



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 “Ανεβατό”**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΥΡΙΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΑΜΠΙΑΤΖΙΑΝΗ
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 “Ανεβατό”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΥΡΙΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΑΜΠΑΤΖΙΑΝΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (ΚΑΡΔΙΤΣΑ)

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Σολωμάκος (Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ.)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Σολωμάκος(Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ.)

Αλέξανδρος Γκόβαρης (Καθηγητής Π.Θ.)

Ανδρεάνα Πεξαρα (Επίκουρη Καθηγήτρια Π.Θ.)

Στους γονείς μου Δημήτριο και Κλεονίκη

Περίληψη

Σημαντικοί όροι: Ανεβατό, οξυγαλακτικά βακτήρια, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των οξυγαλακτικής χλωρίδας από το τυρί «ανεβατό», ένα παραδοσιακό ΠΟΠ προϊόν. Το «Ανεβατό» παρασκευάζεται από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγματα αυτών. Είναι ένα μαλακό λευκό τυρί, κοκκώδους υφής, με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα (ΚΤΠ, 2009), το οποίο έχει πολύ ευχάριστη γεύση, ειδικά εάν παρασκευαστεί από γίδινο γάλα.

Να σημειωθεί επίσης ότι το «Ανεβατό» είναι ένα τυρί Π.Ο.Π., για το οποίο γίνεται μια προσπάθεια για να αυξηθεί η παραγωγή του στην Ελληνική αγορά και να προωθηθεί σε ξένες αγορές. Καθώς τα δεδομένα όσον αφορά την μικροβιολογική ποιότητα του τυριού «Ανεβατό» δεν είναι επαρκή, αξίζει να γίνει μελέτη στην μικροβιολογική του ποιότητα τόσο έπειτα από την παραγωγή του αλλά και τη διακίνησή του στην λιανική πώληση.

Υλικά & Μέθοδοι

Για το σκοπό της διπλωματικής εργασίας κατά τη διάρκεια των μηνών Απριλίου και Μαΐου του 2019 συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν 12 δείγματα του τυριού «Ανεβάτο» από δύο παραγωγούς της Θεσσαλίας (“Εγκατάσταση Α” και “Εγκατάσταση Β”). 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°C) στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εξετάζονταν άμεσα, μέσα στην επόμενη ώρα. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειραματισμού.

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση για το προσδιορισμό του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τέλος στα δείγματα πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της τιμής του pH.

Αποτελέσματα

Η μικροβιολογική εξέταση των φρέσκων δειγμάτων από την «Εγκατάσταση Α» έδειξε ότι οι πληθυσμοί για τα γένη *Lactobacillus* and *Leuconostoc* ήταν $7.4 \pm 0.15 \log \text{ cfu/g}$ και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* ήταν $7.9 \pm 0,25 \log \text{ cfu/g}$. Για τα δείγματα των 5 ημερών οι αντίστοιχοι πληθυσμοί δε διέφεραν σημαντικά ($P > 0.05$) και καταγράφηκαν $7.7 \pm 0.2 \log \text{ cfu/g}$ για τα γένη *Lactobacillus* and *Leuconostoc* και $7.4 \pm 0.24 \log \text{ cfu/g}$ για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*.

Στα «φρέσκα» δείγματα από την «Εγκατάσταση Β» καταγράφησαν πληθυσμοί σημαντικά ($P < 0.05$) χαμηλότεροι από την «Εγκατάσταση Α» φτάνοντας τους 6.7 ± 0.20 log cfu/g για τα γένη *Lactobacillus* and *Leuconostoc* και 6.1 ± 0.44 log cfu/g για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*. Ομοίως στα δείγματα των 5 ημερών οι πληθυσμοί αναπτύχθηκαν σημαντικά και έφτασαν τους 7.9 ± 0.4 log cfu/g για τους *Lactobacillus* and *Leuconostoc* και τους 8.20 ± 0.38 log cfu/g για τους *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*.

Στα «φρέσκα» δείγματα από την «Εγκατάσταση Α» τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lc. lactis*, *Lb. paracasei* and *Lb. plantarum* αποτέλεσαν το 53.33%, 20% and 3,33% των ταυτοποιημένων στελεχών, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα για τα δείγματα των 5 ημερών έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί *Lb. paracasei* and *Lc. Lactis* αποτελούσαν τα κυρίαρχα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων με 40% και 33.33%, αντίστοιχα.

Ομοίως στα «φρέσκα» δείγματα από την «Εγκατάσταση Β» οι *Lc. Lactis*, *Lb. paracasei* και *Lb. casei* ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστά 30%, 30% και 20%, αντίστοιχα. Στα δείγματα των 5 ημερών από την «Εγκατάσταση Β» τα κυρίαρχα είδη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ήταν ο *Lb. paracasei* και ο *Lb. plantarum* με ίδιο ποσοστό 33,33%.

Abstract

Aim

Aim of this work was to study the crop cultivation during the preparation and maintenance of the cheese "Anevato", a traditional PDO Greek cheese.

Materials and Methods

Samples of Anevato cheese were obtained from two different production facilities. From each installation, samples were obtained (1 kg each) that were ready for distribution after a short time after its preparation (10-18 hours at 15 °C) ("fresh") and cheese samples after preservation under cooling (5 days). The samples were determined the population of lactic acid bacteria and then followed a microbiological analysis for their isolation. The isolates were further identified by applying the matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Results

The population of the lactic acid bacteria in samples from «Company A» for *Lactobacillus* and *Leuconostoc* was 7.4 ± 0.15 log cfu/g and for *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* was 7.9 ± 0.25 log cfu/g. In the "5-day" samples, the population was no statistically different ($P > 0.05$) for the *Lactobacillus* and *Leuconostoc* (7.7 ± 0.2 log cfu/g) and for *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* (7.4 ± 0.24 log cfu/g).

Microbiological examination of "fresh" samples from "Company B" showed a significantly ($P < 0.05$) lower population of lactic acid bacterial for both *Lactobacillus* and *Leuconostoc* such as for *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* and *Pediococcus* with values of 6.7 ± 0.20 log cfu/g and 6.1 ± 0.44 log cfu/g respectively. In the "5-day" samples populations grow and reached 7.9 ± 0.4 log cfu/g for *Lactobacillus* and *Leuconostoc* and 8.20 ± 0.38 log cfu/g for *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*.

In the "fresh" samples from "Company A" the lactic acid bacteria *Lc. lactis*, *Lb. paracasei* and *Lb. plantarum* were identified at 53.33%, 20% and 3,33% respectively. The results for the "5-day" product showed *Lb. paracasei* and *Lc. Lactis* as the dominant species with 40% and 33.33%, respectively.

Accordingly in the "fresh" product of "Company B" *Lc. Lactis*, *Lb. paracasei* and *Lb. casei* were identified at 30%, 30% and 20%, respectively. In the "5-day" samples dominant species were *Lb. paracasei* and *Lb. plantarum* both with 33,33%.

Important terms - Keywords: Anevato, lactic acid bacteria, microbiological characteristics.

Περιεχόμενα

| | |
|---|-----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | i |
| Κατάσταση πινάκων..... | ii |
| Κατάσταση σχημάτων..... | iii |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | iv |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο | 1 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1. Το τυρί και ο ορισμός του. | 1 |
| 1.2 Μικροβιολογία των τυριών | 5 |
| 1.3 μεταβολές της μικροβιολογικής χλωρίδας κατά την ωρίμανση..... | 6 |
| 1.4 Ζύμες | 9 |
| 1.5 Μύκητες | 9 |
| 1.6 Γαλακτικοί βακτηριοφάγοι | 10 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο | 11 |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 11 |
| 2. Το Ανεβατό..... | 11 |
| 2.1 Προϋποθέσεις του γάλακτος προς τυροκόμηση | 11 |
| 2.2 Τεχνολογία παρασκευής του τυριού «Ανεβατό» | 12 |
| 2.3 Χαρακτηριστικά του τυριού «Ανεβατό»..... | 13 |
| 2.4 Ονομασία προέλευσης | 13 |
| 2.5 Επισήμανση..... | 13 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο | 14 |
| 3 . Οξυγαλακτικές καλλιέργειες..... | 14 |
| 3.1 Σκοπός της χρήσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα : | 15 |
| 3.2 Φυσιολογία και μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων..... | 16 |
| 3.3 Μεταβολισμός της λακτόζης..... | 16 |
| 3.4 Βιοχημικές δραστηριότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων | 18 |
| 3.5 Αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια | 19 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο | 26 |
| 4. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων..... | 26 |
| 4.1 Γένος Lactobacillus..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Γένος <i>Pediococcus</i> | 28 |
| 4.3 Γένος <i>Leuconostoc</i> | 28 |
| 4.4 Γένος <i>Lactococcus</i> | 29 |
| 4.5 Γένος <i>Streptococcus</i> | 29 |
| 4.6 Γένος <i>Propionibacterium</i> | 30 |
| 4.7 Γένος <i>Enterococcus</i> | 30 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° | 31 |
| 5. Οξυγαλακτικά βακτήρια και προβιοτικά | 31 |
| 5.1 Κριτήρια επιλογής οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτική δράση..... | 31 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° | 36 |
| 6. Συλλογή των δειγμάτων..... | 36 |
| 6.1 Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων | 36 |
| 6.2 Απομόνωση και Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων | 37 |
| 6.3 Μέτρηση της τιμής του pH. | 40 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7° | 41 |
| 7. Αποτελέσματα..... | 41 |
| 7.1 Συζήτηση και συμπεράσματα | 45 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 48 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: τον κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο, Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, την κ. Πεξάρá Ανδρεάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου τον κ. Σολωμάκο Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την βοήθεια και τις γνώσεις τους καθώς και υπήρξαν σημαντικοί αρωγοί κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και ήταν παρών σε κάθε φάση της πορείας της μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες επίσης και στον κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των υποδομών όπου και πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της διπλωματικής εργασίας.

Στην κ. Μαρία Κυρίτη και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση, την συνεργασία και την στήριξή τους κατά την διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού μέρους.

Κατάσταση πινάκων

| |
|----------------------|
| Πίνακας 1.....σελ.25 |
| Πίνακας 2.....σελ.34 |
| Πίνακας 3.....σελ.42 |
| Πίνακας 4.....σελ.43 |
| Πίνακας 5.....σελ.44 |

Κατάσταση σχημάτων

| |
|--------------------|
| Σχήμα 1.....σελ.12 |
|--------------------|

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το τυρί και ο ορισμός του.

.Το γάλα αποτελούσε από τα αρχαία χρόνια μια τροφή εξαιρετική για τον άνθρωπο, καθώς περιέχει ένα μεγάλο φάσμα από θρεπτικές ουσίες που λειτουργούν ως δομικά συστατικά αλλά και ως πηγές ενέργειας για τον οργανισμό. Η πρώτη μαρτυρία διατροφής με γάλα μηρυκαστικού ανήκει στην ελληνική μυθολογία όταν ο Δίας κνηγημένος από τον πατέρα του τρέφεται με γάλα από την κατσίκα Αμάλθεια.

Για τον άνθρωπο μεγάλη θρεπτική αξία πέρα από το γάλα έχει και του τυρί που χρονολογείται ότι η πρώτη δημιουργία του ήταν πριν από 8.000 χρόνια στην εύφορη κοιλάδα μεταξύ του Τίγρη και του Ευφράτη. Έχουν αναφερθεί πολλές εκδοχές για τη δημιουργία του πρώτου τυριού αλλά δύο είναι οι κυριότερες. Η πρώτη εκδοχή αναφέρει την παρασκευή του τυριού ως τυχαία, στη μεταφορά του γάλακτος σε ασκό από στομάχι προβάτου κατά τη διάρκεια ταξιδιού στην έρημο. Η δεύτερη εκδοχή είναι πως μόνο τυχαία δεν ήταν η πρώτη παρασκευή τυριού, καθώς ήταν από την προσπάθεια του ανθρώπου προκειμένου να έχει τη δυνατότητα της διατήρησης των συστατικών του γάλακτος σε αβαθή πήλινα δοχεία στον ήλιο ή σε ξύλινα δοχεία. Και στις δύο περιπτώσεις όμως υπήρξε η δημιουργία πήγματος που σημαίνει ότι πραγματοποιήθηκε είτε εξαιτίας ορισμένων ενζύμων από το στομάχι του προβάτου είτε από την ανάπτυξη βακτηρίων. (Ανυφαντάκης,2004)

Από την περίοδο εκείνη αλλά μέχρι και σήμερα, έχουν παρασκευαστεί πολλά είδη τυριών και με διαφορετικούς τρόπους. Το τυρί μέχρι και σήμερα αποτελεί ένα προϊόν διατροφής που δίνει ενέργεια στον άνθρωπο και τον εφοδιάζει με πολλά και απαραίτητα δομικά συστατικά (Ζώτου Α, 2009).

Το γάλα μέχρι να μετατραπεί σε τυρί μπορεί να περάσει από διάφορες επεξεργασίες. Ανάλογα με τη τεχνολογία παρασκευής, προκύπτουν τυριά τα οποία έχουν διαφορετική μικροβιακή χλωρίδα, σύσταση, γεύση και εμφάνιση. Σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του κάθε τυριού παίζει η μικροβιακή του χλωρίδα, καθώς τα χαρακτηριστικά αυτά καθορίζονται από τα προϊόντα ζυμώσεων αυτής.

Σύμφωνα με τον ορισμό του Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1973), τυρί αποτελεί το ώριμο ή το νωπό προϊόν που προκύπτει από την στράγγιση, έπειτα από την πήξη πλήρους, άπαχου ή μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος ή τυρογάλακτος ή μείγματος ορισμένων ή και όλων των προϊόντων αυτών.

Ο ελληνικός κώδικας τροφίμων και ποτών (1998) ορίζει τα τυριά που παράγονται από γάλα και ωριμάζουν ως «τα προϊόντα του πήγματος που είναι απαλλαγμένο από τα τυρόγαλα, σε βαθμό επιθυμητό κάθε φορά και τα οποία παρασκευάστηκαν με την επενέργεια της πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μείγματα αυτών ή και σε μείγματα αυτών με κρέμα γάλακτος».

Το τυρί στην πράξη προέρχεται από την πήξη του γάλακτος και την στράγγιση του πήγματος. Κατά κύριο λόγο η πήξη γίνεται με ένζυμα (πυτιά) αλλά μπορεί να γίνει και με θέρμανση ή οξίνιση. Αφού το τυρόπηγμα υποστεί ορισμένους χειρισμούς καταναλώνεται είτε νωπό είτε έπειτα από ωρίμανση. Συνεπώς ο ορισμός που δίνει ο FAO/WHO ανταποκρίνεται περισσότερο στην πραγματικότητα.

Ο άνθρωπος μπόρεσε μάλλον τυχαία στην αρχή να παρασκευάσει τυρί ίσως από τότε που εκμεταλλεύτηκε το γάλα αφού η κύρια μεταβολή που υφίσταται είναι η οξίνιση που με τη σειρά της επιφέρει την πήξη του γάλακτος. Τα υπόλοιπα είναι εύκολο να τα φανταστεί κάποιος. Στα παλαιότερα κείμενα της ιστορίας (κείμενα Σουμερίων, Παλαιά Διαθήκη) αναφέρεται το τυρί και σαν πολύτιμο τρόφιμο/αγαθό μάλιστα. Με την πάροδο των χρόνων μπόρεσε ο άνθρωπος να παρασκευάσει πολλά διαφορετικά είδη τυριών, έτσι ώστε σήμερα ανα τον κόσμο να παρασκευάζονται δεκάδες είδη τυριών και με πολλές ποικιλίες το καθένα. Έτσι σήμερα υπάρχουν περισσότερα από 2.000 διαφορετικά ονόματα τυριών (Scott, 1986).

1.1 Τεχνολογία παρασκευής τυριού

1) Πρώτες Ύλες

Τα βασικά συστατικά του γάλακτος που βρίσκονται μέσα σε αυτό σε μεγαλύτερη αναλογία είναι το νερό, το λίπος, η λακτόζη τα άλατα αλλά και οι πρωτεΐνες, οι οποίες ανήκουν σε δυο κατηγορίες, στις πρωτεΐνες ορού και τις καζεΐνες. Τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος όπως βιταμίνες, ορμόνες, αζωτούχες ουσίες μη πρωτεϊνικής φύσεως, κετόνες, αλδεύδες, αλειφατικά οξέα, και τα αέρια και σωματικά κύτταρα βρίσκονται σε ποσότητες πολύ μικρές (Smit, 2003).

Νερό: Το νερό αποτελεί το συστατικό του γάλακτος το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία σε αυτό. Η περιεκτικότητά του κυμαίνεται από 80-88% ανάμεσα στα διαφορετικά είδη του γάλακτος. Το νερό είναι το μέσο στο οποίο υπάρχουν και τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος είτε με τη μορφή γαλακτώματος, είτε με τη μορφή μοριακού διαλύματος είτε υπό κολλοειδή διασπορά. Το νερό βρίσκεται στο γάλα ως ελεύθερο ή δεσμευμένο (Smit, 2003).

Πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν μεγάλο ενδιαφέρον καθώς απαντώνται σε υψηλή αναλογία σε αυτό, προσδιορίζουν τις φυσικοχημικές του ιδιότητες σε μεγάλο βαθμό, ιδιαίτερα αυτές που έχουν υψηλή θρεπτική αξία και σχετίζονται με τη σταθερότητά του. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις πρωτεΐνες ορού και τις καζεΐνες (Smit, 2003).

- *Πρωτεΐνες ορού:* Κυριότερες πρωτεΐνες ορού αποτελούν η οροαλβουμίνη, η α-γαλακταλβουμίνη, η β-γαλακτογλοβουλίνη και οι ανοσοσφαιρίνες. Οι πρωτεΐνες ορού σε αντίθεση με τις καζεΐνες εμφανίζουν υψηλά επίπεδα δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής. Είναι τυπικές σφαιρικές πρωτεΐνες και μετουσιώνονται με την επίδραση της θέρμανσης. Δεν περιέχουν φώσφορο στο μόριό τους και δεν είναι ευαίσθητες ως προς την παρουσία των ιόντων ασβεστίου.
- *Καζεΐνες:* Οι καζεΐνες αποτελούν το κλάσμα των πρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C. Με βάση τη διάταξη των αμινοξέων στο μόριό τους διακρίνονται σε αs1-, αs2-, β-, και κ-καζεΐνες. Πειραματικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι οι καζεΐνες έχουν χαμηλά επίπεδα δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής. Το γεγονός αυτό τις κάνει σταθερές σε παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση και είναι ευάλωτες στην πρωτεόλυση κατά τη διαδικασία ωρίμανσης των τυριών.

Λίπος: Στο γάλα, το λίπος βρίσκεται σε μορφή λιποσφαιρίων που περιβάλλονται από μια μεμβράνη (προστατευτικό στρώμα). Ο ρόλος αυτής της μεμβράνης είναι να εμποδίζει τη συσσωμάτωση τους διατηρώντας με αυτό τον τρόπο το σφαιρικό σχήμα τους και στο υδατικό περιβάλλον του γάλακτος αλλά και να προστατεύει το λίπος από την αυτό-οξειδωση αλλά και από την δράση των ενζύμων που υπάρχουν στο γάλα(Μάντης,2005).

Λακτόζη: Η λακτόζη αποτελεί το κύριο σάκχαρο του γάλακτος, και η παρουσία της είναι σημαντική καθώς έχει κυρίαρχο ρόλο στον έλεγχο των ζυμώσεων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ακόμη προσδίδει θρεπτική αξία στο γάλα, αποτελεί, πηγή γαλακτόζης, πηγή ενέργειας και επηρεάζει τη διαλυτότητα των αποθηκευμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Επίσης έχει βασικό ρόλο σε ο,τι έχει να κάνει με την εμφάνιση του χρώματος αλλά και της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί υψηλή θερμική επεξεργασία (Μάντης, 2005).

Άλατα: Το γάλα περιέχει ανόργανα και οργανικά άλατα. Τα κύρια άλατα που απαντώνται στο γάλα είναι τα φωσφορικά, τα χλωριούχα και κιτρικά άλατα ασβεστίου, καλίου, νατρίου και μαγνησίου. Τα άλατα βρίσκονται σε διάφορες μορφές στο γάλα. Ορισμένα από αυτά απαντώνται σε μορφή διαλυτή, άλλα είναι ενωμένα με διάφορα συστατικά και τα υπόλοιπα βρίσκονται σε μορφή ιόντων. Ο ρόλος των αλάτων του γάλακτος είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Πιο συγκεκριμένα, ο φώσφορος και το ασβέστιο

σταθεροποιούν την κολλοειδή κατάσταση της καζεΐνης στο γάλα. Τα ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν την πήξη του γάλακτος αλλά και το μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων κατά την παρασκευή τυριών. Η αύξηση των χλωριόντων αποτελεί ένδειξη προσβολής των ζώων από μαστίτιδα, ενώ το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται από μικροοργανισμούς για την παραγωγή αρωματικών ουσιών (Smit, 2003).

2) Πυτιά

Η πυτιά, αποτελεί το κύριο μέσο με το οποίο γίνεται η πήξη του γάλακτος. Η πυτιά είναι ζωικής προέλευσης και αποτελεί παρασκεύασμα του ηνύστρου των μικρών μηρυκαστικών, το οποίο περιέχει το ένζυμο ρεννίνη και σε μικρότερη αναλογία άλλα ένζυμα όπως πεψίνη, θρυψίνη και άλλες πεπτιδάσες. (Ανυφαντάκης, 1993).

Η καθαρή κρυσταλλική ρεννίνη έχει μεγάλη πηκτική ισχύ ($1,5 \times 10^6$) και σε πρώτο στάδιο προκαλεί την πήξη του γάλακτος ενώ αργότερα συμβάλλει εξαιτίας της πρωτεολυτικής της δράσης στην ωρίμανση του τυριού.

Η πυτιά πρέπει να είναι απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν κάποια ανώμαλη ζύμωση ή είναι παθογόνοι και πρέπει να έχει ικανοποιητική πηκτική ισχύ. Εφόσον δεν παρασκευάζεται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής μπορεί ανά γραμμάριο να φέρει εκατομμύρια βακτηρίων (Μάντης, 2000).

3) Οξυγαλακτική Καλλιέργεια

Τα περισσότερα τυριά αποτελούν προϊόντα ζύμωσης, η οποία ξεκινά από την πήξη του γάλακτος και ολοκληρώνεται στο στάδιο της ωρίμανσης. Αυτή η ζύμωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια κάποιων ειδικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων ή ειδών μυκήτων. Από τα βακτήρια, για ενοφθαλισμό του γάλακτος χρησιμοποιούνται τα παρακάτω:

- Είδη *Lactococcus*: *L. lactis*, *L. diacetylactis*, *L. cremoris*
- Είδη *Streptococcus*: *S. thermophiles*
- Είδη *Propionibacterium*: *P. Shermanii*
- Είδη *Lactobacillus*: *L. bulgaricus*, *L. Lactis*, *L. casei*, *L. helveticus*
- *Brevibacterium linens* (για επιφανειακό ενοφθαλμισμό)

Από τους μύκητες, τα είδη *Penicillium* (*P. Glaucum*) χρησιμοποιούνται για εσωτερικό ενοφθαλμισμό και τα είδη *Penicillium camemberti*, *P. Caseicolum* (*P. Candidum*) για επιφανειακή ανάπτυξη. Προκειμένου να παραχθεί το κάθε είδος τυριού, τα παραπάνω στελέχη χρησιμοποιούνται σε διαφορετικούς συνδυασμούς.

Η καλλιέργεια χρήσεως προετοιμάζεται από μητρική, δηλαδή μια διαδικασία που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις ή

χρησιμοποιείται συμπυκνωμένη καλλιέργεια εμπορίου τελικής χρήσεως για ενοφθαλμισμό απευθείας του γάλακτος προς τυροκόμηση.

Στο παρελθόν η τυροκομία δεν χρησιμοποιούσε ειδικά οξυγαλακτικά στελέχη καθώς η ζύμωση των τυριών γινόταν με την βοήθεια της αυτόχθονης οξυγαλακτικής χλωρίδας. Αυτό μπορούσε να γίνει κατορθωτό διότι το γάλα δεν παστεριωνόταν. Οι ανώμαλες ζυμώσεις όμως ήταν συχνό φαινόμενο. (Μάντης,2000)

4) *Αλάτι*

Χρησιμοποιείται το κοινό μαγειρικό αλάτι το οποίο όμως πρέπει να είναι πολύ καλά αφυδατωμένο (υγρασία <4%) και απαλλαγμένο από ξένες ύλες. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι προσμίξεις μαγνησίου και χαλκού που δε πρέπει να ξεπερνούν τα 0,0,% καθώς διαφορετικά υπάρχει να δώσουν πικρότητα στο προϊόν.

Το αλάτι από μικροβιολογικής άποψης πρέπει να είναι απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και από μη παθογόνα ψυχρότροφα που μπορούν να προκαλέσουν ανώμαλες ζυμώσεις. Αλάτι το οποίο είναι κακής μικροβιολογικής ποιότητας μπορεί να φέρει ανά γραμμάριο εκατομμύρια βακτήρια.(Μάντης,2000)

1.2 Μικροβιολογία των τυριών

Όπως πολλά τρόφιμα έτσι και τυριά δεν αποτελούν στείρα προϊόντα. Όλα τα είδη που ωριμάζουν σε μεγάλο βαθμό φέρουν πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Παράλληλα και ανάλογα με τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στα διάφορα στάδια παραγωγής τους προστίθενται και άλλα βακτήρια, ζύμες ή μύκητες. Αυτός ο μεικτός πληθυσμός δεν μένει σταθερός αλλά μεταβάλλεται ποσοτικά αλλά και ποιοτικά. Η πορεία της μεταβολής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες κυρίως όμως από την θερμοκρασία, τον βαθμό οξύτητας, τη συγκέντρωση του NaCl, το είδος του μικροβιακού ανταγωνισμού αλλά και από το συντελεστή του ενεργού νερού. Υπό ομαλές συνθήκες εξέλιξης της ζύμωσης το αρχικό φορτίο του τυριού μειώνεται με σταθερό ρυθμό και μετά το πέρας της ωρίμανσης πολλά είδη βακτηρίων, μεταξύ των οποίων και ορισμένα παθογόνα δεν υπάρχουν πλέον.

Ειδικότερα η μικροχλωρίδα των τυριών αμέσως μετά την παρασκευή τους αποτελείται:

- Από τα ειδικά οξυγαλακτικά στελέχη που προστέθηκαν και στα οποία βασίζεται η ζύμωση της λακτόζης και στη συνέχεια η ωρίμανση του τυριού. Συνήθως πρόκειται για συνδυασμό ειδών των γενών *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*.

- Από θερμοάντοχα βακτήρια, είδη των οποίων επιζούν της παστερίωσης. Πρόκειται για είδη τα οποία προϋπήρχαν στο γάλα και κυρίως ανήκουν στα γένη *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*. Αυτά τα βακτήρια βρίσκονται σε μικρό πληθυσμό και σε κανονικές συνθήκες δεν μπορούν να υπερκεράσουν την ειδική οξυγαλακτική χλωρίδα και να εκτρέψουν την πορεία της ζύμωσης.
- Από βακτήρια επιμολύνσεως τα οποία προέρχονται από την πυτιά, το αλάτι, τα υπόλοιπα πρόσθετα και κυρίως από τα μηχανήματα, τα σκεύη και γενικά το περιβάλλον.

Σε αυτή τη φάση υπεισέρχονται σε μικρούς πληθυσμούς κάποια κυρίως κατά gram αρνητικά είδη (κολοβακτηριοειδή, είδη *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* κ.α.) καθώς και ευρωμύκητες και ζυμομύκητες. Λόγω κακών συνθηκών όμως υγιεινής, δεν πρέπει να αποκλείεται και η επιμόλυνση με παθογόνους μικροοργανισμούς (*Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*) με κύρια πηγή μόλυνσης το προσωπικό.

Αν το γάλα που προορίζεται για τυροκόμηση δεν παστεριώνεται, τότε η πλούσια σε είδη και αριθμό μικροβιακή του χλωρίδα μεταφέρεται στο τυρόπηγμα. Σε αυτήν την περίπτωση τα γάλα ενδεχομένως να περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς που είναι προερχόμενοι από το ζώο και αυτό μπορεί να βάλει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία καθώς οι μεταβολές της μικροβιακής χλωρίδας στη φάση της ωρίμανσης δεν είναι σταθερές και δεν εξασφαλίζουν την εξυγίανση του τυριού.

Τα τυριά που εν ωριμάζουν και πιο συγκεκριμένα αυτά που παρασκευάζονται χωρίς την προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας έχουν μικρό πλυθησμό οξυγαλακτικών βακτηρίων και η μικροχλωρίδα τους είναι αποτέλεσμα κυρίως επιμολύνσεων. Από τη χλωρίδα αυτή, τα ψυχρότροφα είδη πολλαπλασιάζονται κατά την συντήρηση του προϊόντος και επιφέρουν τελικά την αλλοίωσή του. (Μάντης, 2000)

1.3 μεταβολές της μικροβιολογικής χλωρίδας κατά την ωρίμανση

1. Οξυγαλακτική χλωρίδα

Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ο *Streptococcus thermophilus* και τα είδη *Lactococcus* (*L. lactis*, *L. diacetylactis*, *L. cremoris*) είναι αυτά που ο πολλαπλασιασμός τους είναι έντονος στα πρώτα στάδια της πήξης όταν η οξύτητα είναι σχετικά μικρή (pH 6,4-5,8) και ο πληθυσμός τους μέσα σε λίγες ώρες ανέρχεται σε 10^8 - 10^9 /gr. Στην συνέχεια, όσο η οξύτητα αυξάνεται και μειώνεται το pH κάτω από 5,8 ο πολλαπλασιασμός σταματά και ξεκινά η μείωση του πληθυσμού τους με ρυθμό που είναι ανάλογος του είδους του βακτηρίου και του τυριού. Ο *L. cremoris* είναι περισσότερο ευαίσθητος από τους *Streptococcus thermophiles* και τον *L. lactis*.

Σε αντίθεση με τους στρεπτόκοκκους, τα είδη *Lactobacillus* πολλαπλασιάζονται στην αρχή αργά και μόνο όταν το pH μειωθεί κάτω του 6,0 αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται σε έντονο βαθμό. Έτσι κατά τις πρώτες ώρες της πήξης ο πληθυσμός τους δεν ξεπερνά τα 10^3 - 10^4 κύτταρα/gr τυροπήγατος και ανάλογα με το είδος του τυριού διατηρείται στα επίπεδα αυτά από 1 έως 6 μήνες. (Chapman και Sharpe, 1981). Την ίδια συμπεριφορά με τους λακτοβάκιλλους έχουν και τα είδη *Pediococcus* ενώ τα είδη *Leuconostoc* συμπεριφέρονται όπως οι στρεπτόκοκκοι. (Reiter και συν., 1967)

2. Χλωρίδα επιμόλυνσης

Η χλωρίδα επιμόλυνσης αποτελείται κυρίως από τα είδη των γενών *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus* κ.α. όπως επίσης και ζύμες και μύκητες.

Αυτά τα είδη δεν δημιουργού προβλήματα Δημόσιας Υγείας συνήθως, αλλά σε περίπτωση που επικρατήσουν είναι ικανά να δημιουργήσουν αλλοιώσεις και τεχνολογικά προβλήματα

Οι μικρόκοκκοι πολλαπλασιάζονται κατά τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης στη συνέχεια όμως ο πληθυσμός τους μειώνεται, αλλά μπορούν να επιβιώσουν από 1-6 μήνες.

Τα ψυχρότροφα αρνητικά κατά gram είδη, μπορούν να πολλαπλασιαστούν στα αρχικά στάδια αργότερα όμως καθώς αυξάνεται η οξύτητα, ο πληθυσμός τους μειώνεται.

Το κολοβακτηριοειδή μπορούν να επιβιώσουν στα τυριά άλμης (φέτα, τελεμέ) από λίγες εβδομάδες μέχρι και 3 μήνες ανάλογα με τον αρχικό τους πληθυσμό και την πορεία της οξύτητας (Μανωλκίδης και Τζανετάκης, 1972, Πεντσιος και συν., 1972)

3. Παθογόνα είδη

Τα τυριά εάν παρασκευάζονται από γάλα απαστερευμένο είναι δυνατόν να περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς που είναι προερχόμενοι από το ζώο και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή ζωνόση στον άνθρωπο. Ακόμα μπορούν να επιμολυνθούν από το περιβάλλον ή τους ανθρώπινους φορείς με παθογόνα βακτήρια.

Η τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών δεν είναι γνωστή με βεβαιότητα είτε αυτοί προέρχονται από το ζώο είτε είναι αποτέλεσμα επιμολύνσεων. Ορισμένοι από αυτούς θνήσκουν κατά το στάδιο της ωρίμανσης, άλλοι έχουν μείωση του πληθυσμού τους ενώ μερικοί επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

- **Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli*:** Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ο πληθυσμός τους μειώνεται σταθερά αλλά στα ημίσκληρα και σκληρά τυριά παραμένουν ανιχνεύσιμα και μετά την ωρίμανση. Στο τυρί Camembert βρέθηκε ότι επιβιώνει από 4 έως 8 εβδομάδες (Frank και συν., 1977, Rash και Kosikowski, 1982).
- **Σαλμονέλλες:** Όταν ακόμα δεν έχει αναπτυχθεί ικανοποιητική οξύτητα, δηλαδή κατά τις πρώτες ώρες της πήξης είναι δυνατό να πολλαπλασιαστούν. Όμως με την αύξηση της οξύτητας (pH <4,5), υπάρχει μείωση του πληθυσμού. Η *Salmonella typhimurium* επιβίωσε σε τυρί φέτα από 20 έως 120 μέρες, η *S. Typhi* σε τυρί Domiati από 15 έως 36 μέρες ανάλογα με το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος και την πορεία της οξύτητας (Tzanetis και Papavasiliou, 1975, Naguib και συν., 1979).
- **Λιστέρια:** Αυτό το βακτήριο είναι ανθεκτικό στις συνθήκες ωρίμανσης. Σε λευκό τυρί άλμης πολλαπλασιάστηκε κατά τις πρώτες μέρες και τα ην 28^η μέρα αριθμήθηκαν 1,3x10⁵ βακτήρια/gr τυριού (Šipka και συν., 1974).
- **Βρουκέλλες:** επιβιώνουν περισσότερο στα σκληρά τυριά παρά στα μαλακά. Επιβίωσαν σε τυρί Cheddar έως και 6 μήνες, σε Pecorino έως 3 μήνες και σε Camembert 20 μέρες. (Charman και Sharpe, 1981). Στο τυρί φέτα πληθυσμοί της τάξης 4x10⁵/ml γάλακτος καταστρέφονται εντός ένα μήνα (Πανέτσος και συν., 1971).
- ***Yersinia enterocolitica*:** Αν και αποτελεί ψυχρότροφο βακτήριο και μπορεί να πολλαπλασιάζεται στους 4°C, βρέθηκε ότι σε κάποια τυριά (Cheddar, Provolone, Mozzarella) θνήσκει εντός 10-23 ημερών (Schiemann, 1978). Στο τυρί φέτα από πρόβειο γάλα παρατηρήθηκε ότι επιβίωσε από 5 έως και 30 μέρες ανάλογα με τον αρχικό ενοφθαλμισμό και τον ρυθμό εξέλιξης της οξύτητας (Karaioanoglou και συν., 1985).
- **Εντεροτοξινογόνοι σταυλόκοκκοι:** Ανεξάρτητα από το είδος του τυριού ο μεγάλος πληθυσμός των εντεροτοξιγόνων στελεχών σταφυλοκόκκων που υπάρχει στο γάλα πριν από την πήξη οδηγεί στην παραγωγή εντεροτοξίνης. Το ίδιο συμβαίνει και όταν η πορεία της οξύτητας του τυριού δεν είναι ικανοποιητική κατά τις 24 πρώτες ώρες. Η εντεροτοξίνη εφόσον παραχθεί μπορεί να παραμείνει δραστική για πολλούς μήνες, ενώ οι σταυλόκοκκοι καταστρέφονται σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μια εβδομάδα μέχρι και 2 μήνες ανάλογα με το είδος του τυριού και τον αρχικό τους πληθυσμό (Μάντης, 1973, Tatini και συν., 1971, 1973).
- **Στρεπτόκοκκοι:** Οι παθογόνοι στρεπτόκοκκοι μπορούν να επιβιώσουν στα τυριά από 2 μέχρι και 5 μήνες. Οι στρεπτόκοκκοι που ανήκουν στην ομάδα D (εντερόκοκκοι) επιβιώνουν για εβδομάδες έως και μήνες, ενώ στα αρχικά στάδια τη παρασκευής ενδέχεται να πολλαπλασιαστούν και να φτάσουν σε πληθυσμούς που είναι ικανοί να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση (Snyder και συν., 1978).
- **Μυκοβακτηρίδια:** Τα μυκοβακτηρίδια θανατώνονται κατά τη διαδικασία της παστερίωσης αλλά ως οξεάντοχα που είναι δεν βλάπτονται από την οξύτητα που αναπτύσσεται στα τυριά και μπορούν να επιβιώσουν για χρόνο που ξεπερνά τον χρόνο ωρίμανσης για τα περισσότερα τυριά. (Charman και Sharpe, 1981).

- **Ιοί:** λίγα πράγματα είναι γνωστά για την επιβίωση διαφόρων ιών κατά την ωρίμανση των τυριών. Ο ιός του αφθώδη πυρετού είναι σχετικά ευαίσθητος σε περιβάλλον που είναι όξινο και αδρανοποιείται πλήρως κατά την ωρίμανση πολλών τυριών. Οι ανθρωπογενείς ιοί όπως της πολυομυελίτιδας, της γρίπης και ιοί ECHO θανατώνονται κατά τη παστερίωση εάν όμως υπεισέλθουν μετά την παστερίωση μπορούν να παραμείνουν δραστικοί για μήνες στο τυρί. (Charman και Sharpe, 1981).

1.4 Ζύμες

Πολλά είδη ζυμών είναι δυνατό να βρεθούν στο γάλα και προέρχονται από τα κόπρανα των ζώων ή το περιβάλλον. Τα περισσότερα είδη ζυμών όταν αναπτυχθούν στο γάλα προκαλούν αεριογόνο ζύμωση (αλκοολική), η οποία δεν είναι επιθυμητή. Συχνά ανευρίσκονται είδη των γενών *Candida* (*C. lactis*, *C. cremoris*, *C. Pseudotropicalis*)

Κάποιες ζύμες προκαλούν ωφέλιμες ζυμώσεις και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ορισμένων προϊόντων ζύμωσης ως οξυγαλακτικά στελέχη, όπως τα στελέχη που υπεισέρχονται στη ζύμωση του γάλακτος για την παραγωγή κεφίρ και του Koumiss, ενώ άλλα στελέχη χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πρωτεϊνών μονοκυταρικής προελεύσεως (πρωτεΐνες SCP) με πρώτη ύλη το τυρόγαλα (Μάντης, 2000).

1.5 Μύκητες

Πέρα από ορισμένα είδη του γένους *Penicillium* (*P. Roqueforti*, *P. Camemberti*), που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ορισμένων τυριών όπως (Roquefort, Camembert), υπάρχουν και πολλά άλλα είδη τα οποία μπορούν να επιμολύνουν το γάλα. Τα κυριότερα από αυτά ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Altenaria*, *Mucor*, *Thamnidium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* (Frazier, 1967).

Οι μύκητες αναπτύσσονται επιφανειακά στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως στα τυριά τα οποία και αλλοιώνουν. Ορισμένα είδη μυκήτων παράγουν μυκοτοξίνες οι οποίες διαχέονται και πέρα από το σημείο ανάπτυξης του μύκητα και για τον λόγο αυτό έχουν μεγάλο ενδιαφέρον από άποψη υγιεινής. (Bullerman, 1979).

1.6 Γαλακτικοί βακτηριοφάγοι

Οι γαλακτικοί βακτηριοφάγοι αποτελούν λοιμογόνους βακτηριοφάγους, οι οποίοι προσβάλλουν διάφορα οξυγαλακτικά στελέχη και τα καταστρέφουν. Εξουδετερώνουν έτσι τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες δημιουργώντας σοβαρά προβλήματα στην παραγωγή των προϊόντων ζύμωσης του γάλακτος (γιαούρτη, τυρί κ.α.). τα οξυγαλακτικά βακτήρια των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus* και *Streptococcus* είναι ευαίσθητα στους βακτηριοφάγους εν αντιθέσει με αυτά των γενών *Leuconostoc* και *Propionibacterium* που σπάνια προσβάλλονται. Η προσβολή μιας οξυγαλακτικής καλλιέργειας από κάποιο λοιμογόνο βακτηριοφάγο οδηγεί είτε σε καθολική λύση των βακτηριακών κυττάρων είτε ορισμένα κύτταρα μεταλλάσσονται, επιβιώνουν και δίνουν στον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο νέα ανθεκτική καλλιέργεια (Sandine,1979).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Το Ανεβατό

Η παραγωγή του τυριού Ανεβατό πραγματοποιείται στο νομό Γρεβενών καθώς και στην επαρχία Βοίου Κοζάνης και αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π). Παράγεται από γίδινο ή πρόβειο γάλα ή και μείγμα αυτών. Για την παρασκευή του τυριού το γάλα που χρησιμοποιείται πρέπει αποκλειστικά να προέρχεται από τις περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω.

2.1 Προϋποθέσεις του γάλακτος προς τυροκόμηση

Οι προϋποθέσεις που απαιτούνται για το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού «Ανεβατό» είναι οι εξής :

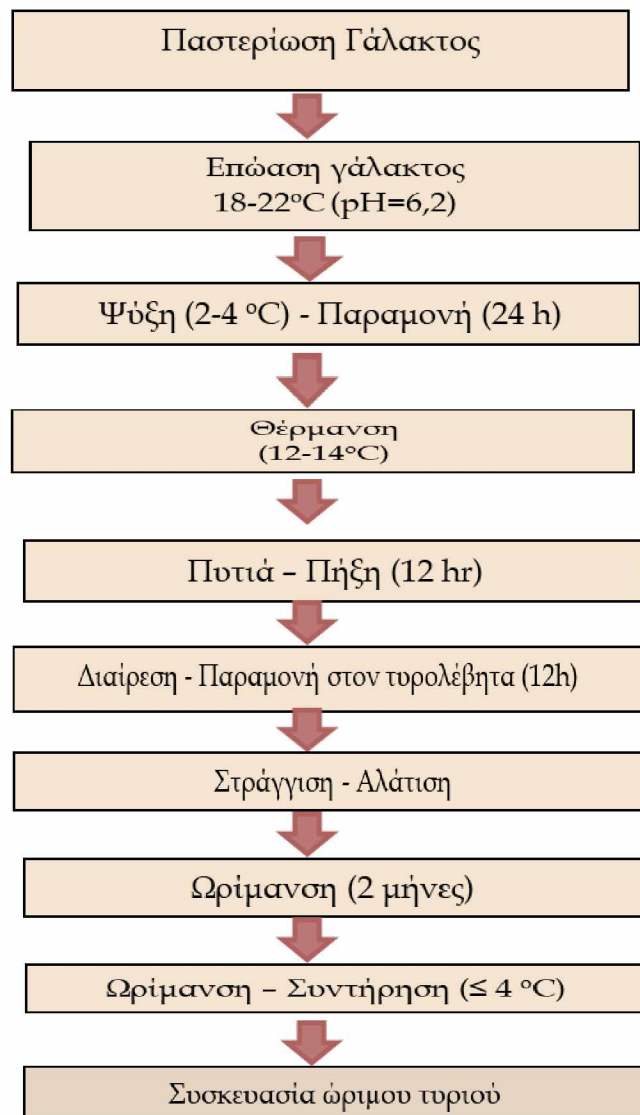
- Το γάλα πρέπει να είναι αποκλειστικά αιγοπρόβειο και να παρασκευάζεται στις γεωγραφικές περιοχές που προαναφέρθηκαν. Η διατροφή τους επίσης έχει ως βάση τη χλωρίδα της ίδιας γεωγραφικής περιοχής.
- Το γάλα πρέπει να παραλαμβάνεται έπειτα από αμέλξεις, τουλάχιστον δέκα ημέρες έπειτα από τον τοκετό.
- Η πήξη πρέπει να ολοκληρώνεται μέσα σε 48 ώρες από την άμελξη. Σύμφωνα με τις κειμενικές διατάξεις, η θερμοκρασία είναι ελεγχόμενη μέχρι και την πήξη.

Η παρασκευή του τυριού «Ανεβατό» από άλλα είδη γάλακτος εκτός των προβλεπόμενων από τη μονοθεσία απαγορεύεται. Για το γάλα που προορίζεται για τυροκόμηση απαγορεύεται η προσθήκη πρωτεϊνών γάλακτος, η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης γάλακτος, συντηρητικών, καζεϊνικών αλάτων, αντιβιοτικών και χρωστικών ουσιών.

Επιτρέπεται η προσθήκη ορισμένων ενζύμων ή και προσθήκη παραδοσιακής πυτιάς. Επίσης επιτρέπεται να προστεθούν καλλιέργειες αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε περίπτωση που το γάλα παστεριωθεί.

2.2 Τεχνολογία παρασκευής του τυριού «Ανεβατό»

- Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού «Ανεβατό» πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις που ορίζει η νομοθεσία.
- Το γάλα που προορίζεται για την παρασκευή του τυριού «Ανεβατό» συλλέγεται και τοποθετείται σε θάλαμο θερμοκρασίας 18-22°C μέχρι η οξύτητά του να φτάσει περίπου 35°D. Έπειτα τοποθετείται σε ψυκτικούς θαλάμους σε θερμοκρασία 2-4°C και παραμένει για 24 ώρες. Στη συνέχεια θερμαίνεται σε θερμοκρασία 12-14°C και προστίθεται πυτιά σε ποσότητα επαρκή ώστε να προκληθεί πήξη σε 12 ώρες. Πραγματοποιείται διαίρεση του τυροπήγματος και παραμονή στον τυρολέβητα για 12 ώρες. Ακολουθεί η στράγγιση το επιφανειακό αλάτισμα και ωρίμανση για τουλάχιστον 2 μήνες.



Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής παρασκευής του τυριού «Ανεβατό»

2.3 Χαρακτηριστικά του τυριού «Ανεβατό»

Τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ) (ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιγνωστικά κ.λπ.) είναι:

❖ Χημική σύσταση:

Το Ανεβατό έχει μέγιστη υγρασία 60% κατά βάρος και η ελάχιστη λιποπεριεκτικότητά του επί ξηρού είναι 45% κατά βάρος. Το pH κυμαίνεται σε τιμές 4,0-4,5.

❖ Τύπος τυριού

Το Ανεβατό είναι ένα τυρί μαλακό και έχει κοκκώδη υφή. Τα βάρη του είναι διάφορα και το χρώμα του είναι λευκό. Άλλα κύρια χαρακτηριστικά του είναι ότι χαρακτηρίζεται από μια ευχάριστη υπόξινη γεύση και ευχάριστο άρωμα. (Κ.Τ.Π, Απόφ. 313060/18.1.94, ΦΕΚ 24/Β/18.1.94)

2.4 Ονομασία προέλευσης

Το Ανεβατό παραδοσιακά παραγόταν από έλληνες ποιμένες στις περιοχές της δυτικής Ελλάδας με μεγάλα κοπάδια αιγοπροβάτων. Γινόταν παραλαβή το γάλακτος πριν το ζώα σιτιστούν ακόμα, το πρωί και γινόταν προσθήκη πυτιάς σε αυτό. Το γάλα έπηζε κατά την διάρκεια της ημέρας και το πήγμα εμφανιζόταν στην επιφάνεια και έτσι προέκυψε και η ονομασία του τυριού. Το απόγευμα κατά την επιστροφή τους με τα κοπάδια, το γάλα ήταν έτοιμο προς στράγγιση. (Hatzikamari et al., 1999).

2.5 Επισήμανση

Στις συσκευασίες του τυριού «Ανεβατό» υποχρεωτικά αναγράφονται οι ακόλουθες ενδείξεις :

- Ανεβατό
- Τυρί
- Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης
- Επωνυμία και έδρα του συσκευαστή/παραγωγού

- Ημερομηνία παραγωγής
- Βάρος περιεχομένου
- Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής :
 - Τα τρία πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης : ANEB
 - Ο αύξοντας αριθμός του μέσου συσκευασίας
 - Ημερομηνία παραγωγής , παράδειγμα (ANEB – 1113-20/2/94)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3 . Οξυγαλακτικές καλλιέργειες

Οξυγαλακτικές καλλιέργειες ονομάζονται οι καλλιέργειες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πρόκληση των ωφέλιμων ζυμώσεων στα τρόφιμα. Αποτελούνται από στελέχη διαφόρων ειδών βακτηρίων τα οποία καλούνται οξυγαλακτικά βακτήρια. Σε αυτά ανήκουν τα εξής 11 γένη : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, και *Vagococcus* (Cogan,1996).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαρτίζονται από τα εξής χαρακτηριστικά : είναι Gram θετικά μη σπορογόνα βακτήρια, καταλάση αρνητικά, ευαίσθητα και απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά, οξεοάντοχα και ζυμώνουν τα σάκχαρα με κύριο τους στόχο τη παραγωγή γαλακτικού οξέος (Axelsson, 1993).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται πολύ καλύτερα σε καλής ποιότητας γάλα και η ανάπτυξή τους αναστέλλεται από τα απολυμαντικά και απορρυπαντικά. Οι ικανότητες βιοσύνθεσης τους είναι περιορισμένες και με διατροφικές απαιτήσεις σε βιταμίνες, αμινοξέα, πυριδίνες και πουρίνες καθώς και σε ορισμένα πεπτιδία για την ανάπτυξή τους (Axelsson,1993, Limsowtin G.K.Y.,et al., 2002).

Τα κυριότερα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην γαλακτοκομία ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες είναι *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και διεθνώς ονομάζονται starters (εκκινητές). Αυτά τα γένη εμφανίζουν τα γενικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμώνουν τα σάκχαρα με αναερόβια ζύμωση προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ ή και CO₂. Παρά το γεγονός έλλειψης συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, αρκετά είδη αναπτύσσονται καλά παρουσία οξυγόνου και είναι αεροανεκτικά (Cogan,1996).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους ή ανάλογα με τον μεταβολισμό τους. Όσον αφορά τον μεταβολισμό, διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από

τους λακτοβάκιλλους ομάδας I και *S. thermophilus* που είναι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί και μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς γαλακτικό οξύ.

Στη δεύτερη κατηγορία βρίσκονται τα λευκονοστόκια και οι λακτοβάκιλλοι ομάδας III που είναι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί

Τέλος, η τρίτη κατηγορία αφορά λακτοβάκιλλους ομάδας II (εντερόκοκκοι, λακτόκοκκοι) που έχουν μια ενδιάμεση θέση. Με τη σειρά τους μεταβολίζουν τις εξόζες κατά τη γλυκολυτική οδό και τις πεντόζες και άλλα σάκχαρα μέσω της φωσφολυκκονικής οδού (Axelsson, 1993)

Βάσει της θερμοκρασίας ανάπτυξης υπάρχουν δύο κατηγορίες οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα θερμοφιλα και τα μεσόφιλα. Τα θερμοφιλα αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 20°C-50°C (ιδανική 40°C-42°C) ενώ τα μεσόφιλα αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 10°C-40°C (ιδανική 30°C). Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριών διακρίνονται από τα στελέχη που περιέχουν σε μεσόφιλες, θερμοφιλες ή και μικτές αν περιέχουν βακτήρια και των δύο κατηγοριών (Marshall, 1993, Μάντης, 2000).

3.1 Σκοπός της χρήσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα :

- Παραγωγή γαλακτικού οξέος με ή χωρίς αέριο, που έχει ως αποτέλεσμα τη ζύμωση της λακτόζης. Το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτικού οξέος παράγεται από τα ομοζυμωτικά θερμοφιλα βακτήρια όπως *L.bulgaricus*, *L.acidophilus*, *S. thermophilus*. Η πτώση του pH κάτω από 5,2 συντελεί στην αποσύνδεση των συμπλόκων του ασβεστίου από τις φωσφορορεσίνες του γάλακτος, στην αποδιοργάνωση των μυκκιλίων του λίπους, ενώ παράλληλα αναδιοργανώνουν τα υπομικκύλια που αποτελούν τη βάση του καζεϊνικού πλέγματος που οδηγεί τελικά στο πήγμα (Ανυφαντάκης Ε. Μ.,1992).
- Ευνοούν την παραγωγή του βουτύρου και την πήξη του γάλακτος (Condon S.,1987)
- Προωθούν την ζύμωση στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα ελέγχοντας τη σύνθεση της μικροχλωρίδας τους και μη επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και την επικράτηση των ανεπιθύμητων βακτηρίων που βρίσκονται στο γάλα. (Ανυφαντάκης Ε.Μ.,1992)
- Αυξάνουν το χρόνο διατήρησης των γαλακτοκομικών προϊόντων επειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών λόγω: α) του όξινου και δυσμενούς περιβάλλοντος που δημιουργούν β) των μεταβολιτών με αντιβακτηριακή δράση που παράγουν και γ) του κυτταρικού ανταγωνισμού που παρουσιάζουν (Ouwehand A. C., et.al.,1999).

- Βελτιώνουν το άρωμα των ζυμώσιμων προϊόντων, ιδιαίτερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια *L. diacetylactis* ή αυτά του γένους *Leuconostoc* sp. (Ανυφαντάκης Ε. Μ. 2004).
- Ευνοούν την πρωτεόλυση επιδεικνύοντας μικρή ενδοπεπτιδασική δραστηριότητα αλλά μεγάλη αμινοπεπτιδασική δραστηριότητα με σημαντική παραγωγή αμινοξέων (Axelsson L. T., 1993)
- Δημιουργούν χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και βοηθούν έτσι να διατηρούνται σε ανηγμένη μορφή οι θειούχες ενώσεις που αποτελούν σημαντικά συστατικά του αρώματος των τυριών (Ανυφαντάκης Ε. Μ., 2004).
- Προκαλούν επιτάχυνση της διαδικασίας της ζύμωσης λόγω διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που απελευθερώνονται. (Ανυφαντάκης Ε. Μ., 2004)
- Παράγουν βακτηριοσίνες. (Axelsson L. T., 1993)

3.2 Φυσιολογία και μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρειάζονται υποστρώματα τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά υλικά, καθώς είναι αρκετά απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά. Έχουν την ικανότητα να αλλάζουν τον μεταβολισμό τους καθώς προσαρμόζονται αξιοποιώντας διάφορες ουσίες σε περιβαλλοντικές συνθήκες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δε διαφέρουν ως προς τον μεταβολισμό τους από άλλα βακτήρια. Ο στόχος του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι να εφοδιάσει το κύτταρο με ενέργεια η οποία είναι απαραίτητη για τους βιοσυνθετικούς σκοπούς, τη διατήρηση της ομοιόστασής του αλλά και όλη τη λειτουργία του, καθώς του δίνει τα απαραίτητα συστατικά προκειμένου να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί. (Monnet και συν. 1996)

3.3 Μεταβολισμός της λακτόζης

Η σημασία για τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην πλειοψηφία των γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται κυρίως στην μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Το οξύ μόνο του ή και σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη αρκετών παθογόνων βακτηρίων για τον άνθρωπο και υπάρχει πιθανότητα ακόμη να προκληθούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για το “ξίνισμα” του γάλακτος και ο υπεύθυνος μικροοργανισμός είναι ο *Lactococcus lactis subsp lactis* που είναι από τα πιο σημαντικά οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι υδατάνθρακες μεταβολίζονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυρίως με την παραγωγή γαλακτικού οξέος καθώς κι από άλλα

προϊόντα όπως οξικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) ή αιθανόλη. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί των υδατανθράκων δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο αποτελούμενο από ενζυμικά στάδια (Monnet και συν. 1996)

Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια πραγματοποιείται με αναερόβιους μηχανισμούς και παράγουν προϊόντα που φυσιολογικά δεν τα χρειάζονται με σκοπό όμως την παραγωγή απαραίτητου ATP. Ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν μικρές ποσότητες ATP είτε μέσω κάποιων οδών που εξοικονομούν ενέργεια όπως π.χ. ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος, είτε μέσω ζύμωσης της αργινίνης. Είναι απαραίτητο όμως να σημειωθεί ότι δεν μπορούν να αναπτυχθούν όταν υπάρχει πλήρης έλλειψη υδατανθράκων. Από αυτό φαίνεται και η σημασία που έχει η ζύμωση των υδατανθράκων από τα βακτήρια. (Monnet και συν.1996)

Η λακτόζη αρχίζει να μεταβολίζεται έπειτα από την πρόσληψη της από το κύτταρο. Αυτό, στα οξυγαλακτικά βακτήρια πραγματοποιείται με δύο βασικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός είναι PEP-PTS. Στο μηχανισμό αυτό, συμμετέχουν το σάκχαρο, το οποίο φωσφορυλιώνεται στη διαδικασία μεταφοράς του μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και συμμετέχουν και οι τέσσερις πρωτεΐνες της μεμβράνης. Σε αυτό το μηχανισμό για τη πρόσληψη λακτόζης δαπανάται ενέργεια.

Στο δεύτερο μηχανισμό πραγματοποιείται μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό τμήμα του κυττάρου, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών χωρίς να καταναλωθεί ενέργεια αλλά και χωρίς να υπάρξει χημική μετατροπή.

Ακολούθως, γίνεται μεταβολισμός της λακτόζης εσωτερικά του κυττάρου. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτύξει τρεις οδούς για τον μεταβολισμό της γλυκόζης αλλά και για άλλα σάκχαρα παρόμοια. Οι οδοί αυτοί είναι γνωστοί ως : α) ετερογαλακτική οδός, β) ομοιογαλακτική οδός και γ) οδός των *Bifidobacteria*. Τα *Bifidobacteria* έχουν να ακολουθήσουν ένα μεταβολικό δρόμο ιδιαίτερο και τα τελικά του προϊόντα είναι οξικό και γαλακτικό οξύ ή μυρμηκικό και οξικό οξύ. Τέτοιου είδους οξυγαλακτικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται στα τυριά άλμης. (Monnet και συν.1996)

Για την παραγωγή τυριών άλμης, οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται είναι ομοιοζυμωτικές και κατά τη ζύμωση του γάλακτος, το τελικό προϊόν που παράγεται είναι το γαλακτικό οξύ και υπάρχει υψηλή συγκέντρωση λακτόζης. Ακόμα, υπάρχει η πιθανότητα παραγωγής ορισμένων προϊόντων σε ίχνη. Αυτά τα προϊόντα είναι το οξικό οξύ, ακετοΐνη, μυρμηκικό οξύ ή αιθανόλη. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργεια λακτόκοκκων όταν αναπτύσσονται σε περιβάλλον που έχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης ή λακτόζης και τα προϊόντα που αναφέρθηκαν παραπάνω παράγονται σε ποσότητες που είναι σημαντικές. (Thomas και συν. 1979)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριών άλμης και έχουν συμμετοχή στην οξυγαλακτική καλλιέργεια είναι τα *Lb delbrucki subsp bulgaricus* και *Str salivarius subsp thermophilus*. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να διασπούν τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Έπειτα η γλυκόζη

μεταβολίζεται προς γαλακτικό οξύ. Τα βακτήρια αυτά αδυνατούν να μεταβολίσουν τη γαλακτόζη περαιτέρω κι έτσι αποβάλλεται από το κύτταρο με ένα σύστημα στο οποίο πραγματοποιείται αντιμεταφορά με τη πρόσληψη λακτόζης. Με αυτό τον τρόπο γίνεται συσσώρευση της γαλακτόζης στο τυρόπηγμα. (Hutkins και Ponne, 1991)

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες από τους οποίους ρυθμίζεται ο μεταβολισμός των βακτηρίων. Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση ορισμένοι υδατάνθρακες συγκριτικά με κάποιους άλλους κι αυτό γιατί τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού ενδέχεται να έχουν σημαντικές διαφορές. Οι διαφορές αυτές εξαρτώνται από τη φύση καθώς και τη συγκέντρωση των σακχάρων που μεταβολίζονται. Έτσι υπάρχουν δυο επίπεδα μεταβολικών οδών για τους υδατάνθρακες. Το πρώτο επίπεδο ρυθμίζεται από τα ίδια τα μεταβολικά προϊόντα, ενώ το δεύτερο επίπεδο εξαρτάται από το ενζυμικό σύστημα που είναι διαθέσιμο στο βακτήριο και ρυθμίζεται από το γενότυπο του. (Thompson, 1987)

Τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, κυρίως είναι όξινα και μεταβάλλουν το κυτταρόπλασμα σε όξινο. Τα βακτήρια μπορούν σε συγκεκριμένο επίπεδο να διατηρήσουν ένα ενδοκυτταρικό pH. Το ενδοκυτταρικό pH επηρεάζει τις ενζυμικές αντιδράσεις και έτσι δημιουργείται διαφορά ανάμεσα σε ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό pH. Η διαφορά αυτή, κατά τη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης των βακτηρίων σε μια καλλιέργεια, είναι μεγαλύτερη. (Nannen και Hutkins, 1991)

Μέχρι ενός σημείου τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν εξαίρεση, καθώς έχουν ανθεκτικότητα σε ευρείες διακυμάνσεις αλλά και σε ενδοκυτταρικό pH. Διαφορές όμως υπάρχουν και μεταξύ των γενών. Για παράδειγμα οι λακτοβάκιλλοι είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ανθεκτικοί σε σύγκριση με τους εντερόκοκκους, τους στρεπτόκοκκους και τα λευκονοστόκια. (Kashket, 1987, McDonald et al., 1990)

3.4 Βιοχημικές δραστηριότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων

1. **Ζύμωση κιτρικών αλάτων.** Τα κιτρικά άλατα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στο γάλα. Ο μεταβολισμός τους, συμβάλλει στον σχηματισμό του αρώματος των γαλακτοκομικών προϊόντων. (Ramet, J. P., 1987)
2. **Ζύμωση της λακτόζης ή γαλακτική ζύμωση.** Τα ομοζυμωτικά μετατρέπουν τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ ενώ τα ετεροζυμωτικά μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης ή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). (Axelsson L.T., 1993)
3. **Προπιονική ζύμωση.** Την ικανότητα να παράγουν προπιονικό οξύ έχουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια του γένους *Propionibacterium sp.* Η παραγωγή προπιονικού οξέος πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα γλυκόζη και κυρίως γαλακτικό οξύ. (Klein G., et. al., 1997)

- 4. Πρωτεόλυση.** Συνήθως τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ασθενώς πρωτεολυτικά και έχουν ένα περίπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεϊνάσες του κυτταρικού τοιχώματος και πολλές πεπτιδάσες του κυτταροπλάσματος. (Pappa E., Anifantakis E.M.,2001)
- 5. Καταβολισμός λιπών και εστέρων.** Η λιπολυτική δραστηριότητα που χαρακτηρίζει τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι περιορισμένη διότι έχουν την ιδιότητα να υδρολύονται μονό και δυγλικερίδια και το λίπος του γάλακτος είναι γνωστό ότι αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τα τριγλυκερίδια. (Ανυφαντάκης Ε. Μ.,2004)

3.5 Αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια

1. Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)
2. Ακεταλεύδη
3. Οργανικά οξέα
4. Διακετύλιο
5. Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής
6. Υπεροξειδίου του υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες
7. Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσης που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες

Στόχος των αντιμικροβιακών αυτών ουσιών, είναι η παροχή σταθερότητας και ασφάλειας στα ζυμώμενα τρόφιμα και η οξυγαλακτική ζύμωση στηρίζεται στους μεταβολίτες αυτούς ως μια διεργασία συντήρησης. Οι μεταβολίτες αυτοί συναθροίζονται σε επίπεδα τα οποία είναι παρεμποδιστικά σε παθογόνα βακτήρια, σε διάφορα ποτά ή τρόφιμα. Συνήθως η αντιμικροβιακή δράση των μεταβολιτών που προαναφέρθηκαν είναι συνεργητική. (Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J,1990, Ashenafi M.,1991)

Ορισμένοι από τους μεταβολίτες αυτούς είναι αποδεκτοί ως συντηρητικά στα τρόφιμα. Για παράδειγμα το οξικό οξύ, το διακετύλιο, το γαλακτικό και το προπιονικό οξύ. Ακόμη, ως αντιμικροβιακό συντηρητικό χρησιμοποιείται η βακτηριοσίνη «νισίνη» από το στέλεχος *Lactococcus subsp lactis* και η χρήση της είναι κυρίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα. (Jay, J.M.,1982, Hurst A., Hoover DG,1993)

- 1. Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂):** ένα από τα προϊόντα ζύμωσης των εξόζων από ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια είναι το διοξείδιο του άνθρακα. Η συσσώρευση του διοξειδίου του άνθρακα, βοηθά στη συντήρηση των τροφίμων με δύο τρόπους.(Genigeorgis C.A.,1985) Ο πρώτος τρόπος είναι η δημιουργία αναερόβιου περιβάλλοντος με αντικατάσταση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου μέσα στη μάζα του προϊόντος. Ο δεύτερος τρόπος είναι ότι το ίδιο το διοξείδιο

του άνθρακα αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα. (Dixon N. M., Kell D. B.,1989)

Το διοξειδίο του άνθρακα σε υψηλή συγκέντρωση συμβάλλει στην παρεμπόδιση ορισμένων μικροοργανισμών, ενώ όταν υπάρχει σε μειωμένη συγκέντρωση ευνοεί την ανάπτυξη άλλων. (Genigeorgis C.A.,1985)

Για τον μηχανισμό δράσης του διοξειδίου του άνθρακα υπάρχουν δυο εξηγήσεις: α) οι ενζυμικές αντιδράσεις καρβοξυλίωσης, παρεμποδίζονται από το διοξειδίο του άνθρακα, β) όταν υπάρχει συσσώρευση του διοξειδίου του άνθρακα στη λιπιδιακή στρώση της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλείται πρόβλημα όσον αφορά τη λειτουργικότητά της. (Dixon N. M., Kell D. B.,1989)

- 2. Ακεταλδεΐδη:** Η παραγωγή της προκύπτει κατά τη διαδικασία παρασκευής του γιαουρτιού, εξαιτίας της δράσης του ενζύμου αλοδάση της θρεονίνης όπου παράγεται από τον *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει την ικανότητα να μετατρέπει τη θρεονίνη σε γλυκίνη και σε ακεταλδεΐδη. Το τυπικό άρωμα που χαρακτηρίζει το γιαούρτι οφείλεται στην ακεταλδεΐδη και η συγκέντρωση της κυμαίνεται στο τελικό προϊόν περίπου στα 225 ppm. (Ακτύπης Α.,1999) Έχει αναφερθεί από τον Egyad L.G. (1967) ότι 44 ppm ακεταλδεΐδης είναι ικανά για να υπάρξει παρεμπόδιση στην κυτταρική διαίρεση των στελεχών *E. Coli*.

- 3. Οργανικά οξέα.** Κατά κύριο λόγο το γαλακτικό οξύ καθώς και το προπιονικό και το οξικό οξύ, αποτελούν τα κύρια οργανικά οξέα που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και είναι από τους πιο αποτελεσματικούς αλλά και βασικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες σε τρόφιμα που είναι όξινα. (Ανυφαντάκης E. M.,1992)

Τα οργανικά οξέα έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και αυτό επιτυγχάνεται με δυο τρόπους. Οι τρόποι αυτοί είναι η μείωση της τιμής του pH και η παρουσία της αδιάστατης μορφής τους.

Σχετικά με την πρώτη περίπτωση, όταν η τιμή της οξύτητας αυξάνεται, οι συνθήκες που δημιουργούνται για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων είναι αντίξοες. Αυτό συμβαίνει ανάλογα με την ευαισθησία που έχουν σε τιμή χαμηλού pH. Όλοι οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από μια τιμή pH που είναι μέγιστη, ελάχιστη και άριστη που καθορίζει την ανάπτυξή τους. Πολλά βακτήρια έχουν ευαισθησία σε τιμή pH ουδέτερη (6,5-7,5) και η αντοχή τους κυμαίνεται σε pH με τιμή 4-9. Οι ζύμες συγκριτικά με τα βακτήρια είναι ανθεκτικές σε τιμές pH χαμηλότερες, ενώ οι μύκητες έχουν ένα ευρύ φάσμα στην τιμή του pH (Adams M.R.,1990, Adams M.R., Hall C.J., 1998)

Οι μικροοργανισμοί παρεμποδίζονται από τον χρόνο επαφής, το είδος καθώς και τη συγκέντρωση του οργανικού οξέος. Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα

να παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα μεταξύ διαφορετικών οργανικών οξέων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια για παράδειγμα έχουν ανθεκτικότητα σε ασθενή λιπόφιλα οξέα που τα παράγουν συγχρόνως και ως προϊόντα μεταβολισμού τα οποία είναι δευτερογενή. (Frank J.F., Hassan N.A.,1998)

4. Διακετύλιο: Αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά μεταβολικά προϊόντα το οποίο συντίθεται αερόβια αλλά και αναερόβια και είναι υπεύθυνο για τη γεύση και το άρωμα του βουτύρου καθώς και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων. Η παραγωγή της ένωσης αυτής προκύπτει από πλήθος οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία έχουν την ιδιότητα να ζυμώνουν το κιτρικό οξύ. Κάποια από αυτά το οξυγαλακτικά βακτήρια είναι τα *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactobacillus sp*, και *Pediococcus sp*. Το προϊόν αυτό, αποτελεί προϊόν δευτερογενούς ζύμωσης. (Μπαλατσούρας Γ.,2006) Μελέτες έχουν δείξει πως σε συγκέντρωση 500-2500 µg/ml το διακετύλιο καθίσταται πιο αποτελεσματικό σε Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς.

Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως προκλήθηκε αναστολή στην ανάπτυξη των Gram αρνητικών βακτηρίων, όταν το διακετύλιο ήταν σε συγκέντρωση 258-344 µg/ml. Ακόμη, ισχυρή παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των στελεχών *E. coli* μπορεί να προκληθεί από ελάχιστα ppm διακετυλίου. Τέλος, άλλη μελέτη έχει αποδείξει πως το διακετύλιο σε συγκέντρωση 344ppm χαρακτηρίζεται από βακτηριοκτόνο δράση έναντι σε στελέχη των *Salmonella anatum*, *Yesrinia enterolytica*, *Aeromonas hydrophila*. (Moltagh, A. M., Johnson, M. C., Ray, B.,1991)

5. Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής: Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν ορισμένες ουσίες όπως η reuterin και οι εξωπολυσακχαρίτες. Οι ουσίες αυτές έχουν ευρύ φάσμα όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση και παράγονται από ορισμένα στελέχη. Από τις ουσίες αυτές παρακάτω θα αναφερθούν οι κυριότερες, οι οποίες είναι:

- Μια ουσία του στελέχους *Lactobacillus lactis subsp. lactis var. diacetylactis*, (Branen A. L., Go H. C., Genske G. R.,1975).
- Μια ουσία από στέλεχος του *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, δραστική έναντι των *L. lactis*, *E.coli*, *S.typhimurium*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* (Pulusani S. R., Rao D. R., Sunki G. R.,1979).
- Η αντιμικροβιακή ουσία "reuterin", η οποία παράγεται από το στέλεχος του *Lactobacillus reuterii* (Talarico T. L., Dobrogosz W. J.,1989), το οποίο ενδημεί στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των άλλων θηλαστικών.(Talarico T. L., Dobrogosz W. J.,1989).

6. **Υπεροξειδίο του υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες.** Η ύπαρξη της βακτηριακής υπεροξειδάσης παρατηρήθηκε πρώτα από τους Gunsalus et Ubreith το 1945 όπου και διαπιστώθηκε η παραγωγή της από στελέχη *Lactobacillus bulgaricus subsp. delbrueckii* και *L. Helveticus*. Αργότερα, παρατηρήθηκε παραγωγή οξειδάσης σε μέγιστο βαθμό σε χλωρίδα γαλακτικών γενών όπως *Pediococcus sp*, *Lactobacillus sp* και *Lactococcus sp*. Έγινε διαπίστωση πως η μεγαλύτερη ποσότητα υπεροξειδάσης παράγεται από τους λακτοβάκιλλους σε σύγκριση με τα άλλα γένη.

Η παρουσία των ελεύθερων ριζών και του οξυγόνου συμπληρώνει τη δράση της υπεροξειδάσης. Τόσο οι ελεύθερες ρίζες όσο και το H_2O_2 έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν ειδικές περιοχές του βακτηριακού DNA όπως για παράδειγμα τα μόρια της γουανίνης και τη μεθολική ομάδα της θυμίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση αντιστρεπτών ή μη βλαβών όπως είναι η απελευθέρωση νουκλεοτιδίων ή και η απόσπαση ολόκληρων τεμαχίων του DNA (Anasthaswamy H. N., Eigenstark A.,1977).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν H_2O_2 και η παραγωγή αυτή εξαρτάται από το είδος των στελεχών καθώς και από την παρουσία του οξυγόνου στο μέσο ανάπτυξης (Juven, B. J., Weisslowicz, H., Harel, S.,1988). Το 1990 οι Lee et Price κατέληξαν στο γεγονός ότι υπεύθυνο για την παρεμπόδιση των στελεχών των γενών *Bacillus sp*, *Proteus sp*, και *Pseudomonas sp* από τον *Lactobacillus plantarum* ήταν το H_2O_2 . Μελέτες απέδειξαν πως ο *L. delbrueckii subsp bulgaricus* σε θερμοκρασία ψύξης έχει την ικανότητα να παρεμποδίσει την *Pseudomonas fluorescens* κι αυτό συμβαίνει λόγω παραγωγής της υπεροξειδάσης. (Lucke F. K., Popp J., Kreutzer R.,1986)

Τέλος, το H_2O_2 ενεργοποιεί το φυσικό και ισχυρό αντιμικροβιακό σύστημα της λακτο-υπεροξειδάσης-θειοκυανίου. Αυτό συμβαίνει κυρίως στο φρέσκο γάλα και ως αποτέλεσμα έχει την συσσώρευση αντιβακτηριακών παραγόντων. Ορισμένοι από αυτούς είναι οι OSCN-, O_2SCN - και O_3SCN -. Αυτοί έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη των Gram αρνητικών βακτηρίων όπως *Salmonella sp*, *Pseudomonas sp* και *E. Coli*. (Pruit K. M., Reiter B.,1985)

7. **Βακτηριοσίνες.** Οι βακτηριοσίνες είναι μια ομάδα από αντιμικροβιακές ενώσεις πρωτεϊνικής φύσης, που παράγονται από μικροοργανισμούς που περιλαμβάνουν στελέχη παθογόνα από Gram αρνητικούς και Gram θετικούς μικροοργανισμούς. Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές για την ετερογένεια που τις διακρίνει ως προς τον τρόπο δράσης, τη δομή αλλά και τις γενετικές και φυσικοχημικές τους ιδιότητες. (Chikindas ML, Montville TJ.,2002)

Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγονται βακτηριοσίνες οι οποίες είναι πρωτεϊνικής φύσης και διακρίνονται σε κατηγορίες όσον αφορά το μοριακό

βάρος, τη δομή αλλά και τη θερμοανθεκτικότητά τους.(Klaenhammer T.R.,1988) Η παραγωγή τους, έχει να κάνει με την μικροβιακή τους ανάπτυξη και εξαρτάται από τις συνθήκες που υπάρχουν στο περιβάλλον της ανάπτυξής τους, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, το pH, ο αερισμός και τα θρεπτικά συστατικά. Οι βακτηριοσίνες, έχουν βακτηριοκτόνο δράση η οποία στα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση λογαριθμικής ανάπτυξης, είναι υψηλότερη σχέση με τα κύτταρα στην στατική φάση της ανάπτυξης.(Davey G.P., Richardson B.C.,1981)

Πολλά από τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες είναι δραστικές σε στελέχη κυρίως της ίδιας οξυγαλακτικής χλωρίδας. Τα τελευταία χρόνια όμως, βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί με ένα φάσμα παρεμπόδισης ευρύτερο, το οποίο περιλαμβάνει Gram θετικά παθογόνα βακτήρια και πιο σπάνια Gram αρνητικά βακτήρια τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων. (Μπαλατσούρας Γ.,2006)

Οι βακτηριοσίνες αυτές, έχουν την ιδιότητα της αναστολής της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό έχει προκαλέσει την προσοχή των επιστημόνων και έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον τους για την αναζήτηση ορισμένων εναλλακτικών μορφών συντήρησης στα τρόφιμα με τρόπο πιο φυσικό και χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών. Έτσι, τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες ή γίνεται χρήση των μεταβολικών προϊόντων τους κι κυρίως αυτά τα προϊόντα είναι οι βακτηριοσίνες.(Van Belkum, M. J.,1991,Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG.,2003)

Οι βακτηριοσίνες που χρησιμοποιούνται για την τεχνολογία των τροφίμων, είναι οι βακτηριοσίνες, η παραγωγή των οποίων προκύπτει από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, παράγεται σημαντικός αριθμός βακτηριοσινών. Σε αυτά τα βακτήρια συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Lactococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Pediostoc sp.*, *Leuconostoc sp.* Οι περισσότερες από τις βακτηριοσίνες αυτές, χαρακτηρίζονται από το στενό φάσμα δράσης και μόνο ορισμένες εξ' αυτών δρουν ενάντια σε παθογόνα βακτήρια. (Cindas L.M., Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE.,2001)

Ο αριθμός των βακτηριοσινών που έχουν βρεθεί είναι μεγάλος και εξαιτίας αυτού θα γίνει παρακάτω αναφορά σε ορισμένες ιδιότητές τους. Ακόμη, θα γίνει αναφορά ξεχωριστά για τη κάθε μια από τις κατηγορίες των μικροοργανισμών που παράγουν βακτηριοσίνες. Πρέπει να τονιστεί πως έπειτα από έρευνες των τελευταίων ετών έχουν εντοπιστεί νέες βακτηριοσίνες από διάφορα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων χωρίς όμως να έχουν πραγματοποιηθεί πλήρεις μελέτες όσον αφορά την ασφάλεια τους ως προβιοτικά καθώς και τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα η *lactocin 705* η οποία αποτυπώθηκε από τον *L. Casei CRL 705* (Vignolo G. M., De Kairuz M. N.,et

al,1995), η *enteracin* 226 NWC από τον *E. Faecalis* 226 (Villani, F.,Salzano,et al,1993), μια βακτηριοσίνη από τον *S. Thermophiles* St 134 (Ward D. J., Somkuti G. A.,1995) και τέλος η *thermophilicin* από τον *S. Thermophiles* (Villani,1995)

Πίνακας 1. Βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια.
(Μεταξόπουλος Ι., και συν. 2003)

| Βακτηριοσίνη | Παραγωγό στέλεχος | Τρόπος δράσης | Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης |
|--|---|---|---|
| Γένος <i>Pediococcus</i> sp. | | | |
| 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. perfingens</i> <i>L. moocytoenes</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. moocytoenes</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. perfingens</i> <i>C. botulinum</i> |
| Γένος <i>Carnobacterium</i> sp. | | | |
| 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. |
| Γένος <i>Lactococcus</i> sp. | | | |
| 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 | Στέλεχη του <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>diacetylactis</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 I | <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>diacetylactis</i> WM4 | Απώλεια των ενδοκυτταρικών συστατικών | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> and <i>diacetylactis</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> |
| Γένος <i>Lactobacillus</i> sp. | | | |
| 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 | <i>L.sakei</i> 184 | Βακτηριοστατική | <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> |
| Sakacin P | <i>L.sakei</i> LTH673 | Δεν έχει καθοριστεί | <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> |
| Lactocin S | <i>L.sakei</i> L45 | Δεν έχει καθοριστεί | <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. |
| Curvacin A | <i>L.curvatus</i> 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 | <i>L.brevis</i> 37 | Δεν έχει καθοριστεί | <i>Pediococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. |
| Caseicin 80 | <i>L.casei</i> B80 | Δεν έχει καθοριστεί | <i>L. casei</i> |

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------------------------|---|
| Plantaricin BN | L.plantarum BN | Βακτηριοκτόνος | L. sakei |
| Bavaracin MN | L.bavaricus MN | Βακτηριοκτόνος | L. sakei |
| Lactocin 27 | L.helveticus LP27 | Εκκροή ιόντων από τα κύτταρα | L. acidophilus, L. helveticus |
| Helveticin J | L.helveticus 481 | Δεν έχει καθοριστεί | L. bulgaricus, L. lactis, L. helveticus |
| Helveticin V-1829 | L.helveticus V-1829 | Δεν έχει καθοριστεί | Lactobacillus sp. |
| Lactacin F | L.acidophilus 11088 | Δεν έχει καθοριστεί | Lactobacillus sp., E. faecalis |
| Lactacin B | L.acidophilus N2 | Δεν έχει καθοριστεί | Lactobacillus sp. |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

4. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ετερογενή ομάδα, η οποία περιλαμβάνει γένη βακτηρίων τα οποία έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Τα πιο σημαντικά είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (starters) για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων με ζύμωση είναι τα εξής: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Propionibacterium*.

4.1 Γένος *Lactobacillus*

Το μέγεθος των βακτηριακών κυττάρων ποικίλει συγκριτικά με εκείνο που χαρακτηρίζει του κοκκοβάκιλλους (1-2μm) μέχρι και τους μεγάλους νηματοειδείς βάκιλλους (10-20μm). Στην πλειοψηφία τους οι λακτοβάκιλλοι είναι ακίνητοι και σπορογόνοι και τα κύτταρά τους διατάσσονται σε βραχείες αλύσους. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία από 2°C-53°C και ιδανικά σε θερμοκρασία 30°C-40°C. (49)

Η ανάπτυξή τους στο γάλα είναι εύκολη κι αυτό συμβαίνει όταν ξεκινάει η ζύμωση και η τιμή του pH αρχίζει να μειώνεται στο 6,0-6,2. Οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους ακόμη και σε τιμές pH 4,2-4,4. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Orlan-Jensen (1919) οι λακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

Ομάδα I. Υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικοί. Ζύμωση των εξόζων με την παραγωγή σχεδόν μόνο γαλακτικού οξέος μέσω της γλυκολυτικής οδού EMP.

Ομάδα II. Προαιρετικά ομοιοζυμωτικοί. Παραγωγή αποκλειστικά γαλακτικού οξέος από τις εξόζες. Σε συγκεκριμένα είδη, σε συνθήκες όπου η γλυκόζη στο καλλιεργητικό υπόστρωμα δεν είναι επαρκής, παρατηρείται έπειτα από ζύμωση πεντοζών παραγωγή μυρμηκικού και οξικού οξέος και αιθανόλης.

Ομάδα III. Υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί. Έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν και πεντόζες και εξόζες και τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού τους είναι διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ. Αυτό συμβαίνει γιατί το οξικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη.

Στο γένος *Lactobacillus* μέχρι και σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 150 περίπου είδη και άλλα 50 υποείδη και κάποια από αυτά χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Παρακάτω θα σχολιαστούν ορισμένα βασικά είδη που αφορούν την τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Ομάδα I:

- *L.b helveticus*: Θερμόφιλος εκκινητής (42oC-45oC). Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ορισμένων ειδών τυριών και παράγει βακτηριοσίνες που έχουν αντιμικροβιακή δράση ως προς τα παθογόνα βακτήρια.
- *L.b delbrueckii subsp lactis*: Είναι θερμόφιλος εκκινητής και η χρήση τους πραγματοποιείται σε συνδυασμό με άλλα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων για τη παραγωγή ορισμένων ειδών τυριών. Αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 40oC-43oC.
- *L.b delbrueckii subsp bulgaricus*: Αποτελεί θερμόφιλο είδος με θερμοκρασία ανάπτυξης ιδανικά στους 40oC-43oC. Το συγκεκριμένο είδος χρησιμοποιείται για πλήθος γαλακτοκομικών προϊόντων όπως για παράδειγμα τυριά και γιαούρτι.

Ομάδα II:

- *L. b Casei*: Αποτελεί μεσόφιλο είδος και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ορισμένων τυριών. Κάποια από τα στελέχη του, λόγω της ευεργετικής τους δράσης για τη λειτουργία του εντέρου, χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ειδικού ξινογάλακτος. Ο *L.b Casei* θεωρείται μέλος της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου. Ο λακτοβάκιλλος αυτός, ενώ προκαλεί ομοιογαλακτική ζύμωση, μπορεί να είναι και ετεροζυμωτικός υπό ορισμένες συνθήκες.

- *L. b plantarum*: Χρησιμοποιείται στη ζύμωση των φυτικών προϊόντων και στην παραγωγή τυριών. Αποτελεί μεσόφιλο είδος με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30°C-35°C

Ομάδα III:

- *L. b brevis*: Έχει απομονωθεί από καλλιέργειες κεφίρ και είναι ετεροζυμωτικό είδος. Θεωρείται προβιοτικός μικροοργανισμός και η ιδανική ζώνη ανάπτυξης είναι σε θερμοκρασία 30°C-32°C. Αναπτύσσεται ακόμη και σε θερμοκρασία 15°C όχι όμως σε θερμοκρασία 40°C.

4.2 Γένος *Pediococcus*

Το γένος αυτό αποτελείται από 11 αναγνωρισμένα είδη. Χαρακτηρίζεται από κόκκους ομοιοζυμωτικούς που δεν σχηματίζουν αλύσους όπως άλλα γένη οξυγαλακτικών κόκκων αλλά τετράδες. Από τα γένη αυτά τα πιο γνωστά είμαι τα *Ped. Pentosaceus*, *Ped. Acidilactici*, *Ped. Damnosus*. Η ανάπτυξή τους πραγματοποιείται σε τιμή pH 4,5 και σε NaCl συγκέντρωσης 4-5%. Τα θερμοκρασιακά όρια της ανάπτυξής τους καθώς και η άριστη θερμοκρασία διαφέρουν ανάλογα με το είδος. Στα τρόφιμα που προέρχονται από ζώα, πιο συχνά εντοπίζονται σε ωμά ψάρια και κρέατα. Ορισμένα είδη έχουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση ορισμένων τυριών.

4.3 Γένος *Leuconostoc*

Τα βακτήρια αυτού το γένους είναι κοκκοειδή. Όλα τα είδη του γένους είναι ετεροζυμωτικά με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 20°C-30°C. Είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, ωστόσο ορισμένα από τα είδη αυτά είναι ψυχρότροφα. Τα είδη αυτά δρουν ως αλλοιογόνα, καθώς αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες(48).

Η επίδραση που έχουν στην ασφάλεια καθώς και στα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι σημαντική διότι παράγουν ουσίες, ορισμένες από τις οποίες έχουν αντιμικροβιακή δράση όπως για παράδειγμα H₂O₂ και βακτηριοσίνες ενώ άλλες δίνουν ευχάριστο άρωμα όπως είναι το διακετύλιο.

Το συγκεκριμένο γένος αποτελείται από 12 είδη και κάποια από αυτά χρησιμοποιούνται ως εκκινητές:

- *Leuc. Mesenteroides subsp mesenteroides*. Ζυμώνει την λακτόζη και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και γαλακτικό οξύ. Κάποια από τα στελέχη του παράγουν μια ουσία η οποία ονομάζεται δεξτράνη και χρησιμοποιείται στην τεχνολογία

τροφίμων ως γαλακτοματοποιητής (π.χ. γιαούρτι). Η ανάπτυξη του πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 10°C-37°C με ιδανική θερμοκρασία τους 20°C-30°C.

- *Leuc. Mesenteroides subsp cremoris*. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή καλλιεργημένου βουτύρου, οξυγάλακτος και τυριού κρέμα. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι από 10°C-30°C με ιδανική θερμοκρασία τους 18°C-25°C. Δεν παράγει δεξτράνη.
- *Leuc. Mesenteroides subsp dextranicum*. Οι ιδιότητές του είναι ίδιες με τον *Leuc. Mesenteroides subsp mesenteroides* και παράγει από τη σακχαρόζη, δεξτράνη.
- *Leuc. Lactis*. Είναι θερμοάντοχο με θερμοκρασία ανάπτυξης 30°C. Τα θερμοκρασιακά του όρια είναι 10°C-40°C. Ζυμώνει εύκολα την λακτόζη και οι απαιτήσεις του σε διατροφικούς παράγοντες όπως τα αμινοξέα, είναι αυξημένες.

4.4 Γένος *Lactococcus*

Πρόκειται για μονήρεις ή σε αλύσους κόκκους. Είναι ομοιοζυμωτικοί και μεσόφιλοι. Το γένος *Lactococcus* αποτελείται από 8 είδη από τα οποία μόνο το *L. lactis* βρίσκεται στο νοπό γάλα και χρησιμοποιείται ως εκκινητής για την ωρίμανση ορισμένων τυριών, βουτύρου ή κρέμας(42). Το είδος *L. lactis* διακρίνεται σε 4 υποείδη εκ των οποίων τα 2 από αυτά είναι τα εξής:

- *Lc. lactis subsp lactis*. Η θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι από 20°C-40°C με ιδανική θερμοκρασία τους 30°C. Παράγει νισίνη η οποία χρησιμοποιείται σαν φυσικό συντηρητικό και μπορεί να αναπτυχθεί σε NaCl συγκέντρωσης μέχρι 4%.
- *Lc. lactis subsp cremoris*. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 30oC, μπορεί όμως να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασία 15oC-30oC. Από το είδος αυτό, παράγονται πολυσακχαρίτες που έχουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της δομής των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων.

4.5 Γένος *Streptococcus*

Το γένος *Streptococcus* αποτελείται από 80 περίπου διαφορετικά είδη και χωρίζονται σε 6 ομάδες. Αρκετά είδη αυτού το γένους είναι παθογόνα για τα ζώα και τον άνθρωπο. Στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, το μοναδικό είδος που χρησιμοποιείται είναι ετεροζυμωτικό και μη παθογόνο και αυτό είναι ο *Str. Thermophilus*.

Ο *Str. Thermophilus* έχει διάμετρο 0,7-0,9 και διακρίνεται σε μακρές αλύσους. Είναι προαιρετικά αναερόβιος, ακίνητος και Gram θετικός κόκκος. Η θερμοκρασία ανάπτυξης του ξεκινά από τους 20°C-50°C με ιδανική θερμοκρασία τους 40°C-45°C. Παρά το όνομά του δεν είναι θεμόφιλος καθώς δεν υπάρχει ανάπτυξη σε θερμοκρασία 55°C.

Είναι θερμοάντοχος διότι σε νωπό γάλα μπορεί να επιβιώσει μέρος του πληθυσμού του ακόμη και κατά την παστερίωση και επίσης δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση NaCl μεγαλύτερη από 2%. Τέλος, ζυμώνει γρήγορα την λακτόζη και παράγει γαλακτικό οξύ χωρίς αέριο σε θερμοκρασία 40°C-42°C και pH 6,4-6,6.

4.6 Γένος *Propionibacterium*

Το συγκεκριμένο γένος παρότι δεν ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια διότι κατά τη διαδικασία ζύμωσης των εξοζών δεν παράγει γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιείται στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. Έχει συμμετοχή στην δευτερογενή ζύμωση με αποτέλεσμα να πραγματοποιηθεί μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος των οξυγαλακτικών βακτηρίων προς οξικό και προπιονικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα με παραγωγή μικρών ποσοτήτων ηλεκτρικού οξέος. (Holt J. G. et al., 1992)

4.7 Γένος *Enterococcus*

Ορισμένα στελέχη του *E. faecalis* και του *E. Durans* τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται στην ωρίμαση ειδών τυριών γιατί εκτιμούνται για την πρωτεολυτική τους δράση. Πολλοί υγειονομικοί όμως πιστεύουν πως οι εντερόκοκκοι μπορούν να προκαλέσουν τροφικό σύνδρομο και οι γνώμες διχάζονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

5. Οξυγαλακτικά βακτήρια και προβιοτικά

Κατά την διαδικασία της παραγωγής γαλακτικών προϊόντων ζύμωσης, γίνεται επιλογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν. Η επιλογή αυτή, βασίζεται στην ικανότητα που έχουν να αναπτύσσονται στο γάλα και να παράγουν οργανικά οξέα, καθώς και στο να δίνουν τις επιθυμητές οργανοληπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν (Cogan T. M., Hill C, 1993). Στην περίπτωση των προβιοτικών όμως, η επιλογή των βακτηρίων βασίζεται στην ύπαρξη των ιδιοτήτων, οι οποίες έχουν άμεση σχέση με την υγεία του οργανισμού αλλά παράλληλα καλύπτουν και τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Svensson U., 1999).

«Ως προβιοτικά, ορίζονται οι «ζωντανοί» μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου πέραν της εγγενούς επίδρασης της γενικής διατροφής (Gyerraer F. and G.J. Schaafsma. 1998). Ο ορισμός αυτός, προϋποθέτει ότι οι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι ζωντανοί και να μην υπάρχουν μεταβολές της εντερικής χλωρίδας.»

Σήμερα, χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά διάφορα γένη και είδη μικροοργανισμών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία και πιο συγκεκριμένα τα είδη *Enterococcus sp.* και *Bifidobacterium sp.* (Kailasapathy K., Chin J. 2000).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, βρίσκονται σε τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση σε μεγάλους πληθυσμούς. Εξάλλου, μέχρι και σήμερα η κατανάλωση των προβιοτικών γίνεται από γαλακτοκομικά προϊόντα κυρίως. Για το λόγο αυτό, δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι σημαντικό τμήμα της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου αποτελείται από τις ίδιες ομάδες βακτηρίων. Το θέμα της ασφάλειας των οξυγαλακτικών βακτηρίων-προβιοτικών, έχει απασχολήσει κρατικούς παράγοντες και έρευνες και το συμπέρασμα είναι πως τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των παθογόνων αλλά και ορισμένων στελεχών του *Enterococcus sp.*, δεν είναι ικανά να προκαλέσουν προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό και ούτε έχουν κάποιο παθογόνο δυναμικό (Adams M.R., Marteau P., 1995).

5.1 Κριτήρια επιλογής οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτική δράση

Ένας μικροοργανισμός προκειμένου να επιλεγεί ως προβιοτικό πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια, τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω (Kaur I.P. et al., 2002).

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε τιμές pH χαμηλές αλλά και έναντι των χολικών αλάτων και των υδρολυτικών ενζύμων του πεπτικού σωλήνα, είναι σημαντική

διότι πρέπει να έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν στις συνθήκες του ανθρώπινου πεπτικού συστήματος. (Kirjavainen P.V. et al.,1998)

Σημαντικό κριτήριο θεωρείται η ικανότητα προσκόλλησης στον εντερικό βλεννογόνο σε σχέση με την ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων είτε να εμποδίζουν την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών, είτε να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο έντερο και να λειτουργούν ανοσορυθμιστικά (Kirjavainen P.V. et al.,1998).

Στα οξυγαλακτικά βακτήρια, η ικανότητα ανθεκτικότητας και επιβίωσης υπό αντίξοες συνθήκες ποικίλει. Κυρίως επηρεάζεται από παγκρεατικά ένζυμα αλλά και από γαστρικά υγρά (υδροχλωρικό οξύ), καθώς και από την διαδικασία της παρασκευής των ίδιων των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Ouwenhand A.C. et al.,2002). Η ικανότητα της προσκόλλησης κατά τη λυοφιλίωση με σκοπό να συντηρηθούν, εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους, τον αριθμό των ανακαλλιιεργειών αλλά και τη χρήση κρυσταλλοπροστατευτικών (Elo S. et al.,1991). Ικανοποιητικός αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει παρουσιάσει στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου ικανότητες προσωρινής αποίκησης και επιβίωσης. (Alander M. et al.,1999).

Είναι απαραίτητο το οξυγαλακτικά βακτήρια να είναι ασφαλή για τον άνθρωπο. Η ασφάλεια όμως των μικροοργανισμών οι οποίοι δεν είναι παθογόνοι, είναι δύσκολο να «μετρηθεί» (Salminen S. et al.,2000).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πρέπει να διαθέτουν καλό τεχνολογικό δυναμικό, δηλαδή, πρέπει να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής, να μπορούν να καλλιιεργηθούν σε μεγάλη κλίμακα και όταν πρόκειται να γίνει χρήση τους σε προϊόντα ζύμωσης είναι απαραίτητο να έχουν ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων (Καμινάρη Σ. και συν.,1992).

Κριτήριο θεωρείται και η βιωσιμότητα των προβιοτικών, καθώς μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν πως η χρήση ζωντανών κυττάρων, έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσορυθμιστικής δράσης (Fuller R.,1989).

Το γένος *Lactobacillus sp.*, έχει στελέχη τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες που καταπονούν το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου και διαθέτουν ταυτόχρονα καλό τεχνολογικό δυναμικό. Έτσι, εξηγείται η ευρεία χρήση του ως προβιοτικό (Ronka E.,2002). Σε αντίθεση με το *Lactobacillus sp.*, στελέχη του γένους *Bifidobacterium sp.*, χρησιμοποιούνται λιγότερο, διότι έχουν μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις και έχουν ευαισθησία στο οξυγόνο (Holt J. G. et al.,1994).

Οι ιδιότητες που έχουν τα προβιοτικά είναι σημαντικό να μένουν σταθερές τόσο κατά τη συντήρηση αλλά και κατά την παρασκευή του σκευάσματος ή του τροφίμου. Σημαντικό ρόλο επίσης έχει η καθαρότητα των προβιοτικών στελεχών. Έχουν παρατηρηθεί επιμολύνσεις σε σκευάσματα που έχουν προβιοτικά και για το λόγο αυτό τηρούνται κανόνες υγιεινής κατά τη διαδικασία της παρασκευής αλλά και της σωστής τυποποίησης (Holzapfel W.H. et al.,2001)

Σύμφωνα με τον Fuller πολλές είναι οι αιτίες που συντελούν στην διαφοροποίηση των προβιοτικών, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο συχνά στην μη αξιόπιστη αξιολόγηση των πειραματικών συμπερασμάτων. Οι αιτίες αυτές είναι:

- Μέθοδοι παρασκευής
- Χαμηλή βιωσιμότητα
- Συνθήκες συντήρησης-αποθήκευσης
- Συχνότητα δόσεων
- Δυνατότητα επιβίωσης στον εντερικό σωλήνα
- Ενδεχόμενη βακτηριακή επιμόλυνση
- Αλλαγές διατροφικών συνηθειών
- Μη σωστή ταξινόμηση
- Βαθμός stress του ξενιστή
- Καθεστώς εντερικού σωλήνα
- Φάση (ηλικία) ανάπτυξης του ξενιστή

Τα στελέχη των προβιοτικών του εμπορίου, πρέπει να έχουν καταχωρηθεί σε μια συλλογή μικροοργανισμών η οποία είναι αναγνωρισμένη διεθνώς, με σκοπό ο έλεγχος των ιδιοτήτων τους και της ταυτοποίησής τους να είναι δυνατός ανά πάσα στιγμή.

Πίνακας 2. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά. (Goldin BR. et al.,1992)

Lactobacillus sp.(LAB)

Lactobacillus acidophilus

L.gasseri

L.jonhonti

| | |
|--------------------------------|---|
| | <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> |
| | <i>L.helveticus</i> |
| | <i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> |
| | <i>L.casei</i> subsp. <i>casei</i> |
| | <i>L.plantarum</i> |
| | <i>L.GG</i> |
| | <i>L.rhamnosus</i> |
| | <i>L.curvatus</i> |
| | <i>L.brevis</i> |
| | <i>L.fermentum</i> , |
| | <i>L.reuterii</i> , |
| | <i>L.cellobiosus</i> |
| <i>Lactococcus sp. (LAB)</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> |
| | <i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | <i>L.lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i> |
| <i>Leuconostoc sp. (LAB)</i> | <i>Leuc.mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicus</i> |
| | <i>Leuc.mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| <i>Streptococcus sp. (LAB)</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| <i>Enterococcus sp. (LAB)</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| | <i>E.faecalis</i> |
| <i>Pediococcus sp. (LAB)</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i> |
| <i>Propionibacterium sp.</i> | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> |
| | <i>P.shermanii</i> |
| <i>Bifidobacterium sp.</i> | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| | <i>B.infantis</i> , <i>B.longum</i> |
| | <i>B.breve</i> , <i>B.adolescentis</i> |
| Ζύμες | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | <i>S.boulardii</i> |

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

6. Συλλογή των δειγμάτων

Η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες ψύξης (4ο) σε ισοθερμικό δοχείο και εξετάστηκαν άμεσα μέσα στην επόμενη ώρα. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις του πειράματος.

Για το σκοπό της διπλωματικής εργασίας κατά τη διάρκεια των μηνών Απριλίου και Μαΐου του 2019 συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν 12 δείγματα του τυριού «Ανεβάτο» από δύο παραγωγούς της Θεσσαλίας (“Εγκατάσταση Α” και “Εγκατάσταση Β”). 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.

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση για το προσδιορισμό του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τέλος στα δείγματα πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της τιμής του pH.

6.1 Καταμέτρηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

Από κάθε δείγμα, ποσότητα 25 g τυριού τοποθετούνταν σε σακούλα stomacher αποστειρωμένη και ακολουθούσε προσθήκη πεπτονόχου ύδατος 0,1% 225 ml ώστε η αρχική αραιώση να έχει αναλογία 1:10. Η ομογενοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή stomacher σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 λεπτά. Έπειτα ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD (Maximum Recovery Diluent).. 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).

6.2 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 αραιώση στην οποία σημειώθηκε η ανάπτυξη. Για την απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών 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-α 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).

Με την εφαρμογή του παλμικού Laser (nitrogenLaser, μήκος κύματος 337 nm, διάρκεια παλμού 1–5 ns) προκαλείται μερική ατμοποίηση του υποστρώματος κατά ώσεις, με επακόλουθη μεταφορά ιονισμένων μορίων του δείγματος στην αέρια φάση (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

«Κατά τη διαδικασία της μεθόδου, το μείγμα του δείγματος και του υποστρώματος τοποθετείται σε ειδική πλάκα-στόχο και σε συνθήκες υψηλού κενού αερίων, εισάγεται στην περιοχή ιονισμού. Η εφαρμογή του κενού είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της εξέτασης έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα σύγκρουσης μεταξύ των ιονισμένων μορίων του προς εξέταση δείγματος και των μορίων του αέρα. Η απουσία του αέρα αποτρέπει την εκφόρτιση των υψηλών δυναμικών που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση και τη μεταφορά των ιόντων στη θέση ανίχνευσης, καθώς επίσης περιορίζει την πιθανότητα επιμόλυνσης ή ανάμειξης διαδοχικών δειγμάτων. Η παλμική μορφή της προσπίπτουσας ενέργειας προκαλεί ιονισμό κατά κύματα και τα παραγόμενα ιόντα αφού επιταχυνθούν με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου οδηγούνται στο φίλτρο μαζών (αναλυτής χρόνου-πτήσης, time of flight analyzer, TOF-analyzer). Ο αναλυτής TOF διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio,

m/z), υπολογίζοντας το χρόνο που χρειάζεται για να διανύσουν τη διαδρομή εντός σωλήνα ορισμένου μήκους σε απουσία ηλεκτρικού πεδίου (περιοχή μετατόπισης, driftregion) κινούμενα ευθύγραμμα και ομαλά μετά από την αρχική επιτάχυνσή τους και εστιάζει τις δέσμες ιόντων στον ανιχνευτή (detector). Εκτός από σταθερές παραμέτρους, ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το λόγο μάζα/φορτίο του ανιχνευόμενου ιόντος και ως εκ τούτου επιτυγχάνεται γρήγορα και ικανοποιητικά η διάκριση των ιόντων ανάλογα της μάζας τους σε ένα θεωρητικά απεριόριστο εύρος m/z τιμών (γραμμική λειτουργία αναλυτή χρόνου- πτήσης, Linear TOF)» (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

«Τα ιόντα καταλήγουν τελικά στον ανιχνευτή, εφόσον διαχωριστούν σε ομάδες ίδιου λόγου m/z. Ο ανιχνευτής του φασματογράφου μάζας MALDI-TOF-MS είναι μια πλάκα μικροδιοδίων (microchannelplate) που αποτελείται από μια συστοιχία γυάλινων τριχοειδών σωλήνων, τα οποία είναι επιστρωμένα με κατάλληλο υλικό. Κατά την πρόπτωση των ιόντων και, ανάλογα με τον αριθμό τους και την κινητική τους κατάσταση, προκαλείται εκπομπή ηλεκτρονίων από τον ανιχνευτή, επομένως παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο, στη συνέχεια, ενισχύεται και παρουσιάζεται τελικά ως φάσμα μάζας (mass spectrum). Όπως είναι φυσικό, η ακρίβεια μέτρησης του ιοντικού ρεύματος εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή. Για να αυξηθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio, SNR) για το παραγόμενο φάσμα, προηγουμένως το δείγμα σαρώνεται πολλές φορές και υπολογίζεται η μέση τιμή των παραγομένων φασμάτων (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009)».

«Το τελικό στάδιο της τεχνικής είναι η καταγραφή και η παρουσίαση του φάσματος μαζών. Ο φασματογράφος μάζας είναι εφοδιασμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η καταγραφή γίνεται ηλεκτρονικά όπου προκύπτουν κορυφές μικρού εύρους, διαφορετικής σχετικής θέσης και ύψους. Το ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία (relative intensity) του ιόντος που αντιπροσωπεύει, ενώ η σχετική θέση στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύει τελικά το ζητούμενο λόγο μάζας προς φορτίο του εξεταζόμενου ιόντος. Το πιο άφθονο ιόν χαρακτηρίζεται ως βασική κορυφή του φάσματος και σημειώνεται στον κάθετο άξονα με σχετική αφθονία 100%, ενώ οι άλλες κορυφές λαμβάνουν τιμές ανάλογα με το σχετικό ως προς τη βασική κορυφή ύψος τους. Συνεπώς, η διαδικασία ανίχνευσης μιας ουσίας μέσω του MALDI-TOF-MS χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την αξιόπιστη καταγραφή ενός συγκεκριμένου φάσματος ιόντων, το οποίο συγκρινόμενο με διαθέσιμες ευρείες βάσεις δεδομένων οδηγεί τελικά στην ταυτοποίηση της ουσίας αυτής (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009)».

Η MALDI-TOF-MS έχει το εξής πλεονέκτημα. Μπορεί να ταυτοποιήσει δείγματα μικροοργανισμών τα οποία έχουν υψηλή ευαισθησία σε ανέπαφη κυτταρική μορφή με

αποτέλεσμα να μειώνει τον χρόνο παρασκευής του δείγματος. Ανιχνεύει κυρίως μόρια όπως ριβοσωμικές και επιφανειακές πρωτεΐνες. Όσο για τον ρόλο του χημικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται για την διάκριση των κατά gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων υπάρχουν δυο θεωρίες.

- Διαφορετικό υπόστρωμα για κατά gram θετικά και αρνητικά βακτήρια.
- Χρήση του ίδιου χημικού υποστρώματος και για τα κατά gram θετικά και αρνητικά βακτήρια διότι στηρίζει την αξιολόγηση των φασμάτων που λαμβάνονται στις υψηλές κυματομορφές των υπαρχουσών και ιονιζόμενων ριβοσωμικών πρωτεϊνών που είναι σε αφθονία. Τα φάσματα αυτά είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνα για τα σήματα που λαμβάνονται και όχι τα φάσματα τα οποία προκύπτουν από ιονισμό των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009)

6.3 Μέτρηση της τιμής του pH.

Στα δείγματα, η μέτρηση της τιμής του pH πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Tsiraki and Savvidis (2014). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ψηφιακό pH- μετρο (Consort C860) με γυάλινο ηλεκτρόδιο έπειτα από αρραίωση του δείγματος (1/10) και ομογενοποίηση του δείγματος (25gr) τυριού με (225 ml) νερό απεσταγμένο. Έπειτα ακολούθησαν δύο μετρήσεις και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο αυτών μετρήσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

7. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειραματικού μέρους της διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται στους πίνακες 3, 4 και 5.

Οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «ανεβατό» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής Α και Β παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Αμέσως μετά την παρασκευή του τυριού («φρέσκο»), στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την «Εγκατάσταση Α», οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ήταν $7,4 \pm 0,15$ log cfu/g, ενώ για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus* ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτεροι ($P < 0,05$) φτάνοντας τους $7,9 \pm 0,25$ log cfu/g. Στα δείγματα «5 ημερών» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή τόσο των πληθυσμών για τους *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ($7,7 \pm 0,2$ log cfu/g), αλλά όσο στους πληθυσμούς των *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* ($7,4 \pm 0,24$ log cfu/g).

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης Β» στο προϊόν αμέσως μετά την παραγωγή του καταγράφηκε σημαντικά χαμηλότεροι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με το αντίστοιχο προϊόν από την «Εγκατάσταση Α», τόσο για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* με τιμές $6,7 \pm 0,20$ log cfu/g και $6,1 \pm 0,44$ log cfu/g, αντίστοιχα. Στα δείγματα «5 ημερών» καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτεροι ($P < 0,05$) πληθυσμοί για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus*, φτάνοντας τους $7,9 \pm 0,4$ log cfu/g και $8,2 \pm 0,38$ log cfu/g, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων παραγωγής Α και Β καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) για το «φρέσκο» προϊόν τόσο για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* ($7,4 \pm 0,15$ log cfu/g για την «Εγκατάσταση Α», $6,7 \pm 0,20$ log cfu/g για την «Εγκατάσταση Β»), όσο και για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus* ($7,9 \pm 0,25$ και $6,1 \pm 0,44$ 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*, ($7,4 \pm 0,24$ και $8,2 \pm 0,38$ log cfu/g για τις Εγκαταστάσεις Α και Β, αντίστοιχα).

Πίνακας 3. Πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «ανεβατό» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής (Μέσος όρος \pm Τυπική απόκλιση).

| Οξυγαλακτικά βακτήρια | Πληθυσμός (log cfu/g) | | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Εγκατάσταση A | | Εγκατάσταση B | |
| | ΦΡΕΣΚΟ | 5 ΗΜΕΡΩΝ | ΦΡΕΣΚΟ | 5 ΗΜΕΡΩΝ |
| <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. | 7,4 \pm 0,15 ^α | 7,7 \pm 0,2 ^α | 6,7 \pm 0,20 ^β | 7,9 \pm 0,4 ^α |
| <i>Lactococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. | 7,9 \pm 0,25 ^α | 7,4 \pm 0,24 ^α | 6,1 \pm 0,44 ^β | 8,2 \pm 0,38 ^γ |

^{α,β,γ} = Μέσοι όροι στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η τιμή του pH στα δείγματα τυριού «ανεβατό» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής A και B.

Από την μέτρηση του pH στα δείγματα αμέσως μετά την παρασκευή του τυριού («φρέσκο») που προέρχονταν από την «Εγκατάσταση A» η τιμή του pH ήταν 4,23 \pm 0,1. Στα δείγματα «5 ημερών» δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (P>0,05) σε σχέση με την αρχική τιμή με την τιμή του pH να παρουσιάζει μια μικρή μείωση φτάνοντας το 4,16 \pm 0,09.

Στα δείγματα της «Εγκατάστασης B» στο «φρέσκο» προϊόν η τιμή του pH ήταν 4,09 \pm 0,08. Στα δείγματα «5 ημερών» επίσης δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (P>0,05) σε σχέση με την αρχική τιμή του pH και παρέμεινε σταθερό σε 4,05 \pm 0,03.

Συγκρίνοντας το pH μεταξύ των δύο εγκαταστάσεων παραγωγής δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές (P>0,05) τόσο για το «φρέσκο» προϊόν όσο και για τα δείγματα των «5 ημερών».

Πίνακας 4. Τιμή του pH στα δείγματα τυριού «ανεβατό» («φρέσκο» και «5 ημερών») στις δύο εγκαταστάσεις παραγωγής (Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση).

| Τιμή pH | Εγκατάσταση Α | | Εγκατάσταση Β | |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | ΦΡΕΣΚΟ | 5 ΗΜΕΡΩΝ | ΦΡΕΣΚΟ | 5 ΗΜΕΡΩΝ |
| | 4,23± 0,1 ^α | 4,16± 0,09 ^α | 4,09±0,08 ^α | 4,05±0,03 ^α |

^{α,β,γ} = Μέσοι όροι στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

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

Στο προϊόν από την «Εγκατάσταση Α» αμέσως μετά από την παραγωγή του «φρέσκο» εξετάστηκαν 30 αποικίες. Από αυτές, 16 (53,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lc. lactis*, 6 (20%) ως *Lb. paracasei*, 4 (13,33%) ως *Hafnia alvei*, 1 (3,33%) ως *Lb. plantarum* και 1 (3,33%) ως *E. faecalis*. Αντίστοιχα, για το προϊόν «5 ημερών» τα αποτελέσματα ήταν 12 (40%) ως *Lb. paracasei*, 7 (23,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lc. Lactis*, 6 (20%) ως *E. faecalis* και 2 (6,66%) ως *Lb. plantarum*.

Στα δείγματα από την «Εγκατάσταση Β» εξετάστηκαν επίσης 30 αποικίες. Από αυτές, 9 (30%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. paracasei*, 7 (23,33%) ως *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, 6 (20) ως *Lb. casei*, 3 (9,99%) ως *Lc. lactis*, 2 (6,66%) ως *Lb. plantarum*, 1 (3,33%) ως *Leuconostoc mesenteroides* και 1 (3,33%) ως *Lb zaeae*. Αντίστοιχα, για το προϊόν «5 ημερών» τα αποτελέσματα ήταν 10 (33,33%) ως *Lb. plantarum*, 7 (23,33%) ως *Lb. paracasei*, 7 (23,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lc. lactis*, 4 (13,33%) ως *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, και 1 (3,33%) ως *E. durans*.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, διαπιστώθηκε αδυναμία ταυτοποίησης κάποιων αποικιών. Στην «Εγκατάσταση Α» στο «φρέσκο» προϊόν και στο προϊόν «5 ημερών», 2 (6,66%) και 3 (9,99%) αποικίες δεν ταυτοποιήθηκαν. Στην «Εγκατάσταση Β» το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 3,33 % τόσο στο «φρέσκο» προϊόν όσο και στο προϊόν «5 ημερών».

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

Πίνακας 5. Ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριού «ανεβατό» («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>Lc. lactis</i> | 16 (53,33) | 10 (33,33) | 9 (30) | 7 (23,33) |
| <i>Lb. brevis</i> | - | - | - | - |
| <i>Lb. paracasei</i> | 6 (20) | 12 (40) | 9 (30) | 7 (23,33) |
| <i>Lb. casei</i> | - | - | 6 (20) | - |
| <i>Lb. zeae</i> | - | - | 1 (3,33) | - |
| <i>Lb. plantarum</i> | 1 (3,33) | 3 (9,99) | 2 (6,66) | 10 (33,33) |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | | | 1 (3,33) | |
| <i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | - | - | 2 (6,66) | 4 (13,33) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 (3,33) | 2 (6,66) | - | - |
| <i>E. durans</i> | - | - | - | 1 (3,33) |
| <i>E. faecium</i> | - | - | - | - |
| MT ¹ | 2 (6,66) | 3 (9,99) | 1 (3,33) | 1 (3,33) |
| AEB ² | - | - | - | - |
| <i>Hafnia alvei</i> | 4 (13,33) | - | - | - |

¹MT: Μη ταυτοποιημένα

²AEB: Άλλο είδος βακτηρίου

7.1 Συζήτηση και συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας για τους πληθυσμούς και το είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα ανεβατού από 2 διαφορετικές εγκαταστάσεις, αλλά και σε διαδοχικές φάσεις αμέσως μετά την παραγωγή του τυριού και μετά από μερικές ημέρες συντήρησης στην ψύξη, έδειξαν ότι υπήρξαν διαφοροποιήσεις.

Η τιμή του pH στα φρέσκα δείγματα από την «Εγκατάσταση Α» βρέθηκε $4,23 \pm 0,1$ και για την «Εγκατάσταση Β» $4,09 \pm 0,08$, χωρίς να διαφέρουν σημαντικά ($P > 0,05$) μεταξύ τους. Οι τιμές του pH στα δείγματα που λήφθηκαν μετά από 5 ημέρες στην συντήρηση σε θερμοκρασία ψύξης ήταν ελαφρά μειωμένες και βρέθηκαν $4,16 \pm 0,09$ και $4,05 \pm 0,03$ για την «Εγκατάσταση Α» και την «Εγκατάσταση Β», αντίστοιχα. Ομοίως οι τιμές αυτών των δειγμάτων από τις δύο εγκαταστάσεις δεν διέφεραν σημαντικά ($P > 0,05$) τόσο μεταξύ τους, όσο και σε σχέση με τα «φρέσκα» δείγματα. Ανάλογη τιμή pH για δείγματα ανεβατού αναφέρονται και από τους Hatzikamari et al., (1999) και Xanthopoulos et al. (2000). Συγκεκριμένα στα δείγματα αμέσως μετά την παραγωγή τους η τιμή του pH βρέθηκε $4,25 \pm 0,18$ και μετά από 60 ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία ψύξης η τιμή pH βρέθηκε να είναι $4,28 \pm 0,07$. Η χαμηλή τιμή του pH σε τυριά με οξυγαλακτική χλωρίδα αποδίδεται στο παραγόμενο οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ κατά το μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το χαμηλό pH δημιουργεί δυσμενείς συνθήκες τόσο στην αύξηση της ανταγωνιστικής χλωρίδας όσο και στην ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, αποτελώντας σημαντικό παράγοντα ενίσχυσης της ασφάλειας αυτών των προϊόντων (Parada et al., 2007). Η χαμηλή τιμή του pH φαίνεται να έχει ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία πήξης του τυριού, με αποτέλεσμα τα τυριά με χαμηλό pH να εμφανίζουν σχετικά πιο σταθερή δομή (Walstra et al., 2005).

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι όξινες τιμές pH δεν φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη της οξυγαλακτικής χλωρίδας του τυριού (Kallinteri et al., 2013).

Πράγματι στα «φρέσκα» δείγματα που εξετάστηκαν από την «Εγκατάσταση Α» οι πληθυσμοί που μετρήθηκαν ήταν $7,4 \pm 0,15$ για *Lactobacillus* spp. και *Leuconostoc* spp. (MRS) και $7,9 \pm 0,25$ για *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. και *Pediococcus* spp. (M17). Στη συνέχεια μετά από 5 ημέρες συντήρησης σε συνθήκες ψύξης, οι πληθυσμοί που μετρήθηκαν ήταν $7,7 \pm 0,2$ (MRS) και $7,8 \pm 0,24$ (M17). Αντίστοιχα, οι πληθυσμοί στα δείγματα από την «Εγκατάσταση Β» μετά από 5 ημέρες συντήρησης στην ψύξη ήταν $7,9 \pm 0,4$ (MRS) και $8,2 \pm 0,38$ (M17), χωρίς να διαφέρουν σημαντικά ($P > 0,05$) με τα δείγματα από την «Εγκατάσταση Α». Σε απόλυτη συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Hatzikamari et al., (1999) οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μετρήθηκαν από δείγματα τυριού «ανεβατό» βρέθηκαν να κυμαίνονται (σε MRS) από $7,78 \pm 1,28$ κατά την παραγωγική διαδικασία έως $8,08 \pm 0,72$ μετά από 60 ημέρες συντήρησης στην ψύξη. Στην ίδια μελέτη οι αντίστοιχοι πληθυσμοί (σε M17) βρέθηκαν να κυμαίνονται από $8,08 \pm 1,28$ έως $8,61 \pm 0,29$ στα ίδια χρονικά διαστήματα.

Στα «φρέσκα» δείγματα από την «Εγκατάσταση Β» οι αρχικοί πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκαν $6,7 \pm 0,20 \log \text{ cfu/g}$ για τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* και $6,1 \pm 0,44 \log \text{ cfu/g}$ για τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enteriococcus* και *Pediococcus*. Οι αρχικοί πληθυσμοί αυτοί ήταν σημαντικά ($P < 0,05$) χαμηλότεροι τόσο από τα αντίστοιχα δείγματα από την «Εγκατάσταση Α» όσο και από τους αντίστοιχους πληθυσμούς που αναφέρονται σε άλλες μελέτες (Hatzikamari et al., 1999). Η διαφορά αυτή στους πληθυσμούς μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται από τις διαφορετικές επιχειρήσεις. Επίσης, έχει καταγραφεί στην βιβλιογραφία σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών του τυριού «ανεβατό» σε διαφορετικές εποχές συλλογής του γάλακτος και επεξεργασίας του (Hatzikamari et al., 1999). Επίσης μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές πρακτικές θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος στην «Εγκατάσταση Β». Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Xanthopoulos et al. (2000) αναφέρονται στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την καταμέτρησή τους σε υποστρώματα MRS και M17 μετά από διαφορετικές θερμικές επεξεργασίες ή καθόλου επεξεργασία του γάλακτος (νωπό, θέρμιση στους $63,3 \text{ C}$ για 10 min και παστερίωση στους 72 C για 15 s).

Οι Hatzikamari et al., 1999 σε μελέτη που πραγματοποίησαν σε δείγματα «ανεβατού» αναφέρουν ότι από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα αμέσως μετά την παραγωγή τους κυρίως ήταν από τα γένη *Lactococcus*. Κατά την παραγωγική διαδικασία από τα στελέχη που απομονώθηκαν το 70% περίπου άνηκαν στο γένος *Lactococcus* spp., ενώ την 15^η ημέρα της συντήρησης στην ψύξη το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 51% περίπου αποτελώντας την κυρίαρχη οξυγαλακτική χλωρίδα του συγκεκριμένου τυριού. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι στη συνέχεια της συντήρησης του τυριού στην ψύξη και μέχρι την 60^η ημέρα, τα περισσότερα στελέχη άνηκαν στο γένος *Lactobacillus* spp. σε ποσοστά 60-70%. Σε απόλυτη συμφωνία η δική μας μελέτη βρήκε ότι στα «φρέσκα» δείγματα ανεβατού τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν και άνηκαν στο γένος *Lactococcus* spp. ήταν 53,33% και 30% για την «Εγκατάσταση Α» και για την «Εγκατάσταση Β», αντίστοιχα. Όπως και στην μελέτη των Hatzikamari et al., (1999) ο *Lactococcus lactis* ήταν το στέλεχος που απομονώθηκε συχνότερα στην πρώτη περίοδο μετά την παραγωγή των δειγμάτων του ανεβατού.

Αντίστοιχα, στα δείγματα της παρούσας εργασίας που εξετάστηκαν 5 ημέρες μετά την παραγωγή τους βρέθηκε ότι το ποσοστό των στελεχών *Lactobacillus* spp. που ταυτοποιήθηκαν ήταν 50% και 57% του συνόλου για την «Εγκατάσταση Α» και για την «Εγκατάσταση Β», αντίστοιχα. Ο *Lb. paracasei* με 40% και ο *Lb. plantarum* με 10% περίπου αποτελούσαν τους κύριους γαλακτοβακίλλους που απομονώθηκαν από τα δείγματα από την «Εγκατάσταση Α». Για την «Εγκατάσταση Β» οι γαλακτοβάκιλλοι που απομονώθηκαν από τα δείγματα ήταν οι *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum* σε ποσοστά 23% και 33% περίπου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα ανεβατού από την «Εγκατάσταση Β» απομονώθηκε *Str. salivarius* subsp. *thermophiles* σε ποσοστό 6,66% στα φρέσκα δείγματα και 13,33% στα δείγματα των 5 ημερών.

Επίσης, διαπιστώθηκε η ταυτοποίηση ορισμένων στελεχών που ανήκουν σε άλλο είδος μικροοργανισμού. Στο «φρέσκο» προϊόν από την «Εγκατάσταση Α» 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 *Hafnia Alvei* αποτελεί ένα βακτήριο κατά gram αρνητικό το οποίο είναι προαιρετικά αναερόβιο. Θεωρείται παθογόνο, ωστόσο έχει απομονωθεί από ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις καθώς κι από άλλες λοιμώξεις. Μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα, πνευμονία, ενδοφθαλμίτιδα γαστρεντερίτιδα, αλλά 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 επεξεργασίας και τοποθέτησης του δείγματος στην πλάκα του Maldi-Tof, καθώς και η επιλογή του κατάλληλου χημικού υποστρώματος και του διαλύτη 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 & Ciccocozzi, 2019; Becker et al., 2019; Λάππα, 2012).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Abdel-Bar, Harris N.D.: *Inhibitory effect of Lactobacillus bulgaricus on psychotropic bacteria in associative cultures and in refrigerated foods.* J. Food Protect., 1984, 47:61-64.

Adams M.R., Hall C.J.: *Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and cetic acids and their mixtures.* Intem. J. Food Sc. Techn. 23, (1998) 287-292.

Adams M.R., Marteau P.: *On the safety of Lactic Acid Bacteria from food.* International journal of Food Microbiology, 1995, 27: 263-264.

Adams M.R.: *Topical aspects of fermented foods.* Trends in Food Sci. Technol., 1990, 1: 140-144.

Alander M, Korpela R, Saxelin M. : *Recovery of Lactobacillus rhamnosus GG from human colonic biopsies.* Lett Appl Microbiol 1999, 24:361-4.

Anasthaswamy H. N., Eigenstark A.: *Repair of hydrogen peroxide induced singlestrand breaks in Escherichia coli deoxyribonucleic acid.* J. Bacterial., 1977, 130:187-191.

Ashenafi M.: *Growth of Listeria monocytogenes in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by Lactobacillus plantarum.* Food Microbiol., 1991, 8:303-310.

Axelsson L.T.: *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology.* In: Salminen S

Blackwell. J. H. 1976.: *Survival of food and mouth disease virus in cheese.* J. dairy Sci. 59: 1574

Branen A. L., Go H. C., Genske G. R.: *Purification and properties of antimicrobial substances produced by Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorum.* J. Food Sc. 1975, 40: 446-450.

Bullerman, L. 1979.: *Significance of mycotoxins to food safety and human health.* J. Food Prot. 42:65.

Chapman, H. R., and M. E. Sharpe. 1981.: *Microbiology of cheese* (In “dairy microbiology”. Vol 2. pp 157-243, R. K. Robinson, edit. Appl. Sci Publ. London).

- Chikindas ML, Montville TJ** : Prespectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Control of foodborne microorganisms, Marcel Dekker, New York,2002:303-321.
- Cindas L.M., Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE** : Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Sci Tech Int, 2001, 7: 281-305.
- Cogan T. M., Hill C.**: Cheese starter cultures. In Fox P.F (ed) In cheese: ChemistryPhysics and Microbiology vol I Chapman and Hall, London, 1993: 179-239.
- Condon S.**: *Responses of Lactic acid bacteria to oxygen*. FEMS Microbiol. Rew., (ed) Lactic Acid Bacteria, Markel Dekker, 1993: 1-63.1987, 46: 269-280.
- Davey G.P., Richardson B.C.**: Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol, 1981, 41: 84-89.
- Dixon N. M., Kell D. B.**: A review. *The inhibition by CO₂ of growth and metabolism of microorganisms*. J. of Appl. Bacteriol., 1989, 67: 109-136.
- Dixon N. M., Kell D. B.**: A review. *The inhibition by CO₂ of growth and metabolism of microorganisms*. J. of Appl. Bacteriol., 1989, 67: 109-136.
- Doderlein A.**: *Das Scheidensekret und seine Bedeutung fur das Puerperalfieber* (The vaginal transsudate and its singnificance for childbed fever). Centralblatt fur Bacteriologie,1892, 11: 699-700.
- Elo S., M. Saxelin S. SIminen** : Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. Lett. Appl. Microbial. 1991, 13: 154-156.
- FAO/WHO. 1972.**: Recommended international standrads for cheese and government acceptances. FAO, CAC/C₁-C₂₅. 1972. Rome.
- FAO/WHO. 1973.**: Code of principles concerning milk and milk products. International standard and standard methods of sampling and analysis for milk products. 7th Edit. FAO, CAC/M 1-1973. Rome.
- Frank , J. F., E. Marth and N. F. Oslon. 1977.** Survival of enteropathogenic and nin pathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Camembert cheese. J. food Prot. 40: 835
- Frank J.F., Hassan N.A.**: *Starter cultures and their use*. In: Mant E.M., Steel J.L. (eds) Applied dairy microbiology, Marcel Dekker Inc, New York, 1998: 173-194.
- Frazier, W. C. 1967.** Food microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York
- Fuller R.**: Probiotics in man animals. A review. j Appl Bacteriol 1989 66:365-78.

Genigeorgis C.A.: *Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish.* Intem. J. of Food Microbiol., 1985:237-251

Genigeorgis C.A.: *Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish.* Intem. J. of Food Microbiol., 1985:237-251.

Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtiere L, Salminen S.: Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Dig Dis Sci 1992, 37:121-8.\

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.

Gyerraer F. and G.J. Schaafsma: Probiotics Int. J. Food. Microbiol. 39,1998 237-238.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994

Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.: Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73: 365s-373s.

Hurst A., Hoover DG : *Nisin. In: Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker Inc, New York, 1993: 369-407

Hyde, J. L., H. Blackwell and J. J. Callis. 1975. Effect of pasteurization and evaporation on Foot and Mouth Disease virus in whole milk from infected cows. Can. J. Comp. Med. 39: 305

Jay, J. M.: *Antimicrobial properties of diacetyl.* Appl. Environ. Microbiol., 1982, 44:525-532.

Juven, B. J., Weisslowicz, H., Harel, S.: *Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures.* J. of Appl. Bacteriol., 1988, 65: 357-360.

Kailasapathy K., Chin J.: Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium sp. Immunol. Cell. Biol. 2000, 78: 80-88.

Kaur I.P., Kanwaljit C., Amarpreet S: Probiotics: potential pharmaceutical application, European journal of Pharmaceutical Sciences 2002, 15: 1-9.

- Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E., Salminen S.J.:** The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEEMS Microbiol. Lett.* 1998, 167: 185-189.
- Klaenhammer T.R.:** *Bacteriocins of lactic acid bacteria Biochemie.* 1988, 70: 337-354.
- Klaenhammer T.R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria *Biochemie.* 1988, 70: 337-338
Lavoisier Publishing Inc, Paris, 1986:108-125.
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J.:** *Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.* *FEEMS Microbiol. Rew.* 1990, 87: 149-164
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J.:** *Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.* *FEEMS Microbiol. Rew.* 1990, 87: 149-164.
- Lucke F. K., Popp J., Kreutzer R.:** *Formation of hydrogen peroxide by Lactobacilli isolated from fermented and pasteurized sliced sausages.* *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.,* 1986, 10:78-81
- Moltagh, A. M., Johnson, M. C., Ray, B.:** *Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites.* *J. Food Prot.* 1991, 54: 873-878.
- Nettles C.G., Barefoot S.F.:** *Biochemical and genetic characteristic of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria.* *J. Food Protect.* 1993, 56: 338-356.
- Ouwenhand A.C., S. Salminen, S. Toekkoe, P.J. Roberts, J. Ovaska E. Salminen :** Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002, 9: 184-186
- Pruit K. M., Reiter B.:** Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: Pruit, K. M., Tenovuo, (eds) *The Lactoperoxidase system, Immunology series,* Dekker, M. Inc., NY. 1985: 143-178
- Pulusani S. R., Rao D. R., Sunki G. R.:** *Partial purification and characterization of antimicrobial compound produced by Streptococcus thermophilus.* *J. Food Sci.* 1979, 44 (2): 575-578.
- Ramet, J. P.:** *Lactic Starters.* In: Eck A(ed) *In Cheesemaking. Science and Technology*
- Rash, K. E. and F. V. Kosikowski,** 1982. Influence of lactic acid starter bacteria on enteropathogenic, *Escherichia coli* in ultrafiltration prepared Camembert cheese. *J. Dairy Sci.* 65:537
- Reiter, B., T. F. Fryer, A. Pickering, H. R. Chapman, R. C. Lawrence and M. E. Sharpe.** 1967. The effect of the microbial flora in the flavor and free fatty acid composition of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 34: 257

Ronka E, Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M.: Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*, International journal of Food Microbiology 2573, 2002, Article in Press

Salminen S., Von Wright A., Moreli L.: *Demonstration of safe of probiotics.* International Journal of Food Micr

Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. C., Holzapfel W.H.: Safety assessment of starters and probiotics. In M. Adams & R. Nis (eds), Fermentation and food safety , Gathersburg, M.D.: Aspen Publishers. 2000, : 239-251.

Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG : Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. Food Microbiol, 2003, 20: 661-669.

Sandine, B. 1978.: Lactic starter technology. Pfizer cheese monographs. Pfizer Inc. New York

Scott, R. 1986. Cheesemaking practice. Appl. Sci. Publ. Ltd. London.

Svensson U.: Industrial perspectives. In probiotics: A critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham U.K., 1999: 57-64.

Svensson U.: Industrial perspectives. In probiotics: A critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham U.K., 1999: 57-64.

Talarico T. L., Dobrogosz W. J.: *Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri.* Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33: 674-679.

Tatini, S. R., J.J. Jezeski, J. C. Olson Jr., and E. P. Gasman. 1971. Production of staphylococcal enterotoxin A in cheddar cheese and Colby cheese. J. Dairy Sci. 54:815

Tatini, S. R., W. D. Wesala, J. J. Jezeski and H. A. Morris. 1973. Production of staphylococcal enterotoxin A in blue, Brick, Mozzarella and Swiss cheeses. J. Dairy Sci. 56:429

Van Belkum, M. J.: Lactococcal bacteriocins: genetics and mode of action. Ph. D. thesis University of Groningen, Groningen, The Netherlands 1991

Vignolo G. M., De Kairuz M. N., De Ruiz Holgado A. A. P., Oliver G.: Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. J. Appl. Bacteriol. 1995, 78 : 5-10.

Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., Coppola, S.: Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 1993, 74: 380-387.

Ward D. J., Somkuti G. A.: Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43

Wunschel, D. S., Hill, E. A., McLean, J. S., Jarman, K., Gorby, Y. A., Valentine, N., et al. (2005). Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *J. Microbiol. Methods* 62, 259–271. doi: 10.1016/j.mimet.2005.04.033

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Ακτόπης Α.: Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από στελέχη οξυγαλακτικών καλλιέργειών που απομονώθηκαν από Ελληνικά παραδοσιακά προϊόντα, Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, 1999: 9-20.

Ανυφαντάκης Ε. Μ. 1998.: Ελληνικά τυριά. Μια παράδοση αιώνων. Έκδοση εθνικής επιτρ. Γάλακτος. Αθήνα 1998

Ανυφαντάκης Ε. Μ.: Οι μικροβιακές καλλιέργειες στη Βιομηχανία γάλακτος και η σημασία τους για την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοκομία Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Αθήνα, 1992:15 33. *obiology* 1998, 44: 39-106.

Ανυφαντάκης Ε. Μ.: Οι μικροβιακές καλλιέργειες στη Βιομηχανία γάλακτος και η σημασία τους για την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοκομία Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος, Αθήνα, 1992:15 33.

Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία.: 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας Και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων . Φεβρουάριος, 2009.

Ζώτου Α (2009): Μελέτη της τεχνολογίας παρασκευής και φυσικοχημικών, μικροβιολογικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών φρέσκου μαλακού τυριού από νωπό, παστεριωμένο και μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΜΣ: «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του ανθρώπου», Ιούνιος 2009.

Καμιναρίδης Σ., Μανωλοπούλου Ε., Ζωΐδου Ε.: Εργαστηριακός έλεγχος οξυγαλακτικών καλλιεργείων. Επιμορφωτικό Σεμινάριο στη Γαλακτοβιομηχανία. Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες στη Βιομηχανία Γάλακτος, Εθνική Επιτροπή Γάλακτος, Αθήνα, 1992: 113-127.

Καραϊωάννογλου , Πρ. 1982.: Πειραματική παραγωγή αφλατοξινών στα τυριά φέτα, κασέρι, κεφαλοτύρι. Διατριβή Υψηγείας. Θεσσαλονίκη, Κτηνιατρική Σχολή

Κεχαγιάς, Χ. (2001): Γάλα: Επιστήμη και έλεγχος για την διασφάλιση της ποιότητας . Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.

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

Μάντης Α. 1973.: Συνθήκαι παραγωγής σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών εις τον τυρόν φέτα. Διατριβή επί υψηγείας. Επιστημονική επετηρίς κτηνιατρικής σχολής. Τόμος 14^{ος} . Θεσσαλονίκη.

Μάντης Α.: Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, Θεσσαλονίκη, 2000.

Μανωλιδάκης, Κ. Σ. και Ν. Μ. Τζανετάκης. 1972.: Παρακολούθησις μεταβολής της μικροχλωρίδας κατά την παρασκευήν και ωρίμανσιν του τυριού Τελεμέ. Χημ. Χρον. 37:87

Μεταξόπουλος Ι., Ματαράγκας Μ., Δροσινός Ε.Χ.: Βακτηρισίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και εφαρμογή τους στα τρόφιμα ως βιοσυντηρητικών (II). Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 2003, 54: 69-77.

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

Πανέτσος, Α., Γεωργάκης και Α. Μάντης. 1972.: Επιβίωσις της *Escherichia coli* εις τον τυρόν φέτα. Πρακτ. 5^ο Εθν. Συμπ. Μικροβ. Σελ 178. Αθήνα.