυμών, όπως το γαλακτικό οξύ και οι αζωτούχες ενώσεις που προκύπτουν από τη γλυκόλυση και την πρωτεολύση από την αρχική οξυγαλακτική καλλιέργεια. Οι ζύμες επιφανειακά στο τυρί μπορούν να μεταβάλλουν το γαλακτικό οξύ, οδηγώντας σε αύξηση του pH, και έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν απαμίνωση ή αποκαρβοξυλοποίηση των αμινοξέων σε αντίστοιχα προϊόντα (Fleet, 2011, Monnet et al., 2014).

Η εναλλαγή των ζυμών και των βακτηρίων στην επιφάνεια του τυριού έχει εξεταστεί από διάφορους ερευνητές, συμπεριλαμβανομένων των Boldyreva et.al., (2016), Irlinger και Mounier (2009), Montel et.al., (2014), και Romano et.al., (2006). Όσον αφορά τα τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μικροοργανισμών, το φρέσκο τυρί βυθίζεται σε κορεσμένη άλμη για ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Η ωρίμανση ξεκινά στη συνέχεια, συνήθως στους 10-15°C, με την άμεση κατάκτηση της επιφάνειας του τυριού από ζύμες. Κατά τις πρώτες ημέρες, ο αριθμός των ζυμών αυξάνεται γρήγορα και φτάνει περίπου τα 10^6 - 10^8 cfu/cm² (Πίνακας 2) (Cogan et al., 2014, Gori et.al., 2013, Irlinger et al., 2015, Montel et al., 2014, Rea et al., 2007).

Οι αρχικά επικρατούσες ζύμες είναι ανθεκτικές στην οξύτητα και ανεκτικές στο NaCl. Καταφέρνουν να μεταβολίσουν το γαλακτικό οξύ που παράγεται από την αρχική οξυγαλακτική καλλιέργεια και να παράγουν αμμωνία από αμινοξέα. Αμφότερες αυτές διαδικασίες οδηγούν σε έντονη αύξηση του pH στην επιφάνεια του τυριού, αρχικά περίπου στα 5.0 κατά την έναρξη της ωρίμανσης, φθάνοντας στα 7.5 (Cogan et al., 2014, Gori et al., 2013, Monnet et al., 2014).

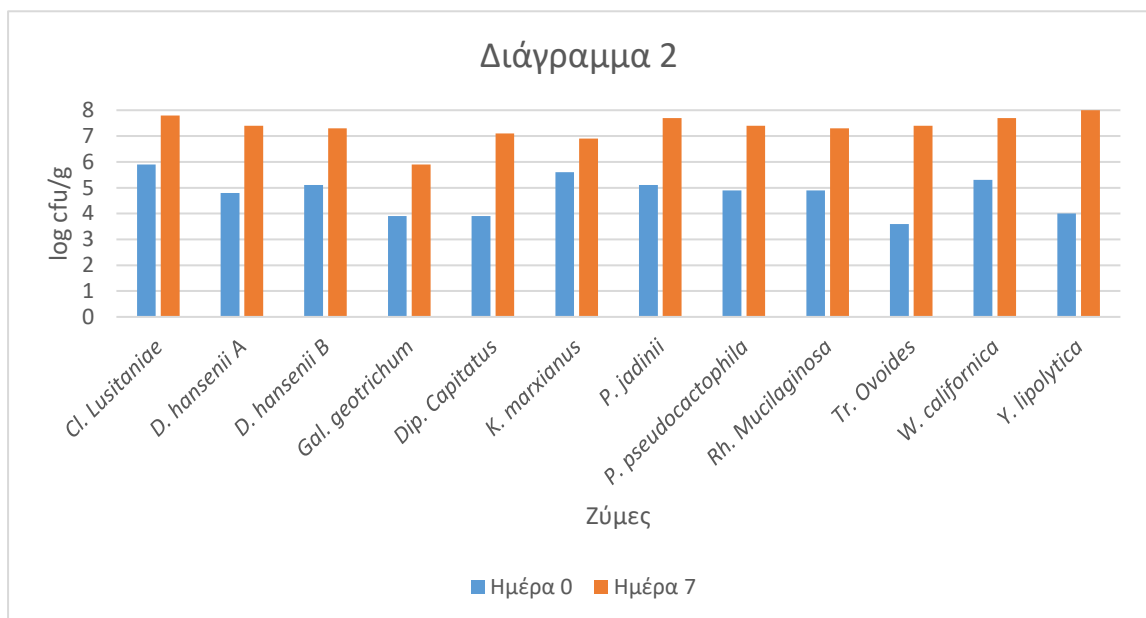
Η διαδικασία αποξίνωσης συντελεί στη δημιουργία μιας ανθεκτικής στο NaCl, gram-θετικής, καταλάση θετικής βακτηριακής κοινότητας, η οποία είναι λιγότερο οξεάντοχη (Montel et al., 2014, Wolfe et.al., 2014). Τα βακτήρια αυξάνονται σε αριθμούς 10^8 – 10^{10} cfu/cm², ξεπερνώντας έτσι τις ζύμες.

2.3. Ο ρόλος των ζυμών στην ωρίμανση των τυριών

Τα τελευταία δέκα χρόνια, έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση στις γνώσεις μας σχετικά με τα διάφορα είδη ζυμών που βρίσκονται στα τυριά. Αυτή η αύξηση στη γνώση μπορεί να αποδοθεί στη χρήση διαφορετικών προσεγγίσεων. Αρκετές μελέτες έχουν συμβάλει σε αυτήν την αυξανόμενη κατανόηση (Irlinger et al., 2015, Montel et al., 2014, Ndoye et al., 2011). Μεταξύ των ειδών ζύμης που απαντώνται συνήθως σε επιφανειακά ώριμα τυριά, δύο ξεχωρίζουν ως τα πιο διαδεδομένα: το *D. hansenii* και το *G. candidum*. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν καταγραφεί έως και 30 διαφορετικά είδη ζύμης στην επιφάνεια του τυριού. Αυτό αποκαλύφθηκε σε μελέτες που διεξήχθησαν από τους Cogan et al. (2014) και Irlinger et al. (2015). Για περαιτέρω διερεύνηση αυτής της ποικιλομορφίας, ο Wolfe et al. (2014) διεξήγαγε μια ολοκληρωμένη μελέτη που ανέλυσε 137 είδη στον φλοιό, τόσο από τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων όσο και μυκήτων από 10 χώρες. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε την ίδια μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) και επιβεβαίωσε την υψηλή συχνότητα και την αφθονία των γενών *Debaryomyces* και *Geotrichum*. Επιπλέον, εντόπισε τα γένη *Yarrowia*, *Trichosporon* και *Kluyveromyces* σε χαμηλότερη συχνότητα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι μελέτες NGS έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν είδη που μπορεί να μην είναι ζωντανά ή καλλιεργούμενα. Για παράδειγμα, η μελέτη του Wolfe et al. (2014) αποκάλυψε μεγαλύτερη συχνότητα του γένους *Candida* από ό,τι είχε αναφερθεί προηγουμένως. Η παρουσία της *Candida* στο τυρί έχει εγείρει ερωτήματα σχετικά με τον πιθανό ρόλο του στα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης με την επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων. Αν και τα είδη *Candida* θεωρούνται επί του παρόντος παθογόνα (Garnier et al., 2017), είναι πιθανό ορισμένα από αυτά τα είδη να έχουν ακόμη μη ανακαλυφθείσες λειτουργίες στη διαδικασία ωρίμανσης.

Μία από τις βασικές συνεισφορές των ζυμών στην ωρίμανση του τυριού είναι η ικανότητά τους να αυξάνουν το pH στην επιφάνεια του τυριού. Αυτή η αύξηση είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού του γαλακτικού οξέος, το οποίο παράγει διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Οι ζύμες συχνά χρησιμοποιούν αμινοξέα ως πηγή ενέργειας όταν εξαντληθεί το γαλακτικό, οδηγώντας στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων αμμωνίας. Επιπλέον, πολλοί ζυμομύκητες εμφανίζουν πρωτεολυτική δράση, η οποία απελευθερώνει αμινοξέα, και μερικές ακόμη εμφανίζουν λιπολυτική δράση (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Ο Wyder

et.al. (1999), μελέτησε την ανάπτυξη ζυμών όπως *Cl. lusitaniae*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica* κ.ά. σε άσηπτη τυρομάζα, μετά από ωρίμανση 7 ημερών στους 25°C (Διάγραμμα 2), ώστε να κατανοηθεί περεταίρω η συμβολή τους στην ωρίμανση των τυριών. Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη συγκεκριμένη επίδραση των ζυμών στην ποιότητα του τυριού, περιγράφονται λεπτομερώς τέσσερα σημαντικά είδη ζύμης. Τρία από αυτά τα είδη, τα *D. hansenii*, *K. marxianus* και *G. candidum*, χρησιμοποιούνται συνήθως ως εμπορικά είδη ζύμης. Ο σημαντικός αντίκτυπός τους στην ποιότητα του τυριού έχει τεκμηριωθεί σε μελέτες των Irlinger et al. (2017) και Lavoie et al. (2012). Αντίθετα, το τέταρτο είδος ζύμης, το *Y. lipolytica*, τυπικά δεν προστίθεται σκόπιμα στα τυριά, όπως τονίζεται από τον Romano et al. (2006).



Διάγραμμα 2: Μέσες καταμετρήσεις ζυμών σε δείγματα 3 τυριών πριν (ημέρα 0) και μετά (ημέρα 7) την επώαση στους 25°C (Wyder et.al., 1999)

2.3.1 *Kluyveromyces marxianus* (αναμορφή: *Candida kefir*)

Η *K. marxianus* απομονώνεται συχνά από γάλατα και τυριά λόγω της ικανότητάς της να χρησιμοποιεί λακτόζη ως πηγή άνθρακα (Belloch et.al., 2011, Lane & Morrissey, 2010). Αυτή η ζύμη, η οποία αναπτύσσεται γρήγορα, είναι θερμοανθεκτική και μπορεί να ευδοκιμήσει σε θερμοκρασίες έως και 42°C (Fonseca et.al., 2008, Tofalo et al., 2014). Ωστόσο, είναι επίσης ικανή να αναπτυχθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Fleet, 2011).

Η *K. marxianus* είναι το κύριο είδος ζύμης που βρίσκεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και είναι υπεύθυνο για τη ζύμωση της λακτόζης, την παραγωγή αιθανόλης και CO₂ (Belloch et al., 2011; Lane & Morrissey, 2010). Η ζύμη μπορεί να μεταβολίσει τη λακτόζη και τη γαλακτόζη μόνο παρουσία έως και 7,5% NaCl, ενώ το γαλακτικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί παρουσία έως και 2,5% NaCl (Tofalo et al., 2014). Η λακτόζη μεταβολίζεται πριν από το γαλακτικό (Cholet et.al., 2007, Leclercq-Perlat et.al., 2012). Ωστόσο, η διαθεσιμότητα λακτόζης και γαλακτόζης στο τυρί είναι περιορισμένη, καθώς υπάρχουν σε μικρές ποσότητες στην αρχή της ωρίμανσης. Η *K. marxianus*, όπως οι περισσότερες ζύμες, είναι ανεκτική σε χαμηλά επίπεδα pH και μπορεί να αναπτυχθεί εντός του εύρους pH 2,5–8,0 (Fleet, 2011).

Τα στελέχη του *K. marxianus* έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ωρίμανση του τυριού μέσω της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δράσης, καθώς και της παραγωγής αρωματικών ενώσεων (Binetti et al., 2013, Cholet et al., 2007, Padilla et.al., 2014). Τα στελέχη παράγουν αιθανόλη και καρβοξυλικά οξέα από τη ζύμωση της λακτόζης και, από αυτά, παράγουν εστέρες (που προσδίδουν φρουτώδη γεύση) και ακεταλδεϋδη. Η ανάπτυξη της *K. marxianus* έχει συσχετιστεί με γεύσεις που είναι όξινες, αλκοολικές, και φρουτώδεις (Belloch et al., 2011).

Η *K. marxianus* προστίθεται συνήθως ή υπάρχει φυσικά σε μπλε τυριά και τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων ή μυκήτων. Το είδος παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της χαρακτηριστικής υφής τέτοιων τυριών λόγω του αερίου που παράγεται κατά την κατανάλωση λακτόζης (Cantor et al., 2017, Leclercq-Perlat et al., 2012). Επιπλέον, η *K. marxianus* βρίσκεται συχνά σε νεαρά ή ελαφρώς ώριμα τυριά (Cardoso et al., 2015, Ceugniez et.al., 2015, Goncalves Dos Santos, et.al., 2017), καθώς και σε τυριά με κίτρινο τύπο φλοιού (Bockelmann, 2011).

2.3.2 *Geotrichum candidum* (τηλεομορφή: *Galactomyces candidus*)

Το *G. candidum* βρίσκεται συνήθως σε ορισμένους τύπους τυριών, όπως το Camembert, το Brie, το Tomme και το Mont d'Or, μεταξύ άλλων, που έχουν λεία και ελαφρώς αφρώδη εμφάνιση (Arteau et.al., 2010, Boutrou & Gueguen, 2005, Ceugniez et al., 2017, Cogan et al., 2014, Dugat-Bony et al., 2016, Gori et al., 2013, Jacques et.al., 2017). Έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας όσον αφορά τη μορφολογία και

τη γενετική του (Boutrou & Guéguen, 2005, Jacques et al., 2017). Το *G. candidum* είναι γνωστό ότι αποικίζει το όριο μεταξύ ζυμών και μυκήτων (Eliskases-Lechner et al., 2011).

Σύμφωνα με μελέτες των Boutrou and Guéguen (2005) και Eliskases-Lechner et al. (2011), το *G. candidum* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα εύρος θερμοκρασίας 5-35°C, με βέλτιστη θερμοκρασία περίπου 25°C. Έχει μεγάλο εύρος pH για ανάπτυξη (3,0-11,0), με βέλτιστο pH περίπου 5,5. Ενώ το *G. candidum* παρατηρείται κυρίως στην επιφάνεια του τυριού, είναι επίσης ικανό να αναπτυχθεί μέσα στο τυρί κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες. Το είδος παρουσιάζει ταχεία ανάπτυξη, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης του τυριού (Lessard et al., 2014). Τα στελέχη *G. candidum* μπορούν να μεταβολίσουν τη γαλακτόζη αλλά όχι τη λακτόζη. Επιπλέον, τα στελέχη που βρίσκονται στο τυρί μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία γαλακτικού οξέος (Dugat-Bony et al., 2015, Lessard et al., 2014). Ωστόσο, το *G. candidum* είναι λιγότερο ανεκτικό στο NaCl σε σύγκριση με το *D. hansenii* και η ανάπτυξή του μπορεί να περιοριστεί με το αλάτισμα, ειδικά σε σκληρά τυριά όπως τα Gruyère και Vorarlberger Bergkäse (Schornsteiner et al., 2014, Wyder & Teuber, 2001).

Η *G. candidum* παρουσιάζει λιπολυτική και πρωτεολυτική δράση, αν και η έκταση αυτών των δραστηριοτήτων ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος (Boutrou & Guéguen, 2005). Οι Dugat-Bony et al. (2015) διεξήγαγαν μεταγραφικές αναλύσεις για να διερευνήσουν τις μεταβολικές δραστηριότητες της μικροβιακής κοινότητας στην επιφάνεια του τυριού. Η μελέτη τους αποκάλυψε ότι το *G. candidum* ήταν το πιο ενεργό είδος που εμπλέκεται στην αποσύνθεση της καζεΐνης και του λίπους. Το είδος απελευθερώνει εξωκυττάρια λιπάσες στο περιβάλλον του (Sacristán et al., 2012), καθιστώντας τη συμβολή του στη λιπόλυση τυριού σημαντική (Lessard et al., 2014). Το πρωτεολυτικό σύστημα της *G. candidum* παρουσιάζει επίσης μεταβλητότητα, ανάλογα με την προέλευση του στελέχους. Τα στελέχη *G. candidum* είναι ικανά να αποικοδομούν την καζεΐνη και τα πεπτιδία, συμπεριλαμβανομένων των πικρών πεπτιδίων, και να καταβάλλουν αμινοξέα, οδηγώντας στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων αμμωνίας (Boutrou & Guéguen, 2005). Η παραγωγή αμμωνίας έχει μεγαλύτερη επιρροή στην αύξηση του pH από την αποσύνθεση του γαλακτικού οξέος (Boutrou & Guéguen, 2005, Lessard et al., 2014). Η παρουσία της *G. candidum* στα τυριά ενισχύει σημαντικά τα χαρακτηριστικά τους αρώματα απελευθερώνοντας ένα ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων όπως δευτεροταγείς αλκοόλες, φαινυλικές ενώσεις, αμμωνία, εστέρες, θειούχες ενώσεις και μεθυλοκετόνες (Arfi et al., 2006, Boutrou & Guéguen, 2005, Eliskases-Lechner et al., 2011). Αυτές οι ενώσεις

συμβάλλουν στην αισθητηριακή εμπειρία των τυριών, παρέχοντάς τους ένα προφίλ ελαφρώς τυρώδους, όξινης και φρουτώδους γεύσης που είναι γενικά αποδεκτό από τους καταναλωτές. Αυτή η έρευνα έχει υποστηριχθεί από μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Boutrou & Guéguen (2005).

2.3.3. *Debaryomyces hansenii* (αναμορφή: *Candida famata*)

Η *D. hansenii* είναι ένα είδος που παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα γενετικής και φαινοτυπικής ποικιλότητας, όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες (Breuer & Harms, 2006, Corbaci et.al., 2012, Padilla et.al., 2014, Petersen & Jespersen, 2004, Romano et al., 2006). Ένα από τα πιο γνωστά χαρακτηριστικά της *D. hansenii* είναι η ικανότητά της να ευδοκιμεί σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, γνωστή ως αλοφιλικότητα (Prista et.al., 2016). Αυτή η προσαρμοστικότητα επιτρέπει στην *D. hansenii* να αποικίζει την επιφάνεια του τυριού, καθιστώντας τη ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη ζύμης που βρίσκονται στην παραγωγή τυριού. Όχι μόνο μπορεί να αναπτυχθεί σε γαλακτικό οξύ και άλλες πηγές άνθρακα, όπως η λακτόζη, αλλά έχει επίσης τη μοναδική ικανότητα να μεταβολίζει ταυτόχρονα και τις δύο ουσίες, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης του τυριού (Mansour et.al., 2008). Για τη διάκριση της ζύμης *D. hansenii* από άλλες ζύμες, ελέγχεται συχνά η ικανότητά της να αναπτύσσεται σε 10% NaCl ή 5% γλυκόζη (Breuer & Harms, 2006). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι η *D. hansenii* μπορεί πραγματικά να ανεχθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις αλατιού, όπως 16% NaCl (Masoud & Jakobsen, 2005) και να επιβιώσει σε περιβάλλοντα με συγκεντρώσεις NaCl που κυμαίνονται από 20-24% (w/w) και ελάχιστες τιμές a_w που κυμαίνονται από 0,79 έως 0,91 (Fleet, 2011, Monnet et al., 2014). Παρά την εντυπωσιακή αυτή ανοχή στο αλάτι, η *D. hansenii* παρουσιάζει κακή ανάπτυξη απουσία οξυγόνου, καθιστώντας απίθανο να ευδοκιμήσει μέσα στο ίδιο το τυρί.

Το είδος εμφανίζει βέλτιστους ρυθμούς ανάπτυξης μεταξύ 20°C και 25°C, αλλά μπορεί επίσης να ανεχθεί ψυχρότερες θερμοκρασίες, όπως 5-10°C (Breuer & Harms, 2006). Επιπλέον, αυτό το είδος παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα pH για ανάπτυξη, που εκτείνεται από 3,0 έως 10,0 (Breuer & Harms, 2006). Ενώ η *D. hansenii* διαθέτει πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση, η ένταση αυτών των δραστηριοτήτων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο στέλεχος, οδηγώντας σε πιθανές παραλλαγές στην υφή και τη γεύση του τυριού (Corbaci et al., 2012, Klein et.al., 2002). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί

ότι άλλα είδη ζύμης, όπως η *Y. lipolytica* και η *K. marxianus*, είναι γενικά πιο πρωτεολυτικά από την *D. hansenii* (Monnet et al., 2014). Επιπλέον, η *D. hansenii* έχει βρεθεί ότι παράγει αλκαλικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της αμμωνίας (Irlinger & Mounier, 2009). Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η *D. hansenii* έχει τη δυνατότητα να συμβάλει στη γεύση του τυριού μέσω της παραγωγής αρωματικών ενώσεων όπως οι αλδεΐδες και οι αλκοόλες, αν και είδη όπως η *G. candidum* και η *Y. lipolytica* μπορεί να έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο από αυτή την άποψη (Padilla et.al., 2014, Sørensen et.al., 2011).

Η *D. hansenii* έχει αναγνωριστεί ως το κυρίαρχο είδος ζύμης στην επιφάνεια διαφόρων τυριών, όπως Asiago, Gruyère, Raclette, Fontina, Munster, τουρκικό τυρί, βραζιλιάνικο τυρί Minas, Limburger, Gubbeen, Epoisses, Saint-Nectaire, Danbo, Pecorino Romano και Vorarlberger Bergkäse (Banjara et.al., 2015, Budak et.al., 2016, Cardoso et al., 2015, Cogan et al., 2014, Corbaci et al., 2012, Dugat-Bony et al., 2016, Gori et al., 2013, Schornsteiner et al., 2014, Tofalo et al., 2014).

2.3.4. *Yarrowia lipolytica* (αναμορφή: *Candida lipolytica*)

Η *Y. lipolytica* είναι ένα είδος ζύμης που μπορεί να αναπτυχθεί σε δύο διαφορετικές μορφές, είτε ως ζύμη είτε ως μυκίλιο, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες εκτίθεται. Ο σχηματισμός μυκιλίου προωθείται από ένα ουδέτερο pH, αλλά μειώνεται καθώς μειώνεται το pH. Είναι ενδιαφέρον ότι είναι το αρχικό pH και όχι το τελικό pH που καθορίζει την έκταση του σχηματισμού μυκιλίου. Επιπλέον, η απουσία οξυγόνου διεγείρει την ανάπτυξη μακρών υφών, αν και αυτό δεν παρατηρείται στην επιφάνεια των τυριών (Coelho et.al., 2010).

Παρά το γεγονός ότι είναι ένα από τα πιο κυρίαρχα είδη ζύμης που απαντώνται στα τυριά, η *Y. lipolytica* δεν προστίθεται σκόπιμα κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού (Groenewald et al., 2014, Irlinger et al., 2017). Βρίσκεται συνήθως σε μπλε τυριά και τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων ή σε νεαρά ή ελαφρώς ώριμα τυριά, όπως τα Tomme d'Orchies, Livarot, Havarti και Milleens (Ceugniez et al., 2015, Cogan et al., 2014, Gkatzionis et al., 2013, Gori et al., 2013, Hermet et al., 2014, Irlinger et al., 2015, Mounier et al., 2005). Αυτό το είδος είναι μοναδικό λόγω της έντονης

λιπολυτικής και πρωτεολυτικής του δράσης, γι' αυτό και υπάρχει συχνά σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ή/και λίπη (Nicaud, 2012). Η *Y. lipolytica* είναι μια αερόβια ζύμη που μπορεί να αναπτυχθεί σε γαλακτικό οξύ αλλά όχι σε λακτόζη ή γαλακτόζη. Ως αποτέλεσμα, βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια του τυριού ή μέσα στα μπλε τυριά. Το είδος είναι γνωστό ότι έχει περιορισμένο εύρος θερμοκρασίας για ανάπτυξη, δεν μπορεί να αναπτυχθεί πάνω από 32°C, μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψύξης (Fleet, 2011), αν και μπορεί να υπάρχουν ορισμένες μεμονωμένες παραλλαγές (Nicaud, 2012).

Η έντονη λιπολυτική και πρωτεολυτική δράση της *Y. lipolytica* την καθιστά σημαντική στην ωρίμανση του τυριού, όπως τονίζεται από τους Groenewald et al. (2014). Κατά τη διαδικασία ωρίμανσης, αυτή η ζύμη παρουσιάζει επίσης μεγάλο ενδιαφέρον επειδή παράγει μεγάλες ποσότητες αρωματικών ενώσεων όπως οργανικά οξέα,θειούχα άλατα, φουράνια και κετόνες μικρού μήκους (Sørensen et al., 2011). Μπορεί να διασπάσει την καζεΐνη, να υδρολύσει τα τριγλυκερίδια, να μετατρέψει τα λιπαρά οξέα σε μεθυλοκετόνες και να μετατρέψει τα αμινοξέα σε αρωματικά θειικά άλατα και αμμωνία (Atanassova et al., 2016, Gkatzionis et al., 2013, Mansour et al., 2008, Mounier et al., 2008, Sørensen et al., 2011). Η *Y. lipolytica* έχει επίσης μέτρια ανοχή στο NaCl (Fleet, 2011). Έχει παρατηρηθεί από τον Mansour et al. (2008) ότι η *Y. lipolytica* διασπά το γαλακτικό οξύ μόνο αφού καταλύσει τα αμινοξέα. Επομένως, η μείωση της οξύτητας στην επιφάνεια του τυριού από αυτή τη ζύμη αποδίδεται κυρίως στην απελευθέρωση αμμωνίας παρά στην αποικοδόμηση του γαλακτικού οξέος (Atanassova et al., 2016, Mounier et al., 2008).

2.4 Αναγνώριση κι εντοπισμός των ζυμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα

2.4.1. Συμβατικές και Μοριακές-Βιολογικές Μεθοδολογίες για τον Προσδιορισμό των Ειδών

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα βασίζονται στην παρατήρηση των μακρο- και μικρο-μορφολογικών χαρακτηριστικών τους και στη μελέτη των φυσιολογικών χαρακτηριστικών τους, όπως ο τρόπος με τον οποίο αναπτύσσονται και μεταβολίζουν υδατάνθρακες και άζωτο (Garnier et al., 2017a). Ωστόσο, αυτά τα φαινοτυπικά

χαρακτηριστικά μπορεί να ποικίλλουν πολύ, καθιστώντας δύσκολη την ακριβή αναγνώριση διαφορετικών ειδών ζύμης. Για να ξεπεραστεί αυτή η πρόκληση, οι παραδοσιακές τεχνικές καλλιέργειας συχνά συνδυάζονται με μοριακές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων ειδών ζύμης που υπάρχουν σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και περιβάλλοντα παραγωγής (Geronikou et.al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση συγκεκριμένων τεχνικών φαινοτυπικής ταυτοποίησης για την γρήγορη και οικονομικά αποδοτική αναγνώριση των στελεχών ζύμης που σχετίζονται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Δύο τέτοιες τεχνικές είναι η φασματομετρία μάζας ιονισμού με λέιζερ (MALDI-TOF MS) και η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Το MALDI-TOF MS δημιουργεί φασματικά προφίλ με βάση τα πρωτεϊνικά συστατικά που υπάρχουν στα κύτταρα των ζυμών. Με την αποδόμηση συγκεκριμένων πεπτιδίων και πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια (Pinto et al., 2011, Chalupová et al., 2014), αυτή η μέθοδος μπορεί να αναγνωρίσει με επιτυχία είδη ζύμης που βρίσκονται σε γιαούρτια και τυριά (Kacáňiová et al., 2018, Halil Kılıç, 2019). Η FTIR ανιχνεύει λειτουργικές βιοχημικές ομάδες απευθείας από άθικτα κύτταρα, παράγοντας μοναδικά φασματικά «δακτυλικά αποτυπώματα» για κάθε είδος ζύμης (Wenning et al., 2002, Büchl et al., 2008, Patel, 2019). Ωστόσο, η FTIR απαιτεί μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων αναφοράς και είναι ευαίσθητο στις συνθήκες ανάπτυξης και στη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο ακριβή προσδιορισμό των ζυμών (Colabella et al., 2017).

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός παραδοσιακών τεχνικών καλλιέργειας με μοριακές προσεγγίσεις και η χρήση ειδικών τεχνικών φαινοτυπικής ταυτοποίησης όπως το MALDI-TOF MS και το FTIR έχουν βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της αναγνώρισης ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

2.4.2. Μοριακές-Βιολογικές Μεθοδολογίες για τον Προσδιορισμό σε Επίπεδο Γένους

Η αναγνώριση του γένους είναι ένα κρίσιμο βήμα για την ανίχνευση των "hot spots" ζυμών στη γαλακτοκομική παραγωγή, για την πρόληψη της μόλυνσης και τη διασφάλιση

της παρατεταμένης διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού DNA είναι η ηλεκτροφόρηση παλμικού υψηλού πεδίου (PFGE), η οποία αξιολογεί την ποικιλομορφία των χρωμοσωμάτων και τον πολυμορφισμό του μήκους τους (Miller, 2013, Lopez-Canovas et al., 2019). Μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα του PFGE στη διαφοροποίηση των στελεχών *D. hansenii* από Δανικά τυριά (Petersen and Jespersen, 2004), των στελεχών *K. marxianus* (Fasoli et al., 2015, Naumova et al., 2017) και *S. cerevisiae* (Hage and Houseley, 2013).

Άλλες τεχνικές προσδιορισμού γονοτύπου, βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κατά μήκος του χρωμοσώματος (Lopandic et al., 2006, Gori et al., 2013).

Η ανάλυση πολυμορφισμού περιορισμένου μήκους (RFLP) του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) είναι μια άλλη ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αναγνώριση των ζυμών. Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην τυποποίηση των γενών *D. hansenii*, που απομονώθηκαν από τα αγελαδινά τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μικροοργανισμών τύπου Danbo (Petersen et al., 2002), καθώς και για τον χαρακτηρισμό των ζυμών *D. hansenii*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *M. guilliermondii*, *Y. lipolytica*, *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon domesticum* και *Candida* spp., σε τυριά από αιγοπρόβριο γάλα (Padilla et al., 2014).

2.4.3 Νέες τεχνολογίες "Omics"

Τα τελευταία χρόνια, έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις στον προσδιορισμό αλληλούχησης DNA επόμενης γενιάς (NGS) και στα εργαλεία βιοπληροφορικής, τα οποία έχουν υιοθετηθεί ευρέως στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτές οι τεχνολογικές εξελίξεις επέτρεψαν στους ερευνητές να αποκτήσουν μια βαθύτερη κατανόηση της ποικιλομορφίας και των αλληλεπιδράσεων στις μικροβιακές κοινότητες που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι τεχνολογίες NGS έχουν φέρει επανάσταση στον τομέα, επιτρέποντας τον υψηλό ρυθμό αλληλούχησης του συνολικού μικροβιακού DNA ή RNA χωρίς την ανάγκη προηγούμενης καλλιέργειας (Kumar et al. (2019). Αυτό ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο σε μελέτες γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου οι ερευνητές συχνά στοχεύουν συγκεκριμένα γονίδια, όπως το γονίδιο 16S rRNA για τα

οξυγαλακτικά βακτήρια και τα γονίδια 26S rRNA ή ITS για τις ζύμες. Ειδικά η τεχνολογία NGS Illumina χρησιμοποιείται για την εξέταση της οικολογίας και της δυναμικής των μικροβίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Jatmiko et al., 2019, Sessou et al., 2019).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Bertuzzi et al. (2018), χρησιμοποιήθηκε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος για τη διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού σε τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτή η μελέτη είχε ως στόχο να αναλύσει τη σχέση μεταξύ συγκεκριμένων μεταγονιδιακών τμημάτων και παραλλαγών στο pH, το χρώμα και την ανάπτυξη γεύσης. Μέσω της ανάλυσης συσχέτισης, οι ερευνητές μπόρεσαν να εντοπίσουν μικροοργανισμούς που συνδέονταν ανεξάρτητα με ορισμένες αρωματικές ιδιότητες στην επιφάνεια του τυριού. Για παράδειγμα, η ζύμη *D. hansenii* βρέθηκε να συνδέεται με την παραγωγή αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων, ενώ η ζύμη *G. candidum* συνδέθηκε με θεικές ενώσεις (Bertuzzi et al., 2018).

3. Η παρουσία των ζυμών στις διάφορες κατηγορίες τυριών

3.1. Σκληρά τυριά

Είναι ένα είδος τυριού που έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, συνήθως λιγότερο από 40%, και τυπικά ωριμάζει για αρκετούς μήνες, μερικές φορές έως και 30 μήνες. Είναι γνωστά για την χαρακτηριστική υφή και την έντονη γεύση τους. Για να επιτευχθεί η επιθυμητή οξύτητα, χρησιμοποιούνται φυσικές καλλιέργειες που περιέχουν είτε θερμόφιλα είτε μεσόφιλα στελέχη βακτηρίων και η πυτιά που χρησιμοποιείται στη διαδικασία τυροκομίας θερμαίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες (Bintsis and Papademas, 2018).

Σε μια μελέτη των Fleet και Mian (1987), διαπιστώθηκε ότι τα αυστραλιανά τυριά Cheddar είχαν πληθυσμούς ζυμών που κυμαίνονταν από 10^4 – 10^6 cfu/g (Πίνακας 2). Ομοίως, οι Welthagen και Vijoen (1996) ανέφεραν πληθυσμούς ζυμών στα τυριά Cheddar της Νότιας Αφρικής που κυμαίνονταν από 10^2 έως 10^7 cfu/g (Πίνακας 2). Είναι ενδιαφέρον ότι το 88% αυτών των τυριών είχαν πληθυσμούς ζυμών 10^5 cfu/g, που θεωρείται το ελάχιστο επίπεδο που απαιτείται για την ανάπτυξη γεύσης. Κατά τη

διαδικασία ωρίμανσης, η πυκνότητα του πληθυσμού ζυμών αυξήθηκε από 10^2 σε 10^3 cfu/g τις πρώτες 30 ημέρες, στη συνέχεια αυξήθηκε περαιτέρω σε 10^6 cfu/g, πριν τελικά μειωθεί ξανά προς το τέλος της ωρίμανσης (Welthagen and Viljoen, 1996).

Το Pecorino di Farindola, ένα σκληρό ιταλικό τυρί που παρασκευάζεται από μη παστεριωμένο γάλα που προέρχεται από ντόπιους αγρότες, μελετήθηκε από τους Tofalo et al. (2014). Στην έρευνά τους, εξέτασαν τις κοινότητες ζυμών που υπάρχουν κατά τη διάρκεια των διαδικασιών τυροκομίας και ωρίμανσης. Ο πληθυσμός των ζυμών στο Pecorino di Farindola κυμαινόταν από 10^5 cfu/g τη στιγμή της πώλησης έως 10^4 cfu/g για το ώριμο τυρί. Παρόμοιοι πληθυσμοί ζυμών έχουν αναφερθεί για το Pecorino Crotonese (Wolfe et al. 2014). Μέσω τεχνικών μοριακής ταυτοποίησης σε συνδυασμό με PCR-RFLP, προσδιορίστηκε ότι το *K. marxianus* ήταν το κυρίαρχο είδος ζύμης. Άλλα είδη ζυμών, όπως τα *Pichia kudriavzevii*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* και *Candida zeylanoides* (Πίνακας 2), παρατηρήθηκαν μόνο κατά τα πρώτα στάδια ωρίμανσης (Capece and Romano 2009, Cosentino et al., 2001, Fadda et al., 2001).

3.2. Ημίσκληρα τυριά

Είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα τυριών που ποικίλλουν ως προς τα χαρακτηριστικά τους. Τα ημίσκληρα τυριά έχουν συνήθως περιεκτικότητα σε υγρασία που κυμαίνεται από 44% έως 55%. Ορισμένα ημίσκληρα τυριά, όπως το τυρί Gouda, μπορούν να ανήκουν σε πολλές κατηγορίες τυριών, όπως τα τυριά ολλανδικού τύπου. Αυτά τα τυριά μπορούν να καταναλωθούν ως ημίσκληρα ή να αφεθούν να ωριμάσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να γίνουν σκληρά τυριά (Bintsis and Papademas, 2018).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Dolci et al. (2009), διερευνήθηκε η εξέλιξη της μικροχλωρίδας στο ημίσκληρο τυρί Fontina ΠΟΠ. Σε διάστημα 28 ημερών, ο αριθμός των ζυμών στο τυρί αυξήθηκε από 10^3 έως 10^6 cfu/g (Πίνακας 2). Αυτή η αύξηση συνοδεύτηκε από αύξηση του pH στην επιφάνεια του τυριού και αύξηση του αριθμού των αλόφιλων βακτηρίων, που έφτασε τα 10^9 cfu/g. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης, τα είδη που βρέθηκαν πιο συχνά ήταν το *D. hansenii* και το *Candida sake*.

Τα τυριά Gouda ολλανδικού τύπου, που ανήκουν στην κατηγορία των ημίσκληρων τυριών, είναι γνωστά για τις οπές οι οποίες δημιουργούνται από το CO₂ που παράγεται από τη ζύμωση του κίτρικου οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η ανάπτυξη των

ζυμών στο τυρί Gouda παρατηρήθηκε να είναι πιο αργή σε σύγκριση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με αύξηση από 10^2 cfu/g έως 10^5 cfu/g. Η εξάντληση της λακτόζης είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των τυριών ολλανδικού τύπου, και η αύξηση των ζυμών εμφανίζεται μετά την εξάντληση της λακτόζης. Εντοπίζονται είδη όπως *Candida catenulata*, *C. laurentii*, *C. zeylanoides*, *C. albidus*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta*, *S. cerevisiae*, *S. roseus*, *T. delbrueckii*, *T. beigellii* και *Y. lipolytica* (Πίνακας 2), (Welthagen and Viljoen 1998).

3.3. Μαλακά τυριά

Τα μαλακά τυριά είναι μια κατηγορία τυριών που έχουν απαλή και λεία υφή και μερικά από αυτά μπορούν ακόμη και να αλείφονται. Πήζουν χρησιμοποιώντας είτε πυτιά είτε οξύ, καθώς το γάλα πήζει όταν το pH του φτάσει στο 4,6 λόγω του οξέος. Τα μαλακά τυριά έχουν γενικά υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, συνήθως μεγαλύτερη από 55%. Η οξύτητα σε αυτά τα τυριά μπορεί να προκύψει φυσικά από τυχαία βακτήρια που υπάρχουν στο γάλα ή μπορεί να προστεθεί σκόπιμα. Ανάλογα με τον τύπο, ορισμένα μαλακά τυριά απολαμβάνονται φρέσκα, ενώ άλλα αφήνονται να ωριμάσουν για μια περίοδο από 5 έως 60 ημέρες (Bintsis and Papademas, 2018).

Τα τυριά τυρογάλακτος είναι ένα άλλο είδος μαλακού τυριού που ανήκει στη δική του ξεχωριστή κατηγορία. Διάφορα είδη ζύμης έχουν παρατηρηθεί στα τυριά τυρογάλακτος, με τα *D. hansenii* και *Pichia membranaefaciens* να είναι τα πιο διαδεδομένα. Άλλα είδη ζύμης που απαντώνται συνήθως περιλαμβάνουν τα *T. delbrueckii*, *Pichia farinosa*, *Candida mogii*, *Candida intermedia*, *Zygosaccharomyces rouxii* και *S. cerevisiae* (Lioliou et al., 2001)

Η Μοτσαρέλα, από την άλλη πλευρά, είναι ένα συγκεκριμένο είδος μαλακού τυριού γνωστό ως τυρί pasta-filata. Σύμφωνα με τον Romano et al. (2001), ο αριθμός και οι είδη των ζυμών στα διάφορα τυριά ποικίλλουν, και υπάρχουν συγκεκριμένα είδη ζυμών που υπάρχουν σε διαφορετικά τυριά μπορεί να ποικίλλουν και ορισμένες ζύμες εντοπίζονται συχνότερα από άλλες. Για παράδειγμα, η ζύμη *S. cerevisiae* η οποία είναι ικανή να ζυμώνει τη γαλακτόζη, βρίσκεται συχνά στα τυριά pasta-filata. Μια πρόσφατη μελέτη επικεντρώθηκε στον εντοπισμό ειδών ζύμης που ζυμώνουν τη λακτόζη και/ή τη γαλακτόζη προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος τους στις λειτουργικές και

αισθητικές ιδιότητες της Μοτσαρέλα. Η κυριαρχία ζυμών, όπως ο *K. marxianus* και ο *S. cerevisiae*, υποδηλώνει ότι αυτές οι ζύμες συμβάλλουν στην ανάπτυξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών του τυριού (Aronte et al., 2010).

3.4. Λευκά τυριά άλμης

Τα λευκά τυριά άλμης είναι ένα μοναδικό είδος τυριού που υφίσταται μια συγκεκριμένη διαδικασία ωρίμανσης σε άλμη πριν να είναι έτοιμα για κατανάλωση. Είναι μαλακά, ημιμαλακά ή ημίσκληρα τυριά και έχουν μακρά ιστορία παραγωγής στα Βαλκάνια, τη Μέση Ανατολή και τις γειτονικές περιοχές. Παραδοσιακά, τα λευκά τυριά άλμης παράγονται με πρόβειο, κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα, το οποίο τους δίνει το χαρακτηριστικό λευκό χρώμα τους. Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει τη χρήση μεσόφιλων ή θερμόφιλων καλλιεργείων εκκίνησης, και ενώ ορισμένες ποικιλίες ψήνονται (π.χ., η Σφέλα και το Χαλούμι), η πλειονότητά τους όχι. Το βασικό βήμα στη διαδικασία παρασκευής αυτών των τυριών είναι η διαδικασία ωρίμανσης, η οποία συμβαίνει ενώ το τυρί βυθίζεται σε άλμη (Bintsis and Papademas, 2018). Σε πρόσφατη μελέτη, ο Rantsiou et. al. (2008), εξέτασε την χλωρίδας τεσσάρων τυριών Φέτας, παρασκευασμένα από διάφορους Έλληνες κατασκευαστές και βρήκαν είδη ζύμης όπως η *S. cerevisiae*, η *D. hansenii*, η *C. famata*, η *P. membranifaciens*, η *T. delbrueckii*, η *K. marxianus*, η *Candida sake* και η *K. lactis* (Rantsiou et. al., 2008). Εκτενέστερη αναφορά στην Φέτα γίνεται σε επόμενο κεφάλαιο.

3.4.1 Σημαντικά Γένη Ζυμών που Εμφανίζονται σε Λευκά Τυριά Άλμης

Ανάλογα με τον τύπο των λευκών τυριών άλμης, οι ζύμες μπορούν να αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα τυριά που υφίστανται ωρίμανση με επιφανειακή ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπου οι μικροοργανισμοί στην επιφάνεια επηρεάζουν θετικά τη γεύση και την υφή του τυριού χωρίς να διακυβεύεται η ποιότητά του (Bintsis et. al., 2000). Ζύμες από διάφορα γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon* και *Yarrowia* έχουν συχνά αναφερθεί σε λευκά τυριά άλμης (Rantsiou et. al, 2008, Golić et. al., 2013, Cardoso et. al., 2015, Šuranská et. al., 2016, Karasu-Yalcin et. al., 2017). Ωστόσο, συχνά λείπουν λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά

με την ταξινόμηση, τα χαρακτηριστικά και τη δυνατότητα αλλοίωσης αυτών των ζυμών. Μεταξύ αυτών των ειδών, η *D. hansenii* είναι η πιο συχνά απομονωμένη ζύμη από το περιβάλλον του τυριού, πιθανώς λόγω της αλόφιλης φύσης της και της συσχέτισής της με το αλάτι τυριού (Haastруп κ.ά., 2018). Ένας λόγος για την έλλειψη ερευνών βρίσκεται στον εκτεταμένο αριθμό των χειροποίητων προϊόντων, τα οποία παράγονται παραδοσιακά με διάφορες τεχνολογίες παραγωγής σε όλο τον κόσμο. Η εξάπλωση των ζυμών μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των γαλακτοκομείων λόγω διαφορών στις πρώτες ύλες, τις πρακτικές παστερίωσης, τη θερμοκρασία και τον χρόνο ρύθμισης, τις συνθήκες αλατίσματος και τη συγκέντρωση αλατιού, τη θερμοκρασία ωρίμανσης και την περίοδο αποθήκευσης και τα πρότυπα υγιεινής κατά την τυροκομία (Hayaloglu, 2017).

Το Χαλούμι είναι ένα παραδοσιακό λευκό τυρί άλμης, που παράγεται κυρίως στην Κύπρο ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) που ελέγχεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (European Commission, 2015). Συνήθως κατασκευάζεται από παστεριωμένο πρόβειο ή αίγιο γάλα, αν και μπορεί να προστεθεί και αγελαδινό γάλα (Kamilari et. al., 2020). Οι *Candida spp.*, *P. membranifaciens* και *D. hansenii* είναι οι πιο συχνά απομονωμένες ζύμες από το τυρί Χαλούμι σε υψηλές ποσότητες (έως 10^5 CFU/g) (Πίνακας 2) (Mehyar et. al., 2018).

Ο Τελεμές είναι ένα άλλο παραδοσιακό ελληνικό τυρί που παρασκευάζεται από μη παστεριωμένο γάλα αλλά πλέον παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιώντας στρεπτόκοκκους γιαουρτιού του εμπορίου (Pappa et. al., 2006). Οι Laslo και György (2018) ανέφεραν υψηλούς συνολικούς αριθμούς ζυμών στον Τελεμέ, με επίπεδα που φτάνουν τα 8×10^3 CFU/g (Πίνακας 2).

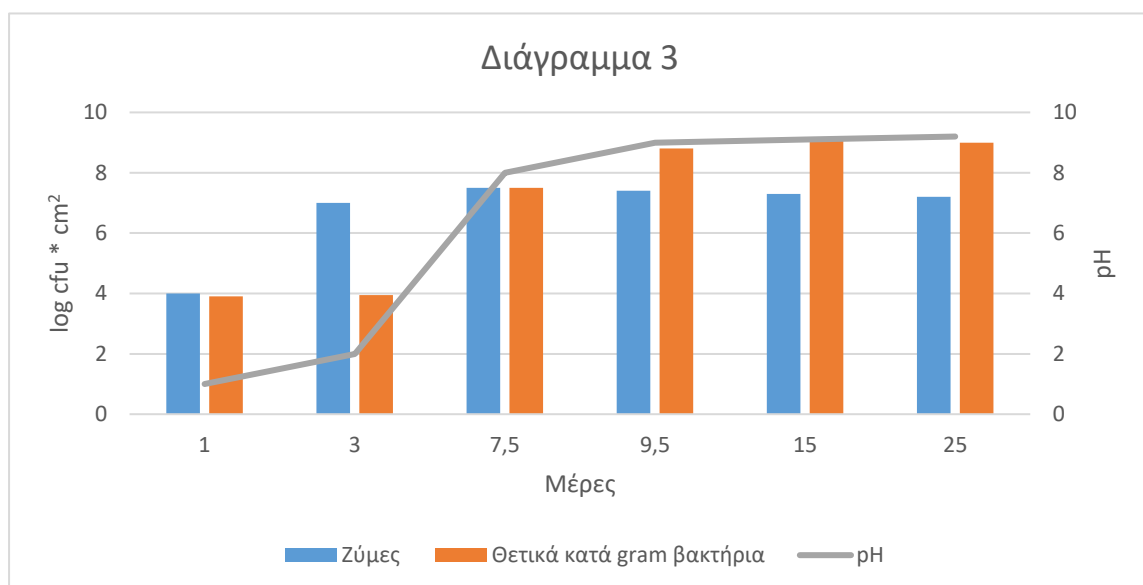
Το Domiati είναι ένα άλλο τυρί άλμης. Είναι λιγότερο αλμυρό όταν είναι φρέσκο και αποθηκεύεται για μερικές εβδομάδες στο ψυγείο, αλλά γίνεται πολύ αλμυρό όταν ωριμάσει και αποθηκεύεται για μερικούς μήνες σε άλμη (El Sharoud et al., 2009). Οι ζύμες που απομονώνονται από το τυρί Domiati περιλαμβάνουν τις *I. orientalis*, *Candida albicans*, *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*), *Kodamaea ohmeri* (*Pichia ohmeri*), *K. marxianus* και *Candida catenulata*. Συνολικά οι μετρήσεις ζυμών στο τυρί Domiati ήταν μεταξύ 10^3 cfu/g και 10^5 cfu/g (Πίνακας 2) (Bintsis and Papademas, 2002).

Η *C. arbicans* απομονώθηκε από φρέσκο Domiati. Τα *C. arbicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* και *Candida guilliermondii*, γνωστά και ως τα πιο κοινά μολυσματικά είδη ζυμών, είναι ευκαιριακά παθογόνα (Jacques and Casaregola, 2008, Kauffman, 2006).

Ωστόσο, αυτά τα είδη δεν απαντώνται σε ώριμο τυρί, βρίσκονται μόνο σε φρέσκα τυριά (Seiler and Busse, 1990) και πιθανόν να μην επιβιώνουν κατά την διαδικασία ωρίμανσης (Jacques and Casaregola, 2008).

3.5 Τυριά που ωριμάζουν με ανάπτυξη μυκήτων

Τα τυριά που υφίστανται τη διαδικασία ωρίμανσης με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων έχουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό : την ανάπτυξη του *Penicillium camemberti* στην επιφάνεια του τυριού, με αποτέλεσμα την απαλή υφή του. Αρχικά, κατά την πρώτη φάση ωρίμανσης, το pH του τυριού είναι κάτω από 5,8 λόγω της δράσης ενός μεσόφιλου εκκινητή. Σε αυτό το στάδιο, μόνο ζύμες όπως οι *D. hansenii*, *K. lactis*, *G. candidum*, μαζί με *P. camemberti*, συμβάλλουν στην αύξηση του pH καταναλώνοντας γαλακτικό οξύ για τη δική τους ανάπτυξη (Spinnler and Leclercq, 2007). Προχωρώντας στη δεύτερη φάση, μικροοργανισμοί που έχουν προσαρμοστεί στην υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι του τυριού, όπως οι σταφυλόκοκκοι, αρχίζουν να αναπτύσσονται και συμβάλλουν στη διαδικασία ωρίμανσης (Bintsis and Papademas, 2018). Η διαδοχή των ζυμών από τα βακτήρια υπεύθυνα για την ολοκλήρωση της ωρίμανσης, παρουσιάζεται αναλυτικά στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Διαδοχή ζυμών και βακτηρίων στην επιφάνεια τυριού που ωριμάζει με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων και η αλλαγή του pH (Frohlich-Wyder et al, 2003).

Σύμφωνα με τον Bintsis (2021), οι κύριες ζύμες που βρίσκονται συνήθως σε τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων, περιλαμβάνουν τις *D. hansenii*, *K. lactis*, *K. marxianus* και *G. candidum*. Περιστασιακά, μπορεί να υπάρχουν και άλλα είδη όπως *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* και είδη *Candida*. Τα *K. lactis* και *K. marxianus* είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της υπολειπόμενης λακτόζης αρχικά, ακολουθούμενα από το *D. hansenii* και άλλες ζύμες που μεταβάλλουν την οξύτητα μόλις εξαντληθεί η λακτόζη. Κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε ημερών, το pH των τυριών που έχουν ωριμάσει με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων αυξάνεται αργά, αλλά η ανάπτυξη του *P. camemberti* προκαλεί ταχεία αύξηση του επιφανειακού pH. Σε λιγότερο από δύο ημέρες, το pH αυξάνεται από λιγότερο από 5 σε 7,5. Η επιφάνεια του τυριού Camembert έχει βρεθεί να περιέχει αριθμούς ζύμης 10^6 cfu/g (Πίνακας 2) (Roostista and Fleet, 1996) με τα πιο κυρίαρχα είδη να είναι τα *D. hansenii*, *Candida catenulata*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. intermedia*, *S. cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, και *K. marxianus*. Σε μια άλλη μελέτη, οι πληθυσμοί ζύμης των τυριών Camembert και Brie αναλύθηκαν για να προσδιοριστεί η εποχιακή ποικιλομορφία των ζυμών (Viljoen et. al., 2003). Τα *D. hansenii* και *Y. lipolytica* βρέθηκαν να είναι τα πιο κυρίαρχα είδη ζύμης και στα δύο είδη τυριών, μαζί με τα *T. delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* και διάφορα είδη *Candida*.

Μια έρευνα που διεξήχθη από τους Addis et al. (2001), επικεντρώθηκε στην παρακολούθηση της ανάπτυξης ζυμών και βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του Αυστραλιανού τυριού Camembert. Ανάλογα με τον κατασκευαστή, οι αριθμοί των ζυμών έφτασαν στα 10^5 – 10^9 cfu/g (Πίνακας 2) κατά την ωρίμανση. Το *D. hansenii* ήταν το κυρίαρχο είδος, με την παρουσία και του *Y. lipolytica*. Η μελέτη εξέτασε επίσης τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων ζυμών και βακτηρίων (Addis et al., 2001). Μια άλλη μελέτη του Chen et. al. (2010) διερεύνησε την επίδραση επιλεγμένων στελεχών ζυμών σε τυριά τύπου Camembert. Ο πληθυσμός των ζυμών παρουσίασε εκθετική ανάπτυξη αρχικά, η οποία στη συνέχεια επιβραδύνθηκε σε μέτριο ρυθμό κατά την ωρίμανση. Τα ευρήματα έδειξαν ότι τα επιλεγμένα στελέχη είχαν σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα και την αναλογία των ελεύθερων αμινοξέων, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη γεύσης.

3.6 “Μπλε τυριά”

Τα μπλε τυριά είναι γνωστά για τον ευδιάκριτο μπλε χρωματισμό τους, ο οποίος προκαλείται από την παρουσία του *Penicillium roqueforti*. Αυτός ο μύκητας αναπτύσσεται μέσα στο τυρί και του δίνει έντονο άρωμα. Αυτό το άρωμα είναι αποτέλεσμα της εκτεταμένης λιπόλυσης, όπου τα λίπη διασπώνται, και της παρουσίας N-μεθυλοκετόνων, οι οποίες παράγονται από λιπαρά οξέα (Bintsis and Papademas, 2018).

Οι ερευνητές μελέτησαν τη μικροχλωρίδα των ζυμών που βρίσκονται στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του Rokrol, ένα είδος μπλε τυριού από την Πολωνία. Ανακάλυψαν ότι οι πληθυσμοί ζυμών στην επιφάνεια του τυριού κυμαίνονταν από 10^5 έως 10^9 cfu/g (Πίνακας 2). Ωστόσο, οι πληθυσμοί ζυμών μέσα στο τυρί ήταν 10 έως 100 φορές χαμηλότεροι, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Τα πιο συχνά απομονωμένα είδη ζύμης ήταν τα *C. famata* και *C. spherica*, ακολουθούμενα από τα *C. intermedia* και *Geotrichum* ssp. Περιστασιακά, βρέθηκαν και άλλα είδη όπως *Saccharomyces kluyveri*, *C. kefir* και *C. lipolytica* (Gkatzionis et al., 2014).

Ένα είδος ζύμης που αναφέρεται συχνά στα μπλε τυριά είναι το *D. hansenii* (Addis et. al., 2001, Mounier et. al., 2008, Besançon et. al., 1992). Έχει παρατηρηθεί ότι προάγει την ανάπτυξη και τη σπορογονία των στελεχών του *P. roqueforti* στο μπλε τυρί (Van den Tempel and Jakobsen, 2000). Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο είναι ειδικό για ορισμένα στελέχη και το *D. hansenii* έχει αναγνωριστεί ως το κυρίαρχο είδος ζύμης τόσο στα καλά όσο και στα αλλοιωμένα μπλε τυριά (Van den Tempel and Jakobsen, 2000).

3.7 Τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων

Τα τυριά που υφίστανται ωρίμανση μέσω της ανάπτυξης βακτηρίων στην επιφάνειά τους διακρίνονται από την παρουσία μιας συγκεκριμένης βακτηριακής κοινότητας στο εξωτερικό στρώμα του τυριού. Μετά την πήξη του γάλακτος με πυτιά, μια ποικιλία ζυμών αρχίζει να πολλαπλασιάζεται στην επιφάνεια του τυριού. Αυτές οι ζύμες διασπούν το υπόλοιπο γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και νερού, το οποίο προκαλεί αύξηση του επιπέδου του pH. Επιπλέον, μπορεί να συμβεί απαμίνωση αμινοξέων και δημιουργία αμμωνίας. Κατά συνέπεια, αναπτύσσεται μια πολύπλοκη βακτηριακή κοινότητα, ενώ οι ζύμες δημιουργούν ενώσεις που προάγουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Αυτή η κοινότητα περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους κορυνοβακτηρίων (όπως *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp. και *Brevibacterium*

spp.), μικρόκοκκους και σταφυλόκοκκους. Μερικοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα που βρίσκεται στα ώριμα τυριά λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων στην επιφάνεια (Bintsis and Papademas, 2018, McSweeney, 2007). Οι κυρίαρχες ζύμες που απαντώνται τυπικά σε τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων περιλαμβάνουν τις *D. hansenii*, *Candida spp.*, *Trichosporon spp.*, *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Torulaspora spp.* και *G. candidum* (Scheehan, 2007).

Η παραγωγή τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων βασίζεται στην ανάπτυξη μιας ποικιλίας βακτηρίων και ζυμών στην επιφάνεια του τυριού. Αυτοί οι μικροοργανισμοί προέρχονται συχνά από το τυροκομείο, με αποτέλεσμα να δημιουργούν ενδιαφέροντες και περίπλοκους συσχετισμούς (Goerges et al., 2008). Αν και τα εμπορικά στελέχη χρησιμοποιούνται συνήθως, δεν είναι αρκετά σαφές εάν αυτά τα στελέχη μπορούν να εγκατασταθούν με επιτυχία στην ανθεκτική μικροβιακή χλωρίδα. Ο Goerges et. al. διεξήγαγε μια μελέτη για την προσθήκη καλλιιεργειών στο τυρί Limburger. Το τυρί ενισχύθηκε με καλλιέργεια που περιείχε *D. hansenii*, *G. Geotrichum*, *Arthrobacter arilaitensis* και *Brevibacterium aurantiacum* (Goerges et al., 2008). Ενώ ορισμένες ζύμες εντοπίστηκαν στην καλλιέργεια, οι βακτηριακές καλλιέργειες δεν μπορούσαν να απομονωθούν από την επιφάνεια του τυριού. Ως αποτέλεσμα, ο Goerges et al. κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κανένα από τα βακτηριακά στελέχη δεν ήταν σε θέση να ανταγωνιστεί σημαντικά την υπάρχουσα μικροχλωρίδα (Goerges et al., 2008).

Πίνακας 2. Συγκριτικός πίνακας φυσιολογικών επιπέδων συνολικών ζυμών σε διάφορα τυριά και οι συνηθέστερες ζύμες που εντοπίζονται σε αυτά.

Προϊόν	Συνήθεις ζύμες	Αριθμοί ζυμών - Φυσιολογικά επίπεδα
Φρέσκο γάλα	<i>Kluyveromyces sp.</i> , <i>G. candidum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>Pichia sp.</i>	10 ¹ έως 10 ³ cfu/mL
Αλμη	<i>Debaryomyces</i> , <i>Yamadazyma triangularis</i> , <i>Sterigmatomyces halophilus</i>	10 ³ -10 ⁹ cfu/mL
Τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μικροοργανισμών (βακτηρίων/μυκήτων)	<i>D. hansenii</i> , <i>G. Candidum</i> , <i>Yarrowia</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Kluyveromyces</i>	10 ⁶ -10 ⁸ cfu/cm ²
Αυστραλιανά τυριά Cheddar	(δεν υπάρχουν στοιχεία)	10 ⁴ –10 ⁶ cfu/g
Νοτιοαφρικανικά τυριά Cheddar Pecorino di Farindola	(δεν υπάρχουν στοιχεία)	από 10 ² έως >10 ⁷ cfu/g
	<i>K. marxianus</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida glabrosa</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	10 ⁴ cfu/g έως 10 ⁵ cfu/g
Fontina	<i>D. hansenii</i> , <i>Candida sake</i>	10 ³ έως 10 ⁶ cfu/g
Ολλανδικού τύπου τυριά Gouda	<i>Candida catenulata</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. albidus</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. minuta</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. roseus</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>T. Beigellii</i> , <i>Y. lipolytica</i>	10 ² cfu/g έως 10 ⁵ cfu/g
Domiat	<i>I. orientalis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> (<i>Candida lusitaniae</i>), <i>Kodamaea ohmeri</i> (<i>Pichia ohmeri</i>), <i>K. marxianus</i> , <i>Candida catenulata</i>	10 ³ cfu/g έως 10 ⁵ cfu/g
Camembert	<i>D. hansenii</i> , <i>Candida catenulata</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>K. marxianus</i>	10 ⁶ cfu/g
Αυστραλιανό τυρί Camembert Rokpol (επιφάνεια)	<i>D. hansenii</i> , <i>Y. lipolytica</i>	10 ⁵ –10 ⁹ cfu/g
	<i>C. famata</i> , <i>C. spherica</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>Geotrichum ssp</i> , <i>Saccharomyces kluyveri</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. lipolytica</i>	10 ⁵ –10 ⁹ cfu/g
Χαλούμι	<i>Candida spp.</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>D. hansenii</i>	έως 10 ⁵ CFU/g
Τελεμές	(δεν υπάρχουν στοιχεία)	έως 8 × 10 ³ CFU/g

4. Οι Ζύμες ως αλλοιωτικοί οργανισμοί

Έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες μελέτες για τη διερεύνηση της επίδρασης των ζυμών στην αλλοίωση των τροφίμων και των ποτών γενικότερα. Αυτές οι μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν από τους Deák (2008), Fleet (2011), Stratford (2006) και Garnier et al. (2017), έχουν ρίξει φως στον ρόλο των ζυμών στην αλλοίωση των τροφίμων, ειδικά σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το τυρί. Ωστόσο, ο εντοπισμός της αλλοίωσης του τυριού δεν είναι πάντα εύκολη υπόθεση. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η ανάπτυξη του *D. hansenii* μπορεί να ξεπεράσει το *Y. lipolytica*, με αποτέλεσμα αλλαγές στην εμφάνιση και τις αισθητικές ιδιότητες του τυριού, ενώ δεν επηρεάζει απαραίτητα τη συνολική του ποιότητα. Ομοίως, ορισμένες ζύμες όπως το *K. marxianus* συμβάλλουν στον επιθυμητό σχηματισμό κοιλοτήτων στα μπλε τυριά, τα οποία θεωρούνται ελαττώματα σε άλλα είδη τυριών. Όταν ένα τυρί αποτυγχάνει να ανταποκριθεί στις προσδοκίες των καταναλωτών όσον αφορά την εμφάνιση ή τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη ποικιλία του, θεωρείται ότι έχει χαλάσει. Αυτό τονίζει τη σημασία της αξιολόγησης της ποιότητας του τυριού πέρα από τη φυσική του εμφάνιση και μόνο (Fleet, 2011). Η έρευνα της Geronikou et.al. (2020) δίνει φως στις ζύμες εκείνες που είναι επιβλαβείς για τα τυριά άλμης, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Παρατηρείται ότι ζύμες όπως *Candida sphaerica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* κ.ά. είναι συχνά παράγοντες αλλοίωσης στα τυριά αυτά. Αυτές οι ζύμες λοιπόν, όση επιρροή έχουν στην ανάπτυξη και ωρίμανση των τυριών, άλλο τόσο μπορούν, υπό διαφορετικές συνθήκες και πληθυσμούς, να τα βλάψουν.

4.1 Ανώμαλες οσμές

Η παρουσία ανώμαλων οσμών έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς ζυμών σε επίπεδα που κυμαίνονται από 10^5 – 10^6 cfu/g (Garnier et al., 2017). Έχει διαπιστωθεί ότι οι ζύμες έχουν την ικανότητα να συνδυάζουν αιθανόλη, την οποία παράγουν, με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας που απελευθερώνονται μέσω λιπόλυσης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό φρουτώδων εστέρων, όπως αναφέρθηκε από τους Ledenbach και Marshall το 2009.

Κάποια είδη ζυμών έχουν αναγνωριστεί ως ικανά να παράγουν βιογενείς αμίνες, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη ανώμαλων οσμών, όπως αναφέρεται επίσης από τον Garnier et al. (2017).

4.2 Δημιουργία κοιλοτήτων και πρώιμη διόγκωση

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ζύμες προκαλούν πρώιμη διόγκωση σε διάφορους τύπους τυριών, όπως σημειώνεται από τον Sheehan (2011). Στην περίπτωση των ελβετικών ημίσκληρων τυριών που παρασκευάζονται από φρέσκο γάλα, η μόλυνση από ζύμες κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης μπορεί να οδηγήσει σε πρώιμη διόγκωση που συνοδεύεται από μια μυρωδιά μούχλας καθώς και ανώμαλη δημιουργία κοιλοτήτων (Agroscope, αδημοσίευτα). Το πιο συνηθισμένο ελάττωμα σε τυριά άλμης, όπως η φέτα, είναι η πρώιμη διόγκωση, η οποία μπορεί να οφείλεται σε υπερβολική ανάπτυξη ζυμών. Το ελάττωμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων κοιλοτήτων και σπογγώδη υφή όπως αναφέρθηκε από τους Bintsis και Papademas (2002) και Yalcin και Ucar (2009).

4.3 Μεταβολές στην εμφάνιση

Η ανάπτυξη ζυμών σε συσκευασμένα τυριά μπορεί συχνά να δώσει την εντύπωση ότι το προϊόν δεν είναι πλέον φρέσκο. Για παράδειγμα, η *G. candidum* έχει παρατηρηθεί ότι σχηματίζει ξεχωριστές αποικίες στο τυρί Harzer, ένα μικρό κίτρινο τυρί ξινού τυροπήγματος. Ενώ αυτές οι αποικίες είναι γενικά αβλαβείς, μπορούν να κάνουν το τυρί να φαίνεται μουχλιασμένο (Fröhlich-Wyder et. al., 2019).

Η βλεννώδης κι ανώμαλη επιφάνεια, γνωστή κι ως toad skin, οφείλεται επίσης στη *G. candidum*, αν και το toad skin μπορεί να είναι επιθυμητό για τυριά όπως το Crottin de Chavignol AOP από τη Γαλλία (Fröhlich-Wyder et. al., 2019).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία της *Y. lipolytica* μπορεί να οδηγήσει σε καφέ αποχρωματισμό σε τυριά, όπως το μπλε τυρί. Αυτός ο αποχρωματισμός είναι αποτέλεσμα της ικανότητας της ζύμης να μεταβολίζει την τυροσίνη (Carreira et.al., 2001). Το *D. hansenii* είναι ένα άλλο είδος ζύμης που μπορεί να συμβάλει στον μικροβιακό πληθυσμό στην επιφάνεια των λευκών τυριών. Η παρουσία του έχει συνδεθεί με το σχηματισμό μιας

βλεννώδους επιφάνειας, δίνοντας σε αυτά τα τυριά μια μοναδική υφή (Bintsis and Papademas, 2002).

4.4 Σχηματισμός βιογενών αμινών

Η παραγωγή βιογενών αμινών στο τυρί αποδίδεται κυρίως σε βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοβάκιλλων, των εντερόκοκκων και των εντεροβακτηρίων (Benkerroum, 2016, Linares et.al., 2011). Ωστόσο, ορισμένα είδη ζυμών, όπως η *Y. lipolytica*, έχει επίσης βρεθεί ότι παράγουν βιογενείς αμίνες (Gardini et al., 2006, Benkerroum, 2011). Παρόλα αυτά, οι ζύμες φαίνεται να έχουν μικρότερο αντίκτυπο στον σχηματισμό βιογενών αμινών στα ημίσκληρα και σκληρά τυριά. Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένα στελέχη των *G. candidum*, *D. hansenii* και *Y. lipolytica* έχουν την ικανότητα να διασπούν βιογενείς αμίνες (Bäumlisberger et al., 2015, Leuschner and Hammes, 1998).

5. Η περίπτωση της Φέτας

5.1 Μελέτη ανάπτυξης ζυμών στη φέτα

Στις αρχές του 1990, απομονώθηκαν από την άλμη της Φέτας διάφορα είδη ζυμών, όπως το *Tetrapisispora blattae* (προηγούμενο όνομα *Kluyveromyces blattae*), το *Candida sphaerica* (αναμορφή του *K. lactis*) και το *Lachancea thermotolerans* (προηγούμενο όνομα *Kluyveromyces thermotolerans*) (Vivier et.al., 1994). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Manolopoulou et.al. (2003) ανέλυσε τη Φέτα από τρία τυροκομεία στην περιοχή της Πελοποννήσου (Πίνακας 4) και διαπίστωσε ότι ο αριθμός ζυμών στην τυρομάζα άλλαζε μεταξύ των διαφόρων παραγωγών (10^2 – 10^3 CFU/g), ενώ έδειξε να αυξάνεται κατά την ωρίμανση ($2,6 \times 10^3$ – $4,6 \times 10^4$ CFU/g) (Πίνακας 3). Σε μια άλλη μελέτη, ο Rantsiou et. al. (2008) χρησιμοποίησε διάφορες τεχνικές για να χαρακτηρίσει το μικροβίωμα των τυριών Φέτας που παράγονταν από τέσσερις διαφορετικούς τυροκόμους στην Ελλάδα. Οι αριθμοί των ζυμών στις περισσότερες τοποθεσίες ήταν περίπου στα 10^3 CFU/g. Κυρίαρχο είδος ήταν ο *K. lactis* (79–83%), με τα *P. fermentans*, *Pichia membranifaciens* και *Candida zeylanoides* (Πίνακας 3) να

απομονώνονται λιγότερο συχνά (16–20%). Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι το περιβάλλον της άλμης δεν δίνει πολλά περιθώρια για την ανάπτυξη ποικιλίας ζυμών, κι εκείνες που καταφέρνουν να αναπτυχθούν εμφανίζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα. Σύμφωνα με τους Litopoulou-Tzanetaki και Tzanetakis (2011), οι ζύμες και οι ανθεκτικοί στο NaCl μικροοργανισμοί είναι κυρίαρχοι στη Φέτα η οποία παρασκευάζεται από μη παστεριωμένο πρόβειο γάλα. Ο συνολικός αριθμός των ζυμών, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από *S. Cerevisiae* και *D. hansenii*, είναι υψηλότερος μετά την τέταρτη ημέρα ωρίμανσης ($7,2 \times 10^5$ CFU/g) ενώ αργότερα μειώνεται ($5,9 \times 10^4$ CFU/g) (Πίνακας 3).

Η παρουσία ζυμών κατά την ωρίμανση της φέτας μπορεί δυνητικά να επηρεάσει τη γεύση του τυριού, όπως σημειώνουν διάφοροι ερευνητές (Mahmoud, 1980, Lueck et al., 1982, Kaminarides and Laskos, 1992). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα τυριά διατίθενται στην αγορά πριν ολοκληρωθεί η ζύμωση, με αποτέλεσμα να διογκώνεται η συσκευασία. Αν και αυτό θεωρείται ανεπιθύμητο, δεν θεωρείται ποιοτικό ελάττωμα του τυριού.

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στο τυρί φέτα, πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μαθηματικά μοντέλα. Αυτά τα μοντέλα λαμβάνουν υπόψη παράγοντες όπως το pH, θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε NaCl και ενεργότητα του νερού για την κατανόηση των προτύπων ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Buchanan and Phillips, 1989, Cole et al., 1990, Davey 1989, McMeekin et al., 1987).

Οι Kaminarides και Laskos (1992), έχουν δείξει ότι η κύρια χλωρίδα της Φέτας στην Ελλάδα αποτελείται κυρίως από *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata* και *Pichia membranefaciens* (Πίνακας 3). Η σύνθεση της χλωρίδας των ζυμών, όμως, διαφέρει ανάλογα με τις τοποθεσίες και τις χώρες παραγωγής.

Πίνακας 3. Σύγκριση των συνολικών αριθμών ζυμών και των ειδών ζυμών στην Φέτα, σε διάφορα στάδια επεξεργασίας.

Άλμη φέτας	<i>Tetrapisispora blattae</i> , <i>Candida sphaerica</i> , <i>Lachancea thermotolerans</i>	(δεν υπάρχουν στοιχεία)	Vivier et.al., 1994
Φέτα πριν την ωρίμανση	<i>K. lactis</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	10^2 – 10^3 CFU/g	Manolopoulou et.al., 2003, Rantsiou et.al., 2008
Φέτα κατά την ωρίμανση	<i>K. lactis</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	$2,6 \times 10^3$ – $4,6 \times 10^4$ CFU/g	Manolopoulou et.al., 2003, Rantsiou et.al., 2008
Φέτα από μη παστεριωμένο πρόβειο γάλα, 4 ^η ημέρα ωρίμανσης	<i>S. Cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , κ.ά.	$7,2 \times 10^5$ CFU/g	Litopoulou- Tzanetaki and Tzanetakis, 2011
Φέτα από μη παστεριωμένο πρόβειο γάλα, μετά την ωρίμανση	<i>S. Cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , κ.ά.	$5,9 \times 10^4$ CFU/g	Litopoulou- Tzanetaki and Tzanetakis, 2011

Πίνακας 4. Μέσες καταμετρήσεις ζυμών (log cfu/g $\pm$ standard deviation) σε 3 τυροκομικές μονάδες (Α, Β, Γ) (Manolopoulou et.al., 2003)

Χρόνος (μέρες)	Συνολικές Ζύμες		
	Α	Β	Γ
0	$2,58 \pm 0,2$	$2,81 \pm 0,4$	$2,81 \pm 0,3$
4	$4,00 \pm 0,3$	$5,20 \pm 0,6$	$4,38 \pm 0,3$
16	$3,41 \pm 0,2$	$4,54 \pm 0,4$	$4,66 \pm 0,4$
60	$3,23 \pm 0,2$	$3,79 \pm 0,3$	$4,28 \pm 0,3$
120	$3,28 \pm 0,1$	$3,66 \pm 0,4$	$3,94 \pm 0,2$

Πίνακας 5. Αλλοιωτικές ζύμες σε λευκά τυριά άλμης (Geronikou et al. 2020)

Τυρί	Κατηγορία τυριού	Γάλα (πρώτη ύλη)	Είδη ζυμών	Πηγές
Φέτα	Μαλακό	Πρόβειο ή μείγμα αιγοπρόβειου	<i>Candida sphaerica</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Lachancea thermotolerans</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Tetrapisispora blattae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vivier et al., 1994; Rantsiou et al., 2008; Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011
Χαλούμι	Ημίσκληρο	Πρόβειο, αίγιο ή μείγμα τους	<i>Candida</i> spp., <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>	Kaminarides et al., 2009; Mehryar et al., 2018; Kamilari et al., 2020
Λευκό τυρί	Μαλακό	Αγελαδινό	<i>Candida aaseri</i> , <i>Candida boidinii</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Naumovozyma dairenensis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Westall and Filtenborg, 1998

5.2 Επίδραση του pH, του NaCl, του a_w και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των ζυμών

Σε μελέτη του Vivier et.al. (1994), εξετάστηκε η ανάπτυξη ζυμών στη φέτα, εστιάζοντας συγκεκριμένα στο εύρος του pH που αναπτύσσονται. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε ένα εύρος pH από περίπου 2,5 έως 7,5, και είναι ενδιαφέρον ότι η ανάπτυξή τους δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις διακυμάνσεις του pH. Μεταξύ των ζυμών που εξετάστηκαν, η *C. sphaerica*, η *K. blattae* και η *K. thermotolerans* εμφάνισαν βέλτιστο pH 5,5. Ο Skinner et al. (1980) αναφέρει ότι το ιδανικό εύρος pH για

ανάπτυξη ζυμών είναι μεταξύ pH 3,5 και 6,5. Ωστόσο, γενικά, οι ζύμες είναι γνωστό ότι αναπτύσσονται σε ένα ευρύτερο εύρος pH είτε pH 3-8 είτε pH 3-11.

Η αύξηση της περιεκτικότητας σε NaCl φαίνεται να έχει αρνητικό αντίκτυπο στον ρυθμό ανάπτυξης των ζυμών. Καθώς η περιεκτικότητα σε NaCl αυξάνεται, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται. Στο 14% (w/w), τόσο η *K. blattae* όσο και η *K. thermotolerans* δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν. Η *C. sphaerica* φαίνεται ελαφρώς πιο ανθεκτική στο NaCl (Vivier et.al., 1994). Επιπλέον, ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών *C. sphaerica* και *K. thermotolerans* μειώνεται σε ενεργότητα νερού $< 0,94$. Η *K. blattae* φαίνεται να είναι ακόμα πιο ευαίσθητη στη μείωση των τιμών a_w .

Η έννοια της ελάχιστης θερμοκρασίας (T_{min}) δεν έχει καμία μεταβολική σημασία, αλλά βοηθά στην ταξινόμηση των μικροοργανισμών σε διαφορετικές κατηγορίες, όπως ψυχρόφιλα, ψυχρότροφα, μεσόφιλα και θερμόφιλα (Ratkowsky et al., 1982). Στην περίπτωση των ζυμών που μελετήθηκαν, η T_{min} ήταν -2°C για *C. sphaerica*, $+3^{\circ}\text{C}$ για *K. blattae* και 0°C για *K. thermotolerans*. Παρά αυτές τις μικρές διαφορές, οι συγκεκριμένες ζύμες είναι όλες μεσόφιλες, καθώς οι T_{min} ήταν $-3^{\circ}\text{C}/+7^{\circ}\text{C}$, το τυπικό εύρος για μεσόφιλους μικροοργανισμούς, σύμφωνα με το Ratkowsky et al. (1982). Οι θεωρητικές βέλτιστες θερμοκρασίες είναι 28°C για *C. sphaerica* και *K. blattae*, και 32°C για *K. thermotolerans*. Αυτές οι θεωρητικές τιμές ήταν λίγο χαμηλότερες από τις τιμές που καθορίστηκαν πειραματικά (Vivier et.al., 1994).

Σύμφωνα πάλι με τον Vivier et. al. (1994), κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης του τυριού φέτα, το pH της άλμης αυξάνεται από 3.5 σε 4.5. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε αυτές τις τιμές pH, η ανάπτυξη των ζυμών που απομονώνονται δεν εμποδίζεται, και ο ρυθμός ανάπτυξής τους φτάνει στο μέγιστό του. Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών επηρεάζεται περισσότερο από την περιεκτικότητα NaCl. Στο 5.5% (w/w) NaCl ή 0.966 a_w , ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών μειώθηκε στο μισό. Το εύρος θερμοκρασιών που επέτρεπε την ανάπτυξη ήταν μεταξύ 4 και 37°C για τη *C. sphaerica*, 8 και 37°C για την *K. blattae* και 4 και 41°C για την *K. thermotolerans*. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δείχνουν ότι θα είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί η ανάπτυξη των μη επιθυμητών ζυμών μόνο με τη ρύθμιση φυσικοχημικών παραμέτρων όπως το pH, το NaCl, η a_w και η θερμοκρασία.

6. Μέτρα για την πρόληψη και την αντικατάσταση των ζυμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε τυριά άλμης

6.1 Ποιοτική εξασφάλιση

Προκειμένου να διατηρηθεί η ποιότητα και η ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες στρατηγικές πρόληψης κι ελέγχου σε όλα τα στάδια επεξεργασίας, αποθήκευσης και χειρισμού του τελικού προϊόντος (Garnier κ.ά. (2017a). Αυτές οι στρατηγικές βασίζονται σε ευρέως αναγνωρισμένα συστήματα διαχείρισης, όπως το σύστημα Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP), η Καλή Κατασκευαστική Πρακτική (GMP), η Καλή Υγιεινή Πρακτική (GHP) και τον Οργανισμό Διεθνών Προτύπων (ISO) 22000 (Papademas and Bintsis, 2010, Tamime et.al., 2011, FACEnetwork, 2016, ISO, 2018, Awasti and Anand, 2020). Αυτά τα συστήματα παρέχουν κατευθυντήριες γραμμές και διαδικασίες για την πρόληψη και τον έλεγχο της διασταυρούμενης μόλυνσης κατά την παραγωγή. Χρησιμοποιώντας τεχνολογίες όπως η παστερίωση του γάλακτος, το φιλτράρισμα του αέρα, η απολύμανση, συνθήκες ασηπτικής συσκευασίας εξασφαλίζεται η ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι στρατηγικές ελέγχου από την άλλη πλευρά, επικεντρώνονται στην αναστολή της ανάπτυξης των ζυμών μέσω χημικής συντήρησης, της προσθήκης προστατευτικών καλλιεργειών, την ψύξη, ή την χρήση συσκευασίας με τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Στην τυροκομία, έχουν αναπτυχθεί ειδικοί κανονισμοί και διαδικασίες υγιεινής με βάση τις αρχές HACCP και GMP. Αυτοί οι κανονισμοί είναι προσαρμοσμένοι στα μεμονωμένα τυροκομεία και στις διαδικασίες παραγωγής τους. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει την επιτυχή εφαρμογή του HACCP στην παραγωγή τυριών τύπου Φέτας (Mauropoulos and Arvanitoyannis, 1999, Tamime et.al., 2007, El-Hofi et.al., 2010, Carrascosa et.al., 2016, Kapshakbayeva et.al., 2019).

Όταν προκύπτουν ζητήματα μόλυνσης από ζύμες στη γαλακτοβιομηχανία, πρέπει να διενεργείται ανάλυση ριζικών αιτιών (RCA) ως μέρος του ελέγχου της βιομηχανικής διαδικασίας (BRC Global Standards, 2012). Αυτή η ανάλυση, στοχεύει στον εντοπισμό της πηγής μόλυνσης και στην εφαρμογή κατάλληλων προληπτικών μέτρων. Μόλις εντοπιστεί η βασική αιτία, εφαρμόζονται μακροπρόθεσμα διορθωτικά μέτρα για την πρόληψη της επανεμφάνισης του ζητήματος. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα περιστατικά μόλυνσης μπορεί να έχουν πολλαπλές αιτίες, όπως ελαττωματικό εξοπλισμό,

ακατάλληλη επεξεργασία, προβλήματα προσωπικού, ακατάλληλα συστατικά ή περιβαλλοντικούς παράγοντες (Geronikou et.al., 2020).

6.2. Οδοί μόλυνσης

Η μόλυνση του θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος από ζύμες μπορεί να συμβεί αν οι εγκαταστάσεις παραγωγής έχουν υποβαθμισμένες συνθήκες ποιότητας αέρα. Δύο προσεγγίσεις μπορούν να ελαχιστοποιήσουν αυτόν τον κίνδυνο. Η πρώτη είναι να διασφαλιστεί ότι ολόκληρο το περιβάλλον παραγωγής είναι μια «καθαρή περιοχή» με τη χρήση φίλτρων αέρα υψηλής απόδοσης, ειδικά εκείνων που πληρούν το πρότυπο ISO class 8 σύμφωνα με το ISO 14644-1. Εάν δεν είναι δυνατή η δημιουργία μιας εντελώς καθαρής περιοχής λόγω κατασκευαστικών περιορισμών, θα πρέπει να εφαρμόζονται καθαρές περιοχές γύρω από τον εκτεθειμένο εξοπλισμό (ISO, 2015).

Όταν το γάλα παστεριώνεται, όλα τα κύτταρα της ζύμης, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων, καταστρέφονται λόγω της μη αντοχής τους στη θερμότητα. Ωστόσο, σε ορισμένες χώρες, όπως η Ελλάδα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοτικό μη παστεριωμένο γάλα για την παρασκευή τυριού Φέτα, υπό την προϋπόθεση ότι το τυρί θα ωριμάσει σωστά για τουλάχιστον δύο μήνες. Ως εκ τούτου, όσον αφορά στα λευκά τυριά άλμης, η μόλυνση από ζύμες προκύπτει κυρίως από τη περιβαλλοντική ρύπανση σε κάποιο στάδιο παραγωγής μετά την θερμική επεξεργασία. Αυτό έχει βρεθεί σε αρκετές μελέτες (Temelli et al., 2006, Beletsiotis et al., 2011, Stobnicka-Kupiec et al., 2019, Kandasamy et al., 2020). Ο Stobnicka-Kupiec et al. (2019) εντόπισε *C. albicans*, *Candida glabrata*, *C. rugosa*, *D. hansenii*, *G. candidum*, *Rhodotorula spp.*, και *Y. lipolytica* σε δείγματα αέρα και επιφανειών από τυροκομεία στην Πολωνία. Μια άλλη μελέτη σε μια ελληνική τυροκομική μονάδα έδειξε ότι το μέσο φορτίο μυκήτων, αποτελούμενο από *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, και ακαθόριστες ζύμες, ήταν 362.3 CFU/m³ στον εξωτερικό αέρα και έως 266.2 CFU/m³ στους χώρους παρασκευής (Beletsiotis et al., 2011).

6.3. Διαδικασίες Απολύμανσης και Καθαρισμού

Η υπερϊώδης ακτινοβολία ή ο οζονισμός έχουν προταθεί ως πιθανές μέθοδοι για την απενεργοποίηση αιωρούμενων μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, εκτός από τη διήθηση αέρα (Varga and Szigeti, 2016). Η παρουσία ζυμών σε εγκαταστάσεις γαλακτοβιομηχανίας τονίζει την ανάγκη τακτικής παρακολούθησης του μικροβιακού αριθμού και επακόλουθων διαδικασιών καθαρισμού για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης από μύκητες. Ο καθαρισμός και η απολύμανση είναι ιδιαίτερα σημαντικοί σε περιοχές που είναι επιρρεπείς στην υγρασία, όπως γωνίες τοίχων, πάτωμα και απορροφητικές τρύπες δαπέδου, ταβάνι, και μέρη του εξοπλισμού, όπου οι ζύμες είναι σε θέση να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν (Awasti and Anand, 2020). Η κυκλική πλύση (CIP) με διάφορα απορρυπαντικά και ζεστό νερό εφαρμόζεται ως μέθοδος καθαρισμού των δεξαμενών και των σωληνώσεων στις γαλακτοβιομηχανίες, εξαλείφοντας ακαθαρσίες και μειώνοντας τα επίπεδα της μικροβιακής μόλυνσης (Memisi et.al., 2015).

6.4. Βίο-Προστατευτικές Καλλιέργειες

Η αγορά γαλακτοκομικών προϊόντων, για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις των καταναλωτών, κινείται προς πιο φυσικά προϊόντα, δηλαδή λιγότερο επεξεργασμένα και απαλλαγμένα από τεχνητά συστατικά ("καθαρές ετικέτες") (Román et al., 2017). Η εύρεση λύσεων για καθαρές ετικέτες για τα λευκά τυριά είναι σημαντική, καθώς είναι επιρρεπή σε αλλοιώσεις από ζύμες. Μια πιθανή λύση είναι η χρήση βιοπροστατευτικών καλλιεργειών, οι οποίες προσφέρουν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα χημικά συντηρητικά (Crowley et al., 2013). Είναι σημαντικό αυτές οι βιοπροστατευτικές καλλιέργειες όχι μόνο να αναστέλλουν τις ζύμες, αλλά να έχουν επίσης την ικανότητα να αναπτύσσονται και να ευδοκιμούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς να παρεμβαίνουν στην απόδοση άλλων καλλιεργούμενων μικροοργανισμών και να μην αλλάζουν την αισθητική ποιότητα των προϊόντων (Schnürer and Magnusson, 2005). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ειδικότερα του γένους *Lactobacillus*, είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους επιδράσεις ως βιοπροστατευτικά (Bernardeau et al., 2008).

7. Συμπεράσματα

Οι ζύμες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μικροχλωρίδα του τυριού. Την τελευταία μιάμιση δεκαετία, η πρόοδος στις μοριακές τεχνικές έχουν διευρύνει σημαντικά την κατανόησή μας για τους διάφορους τύπους ζυμών που βρίσκονται στο τυρί. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές για την αναγνώριση και ταξινόμηση των στελεχών, οι ερευνητές μπόρεσαν να αποκαλύψουν πληθώρα πληροφοριών σχετικά με την ποικιλομορφία των ζυμών τυριού. Ορισμένα συγκεκριμένα είδη ζύμης έχουν ακόμη επιλεγεί ως συμπληρωματικές καλλιέργειες για ορισμένα είδη τυριών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία διακριτών αισθητηριακών χαρακτηριστικών τόσο κατά τη διαδικασία παραγωγής όσο και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης (Zheng et.al., 2021).

Οι ζύμες έχουν την τάση να ευδοκιμούν εύκολα στην επιφάνεια του τυριού. Η παρουσία τους και ο ρόλος τους στη διαδικασία ωρίμανσης εξαρτώνται από το είδος του τυριού και τα μοναδικά χαρακτηριστικά τους. Η έκταση της συμβολής τους καθορίζεται από τον αριθμό των ζυμών που υπάρχουν και τα συγκεκριμένα είδη και στελέχη που εμπλέκονται. Έχει παρατηρηθεί ότι το είδος ζύμης που επικρατεί στην πλειονότητα των κατηγοριών τυριών είναι το *D. Hansenii*. Το συγκεκριμένο είδος έχει εντοπιστεί και στις επτά κατηγορίες τυριών. Ο λόγος για την ευρεία παρουσία του θα μπορούσε να αποδοθεί στην ικανότητά του να αντέχει σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου, να ευδοκιμεί σε όξινα περιβάλλοντα και να χρησιμοποιεί το γαλακτικό οξύ ως κύρια πηγή άνθρακα (Fröhlich-Wyder et.al., 2019). Το *D. Hansenii* μπορεί να βρεθεί στις επιφάνειες πολλών τυριών καθώς και στις άλμεις που χρησιμοποιούνται για την αλάτισή τους, πράγμα που σημαίνει ότι η μόλυνση συμβαίνει κατά πάσα πιθανότητα κατά το στάδιο της αλάτισης.

Οι *K. marxianus* και *K. lactis* βρίσκονται συχνά σε μεγάλες ποσότητες σε διάφορα είδη τυριών, κυρίως επειδή έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τη λακτόζη ως πηγή άνθρακα (Fröhlich-Wyder et.al., 2019). Αυτά τα δύο είδη ζύμης, έχουν επιδείξει αξιοσημείωτες βιοχημικές ικανότητες, ιδιαίτερα όσον αφορά την ικανότητά τους να διασπούν πρωτεΐνες και λίπη, τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην ωρίμανση και το σχηματισμό αρωματικών ενώσεων στο τυρί. Η *G. candidum* βρίσκεται συνήθως σε τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων ή βακτηρίων, αλλά έχει εντοπιστεί και σε δείγματα σκληρών τυριών (Banjara et.al., 2015). Η *Y. lipolytica* είναι μια άλλη ζύμη που απαντάται σε πολλές κατηγορίες τυριού και χαρακτηρίζεται από την δράση της στη

διάσπαση πρωτεϊνών και λιπών (Sørensen et.al., 2011). Ωστόσο, η πολύ ισχυρή δραστηριότητα της *Y. lipolytica* μπορεί ενδεχομένως να οδηγήσει σε αλλοιώσεις.

Εκτός από τα προαναφερθέντα είδη, υπάρχει μια τεράστια ποικιλία ειδών ζύμης που μπορεί να παρατηρηθεί. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε ορισμένα είδη τυριών, οι ζύμες διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο ως η κύρια μικροβιακή ομάδα κατά τη διάρκεια ορισμένων σταδίων της διαδικασίας ωρίμανσης, ενώ σε άλλα είδη τυριών οι ζύμες απουσιάζουν εντελώς. Ωστόσο, η παρουσία ή η απουσία ζυμών στο τυρί εξαρτάται από τα ειδικά χαρακτηριστικά που είναι εγγενή σε κάθε ποικιλία τυριού, καθώς και από τις τεχνικές παραγωγής που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή. Η μεγάλη ποικιλία στη διαδικασία παραγωγής τυριού, σε συνδυασμό με τις μεταβλητές κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η ωρίμανση, δημιουργεί ένα ποικίλο περιβάλλον στο οικοσύστημα του τυριού, ενθαρρύνοντας την ανάπτυξη πολυάριθμων διακριτών μικροοργανισμών.

Η μικροβιακή χλωρίδα της Φέτας αποτελείται κυρίως από ζύμες όπως η *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, και *Pichia membranefaciens*. Η ποικιλία των ζυμών φαίνεται να προσαρμόζεται στο περιβάλλον της άλμης. Δεν είναι ασυνήθιστη η διόγκωση του τυριού πριν από το τέλος της ζύμωσης και δεν θεωρείται ως ελάττωμα ποιότητας, όμως παραμένει μη επιθυμητό. Η αλάτιση και η περίοδος ωρίμανσης φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη της διόγκωσης. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, παράγοντες όπως pH, θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε NaCl, και ενεργότητα του νερού επηρεάζουν τους αριθμούς των ζυμών που αναπτύσσονται στα τυριά. Συνοψίζοντας, ο ρόλος των ζυμών στα τυριά αναδεικνύεται ως κρίσιμος παράγοντας στη διαμόρφωση των αισθητηριακών χαρακτηριστικών αυτών των προϊόντων. Ωστόσο, παρά τη θετική τους συμβολή, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι η επίδρασή τους υφίσταται επίσης σημαντικές παραμέτρους. Σε μεγάλους αριθμούς, με διάφορους εξωτερικούς παράγοντες και ενδεχομένως με επιμολύνσεις από άλλα ξένα στελέχη ζυμών, μπορεί να προκύψουν ανεπιθύμητες αλλοιώσεις.

Εν κατακλείδι, η εμβάθυνση στην κατανόηση των διαδικασιών αλληλεπίδρασης μεταξύ ζυμών και τυριών είναι κρίσιμη για τη βελτίωση της παραγωγικής διαδικασίας και την αποτελεσματική αντιμετώπιση πιθανών προκλήσεων που ενδέχεται να προκύψουν στον κλάδο της τυροκομίας.

Βιβλιογραφία

Addis E, Fleet GH, Cox JM, et al. (2001) The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 69: 25-36.

Arfi, K., Landaud, S., & Bonnarne, P. (2006). Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2155–2162. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2155-2162.2006>

Aponte M, Pepe O, Blaiotta G (2010) Short communication: Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo mozzarella cheese. *J Dairy Sci* 93: 2358-2361.

Arteau, M., Labrie, S., & Roy, D. (2010). Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *International Dairy Journal*, 20, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.006>

Atanassova, M. R., Fernandez-Otero, C., Rodriguez-Alonso, P., Fernandez- No, I. C., Garabal, J. I., & Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, 53, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>

Awasti, N., and Anand, S. (2020). “The role of yeast and molds in dairy industry: an update,” in *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*, eds J. Minj, V. A. Sudhakaran, and A. Kumari (Singapore: Springer), 243–262. doi: 10.1007/978-981-15-2608-4

Banjara, N., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*, 70, 792–800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>

Bäumlisberger, M., Moelleken, U., König, H., & Claus, H. (2015). The potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*, 3, 839–850. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040839>

Beletsiotis, E., Ghikas, D., and Kalantzi, K. (2011). Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: a case study. *Procedia Food Sci.* 1, 1051–1059. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.157

Belloch, C., Querol, A., & Barrio, E. (2011). *Kluyveromyces* spp. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, volume 4 (pp. 754–763). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00499-4>

Benkerroum, N. (2016). Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>

- Bernardeau, M., Vernoux, J., Henridubernet, S., and Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015
- Bertuzzi, A. S., Walsh, A. M., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., Crispie, F., McSweeney, P. L. H., et al. (2018). Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *mSystems* 3:e00211-17. doi: 10.1128/mSystems.00211-17
- Besançon X, Smet C, Chabalier C, et al. (1992) Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int J Food Microbiol* 17: 9-18.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suarez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 434–444. <https://doi.org/10.1111/jam.12228>
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., Davies, R., and Robinson, R. K. (2000). Microbiology of brines used to mature Feta cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 53, 106–112. doi: 10.1111/j.1471-0307.2000.tb02671.x
- Bintsis T, Papademas P (2002) Microbiological quality of white brined cheeses: a review. *Intern J Dairy Technol* 55: 113-120.
- Bintsis T, Papademas P (2018) An overview of the cheesemaking process. In: Papademas P, Bintsis T. *Global Cheesemaking Technology*, Chichester: John Wiley & Sons 120-156.
- Bintsis T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, 7(4): 447–470. DOI: 10.3934/microbiol.2021027
- Bockelmann, W., Gareis, M., & Heller, K. J. (2010). Kann man Sauermilchkäse sicher produzieren? *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 131(7), 26–28.
- Bockelmann, W. (2011). Smear-ripened cheeses. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, volume 1 (pp. 753–766). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00089-3>
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2013). Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5214–5223. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-13>
- Boldyreva, E. M., Hill, A., Griffiths, M., & Marcone, M. (2016). The quality and safety of washed-rind cheeses with a focus on antilisterial protection. *International Dairy Journal*, 55, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.007>
- Boutrou, R., & Gueguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>
- BRC Global Standards (2012). Understanding Root Cause Analysis. Available at: <http://www.brcglobalstandards.com/Portals/0/Books/Rootcause/rootcause.html> (accessed November 30, 2023).
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23, 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>

- Budak, S. O., Figge, M. J., Houbroken, J., & de Vries, R. P. (2016). The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 58, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.09.011>
- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. (1989). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* Vol 53, 5, 370-376.
- Büchl, N. R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H., and Scherer, S. (2008). Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* 25, 787–798. doi: 10.1002/yea.1633
- Büchl, N. R., & Seiler, H. (2011). Yeasts in milk and dairy products. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, volume 4 (pp. 744–753). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00498-2>
- Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100, 8814–8825. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12635>
- Callon, C., Chataud, J., Vanderbecken, F., & Larpent, J. P. (1994). Isolation and identification of yeasts from the internal microflora of various cheese types. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 12, 23-29.
- Cantor, M. D., van den Tempel, T., Kronborg Hansen, T., & Ardö, Y. (2017). Blue Cheese. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, volume 2, major cheese groups (pp. 929–954). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00037-5>
- Capece A, Romano P (2009) ‘Pecorino di filiano’ cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii* *Int J Food Microbiol.* 132: 180-184.
- Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., & Rosa, C. A. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, 69, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- Carrascosa, C., Millán, R., Saavedra, P., Jaber, J. R., Raposo, A., and Sanjuán, E. (2016). Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. *J. Dairy Sci.* 99, 2606–2616. doi: 10.3168/jds.2015-10301
- Carreira, A., Ferreira, L. M., & Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3463–3468. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3463-3468.2001>
- Ceugniet, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'Orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, 52, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>

- Ceugniet, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017). Fungal diversity of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *International Journal of Food Microbiology*, 258, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.015>
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., and Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol. Adv.* 32, 230–241. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.002
- Chen LS, Ma Y, Maubois JL, et al. (2010) Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *Int J Dairy Technol* 63: 47-54.
- Choisy, C., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L., & Tourneur, C. (1987). Microbiological aspects. In A. Eck, *Cheesemaking. Science and technology*, 2nd ed. (pp. 259-292). Paris: Technique et Documentation Lavoisier.
- Cholet, O., Henaut, A., Casaregola, S., & Bonnarne, P. (2007). Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: Focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2561–2570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02720-06>
- Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., & Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: An industrial workhorse. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (pp. 930–944). Badajoz: Formatex.
- Cogan, T. M., Goerges, S., Gelsomino, R., Larpin, S., Hohenegger, M., Bora, N., ... Scherer, S. (2014). Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2. CM-0010-2012
- Colabella, C., Corte, L., Roscini, L., Shapaval, V., Kohler, A., Tafintseva, V., et al. (2017). Merging FT-IR and NGS for simultaneous phenotypic and genotypic identification of pathogenic *Candida* species. *PLoS One* 12:e0188104. doi: 10.1371/journal.pone.0188104
- Cole, M.B., Jones, M.V. and Holoyak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 63-72.
- Corbaci, C., Ucar, F. B., & Yalcin, H. T. (2012). Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 534–542.
- Cosentino S, Fadda ME, Deplano M, et al. (2001) Yeasts associated with sardinian ewe's dairy products. *Int J Food Microbiol* 69: 53-58.
- Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi: 10.1016/j.tifs.2013.07.004
- Davey, K.R. (1989). A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 483-488.
- Deák, T. (2008). *Handbook of Food Spoilage Yeasts* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.

- Devoyod, J. J. (1990). Yeasts in cheese-making. In J. F. T. Spencer, & D. M. Spencer, *Yeast technology* (pp. 228-240). Berlin: Springer.
- Dolci P, Barmaz A, Zenato S, et al. (2009) Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture dependent and independent methods. *J Appl Microbiol* 106: 278-287.
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onesime, D., Loux, V., Monnet, C., ... Bonnarne, P. (2015). Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PLoS One*, 10, e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A. S., Bonnarne, P., & Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>
- El-Hofi, M., El-Tanboly, E. S., and Ismail, A. (2010). Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to UF white cheese production line. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 9, 331–342.
- Eliskases-Lechner, F., Guéguen, M., & Panoff, J. M. (2011). *Geotrichum candidum*. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (ed., Vol. 4) (pp. 765–777). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4>
- El Sharoud WM, Belloch C, Peris D, et al. (2009) Molecular identification of yeasts associated with traditional egyptian dairy products. *J Food Sci* 74: 341-346.
- El Soda, M. (1986). Acceleration of cheese ripening: recent advances. *Journal of Food Protection*, 49, 395-399.
- Enache-Angoulvant, A., and C. Hennequin. 2005. Invasive *Saccharomyces* infection, a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1559–1568.
- European Commission (2002). Commission Regulation (EC) No 1829/2002 of 14 October 2002 Amending the Annex to Regulation (EC) No 1107/96 with Regard to the Name “Feta”. Available online at: <https://www.eumonitor.eu/9353000/1/j9vvik7mlc3gyxp/vitgbgic6wzi> (accessed November 30, 2023).
- European Commission (2015). Publication of an Application Pursuant to Article 50(2)(a) of Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council on Quality Schemes for Agricultural Products and Foodstuffs. Available online at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:343:0001:0029:en:PDF> (accessed November 30, 2023).
- FACEnetwork (2016). European Guide for Good Hygiene Practices in the Production of Artisanal Cheese and dairy Products. Target: Farmhouse and Artisan Producers. Available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_guidance_artisanal-cheese-and-dairy-products_en.pdf (accessed November 30, 2023).
- Fadda ME, Cosentino S, Deplano M, et al. (2001) Yeasts populations in Sardinian feta *Int J Food Microbiol* 69: 153-156.

- Fasoli, G., Tofalo, R., Lanciotti, R., Schirone, M., Patrignani, F., Perpetuini, G., et al. (2015). Chromosome arrangement, differentiation of growth kinetics and volatile molecule profiles in *Kluyveromyces marxianus* strains from Italian cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 151–158. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.001
- Fleet GH, Mian MA (1987) The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int J Food Microbiol* 4: 145-155.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.
- Fleet, G.H., and R. Balia. (2006). The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. In: A. Querol and G.H. Fleet (Eds), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 381–398.
- Fleet, G. H. (2011). Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In C. P. K. C. J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (pp. 53–63). Amsterdam: Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00005-7>
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>
- Fröhlich-Wyder, M. T. (2003). Yeasts in dairy products. In T. Boekhout, & V. Robert (Eds.), *Yeasts in Food* (pp. 209–237). Hamburg: Behr's Verlag. <https://doi.org/10.1533/9781845698485.209>
- Fröhlich-Wyder M-T, Arias-Roth E, Jakob E. Cheese yeasts. *Yeast*. (2019) 36:129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., ... Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23, 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.005>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017a). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 5, 1–33, 5:42. doi: 10.3390/microorganisms5030042
- Geronikou A, Srimahaeak T, Rantsiou K, Triantafillidis G, Larsen N and Jespersen L (2020) Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. *Front. Microbiol.* 11:582778. doi: 10.3389/fmicb.2020.582778
- Gkatzionis, K., Hewson, L., Hollowood, T., Hort, J., Dodd, C. E. R., & Linforth, R. S. T. (2013). Effect of *Yarrowia lipolytica* on blue cheese odour development: Flash profile sensory evaluation of microbiological models and cheeses. *International Dairy Journal*, 30, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.010>
- Gkatzionis, K., Yunita, D., Linforth, R. S., Dickinson, M., & Dodd, C. E. (2014). Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016>
- Goerges S, Mounier J, Rea MC, et al. (2008) Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident

microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 74: 2210-2217.

Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., et al. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 294–300. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032

Goncalves Dos Santos, M. T. P., Benito, M. J., de Guia Cordoba, M., Alvarenga, N., & Ruiz-Moyano Seco de Herrera, S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and - independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013>

Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2013). Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microbial Ecology*, 65, 602–615. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0138-3>

Groenewald, M., Boekhout, T., Neuveglise, C., Gaillardin, C., van Dijk, P. W. M., & Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40, 187–206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>

Haastrup, M. K., Johansen, P., Malskær, A. H., Castro-Mejía, J. L., Kot, W., Krych, L., et al. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 285, 173–187. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.015

Hage, A. E., and Houseley, J. (2013). “Resolution of budding yeast chromosomes using pulsed-field gel electrophoresis,” in *Methods in Molecular Biology*, ed. S. Makovets (New York, NY: Springer), 195–207. doi: 10.1007/978-1-62703-565-1_13

Halil Kılıç, I. (2019). Identification and isolation of the yeasts in traditional yogurts collected from villages in Gaziantep, Turkey. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 13, 10325–10328. doi:10.26717/BJSTR.2019.13.002478

Hayaloglu, A. A. (2017). “Cheese varieties ripened under brine,” in *Cheese Varieties Ripened Under Brine*, 4 Edn, eds P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, and D. W. Everett (London: Elsevier Ltd), 997–1040. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00039-9

Hermet, A., Mounier, J., Keravec, M., Vasseur, V., Barbier, G., & Jany, J. L. (2014). Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiology*, 41, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.013>

Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>

Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., & Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: Diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters*, 362, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>

- Irlinger, F., Hélinck, S., & Jany, J. L. (2017). Secondary and adjunct cultures. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, volume 1, general aspects (pp. 273–300). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00011-9>
- ISO (2015). “Cleanrooms and Associated Controlled Environments—Part1: Classification of Air Cleanliness by Particle Concentration” in ISO 14644-1:2015. Available at: <https://www.iso.org/standard/53394.html> (accessed November 30, 2023).
- ISO (2018). Food Safety Management Systems — Requirements for Any Organization in the food chain” in ISO 22000:2018 (Geneva, Switzerland). Available at: <https://www.iso.org/standard/65464.html> (accessed November 30, 2023).
- Jacques, N., and S. Casaregola. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 113-120, 126, 321–326.
- Jacques, N., Mallet, S., Laaghouti, F., Tinsley, C. R., & Casaregola, S. (2017). Specific populations of the yeast *Geotrichum candidum* revealed by molecular typing. *Yeast*, 34, 165–178. <https://doi.org/10.1002/yea.3223>
- Jatmiko, Y. D., Mustafa, I., and Ardyati, T. (2019). Profile of microbial community of naturally fermented Sumbawa mare’s milk using next-generation sequencing. *J. Biol. Res.* 24, 65–69. doi: 10.23869/bphjbr.24.2.20191
- Kacániová, M., Terentjeva, M., Kunová, S., Nagyová, L., Horská, E., Haščík, P., et al. (2018). Identification of the Slovak traditional cheese “Parenica” microflora. *Acta Agrar. Debreceniensis* 227–239. doi: 10.34101/actaagrar/150/1719
- Kamilari, E., Anagnostopoulos, D. A., Papademas, P., Kamilaris, A., and Tsalas, D. (2020). Characterizing Halloumi cheese’s bacterial communities through metagenomic analysis. *LWT* 126:109298. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109298
- Kaminarides, S. E., & Anifantakis, E. M. (1989). Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening. Study of the yeast flora. *Lait*, 69, 537-546.
- Kaminarides, S.E. and Laskos, N.S. (1992). Yeasts in factory brine of feta cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 47 (1), 68-71.
- Kammerlehner, J. (1995). Kase mit Schmiere-Rinde. *Deutsche Milchwirtschaft*, 46, 1084-1086.
- Kandasamy, S., Park, W. S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K.-H., et al. (2020). Characterisation of fungal contamination sources for use in quality management of cheese production farms in Korea. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 33, 1002–1011. doi: 10.5713/ajas.19.0553
- Kapshakbayeva, Z., Mayorov, A., Moldabayeva, Z., Mirasheva, G., Utegenova, A., Imankulova, G., et al. (2019). Food safety control of Halloumi type cheese production. *Eur. Asian J. Biosci.* 13, 293–301.
- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S., and Ozbas, Z. Y. (2017). Enzymatic characterization of yeast strains originated from traditional Mihalic cheese. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 6, 1152–1156. doi: 10.15414/jmbfs.2017.6.5.1152-1156
- Kauffman CA (2006) Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc* 3: 35-40.

- Klein, N., Zourari, A., & Lortal, S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products—Comparison with several dairy bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 853–861. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00081-X)
- Kragelund Haastrup, M., Johansen, P., Harboe Malskær, A., Castro-Mejía, J. L., Kot, W., Krych, L., ... Jespersen, L. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 173–187.
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., and Davis, R. L. (2019). Next-generation sequencing and emerging technologies. *Semin. Thromb. Hemost.* 45, 661–673. doi: 10.1055/s-0039-1688446
- Kurtzman, Fell, & Boekhout (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Volume 1, Fifth Edition, 3-4
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
- Laslo, É., and György, É. (2018). Evaluation of the microbiological quality of some dairy products. *Acta Univ. Sapientiae Aliment.* 11, 27–44. doi: 10.2478/ausal-2018-0002
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science and Technology*, 92, 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>
- Leclercq-Perlat, M. N., Sicard, M., Trelea, I. C., Picque, D., & Corrieu, G. (2012). Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 95, 4666–4682. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5368>
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbial spoilage of dairy products. In M. P. Doyle, & W. H. Sperber (Eds.), *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 41–67). Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2
- Lenoir, J. (1984). The surface flora and its role in the ripening of cheese. *IDF Bulletin*, 171, 3-19.
- Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J. L., & Tourneur, C. (1985). La main-d'oeuvre microbienne domine l'affinage des fromages. *Revue Laitière Française*, 444, 54-62.
- Lessard, M. H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2014). Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, 15, 235–248. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-235>
- Leuschner, R. G. K., & Hammes, W. P. (1998). Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *Journal of Food Protection*, 61, 874–878. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.7.874>

- Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691–703. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.582813>
- Lioliou K, Litopoulou Tzanetaki E, Tzanetakis N, et al. (2001) Changes in the microflora of Manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage. *Int J Dairy Technol* 54: 100-106.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Rumin. Res.* 101, 17–32. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.022
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23, 341–350. doi: 10.1016/j.fm.2005.05.001
- Lopez-Canovas, L., Martinez Benitez, M. B., Herrera Isidron, J. A., and Flores Soto, E. (2019). Pulsed Field Gel Electrophoresis: past, present, and future. *Anal. Biochem.* 573, 17–29. doi: 10.1016/j.ab.2019.02.020
- Lueck, H., Dunkeld, M. and Van der Merwe, N.L. (1982). White pickled cheese: manufacture and quality recommendations. *S. African J. Dairy Technol.* 14 (1), 31-35.
- Mahmoud, M.M. (1980). Ultrafiltration in the manufacture of soft pickled cheese and production of alcohol and single cell protein from whey. *Dissertation Abstracts International.*, B 1980, 41 (3) 878 Order No 8020855, 91pp.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., et al. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 153–161. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00258-1
- Mansour, S., Beckerich, J. M., & Bonnarne, P. (2008). Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6505–6512. <https://doi.org/10.1128/AEM.01519-08>
- Masoud, W., & Jakobsen, M. (2005). The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *International Dairy Journal*, 15, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.05.008>
- Mauropoulos, A. A., and Arvanitoyannis, I. S. (1999). Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. *Food Control* 10, 213–219. doi: 10.1016/S0956-7135(99)00021-3
- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putros, S. and Ratkowsky, D.A. (1987). Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity in the growth of *Staphylococcus xylosus*. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 543-550.
- McSweeney PLH (2007) Bacterial surface ripened cheeses. In: McSweeney PLH. *Cheese Problems Solved*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 289-290.
- Mehyar, G. F., Al Nabulsi, A. A., Saleh, M., Olaimat, A. N., and Holley, R. A. (2018). Effects of chitosan coating containing lysozyme or natamycin on shelflife, microbial

quality, and sensory properties of Halloumi cheese brined in normal and reduced salt solutions. *J. Food Process. Preserv.* 42, 1–9. doi: 10.1111/jfpp.13324

Memisi, N., Moracanin, S. V., Milijasevic, M., Babic, J., and Djukic, D. (2015). CIP cleaning processes in the dairy industry. *Procedia Food Sci.* 5, 184–186. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.052

Miller, J. M. (2013). Whole-genome mapping: a new paradigm in strainotyping technology. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1066–1070. doi: 10.1128/JCM.00093-13

Monnet, C., Landaud, S., Bonnarne, P., & Swennen, D. (2014). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiology Letters*, 263, 1–9.

Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>

Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., ... Cogan, T. M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6489–6500. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6489-6500.2005>

Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., ... Cogan, T. M. (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 668–681. <https://doi.org/10.1111/j.13652672.2006.02922.x>

Mounier, J., Monnet, C., Vallaey, T., Arditi, R., Sarthou, A. S., Helias, A., & Irlinger, F. (2008). Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 172–181. <https://doi.org/10.1128/AEM.01338-07>

Murphy, A., and K. Kavanagh. 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 551–557.

Naumova, E. S., Sadykova, A. Z., Michailova, Y. V., and Naumov, G. I. (2017). Polymorphism of lactose genes in the dairy yeasts *Kluyveromyces marxianus*, potential probiotic microorganisms. *Microbiology* 86, 363–369. doi: 10.1134/S0026261717030122

Ndoye, B., Rasolofo, E. A., LaPointe, G., & Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*, 91, 495–524. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0031-8>

Nicaud, J. M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29, 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>

Padilla, B., Manzanares, P., & Belloch, C. (2014). Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology*, 38, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.002>

Papademas, P., and Bintsis, T. (2010). Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 489–503. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00620.x

- Pappa, E. C., Kandarakis, I. G., Zerfiridis, G. K., Anifantakis, E. M., and Sotirakoglou, K. (2006). Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk. *Lait* 86, 273–290. doi: 10.1051/lait:2006010
- Patel, R. (2019). A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *J. Fungi* 5:4. doi: 10.3390/jof5010004
- Petersen, K. M., Westall, S., and Jespersen, L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced ripened cheeses. *J. Dairy Sci.* 85, 478–486. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74098-8
- Petersen, K. M., & Jespersen, L. (2004). Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02293.x>
- Pinto, A., Halliday, C., Zahra, M., van Hal, S., Olma, T., Maszewska, K., et al. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 6:e25712. doi:10.1371/journal.pone.0025712
- Prista, C., Michan, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33, 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.031>
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A. and Olley, J. (1991). Comparison of Arrhenius-type and Belehradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 71,452-459.
- Rea, M. C., Gorges, S., Gelsomino, R., Brennan, N. M., Mounier, J., Vancanneyt, M., ... Cogan, T. M. (2007). Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 2200–2210. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-377>
- Rohm, H. (1991). Zur Bedeutung von Hefen und Schimmelpilzen für die Milchwirtschaft. Part II. *Deutsche Milchwirtschaft Hildesheim*, 42, 478-480.
- Román, S., Sánchez-Siles, L. M., and Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: results of a systematic review. *Trends Food Sci. Technol.* 67, 44–57. doi: 10.1016/j.tifs.2017.06.010
- Romano P, Ricciardi A, Salzano G, et al. (2001) Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *Int J Food Microbiol* 69: 45-51.
- Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In A. Querol & G. H. Fleet (Eds). *Yeasts in food and beverages* (pp. 13–53). Heidelberg: Springer, DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_2.
- Roostista R, Fleet GH (1996) The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 28: 393-404.

- Sacristán, N., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2012). Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food Microbiology*, 30(1), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.003>
- Schnürer, J., and Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70–78. doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.014
- Schornsteiner, E., Mann, E., Bereuter, O., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *International Journal of Food Microbiology*, 180, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.010>
- Seiler H, Busse M (1990) The yeasts of cheese brines. *Int J Food Microbiol* 11: 289-304.
- Sessou, P., Keisam, S., Tuikhar, N., Gagara, M., Farougou, S., and Jeyaram, K. (2019). High throughput illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from Republics of Benin and Niger. *Front. Microbiol.* 10:594. doi: 10.3389/fmicb.2019.00594
- Sheehan JJ (2007) What organisms grow on the surface of smear cheeses? In: McSweeney PLH. *Cheese Problems Solved*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 291-292.
- Sheehan, J. J. (2011). Avoidance of gas blowing. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, volume 1 (pp. 661–666). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00079-0>
- Skinner, F.A., Passmore, S.M. and Davenport, R.R. (1980). *Biology and activities of yeasts*. London Academic Press.
- Sørensen, L. M., Gori, K., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal*, 21, 970–978. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.005>
- Spinnler HE, Leclercq Perlat MN (2007) White mould cheese. In: McSweeney PLH. *Cheese Problems Solved*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 268-269.
- Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Stobnicka-Kupiec, A., Gołofit-Szymczak, M., and Górny, R. (2019). Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Ann. Agric. Environ. Med.* 26, 555–565. doi: 10.26444/aaem/112381
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In A. Querol, & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in food and beverages* (pp. 335–379). Berlin Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_11
- Šuranská, H., Raspor, P., Uroić, K., Golić, N., Kos, B., Mihajlović, S., ... Čadež, N. (2016). Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. *Folia Microbiologica*, 61, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0455-x>

- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., and Kiers, G. (2007). "Industrial manufacture of Feta-Type cheeses," in *Brined Cheeses*, A. Tamime (Oxford: Blackwell Science Ltd), 77–116. doi: 10.1002/9780470995860.ch3
- Tamime, A. Y., Muir, D. D., Wszolek, M., Domagala, J., Metzger, L., Kneifel, W., et al. (2011). "Quality control in processed cheese manufacture," in *Processed Cheese and Analogues*, ed. A. Y. Tamime (Oxford: Wiley-Blackwell), 245–340. doi: 10.1002/9781444341850.ch10
- Temelli, S., Anar, S., Sen, C., and Akyuva, P. (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control* 17, 856–861. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.05.012
- Tofalo, R., Fasoli, G., Schirone, M., Perpetuini, G., Pepe, A., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2014). The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029>
- Van den Tempel T, Jakobsen M (2000) The technological characteristics of *Debaromyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy J* 10: 263-270.
- Varga, L., and Szigeti, J. (2016). Use of ozone in the dairy industry: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 69, 157–168. doi: 10.1111/1471-0307.12302
- Vermote, L., Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2018). Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems present in cheese brines reflect environmental inoculation during the cheese production process. *International Dairy Journal*, 87, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.010>
- Viljoen, B. C., Knox, A. M., De Jager, P. H., & Lourens-Hattingh, A. (2003). Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 275-283, 291–297.
- Vivier D., M. Rivemale, J.P. Reverbel, R. Ratomahenina, P. Galzy. (1994). Study of the growth of yeasts from feta cheese, *International Journal of Food Microbiology* 22 (1994) 207-215
- Welthagen JJ, Viljoen BC (1996) The presence of yeasts in different cheese types. In: Jakobsen M, Narvhus J, Viljoen BC. Eds., *Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects*, Copenhagen, Denmark. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 78-87.
- Welthagen JJ, Viljoen BC (1998) Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int J Food Microbiol* 41: 185-194.
- Wenning, M., Seiler, H., and Scherer, S. (2002). Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4717–4721. doi: 10.1128/AEM.68.10.4717-4721.2002
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., & Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>

Wyder M. T., Puhan Zdenko, (1999). Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *International Dairy Journal* 9 (1999) 117-124

Wyder, M. T., & Teuber, M. (2001). Yeast flora composition on the surface of three different Swiss cheese varieties. *Systematic and Applied Microbiology*, accepted for publication. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3440.7847>.

Yalcin, H. T., & Ucar, F. B. (2009). Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses. *Annals of Microbiology*, 59, 477–483. <https://doi.org/10.1007/BF03175134>

Zheng X, Shi X, Wang B (2021) A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Front Microbiol* 12: 703284.

Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ), 2012, efet.gr, <https://www.efet.gr> > files > F7755_tables1