



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ»



## **Μελέτη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την παρασκευή και συντήρηση του τυριού “γαλοτύρι”**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**ΣΕΧΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΑ**  
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (ΚΑΡΔΙΤΣΑ)

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ»



**Μελέτη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την  
παρασκευή και συντήρηση του τυριού “γαλοτύρι”**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**ΣΕΧΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΑ**  
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (ΚΑΡΔΙΤΣΑ)

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ανδρεάνα Πεξαρά  
(Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ)

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ανδρεάνα Πεξαρά (Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ)

Νικόλαος Σολωμάκος (Επίκουρος Καθηγητής ΠΘ)

Γεωργία Γκρίντζαλη (Εθνικός Εμπειρογνώμονας)

Στους γονείς μου Βασίλη και Ορνέλλα

# Περίληψη

**Σημαντικοί όροι:** Γαλοτύρι, οξυγαλακτικά βακτήρια, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά.

## Σκοπός εργασίας

Το «γαλοτύρι», ένα τυρί προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.), είναι από τα παλαιότερα παραδοσιακά τυριά στην Ελλάδα, φτιαγμένο από πρόβειο ή αίγαιο γάλα ή μείγμα αυτών. Πρόκειται για ένα όξινο τυρόπηγμα με αλοιφώδη υφή, με υπόξινη και ευχάριστη δροσερή γεύση και άρωμα. Στην παρασκευή του τυριού «γαλοτύρι» πολύ σημαντικό ρόλο για την διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αλλά και την ικανότητα συντήρησης έχει το είδος της οξυγαλακτικής καλλιέργειας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της παρασκευής και συντήρησης του τυριού «γαλοτύρι» από διαφορετικές εγκαταστάσεις παραγωγής.

## Υλικά και μέθοδοι

Δείγματα τυριού «γαλοτύρι» λήφθηκαν από δύο διαφορετικές εγκαταστάσεις παραγωγής («Εγκατάσταση Α» και «Εγκατάσταση Β»). Από κάθε εγκατάσταση λήφθηκαν δείγματα που ήταν έτοιμα για διακίνηση μετά από μικρό διάστημα μετά την παρασκευή του (10-18 ώρες στους 15° C) («φρέσκο») και δείγματα τυριού μετά από διατήρηση υπό ψύξη («5 ημερών»). Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση για την καταμέτρηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococci* spp., *Pediococcus* spp. και *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.) και την απομόνωση αποικιών. Έπειτα ακολούθησε ταυτοποίηση των απομονωθέντων αποικιών με τη μέθοδο Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Spectrometry (MALDI-TOF MS). Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της τιμής του pH.

## Αποτελέσματα

Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην «Εγκατάσταση Α» στο «φρέσκο» προϊόν για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ήταν  $6,45 \pm 0,45 \log \text{ cfu/g}$  και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus* ήταν  $8,41 \pm 0,36 \log \text{ cfu/g}$ . Στα δείγματα «5 ημερών» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) τόσο στον πληθυσμό των *Lactobacillus* spp. και *Leuconostoc* spp. ( $7,12 \pm 0,43 \log \text{ cfu/g}$ ) όσο στον πληθυσμό των *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enteriococcus* spp. και *Pediococcus* spp. ( $8,36 \pm 0,14 \log \text{ cfu/g}$ ).

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» στο «φρέσκο» προϊόν καταγράφηκε υψηλός πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* με τιμές  $9,52 \pm 0,40 \log \text{ cfu/g}$  και  $9,76 \pm 0,32 \log \text{ cfu/g}$  αντίστοιχα. Στα δείγματα «5 ημερών»

παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μικρότερος ( $P < 0,05$ ) πληθυσμός για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus*,  $6,02 \pm 0,49 \log \text{ cfu/g}$  και  $7,70 \pm 0,33 \log \text{ cfu/g}$ , αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων παραγωγής διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) για το «φρέσκο» προϊόν τόσο για γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc*, όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus*. Για τα δείγματα «5 ημερών» στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) διαπιστώθηκε μόνο στους πληθυσμούς στα γένη *Lactococci*, *Streptococcus*, *Enterococci*, *Pediococci*.

Για τα δείγματα της «Εγκατάστασης Α», τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lb. plantarum* και *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* αποτέλεσαν το κυρίαρχο είδος τόσο για το «φρέσκο» (ποσοστό 43,33%) όσο και για το προϊόν «5 ημερών» (ποσοστό 43,33% και 40% αντίστοιχα). Στο «φρέσκο» προϊόν της «Εγκατάστασης Β» ο *Lc. lactis* ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 93,33%, στο προϊόν «5 ημερών» κυρίαρχο είδος ήταν ο *Lb. paracasei* με ποσοστό 50%, ενώ αποικίες ταυτοποιήθηκαν ως *E. faecalis* (16,66%), ως *E. durans* (9,99%) και ως *E. faecium* (3,33%).

Στη τιμή του pH των δειγμάτων από την «Εγκατάσταση Α» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) μεταξύ των δειγμάτων «φρέσκο» ( $4,57 \pm 0,05$ ) και «5 ημερών» ( $4,48 \pm 0,06$ ). Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην τιμή του pH στα δείγματα «5 ημερών» ( $4,36 \pm 0,04$ ) συγκριτικά με το «φρέσκο» προϊόν ( $4,23 \pm 0,04$ ).

# Study of lactic acid bacteria during the preparation and preservation of "galotyri" cheese

## Abstract

**Keywords:** Galotyri, lactic acid bacteria, microbiological characteristics.

### Objective

"Galotyri", a traditional Greek cheese of Protected Designation of Origin (P.D.O), is made from ovine or caprine milk or mixtures of both. It is an acid-curd, with a spreadable texture, slightly acidic and pleasant organoleptic characteristics. In the production of "galotyri" cheese the type of lactic acid starter culture has an essential role in the sensory characteristics' development and the shelf life of the product.

The objective of this work was the study of lactic acid bacteria (LAB) during the preparation and preservation of "galotyri" cheese made from different production establishments.

### Materials and methods

Samples of "galotyri" cheese were obtained from two different production establishments ("Establishment A" and "Establishment B"). From each establishment, samples were obtained (1 kg each) that were ready for distribution in the market following a short draining (10–18 h at 15° C) ("fresh") and holding period under refrigeration (5 days after preparation).

Microbiological analysis for enumeration and isolation of LAB (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp.) was performed in the samples. The isolates were further identified by applying the matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The pH value was also determined in the samples.

### Results

In the "fresh" product of "Establishment A" the counts of *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. was  $6.45 \pm 0.45$  log cfu/g and of *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. and *Pediococcus* spp. was  $8.41 \pm 0.36$  log cfu/g. In the "5-days" samples, *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. counts ( $7.12 \pm 0.43$  log cfu/g), and *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. and *Pediococcus* spp. counts ( $8.36 \pm 0.14$  log cfu/g) did not change significantly ( $P > 0.05$ ).

In the "fresh" samples of "Establishment B" higher counts of LAB of both *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. ( $9.52 \pm 0.40$  log cfu/g and  $9.76 \pm 0.32$  log cfu/g respectively) were recorded. In the "5-days" samples significant ( $P < 0.05$ ) lower counts of *Lactobacillus*

spp., *Leuconostoc* spp. and of *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. *Pediococcus* spp. ( $6.02 \pm 0.49$  log cfu/g and  $7.70 \pm 0.33$  log cfu/g) were observed.

Comparison between observed counts of LAB in the samples of the two production establishments revealed significant differences ( $P < 0.05$ ) in "fresh" samples for both *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., and *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. In the "5-days" samples, a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) was found only in the counts of second group of LAB.

For the samples of "Establishment A", *Lb. plantarum* and *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* were identified as the predominant species in both "fresh" (43.33%) and "5 days" samples (43.33% and 40%, respectively). In the "fresh" samples of "Establishment B", *Lc. lactis* was identified in 93.33% of the samples; in the "5 days" samples the predominant species was *Lb. paracasei* (50%), whereas colonies as *E. faecalis* (16.66%), *E. durans* (9.99%) and *E. faecium* (3.33%) were also identified.

No statistically significant change ( $P > 0.05$ ) was found in the pH values between the samples "fresh" ( $4.57 \pm 0.05$ ) and "5 days" ( $4.48 \pm 0.06$ ) of "Establishment A". Statistically significant higher pH values were revealed in the samples of "5 days" ( $4.36 \pm 0.04$ ) compared to the "fresh" samples of "Establishment B" ( $4.23 \pm 0.04$ ).



## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	i
Κατάσταση πινάκων .....	ii
Κατάσταση σχημάτων .....	iii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	1
ΓΑΛΟΤΥΡΙ .....	1
1.1 Γενικά για το γαλοτύρι .....	1
1.2 Τεχνολογία παρασκευής .....	2
1.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος .....	3
1.4 Επισήμανση .....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> .....	5
ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	5
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....	5
2.2 Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	6
2.3 Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	10
2.3.1 Μεταβολισμός σακχάρων .....	11
2.3.2 Μεταβολισμός λιπών (λιπόλυση) .....	12
2.3.3 Μεταβολισμός των πρωτεϊνών (πρωτεόλυση) .....	12
2.4 Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια .....	13
2.4.1 Βακτηριοσίνες .....	13
2.5 Οξυγαλακτικά βακτήρια και προβιοτικά .....	17
2.6 Ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα .....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	21
3.1 Γαλοτύρι και οξυγαλακτικά βακτήρια .....	21
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	25
4.1 Σύλλογή των δειγμάτων .....	25
4.2 Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	25
4.3 Απομόνωση και Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	26
4.4 Μέτρηση της τιμής του pH .....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> .....	28
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	28
5.2 Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	37



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την εισηγήτρια του θέματος αυτού και επιβλέπουσα Καθηγήτρια κα. Πεζαρά Ανδρεάνα (Επίκουρη Καθηγήτρια του Π.Θ) για την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Οι παρατηρήσεις και οι υποδείξεις της σε όλα τα στάδια της μελέτης ήταν καθοριστικής σημασίας για την περάτωση της παρούσας μελέτης. Επίσης την ευχαριστώ για την άμεση επικοινωνία καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή της όλες τις φορές που της ζητήθηκε.

Θερμές ευχαριστίες σε όλα τα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: στην κ. Γεωργία Γκρίντζαλη, Εθνικός Εμπειρογνώμονας, Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφαλείας Τροφίμων, και στον κ. Σολωμάκο Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις γνώσεις που μου παρείχαν, καθώς στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί στην προσπάθειά μου και με υποστήριξαν σε κάθε φάση της πορείας μου.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των υποδομών για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Στην κα. Μαρία Κυρίτση καθώς και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

## Κατάσταση πινάκων

Πίνακας 1.....σελ.10
Πίνακας 2.....σελ.14
Πίνακας 3.....σελ.18
Πίνακας 4.....σελ.30
Πίνακας 5.....σελ.30
Πίνακας 6.....σελ.31

## Κατάσταση σχημάτων

Σχήμα 1.....	σελ.3
Σχήμα 2.....	σελ.12

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>



## ΓΑΛΟΤΥΡΙ

### 1.1 Γενικά για το γαλοτύρι

Το γαλοτύρι είναι ένα από τα παλαιότερα παραδοσιακά τυριά στην Ελλάδα, φτιαγμένο από γάλα προβατίνας ή αίγας ή μείγμα αυτών. Πρόκειται για ένα όξινο τυρόπηγμα με περιεκτικότητα σε υγρασία <75% και περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες σε ξηρά ύλη> 40%. Έχει αλοιφώδη υφή, χαρακτηριζόμενη από υπόξινη και ευχάριστη δροσερή γεύση και άρωμα (Κ.Τ.Π. 2014). Η τιμή του pH είναι συνήθως κάτω από 4,4 (Samelis & Kakouri 2007; Rogga et al. 2005).

Το Γαλοτύρι παράγεται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας με πολλούς τρόπους. Οι μεταβολές στις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής οδήγησαν σε διαφορετικούς τύπους τυριού (Ανυφαντάκης, 1991). Το 1996, η ονομασία «ΓΑΛΟΤΥΡΙ» (GALOTYRI) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.). Η παραγωγή, η συσκευασία και η ωρίμανση του προϊόντος γίνεται στην Ήπειρος και Θεσσαλία. Η γεωγραφική ζώνη στην οποία παράγεται το γάλα από το οποίο παρασκευάζεται το γαλοτύρι, οριοθετείται από τα όρια των κάτωθι γεωγραφικών διαμερισμάτων: Ήπειρος: Νομοί Ιωαννίνων, Θεσπρωτίας, Άρτας και Πρεβέζης Θεσσαλία: Νομοί Λαρίσης, Τρικάλων, Καρδίτσας και Μαγνησίας.

Για την Παρασκευή του τυριού «γαλοτύρι», δεν επιτρέπεται η χρήση γάλακτος που προέρχεται από περιοχές άλλες πέραν των προαναφερόμενων (Κ.Τ.Π. 2014).

Για την παρασκευή του τυριού "Γαλοτύρι" το γάλα που χρησιμοποιείται θα πρέπει να προέρχεται από φυλές αιγών και προβάτων τα οποία εκτρέφονται παραδοσιακά στην περιοχή παρασκευής του τυριού αυτού και η διατροφή τους βασίζεται αποκλειστικά στη χλωρίδα της περιοχής αυτής. Ακόμη το γάλα να προέρχεται από αρμέξεις που γίνονται 10 ημέρες μετά τον τοκετό. Θα πρέπει να είναι πλήρες, παστεριωμένο ή νωπό και καλής ποιότητας (ΦΕΚ, 1994).

Η παρασκευή του τυριού "Γαλοτύρι" απαγορεύεται να γίνεται από άλλο είδος γάλακτος εκτός αυτών που ορίζει η νομοθεσία. Επίσης στο προς τυροκόμηση γάλα για την παρασκευή του τυριού δεν επιτρέπεται η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, αντιβιοτικών ουσιών, καζεϊνικών αλάτων, συντηρητικών, χρωστικών, και η συμπύκνωση.

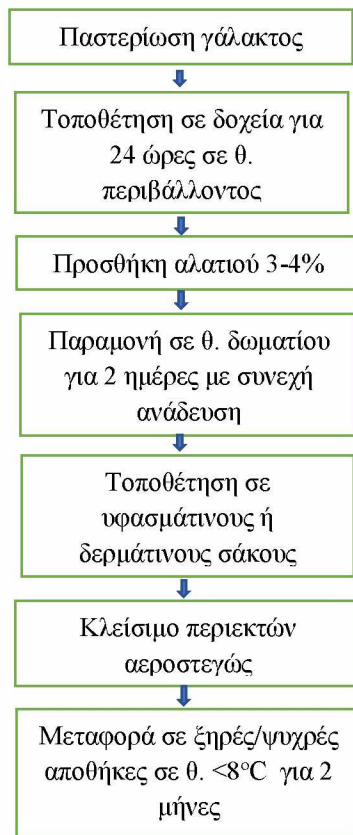
Επιτρέπεται όμως η προσθήκη άλατος, η προσθήκη πυτιάς ή άλλων ενζύμων καθώς και η προσθήκη αβλαβών οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηρίων (Κ.Τ.Π. 2014).

## 1.2 Τεχνολογία παρασκευής

Για την παρασκευή του τυριού "ΓΑΛΟΤΥΡΙ" το γάλα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και τοποθετείται σε δοχεία κατά προτίμηση πήλινα, για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα γίνεται προσθήκη αλατιού (βρώσιμο χλωριούχο νάτριο) 3-4 %. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για δυο μέρες στις οποίες αναδεύεται κατά διαστήματα και σταδιακά αναπτύσσεται οξύτητα. Το οξυνισμένο και αλατισμένο γάλα με ή χωρίς τη προσθήκη πυτιάς τοποθετείται σε υφασμάτινους ή δερμάτινους σάκους – τουλούμια ή σε ξύλινα βαρέλια. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται στο γάλα των επόμενων αμέλξεων μέχρις ότου οι περιέκτες να γεμίσουν. Στη συνέχεια οι περιέκτες κλείνονται αεροστεγώς και μεταφέρονται σε ψυχρές, ξηρές αποθήκες σε θερμοκρασία κάτω των 8<sup>ο</sup> C, για δυο τουλάχιστον μήνες εάν παρασκευάζεται από νωπό γάλα. Στο διάστημα αυτό αποβάλλεται υγρασία από τους περιέκτες. Με βραδύ ρυθμό το τυρί ωριμάζει και αποκτά τα ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Η παρασκευή και η ωρίμανση του γίνεται στις περιοχές Ηπείρου και Θεσσαλίας (Κ.Τ.Π. 2014). Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα ροής του τυριού "ΓΑΛΟΤΥΡΙ" (σχήμα 1).

Ωστόσο επειδή υπάρχει μεγάλη ζήτηση για την παραγωγή του τυριού «γαλοτύρι» πολλές εγκαταστάσεις παραγωγής σε διάφορες περιοχές της χώρας παράγουν τυριά που μοιάζουν με το γαλοτύρι, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικές διαδικασίες από το τυρί ΠΟΠ (Zoidou et al., 2011; Ανυφαντάκης, 1991). Αυτό γίνεται με την ανάμιξη, μέσα σε σάκο από δέρμα ή ύφασμα, γιαουρτιού με κομμάτια από φρέσκια Φέτα (που δεν έχει ωριμάσει), σε αναλογία 1,5-2 kg τυρί σε 10kg γιαούρτη. Προστίθεται αλάτι 3-4% και ο σάκος κλείνεται αεροστεγώς. Καθώς το μείγμα στραγγίζει, το γιαούρτι με το τυρί γίνονται μια μάζα, παρόμοια με αυτή που παράγεται με την επίσημη μέθοδο (Μπίντσης & Παπαδήμας, 2009). Σήμερα συνήθως χρησιμοποιείται παστεριωμένο γάλα και διακινείται ως νωπό ή μετά από σύντομη ωρίμανση (Samelis & Kakouri, 2007).





**Σχήμα 1.** Διάγραμμα ροής της παρασκευής του τυριού «γαλοτύρι»

### 1.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος

Παραδοσιακά το γαλοτύρι παρασκευάζεται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μείγμα αυτών. Το κατσικίσιο και το πρόβειο γάλα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με το αγελαδινό, ως προς τη χημική του σύσταση αλλά και όσο αναφορά τις τυροκομικές τους ιδιότητες. Γενικότερα το πρόβειο και το κατσικίσιο γάλα χαρακτηρίζονται από αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λίπος και ξηρά ουσία με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι ιδιότητες και η απόδοση του τυριού.

Πλην των ποσοτικών διαφορών μεταξύ των ειδών γάλακτος υπάρχουν και ποιοτικές διαφορές οι οποίες εκτός από την απόδοση στο τυρί επηρεάζουν ακόμη τις οργανοληπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες στο γαλοτύρι. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο κύριες διαφορές:

Στο πρόβειο και στο κατσικίσιο γάλα επειδή δεν υπάρχουν καροτένια το πήγμα που παράγεται από αυτά έχει φυσικό λευκό χρώμα, ενώ στο αγελαδινό το πήγμα είναι κιτρινωπό.

Σημαντικό στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος στο ώριμο τυρί είναι το λίπος του γάλακτος. Το τελικό άρωμα του τυριού επηρεάζεται από το μικρό μοριακό βάρος λιπαρών οξέων στη δομή του λίπους του γάλακτος. Το πρόβειο και κυρίως το κατσικίσιο γάλα περιέχουν αξιόλογες ποσότητες καπρονικού, καπρυλικού και καπροϊκού οξέος.

Σημαντικές διαφορές βρίσκονται στα κλάσματα καζεϊνών με αποτέλεσμα να διαφέρουν τα προϊόντα υδρόλυσής τους.

Η  $\alpha s1$ - καζεΐνη παρουσιάζει διαφορετική ηλεκτροφορητική ιδιότητα στα τρία είδη γάλακτος, γεγονός που επιτρέπει την αντίχνευση νοθείας του ενός από τα άλλα.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τυριού Γαλοτύρι οφείλονται κυρίως στην ποιότητα της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του και στη τεχνολογία που εφαρμόζεται σε αυτό.

Ενδεικτικά αναφέρεται η μέση χημική σύσταση και το pH από δείγματα του τυριού Γαλοτύρι από την ελληνική αγορά: λίπος 13,8 %, υγρασία 70,8 %, ολικές πρωτεΐνες 9,8 %, χλωριούχο νάτριο 2,8 % και pH 3,9 % ( Anifantakis,1991).

Τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού "Γαλοτύρι" είναι :

#### Χημική σύσταση :

Μέγιστη υγρασία :75 %

Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού :40 %

#### Τύπος τυριού :

Συνεκτικότητα :Μαλακό τυρί αλοιφώδους υφής

Επιδερμίδα : Δεν έχει

#### Μάζα τυριού :

Υφή: Αλοιφώδης

Χρώμα: Καθαρό λευκό

Οπές: Δεν έχει

Άλλα κύρια χαρακτηριστικά: Είναι μαλακό επιτραπέζιο τυρί, αλοιφώδους υφής, με ευχάριστη , υπόξινη, δροσερή γεύση και άρωμα.

Απαγορεύεται η προσθήκη συντηρητικών, χρωστικών, και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί (Κ.Τ.Π. 2014).

## 1.4 Επισήμανση

Σύμφωνα με τη νομοθεσία στα μέσα συσκευασίας που περιέχουν Γαλοτύρι, αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις:

- "Γαλοτύρι" (GALOTYRI)
- Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π)
- Τυρί
- Η επωνυμία και η έδρα του παραγωγού – συσκευαστή
- Η ημερομηνία παραγωγής
- Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:
- Τα δυο πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης: ΓΑ
- Ο αύξοντας αριθμός του μέσου συσκευασίας
- Η ημερομηνία παραγωγής (Παράδειγμα ( ΓΑ-1113-2012/94)).

Οι παραπάνω υποχρεωτικές ενδείξεις θα πρέπει να αναγράφονται στην ελληνική γλώσσα. Τα στοιχεία ελέγχου αναγράφονται με ευθύνη του συσκευαστή κατόπιν έγγραφης άδειας της αρμόδιας Διεύθυνσης Γεωργίας, η οποία τηρεί ειδικό βιβλίο παρακολούθησης και ελέγχου ανά παραγωγό τυριού "Γαλοτύρι" (GALOTYRI). Οι παραπάνω ενδείξεις αναγράφονται υποχρεωτικά σε κάθε συνοδευτικό έγγραφο κατά τη διακίνηση του τυριού "Γαλοτύρι" (GALOTYRI).

Η αναγραφή των υποχρεωτικών διατάξεων γίνεται σύμφωνα με τα καθοριζόμενα στην παρ.7 του άρθρου 4 του Π.Δ. 81/93 (Κ.Τ.Π. 2014).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

#### 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Με τον όρο οξυγαλακτικά βακτήρια περιγράφεται μια ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πρόκληση ωφέλιμων ζυμώσεων στα τρόφιμα (Cogan, 1996). Η ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων χαρακτηρίζεται διεθνώς ως LAB (Lactic Acid Bacteria), λόγω του γεγονότος ότι κύριο μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης της λακτόζης στο γάλα ή τα προϊόντα του είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αυτό καθορίζει και το μεταβολικό μονοπάτι. Εάν το προϊόν της

ζύμωσης είναι σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ (85%) τα βακτήρια καλούνται ομοιοζυμωτικά, ενώ αν πέρα από το γαλακτικό οξύ παράγονται και άλλα προϊόντα όπως CO<sub>2</sub> και αιθανόλη καλούνται ετεροζυμωτικά (Stiles & Holzapfel, 1997; Axelsson, 1993).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι θετικά κατά Gram, αρνητικοί στην καταλάση, μη σπορογόνοι, στερούνται κυτοχρώματος, αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια κόκκοι ή βάκιλλοι. Ζυμώνουν τα σάκχαρα με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ, είναι απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά και ευαίσθητα, καθώς και οξεάντοχα. (Axelsson, 1993). Αποτελούν μια ιδιαίτερα ευρεία ομάδα η οποία περιλαμβάνει 12 γένη. Τα κυριότερα γένη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στη γαλακτοκομία είναι ο *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Lactobacillus*. Τα είδη του γένους *Lactobacillus* είναι βάκιλοι, ενώ τα υπόλοιπα είδη των γενών που αναφέρθηκαν είναι κόκκοι (Cogan, 1996).

Ως επί το πλείστον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, αν και ορισμένα έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν και σε υψηλές θερμοκρασίες έως και 45°C ακόμα και σε χαμηλές κάτω από τους 5°C. Επιπλέον, αναπτύσσονται σε pH 4,0-4,5, ενώ ορισμένα καταφέρνουν και επιβιώνουν σε ακραίες τιμές pH όπως 3,2 ή 9,6 (Axelsson, 1993 ; Stiles & Holzapfel, 1997).

## 2.2 Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για πολλά χρόνια, η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζονταν στα φαινοτυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Ο συνεχής εμπλουτισμός με αλληλουχίες 16S rRNA γονιδίων στις βάσεις δεδομένων και η εξέλιξη στις μοριακές μεθόδους οδήγησαν σε αλλαγές στην ταξινόμησή τους (Garrity & Holt, 2001). Τα σημαντικότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* και *Pediococcus*.

### Γένος *Streptococcus* sp.

Στο γένος *Streptococcus* sp. περιλαμβάνονται περίπου 80 διαφορετικά είδη. Πολλά από αυτά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο ή τα ζώα, εκτός από το *Streptococcus thermophilus*, ο οποίος είναι μη παθογόνος και ομοιοζυμωτικός με ευρεία χρήση στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων.

Ο *Str. thermophilus* είναι Gram – θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος με διάμετρο 0,7-0,9μm και διατάσσεται σε μακρές αλύσους. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία από 20 ως 50° C με άριστη τους 40-45° C. Δεν αναπτύσσεται στους 55° C και δεν είναι θερμοφίλος, είναι όμως θερμοάντοχος και ένα μέρος του μπορεί να επιβιώσει κατά την παστερίωση του γάλακτος. Είναι ευαίσθητος στο NaCl, και δεν αναπτύσσεται σε

συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2% (Quinones et al., 1998). Παράγει βακτηριοσίνες και χρησιμοποιείται στη ζύμωση της φέτας και την παραγωγή γιαούρτης. Σε θερμοκρασία 40-42° C και σε pH 6,4-6,6 ζυμώνει ταχεία τη λακτόζη και παράγει γαλακτικό οξύ χωρίς αέριο (Limsowtin et al., 2002).

### **Γένος *Lactococcus* sp.**

Το γένος *Lactococcus*, παλαιότερα ήταν ταξινομημένο στο γένος *Streptococcus*. Πλέον έχει διαχωριστεί περιλαμβάνοντας τους πρώην στρεπτόκοκκους της ομάδας N κατά Lancefield ("γαλακτικοί" στρεπτόκοκκοι). Πρόκειται για κόκκους, μονήρεις τα οποία διατάσσονται σε ζεύγη ή βραχείες αλύσους, είναι ομοζυμωτικοί και μεσόφιλοι. Σήμερα αναγνωρίζονται 8 είδη του γένους *Lactococcus*, όμως μόνο το *Lc. Lactis* ανευρίσκεται συχνότερα στο νωπό γάλα και χρησιμοποιείται ως εκκινητής στην τεχνολογία παρασκευής του γάλακτος (Limsowtin et al., 2002).

Τα κυριότερα υποείδη του *Lc. Lactis* είναι τα:

- *Lc. Lactis* subsp. *lactis*. Σχηματίζει βραχείες αλύσους και έχει τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με το *Str. Thermophilus*. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία μεταξύ 20 ως 45° C, με άριστη τους 30° C. Ακόμη αναπτύσσεται παρουσία NaCl ως 4%. Μερικά στελέχη του παράγουν τη βακτηριοσίνη νισίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως φυσικό συντηρητικό και παρεμποδίζει την ανάπτυξη αρκετών Gram θετικών βακτηρίων.
- *Lc. Lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Χρησιμοποιεί τα κιτρικά άλατα και παράγει πυροσταφυλικό οξύ και από αυτό διακετύλιο, προσδίδοντας ιδιαίτερη γεύση και άρωμα σε κάποια γαλακτοκομικά προϊόντα (όπως γιαούρτη, βούτυρο κ.α).
- *Lc. Lactis* subsp. *cremoris*. Αναπτύσσεται μεταξύ 15 και 30° C για το λόγω αυτό διαφέρει από τα προηγούμενα είδη. Παράγει πολυσακχαρίτες οι οποίοι συμβάλλουν στη διαμόρφωση της επιθυμητής δομής σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα.

### **Γένος *Pediococcus* sp.**

Στο γένος *Pediococcus* έχουν αναγνωριστεί 11 είδη. Είναι ομοζυμωτικοί κόκκοι που σχηματίζουν τετράδες. Τα πιο γνωστά είναι τα *Ped. Acidilactici*, *Ped. Damnosus* και *Ped. Pentosaceus*. Αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις NaCl 4-5 % και σε χαμηλές τιμές pH 4,5. Η θερμοκρασία ανάπτυξης ποικίλει ανάλογα με το είδος. Ορισμένα είδη όπως το *Ped. Pentosaceus* βοηθάει στην ωρίμανση κάποιων τυριών.

### **Γένος *Leuconostoc* sp.**

Όλα τα είδη του γένους *Leuconostoc* είναι κοκκοειδή, ετεροζυμωτικά και αναπτύσσονται ιδανικά σε θερμοκρασίες 20-30° C. Ωστόσο είναι ψυχρότροφα, μπορούν και αναπτύσσονται και σε χαμηλές θερμοκρασίες και δρουν ως αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Lawless et al., 2010). Η επίδρασή τους στα τεχνολογικά χαρακτηριστικά και στην ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι σημαντική. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή CO<sub>2</sub>, το οποίο προκαλεί τις χαρακτηριστικές οπές στο τυρί, και στο διακετύλιο που προσδίδει ευχάριστο άρωμα, ενώ άλλες ουσίες ασκούν και αντιμικροβιακή δράση (πχ. H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>, βακτηριοσίνες) (Shillinger et al., 1996).

Το γένος *Leuconostoc* περιλαμβάνει 12 είδη μερικά από τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκκινητές:

- *Leuc. Mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Ζυμώνει τη λακτόζη με παραγωγή γαλακτικού οξέος και αερίου (CO<sub>2</sub>). Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 10-37° C με άριστη τους 20-30° C. Ορισμένα στελέχη του χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές λόγω της παραγωγής δεξτράνης.
- *Leuc. Mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Ίδιες ιδιότητες με το προηγούμενο.
- *Leuc. Mesenteroides* subsp. *cremoris*. Δεν παράγει δεξτράνη, αναπτύσσεται στους 10-30° C με άριστη θερμοκρασία τους 18-25° C. Χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή τυριού κρέμας, βουτύρου και οξυγάλακτος.
- *Leuc. Lactis*. Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 30° C με όρια 10-40° C. Είναι θερμοάντοχο και ζυμώνει εύκολα τη λακτόζη.

### **Γένος *Enterococcus* sp.**

Τα κύτταρα του γένους *Enterococcus* είναι κόκκοι, ομοζυμωτικοί, μονήρεις, ακίνητοι στο σύνολό τους, καταλάση αρνητικοί και διατάσσονται σε ζεύγη ή βραχείες αλύσους. Αναπτύσσονται ιδανικά στους 37° C (Murray et al., 2001). Τα στελέχη του γένους είναι τα πιο θερμοανθεκτικά βακτήρια στο σύνολο των ασποριογόνων βακτηρίων (Banwart, 1989).

Τόσο στην τεχνολογία τροφίμων όσο και στη δημόσια υγεία οι εντεροκόκκοι είναι αρκετά σημαντικοί, αποτελώντας το πιο αμφιλεγόμενο γένος οξυγαλακτικών βακτηρίων (Valentin et al., 2012). Όπως επίσης έχουν σημασία και στη μικροβιολογία τροφίμων καθώς μεταφέρονται από τα κόπρανα των ζώων στο γάλα.

Σε ορισμένα παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα, η παρουσία εντεροκόκκων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αρώματος και στην ωρίμανσή τους. Τα στελέχη εντεροκόκκων που ενδιαφέρουν την τεχνολογία τροφίμων είναι οι *E. faecalis* και *E. faecium*. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται ως βοηθητικές καλλιέργειες (adjunct cultures) στην παραγωγή ορισμένων τυριών. Παρά το γεγονός της ανικανότητας οξίνισης, εκτιμώνται λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν βακτηριοσίνες και για την λιπολυτική και πρωτεολυτική τους δράση. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά συγκεντρώνουν αμφισβητήσεις ως προς την χρήση τους ως LAB στην παραγωγή ζυμωμένων

γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω της πιθανότητας να εξελιχθούν σε ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο (Limsowtin et al., 2002).

### **Γένος *Lactobacillus* sp. (λακτοβάκιλλοι ή γαλακτοβάκιλλοι)**

Το μέγεθος των βακτηριακών κυττάρων του γένους *Lactobacillus* ποικίλει από εκείνο των κοκκοβακίλλων (1-2 μm) έως των μεγάλων νηματοειδών βακίλλων (10-20 μm). Τα κύτταρά τους σχηματίζουν αλυσίδες, είναι ασπορογόνοι και στην πλειοψηφία τους ακίνητοι. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 2 ως 53° C με άριστη ανάπτυξη μεταξύ 30 και 40° C (Nicolas et al., 2010). Στο γάλα όταν έχει ξεκινήσει η ζύμωση και το pH έχει μειωθεί στο 6,0-6,2 αναπτύσσονται εύκολα και η ανάπτυξή τους συνεχίζεται και σε τιμές pH έως 4,2-4,4 (Curry & Crow, 2002)

Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Orla – Jensen (από το 1919) οι λακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε 3 ομάδες:

- Ομάδα I: Υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί. Παράγουν σχεδόν μόνο γαλακτικό οξύ ζυμώνοντας τις εξόζες.
- Ομάδα II: Προαιρετικά ομοζυμωτικοί. Ζυμώνουν τις εξόζες με παραγωγή αποκλειστικά γαλακτικού οξέος. Σε ορισμένα είδη μπορεί να παρατηρηθεί παραγωγή οξικού οξέος, μυρμηκικού οξέος και αιθανόλης έπειτα από ζύμωση πεντοζών.
- Ομάδα III: Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί. Ζυμώνουν πεντόζες και εξόζες. Τα τελικά προϊόντα μεταβολισμού είναι γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO<sub>2</sub> (Curry & Crow, 2002).

Στο γένος *Lactobacillus* έχουν αναγνωριστεί περίπου 150 είδη και πολλά υποείδη κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Παρακάτω γίνεται αναφορά των βασικότερων ειδών που αφορούν την τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Μετά την αναφορά του κάθε είδους ή υποείδους αναγράφεται στην παρένθεση η φυλογενετική ομάδα στην οποία κατατάσσεται.

#### **Ομάδα I**

- *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Group: *delbrueckii*). Χρησιμοποιείται στην παραγωγή ορισμένων τυριών σε συνδυασμό με άλλα οξυγαλακτικά είδη. Είναι θερμοφίλος εκκινητής με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 40-43° C.
- *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Group: *delbrueckii*). Χρησιμοποιείται στην παραγωγή αρκετών γαλακτοκομικών προϊόντων. Είναι θερμοφίλο με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 40-43° C.
- *Lb. helveticus* (Group: *delbrueckii*). Είναι θερμοφίλο (42-45° C) και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ορισμένων ειδών τυριών. Παράγει βακτηριοσίνες.

- *Lb. acidophilus* (Group: *delbrueckii*). Χρησιμοποιείται για την παραγωγή kefir και του ειδικού ξινογάλακτος "acidophilus milk". Είναι θερμοφίλο είδος.

## Ομάδα II

- *Lb. casei* (Group: *casei*). Μεσόφιλο είδος το οποίο χρησιμοποιείται στην παραγωγή ορισμένων ειδών τυριών. Κάποια στελέχη χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ειδικού ξινογάλακτος. Ασκεί ευεργετική δράση στη λειτουργία του εντέρου και ακόμη ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (da Silva et al., 2013). Ακόμη δρα έναντι ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.
- *Lb. plantarum* (Group: *plantarum*). Μεσόφιλο είδος με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-35° C. Χρησιμοποιείται κυρίως στη ζύμωση φυτικών προϊόντων και στην παραγωγή τυριών.

## Ομάδα III

- *Lb. brevis* (Group: *brevis*). Ετεροζυμωτικό είδος, αναπτύσσεται στους 15° C όχι όμως στους 45° C. Άριστη ζώνη στους 30-32° C. Έχει απομονωθεί από καλλιέργειες kefir και θεωρείται προβιοτικός οργανισμός.

**Πίνακας 1.** Ταξινόμηση του γένους *Lactobacillus* με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (πηγή: Stiles & Holzapel, 1997)

1 <sup>η</sup> ομάδα	2 <sup>η</sup> ομάδα	3 <sup>η</sup> ομάδα
Υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικοί	Προαιρετικά ετεροζυμωτικοί	Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. parakefir</i>
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

## 2.3 Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά, έχοντας την δυνατότητα να μεταβάλλουν τον μεταβολισμό τους αξιοποιώντας διάφορες ουσίες ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Γι' αυτό όταν βρίσκονται στο φυσικό τους



υπόστρωμα όπως είναι το γάλα, χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου και το λίπος και τη λακτόζη ως πηγή άνθρακα. Ενώ όταν βρίσκονται σε τεχνητό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιούν διάφορες πηγές αζώτου και άνθρακα από αυτά. Τα συστατικά αυτά του γαλακτος υπόκεινται σε φυσικοχημικές μετατροπές οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τις βιοχημικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων (McSweeney & Sousa, 2000).

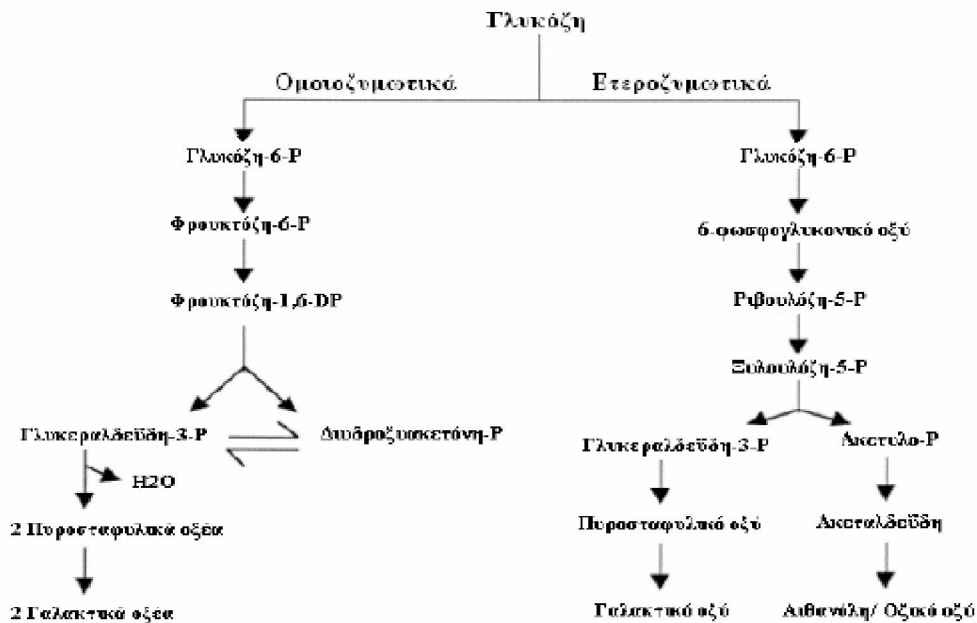
### 2.3.1 Μεταβολισμός σακχάρων

Το κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η ζύμωση των υδατανθράκων με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Για τη ζύμωση των εξοζών υπάρχουν δύο μεταβολικοί οδοί η ομοιογαλακτική ζύμωση, η οποία βασίζεται στη γλυκόλυση και παράγεται αποκλειστικά σχεδόν γαλακτικό οξύ, και η ετερογαλακτική ζύμωση (μεταβολική οδός των φωσφορικών πεντοζών) κατά την οποία εκτός από γαλακτικό οξύ παράγεται επίσης αιθανόλη και CO<sub>2</sub> (Σχήμα 2) (Μπαλατσούρας, 2006).

Με βάση τα κριτήρια αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε:

- Υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικά. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα γένη *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* και η ομάδα I των *Lactobacillus spp.* (*Lb. delbrueckii*, , *Lb. Salivarius*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*) σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Orla – Jensen (1919). Τα ομοιοζυμωτικά βακτήρια χρησιμοποιούν τη μεταβολική οδό των Embden-Meyerhof-Parnas και από ένα μόριο εξόξης παράγουν 2 μόρια γαλακτικού οξέος. Λόγω έλλειψης του ενζύμου φωσφοκετολάση δεν ζυμώνουν πεντόζες (Vandamme et al., 1996; Stiles & Holzapfel, 1997).
- Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά. Περιλαμβάνονται τα γένη *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, και η ομάδα III των *Lactobacillus spp.* (*Lb. brevis*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*) (Vandamme et al., 1996; Stiles & Holzapfel, 1997). Τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά βακτήρια μεταβολίζουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO<sub>2</sub> μέσω της οδού 6-φωσφογλυκονικού οξέος/φωσφοκετολάσης ( Show et al., 1984; Axelsson, 1993; Stiles & Holzapfel, 1997). Η ζύμωση των πεντοζών είναι εφικτή αφού τα βακτήρια αυτά κατέχουν το ένζυμο φωσφοκετολάση (Kandler, 1983)
- Προαιρετικά ετεροζυμωτικά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γένη *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και η ομάδα II των *Lactobacillus spp.* (*Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*) (Vandamme et al., 1996; Stiles & Holzapfel, 1997). Τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια ζυμώνουν τις εξόζες μέσω της γλυκολυτικής οδού, όπως τα ομοιοζυμωτικά βακτήρια, ωστόσο ζυμώνουν και τις πεντόζες, όπως τα ετεροζυμωτικά βακτήρια, μέσω της βιοχημικής οδού των φωσφορικών πεντοζών

(phosphor-ketolase pathway) (Kandler, 1983; Axelsson, 1993; Stiles & Holzapfel, 1997).



**Σχήμα 2.** Γενικό σχέδιο της ζύμωσης της γλυκόζης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Πηγή: Caplice & Fitzgerald, 1999)

### 2.3.2 Μεταβολισμός λιπών (λιπόλυση)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τρι-, δι- και μονοακυλογλυκερίδια, καθώς και διάφορους εστέρες λιπαρών οξέων εξαιτίας της παρουσίας λιπολυτικών ενζύμων (Liu et al., 2004). Οι λακτόκοκκοι και οι γαλακτοβάκιλλοι παρουσιάζουν ελάχιστη λιπολυτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα είδη του γένους *Streptococcus* sp. και *Enterococcus* sp. (Collins et al., 2003). Μικρού βαθμού λιπόλυση επηρεάζει άμεσα το άρωμα των τυριών.

### 2.3.3 Μεταβολισμός των πρωτεϊνών (πρωτεόλυση)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ασθενώς πρωτεολυτικά. Διαθέτουν όμως ένα πρωτεολυτικό σύστημα που είναι ικανό να υδρολύει τις καζεΐνες, προμηθεύοντας τα κύτταρα με τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξή τους στο γάλα (Fox, 1989; McSweeney & Sousa, 2000; Sousa et al., 2001). Για τη βιομηχανία τροφίμων το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει μεγάλη τεχνολογική

σημασία διότι συνεισφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Cairncross & Sjostrom, 1950).

Το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελείται από τρία διαφορετικά στάδια (Pritchard & Coolbear, 1993; Kunji et al., 1996):

- Πρωτεΐνάσες: Οι πρωτεΐνάσες οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο κυτταρικό τοίχωμα ή στην κυτταρική μεμβράνη αποικοδομούν τις καζεΐνες (κύρια πρωτεΐνη στο γάλα και στο τυρί) και διασπούν τους εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια (Pappa & Anifantakis, 2001).
- Πεπτιδάσες: Στο στάδιο αυτό της πρωτεόλυσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες διασπούν τα πεπτίδια προς μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα (Law, 1997).
- Συστήματα μεταφοράς πεπτιδίων μέσα στο κύτταρο: Για την ανάπτυξη βακτηρίων είναι σημαντική η είσοδος των πεπτιδίων μέσα στο κύτταρο. Τα παραγόμενα πεπτίδια και ο βαθμός πρωτεόλυσης των καζεϊνών συνεισφέρουν στα δομικά χαρακτηριστικά του τυριού. Αντίστοιχα, στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού συμβάλουν τα ελεύθερα αμινοξέα και τα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια που παράγονται κατά την πρωτεόλυση. Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν τα πικρά πεπτίδια, τα οποία είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα όπως η φαινυλαλανίνη και η λευκίνη. Προκαλούν μια δυσάρεστη πικρή γεύση η οποία όμως χάνεται κατά την αποικοδόμησή τους (McSweeney & Sousa, 2000).

## **2.4 Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια**

Όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων οι προτιμήσεις του καταναλωτικού κοινού έχουν στραφεί σε φυσικά και βιολογικά συντηρητικά έναντι των χημικών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν εναλλακτική λύση στο πεδίο αυτό καθώς παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις όπως CO<sub>2</sub>, υπεροξείδιο του υδρογόνου, οργανικά οξέα (γαλακτικό, φορμικό, οξικό, καπροϊκό και φαινυλο-γαλακτικό οξύ), διακετύλιο, αιθανόλη και βακτηριοσίνες (Luke, 2000). Οι μεταβολίτες συνεισφέρουν στη βιοσυντήρηση των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, παρέχοντας σταθερότητα και ασφάλεια. Μεγάλης σημασίας είναι η ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν βακτηριοσίνες εντός του τροφίμου και κατά συνέπεια να έχουν ανασταλτική δράση στα παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια (Leroy & De Vuyst, 2004).

### **2.4.1 Βακτηριοσίνες**

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιμικροβιακών ενώσεων. Είναι ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως, συνήθως αμφιφιλικά πεπτίδια, κατιονικά τα οποία συντίθενται στα ριβοσώματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ασκούν αντιμικροβιακή δράση ιδιαίτερα στα Gram θετικά παθογόνα βακτήρια (Salminel et al., 1998). Παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Carnobacterium* sp. *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. και *Leuconostoc* sp. (Klaenhammer, 1988). Η παραγωγή των βακτηριοσινών επηρεάζεται από τη φάση ανάπτυξης του στελέχους, από τις συνθήκες παρασκευής ενός τροφίμου όπως είναι η θερμοκρασία και το pH κατά την ωρίμανση του τυριού, καθώς και από το θρεπτικό μέσο (Yang & Ray, 1994; Parente & Ricciardi, 1999).

Η αντιμικροβιακή δράση, βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική, των βακτηριοσινών περιορίζεται κυρίως στα Gram θετικά βακτήρια, ενώ τα Gram αρνητικά είναι πιο ανθεκτικά. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, η οποία προκαλεί αύξηση της διαπερατότητάς της, τα οποία είναι ευαίσθητα στη δράση της εκάστοτε βακτηριοσίνης (Salminel et al., 1998). Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί δράση των βακτηριοσινών και κατά ορισμένων Gram αρνητικών βακτηρίων, κυρίως όταν συνδυάζεται με παράγοντες όπως η χρήση χηλικών παραγόντων ή το χαμηλό pH που διαταράσσουν τη διαπερατότητα και την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Abee et al., 1995; Jack et al., 1995).

Η εφαρμογή των βακτηριοσινών ως συντηρητικών στα γαλακτοκομικά προϊόντα με πιο φυσικό τρόπο ξεκίνησε με τη χρήση της νισίνης. Η νισίνη, βακτηριοσίνη των στελεχών του γένους *Lactobacillus* sp. έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση όταν ενοφθαλμίζεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Masshalck et al., 2001; Chikindas & Montville, 2002).

**Πίνακας 2.** Κυριότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (πηγή: Μεταξόπουλος et al, 2003)

Βακτηριοσίνη	Παραγωγό στέλεχος	Τρόπος δράσης	Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης
<b>Γένος <i>Pediococcus</i> sp.</b>			
Pediocin Ach	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	Αναστολή ης σύνθεσης ATP, διακοπή του συστήματος μεταφοράς	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>S. aureus</i> <i>C. perfringens</i> <i>L. moocytozenes</i> <i>P. putida</i>
Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PA 1.0	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>L. mesenteroides</i> <i>L. moocytozenes</i>
Pediocin A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>S. aureus</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. botulinum</i>
<b>Γένος <i>Carnobacterium</i> sp.</b>			

Carnobacteriocin A1, A2, A3	<i>Carnobacterium pisciola</i> LV17A	Δεν έχει καθοριστεί	LAB
Carnobacteriocin B1, B2	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	Δεν έχει καθοριστεί	LAB
Carnocin U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Carnobacterium</i> sp.
<b>Γένος <i>Lactococcus</i> sp.</b>			
Diplococcin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346	Αναστολή σύνθεσης DNA, RNA, μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> and <i>cremoris</i>
Lactostrepcin	Στελέχη του <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>diacetyllactis</i> , <i>lactis</i> που δεν παράγουν νισίνη	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., (Group A, C, G) <i>Bacillus cereus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. citrovorum</i> , <i>L. paracitrovorum</i>
Lactostrepcin 5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 202	Απώλεια ιόντων, διακοπή της μεταφοράς ουριδίνης, αναστολή σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνικής σύνθεσης	<i>Lactococcus</i> sp.,
Lactococcin 1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AC1	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.
Lactococcin A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG2130,9BA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i> WM4	Απώλεια των ενδοκυτταρικών συστατικών	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> and <i>diacetyllactis</i> , <i>Clostridium</i> sp.
Lactococcins M and N	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Δεν έχει καθοριστεί	Δεν έχει καθοριστεί
Lactococcin B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Δεν έχει καθοριστεί	Δεν έχει καθοριστεί
Nisin	Διάφορα στελέχη <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Εκροή των αμινοξέων και των κατιόντων, διαταραχή του δυναμικού της μεμβράνης	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>S. aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. typhimutium</i>
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ481	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>C. tyrobutyricum</i>
<b>Γένος <i>Lactobacillus</i> sp.</b>			
Fermentacin	<i>Lactobacillus fermenti</i>	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp
Plantaricin A	<i>L. plantarum</i> C-11	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp
Plantaricin B	<i>L. plantarum</i> NCDO1103	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesederoides</i> , <i>P. Damnosus</i>
Sakacin A	<i>L. sakei</i> 706	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.,

			<i>Enterococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
Sakacin M	L.sakei 184	Βακτηριοστατική	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>
Sakacin P	L.sakei LTH673	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Brochothrix thermo-</i> <i>sphacta</i>
Lactocin S	L.sake L45	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
Curvacin A	L.curvatus LTH1174	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
Brevicin	L.brevis 37	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
Caseicin 80	L.casei B80	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. casei</i>
Plantaricin BN	L.plantarum BN	Βακτηριοκτόνος	<i>L. sakei</i>
Bavaracin MN	L.bavaricus MN	Βακτηριοκτόνος	<i>L. sakei</i>
Lactocin 27	L.helveticus LP27	Εκροή ιόντων από τα κύτταρα	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i>
Helveticin J	L.helveticus 481	Δεν έχει καθοριστεί	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. helveticus</i>
Helveticin V-1829	L.helveticus V-1829	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp.
Lactacin F	L.acidophilus 11088	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>E. faecalis</i>
Lactacin B	L.acidophilus N2	Δεν έχει καθοριστεί	<i>Lactobacillus</i> sp.

Σύμφωνα με μελέτες οι βακτηριοσίνες είναι περισσότερο αποτελεσματικές στα διάφορα συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο κατά τη μελέτη τους από ότι στα τρόφιμα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και των παραγωγών στελεχών των βακτηριοσινών των τροφίμων έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας των βακτηριοσινών (Schillinger et al., 1996).

Οι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των LAB που παράγουν βακτηριοσίνες είναι:

- Η απώλεια της ικανότητας παραγωγής των βακτηριοσινών.
- Ο ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στα τρόφιμα.
- Οι ανεπαρκείς συνθήκες περιβάλλοντος, όπως το pH, τα θρεπτικά συστατικά και η θερμοκρασία, για την παραγωγή των βακτηριοσινών.
- Η μόλυνση από βακτηριοφάγους.

(Schillinger et al., 1996)

Οι παράγοντες που επιδρούν αρνητικά στο μόριο της βακτηριοσίνης είναι:

- Η απενεργοποίηση των βακτηριοσινών, από τα πρόσθετα των τροφίμων.
- Η επίδραση του pH στη σταθερότητα και δραστικότητα των βακτηριοσινών.
- Η χαμηλή διαλυτότητα, η άνιση και ανεπαρκής διάχυση των βακτηριοσινών μέσα στη μάζα των τροφίμων.
- Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στις βακτηριοσίνες ή παθογόνων βακτηρίων.
- Η δέσμευση των βακτηριοσινών από τα διάφορα συστατικά του τροφίμου.
- Η ύπαρξη φυσιολογικών μηχανισμών, όπως η οξειδωση του λίπους, αλλά και διάφορων παραγόντων, όπως τα ένζυμα (πρωτεάσες), που αποσταθεροποιούν τη βιολογική δραστηριότητα των.

(Schillinger et al., 1996)

## 2.5 Οξυγαλακτικά βακτήρια και προβιοτικά

Τα προβιοτικά ανακαλύφθηκαν το 1907 από τον βραβευμένο με νόμπελ Ρώσο μικροβιολόγο Elie Metchnikoff (1845-1916). Γύρω στο 1908, υπέθεσε πως η μακροζωία του Καυκάσιου πληθυσμού οφειλόταν στην κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τα τυριά και το βουτυρόγαλα. Ο Elie Metchnikoff, είχε την πεποίθηση ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια που περιέχονται στα τρόφιμα αυτά είναι ικανά να αντικαταστήσουν τους επιβλαβείς οργανισμούς που υπάρχουν στο έντερο και να μειώσουν την παραγωγή τοξινών που οδηγούν σε μολύνσεις (Singh et al., 2011).

Η έννοια των προβιοτικών έχει εξελιχθεί με τα χρόνια. Η λέξη προβιοτικό είναι σύνθετη και προέρχεται από την λατινική λέξη «προ» και την ελληνική λέξη «βιοτικό» που σημαίνουν «για τη ζωή» (Leroy et al., 2008). Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος για τα προβιοτικά ήταν αυτός του Fuller: «τα προβιοτικά είναι ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα διατροφής τα οποία επιδρούν ευεργετικά στο ζώο – ξενιστή βελτιώνοντας την μικροβιακή του ισορροπία» (Fuller, 1989). Σήμερα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) τα προβιοτικά ορίζονται «ως ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2006).

Οι Lilly και Stillwell, το 1965, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στα οξυγαλακτικά βακτήρια ως προβιοτικά (Lilly & Stillwell, 1965). Στο έργο του Parker (1974) σχετικά με τα συμπληρώματα διατροφής των ζώων με ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ξενιστή επαναπροσδιορίζει τον όρο προβιοτικά ως «μικροοργανισμούς και συστατικά τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της φυσιολογικής ενότητας και ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας» (Salminen et al., 1999).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της ικανότητάς τους να παραμένουν ζωντανά στο έντερο και να παρέχουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή θεωρούνται ως προβιοτικά (Holzapfel et al., 2001; Anal & Singh, 2007). Κατά την παραγωγική διαδικασία προβιοτικών προϊόντων επιλέγονται βακτήρια ανάλογα με τις ικανότητές τους να παρουσιάζουν όλα τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των LAB και να συνδέονται οι ιδιότητές τους με την υγεία του οργανισμού (Salminen & Ouwenhand, 2002).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν το κύριο μέσο χορήγησης των προβιοτικών μέσω της διατροφής (Sanchez et al., 2009). Η κατανάλωση προβιοτικών προϊόντων, όπως γιαούρτη, τυρί και γαλακτοκομικά ροφήματα που έχουν υποστεί ζύμωση, φαίνεται ότι προάγουν την υγεία (Czinn et al., 2008).

Τα πιο συχνά και κύρια χρησιμοποιούμενα προβιοτικά στα τρόφιμα ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (FAO/WHO, 2001) καθώς επιδρούν ευεργετικά στην υγεία (Tuohy et al., 2003; Ross et al., 2005; Bhardeay et al., 2011). Γενικά οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί υποχρεούνται να αναγνωρίζονται ως ασφαλείς (GRAS – Generally Regard As Safe) (Gupta & Garg, 2009). Τα είδη των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* είναι Gram – θετικά βακτήρια τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ (FAO/WHO, 2001). Η χρήση των γαλακτοβάκιλλων ως προβιοτικά είναι ευρεία λόγω της ανθεκτικότητας στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο πεπτικό σύστημα. Αντίθετα τα *Bifidobacterium* είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο και έχουν μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις γι' αυτό και χρησιμοποιούνται λιγότερο (Holt & Krieg et al., 1994). Ορισμένα από αυτά τα είδη αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας σε ανθρώπους και ζώα (de Vrese et al., 2008).

Επιπλέον υπάρχουν και άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικές ιδιότητες τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3.** Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια	Άλλοι μικροοργανισμοί
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcuslactis</i>	<i>Esherichia coli</i> <i>strain nissle</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardiilyo</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>		



<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>subsp. bulgaricus</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. gallinarum</i>	
<i>L. gasseri</i>	
<i>L. johnsonii</i>	
<i>L. paracasei</i>	
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius</i>	

(πηγή: Anukam, 2007)

Στο γένος *Lactobacillus* ανήκουν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα οξυγαλακτικά ως προβιοτικά (Holzapfel et al., 2001). Τα πιο συχνά είδη που χρησιμοποιούνται στις εμπορικές εφαρμογές των προβιοτικών είναι ο *Lb. acidophilus* και ο *Lb. rhamnosus* (Goktepe, Juneja & Ahmedna, 2005). Ο *Str. thermophilus* και ο *Lb. bulgaricus* αν και δεν θεωρούνται προβιοτικά είναι σημαντικά οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη γαλακτοβιομηχανία ιδίως στην παραγωγή γιαούρτης (Felis & Dellaglio, 2007).

Έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα ως προς την ιδιότητά τους να περιέχουν προβιοτικά βακτήρια (Saxelin et al., 2005; Settani & Moschetti, 2010). Τα τυριά αποτελούν ιδανικά προϊόντα για την μεταφορά των προβιοτικών στο ανθρώπινο έντερο (Settani & Moschetti, 2010) σε σύγκριση με άλλα όξινα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως η γιαούρτη (Albenzio et al., 2013). Αυτό οφείλεται στη συμπαγή μάζα των τυριών, στο υψηλό pH και στη χαμηλή ελεύθερη οξύτητα (Ross et al., 2002).

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες παρουσιάζεται ότι οι προβιοτικές δραστηριότητες ορισμένων βακτηρίων εξαρτώνται από το στέλεχος και όχι από το είδος. Η επιλογή των προβιοτικών στηρίζεται σε ποικίλα κριτήρια. Το στέλεχος θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: αντοχή κατά τη διέλευση στον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα, να είναι ανθρώπινης προέλευσης (Fuller, 1989) και να επικολλλάται στον εντερικό επιθηλιακό ιστό (Morelli, 2000; Gorbach, 2002). Επίσης η ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα αποτελεί σημαντικό και αναγκαίο χαρακτηριστικό στην επιλογή των προβιοτικών στελεχών (Fuller, 1989). Ένας μικροοργανισμός για να ταξινομηθεί ως προβιοτικό θα πρέπει η αποτελεσματικότητά και η επίδραση του να έχει αποδειχθεί σε κλινικές δοκιμές in vitro, στις οποίες χρησιμοποιούνται στελέχη γενών *Bacillus*, *Escherichia*,

*Enterococcus*, και *Saccharomyces*, και να έχει οριστεί η ασφαλής χρήση του και δοσολογία. (Fric, 2007).

## 2.6 Ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα

Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αρκετά σημαντική και ο ρόλος τους στην προσθήκη αυτών είναι:

- Η παραγωγή γαλακτικού οξέος με ή χωρίς αέριο. Το μεγαλύτερο ποσοστό παράγεται από τα θερμοφιλα ομοιοζυμωτικά βακτήρια (πχ. *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*)(Ανυφαντάκης, 1992).
- Η προώθηση της ζύμωσης στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα όπου ελέγχουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας τους και δεν επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό και την παραμονή των ανεπιθύμητων βακτηρίων που υπάρχουν στο γάλα (Ανυφαντάκης, 1992).
- Ευνοείται η παραγωγή βουτύρου, το στράγγισμα καθώς και η πήξη του γάλακτος και η ωρίμανση των τυριών (Ramet, 1986).
- Έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση του χρόνου διατήρησης των γαλακτοκομικών προϊόντων (Salminen & Ouwehand, 2002).
- Ευνοείται η λιπόλυση
- Βελτιώνουν το άρωμα των ζυμωμένων προϊόντων (Ανυφαντάκης, 2004).
- Ορισμένα βακτήρια συνθέτουν βιταμίνες του συμπλέγματος Β αυξάνοντας τη θρεπτική αξία στα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως πχ.:
  - ✓ *Propionibacterium shermanii*: συνθέτει τη βιταμίνη Β12.
  - ✓ *Leuconostoc*: συνθέτουν τις βιταμίνες Β12 και ριβοφλαβίνη.
  - ✓ *Lactobacillus acidophilus*: συνθέτει τις βιταμίνες Β12, νιασίνη και ασκορβικό οξύ. (Axelsson, 1993).
- Δημιουργούν χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής (Ανυφαντάκης, 2004)
- Βοηθούν στην επιτάχυνση της ωρίμανσης των ζυμώσιμων προϊόντων μέσω των ενζυμικών συστημάτων που απελευθερώνουν (Ανυφαντάκης, 2004).
- Ορισμένα στελέχη σχηματίζουν πολυσακχαρίτες και αυξάνουν το ιξώδες ορισμένων όξινων προϊόντων (Ballesteros et al., 1999).
- Παράγουν βακτηριοσίνες (Axelsson, 1993)
- Κάποια στελέχη λειτουργούν ως προστατευτικές καλλιέργειες (Axelsson, 1993)
- Ορισμένα στελέχη, χαρακτηριζόμενα ως προβιοτικά, επιδρούν ευνοϊκά στο πεπτικό σύστημα και στην υγεία του ανθρώπου (π.χ. *L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*) (Isolauri, 2001)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### 3.1 Γαλοτύρι και οξυγαλακτικά βακτήρια

Επειδή το τυρί «γαλοτύρι» έχει ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, εκτιμάται ιδιαίτερα από τους Έλληνες καταναλωτές και υπάρχει μεγάλη ζήτηση για την παραγωγή του. Ως αποτέλεσμα, πολλές εγκαταστάσεις παραγωγής σε διάφορες περιοχές της χώρας να παράγουν τυριά που μοιάζουν με το γαλοτύρι, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικές διαδικασίες από το τυρί ΠΟΠ (Zoidou et al., 2016). Διαφορές παρατηρούνται ειδικά μεταξύ των προϊόντων που παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα συγκριτικά με αυτά που παράγονται σε μικρότερες εγκαταστάσεις από παραγωγούς (Samelis & Kakouri, 2007).

Στην παρασκευή του τυριού «γαλοτύρι» πολύ σημαντικό ρόλο για την διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αλλά και την ικανότητα συντήρησης έχει το είδος της οξυγαλακτικής καλλιέργειας (Rogga et al. 2005; Samelis & Kakouri, 2007). Οι Samelis & Kakouri (2007) μελέτησαν τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά στο τυρί 'Γαλοτύρι' κατά την παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα σε σχέση με το παραδοσιακό τυρί που παράγεται σε μικρότερες εγκαταστάσεις. Η εκλεκτικότητα των μικροβιακών καλλιέργειών ελέγχθηκε με κατάλληλες ταχείες δοκιμές σύμφωνα με τους Samelis et al. (1998). Τα κυρίαρχα είδη LAB που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες εξετάστηκαν για θετικές κατά Gram και αρνητικές στη καταλάση αποικίες. Οι απομονωμένες αποικίες ελέγχθηκαν ως προς τη μορφολογία τους όταν αναπτύσσονται στους 15 και 45° C σε 2,4, ή 6,5 NaCl και για την παραγωγή αερίου από την υδρόλυση της γλυκόζης και της αργινίνης ( Samelis et al., 1998). Στο τυρί 'Γαλοτύρι' βιομηχανικής κλίμακας σε σύγκριση με το παραδοσιακό τυρί δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον πληθυσμό των LAB που καλλιεργήθηκαν στα θρεπτικά υλικά. Ωστόσο, υπήρχαν σημαντικές διαφορές για το κυρίαρχο είδος σε κάθε τύπο τυριού, λόγω ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές σε κάθε τυρί. Συγκεκριμένα, στο βιομηχανικού τύπου τυρί η πλειοψηφία των αποικιών που απομονώθηκαν ήταν ομοιοζυμωτικοί, αρνητικά στην αργινίνη, θερμοάντοχα (ανάπτυξη στους 45° C όχι όμως στους 15° C), κόκκοι, αδυναμία ή καθόλου ανάπτυξη σε 2% NaCl. Συνεπώς το είδος που πιθανόν χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Streptococcus thermophilus*. Αντίθετα, στο τυρί που παράγεται σε μικρότερες εγκαταστάσεις οι αποικίες ήταν ομοιοζυμωτικές, αρνητικές στην αργινίνη, μεσόφιλες (ανάπτυξη στους 15° C όχι στους 45° C), λακτοβάκιλλοι (66,7% των απομονωθέντων αποικιών) και λακτόκοκκοι (26,7%) τα οποία ήταν σε θέση να αναπτυχθούν σε 4 και 6,5% NaCl. Ένα μικρό μέρος της μικροχλωρίδας και στους δυο τύπους τυριών που μελετήθηκαν αποτελούνταν από

οξυγαλακτικά βακτήρια με παραγωγή αερίου. Οι απομονωμένες αποικίες αντιπροσωπεύαν το στέλεχος *Leuconostoc* (βακτήρια αρνητικά στην αργινίνη, κοκκοειδή, αναπτύσσονται στους 15 και 45° C και σε NaCl 6,5%). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος θερμοφίλων λακτοβακίλλων σε κανένα από τα δύο είδη τυριού, υποδηλώνοντας ότι αυτή η ομάδα ήταν υποδεέστερη ή απύσχα. Στην πραγματικότητα οι πληθυσμοί των θερμοφίλων λακτοβακίλλων υπερκαλύφθηκαν από τους μεσόφιλους λακτοβακίλλους μετά την επώασή τους στους 30° C και όχι στους 37° C που είναι πιο ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης για τους θερμοφίλους γαλακτοβακίλλους. Έχει βρεθεί ότι μεσόφιλα είδη LAB κυριαρχούν σε πολλά παραδοσιακά τυριά (Piraino et al., 2005; De Angelis et al., 2001; Hatzikamari et al., 1999). Συμπεραίνουμε ότι στην εργασία των Samelis & Kakouri (2007) διαπιστώθηκε μεγάλη ποικιλότητα στα οξυγαλακτικά βακτήρια στα τυριά που παράγονται από παραγωγούς με το είδος *Lc. lactis* ως κυρίαρχο είδος. Αντίθετα στα τυριά που παράγονταν σε βιομηχανική κλίμακα διαπιστώθηκε μικρότερη ποικιλότητα με κυρίαρχο είδος το *S. thermophilus*. Τα παραγόμενα προϊόντα μοιάζουν περισσότερο με "Αλατισμένο προϊόν τύπου γιαουρτιού" και δεν είναι αντιπροσωπευτικό του παραδοσιακού τυριού «ΓΑΛΟΤΥΡΙ ΠΟΠ».

Σημαντικό είναι να μελετηθούν το είδος, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων και πως αυτοί διαμορφώνονται κατά τα διάφορα στάδια παρασκευής και συντήρησης αυτού του τυριού, ανάλογα με τις εφαρμοζόμενες τεχνολογίες παρασκευής. Σε ερευνητικό επίπεδο έχουν προταθεί εμπορικές καλλιέργειες και διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής (Kondyli et al., 2002; Kondyli et al. 2008; Kondyli et al., 2013). Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για το είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα διάφορα τυριά που διακινούνται στην ελληνική αγορά ως «γαλοτύρι». Επίσης ενδιαφέρον υπάρχει σχετικά με χρήση προσθήκη προβιοτικών βακτηρίων στην παραγωγή του προϊόντος (Zoidou et al., 2016). Σημαντικό θα ήταν η απομόνωση σε υψηλούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτική δράση.

Οι Zoidou et al., 2016 μελέτησαν την παραγωγή του τυριού 'Γαλοτύρι' με τη προσθήκη εμπορικής καλλιέργειας εκκίνησης μαζί με προβιοτικά στελέχη το *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei subsp. Paracasei* και *Lb. rhamnosus*. Μελετήθηκαν 5 τύποι τυριού 'Γαλοτύρι' : τυρί που περιείχε μόνο μεσόφιλη καλλιέργεια BT002, η οποία αποτελείται από ένα μείγμα *Lc. Lactis spp. Lactis*, *Lc. Lactis spp. Cremoris* και *Lc. Lactis spp. Lactis biovar diacetylactis*, και τα υπόλοιπα 4 είδη περιέχουν τη μεσόφιλη καλλιέργεια μαζί με το προβιοτικό στέλεχος. Μετά την επώαση στους 37° C οι αποικίες ταυτοποιήθηκαν ανάλογα με την μορφολογία τους. Οι αποικίες των στελεχών του *Lb. acidophilus* ήταν μεγάλες, ανοιχτό καφέ, με ακανόνιστο σχήμα, του *Lb. paracasei* και του *Lb. rhamnosus* εντοπίστηκαν ως φουσκωτές, στρογγυλές, κρεμώδεις, λευκές αποικίες και ήταν όλα αρκετά διακριτά από τις πιο μικρές, επίπεδες, στρογγυλές γκρι αποικίες των μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν επίσης. Καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης των τυριών η βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών διατηρούνταν χωρίς σημαντικές αλλαγές. Το περιβάλλον του τυριού δεν επηρέασε την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων και αυτά παρέμεναν βιώσιμα, πάνω από το

συνιστάμενο επίπεδο των  $10^6$  cfu gr-1, ικανοποιώντας τα κριτήρια που έχουν καθοριστεί για τα προβιοτικά τρόφιμα. Όσο για τη μεσόφιλη οξυγαλακτική καλλιέργεια εκκίνησης ο αριθμός τους μειώθηκε μέχρι το τέλος της αποθήκευσης. Η μείωση αυτή πιθανόν σχετίζεται με το χαμηλό pH αφού οι μεσόφιλοι κόκκοι αναστέλλονται όταν το pH πέφτει κάτω από το 5,5 (Parente & Cogan, 2004). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι τα προβιοτικά στελέχη δεν άσκησαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη των εκκινήτων και οι συνθήκες παραγωγής του τυριού ήταν κατάλληλες για αυτά. Ακόμη, το pH παρέμεινε σταθερό χωρίς σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης, από 4,4 ως 4,5. Η προσθήκη προβιοτικών στο γάλα δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τυρί "Γαλοτύρι" με προβιοτικά στελέχη δεν επηρεάζουν τη χημική σύνθεση του τυριού και δεν επιφέρουν καμία δυσμενή επίδραση στα ποιοτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια αποθήκευσης. Το Γαλοτύρι με προβιοτικά στελέχη περιέχει ακόμη ίχνη από διακετύλιο, και ακεταλδεΐδη σε υψηλότερα επίπεδα από το τυρί "Γαλοτύρι" που παράγεται μόνο με εκκινήτες. Τα προβιοτικά βακτήρια επέζησαν επαρκώς κατά την συντήρηση στους  $4^{\circ}$  C.

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### 4.1 Συλλογή των δειγμάτων

Για τον σκοπό της εργασίας αυτής κατά τη διάρκεια των μηνών Απρίλιου και Μαΐου του 2019 λήφθηκαν δείγματα τυριού «γαλοτύρι» από δύο διαφορετικές εγκαταστάσεις παραγωγής (“Εγκατάσταση Α” και “Εγκατάσταση Β”). Από κάθε εγκατάσταση λήφθηκαν δείγματα (1 kg το καθένα) που ήταν έτοιμα για διακίνηση μετά από μικρό διάστημα μετά την παρασκευή τους (10-18 ώρες στους 15° C) («φρέσκο») και δείγματα τυριού μετά από διατήρηση υπό ψύξη (5 ημερών) όπως στην εργασία των Kykkidou et al. 2007.

Τα δείγματα μεταφέρονταν σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης (4<sup>ο</sup>C) στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εξετάζονταν άμεσα, μέσα στην επόμενη ώρα. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειραματισμού.

### 4.2 Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

Ποσότητα 25 g από κάθε δείγμα τοποθετούνταν ξεχωριστά σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher και γινόταν προσθήκη 225 ml πεπτονόχου ύδατος 0.1% (Merck, Darmstadt, Germany), ώστε να επιτευχθεί μια αρχική αραιώση 1:10. Τα δείγματα ομογενοποιούνται σε συσκευή stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical Ltd., London, UK) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε Maximum Recovery Diluent MRD. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός των δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιώντας την τεχνική ενσωμάτωσης σε τρυβλία M17 (για την καταμέτρηση των *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococci* spp., και *Pediococcus* spp.) (Condalab, Madrid, Spain) και σε τρυβλία de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) άγαρ (Condalab, Madrid, Spain), (για την καταμέτρηση των *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.) σύμφωνα με τους Kallinteri et al., 2013. Μετά από επώαση των τρυβλίων για 48 h στους 30 και 37° C, αντίστοιχα υπό αναερόβιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά γραμμάριο (cfu/g).

### 4.3 Απομόνωση και Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μετά την καταμέτρηση, πέντε αποικίες από κάθε δείγμα τυριού λήφθηκαν τυχαία και από τα τρυβλία MRS και M17 που αντιστοιχούσαν στην υψηλότερη αραίωση στην οποία σημειώθηκε η ανάπτυξη. Για την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών οι αποικίες που λήφθηκαν ενοφθαλμίστηκαν με την τεχνική επιφανειακής επίστρωσης στα αντίστοιχα θρεπτικά υλικά, σε MRS για *Lactobacillus* spp. και *Leuconostoc* spp. και σε M17 για *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. και *Pediococcus* spp. Η επώαση διεξήχθη σε κατάλληλες θερμοκρασίες ανάπτυξης ανάλογα με το στέλεχος LAB (30 ή 37 ° C) κατά τη διάρκεια 24-48 ωρών υπό αναερόβιες συνθήκες.

Μετά την επώαση, ακολούθησε ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών με Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ακολουθώντας το πρωτόκολλο της ταχείας εξαγωγής των ριβοσωμικών πρωτεϊνών με τη χρήση 70% μυρμηκικού οξέος σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Λεπτομερώς, αρχικά οι ύποπτες αποικίες επιστρώθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο στην MALDI-πλάκα (96-target steel MALDI-plate). Κατόπιν, υπερκαλύφθηκε με 1 μl διαλύματος μυρμηκικού οξέος 70% (Formic Acid 85% AG, Penta, Praha) και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ένα (1) μl διαλύματος μήτρας (matrix solution) τοποθετήθηκε στη συνέχεια στο δείγμα. Το διάλυμα μήτρας που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν κορεσμένο διάλυμα κύανο-4-υδροξυσυναμινικού οξέος (saturated solution of cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix) (HCCA matrix, Bruker Daltonics) με 50% ακετονιτρίλιο και 2,5% τρι-φλουορο-ακετοξικό οξύ (trifluoroacetic acid). Το μίγμα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εισήχθη στον φασματογράφο μάζας για την πραγματοποίηση των αναλύσεων.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Germany) στο Εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την απόκτηση των φασμάτων ο φασματογράφος μάζας ρυθμίστηκε σε θετική γραμμική ανάλυση ιόντων και σε συχνότητα laser στα 60 Hz. Το εύρος μαζών εντός του οποίου καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κορυφές ήταν από m/z 2000 έως 20.000. Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις Microflex LT με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις ήταν: πηγή ιόντων 1: 20kV, πηγή ιόντων 2: 18,5kV, φακοί: 6kV, παλμική εξαγωγή ιόντων: 100 ns.



Η μέθοδος βαθμονομήθηκε εξωτερικά με τη χρήση του Bruker Bacterial Test Standard (BTS), ενός τεχνητού εκχυλίσματος του στελέχους *Escherichia coli* DH5-a στο οποίο έχουν προστεθεί δύο επιπλέον πρωτεΐνες (RNAase A και μυογλοβίνη) ώστε να επεκταθούν τα ανώτερα όρια των μαζών που καλύπτονται από το BTS. Τα πρωτογενή φάσματα αποκτήθηκαν αυτομάτως με το λογισμικό AutoXecute Control (FlexControl 3.4, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Τα αποτελέσματα των ταυτοποιήσεων αποκτήθηκαν με το λογισμικό Maldi Biotyper Real Time Classification του συστήματος και αξιολογήθηκαν βάσει τη βαθμολογία ταυτοποίησης (score value): οι τιμές του score value κυμαίνονται από 0.000 έως 3.000 και είναι ο λογάριθμος της ομοιότητας μεταξύ του υπό ανάλυση φάσματος και των φασμάτων της βάσης δεδομένων ως προς το γένος και το είδος. Βαθμολογία από 2.3 έως 3.000 αντιστοιχούν σε εξαιρετικά πιθανή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους ενώ μεταξύ 2.00 και 2.299 αντιπροσωπεύουν ασφαλή ταυτοποίηση ως προς το γένος και πιθανή ταυτοποίηση ως προς το είδος. Λογαριθμική βαθμολογία που κυμαίνεται από 1.700 έως 1.999 αντιπροσωπεύει μία πιθανή ταυτοποίηση είδους και επιπρόσθετες αναλύσεις απαιτούνται προκειμένου να δοθεί αξιόπιστο αποτέλεσμα ταυτοποίησης. Τέλος, λογαριθμική βαθμολογία μεταξύ 0.000 και 1.699 δεν θεωρείται αξιόπιστη ταυτοποίηση και περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, ανάλυση και αξιολόγηση είναι απαραίτητες. Συνολικά απομονώθηκαν και τέθηκαν υπό ταυτοποίηση 30 αποικίες (15 από το MRS και 15 από το M17).

#### **4.4 Μέτρηση της τιμής του pH**

Η μέτρηση της τιμής του pH στα δείγματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Kallinteri et al, 2013 με ψηφιακό pH-μετρο (Consort C860) με απευθείας είσοδο του γυάλινου ηλεκτρόδιου στη μάζα του τυριού. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και καταγράφηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### 5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στους πίνακες 1,2,3. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1 στα δείγματα αμέσως μετά την παρασκευή του τυριού («φρέσκο») που προέρχονταν από την «Εγκατάσταση Α» ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ήταν  $6,45 \pm 0,45$  log cfu/g και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus* ήταν  $8,41 \pm 0,36$  log cfu/g. Στα δείγματα «5 ημερών» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) τόσο στον πληθυσμό των *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ( $7,12 \pm 0,43$  log cfu/gr) όσο στον πληθυσμό των *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* ( $8,36 \pm 0,14$  log cfu/g).

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» στο «φρέσκο» προϊόν καταγράφηκε υψηλός πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* με τιμές  $9,52 \pm 0,40$  log cfu/g και  $9,76 \pm 0,32$  log cfu/g αντίστοιχα. Στα δείγματα «5 ημερών» παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μικρότερος ( $P < 0,05$ ) πληθυσμός για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus*,  $6,02 \pm 0,49$  log cfu/g και  $7,70 \pm 0,33$  log cfu/g, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων παραγωγής διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) για το «φρέσκο» προϊόν τόσο για γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ( $6,45 \pm 0,45$  log cfu/g για την «Εγκατάσταση Α»,  $9,52 \pm 0,40$  log cfu/g για την «Εγκατάσταση Β»), όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* ( $8,41 \pm 0,36$  και  $9,76 \pm 0,32$  log cfu/g, για τις Εγκαταστάσεις Α και Β, αντίστοιχα). Για τα δείγματα «5 ημερών» στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) διαπιστώθηκε μόνο στους πληθυσμούς στα γένη *Lactococci*, *Streptococcus*, *Enterococci*, *Pediococci*, ( $8,36 \pm 0,14$  και  $7,70 \pm 0,33$  log cfu/g για τις Εγκαταστάσεις Α και Β, αντίστοιχα).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η τιμή του pH στα στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής.

Από τη μέτρηση του pH στα δείγματα αμέσως μετά την παρασκευή του τυριού («φρέσκο») που προέρχονταν από την «Εγκατάσταση Α» η τιμή του pH ήταν  $4,57 \pm 0,05$ . Στα δείγματα «5 ημερών» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P > 0,05$ ) με την τιμή του pH να παρουσιάζει μια μικρή ελάττωση σε  $4,48 \pm 0,06$ .

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» στο «φρέσκο» προϊόν η τιμή του pH ήταν  $4,23 \pm 0,04$ . Στα δείγματα «5 ημερών» παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P < 0,05$ ) με την τιμή του pH να παρουσιάζει μια μικρή αύξηση σε  $4,36 \pm 0,04$ .

Συγκρίνοντας το pH μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων παραγωγής διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) για το «φρέσκο» προϊόν ( $4,57 \pm 0,05$  για την «Εγκατάσταση Α» και  $4,23 \pm 0,04$  για την «Εγκατάσταση Β»). Για τα δείγματα «5 ημερών» διαπιστώθηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) στο pH των δύο εγκαταστάσεων ( $4,48 \pm 0,06$  και  $4,36 \pm 0,04$  για τις Εγκαταστάσεις Α και Β, αντίστοιχα).

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής.

Στην «Εγκατάσταση Α» στο «φρέσκο» προϊόν από τις 30 αποικίες που εξετάστηκαν 13 (43,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. plantarum*, 13 (43,33%) ως *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* και 1 (3,33%) ως *Lb. brevis*. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα για το προϊόν «5 ημερών», το κυρίαρχο είδος ήταν ο *Lb. plantarum* (13 από τις 30 αποικίες, 43,33%), και ακολουθούσε ο *Str. thermophilus* (40%), ενώ 1 αποικία (3,33%) ταυτοποιήθηκε ως *Lb. paracasei*.

Αντίθετα στην «Εγκατάσταση Β» διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ «φρέσκου» και του προϊόντος «5 ημερών» στα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν. Στο «φρέσκο» προϊόν από τις 30 αποικίες που εξετάστηκαν οι 23 (93,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lc. lactis* και 1 αποικία (3,33%) ως *Str. thermophilus*. Για το προϊόν «5 ημερών» το κυρίαρχο είδος ήταν *Lb. paracasei* (15 από τις 30 αποικίες, 50%). Επίσης 5 αποικίες (16,66%) ταυτοποιήθηκαν ως *E. faecalis*, 3 (9,99%) ως *E. durans*, 1 (3,33%) ως *E. faecium*, 1 αποικία (3,33%) ως *Lb. rhamnosus* και 1 αποικία (3,33%) ως *Str. thermophilus*.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, διαπιστώθηκε αδυναμία ταυτοποίησης κάποιων αποικιών. Στην «Εγκατάσταση Α» τόσο στο «φρέσκο» προϊόν όσο και στο προϊόν «5 ημερών», 3 αποικίες (9,99%) δεν ταυτοποιήθηκαν. Στην «Εγκατάσταση Β» το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 13,33 % τόσο στο «φρέσκο» προϊόν όσο και στο προϊόν «5 ημερών».

Επίσης διαπιστώθηκε η ταυτοποίηση ορισμένων αποικιών σε άλλο είδος μικροοργανισμού. Στο προϊόν «5 ημερών» της «Εγκατάστασης Α» 1 αποικία (3,33%) ταυτοποιήθηκε ως *Staphylococcus lugdunensis*, και στο «φρέσκο» προϊόν της «Εγκατάστασης Β» 4 αποικίες (13,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Hafnia alvei*.

**Πίνακας 4.** Πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής (Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση).

Οξυγαλακτικά βακτήρια	Πληθυσμός (log cfu/g)			
	Εγκατάσταση Α		Εγκατάσταση Β	
	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ
<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp.	6,45±0,45 <sup>α</sup>	7,12±0,43 <sup>α</sup>	9,52±0,40 <sup>β</sup>	6,02±0,49 <sup>α</sup>
<i>Lactococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.	8,41±0,36 <sup>α</sup>	8,36±0,14 <sup>α</sup>	9,76±0,32 <sup>β</sup>	7,70±0,33 <sup>γ</sup>

<sup>α,β,γ</sup> = Μέσοι όροι στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

**Πίνακας 5.** Τιμή του pH στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής (Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση).

Τιμή pH	Εγκατάσταση Α		Εγκατάσταση Β	
	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ
	4,57± 0,05 <sup>α</sup>	4,48± 0,06 <sup>α</sup>	4,23±0,04 <sup>β</sup>	4,36±0,04 <sup>γ</sup>

<sup>α,β,γ</sup> = Μέσοι όροι στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

**Πίνακας 6.** Ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής.

Οξυγαλακτικά βακτήρια (n=30)	Αριθμός στελεχών (%)			
	Εγκατάσταση Α		Εγκατάσταση Β	
	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ	ΦΡΕΣΚΟ	5 ΗΜΕΡΩΝ
<i>Lb. plantarum</i>	13 (43,33)	13 (43,33)	-	
<i>Lb. brevis</i>	1 (3,33)	-	-	
<i>Lb. paracasei</i>	-	1 (3,33)	-	15 (50,0)
<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-	-	1 (3,33)
<i>Lc. lactis</i>	-	-	23 (93,33)	
<i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	13 (43,33)	12 (40,0)	1 (3,33)	1 (3,33)
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	5 (16,66)
<i>E. durans</i>	-	-	-	3 (9,99)
<i>E. faecium</i>			-	1 (3,33)
MT <sup>1</sup>	3 (9,99)	3 (9,99)	4 (13,33)	4 (13,33)
AEB <sup>2</sup>				
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	4 (13,33)	-
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-	1 (3,33)	-	-

<sup>1</sup>MT: Μη ταυτοποιημένα

<sup>2</sup>AEB: Άλλο είδος βακτηρίου

## 5.2 Συζήτηση – Συμπεράσματα

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «γαλοτύρι» μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) τόσο στο φρέσκο όσο και στο τελικό προϊόν. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο είδος της καλλιέργειας εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε τυρί.

Στη μελέτη των Samelis & Kakouri (2007) οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο στο παραδοσιακό όσο και στο βιομηχανικό τύπο τυρί που ερεύνησαν ήταν μεταξύ 7,5-8,1 log cfu/g χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ωστόσο, υπήρχαν σημαντικές διαφορές για το κυρίαρχο είδος σε κάθε τύπο τυριού, λόγω ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές σε κάθε τυρί.

Στην μελέτη των Samelis και Kakouri (2007) σε τυρί «γαλοτύρι», μετά την συντήρησή του στους 4 C° για 4-5 ημέρες, τόσο σε βιομηχανική όσο και σε παραδοσιακή κλίμακα ο πληθυσμός των κόκκων ήταν της τάξης των 8 log cfu/g, με τον *Str. thermophilus* να αποτελεί το κυρίαρχο στέλεχος στο βιομηχανικό τύπου «γαλοτύρι». Ομοίως, στην

«Εγκατάσταση Α» στο προϊόν των «5 ημερών» ο πληθυσμός των κόκκων ήταν της τάξεως των 8,36 log cfu/g με τον *Str. thermophilus* να αποτελεί το κυρίαρχο είδος.

Ακόμη, στη μελέτη των Rogga et al., 2005, ο πληθυσμός των λακτόκοκκων τόσο για το βιομηχανικό όσο και για το παραδοσιακό τυρί «γαλοτύρι» ήταν 7,5 log cfu/gr και 8,3 log cfu/g αντίστοιχα. Τα δείγματα τυριού που μελέτησαν προέρχονταν από τυρί γαλοτύρι 4-5 ημερών μετά την προετοιμασία τους. Τα αποτελέσματα συμπίπτουν με την παρούσα μελέτη όπου ο πληθυσμός των λακτόκοκκων στο προϊόν των «5 ημερών» της «Εγκατάστασης Β» ήταν 7,7 log cfu/g.

Οι Samelis & Kakouri (2019), μελέτησαν τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε εμπορικές παρτίδες τυριού «γαλοτύρι» την περίοδο 2003-2006 ο οποίος ήταν μεταξύ 6,9 log cfu/gr ως 8,3 log cfu/g. Ο πληθυσμός των μεσόφιλων λακτοβακίλων ήταν  $7,55 \pm 0,88$  log cfu/g για το βιομηχανικό τύπο τυρί. Παρόμοια με τα αποτελέσματα της έρευνας στη δική μας μελέτη ο πληθυσμός των λακτοβακίλων ήταν  $7,12 \pm 0,43$  log cfu/g για την «Εγκατάσταση Α» στο προϊόν των «5 ημερών», ενώ στην «Εγκατάσταση Β» ο πληθυσμός διέφερε κατά έναν λογάριθμο με τιμή  $6,02 \pm 0,49$  log cfu/g.

Όσον αφορά το pH των δύο εγκαταστάσεων παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στο «φρέσκο» και «5 ημερών».

Ανάλογες τιμές pH έχουν βρεθεί σε δείγματα τυρί «γαλοτύρι» οι οποίες αναφέρονται στις μελέτες των Zoidou et al., (2016) όπου το pH κυμάνθηκε μεταξύ 4,4-4,5.

. Παρόμοιες τιμές pH βρέθηκαν και στην παρούσα μελέτη ιδίως για τα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» όπου το pH στο «φρέσκο» ήταν 4,23 και στο «5 ημερών» 4,36. Ωστόσο και στα δείγματα της «Εγκατάστασης Α» στο προϊόν των «5 ημερών» το pH ήταν ανάλογο με αυτό που βρέθηκε στη μελέτη των Zoidou et al., (2016) με τιμή 4,48.

Οι Kondyli et al., (2008) μελέτησαν το είδος και τους πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηρίων και πως αυτοί διαμορφώνονται κατά τα διάφορα στάδια παρασκευής και συντήρησης αυτού του τυριού, ανάλογα με τις εφαρμοζόμενες τεχνολογίες παρασκευής. Οι τιμές του pH στα δείγματα αυτά, την δεύτερη μέρα κατά την διάρκεια της πήξης του τυριού, ήταν μεταξύ 4,39 ως 4,4.

Το χαμηλό pH έχει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της πήξης του τυριού, αφού τα τυριά που έχουν χαμηλό pH εμφανίζονται με πιο σταθερή δομή (Walstra et al., 2005). Επιπλέον, η μεγαλύτερη πτώση του pH στα φρέσκα τυριά γίνεται μέσα στις πρώτες 4-12 ώρες, όπου συμβαίνει η διαδικασία της ζύμωσης ενώ κατά τη συντήρησή τους στο ψυγείο το pH παραμένει σταθερό (Kondyli et al., 2007). Η χαμηλή τιμή του pH οφείλεται στα προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως το οξικό οξύ και το γαλακτικό οξύ, το οποίο αποτελεί βασικό μηχανισμό αντιμικροβιακής δράσης αφού προκαλεί δυσμενείς συνθήκες για την αύξηση της ανταγωνιστικής χλωρίδας αλλά και των παθογόνων μικροοργανισμών (Parada et al., 2007).

Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι όξινες τιμές pH δεν φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη της γαλακτικής χλωρίδας του τυριού (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) (Kallinteri et al., 2013). Σύμφωνα με την έρευνα της Kallinteri et al., (2013) τα οξυγαλακτικά βακτήρια που βρέθηκαν σε δείγματα τυριού «γαλοτύρι» ήταν κυρίως του γένους *Lactobacillus* και *Lactococcus* τα οποία έρχονται σε συμφωνία με τα είδη που

έχουν απαριθμηθεί και σε προηγούμενες μελέτες για το «γαλοτύρι» (Rogga et al., 2005; Kykkidou et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια που βρέθηκαν στα δείγματα τυριού γαλοτύρι ήταν κυρίως του γένους *Lactobacillus* και *Lactococcus*, τόσο στο «φρέσκο» προϊόν όσο και στο προϊόν «5 ημερών». Οι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται εύκολα στο γάλα όταν έχει αρχίσει η ζύμωση και το pH μειωθεί στο 6,0-6,2 και συνεχίζουν να αναπτύσσονται και σε τιμές έως 4,2-4,4. Ενώ οι λακτόκοκκοι μειώνουν το pH για να φτάσουν σε τελική τιμή που κυμαίνεται από 4,4 έως 4,8 (Demarigny, 2014).

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην «Εγκατάσταση Α» κυρίαρχο είδος ήταν ο *Lb. plantarum* (43,33%) τόσο στο «φρέσκο» προϊόν όσο και στο προϊόν «5 ημερών», καθώς και ο *Str. thermophilus* με ποσοστό απομόνωσης 43,33% στο «φρέσκο» προϊόν και 40% στο «5 ημερών».

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Samelis & Kakouri, (2019) σε τυρί «γαλοτύρι» μεταξύ των μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκαν ανάμεσα στα δείγματα που εξέτασαν συμπεριλαμβανόταν και ο *Lb. plantarum* ως το πιο επικρατέστερο είδος (Samelis & Kakouri, 2019).

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει βρεθεί ότι ο *Lb. plantarum* ήταν το κυρίαρχο στέλεχος σε τυριά από αιγοπρόβειο γάλα, όπως το τυρί Φέτα (Hanopoulou et al., 2005), σε αρκετά τυριά από νωπό αίγαιο γάλα (Tzanetakis & Litoroulou – Tzanetaki, 1989), σε τυρί Φέτα από πρόβειο γάλα (Tzanetakis and Litoroulou – Tzanetaki, 1992), και στο τυρί κοπανιστή από γάλα αγελαδινό (Tzanetakis et al., 1987). Οι Tzanetakis et al., 1987, μελέτησαν τους μικροβιακούς πληθυσμούς σε 50 δείγματα κοπανιστή του εμπορίου και βρήκαν ότι οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν το 86% των τυριών με το *Lb. plantarum* να είναι το επικρατέστερο στέλεχος. Ο *Lb. plantarum* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 15-45 ° C καθώς και σε συγκέντρωση NaCl 6,5% (Adesulu – Dahunsi et al., 2017). Η μη σημαντική μείωση στη τιμή του pH μεταξύ των δειγμάτων «φρέσκου» και «5 ημερών» στην «Εγκατάσταση Α» φαίνεται να συνδέεται με την επικράτηση του *Lb. plantarum* και τη χαμηλή ικανότητά του για τη χρήση λακτόζης και τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό (Jyoti et al., 2004) (Matejčeková et al., 2016).

Ο *Str. thermophilus* αποτελεί τον κυρίαρχο μικροοργανισμό των θερμόφιλων κόκκων. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Samelis και Kakouri (2019), επιβεβαιώθηκαν τα προκαταρκτικά τους ευρήματα (Samelis και Kakouri, 2007), στα τυριά βιομηχανικού τύπου «γαλοτύρι» που εξέτασαν την περίοδο 2003-2006 το 94,5% των αποικιών που απομονώθηκαν ήταν ομοιοζυμωτικοί, αρνητικά στην αργινίνη, θερμοάντοχα (ανάπτυξη στους 45° C όχι όμως στους 15° C), κόκκοι, αδυναμία ή καθόλου ανάπτυξη σε 2% NaCl. Το στέλεχος που απομονώθηκε ήταν ο *Str. thermophilus*, ο οποίος εμφανίστηκε ως μονοκαλλιέργεια σε όλες τις παρτίδες τυριού που μελέτησαν. Στην παρούσα μελέτη, στην «Εγκατάσταση Α» απομονώθηκε το στέλεχος *Str. thermophilus*, σε ποσοστό 43,33% και 40% για το «φρέσκο» και το «5 ημερών» αντίστοιχα αποτελώντας το κυρίαρχο είδος μαζί με το στέλεχος *Lb. plantarum*.

Σε μικρότερο ποσοστό 3,33% στο «φρέσκο» προϊόν απομονώθηκε ο *Lb. brevis*. Ο *Lb. brevis* είναι ετεροζυμωτικός και έχει την ικανότητα να παράγει εκτός από γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, επηρεάζοντας την δομή του τυριού. Έχει βρεθεί σε σχετικά υψηλούς πληθυσμούς σε τυριά άλμης χωρίς να επιφέρει αλλοιώσεις στη τελική δομή του τυριού (Litoroulou – Tzanetaki και Tzanetakis, 1992). Θεωρείται προβιοτικός μικροοργανισμός με σημαντική επίδραση στη υγεία των καταναλωτών (Ren et al. 2014) και έχει αποδειχθεί η ανταγωνιστική του επίδραση εναντίων σημαντικών τροφιμογενών παθογόνων μεταξύ αυτών *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H4, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (Kariyawasam et al. 2020).

Στο προϊόν «5 ημερών» απομονώθηκε σε μικρό ποσοστό 3,33% ο *Lb. paracasei*. Τα είδη *Lb. paracasei*, *Lb. brevis* και *Lb. plantarum* θεωρούνται προβιοτικοί οργανισμοί (Holzapfel & Schillinger, 2002). Οι Zoidou et al., (2016) μελέτησαν την παραγωγή του τυριού «γαλοτύρι» με τη προσθήκη εμπορικής καλλιέργειας εκκίνησης μαζί με προβιοτικά στελέχη το *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei subsp. paracasei* και *Lb. rhamnosus*. Καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης των τυριών η βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών διατηρούνταν χωρίς σημαντικές αλλαγές. Το περιβάλλον του τυριού δεν επηρέασε την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων και αυτά παρέμεναν βιώσιμα, πάνω από το συνιστάμενο επίπεδο των 10<sup>6</sup> cfu/g, ικανοποιώντας τα κριτήρια που έχουν καθοριστεί για τα προβιοτικά τρόφιμα.

Επίσης διαπιστώθηκε η ταυτοποίηση ορισμένων στελεχών σε άλλο είδος μικροοργανισμού. Στο προϊόν «5 ημερών» ένα από τα υπό εξέταση στελέχη (3,33%) ταυτοποιήθηκε ως *Staphylococcus lugdunensis*. Ο *Staphylococcus lugdunensis* ανήκει στους αρνητικούς στην πηκτάση σταφυλόκοκκους (Kloos & Schleifer, 1975; Δημητρακόπουλος, 1987). Εντοπίζεται στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Πάραυτα σε πρόσφατες μελέτες έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις του δέρματος όσο και μαλακών ιστών (Manica et al., 2017).

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλομορφία στα οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν σε σύγκριση με την «Εγκατάσταση Α».

Στην «Εγκατάσταση Β» στο φρέσκο προϊόν κυρίαρχο στέλεχος αποτελεί ο *Lc. lactis* (93,33%). Ο πληθυσμός του *Lc. lactis* μειώθηκε σημαντικά από 9,76 log cfu/gr στο φρέσκο προϊόν σε 7,70 log cfu/gr μετά την πάροδο των 5 ημερών όπου η τιμή του pH ήταν 4,36. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή τιμή pH και στην υψηλή αλατότητα του τυριού καθώς οι λακτόκοκκοι αναστέλλονται όταν το pH πέφτει κάτω από το 5,5 (Parente & Cogan, 2004). Ο *Lc. lactis* αναπτύσσεται βέλτιστα σε τιμές pH από 6,3-6,9, το χαμηλότερο όριο ανάπτυξης όμως είναι από 4,0-5,0 (Hutkins, 1987).

Στη μελέτη των Samelis & Kakouri (2019), ο *Lc. lactis* απομονώθηκε σε ποσοστό 38,9% αποτελώντας το κυρίαρχο είδος σε τυρί «γαλοτύρι» παραδοσιακού τύπου, σε δείγματα τυριού 4-5 ημέρες μετά τη παραγωγή και συντήρησή τους στους 4 °C. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έρχονται σε αντίθεση με την παρούσα εργασία καθώς ο *Lc. lactis* αποτέλεσε κυρίαρχο είδος στο «φρέσκο» προϊόν της «Εγκατάστασης Β», σε ποσοστό (93,33%).

Σε μικρότερο ποσοστό 3,33% στο «φρέσκο» προϊόν και στο «5 ημερών» απομονώθηκε ο *Str. thermophilus*.



Στη μελέτη των Samelis & Kakouri (2019), ένα διαφορετικό στέλεχος του *Str. thermophilus* απομονώθηκε από τυριά παραδοσιακού τύπου «γαλοτύρι», με συνολική συχνότητα απομόνωσης 28,9% μεταξύ των κυρίαρχων ομάδων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το στέλεχος *Str. thermophilus* που απομονώθηκε διέφερε σημαντικά από το αντίστοιχο στέλεχος που απομονώθηκε στα δείγματα τυριού βιομηχανικού τύπου, το οποίο αναπτυσσόταν σε NaCl 2% και ζύμωνε ασθενώς τη λακτόζη και τη ριβόζη. Η πρόσφατη εμφάνιση του *Str. thermophilus* θετικός στη γαλακτόζη στα ελληνικά γαλακτοκομικά προϊόντα πιθανότατα οφείλεται στο νέο εισαγόμενο είδος καλλιέργειας εκκίνησης που μπορεί να έχει αποκτήσει αυτή την ιδιότητα φυσικά ή μάλλον λόγω της μεταβολικής μηχανικής από μετάλλαξη στη Βόρεια Ευρώπη (de Vos, 1996; Vaughan et al., 2001).

Στο προϊόν «5 ημερών» το κυρίαρχο είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν ο *Lb. paracasei* (50%) και ακολούθησε σε μικρό ποσοστό (3,33%) ο *Lb. rhamnosus*.

Στο προϊόν «5 ημερών» απομονώθηκαν στελέχη του γένους *Enterococcus* πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστό (16,66%) ο *E. faecalis*, (9,99%) ο *E. durans* και σε μικρότερο ποσοστό (3,33%) ο *E. faecium*.

Στη μελέτη των Rogga et al., (2005), βρέθηκαν πληθυσμοί εντεροκόκκων της τάξης των 2,7 log cfu/g για το βιομηχανικό τύπου τυρί «γαλοτύρι» και 4,3 log cfu/g για το παραδοσιακό τύπο τυρί που ερεύνησαν. Ωστόσο, πληθυσμοί εντεροκόκκων βρέθηκαν και στη μελέτη των Samelis & Kakouri (2007) της τάξης των 4,7 log cfu/g.

Οι εντερόκοκκοι μπορούν να παράγουν βακτηριοσίνες, τις εντεροσίνες, με αντιμικροβιακή δράση έναντι της ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων όπως *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* και *Staphylococcus aureus* (Hanchi et al., 2018).

Σύμφωνα και με άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα είδη των εντεροκόκκων *E. faecalis*, *E. faecium* και *E. durans* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες καλλιέργειες οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία ζύμωσης παραδοσιακών τυριών συνεισφέροντας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος μέσω της λιπολυτικής και πρωτεολυτικής τους δράσης, αλλά και το μεταβολισμό των κιτρικών αλάτων (Franz et al., 2011; Hanchi et al., 2018).

Η παρουσία υψηλών αριθμών εντεροκόκκων στα τυριά εξηγείται λόγω της ανθεκτικότητάς τους στις υψηλές θερμοκρασίες και σε συγκεντρώσεις αλάτων NaCl 6,5% (Mundt, 1986; Caridi et al., 2003).

Επίσης η παρουσία των εντεροκόκκων αποτελεί δείκτη κακής υγιεινής των τυροκομείων χωρίς όμως τα στελέχη αυτά να έχουν κατηγορηθεί ως επικίνδυνα για την υγεία των καταναλωτών (De Vuyst et al., 2006). Οι εντερόκοκκοι στον άνθρωπο αποτελούν το 1% της εντερικής μικροχλωρίδας με τα είδη *E. faecalis*, και *E. faecium* να είναι τα συνηθέστερα. Ο ρόλος τους στην δημόσια υγεία είναι αρκετά σημαντικός καθώς αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου ανθρώπων και ζώων χρησιμοποιούνται ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης (Franz et al., 1999).

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων (Tannok & Cook, 2002). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 38 είδη εντεροκόκκων,

όμως μόνο ο *E. faecalis* και ο *E. faecium* ευθύνονται για την πλειοψηφία των λοιμώξεων στους ανθρώπους. Το είδος *E. faecalis* αποτελεί το 80 % των κλινικών λοιμώξεων όπως η ενδοκαρδίτιδα, η βακτηριαμία, οι λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος και του ουροποιητικού, σε αντίθεση με τον *E. faecium* που συνιστά μόλις το 10% (Patterson et al., 1995; Low et al. 2001). Παρόλα αυτά η αναλογία αυτή άλλαξε κατά τα μέσα της δεκαετίας του 1990 στην Ευρώπη (Simonsen et al., 2003) και στα τέλη της δεκαετίας στις ΗΠΑ (Treitman et al., 2005) υπέρ του *E. faecium* αποτελώντας το 40% των ενδονοσοκομειακών εντεροκοκκικών λοιμώξεων (Willens & van Schaik, 2009).

Επίσης διαπιστώθηκε η ταυτοποίηση ορισμένων στελεχών σε άλλο είδος μικροοργανισμού. Στο «φρέσκο» προϊόν της «Εγκατάστασης Β» 4 αποικίες (13,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Hafnia alvei*.

Στην εργασία του Αντωνίου (2018), για το τυρί Ανεβατό, σε 5 από τα 40 δείγματα ανεβατού ταυτοποιήθηκε το βακτήριο *Hafnia alvei* με ποσοστό 12,5%.

Η *H. alvei* είναι ένα Gram<sup>-</sup> βακτήριο, το οποίο έχει απομονωθεί από ανθρώπινα δείγματα και κυρίως από το ουρογεννητικό, το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Έχει απομονωθεί τόσο από ενδονοσοκομειακές όσο και άλλες λοιμώξεις, ενώ αναφέρεται ότι μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα, πνευμονία, γαστρεντερίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα καθώς και ενδονοσοκομειακές μολύνσεις τραυμάτων (Günthard and Pennekamp, 1996).

Ωστόσο διαπιστώθηκε αδυναμία ταυτοποίησης κάποιων στελεχών μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο στην «Εγκατάσταση Α» όσο και στην «Εγκατάσταση Β». Οι κατάλληλες συνθήκες τοποθέτησης του δείγματος και επεξεργασίας στην πλάκα του Maldi-ToF, καθώς και η επιλογή του διαλύτη και του κατάλληλου χημικού υποστρώματος είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ακρίβεια του τελικού αποτελέσματος της μικροβιολογικής ταυτοποίησης (Wunschell et al., 2005). Το σύστημα biotyper έχει δημιουργήσει τις εξής βαθμολογίες: >2 και >1,7 για υψηλή και χαμηλή ταυτοποίηση αντίστοιχα και <1,7 για μη αξιόπιστη ταυτοποίηση (Λάππα, 2012). Τα είδη με βαθμολογία < 1,7 δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν γιατί ίσως δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες στη βάση δεδομένων για αυτούς τους μικροοργανισμούς. Την άποψη αυτή ενστερνίζονται και άλλοι ερευνητές όπου κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα μέσα από τις έρευνες που πραγματοποίησαν (Wunschell et al., 2005; Nomura, 2015; Angletti & Ciccuzzi, 2019; Becker et al., 2019; Λάππα, 2012).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι η μικροβιολογική χλωρίδα του τυριού «γαλοτύρι» όσον αφορά το είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων διαφέρει στις δύο εγκαταστάσεις σημαντικά. Αυτή η διαφορά έγκειται στον τρόπο παρασκευής του κάθε τυριού και στην επιλογή των καλλιιεργειών εκκίνησης. Ειδικότερα, συγκρίνοντας το προφίλ των μικροοργανισμών των τυροκομικών προϊόντων των δύο εγκαταστάσεων μπορούν να διεξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα γύρω από την παρασκευή τους και την κατηγοριοποίηση τους σε βιομηχανικό και παραδοσιακό τύπο τυριού. Λόγω της ανίχνευσης των διαφόρων εντεροβακτηρίων στο τυρί της «Εγκατάστασης Β» και της μείωσης του πληθυσμού των μικροοργανισμών κόκκων (*Str. salivarius*, το οποίο δεν αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl > 2%, Quinones et al., 1998) προκύπτει ότι το συγκεκριμένο προϊόν έχει παρασκευαστεί ενδεχομένως με τον γνωστό παραδοσιακό τρόπο και έχει προηγηθεί προσθήκη NaCl 4-5%. Σε αντίθεση στα

δείγματα της «Εγκατάστασης Α», λόγω της αύξησης του πληθυσμού του προαναφερόμενου μικροοργανισμού, *Str. salivarius* το προϊόν αυτό θα αποτελεί ένα βιομηχανικού τύπου τυριού «γαλοτύρι» με συγκέντρωση NaCl < 2%.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Α.ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

**Ανυφαντάκης Ε. Μ.** (2004): *Τυροκομία, Χημεία-Φυσικοχημεία-Μικροβιολογία Β'* έκδοση, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, 187-192.

**Ανυφαντάκης Ε.Μ.** (1992) : *Οι μικροβιακές καλλιέργειες στη Βιομηχανία του γάλακτος και η σημασία τους για την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων*. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοκομία Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Αθήνα.

**Δημητρακόπουλος, Γ.Ο.** (1987). *Εισαγωγή στην κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα*. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

**Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π) (2014)** Εφημερίδα της Κυβερνήσεως. ΕθνικόΤυπογραφείο, Αθήνα, αρθ.83.

**Λάππα Ι.** (2012). «*Διερεύνηση της μικροχλωρίδας της στάκας- ταυτοποίηση βακτηρίων με την πρωτεωμική τεχνολογία της φασματομετρίας μαζών*». Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Μπαλατσούρας Γ.** (2006) : *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις «Έμβρυο» Αθήνα, 194-230.

**Μπίντσης Θ. και Παπαδήμας Φ.** (2009). *Τυρί τεχνολογία γάλακτος – τυροκομία παρουσίαση τυριών*. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.

**Υπουργική Απόφαση με αριθμό 313031/94** (1994). "Αναγνώριση προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) τυριού "ΓΑΛΟΤΥΡΙ" (ΟΑΙ.0ΤΥΗΙ). (Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας , Αρ . Φύλλου 8 , τεύχος Β , 11/1/1994 , Εθνικό Τυπογραφείο.

**Χρονοπούλου - Σερέλη Αικατερίνη** (1993). Μαθήματα Γεωργικής Μετεωρολογίας Βιοκλιματολογίας, Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### **Β. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ**

**Abbee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995).** *Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning.* International Journal of food Microbiology 28: 169-185.

**Adesulu-Dahunsi, A.T. et al. (2017).** *Genetic diversity of Lactobacillus plantarum strains from some indigenous fermented foods in Nigeria.* LWT-Food Science and Technology – Elsevier Ltd, 82:199-206.

**Anal, A.K., & Singh, H. (2007).** *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery.* Trends in food Science & Technology, 18(5):240-251.

**Angeletti S., Cicozzi M. (2019).** «*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology*»: An updating review. Infection, Genetics and evolution. 76, 104063.

**Anifantakis, E. M. (1991).** Greek cheeses: A tradition of centuries. Athens: National Dairy Committee of Greece, pp. 55–57.

**Anukam, K.C. (2007).** *The potential role of probiotics in reducing poverty associated infections in developing countries.* Journal of infection in developing countries, 1(2):81-83.

**Axelsson LT (1993).** *Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology, in: Lactic Acid Bacteria, Vol. 1,* eds Seppo Salminen and Atte von Wright, Marcel Dekker, Inc., New York.

**Ballesteros Cr., LI. Palop., I. Schanchez.. (1999):** *Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of “Almargo” eggplants.* Int. Journ. Of Food Microbiol.

**Banwart G. J (1989):.** *Basic Food Microbiology* 2nd ed. Avi Book. Van Nostrand Reinhold New York.

**Becker P., Normand A.C., Vanantwerpen G., Vanrobayers M., Haesendock R., Vercammen F., Stubble D., Piarroux R., Hendrickx M. (2019).** «*Identification of fungal isolates by MALDI-TOF mass spectrometry in Veterinary practice: Validation of a web application*». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 31(3), 471-474.

**Cairncross, S.E., and Sjoström, L.B. (1950).** *Flavor profiles: a new approach to flavor problems.* Food Technol., 4:308-311.

**Chikindas ML, Montville TJ (2002) :** *Prespectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Control of foodborne microorganisms, Marcel Dekker, New York.*

**Cogan TM (1996).** *History and taxonomy of starter cultures.* In: Dairy starter cultures, ed. T. M. Cogan and J. P. Accolas, VCH Publishers, Inc, New York.

**Collins, Y. F., Mc Sweeney, P.L.H., & Wilkinson, M. G. (2003).** *Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge.* International Dairy Journal, 13, 841-866.

- Curry B., Crow V.: Lactobacillus sp. In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) (2002).** *Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press Elsevier Science: 1479-1510.*
- Czinn, J.S. & Blanchard, S.S. (2008).** *Probiotics in foods and supplements.* Nutrition and Health. Probiotics in pediatric medicine, 21: 299-306.
- Da Silva, A.N., da Silva, R.C.S.N., Ferreira, M.A.M., Minin, V.P.R., da Costa, T.M.M., and Perez, R., (2013).** *Performance of hedonic scales in sensory acceptability of strawberry yogurt.* *Food Qual.Prefer.*, 30:9-21.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, I., Corbo, M.R., & Gobbetti, M. (2001).** *Characterization of non – starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses.* Applied and Environmental Microbiology, 67:2011-2020.
- De Vos, W.M. (1996).** *Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria.* Ant. Leeuwen 70:223-242.
- De Vrese, M. & Schrezenmeir, J. (2008).** *Probiotics, prebiotics and symbiotics.* Advances Biochemical Engineering/ Biotechnology, 111: 1-66.
- De Vuyst L., Moreno, F., Tsakalidou, E., Sarantinopoulos, P., (2006).** *The role and application of enterococci in food and health.* International Journal of Food Microbiology, 106:11.
- Demarigny, Y. (2014).** *Lactococcus, Lactococcus lactis Subspecies lactis and cremoris.* Encyclopedia of food Microbiology (second edition). Reference Module in food Science, 442-446.
- FAO (Food and Agricultural Organization)/ WHO (World Health Organization), (2006).** *Guidelines for the evaluation of probiotics in food.*
- FAO/WHO (2001).** Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. *Expert consultation on evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.*
- Felis, G.E., & Dellaglio, F. (2007).** *Taxonomy of lactobacilli and bifidobacterial.* Current issues in intestinal microbiology, 8(2), 44-61.
- Fox P.F., (1989).** *Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening.* *J. Dairy Sci.*, 72, 1379-1400.
- Franz C.M.A.P., Hunchi M., Abrionel H., Holzapfel W., Galvez A. (2011).** « *Enterococci as probiotics and their implications in food safety*». Food Microb. 151, 125-140.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. (1999).** *Enterococci at the crossroads of food safety.* International Journal of Food Microbiology, 47:1-24.
- Fric, P. (2007).** *Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle.* Central European Journal of Medicine, 2(3):237-270.
- Fuller, R. (1989).** *Probiotics in man and animals.* J. Appl. Bacteriol., 66: 372-378.

**Garrity, G.M. and J.G. Holt** (2001). *The Road Map to the Manual. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria (edited by Boone, Castenholz and Garrity). Springer, New York, pp. 119–166.

**Goktepe, J., Juneja, V.K.R., Ahmedna, M.** (2005). *Probiotics in food safety and human health*. CRC Press, 1-33.

**Günthard H, Pennekamp A.** (1996) *Clinical significance of extraintestinal Hafnia alvei isolates from 61 patients and review of the literature*. Clin Infect Dis. 22(6):1040-5.

**Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R.** (2018). «*The genus Enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns*». An update review. Frontiers in Microbiology. 9;1791. Dol:10.3389/fmicb.01791.

**Hatzikamari, M., Litopoulou – Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N.** (1999). *Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese*. Journal of Applied Microbiology, 87:595-601.

**Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & Schillinger, U.** (2001). *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2): 365-373.

**Isolauri E.**(2001) : *Probiotics in Human disease*. Am. J. Clin Nutr..

**Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B.** (1995). *Bacteriocins of gram positive bacteria*. Microbiol. Rev. 59; 171-200.

**Jyoti, B.D., Suresh, A.K., Venkatesh, K.V.** (2004). *Effect of preculturing conditions on growth of Lactobacillus rhamnosus on medium containing glucose and citrate*. Microbiological Research 159:35-42.

**Kallinteri, L.D., Kostoula, O.K., Savvaidis, I.N.** (2013). *Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf life of Galotyri cheese*. Intern. Journal of Food Microbiology, 36:176-181.

**Kandler O.** (1983). *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 49,209-224.

**Kariyawasam, K., Yang, S.J., Lee, N.K., & Paik, H.D.** (2020). *Probiotic Properties of Lactobacillus brevis KU200019 and Synergistic Activity with Fructooligosaccharides in Antagonistic Activity against Food Pathogens*. Food science of animal resources, 40(2):297-310.

**Klaenhammer T.R.(1988):** *Bacteriocins of lactic acid bacteria Biochemie*.

**Kloos, W.E., & Scheifer, K.H.** (1975). *Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species*. J. Clin Microbiol., 1(1):82-88.

**Kondyli E., Katsiari M.C. & Voutsinas L.P.** (2008). *Chemical and sensory characteristics of Galotyri-type cheese made using different procedures*. Food Control 19: 301-307.

- Kondyli E, Katsiari MC, Massouras T, Voutsinas LP (2002).** *Free fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta type cheese made with a commercial adjunct culture.* Food Chem 79: 199-205.
- Kondyli E, Massouras T, Katsiari MC, Voutsinas LP (2013).** *Lipolysis and volatile compounds of Galotyri-type cheese made using different procedures.* Small Rumin Research 113: 432-436.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996).** *The proteolytic system of lactic acid bacteria.* Antonie van Leeuwenhoek 70: 187-221.
- Kykkidou, S., Pournis, N., Kostoula, O.K., Savaidis, I.N. (2007).** *Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid – curd cheese stored aerobically at 4 °C.* Intern. Dairy Journal, 17:1254-1258.
- Law, B.A. (Ed), (1997).** *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Second edition. Blackie academic & professional. London, UK.*
- Lawless H.T., Popper, R., and Kroll, B.J., (2010).** *A comparison of the labeled magnitude (LAM) scale, an 11-point category scale and the traditional 9-point hedonic scale.* Food Qual. Prefer., 21:4-12.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004).** *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.* Trends in Food Science & Technology, 15(2),67-78.
- Leroy, F., Falony, G., & de Vuyst, L. (2008).** *Latest developments in probiotics.* In meat biotechnology, 217-229.
- Lilly, D.M., & Stillwell, R.H. (1965).** *Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms.* Science, 147(365a):747-748.
- Limsowtin G.K.Y., Broome MC., Powell I.B (2002):** *Lactic Acid Bacteria, Taxonomy.* In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press Elsevier Science: 1470-1478.
- Limsowtin G.K.Y., Broome MC., Powell I.B. (2002):** *Lactic Acid Bacteria, Taxonomy.* In: Roginski H., Fuquay J. W., Fox P.F. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press Elsevier Science, 1470-1478.
- Litopoulou – Tzanetaki E., Tzanetakis, N. (1992).** *Microbiological study of white brined cheese made from raw goat milk.* Food Microbiol., 9:13-19.
- Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2004).** *Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review.* International Dairy Journal, 14 (11), 923-945.
- Low, D.E., Keller, N., Barth, A. and Jones, R.N. (2001)** *Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999.* Clin Infect Dis 32 Suppl 2, S133-145.
- Lucke, F. -K. (2000).** *Utilization of microbes to process and preserve meats.* Meat Science, 56, 105-115.

- Manica, L.A., & Cohen P.R.,** (2017). *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: a case series and review. *Dermatology and Therapy* 7(4):555-562.
- Matejcekova, Z., Liptakova, D., Spodniakova, S., & Valik, L.** (2016). *Characterization of the growth of Lactobacillus plantarum in milk in dependence on temperature.* *Acta Chimica Slovaca*, 9(2).
- Matejcekova, Z., Liptakova, D., Spodniakova, S., and Valik, L.** (2016). *Characterization of the growth of Lactobacillus plantarum in milk in dependence on temperature.* *Acta Chimica Slovaca* 9:2.
- Mc Sweeney, P.L.H., & Sousa, M.J.** (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80, 293–324.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M. & Drosinos, E.H.** (2003). *Bacteriocins of lactic acid bacteria and their application on food as biopreservatives.* *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 54: 69-77.
- Morelli, L.** (2000). *In vitro selection of probiotic Lactobacilly: A critical Appraisal, Current. Issues Intest. Microbiology*, 1(2): 59-67.
- Mundt, O.J.** (1986). *Enterococci.* In: *Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds).* *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2.
- Murray, J.M., Delahunti, C.M., and Baxter, I.,**(2001). *Descriptive sensory analysis: Past, present and future.* *Food Res. Int.*,34: 461-471.
- Nicolas, L., Marquilly, C., and O' Mahony, M.** (2010). *The 9-point hedonic scale: Are words and numbers compatible?* *Food Qual. Prefer.*, 21: 1008-1015.
- Nomura F.** (2015). «*Protome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology*». *Biochimica et Biophysica Acta* 1854, 528-537.
- Pappa E., Anifantakis E.M.** (2001). *Effect of different concentrated culture on the proteolysis and organoleptic characteristics of Feta cheese.* *Milchwissenschaft*, 56: 384-387.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R.** (2007). *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives.* *Brazilian Archives of Biology and Technology*, (50)3:521-542.
- Parente, E., & Cogan, T.M.** (2004). *Starter cultures General aspects.* In: *Fox P.F., McSweeney PLH, Cogan T.M. (Ed).* *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. *Cheese: General Aspects*, Chapman & Hall, London UK, 123-144.
- Parente, E., Cogan, T.M., & Powell, I.B.** (2017). *Starter cultures: General Aspects.* *Chemistry, Physics and Microbiology*, 201-226.
- Parente, E., Ricciardi, A.** (1999). *Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria.* *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 628-638.



- Patterson, J.E., Sweeney, A.H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J. and Lyons, R.W.** (1995) *An analysis of 110 serious enterococcal infections*. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore)* 74, 191-200.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E.** (2005). *Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis*. *Intern. Dairy Journal*, 15:1138-1149.
- Pritchard, G.G., Freebairn, A.D., Coolbear, T.** (1994). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* SK11. *Microbiology* 140: 923-930.
- Quinones, H.J., Barbano, D.M., and Philips, L.G.,.** (1998). *Influence of protein standardization by ultrafiltration on the viscosity, color and sensory properties of 2 and 3,3% milks*. *J. Dairy Sci.*,81: 884-894.
- Ramet, J. P.** (1986) : *Lactic Starters*. In: *Eck A(ed) In Cheesemaking. Science and Technology*. Lavoisier Publishing Inc, Paris
- Ren, D., Li C., Qin Y., Yin R., Du S., Ye F., Liu C., Liu H., Wang M., Li Y., Sun Y., Li X., Tian M., Jin N.** (2014). *In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains from fermented food and human intestine*. *Anaerobe* 30:1-10.
- Rogga, K.J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M.C., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G.** (2005). *Survival of Listeria monocytogenes in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4 °C and 12 °C*. *Int. Dairy J.*15, 59-67.
- Rogga, K.J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M.C., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G.** (2005). *Survival of Listeria monocytogenes in Galotyri, a traditional Greek soft acid – curd cheese, stored aerobically at 4 C° and 12 C°*. *Intern. Dairy Journal* 15:59-67.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C.** (2005). *Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6): 1410-1417.
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K. & Stanton, C.** (2002). *Cheese delivering biocultures: probiotic cheese*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2): 71-78.
- Salminel, S., Ouwehand, A.C.** (2002). *Probiotics, Applications in Dairy Products*. In: Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Elsevier Science. Ltd: 2315-2321.
- Salminel, S., Ouwenhand, A., Benno, Y., & Lee, Y.K.** (1999). *Probiotics: how should they be defined?* *Trends in fod science & technology*, 10(3): 107-110.
- Salminel, S., Vanwright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Devos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Morgensen, G., Birkeland, J., Matilla – Sandhehn, T.** (1998). *Demonstration of safety probiotics*. *Intern. J. FD Microbiol.*, 44:93-106.

**Salminen S., Ouwehand A.C.**(2002) : *Probiotics, Applications in Dairy Products*. In: Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Elsevier Science, Ltd.

**Samelis J., Kakouri A. (2007).** *Microbial and safety qualities of PDO Galotyri cheese manufactured at the industrial or artisan scale in Epirus, Greece*. Ital J Food Sci. 19, 91-99.

**Samelis, J., & Kakouri, A. (2019).** *Major technological differences between an industrial type and five artisan type Greek PDO Galotyri market cheeses as revealed by great variations in their lactic acid microbiota*. AIMS. Agriculture and Food, 4(3):685-710.

**Sanchez, B., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A. & Guejmonde, M. (2009).** *Probiotic fermented milks: Present and future*. Society of Dairy Technology, 62(4):472-483.

**Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W.M. (2005).** *Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms*. Current opinion in Biotechnology, 16(2), 204-211.

**Schillinger U., Geisen R., Holzappel W.H. (1996).** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 1996:158-164.

**Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, W.H. (1996).** *Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods*. Trends food Sci. Technol., 158-164.

**Settanni, L., Moschetti, G. (2010).** *Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits*. A review, Food Microbiology, 27: 691-697.

**Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1984).** *Letters of applied Bacteriology* 56,25-40.

**Simonsen, G.S., Smabrekke, L., Monnet, D.L., Sorensen, T.L., Moller, J.K., Kristinsson, K.G., Lagerqvist-Widh, A., Torell, E., Digranes, A., Harthug, S. and Sundsfjord, A. (2003).** *Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals*. J Antimicrob Chemother 51, 323-331.

**Singh,R., Damle, S.G., & Chawla, A. (2011).** *Salivary mutans Streptococci and Lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice cream containing Bifidobacterium lactis Bb12 and Lactobacillus acidophilus La5*. Acta Odontologica Scandinavica, 69(6): 389-394.

**Sousa, M. J., Ardo, Y., & Mc Sweeney, P. L. H. (2001).** *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. Int. Dairy J., 11, 327-345.

Stiles, M.E. and Holzappel, W.H. (1997) Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.

- Tannock, G.W. and Cook, G.** (2002) *Enterococci as members of the Intestinal Microflora of Humans*, p. 101-132. In D. B. Clewell, P. Courvalin, G. Dunny, B.E. Murray, L. Rice, M.S. Gilmore (ed). *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, ASM Press, Washington, DC.
- Treitman, A.N., Yarnold, P.R., Warren, J. and Noskin, G.A.** (2005). *Emerging incidence of Enterococcus faecium among hospital isolates (1993 to 2002)*. J Clin Microbiol 43, 462-463.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. & Gibson, G.R.** (2005). *Using probiotics and prebiotics to improve gut health*. Drug Discovery Today, 8(15): 692-700.
- Tzanetakis, N. and Litopoulou – Tzanetaki, E.** (1992). *Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, Two Greek Cheeses from Ewes Milk*. Journal of Dairy Science, 75(6):1389-1393.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Manolkidis, K.** (1987). *Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek chesse*. Food Microbiology 4:251-256.
- Valentin, D., Chollet, S., Lelievre, M., and Abdi, H.,** (2012). *Quick and dirty but still pretty review of new descriptive methods in food science*. Int. J. Food Sci. technol., 47: 1563-1567.
- Vandamme. P., Pot. B., Gillis. M., de Vos, P. Kerster. K and Swings, J** (1996). *Polyphasic taxonomy. A concensus approach to bacterial systematics*. Microbiology Reviews, 60:407-338.
- Vaughan E.E., van den Bogaard PTC, Catzeddu P., et al.** (2001). *Activation of silent gal genes in the lac-gal regulon of Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol., 183:1184-1194.
- Voliotis, D.T.** (1987) Acta Bot. Croat. 46: 213-224
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. & Genders, T.J.** (2005). *Dairy Science and Technology*. Second Edition ( CRC, Taylor & Francis Group).
- Willems, R.J. and van Schaik, W.** (2009) *Transition of Enterococcus faecium from commensal organism to nosocomial pathogen*. Future Microbiol 4, 1125-1135.
- Yang, R., & Ray, B.** (1994). *Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria*. Food Microbiology 11: 281-291.
- Zoidou, E., Karageorgos, D., Massouras, T., & Anifantakis, E.** (2016). *The effect of probiotic Lactic acid bacteria on the characteristics of Galotyri cheese*. Int. I. Clin. Nutr. Diet, 2:114.



