

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

**ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»**
**ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**
(ΓΠΑ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Επίδραση του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως
επιπρόσθετη καλλιέργεια στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και
οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα**

ΤΣΟΥΜΠΡΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Α. Ακτύπης, Λέκτορας ΓΠΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γ. Ζέρβας, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»
ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
(ΓΠΑ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Επίδραση του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως
επιπρόσθετη καλλιέργεια στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και
οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

ΤΣΟΥΜΠΡΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Α. Ακτύπης, Λέκτορας ΓΠΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γ. Ζέρβας, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα πρόσωπα που συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Λέκτορα του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και επιβλέποντα της παρούσας μελέτης κ. Αναστάσιο Ακτύπη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και μου ανέθεσε την παρούσα εργασία καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και των εργαστηριακών αναλύσεων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα κ. Αικατερίνη Γεωργαλά για την καθοδήγησή της κατά την διάρκεια των εργαστηριακών αναλύσεων καθώς και την Διδάκτορα κ. Ράνια Αναστασίου για την προσπάθειά της να εξελιχθεί ένα βήμα επιπλέον η έρευνα για την μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ana Isabel Quirola για τη πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια του πειράματος και των εργαστηριακών αναλύσεων καθώς και όλους όσους συνέβαλλαν στην επιτυχή έκβαση της παρούσας εργασίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Έφη Τσακαλίδου και στον Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδαροκαλλιεργειών κ. Γεώργιο Ζέρβα για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση που δείχνει σε όλες μου τις αποφάσεις.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	8
B	Abstract	10
1	Εισαγωγή	11
2	Ορισμός τυριού και τρόπος παρασκευής του	13
3	Η τυροκομία στην Ελλάδα	17
4	Ταξινόμηση τυριών	19
5	Τυριά άλμης	23
6	Η Φέτα	25
6.1	Ορισμός και περιγραφή της Φέτας	25
6.2	Η Φέτα ως τυρί Π.Ο.Π.	26
6.3	Τεχνολογία και στάδια παρασκευής της Φέτας	27
6.4	Χημικές και μικροβιολογικές ιδιότητες της φέτας	32
7	Οξυγαλακτικά βακτήρια	35
7.1	Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	36
7.2	Διαχωρισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων σε εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες	41

7.3	Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων	42
7.3.1	Μεταβολισμός σακχάρων	43
7.3.2	Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών	46
7.3.3	Μεταβολισμός λίπους	49
8	<i>Lactobacillus rennini</i> ACA-DC 565	51
9	Σκοπός του πειράματος	53
10	Υλικά και μέθοδοι	54
10.1	Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν	54
10.2	Τυροκομήσεις και δειγματοληψία	54
10.3	Φυσικοχημικές αναλύσεις	55
10.4	Μικροβιολογικές αναλύσεις	62
10.5	Οργανοληπτικός έλεγχος	63
10.6	Στατιστική επεξεργασία	64
11	Αποτελέσματα	65
11.1	Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα	65
11.1.1	Μεταβολή του pH	65
11.1.2	Μεταβολή της υγρασίας	66
11.1.3	Μεταβολή του λίπους (%)	67

11.1.4		Μεταβολή του λίπους επί ξηρού (%)	67
11.1.5		Μεταβολή της περιεκτικότητας σε αλάτι (%)	68
11.1.6		Μεταβολή της περιεκτικότητας σε (%) αλάτι επί της υγρασίας	68
11.1.7		Μεταβολή του ολικού αζώτου (%)	69
11.1.8		Μεταβολή της πρωτεΐνης (%)	70
11.1.9		Μεταβολή του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA/TN	70
11.2		Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα	72
11.2.1		Οξυγαλακτικά βακτήρια	72
11.2.1.1		<i>Lactobacillus rennini</i> ACA-DC 565	72
11.2.1.2		Θερμόφιλοι κόκκοι	73
11.2.1.3		Θερμόφιλοι βάκιλλοι	74
11.2.1.4		Μεσόφιλοι κόκκοι	75
11.2.1.5		Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB)	76
11.2.2		Άλλα βακτήρια	77
11.2.2.1		Εντερόκοκκοι	77
11.2.2.2		Μικρόκοκκοι	78

11.2.2.3		Κολοβακτηρίδια	78
11.2.2.4		Ζύμες	79
11.3		Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα	80
12		Συζήτηση	83
Γ		Βιβλιογραφία	92

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματικής καλλιέργειας στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα.

Για το σκοπό αυτό έγιναν τυροκομήσεις με την χρήση 3 διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών: Α, χωρίς την χρήση συμπληρωματικής καλλιέργειας αλλά μόνο με την μεικτή εναρκτήρια καλλιέργεια (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ACA-DC 0052 plus *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0007+ *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ACA-DC 0084), Β, με την χρήση της ίδιας εναρκτήριας καλλιέργειας με το Α και με την προσθήκη του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματικής, Γ, με την χρήση της ίδιας εναρκτήριας καλλιέργειας με το Α και με την προσθήκη του *L. lactis* ssp. *cremoris* ACA-DC 0736 ως συμπληρωματικής.

Αναλύσεις στα τυριά έγιναν κατά τον χρόνο ωρίμανσης στις 1, 15, 30 και 60 ημέρες. Ως προς τις μικροβιολογικές αναλύσεις βρέθηκε ότι χρήση του στελέχους *Lb. rennini* ως συμπληρωματικού στην επέμβαση Β είχε ενισχυτική επίδραση στην βιωσιμότητα των θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης με τον πληθυσμό να παραμένει στις 9 λογ. μονάδες στα ώριμα τυριά, σε αντίθεση με τα άλλα τυριά όπου ο πληθυσμός τους μειώθηκε σημαντικά στις 4 λογ. μονάδες. Ομοίως, ο πληθυσμός των μη εναρκτήριων οξυγαλακτικών γαλακτοβακίλλων (NSLAB) διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα κατά την ωρίμανση στο τυρί Β σε σύγκριση με τα άλλα τυριά και στο τέλος της ωρίμανσης η μείωση ήταν μικρότερη κατά 1 λογ μονάδα. Όσον αφορά τις άλλες μικροβιακές ομάδες η εξέλιξη τους δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα μεταξύ των 3 διαφορετικών επεμβάσεων, τόσο κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης, όσο και στα τελικά ώριμα τυριά.

Στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών, κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε υγρασία, η οποία στα τυριά Β και Γ με την χρήση συμπληρωματικών καλλιεργειών ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η πλέον σημαντική επίδραση παρατηρήθηκε στην περίπτωση της πεπτιδασικής πρωτεόλυσης στα τυριά μετά από 15 ημέρες, όπου στο Β βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη εκφρασμένη ως υδατοδιαλυτό άζωτο %(TCA-SN). Τέλος, κατά την οργανοληπτική εκτίμηση των τυριών, το τυρί Β

με τον *Lb. rennini* ACA-DC 565, ως συμπληρωματική καλλιέργεια, έλαβε την μεγαλύτερη βαθμολογία, όσον αφορά το άρωμα-γεύση και την συνολική αποδοχή συγκριτικά με τα άλλα τυριά.

Λέξεις κλειδιά: Συμπληρωματική καλλιέργεια; *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565;
Φέτα

ABSTRACT

The influence of *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 as adjunct cultures on some chemical and biochemical properties of Feta cheese was investigated. Three batches of cheese were produced: A, with no added adjuncts, containing only cheese culture (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ACA-DC 0052 plus *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0007+ *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ACA-DC 0084); B, containing A culture plus *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 adjunct culture; C containing A culture plus *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ACA-DC 0736.

Analyses were carried out on days of 1, 15, 30, and 60 of ripening. It was found that *Lb. rennini* positively affected the counts of thermophilic lactobacilli during the whole ripening time, compared to the rest of the vats ($P < 0.05$), where the counts decreased to 4 log instead of 9 log in cheese B. Similarly, the counts of NSLAB group in cheese B were higher during the ripening compared to the other vats, and a lower decline to 7 log instead of 6 log in A and C cheeses was achieved, after 60 days of ripening. Only small variations in the evolution of thermophilic and mesophilic cocci were observed, to all cheeses, during the whole ripening period and they remained in high counts of approximately 9 log units in matured cheeses. The remaining groups investigated, comprising yeasts, coliforms and micrococci were highest at day 15. The yeasts decreased about 2 log units, while coliforms and micrococci were not detectable after 60 days of ripening. Throughout aging no significant differences in physicochemical characteristics were observed except the moisture content, where in vats B and C was significantly lower than in the control vat. The most pronounced effect was observed in the case of proteolysis after 15 days, where in cheese B was found the highest mean value for the TCA-SN. Finally, during the sensory assessment the cheeses prepared with the *Lb. rennini* ACA-DC 565 as adjunct culture received better grades compared to the control and the other with *L. lactis* ssp. *cremoris* ACA-DC 0736 as adjunct culture.

Keywords: adjunct starters; *Lb. rennini*; Feta cheese

1. Εισαγωγή

Το τυρί χρησιμοποιείται στη διατροφή του ανθρώπου από αρχαιοτάτων χρόνων. Θεωρούνταν από τότε εξαιρετική τροφή χάρη στην πολύ καλή γεύση και στο άρωμά του. Τους τελευταίους δύο αιώνες τεκμηριώθηκε και επιστημονικά ότι πέραν της γεύσης και του αρώματός του περιέχει και μία μεγάλη ποικιλία στερεών συστατικών που είναι πολύτιμα για την διατροφή του ανθρώπου. Οι πρωτεΐνες του είναι υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε ποσότητες και σχέσεις που ανταποκρίνονται στις ανάγκες του ανθρώπου. Αποτελεί μία πολύ πλούσια πηγή ασβεστίου και φωσφόρου, περιέχει βιταμίνες, ανόργανα άλατα, λίπος και άλλα συστατικά που το καθιστούν πολύτιμο τρόφιμο. Αυτοί είναι και οι λόγοι που η παραγωγή και κατανάλωσή του αυξάνουν από χρόνο σε χρόνο (Ανυφαντάκης 2004).

Το γάλα μπορεί να υποστεί διάφορες επεξεργασίες μέχρι να μετατραπεί σε τυρί και ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής προκύπτουν τυριά με διαφορετική σύσταση, εμφάνιση, γεύση και μικροβιακή χλωρίδα. Η μικροβιακή χλωρίδα του κάθε τυριού παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών, αφού αυτά καθορίζονται κυρίως από τα προϊόντα ζυμώσεων της μικροβιακής χλωρίδας.

Η Φέτα είναι ένα λευκό τυρί που ωριμάζει σε άλμη, η οποία ασκεί καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των γευστικών του χαρακτηριστικών και στη συντήρησή του. Το τυρί αυτό είναι παραδοσιακό Ελληνικό τυρί Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.), για την παρασκευή του χρησιμοποιείται αμιγώς πρόβειο γάλα ή πρόσμιξή του με αίγιο έως 30%, ανήκει στην κατηγορία των μαλακών τυριών, με υγρασία μικρότερη από 56% και λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 43% επί ξηρού. Στην Ελλάδα, η Φέτα, κατέχει εξέχουσα θέση στην προτίμηση του καταναλωτή.

Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής Φέτας γίνεται από παστεριωμένο γάλα και με τη χρήση οξυγαλακτικής καλλιέργειας του εμπορίου. Η εναρκτήρια οξυγαλακτική καλλιέργεια που χρησιμοποιείται έχει ιδιαίτερη σημασία, στη δημιουργία των επιθυμητών τυπικών χαρακτηριστικών του τυριού αυτού. Ωστόσο σημαντικό ρόλο παίζει και η συμμετοχή της υπόλοιπης μικροχλωρίδας και ιδιαίτερα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η τεχνολογία τυροκόμησης αναφέρεται κυρίως στη θερμοκρασία ωρίμανσης, στον τρόπο

και βαθμό αλάτισης στον τρόπο στράγγισης κ.ά. Αυτά καθορίζουν τόσο την πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (πρόσθετων ή/και αυτόχθονων) αλλά και των άλλων ομάδων βακτηρίων που τυχόν βρίσκονται στο τυρόπηγμα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών, τα οποία διαθέτουν ορισμένες κοινές φυσιολογικές ιδιότητες. Το κύριο χαρακτηριστικό τους γνώρισμα, είναι ότι ζυμώνουν την λακτόζη σε γαλακτικό οξύ μέσω ομο- ή ετερο-ζυμωτικής οδού (Salminen and non Wright, 1998). Εκτός από τη ζύμωση της λακτόζης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια επηρεάζουν ουσιαστικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού, γενικότερα μέσω του μεταβολισμού τους και της απελευθέρωσης πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων καθώς και άλλων προϊόντων μεταβολισμού.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματικής καλλιέργειας στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα. Ο μικροοργανισμός *Lactobacillus rennini* απομονώθηκε από δείγμα τυριού Μάνας Κοπανιστής (Asteri *et al.*, 2009). Επίσης, είναι ένα είδος που περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα για απομονώσεις που προέρχονται από αλλοιωμένη πυτιά (Chenol *et al.*, 2006). Οστόσο στο παρελθόν δεν έχει απομονωθεί από καμία άλλη πηγή.

2. Ορισμός τυριού και τρόπος παρασκευής του

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1988) ‘Ως τυρί ορίζεται το προϊόν που παράγεται από γάλα και αποτελεί προϊόν ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν με την επενέργεια της πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου ή μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγματα αυτών ή και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα)’. Ο ορισμός αυτός αναφέρεται στα τυριά από γάλα με ωρίμανση.

Εκτός από τα παραπάνω τυριά από γάλα με ωρίμανση υπάρχουν και τα τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση τα οποία ορίζονται βάση του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1988) ως ‘Τα φρέσκα (νωπά) τυριά που παρασκευάζονται με την επενέργεια οξυγαλακτικών καλλιιεργειών βακτηρίων σε παστεριωμένο γάλα ή παστεριωμένο γάλα και παστεριωμένη κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 75%’.

Επίσης υπάρχουν τα τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση που ορίζονται βάση του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (1988) ως ‘Τα τυριά τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα) και βρώσιμοι χλωριούχου νατρίου (κοινώς αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα)[μερικά από αυτά μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξερά) και άλλα κατόπιν ωρίμανσης] και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%’.

Η πήξη του γάλακτος και η μετατροπή του σε τυρί με την επίδραση της πυτιάς είναι μία πανάρχαια τεχνική, η οποία με την πάροδο των χρόνων έχει συμπληρωθεί με πολλά στάδια επεξεργασίας που καταλήγουν στη δημιουργία πολλών διαφορετικών ποικιλιών τυριών.

Για την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της πήξης θα πρέπει να προσδιοριστεί η μονάδα του ‘καζεϊνικού μικκυλίου’ που αποτελεί τη βάση του πήγματος. Η μονάδα λοιπόν αυτού του καζεϊνικού μικκυλίου μπορεί να προσδιοριστεί ως μια σφαιροειδής κατασκευή που αποτελείται και από τους τέσσερεις τύπους

καζεϊνών (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) και περιέχει και φωσφορικό ασβέστιο στην κολλοειδή μορφή του (Μάντης, 2000). Οι κ -καζεΐνες (υδρόφιλες) μαζί με τις α_s -καζεΐνες (υδρόφοβες) φαίνεται να είναι τοποθετημένες στην επιφάνεια της παραπάνω σφαίρας έτσι ώστε να αποφεύγεται η συγκόλληση των ομοιοπολικών μορίων. Ενώ στο κέντρο της σφαίρας είναι τοποθετημένες οι α_s και β καζεΐνες, οι οποίες είναι υδρόφοβα μόρια. Η σταθερότητα αυτών των μικκυλίων βασίζεται κυρίως στην διπολικότητα του μορίου της κ -καζεΐνης η οποία αποτελείται από ένα υδρόφοβο μόριο, την παρά- κ -καζεΐνη που συνδέεται με το υδροφοβικό εσωτερικό του μορίου του μικκυλίου και από ένα υδρόφιλο μόριο, το μακροπεπτίδιο ή γλυκομακροπεπτίδιο (CMP ή GMP) το οποίο αντιδρά με το περιβάλλον διάλυμα ώστε να σταθεροποιεί το μικκύλιο σε αυτό (Walstra and Jenness, 1984).

Γενικά, η παραγωγή όλων των κατηγοριών τυριών περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009):

- Πήξη του γάλακτος με τη δράση της πυτιάς, της οξύτητας ή και των δύο παραγόντων.

Η πήξη του γάλακτος με πυτιά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η πρώτη είναι η ενζυμική φάση, κατά την οποία συμβαίνει υδρόλυση της σταθεροποιητικής κ -καζεΐνης στο δεσμό Phe 105-Met 106 από το πρωτεολυτικό ένζυμο χυμοσίνη. Η χυμοσίνη είναι το κύριο πρωτεολυτικό ένζυμο της πυτιάς και ονομάζεται πυκτικό ένζυμο του γάλακτος. Προέρχεται από το τέταρτο στόμαχο (ήνυστρο) των μικρών σε ηλικία μηρυκαστικών, πριν ξεκινήσει ο μηρυκασμός. Η δεύτερη φάση της πήξης του γάλακτος αφορά την μη-ενζυμική φάση ή την κροκίδωση των μικκυλίων κατά την οποία συμβαίνει συσσωμάτωση των αποσταθεροποιημένων μικκυλίων παρουσία ιόντων ασβεστίου σε θερμοκρασία > 20 °C. Έτσι, δημιουργείτε ένα τρισδιάστατο καζεϊνικό πλέγμα που συνδέεται διαμέσου γεφυρών ασβεστίου, μέσα στο οποίο περικλείονται τα λιποσφαίρια και μέρος του ορού του γάλακτος, το οποίο ονομάζεται τυρόπηγμα (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Η πήξη του γάλακτος μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την δράση της οξύτητας και ονομάζεται όξινη πήξη. Σε $\text{pH} < 5,2$ το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο (ενώνει τα υπομικκύλια τα οποία αποτελούν το καζεϊνικό μικκύλιο) αποσυνδέεται από τα καζεϊνικά μικκύλια, με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωσή τους. Σε $\text{pH} 4,6$ (ισοηλεκτρικό σημείο καζεϊνών) συμβαίνει η εξουδετέρωση του

αρνητικού φορτίου της καζεΐνης, με αποτέλεσμα την αδιαλυτοποίησή της και τη δημιουργία ενός συνδετικού δικτύου αφαλατωμένων υπομικκυλίων. Το συνεκτικό δίκτυο μετατρέπεται σε πήγμα (όξινο πήγμα) που περικλείει το σύνολο του νερού και των συστατικών του γάλακτος (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Η οξίνιση του γάλακτος μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ζύμωσης της λακτόζης από τους μικροοργανισμούς με τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ ή της προσθήκης οξέος. Η δημιουργία όξινου πήγματος εξαρτάται από την θερμοκρασία. Σε 0-5 °C και pH 4,6 δεν συμβαίνει πήξη, απλώς παρατηρείται αύξηση του ιξώδους. Όταν η θερμοκρασία είναι ~40 °C, η πήξη παρατηρείται ήδη από το pH 5,2, ενώ όταν το γάλα έχει θερμανθεί σε θερμοκρασίες > 80 °C, μαζί με τις καζεΐνες κατακρημνίζονται και συμμετέχουν στο πήγμα οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες του ορού (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

- Απομάκρυνση του ορού (τυρογάλακτος) από το πήγμα, έτσι ώστε να αποτελεί το 10-30 % του όγκου του γάλακτος.
- Παραγωγή οξέος εξαιτίας της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων.
- Αλάτισμα, έτσι ώστε το τελικό προϊόν να περιέχει κατά κανόνα 1-4% αλάτι.
- Σχηματοδότηση του τυροπήγματος (π.χ. σε κεφάλια), έτσι ώστε να μπορεί να μεταφερθεί και να διατηρηθεί εύκολα.
- Ωρίμανση για ορισμένο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο συμβαίνουν βιοχημικές και μικροβιακές διεργασίες που αλλάζουν τη σύσταση και τη δομή του τυριού και διαμορφώνουν τη γεύση και το άρωμά του. Οι κυριότερες λοιπόν βιοχημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση των τυριών είναι η πρωτεόλυση, λιπόλυση και η γλυκόλυση. Η πρωτεόλυση είναι ο κυριότερος δείκτης ωρίμανσης του τυριού και είναι ενδεικτικός της ποιότητας του τυριού.

Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την περίοδο της ωρίμανσης στο τυρί έτσι ώστε να προσδίδουν τα διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (άρωμα, γεύση, υφή) σε αυτό, εξαρτώνται από το ποσοστό υγρασίας, την ποσότητα του αλατιού, το pH καθώς και η μικροβιακή χλωρίδα του τυριού. Τέλος, η δημιουργία του κάθε είδους τυριού εξαρτάται και από το είδος του γάλακτος (αγελαδινό, γίδινο, πρόβειο), τη χημική σύσταση αυτού, την ατομικότητα του ζώου από το οποίο προέρχεται, τον τρόπο

και το είδος διατροφής αυτού, τον τρόπο και τις συνθήκες συλλογής του γάλακτος (Ανυφαντάκης, 2004).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι βασικές πρώτες ύλες για την παραγωγή τυριών είναι: το γάλα, τα πηκτικά ένζυμα (πυτιά και υποκατάστατα αυτής), οξυγαλακτική καλλιέργεια, αλάτι και πρόσθετες ύλες (χρωστικές, προσθετικά, συντηρητικά).

Η περίοδος της δημιουργίας του πρώτου πήγματος ορίζεται ως η χρονική διάρκεια των 24 πρώτων ωρών κατά τις οποίες διενεργούνται συγκεκριμένες εργασίες όπως το αλάτισμα, η αφυδάτωση κ.α. που αποτελούν τα βασικά βήματα μιας τυροκόμησης, ανεξάρτητα από τον τύπο τυριού που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Επομένως, σε αυτές τις εργασίες συνήθως εντάσσονται: η οξίνιση, η δημιουργία πήγματος, η αφυδάτωση αυτού (αυτή επιτυγχάνεται με τον τεμαχισμό του πήγματος σε κύβους, την πίεση αυτού, την ανάπλαση αυτού, τη θέρμανσή του, το αλάτισμα αυτού καθώς και άλλους τρόπους που διευκολύνουν τη συναίρεση του πήγματος), η σχηματοποίηση του τυριού (με πίεση ή σε εκμαγείο) και τέλος το αλάτισμα του τελικού πήγματος. Με άλλα λόγια, η δημιουργία του πρώτου πήγματος του τυριού είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης κατά την οποία το λίπος και η καζεΐνη συμπυκνώνονται από 6 ως 12 φορές, ανάλογα με το είδος του τυριού (Fox *et al.*, 1999).

3. Η τυροκομία στην Ελλάδα

Η γαλακτοκομία αποτελεί, σε παγκόσμιο επίπεδο, έναν από τους πιο σημαντικούς παραγωγικούς κλάδους. Όμως, η σημασία της δεν είναι η ίδια σε όλες τις χώρες. Υπάρχουν χώρες των οποίων η οικονομία στηρίζεται σε σημαντικό βαθμό στην παραγωγή, μεταποίηση και εμπορία του γάλακτος και των προϊόντων του και άλλες για τις οποίες ο κλάδος αυτός δεν έχει αξιόλογη οικονομική σημασία. Εκείνο όμως που έχει σημασία είναι ότι με την εξέλιξη της επιστήμης και της διατροφής του ανθρώπου και της σχετικής ενημέρωσης των καταναλωτών αναδεικνύεται ακόμη περισσότερο η διατροφική αξία του γάλακτος και των προϊόντων του, γεγονός που δημιουργεί θετικές προοπτικές για το μέλλον της παγκόσμιας γαλακτοκομίας (Ανυφαντάκης 2004).

Χαρακτηριστικό της ελληνικής γαλακτοπαραγωγής είναι η μεγάλη συμβολή του πρόβειου και γίδινου γάλακτος στη διαμόρφωση της συνολικής γαλακτοπαραγωγής, κάτι που δεν συμβαίνει σε καμία άλλη χώρα (Ανυφαντάκης 2004). Η Ελλάδα είναι μία χώρα με μεγάλη παράδοση στην κτηνοτροφία και ειδικότερα στην εκτροφή μικρών μηρυκαστικών (πρόβατα και αίγες), κατεύθυνση η οποία βοήθησε στο να δημιουργηθεί μία τυροκομία προσαρμοσμένη στις συγκεκριμένες πρώτες ύλες (αιγοπρόβειο γάλα) και στις ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής. Οι μέθοδοι κατεργασίας του αιγοπρόβειου γάλακτος έχουν δημιουργηθεί μέσα από το πέρασμα των αιώνων και συντελούν στη δημιουργία μίας ομάδας τυριών (Αποστολόπουλος και Φωτόπουλος, 1999).

Η τυροκομία στην Ελλάδα αποτελεί έναν παραδοσιακό τομέα δραστηριότητας, ο οποίος τα τελευταία χρόνια εκσυγχρονίζεται και αναδιοργανώνεται αποκτώντας βιομηχανικό χαρακτήρα με την είσοδο μεγάλων βιομηχανιών γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Περίπου το 75% της ελληνικής γαλακτοπαραγωγής μεταφέρεται στις γαλακτοβιομηχανίες για επεξεργασία. Στα τυροκομεία και στις γαλακτοβιομηχανίες παράγονται διάφορα προϊόντα τα οποία διατίθενται σχεδόν αποκλειστικά στην ελληνική αγορά, με εξαίρεση κάποιες μικρές ποσότητες τυριών που εξάγονται (Ανυφαντάκης 2004).

Ο κλάδος της τυροκομίας στην Ελλάδα είναι αρκετά ανεπτυγμένος και ένας από τους λόγους είναι ότι το τυρί είναι ιδιαίτερα αγαπητό στους Έλληνες καταναλωτές. Το πρόβειο και το γίδινο γάλα χρησιμοποιείται στη Ελλάδα για τυροκόμηση, σε ποσοστό

περίπου 85% και 70%, αντίστοιχα. Κατά το έτος 2001 παράχθηκαν συνολικά στη χώρα μας (βιομηχανίες και κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις) περί τούς 229.491 τόνους τυριών από τους οποίους υπολογίζεται περίπου ότι το 90% προέρχεται από αιγοπρόβειο γάλα και μόνο το 10% από αγελαδινό, γεγονός που αποδεικνύει τη σημαντική σημασία του πρώτου για την ελληνική τυροκομία (Ανυφαντάκης 2004). Αύξηση με μέσο ετήσιο ρυθμό μεταβολής της τάξης του 3% παρουσιάζει η παραγωγή τυροκομικών από τις βιομηχανικές επιχειρήσεις την τελευταία πενταετία, ενώ οι εξαγωγές του κλάδου παρουσίασαν μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 5,3% (σε όγκο) την πενταετία 2007 – 2011. Το δε τελευταίο έτος ανήλθαν στα υψηλότερα επίπεδα της τελευταίας 20ετίας. Τα περιθώρια αύξησης που παρουσιάζουν είναι σημαντικά, δεδομένης της υψηλής παραγωγικής δυναμικότητας των επιχειρήσεων (www.icap.gr). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η ετήσια κατανάλωση τυριών στην Ελλάδα ανέρχεται στα 24 κιλά ανά άτομο από τα οποία τα 12 κιλά αντιστοιχούν στο τυρί Φέτα (Ανυφαντάκης 2004).

4. Ταξινόμηση τυριών

Ο κλάδος της τυροκομίας περιλαμβάνει πολλά είδη τυριών που έχουν κατασκευαστεί με διαφορετικές τεχνολογίες και από διαφορετικές πρώτες ύλες, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ταξινόμηση τους. Το πρόβλημα εντείνεται από το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό κοινά κριτήρια από τις διάφορες χώρες. Πολλά προϊόντα είναι δυνατόν να ταξινομηθούν με διαφορετικό τρόπο από χώρα σε χώρα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο παρελθόν, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να κατατάξουν τα περίπου 2000 είδη τυριών σε κάποιες κατηγορίες σύμφωνα με κάποια κοινά χαρακτηριστικά τους.

Η ταξινόμηση των τυριών μπορεί να γίνει βάση ορισμένα κριτήρια όπως η συνεκτικότητα, η υγρασία, η εμφάνιση, η λιποπεριεκτικότητα, το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους, ο χρόνος ωρίμανσης και ο τρόπος παρασκευής τους. Καθένα από αυτά τα χαρακτηριστικά, μπορεί να αποτελέσει διαφορετικό κριτήριο ταξινόμησης, που είναι απαραίτητο ώστε να γίνει καλύτερη η ομαδοποίησή τους (Γαζέλας *et al.*, 1992).

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (Κ.Τ.), άρθρο 83, κατατάσσει τα τυριά, με βάση την πρώτη ύλη από την οποία παρασκευάζονται, σε δύο μεγάλες κατηγορίες, από γάλα και από τυρόγαλα. Τα τυριά από γάλα διακρίνονται περαιτέρω, με κριτήριο την ωρίμανση, σε αυτά που ωριμάζουν και σε αυτά που δεν ωριμάζουν και έχουν αλοιφώδη υφή. Όσα ωριμάζουν κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες, πολύ σκληρά, σκληρά, ημίσκληρα και μαλακά, τα οποία επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση σε τέσσερις ποιότητες (εξαιρετική, πρώτη, δεύτερη και μερικώς αποβουτυρωμένη) ανάλογα με την υγρασία και την λιποπεριεκτικότητά τους. Τα τυριά που δεν ωριμάζουν έχουν αλοιφώδη υφή και επιτρέπεται να διατίθενται για κατανάλωση στις παραπάνω ποιότητες (Ανυφαντάκης, 2004).

Η υγρασία αποτελεί κριτήριο κατάταξης των τυριών, ωστόσο τα όρια που προτείνονται για να χαρακτηριστεί ένα τυρί μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό δεν είναι πάντα τα ίδια (Ανυφαντάκης, 2004).

Ο Davis (1965) κατατάσσει τα τυριά σύμφωνα με την υγρασία τους, παρέχει όμως επιπλέον πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά ης τεχνολογίας κάθε κατηγορίας και για την διατηρησιμότητά τους. Συγκεκριμένα τα κατατάσσει σε:

- Μαλακά τυριά (Quarg, Cottage, Cream). Κατακρατούν στη μάζα τους σημαντική ποσότητα τυρογάλακτος και η τελική τους υγρασία κυμαίνεται από 40% και πάνω. Καταναλίσκονται σε λίγες μέρες μετά την παρασκευή τους, αν δεν ωριμάσουν ή σε λίγες εβδομάδες αν υποστούν ωρίμανση. Τα κύρια χαρακτηριστικά της τεχνολογίας τους είναι:
 - ✓ Πήξη του γάλακτος με λίγη ή χωρίς καθόλου πυτιά.
 - ✓ Χαμηλή θερμοκρασία πήξης.
 - ✓ Ατελής ή καθόλου διαίρεση του τυροπήγματος.
 - ✓ Ελάχιστη ή καθόλου αναθέρμανση του τυροπήγματος.
 - ✓ Στράγγιση με τη βαρύτητα, που διαρκεί συνήθως 1-2 μέρες.
 - ✓ Καμία εφαρμογή πίεσης κατά την δημιουργία τους.
 - ✓ Ανάπτυξη υψηλής οξύτητας ως συνέπεια της διατήρησης στο τυρόπηγμα αξιόλογης ποσότητας τυρογάλακτος. (Αυτό δεν ισχύει για τα τυριά αυτού του τύπου, των οποίων το τυρόπηγμα υφίστανται έκπλυση, π.χ. Cottage).
 - ✓ Ανάπτυξη αρώματος γαλακτικής ζύμωσης.
 - ✓ Πολύ περιορισμένη πρωτεόλυση ή/και λιπόλυση.
- Ημισκληρα τυριά (Taleggio, Limburg, Romadur). Η υγρασία τους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 36-40% και καταναλώνονται μέσα σε 2-3 μήνες από την παρασκευή τους. Τα κύρια χαρακτηριστικά των τυριών αυτών είναι:
 - ✓ Πήξη του γάλακτος με πυτιά.
 - ✓ Μέτρια θερμοκρασία πήξης.
 - ✓ Μέτρια διαίρεση του πήγματος.
 - ✓ Αναθέρμανση του πήγματος για βραχύ χρονικό διάστημα σε μέτριες θερμοκρασίες.

- ✓ Εφαρμογή μέτριας πίεσης στα τυριά κατά την παρασκευή τους.
 - ✓ Ταχεία ωρίμανση.
 - ✓ Άρωμα πλούσιο και καμία φορά έντονο.
- Σκληρά τυριά (Cheddar, Cheshire, Cantal, Emmental). Η υγρασία κυμαίνεται μεταξύ 25-36% και είναι η πιο διαδεδομένη κατηγορία στην παγκόσμια παραγωγή τυριών. Κύρια χαρακτηριστικά τους είναι:
 - ✓ Πήξη του γάλακτος με πυτιά.
 - ✓ Μέτρια θερμοκρασία πήξης και με κάποιο βαθμό οξίνισης του γάλακτος.
 - ✓ Διαίρεση του πήγματος σε μικρούς κόκκους.
 - ✓ Αναθέρμανση του τυροπήγματος σε υψηλή θερμοκρασία με παρατεταμένη και έντονη ανάδευση του στο τυρόγαλα.
 - ✓ Εφαρμογή υψηλής πίεσης στα νωπά τυριά για 1-3 μέρες.
 - Πολύ σκληρά τυριά (Grana, Parmesan). Το ποσοστό υγρασίας τους κυμαίνεται περίπου στο 25% και χαμηλότερα. Ωριμάζουν πολύ πιο αργά όλες τις προηγούμενες κατηγορίες και διατηρούνται περισσότερο. Με την πάροδο του χρόνου δεν επηρεάζονται άμεσα, απλώς θα πρέπει να σημειωθεί ότι γίνονται πιο σκληρά, πιο ξηρά και με σκοτεινότερη απόχρωση. Κύρια χαρακτηριστικά τους είναι:
 - ✓ Διαίρεση του τυροπήγματος σε πολύ μικρούς κόκκους.
 - ✓ Αναθέρμανση σε πολύ υψηλή θερμοκρασία($\theta=52-58^{\circ}\text{C}$).
 - ✓ Παρατεταμένη ανάδευση του τυροπήγματος μετά την αναθέρμανση.
 - ✓ Χρησιμοποίηση συνήθως ειδικών ενζυμικών παρασκευασμάτων.

Ο Kosikowski (1982) ταξινομεί τα τυριά σύμφωνα με την υγρασία σε αυτά με πολύ υψηλή υγρασία (80-55%) (Cottage, Ricotta, Impastata, Neufchatel, Cream κ.λπ.), με υψηλή υγρασία (55-45%) (Mozzarella, Camembert, Pizza, Blue κ.λπ.), με μέση

υγρασία (45-34%) (Edam, Brick Swiss, Cheddar, Provolone κ.λπ.) και με χαμηλή υγρασία (34-13%) (Romano, Parmesan, Dry ricotta κ.λπ.).

Μία ακόμα κατάταξη προτάθηκε από τους Walter και Hagrove (1972), σύμφωνα με την οποία τα τυριά κατηγοριοποιούνται σε πολύ σκληρά τυριά που ωριμάζουν με βακτήρια (Parmesan, Romano κ.α), σε σκληρά τυριά που ωριμάζουν με βακτήρια, τα οποία μπορούν να σχηματίζουν στη μάζα του οπές (Emmental, Gryere) ή όχι (Cheddar, Granular), σε ημι-μαλακά τυριά που ωριμάζουν κυρίως με βακτήρια (Brick, Munster) ή με βακτήρια και μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στην επιφάνειά τους (Limburger, Trappist), σε μαλακά τυριά που ωριμάζουν (Bel Paese, Brie, Camembert) και που δεν ωριμάζουν (Cottage, Pot, Cream, Ricotta).

Ο οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), σε κοινή έκδοση το 2002, ταξινομούν τα τυριά με βάση το ποσοστό % της υγρασίας στο άνευ λίπους τυρί (MFFB) και το ποσοστό % της λιποπεριεκτικότητας στην ξηρά ουσία του τυριού (FDB) και τον τρόπο ωρίμανσής τους (πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Κατάταξη των τυριών με κριτήρια τη συνεκτικότητα, τη λιποπεριεκτικότητα και τον τρόπο ωρίμανσης (FAO/WHO, 2000).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΤΑΞΗΣ				
ΣΥΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ		ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ		ΤΡΟΠΟΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ
MFFB	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	FDB	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
<51%	ΠΟΛΥ ΣΚΛΗΡΟ	>60%	ΥΨΗΛΗΣ ΛΙΠΟΠ.	ΩΡΙΜΑΣΜΕΝΟ
49-56%	ΣΚΛΗΡΟ	45-60%	ΠΛΗΡΕΣ	ΩΡΙΜΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΜΥΚΗΤΕΣ
54-69%	ΗΜΙΣΚΛΗΡΟ	25-45%	ΜΕΣΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡ.	ΩΡΙΜΑΣΜΕΝΟ ΣΕ ΑΛΜΗ
>67%	ΜΑΛΑΚΟ	10-25%	ΧΑΜΗΛΗΣ ΛΙΠ.	ΧΩΡΙΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗ / ΦΡΕΣΚΟ
		<10%	ΑΠΑΧΟ	

Ο υπολογισμός των MFFB και FDB γίνεται με βάση τους παρακάτω τύπους.

MFFB= Βάρος υγρασίας στο τυρί / (Συνολικό βάρος τυριού - Βάρος λίπους στο τυρί) * 100

FDB= Λιποπεριεκτικότητα του τυριού / (Συνολικό βάρος τυριού - Βάρος υγρασίας στο τυρί) * 100

5. Τυριά άλμης

Ως τυριά άλμης χαρακτηρίζονται τα τυριά, τα οποία ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη από τον παραγωγό μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή. Γενικά, χαρακτηρίζονται από τα εξής χαρακτηριστικά (Abd El-Salam and Alichanidis, 2004):

- Τυριά χωρίς ‘‘επιδερμίδα’’, που παρασκευάστηκαν σε διάφορα σχήματα και μεγέθη αλλά συνήθως σε τεμάχια μικρότερα του 1 kg.
- Ξινή και αλμυρή γεύση όταν είναι φρέσκα. Τα πιο ώριμα τυριά έχουν δριμεία πικάντικη γεύση.
- Το τυρί και η άλμη έχουν υψηλό ποσοστό άλατος, που διατηρεί την καλή ποιότητα σε θερμές κλιματικές συνθήκες.
- Λευκό χρώμα, που προέρχεται από την χρησιμοποίηση του πρόβειου, κατσικίσιου ή βουβαλίσιου γάλακτος για την παρασκευή τους. Όταν χρησιμοποιείται αγελαδινό γάλα για την παρασκευή τυριού που ωριμάζει σε άλμη, χρησιμοποιούνται μέθοδοι αποχρωματισμού του λίπους του αγελαδινού γάλακτος, ώστε να αποκτηθεί το επιθυμητό λευκό χρώμα.
- Οι μεταβολές στη σύνθεση και ιδιότητες του τυριού κατά την ωρίμανση αλληλοσχετίζονται με αυτές στην άλμη.
- Οι περισσότερες παραλλαγές της ομάδας αυτής των τυριών αποθηκεύονται σε σφραγισμένους περιέκτες αλλά κάποιες άλλες αποθηκεύονται σε περιέκτες διαπερατούς στον αέρα, το οποίο επηρεάζει τις βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση.

Τα τυριά άλμης χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα μαλακά (με ποσοστό υγρασίας 55 – 65 %) και τα ημίσκληρα (με ποσοστό υγρασίας 45 – 55 %). Τα μαλακά τυριά άλμης χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, αυτά που πήζουν παρουσία οξέων (όπως το Αιγυπτιακό Mish) και σε αυτά που πήζουν με την συμβολή της πυτιάς. Η δεύτερη υποκατηγορία αποτελείται από τα τυριά στα οποία γίνεται αλάτισμα του πήγματος (όπως η Ελληνική Φέτα, το Ρουμάνικο Teleme, το Brinza από Ρωσία και Ισραήλ, το Bill-sir-U-kriskama από την Σερβία, το Bjalo ή Belo Samurreno sirene από την Βουλγαρία, το Beyaz peynir από την Τουρκία, το Akawi από την Συρία, το Baida από τον Λίβανο και το Ιρανικό λευκό τυρί) και από αυτά στα οποία γίνεται αλάτισμα

του γάλακτος του τυριού (όπως τα Αιγυπτιακά Domiati, Dani και το Gibna bayda από το Σουδάν). Στα ημίσκληρα τυριά άλμης ανήκουν το Κυπριακό Χαλούμι, τα Braided Meddafara και Magdula από Συρία και Σουδάν και το Nabulsi από την Ιορδανία (Abd El-Salam and Alichanidis, 2004).

6. Η Φέτα

6.1. Ορισμός και περιγραφή της Φέτας

Η προέλευση της ονομασίας «φέτα» σχετίζεται κατά μια εκδοχή με τον τρόπο κατανάλωσης του τυριού. Προέρχεται από την ιταλική λέξη «Fetta», που σημαίνει λεπτό τεμάχιο, και εδραιώθηκε στην Ελλάδα κατά τον 17ο αιώνα (Απόφαση Ευρωπαϊκού Δικαστηρίου 25ης Οκτωβρίου 2005), όταν μεγάλα τμήματα της σημερινής Ελλάδας βρισκόταν κάτω από την Ενετική κυριαρχία (Abd El-Salam *et al.*, 1994).

Σύμφωνα με μια άλλη εκδοχή, η ονομασία «φέτα» σχετίζεται με τον τρόπο συσκευασίας του τυριού στα βαρέλια. Τα τεμάχια της φέτας είχαν σχήμα φέτας καρπουζιού για να ταιριάζουν μέσα στα βαρέλια αποθήκευσης (Ζερφυρίδης, 2001). Η ονομασία «φέτα» αντικατέστησε άλλες ονομασίες όπως «τουλουμοτύρι, βλαχοτύρι, κ.α» που χρησιμοποιούνταν για το παραγόμενο λευκό τυρί άλμης εκείνης της εποχής, πρόδρομο της σημερινής φέτας (Βάκρου *et al.*, 1999).

Σύμφωνα με την Ελληνική και την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, η παραδοσιακή φέτα είναι μαλακό λευκό τυρί άλμης που παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα στο οποίο μπορεί να έχει προστεθεί αίγιο μέχρι ποσοστού 30% σε οριοθετημένη με νόμο περιοχή της Ελλάδας. Το γάλα προέρχεται ζώα, που βόσκουν παραδοσιακά σε βοσκότοπους πλούσιους σε βλάστηση και τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις φυσικές συνθήκες της περιοχής. Πρέπει να είναι πλήρες σε λιπαρά, ώστε η λιποπεριεκτικότητα να υπερβαίνει το 6%, η οξύτητα να είναι μικρότερη από 0,25% σε γαλακτικό οξύ και το pH να είναι τουλάχιστον 6,5. Το γάλα μπορεί να τυροκομηθεί εντός 48 ωρών από την άμελξή του και μέχρι τη χρήση του πρέπει να παραμένει υπό ψύξη. Δεν επιτρέπεται η συμύκνωση του γάλακτος καθώς και η χρήση γάλακτος σε σκόνη, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, συντηρητικών και χρωστικών ουσιών.

6.2. Η Φέτα ως τυρί Π.Ο.Π.

Τυρί ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) ή αλλιώς PDO (Protected Designation of Origin) μπορεί να χαρακτηριστεί το τυρί που παράγεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή μιας χώρας, από γάλα που παράγεται μόνο στην περιοχή αυτή και η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον που περιλαμβάνει φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες. Η ιδέα να προστατεύονται και να διατηρούνται τα παραδοσιακά προϊόντα της κάθε περιοχής είναι αρκετά παλιά και χρονολογείται από το 1883, οπότε η συνθήκη του Παρισιού πρότεινε τον όρο *Appellation d'Origine Contrôlée* (AOC, Ονομασία ελεγχόμενης προέλευσης), όρος που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα από τους Γάλλους (Bertozzi and Panari, 1993). Αυτή η ιδέα διαδόθηκε σε όλη την Ευρώπη και ο όρος AOC αντικαταστάθηκε από τον όρο PDO. Ο FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World and Health Organization) έχει δημοσιεύσει πρότυπα για πολλά είδη τυριών σε διάφορες εκδόσεις του Κώδικα περί Προτύπων Ποιότητας για Τυριά ως μέλος του FAO/WHO Κώδικα Τροφίμων (www.codexalimentarius.net).

Η Φέτα κατέχει σημαντική θέση στο διεθνές εμπόριο. Για να καλυφτεί η ζήτηση του τυριού αυτού, άρχισαν να παράγονται σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης, μεγάλες ποσότητες τυριού άλμης από αγελαδινό γάλα, που χαρακτηριζόταν ως Φέτα, με τεχνολογία όμως που διέφερε από την παραδοσιακή.

Το 1994 γίνεται σημαντική προσπάθεια για την κατοχύρωση της Φέτας ως Ελληνικού προϊόντος και τον Οκτώβριο του 2002 (ΕΚ 1829/2002) η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εξέδωσε ρύθμιση που επιβάλλει την παραγωγή Φέτας από την Ελλάδα. Ωστόσο το ζήτημα διευθετήθηκε οριστικά μόλις τον Οκτώβριο του 2005 στο Ευρωπαϊκό Δικαστήριο, έπειτα από προσφυγή της Δανίας και της Γερμανίας με την υποστήριξη της Γαλλίας και της Μεγάλης Βρετανίας, και η Φέτα χαρακτηρίστηκε τελικά ως Ελληνικό ΠΟΠ τυρί.

Για να προστατεύεται ως Π.Ο.Π μια παραδοσιακή ονομασία όπως η «Φέτα», η οποία δεν αποτελεί όνομα μιας περιοχής, ενός τόπου ή μιας χώρας, πρέπει να περιγράφει ένα γεωργικό προϊόν ή τρόφιμο που κατάγεται από ένα οριοθετημένο γεωγραφικό περιβάλλον, το οποίο περιλαμβάνει ιδιαίτερους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και είναι ικανό να προσδώσει σ' αυτό το γεωργικό προϊόν ή τρόφιμο τα ειδικά χαρακτηριστικά του.

Η γεωγραφική ζώνη την οποία οριοθετεί η Ελληνική νομοθεσία περιλαμβάνει αποκλειστικά το έδαφος της Μακεδονίας, της Θράκης, της Ηπείρου, της Θεσσαλίας, της Στερεάς Ελλάδας, της Πελοποννήσου και του Νομού Λέσβου. Επιπλέον, έστω και αν η παραγωγή φέτας σε άλλα κράτη πλην της Ελλάδας είναι σχετικά σημαντική και έχει διαρκέσει επί ικανό χρονικό διάστημα (στη Γαλλία από το 1931, στη Δανία από τη δεκαετία του 1930 και στη Γερμανία από το 1972), η παραγωγή φέτας εξακολουθεί να είναι συγκεντρωμένη στην Ελλάδα, η οποία αντιπροσωπεύει το 85% της κοινοτικής ετήσιας κατανάλωσης κατ' άτομο (Κ.Τ.Π., 1998).

6.3. Τεχνολογία και στάδια παρασκευής της Φέτας

Η Φέτα παρασκευάζεται στη χώρα μας είτε σε μικρά οικογενειακής μορφής τυροκομεία, που εφαρμόζεται η παραδοσιακή τεχνολογία είτε σε βιομηχανικές μονάδες με σύγχρονο εξοπλισμό, οι οποίες σέβονται πάντοτε τις βασικές αρχές της παραδοσιακής τεχνολογίας του τυριού (Ανυφαντάκης, 1998).

Παραδοσιακά, η πήξη του γάλακτος για την παρασκευή της Φέτας γινόταν κυρίως με η χρήση πυτιάς που έφτιαχναν οι ίδιοι οι τυροκόμοι από στομάχια αρνιών και μικρών κατσικιών τα οποία σφάζονταν πριν απογαλακτιστούν. Η κύρια αιτία γι' αυτό ήταν το γεγονός ότι οι μικρές οικογενειακές επιχειρήσεις, διασκορπισμένες σε δυσπρόσιτες ορεινές και ημιορεινές περιοχές, δεν ήταν εύκολο να προμηθευτούν και να διατηρήσουν πυτιές του εμπορίου. Επιπλέον, η πυτιά που παράγεται από τα στομάχια των αρνιών και των μικρών κατσικιών, γνωστή ως παραδοσιακή πυτιά, θεωρείται ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός πολύ ευχάριστου αρώματος και μίας πιπεράτης γεύσης, η οποία επιζητείται από ένα μεγάλο μέρος των Ελλήνων καταναλωτών (Ανυφαντάκης, 1998).

Σήμερα, που υπάρχουν πολλά μεγάλα τυροκομεία, η παραδοσιακή πυτιά έχει μερικώς ή πλήρως υποκατασταθεί από την πυτιά του εμπορίου. Αυτό που χρησιμοποιείται συχνά στην πράξη είναι ένα μίγμα δύο ειδών πυτιάς με σχέση 1:3 (παραδοσιακή/ εμπορίου) ή αμιγής πυτιά εμπορίου (Ανυφαντάκης, 1998). Έχει αποδειχτεί ότι η παραδοσιακή πυτιά περιέχει τα ίδια ένζυμα με αυτή του εμπορίου αλλά η περιεκτικότητά σε ρεννίνη είναι υψηλότερη (Ανυφαντάκης και Green, 1980).

Παραδοσιακά η Φέτα παρασκευαζόταν από απαστερίωτο γάλα, σε μικρές οικογενειακές εκμεταλλεύσεις με στοιχειώδη εξοπλισμό. Η πρακτική αυτή, όταν το γάλα δεν ήταν καλής ποιότητας, οδηγούσε συνήθως στην παρασκευή τυριού με πολλές μικρές τρύπες που πολλές φορές δεν ήταν εμπορεύσιμο. Ο κίνδυνος ενός τέτοιου προβλήματος αυξανόταν σε εποχές με υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Ανυφαντάκης,1998).

Σήμερα η κατάσταση έχει αλλάξει. Το μεγαλύτερο μέρος της Φέτας παράγεται από παστεριωμένο γάλα σε καλά οργανωμένες τυροκομικές μονάδες. Το γάλα που χρησιμοποιείται κατά την τυροκόμηση πρέπει να είναι άριστης ποιότητας. Πρέπει να είναι απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) και να φέρει χαμηλούς πληθυσμούς από ψυχρότροφους μικροοργανισμούς που μπορεί να προκαλέσουν ελαττώματα και αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν. Το γάλα πρέπει να προέρχεται από υγιή ζώα, να συλλέγεται και να διακινείται κάτω από υγιεινές συνθήκες, να μην επιμολύνεται και να ψύχεται γρήγορα (Limsowtin, 1992). Αμέσως μετά την άμελξή του πρέπει να ψύχεται σε θερμοκρασία μικρότερη των 7°C και να χρησιμοποιείται κατά το δυνατό γρηγορότερα. Έτσι παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών και με τη γρήγορη χρησιμοποίησή του, περιορίζεται και η ανάπτυξη ψυχρότροφων βακτηρίων, τα οποία παράγουν θερμοανθεκτικές λιπάσες και πρωτεάσες, οι οποίες δεν αδρανοποιούνται κατά την παστερίωση. (Dumont *et al.*, 1977, Fairbairn and Law, 1986, Griffiths, 1989, Banks, 1990). Επίσης αποφεύγονται οι μεταβολές στις φυσικοχημικές του ιδιότητες όπως διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, διαχωρισμός των μικκυλίων των καζεϊνών κ.ά. (Ali *et al.*, 1980a, 1980b).

Επίσης, το προς τυροκόμηση γάλα δεν πρέπει να περιέχει κατάλοιπα αντιμικροβιακών, αντιπαρασιτικών ουσιών, φυτοφαρμάκων και ορμονών, μυκοτοξινών, πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCB's), πολυχλωριωμένων διβενζοδιοξινών (PCDD) και φουρανίων (Fs), νιτροζαμινών, βαρέων μετάλλων, απορρυπαντικών και απολυμαντικών, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις ανώτερες επιτρεπτές. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να επηρεάσουν άμεσα την υγεία του ανθρώπου, ενώ ορισμένα από αυτά (π.χ. αντιμικροβιακά) επηρεάζουν την πορεία της τυροκόμησης και της ωρίμασης του τυριού, επιβραδύνοντας ή αναστέλλοντας την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Anifantakis, 1980, Schiffmann *et al.*, 1992).

Επιπλέον, σήμερα χρησιμοποιούνται εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες. Διάφορες οξυγαλακτικές καλλιέργειες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία (Βεϊνόγλου *et al.*, 1979). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται στην παραγωγή της Φέτας συμπυκνωμένες κατεψυγμένες ή λυοφιλωμένες καλλιέργειες που παράγουν εργαστήρια του εξωτερικού, οι οποίες προστίθενται χωρίς καμία ιδιαίτερη προετοιμασία στο γάλα της τυροκόμησης (Ανυφαντάκης,1998).

Αυτό που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την ποιότητα της Φέτας, δεν είναι μόνο η επιλογή της κατάλληλης καλλιέργειας αλλά επίσης η αναλογία στην οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, το πόσο χρόνο πριν την πυτιά πρέπει να προστεθεί στο γάλα καθώς επίσης και η θερμοκρασία πήξης. Όλοι οι παράγοντες πρέπει να συνδυαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλιστεί ο κατάλληλος ρυθμός αύξησης της οξύτητας. Σε περιπτώσεις γάλακτος με υψηλή οξύτητα ή όταν ο καιρός είναι πολύ ζεστός προτιμώνται χαμηλότερες θερμοκρασίες πήξης. Αντίθετα, όταν το γάλα είναι πολύ φρέσκο ή όταν ο καιρός είναι κρύος, οι θερμοκρασίες πήξης πρέπει να είναι υψηλότερες. Γενικά, η πήξη του γάλακτος σε χαμηλές θερμοκρασίες (< 30 °C) οδηγεί σε μαλακότερο τυρί, το οποίο τρίβεται κατά το αλάτισμα και τη συσκευασία και έχει επίσης ένα μεγάλο ποσοστό υγρασίας (Ανυφαντάκης,1998).

Όσον αφορά τα στάδια παραγωγής της Φέτας, αρχικά πραγματοποιείται παστερίωση στους 72°C για 15sec ή στους 63-65°C για 30 min. Στα μεγάλα τυροκομεία, το γάλα, συνήθως τυποποιείται ως προς το λίπος, πριν την παστερίωση. Μετά τη θερμική επεξεργασία, ακολουθεί η μείωση της θερμοκρασίας στους 32-34°C και ενοφθαλμίζεται με οξυγαλακτική καλλιέργεια, που συνήθως είναι εκείνη της γαιούρης (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), σε ποσοστό 0,3-0,5%. Το γάλα αφήνεται σε επώαση για 15-30 min (pH 6,2-6,3) και ακολούθως προστίθεται χλωριούχο ασβέστιο (200 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου 40% ανά 100 λίτρα γάλακτος) και πυτιά, η οποία προκαλεί πήξη του γάλακτος σε 45-50 min (η θερμοκρασία πήξης πρέπει να είναι πάνω από 30°C).

Μετά την πήξη το τυρόπηγμα κόβεται σε κύβους ακμής 2-3cm και παραμένει σε ηρεμία για 5-10 min ώστε να αποβάλει μέρος του ορού και να γίνει πιο σταθερό. Κατόπιν μεταφέρεται σε καλούπια με σχισμές, μεταλλικά ή πλαστικά, που επιτρέπουν τη στράγγιση του τυροπήγατος. Τα καλούπια, με το τυρόπηγμα, αναστρέφονται κατά διαστήματα και μετά από 2-3 ώρες μεταφέρονται σε θερμοκρασία 14-18 °C μέχρι να ολοκληρωθεί η στράγγιση (για 5-6 ώρες). Όταν το τυρόπηγμα έχει γίνει αρκετά

συμπαγές αφαιρείται από τα καλούπια, κόβεται σε κομμάτια, ανάλογα με το δοχείο στο οποίο θα τοποθετηθεί, για να ολοκληρώσει την ωρίμαση και αλατίζεται με χονδρόκοκκο αλάτι. Η αλάτιση και η αναστροφή του τυροπήγματος γίνεται κάθε 12 ώρες περίπου και για 3-4 φορές. Το τυρί παραμένει στην τυροτράπεζα μετά το τέλος της αλάτισης για άλλες 24 ώρες. Στις μεγάλες τυροκομικές εγκαταστάσεις, το τυρόπηγμα δεν τοποθετείται σε τυροτράπεζες αλλά στα δοχεία όπου θα συνεχιστεί η ωρίμαση, σε 3-4 στρώματα όπου αλατίζεται και αναστρέφεται (Anifantakis, 1991).

Μετά από 1-2 εβδομάδες παραμονής στα δοχεία, γίνεται έλεγχος της στάθμης της άλμης, συμπληρώνονται τα κενά με άλμη 5-7%. Τα δοχεία ανοίγονται κατά περιόδους, για να φύγει το αέριο που πιθανόν σχηματίζεται κατά την ωρίμαση και γεμίζονται με άλμη εάν η στάθμη της έχει μειωθεί. Όταν το pH του τυριού φθάσει το 4,6-4,8 τα δοχεία μεταφέρονται σε ψυκτικό θάλαμο θερμοκρασίας 3-4 °C, όπου παραμένουν μέχρι το τέλος της ωρίμασης. Ο ελάχιστος χρόνος ωρίμασης ορίζεται σε 2 μήνες (Κ.Τ.Π., 1998).

Ο παραπάνω παραδοσιακός τρόπος παρασκευής της Φέτας, στις μεγάλες γαλακτοβιομηχανίες, έχει τροποποιηθεί κυρίως σε ότι αφορά την κοπή του τυροπήγματος, το γέμισμα των καλουπιών με το τυρόπηγμα, τον τρόπο στράγγισης και την αλάτιση, ώστε να ανταποκρίνεται στις ανάγκες μιας συνεχούς γραμμής παραγωγής. Τα βασικά, όμως, στάδια παραγωγής είναι σύμφωνα με την παραδοσιακή τεχνολογία (Κ.Τ.Π., 1998, Anifantakis, 1991a, 1991b, Μάντης, 2000). Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής παρασκευής της Φέτας (σχεδιάγραμμα 6.1) (ΕΦΕΤ, 2011).

Σχεδιάγραμμα 6.1: το διάγραμμα ροής παρασκευής της Φέτας (ΕΦΕΤ, 2011).

Παραλαβή/Ψύξη γάλακτος	
	Φυγοκέντρωση
Παστερίωση 72°C/15 δευτερόλεπτα ή 63°C/30 λεπτά	
	Ψύξη υπό ανάδευση στους 34 °C
Δεξαμενές πήξεως. Οξυγαλακτική καλλιέργεια Χλωριούχο ασβέστιο	
	Πυτιά - Πήξη
Διαίρεση πήγματος	
	Τοποθέτηση πήγματος σε καλούπια 1 ^ο αλάτισμα
Παραμονή - Στοίβαξη (2 ώρες)	
	Ανατροπή 2 ^ο αλάτισμα
Παραμονή (2 ώρες) - 2η ανατροπή. Παραμονή (20 ώρες)	
	Αποστοίβαξη - 3 ^ο αλάτισμα. Προσωρινή συσκευασία - παραμονή 2 ημέρες
Τελική συσκευασία - Προσθήκη παστεριωμένης άλμης	
	Ωρίμανση (θ 17-18 °C/5-15 ημέρες)
Ωρίμανση - Συντήρηση (θ ≤ 4 °C /2 μήνες)	
	Ανασυσκευασία ώριμου τυριού

6.4. Χημικές και μικροβιολογικές ιδιότητες της φέτας

Η μέση σύσταση δειγμάτων Φέτας από την Ελληνική αγορά βρέθηκε να είναι η ακόλουθη (Βασταρδής, 1989):

- Υγρασία 52,9%
- Λιπαρά 26,17%
- Ολική πρωτεΐνη 16,71%
- Λακτόζη 0,17%
- Χλωριούχο νάτριο 2,94%
- pH 4,41

Κατά την ωρίμανση της Φέτας, λαμβάνουν χώρα σημαντικές αλλαγές στην σύσταση και τις ιδιότητες του τυριού, οι οποίες συμβάλλουν πολύ στην ανάπτυξη των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζονται από πολλούς και διάφορους παράγοντες όπως η ποιότητα του γάλακτος, η θερμοκρασία παστερίωσης, οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες, η πυτιά, η θερμοκρασία ωρίμανσης κ.α. (Ανυφαντάκης, 1998).

Σύμφωνα με τον Βεϊνόγλου *et al.*, (1969), στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι αλλαγές στη σύσταση κατά την ωρίμανση της Φέτας η οποία παράγεται από παστεριωμένο πρόβειο γάλα με τη χρήση οξυγαλακτικών καλλιεργειών (πίνακας 6.1).

Πίνακας 6.1: Αλλαγές στη σύσταση της Φέτας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Βεϊνόγλου *et al.*, 1969)

Σύσταση (%)	Χρόνος ωρίμανσης						
	1	3	10	35	65	100	125
Υγρασία	61,17	59,10	54,40	55,01	55,16	53,80	51,60
Λακτόζη	3,24	2,12	1,88	1,32	0,75	0,00	0,00
Λίπος	20,14	21,66	24,60	23,75	23,66	24,85	25,60
Ολική Πρωτεΐνη	18,08	17,76	17,45	17,64	17,26	17,08	-
Τέφρα	1,06	1,49	1,03	1,21	1,23	0,91	0,94
CaO	0,53	0,51	0,61	0,59	0,62	0,65	0,71
NaCl	0,71	1,93	2,60	2,53	2,80	2,83	2,75

Από τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα, είναι φανερό πως αυτές οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα με σημαντικά ταχύτερο ρυθμό κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 περίπου ημερών της ωρίμασης, που συμπίπτει με τη μέγιστη ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του τυριού, ενώ στη συνέχεια όταν το τυρί τοποθετηθεί στο ψυγείο οι μεταβολές πραγματοποιούνται με πιο αργό ρυθμό (Abd El-Salam, 1987, Anifantakis, 1991a). Στη διάρκεια των πρώτων ημερών, η υγρασία του τυριού μειώνεται και αποκτά τιμές μικρότερες του 56%, όπου είναι το ανώτερο όριο για ώριμη Φέτα σύμφωνα με το Γενικό Χημείο του Κράτους (1988). Επίσης, περίπου το 50% της λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και άλλα συστατικά (Ανυφαντάκης, 1998).

Το ποσοστό λιποπεριεκτικότητας του τυριού αυξάνει επειδή μειώνεται η υγρασία. Παρ' όλα αυτά, δεν συμβαίνει το ίδιο στην περίπτωση των πρωτεϊνών, των οποίων ένα μέρος αποικοδομείται σε μικρότερα, υδατοδιαλυτά αζωτούχα συστατικά, που είναι μερικώς ανταλλάξιμα μεταξύ του τυριού και της άλμης στην οποία ωριμάζει. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της Φέτας μπορεί να αποδοθεί στην πυτιά που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του τυριού, στις πρωτεΐνες που παράγονται από την μικροχλωρίδα του τυριού, στη χλωρίδα που εμφανίζεται στην επιφάνειά του κατά τη στράγγιση και το αλάτισμα και στις ενδογενείς πρωτεΐνες του γάλακτος (Ανυφαντάκης, 1998).

Τα ελεύθερα αμινοξέα είναι συστατικά με μεγάλη σπουδαιότητα για το άρωμα της Φέτας. Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών συνεχώς αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Alichanidis *et al.*, 1981, Βουδούρης *et al.*, 1986). Πολύ σημαντικό στοιχείο είναι, όχι μόνο η ολική συγκέντρωση αυτών των συστατικών στο τυρί, αλλά επίσης και η συγκέντρωση καθενός ελεύθερου λιπαρού οξέος και ελεύθερου αμινοξέος ξεχωριστά όπως επίσης και η αναλογία τους.

Στο γάλα που τυροκομείται ανευρίσκεται ένα πλήθος μικροβιακών ομάδων που προέρχονται είτε από το γάλα είτε το επιμολύνουν κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης είτε ακόμα προστίθενται σ' αυτό ως οξυγαλακτική καλλιέργεια. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στους μικροβιακούς αυτούς πληθυσμούς. Οι μεταβολές αρχίζουν με την έναρξη της τυροκόμησης. Το γάλα είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, αποτελώντας έτσι ένα εξαιρετικό υπόστρωμα ανάπτυξης, για τα περισσότερα βακτήρια. Επίσης, οι θερμοκρασίες τυροκόμησης (32-34°C) καθώς και εκείνες της πρώτης φάσης ωρίμασης (14-18°C) των τυριών άλμης, είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Για αρκετούς

όμως από αυτούς, καθώς προχωρεί η ωρίμανση, το περιβάλλον του τυριού γίνεται δυσμενές για την ανάπτυξή τους. Έτσι λοιπόν, η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης και η επακόλουθη πτώση του pH, η μείωση της υγρασίας λόγω της στράγγισης, η αύξηση της συγκέντρωση άλατος, ο μικροβιακός ανταγωνισμός που ασκεί η οξυγαλακτική χλωρίδα κατά των υπόλοιπων μικροβιακών ομάδων και τέλος η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης προκαλούν μείωση των περισσότερων μικροβιακών πληθυσμών είτε παθογόνων είτε εκείνων που προκαλούν ελαττώματα ή αλλοιώσεις στα τυριά.

Η ολική αερόβια χλωρίδα, τα οξυγαλακτικά και τα πρωτεολυτικά βακτήρια αγγίζουν τα ανώτερα επίπεδά τους σε 5, 20 και 45 ημέρες αντίστοιχα. Μειώνονται στους 3 με 4 μήνες και μετά παραμένουν σταθερά. Τα λιπολυτικά μικρόβια παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση κατά την ωρίμανση και τη διατήρηση. Τα ψυχρότροφα βακτήρια παρουσιάζουν τα ανώτερα επίπεδά τους σε 5 έως 20 ημέρες και παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διατήρηση. Ο ζύμες είναι παρούσες στη φέτα σε μικρές ποσότητες καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης και επίσης κολοβακτηρίδια μπορεί να βρεθούν σε αμελητέες ποσότητες στο φρέσκο τυρί (Vaforoulou, *et al.*, 1989, Vaforoulou, *et al.*, 1990).

7. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε τους μικροοργανισμούς στην εμπειρική παρασκευή διαφόρων ζυμούμενων τροφίμων για πολλές χιλιάδες χρόνια. Παρά το γεγονός ότι δεν γνώριζε από την αρχή την ύπαρξή τους, γνώριζε πολύ καλά το αποτέλεσμα της δράσης τους. Έτσι η συντήρηση των τροφίμων με την βοήθεια της διαδικασίας της ζύμωσης είναι μία από τις παλαιότερες μεθόδους. Το 1875, ο Γάλλος βιοχημικός Louis Pasteur δημοσίευσε τα αποτελέσματα μίας έρευνας που αποδείκνυαν ότι οι ζυμώσεις είναι αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών και το 1878 ο Joseph Lister κατάφερε να απομονώσει το πρώτο βακτήριο που ήταν υπεύθυνο για την οξύνιση του γάλακτος. Έκτοτε ξεκίνησε μια προσπάθεια απομόνωσης και μελέτης διαφόρων μικροοργανισμών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή τροφίμων ζύμωσης.

Ένα τυπικό παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων μέσω της γαλακτικής ζύμωσης. Η μετατροπή του γάλακτος σε τυρί είναι, κατά πάσα πιθανότητα, ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος να αποθηκευτεί το γάλα σε μία πρακτική και εύγευστη μορφή. Η ζύμωση αυτή αποτελεί συνέπεια της παρουσίας μικροοργανισμών (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) καθώς και των ενζύμων τους στο γάλα (Tamime, 1990). Η μικροβιακή χλωρίδα συνεισφέρει τόσο στην συντήρηση όσο και στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τυριών. Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια φαίνεται να συμβάλλουν θετικά στην υγεία των καταναλωτών (Cogan *et al.*, 2007).

Σε παγκόσμιο επίπεδο τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid bacteria, LAB) συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία, με τη μέγιστη χρήση τους στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen 2002).

7.1. Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Ως "οξυγαλακτικές" χαρακτηρίζονται οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την πρόκληση ωφέλιμων ζυμώσεων στα τρόφιμα. Τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών, τα οποία διαθέτουν ορισμένες κοινές φυσιολογικές ιδιότητες. Το κύριο χαρακτηριστικό τους γνώρισμα, είναι ότι ζυμώνουν την λακτόζη σε γαλακτικό οξύ μέσω ομο- ή ετερο- ζυμωτικής οδού (Salminen and non Wright, 1998). Τα γαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, μη σπορογόνα, με χαμηλή αναλογία G + C (γουανίνης + κυτοσίνης) και προαιρετικά αναερόβια (Kandler and Weiss, 1986, Holzapfel *et al.*, 2001). Η ετερογένεια της ομάδας εμφανίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, καθώς εμφανίζονται ως ραβδία ή κόκκοι, μόνα τους ή σε συσσωματώματα, σε κοντές ή μακριές αλυσίδες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40 °C. Είναι ανθεκτικά στα οξέα (έχει σημειωθεί ανάπτυξη ορισμένων ειδών ακόμα και σε pH 3,5) και έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης στην όξινη περιοχή (5,0-7,0). Στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά.

Ο μεταβολισμός τους είναι αυστηρά ζυμωτικός και η παραγωγή του ATP πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος και ATPσών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Law 1997). Χρησιμοποιούν τα σάκχαρα ως πηγή άνθρακα και κυρίως τη λακτόζη και τη γλυκόζη, για την παραγωγή ενός αριθμού προϊόντων με κυριότερο το γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικά) ή το γαλακτικό οξύ, το CO₂, την αιθανόλη και το οξικό οξύ (ετεροζυμωτικά).

Το περιβάλλον του τυριού κατά το στάδιο της ωρίμανσης, αποτελεί ένα εχθρικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς, καθώς χαρακτηρίζεται, σε γενικές γραμμές, από την παρουσία άλατος σε υψηλά επίπεδα (4,0-6,0%), χαμηλής υγρασίας και θερμοκρασίας, σχετικά αναερόβιες συνθήκες, τιμή pH 4,9-5,3 και ανεπάρκεια θρεπτικών ουσιών (Turner *et al.*, 1986, Fox *et al.*, 1996, Stanton *et al.*, 1998). Οι συνθήκες αυτές είναι ικανές να αναχαιτίσουν την ανάπτυξη πολλών ομάδων μικροοργανισμών, εκτός από ορισμένα είδη γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία αντέχουν σε αυτές τις συνθήκες και αναπτύσσουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες (Peterson and Marshall, 1990).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη των *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity and Holt, 2001). Αποτελούν μία ομάδα βακτηρίων που επεκτείνεται ταχέως και επί του παρόντος περιλαμβάνει έξι οικογένειες και περίπου 40 γένη. Αυτά που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα ακόλουθα 11 γένη: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* και *Vagococcus* (Cogan, 1996).

Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες στη γαλακτοκομία ανήκουν κυρίως στα γένη: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Lactobacillus* και ονομάζονται διεθνώς starters (εκκινητές). Τα είδη των γενών *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus* είναι κόκκοι ενώ τα είδη του γένους *Lactobacillus* είναι βάκιλλοι (πίνακας 7.1). Τα 5 αυτά γένη εμφανίζουν τα γενικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμώνουν τα σάκχαρα με αναερόβια ζύμωση προς γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικά βακτήρια) ή γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO₂ (ετεροζυμωτικά βακτήρια). Παρά την έλλειψη συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, αρκετά είδη αναπτύσσονται αρκετά καλά παρουσία οξυγόνου και είναι αεροανεκτικά (Cogan, 1996).

Πίνακας 7.1: Οξυγαλακτικά βακτήρια

Ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια	Ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια
<p>Κόκκοι</p> <p><i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> <i>Lactococcus lactis ssp. lactis biov. diacetylactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus durans</i></p> <p>Βάκιλλοι</p> <p><i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei ssp. casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>Κόκκοι</p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> <i>Leuconostoc lactis</i></p> <p>Βάκιλλοι</p> <p><i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i></p>

Οι λακτόκοκκοι είναι κόκκοι, βρίσκονται σε μονάδες, ζεύγη ή σχηματίζουν αλυσίδες, συχνά αρκετά μακριές. Ζυμώνουν τα σάκχαρα ομοζυμωτικά παράγοντας L-γαλακτικό οξύ. Αναπτύσσονται στους 10°C αλλά όχι στους 45°C. Παρουσιάζουν καλύτερη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 28°C ή 21°C και σε pH περίπου 6,3 (Cogan, 1996). Στο γένος αυτό ανήκουν πέντε είδη: *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium*, *Lc. raffinolactis*. Το σημαντικότερο είδος για τη τυροκομία είναι ο *Lc. lactis* το οποίο υποδιαιρείται σε δύο υποείδη: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* και *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

Τα λευκονοστόκια είναι κόκκοι σε ζεύγη ή αλυσίδες και μερικές φορές έχουν ελλειψοειδές σχήμα. Μοιάζουν με τους λακτόκοκκους από τους οποίους διαφοροποιούνται γιατί ζυμώνουν τα σάκχαρα ετεροζυμωτικά και παράγουν κυρίως D-γαλακτικό οξύ παρά L. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 18°C έως 30°C. Στο γένος αυτό ανήκουν επτά είδη: *Leuc. oenos*, *Leuc. paramesenteroides*, *Leuc. citrum*, *Leuc. amelibiosum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. carnosum* και *Leuc. mesenteroides* που υποδιαιρείται σε τρία υποείδη τα: *mesenteroides*, *dextranicum* και *cremoris*. Από αυτά κυρίως το υποείδος *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* είναι αυτό που συμμετέχει σε οξυγαλακτικές καλλιέργειες και έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά για την παραγωγή λευκού τυριού άλμης (Tzanetakis *et al.*, 1995).

Από το γένος *Streptococcus* μόνο ο *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* χρησιμοποιείται στις οξυγαλακτικές καλλιέργειες. Πρόκειται για κόκκο, ο οποίος συνήθως διατάσσεται σε ζεύγη ή αλυσίδες που μερικές φορές είναι εξαιρετικά μακριές. Ζυμώνει τα σάκχαρα ομοζυμωτικά παράγοντας L-γαλακτικό οξύ. Αναπτύσσεται σε άριστη θερμοκρασία 45 °C. Ο *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* συμμετέχει στην καλλιέργεια για την παραγωγή Φέτας καθώς και γιαούρτης.

Τα είδη του γένους *Enterococcus* έχουν βρεθεί σε πολλά παραδοσιακά προϊόντα ζύμωσης (τυριά), σε μεγάλο πληθυσμό και θεωρείται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα τυριά. Από τα είδη του γένους *Enterococcus* οι *E. faecalis*, *E. faecium* και ο *E. durans* έχουν απομονωθεί από πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα (Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992, Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Τα είδη αυτά παράγουν γρήγορα οξύ, είναι αλατοάντοχα και αναπτύσσονται σε συγκέντρωση 6,5% NaCl. Αναπτύσσονται τόσο στους 10°C όσο και στους 45°C και σε pH 9,6. Είδη του γένους

Enterococcus έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές τυροκομήσεις τυριών άλμης (Litoroulou-Tzanetaki *et al.*, 1993, Tzanetakakis *et al.*, 1995).

Οι λακτοβάκιλλοι είναι μια μεγάλη ομάδα ραβδόμορφων βακίλλων, που το σχήμα τους ποικίλει από μακρύ και λεπτό, μερικές φορές κοίλο, έως κοντό, συχνά κορυνόμορφο ή σχήμα κοκκοβακίλου. Το γένος περιλαμβάνει 64 είδη. Διακρίνονται σε θερμοφίλους (αναπτύσσονται στους 45oC αλλά όχι στους 15oC) ή σε μεσόφιλους (αναπτύσσονται στους 15oC αλλά όχι στους 45oC) (Fox *et al.*, 1998). Οι λακτοβάκιλλοι που χρησιμοποιούνται στις εμπορικές οξυγαλακτικές καλλιέργειες είναι: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* και *Lb. helveticus*, οι οποίοι είναι θερμοφιλοί και παράγουν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες οξέος σε σχέση με τα υπόλοιπα οξυγαλακτικά βακτήρια. Άλλοι λακτοβάκιλλοι που έχουν βρεθεί σε παραδοσιακές οξυγαλακτικές καλλιέργειες είναι οι *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*. Τα είδη αυτά βρίσκονται και σε ώριμα τυριά. Οι λακτοβάκιλλοι είναι επίσης πολύ ανθεκτικοί σε χαμηλό pH, ακόμα και κάτω από 4,5. Ο *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* συμμετέχει στην οξυγαλακτική καλλιέργεια της γιαούρτης η οποία κυρίως χρησιμοποιείται στην παραγωγή της Φέτας. Επίσης, πολλά είδη του γένους αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί στις οξυγαλακτικές καλλιέργειες των τυριών άλμης.

Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται τα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα γαλακτοκομικά προϊόντα (πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.2: Χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα γαλακτοκομικά προϊόντα

<i>Εοδός μικροοργανισμού</i>	Μεταβολισμός	Θ°/ °C	Γαλακτικό οξύ	Ανάπτυξη σε αλάτι 4%	Κύρια μεταβολικά προϊόντα	Χρήση σε Γαλακ/μικά Προϊόντα
<i>Lc. lactis lactis</i>	OMO	30°C	L(+)	+	οξύ	Τυριά, κρέμα βούτυρο
<i>Lc lactis cremoris</i>	OMO	22-25°C	L(+)		Οξύ, πολυσακχ/τες	Τυριά, κρέμα βούτυρο
<i>Lc lactis diacetylactis</i>	OMO	28°C	L(+)	+	οξύ άρωμα	Τυριά, κρέμα βούτυρο
<i>Str. Thermophilus</i>	OMO	40°C	L(+)		οξύ	Σκληρά τυριά Mozarella, Γιαούρτη
<i>Leuc.mes cremoris</i>	ETEPO	20-25°C	D(-)		Άρωμα	Όξινη κρέμα, βούτυρο Cottage, roquefort
<i>Lb del bulgaricus</i>	OMO	40-45°C	D(-)		Οξύ, άρωμα	Τυριά, γιαούρτη, οξυγάλατα
<i>Lb acidophilus</i>	OMO	35-38°C	DL	+	οξύ	Ειδικά προϊόντα
<i>Lb casei casei</i>	OMO	30°C	L(+)		Θερμοάντοχο, ανθεκτικό αντιβιοτικά πρωτεολυτικό	Μαλακά και ημίσκληρα τυριά
<i>Lb helveticus</i>	OMO	40-42°C	DL	+	Οξύ,λεπτιδασική δράση	Ελβετικά και ημίσκληρα τυριά
<i>Propionibacterium shermanii</i>		20-25°C			Προπιονικό, οξικό, CO2	Ελβετικά τυριά

Το γένος *Bifidobacterium*, αν και φιλογενετικά ανήκει στο φύλο Ακτινοβακτηρια, εξετάζεται συνήθως με οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω στενής συγγένειας με αυτά όσον αφορά τις φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες, αλλά και γιατί απαντάται στα ίδια οικοσυστήματα, όπως για παράδειγμα το γαστρεντερικό σύστημα (Vandamme *et al.*, 1996).

7.2. Διαχωρισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων σε εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απαντώνται στα τυριά θα μπορούσαν πρακτικά να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τα εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (Starter Lactic Acid Bacteria, SLAB) και τα μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB).

Τα εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την καλλιέργεια εκκίνησης που προστίθεται αρχικά στο γάλα για να ξεκινήσει η ζύμωση. Είναι τα βακτήρια που παράγουν οξύ ικανό να προκαλέσει μείωση του pH του γάλακτος κάτω από το 5,3 σε 6 ώρες στους 30-37 °C και τα οποία κατά την παρασκευή των τυριών αναπτύσσονται σε πληθυσμούς της τάξης των 10^8 cfu/g μέσα σε λίγες ώρες. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μέλη των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus* (Beresford *et al.*, 2001).

Τα μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τυρί το 1912 (Cogan *et al.*, 2007) και χαρακτηρίζονται οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και οι πεδιόκοκκοι. Τα βακτήρια αυτά δεν προστίθενται ως μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης, διότι δεν διαθέτουν υψηλή ικανότητα οξίνισης, αλλά βρίσκονται τυχαία στο γάλα, όπου αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση του τυριού. Ο αριθμός τους στο τυρί, εξαρτάται από τον αρχικό πληθυσμό τους στο γάλα, και την επιμόλυνση του γάλακτος μετά την παστερίωση (Peterson and Marshall, 1990). Ως εκ' τούτου αποτελούν τις συμπληρωματικές καλλιέργειες (adjuncts). Ο κύριος ρόλος τους δεν είναι η παραγωγή οξέος από την λακτόζη, αλλά η αύξησης του ρυθμού πρωτεόλυσης με αποτέλεσμα την παραγωγή αρωματικών ενώσεων κατά την ωρίμανσή του τυριού. Η δράση αυτή σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού. Τέτοια στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*,

Lactobacillus curvatus, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Beresford *et al.*, 2001).

Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί μη εκκινητές μεσόφιλοι λακτοβάκιλλοι αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού των NSLAB στα περισσότερα τυριά κατά την διαδικασία της ωρίμανσης (Manolopoulou *et al.*, 2003, Beresford and Williams, 2004, Casey *et al.*, 2006, Gobbetti *et al.*, 2007). Ειδικότερα, στο τυρί φέτα, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε αλάτι, επιβιώνουν είδη, όπως: *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* (Vassiliadis *et al.*, 2009). Συμπερασματικά ο πληθυσμός των NSLAB ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του τυριού, την διαδικασία παρασκευής καθώς και την χρονική περίοδο ωρίμανσης του τυριού (Casey *et al.*, 2006).

7.3. Μεταβολισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια όταν βρίσκονται σε κάποιο τεχνητό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου από αυτό. Όταν απαντούν στο φυσικό τους υπόστρωμα όπως για παράδειγμα στο γάλα, χρησιμοποιούν τη λακτόζη και το λίπος ως πηγή άνθρακα και τις πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου (McSweeney and Sousa, 2000). Ο μεταβολισμός τους δεν διαφέρει από εκείνον των άλλων βακτηρίων. Έχει ως στόχο να εφοδιάσει το κύτταρο με ενέργεια (υπό μορφή ATP) απαραίτητη κυρίως για τους βιοσυνθετικούς σκοπούς του, τη διατήρηση της ομοιόστασής του (έκκριση ουσιών αντίθετα σε μια διαβάθμιση συγκέντρωσης) και γενικά για όλη του τη λειτουργία, καθώς και να το προμηθεύσει με τα απαραίτητα συστατικά (π.χ. αμινοξέα) για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό.

Κατά την ωρίμανση του τυριού, ο σχηματισμός των γεύσεων είναι μάλλον μία αργή διαδικασία στην οποία λαμβάνουν χώρα διάφορες χημικές και βιοχημικές μετατροπές των συστατικών του γάλακτος. Οι αρωματικές ενώσεις στο τυρί προκύπτουν από τη δράση ενζύμων που προέρχονται από την πυτιά, το γάλα, τα εναρκτήρια και μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια, μαζί με μη-ενζυματικές μετατροπές (Kosikowski *et al.*, 1997; Walstra *et al.*, 1993; Skeie *et al.*, 2000; Christiani *et al.*, 2001). Τρεις είναι οι κύριες οδοί που μπορούν να συσχετιστούν με την παραγωγή αρωματικών ενώσεων και αφορούν την διάσπαση της λακτόζης

(γλυκόλυση), του λίπους (λιπόλυση) και των καζεϊνών (πρωτεόλυση) (Bockelmann *et al.*, 2001; Bockelmann *et al.*, 1997; Molimard *et al.*, 1996).

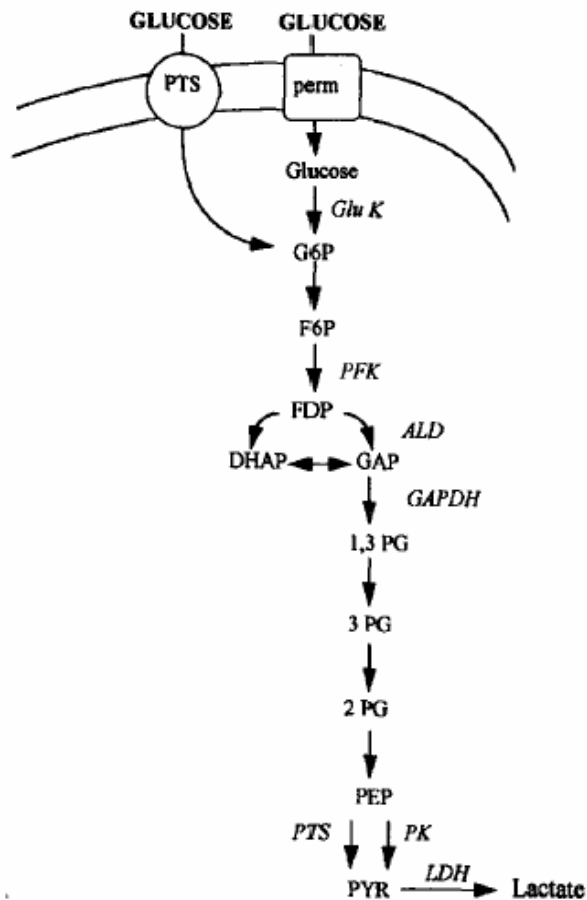
7.3.1. Μεταβολισμός σακχάρων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν διάφορους υδατάνθρακες και συγγενικές ενώσεις με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ.

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης μπορεί να είναι ομοζυμωτικός (μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas) ή ετεροζυμωτικός (μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών). Η μεταφορά και φωσφορυλίωση της γλυκόζης πραγματοποιείται με μεταφορά του ελεύθερου σακχάρου και φωσφορυλίωσή του από μία ATP- εξαρτώμενη γλυκοκινάση. Κάποια είδη χρησιμοποιούν το σύστημα της φωσφοτρανσφεράσης (Phosphotransferase system, PTS) που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (Phosphoenolpyruvate, PEP) (σύστημα PEP-PTS) με το PEP να είναι δότης της φωσφορικής ομάδας (Postma *et al.*, 1993).

Η γλυκόλυση χρησιμοποιείται απ' όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός από τους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους, τα *Leuconostoc* spp., τα *Oenococcus* spp., και τα *Weisellas* spp.

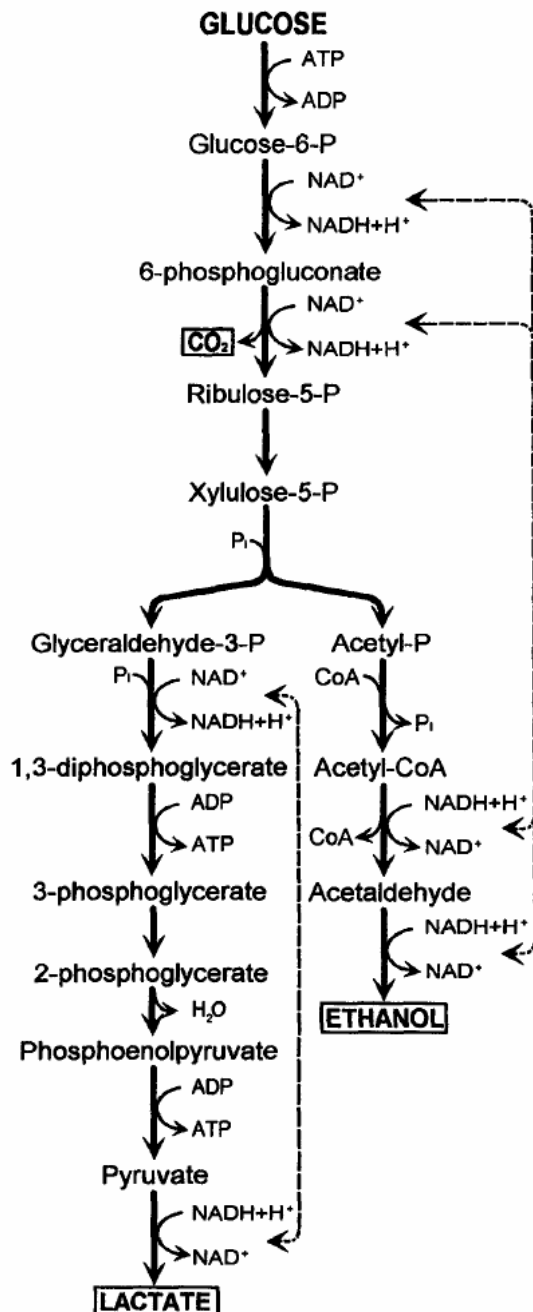
Ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, η οποία με τη σειρά της διασπάται από μία αλδολάση προς φωσφορική διυδροξυ ακετόνη και 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη στη συνέχεια μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω μίας αλληλουχίας αντιδράσεων που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και συγκεκριμένα παρουσία περίσσειας σακχάρου και περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς γαλακτικό οξύ μέσω της NAD^+ -εξαρτώμενης γαλακτικής αφυδρογονάσης, ενώ ταυτόχρονα το NADH αναγεννιέται στην οξειδωμένη του μορφή. Συμπερασματικά, αυτός ο μεταβολισμός έχει ως μοναδικό τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ (σχεδιάγραμμα 7.1). Πραγματοποιείται από βακτήρια του γένους *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus* και από υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς και προαιρετικά ετεροζυμωτικούς λακτοβάκιλλους (Axelsson, 1993).



Σχεδιάγραμμα 7.1: ομοζυμωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996)

Ο ετεροζυμωτικός μεταβολισμός της λακτόζης ή μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών χαρακτηρίζεται από τα αρχικά στάδια οξείδωσης της γλυκόζης, το σχηματισμό του 6-φωσφογλυκονικού οξέος και την αποκαρβοξυλίωση αυτού. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια στερούνται της αλδολάσης της 6-διφωσφορικής φρουκτόζης και της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών που αποτελούν σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Η παραγόμενη 6-φωσφορική πεντόζη διασπάται από την φωσφοκετολάση προς 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη στη συνέχεια εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ είτε ανάγεται σε αιθανόλη, μέσω του ακετυλο-CoA και της ακεταλδεύδης, είτε αποφωσφορυλιώνεται προς οξικό οξύ και ATP, είτε ενώνεται με ένα μόριο CoA, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς ακεταλδεύδη που με τη σειρά της ανάγεται προς

αιθανόλη έτσι ώστε να αναγεννηθεί το NAD στην οξειδωμένη του μορφή (Law, 1997). Συμπερασματικά, αυτός ο μεταβολισμός οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτικού οξέως αλλά και σημαντικών ποσοτήτων άλλων τελικών προϊόντων (CO₂, οξικό οξύ ή αιθανόλη) (σχεδιάγραμμα 7.2).



Σχεδιάγραμμα 7.2: Ετεροζυμωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης

Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια η λακτόζη είναι η κύρια πηγή άνθρακα στο γάλα. Μεταβολίζεται από αυτά και παράγεται γλυκόζη και γαλακτόζη και περαιτέρω γαλακτικό οξύ. Το πρώτο βήμα είναι η είσοδος της μέσα στο κύτταρο η οποία μπορεί να γίνει με δύο βασικούς μηχανισμούς (Monnet *et al.*, 1996). Στον πρώτο η λακτόζη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της περμεάσης της λακτόζης και στη συνέχεια αποικοδομείται από την ενδοκυτταρική β-γαλακτοσιδάση προς γλυκόζη και γαλακτόζη (Fox *et al.*, 1990). Στον δεύτερο η λακτόζη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός συστήματος PEP-PTS (phosphoenol pyruvate phospho transferase system) και στη συνέχεια διασπάται από τη β-φωσφογαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και 6-φωσφορική γαλακτόζη. Τα σύστημα PEP-PTS της λακτόζης καθώς και η β-φωσφογαλακτοσιδάση σε γενικές γραμμές επάγονται ή καταστέλλονται από την παρουσία της γλυκόζης (Kandler, 1983).

Ανεξάρτητα από το σύστημα μεταφοράς η γλυκόζη, στη συνέχεια θα οξειδωθεί προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού, η γαλακτόζη θα μεταβολισθεί μέσω της οδού Leloir ή μέσω του μονοπατιού της ταγκατόζης (Marilley and Casey, 2004).

7.3.2. Μεταβολισμός αζωτούχων ουσιών

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης αρκετών αμινοξέων ή/και βιταμινών. Έτσι στο υπόστρωμα ανάπτυξης εκτός από τη παρουσία ενός σακχάρου που μπορεί να ζυμωθεί, προσθέτονται και βιταμίνες, νουκλεοτίδια και αμινοξέα.

Ως προς τα αμινοξέα, οι λακτοβάκιλλοι είναι πιο απαιτητικοί από τους λακτόκοκκους (Peterson and Marshal, 1990, Monnet *et al.*, 1996). Οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων αμινοξέων και πεπτιδίων στο γάλα είναι πολύ χαμηλές, περιέχει όμως, σημαντικά ποσά αμινοξέων σε πεπτίδια και πρωτεΐνες (Law *et al.*, 1976b). Οι εναρκτήριοις καλλιέργειες διαθέτουν ένα καλά αναπτυγμένο πρωτεολυτικό σύστημα, το οποίο τα βοηθά την ανάπτυξή τους στο γάλα. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του γάλακτος οδηγεί στην παραγωγή πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων, τα οποία μπορούν εν συνεχεία να ληφθούν από τα κύτταρα. Παράλληλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη αρώματος και γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα ζυμώσεως, με τον σχηματισμό

μικρών πεπτιδίων, ελεύθερων αμινοξέων και άλλων ουσιών που προκύπτουν απ' αυτά (Visser, 1993).

Το πρωτεολυτικό σύστημα των γαλακτικών βακτηρίων απαρτίζεται από τρία διαφορετικά συστήματα (Pritchard and Coolbear 1993, Kunji *et al.*, 1996):

- τις πρωτεϊνάσες
- το σύστημα μεταφοράς πεπτιδίων μέσα στο κύτταρο και
- τις πεπτιδάσες

Οι πρωτεϊνάσες συμμετέχουν στην πρώτη φάση της πρωτεόλυσης, δρουν στις καζεΐνες και τα προϊόντα τους είναι το υπόστρωμα δράσης των πεπτιδασών. Οι πρωτεϊνάσες βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και διασπούν τις πρωτεΐνες προς ολιγοπεπίδια. Πολλά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων περιέχουν μια τέτοια εξωκυτταρική πρωτεϊνάση. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη στερούνται αυτής και η παραγωγή πεπτιδίων και αμινοξέων εξαρτάται από άλλα στελέχη της καλλιέργεια εκκίνησης. Τέτοιου είδους εξάρτηση των στελεχών είναι συχνή σε και δείχνει τη σημασία της γνώσης της δυναμικής του πληθυσμού σε μία καλλιέργεια εκκίνησης.

Το δεύτερο σημαντικό τμήμα του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνει την μεταφορά πεπτιδίων που παράγονται με την δράση των CEP εντός του κυττάρου μέσω του συστήματος Opp. Οι πρωτεΐνες Opp ανήκουν σε μία υπεροικογένεια υψηλά συντηρημένων μεταφορέων κασέτας ATP-πρόσδεσης (Doeven *et al.*, 2005). Το σύστημα Opp του *L. lactis* μεταφέρει πεπίδια με 6-8 αμινοξέα. Γενικότερα το σύστημα Opp των υπολοίπων οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι εξίσου μελετημένα, ωστόσο έχει αναφερθεί ότι για τον *S. thermophilus* και τον *Lb. bulgaricus* τα συστήματα Opp είναι παρόμοια με αυτά του *L. Lactis*.

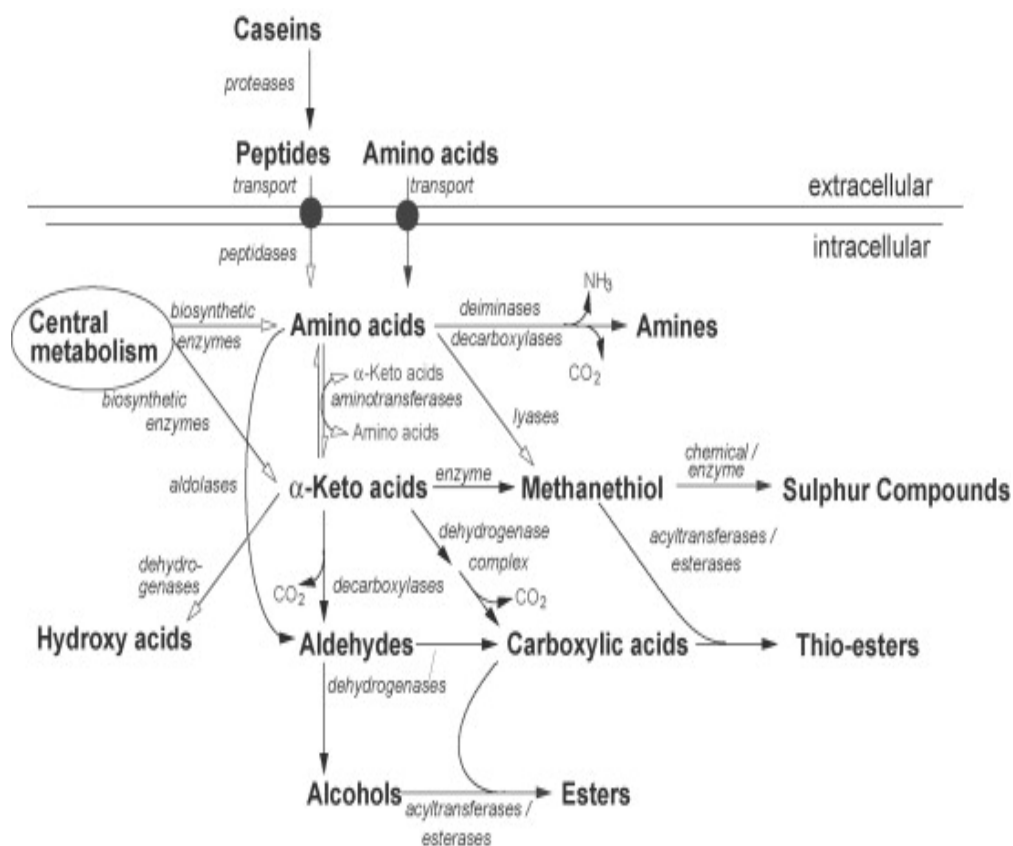
Το τρίτο μέρος του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά τις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που διασπούν τα πεπίδια προς μικρότερα πεπίδια και αμινοξέα τα οποία στη συνέχεια αποικοδομούνται από τη δράση των αμινοπεπτιδασών (Law, 1997). Τα μικρά πεπίδια και αμινοξέα που προκύπτουν από τη δράση των πεπτιδασών είναι οι κύριες ουσίες γεύσης και αρώματος του τυριού. Όσο το κύτταρο παραμένει βιολογικά ενεργό, η δράση των εσωκυτταρικών πεπτιδασών πετυχαίνεται με την πρόσληψη αμινοξέων και πεπτιδίων μέσα στο κύτταρο (Visser, 1991). Ο πιο πιθανός δρόμος για την αποικοδόμηση των καζεϊνών είναι η αποικοδόμηση τους σε μεγάλα ολιγοπεπίδια από τα ένζυμα του γάλακτος και τις

μικροβιακές πρωτεΐνάσες και η περαιτέρω υδρόλυση των ολιγοπεπτιδίων από τις ενδοπεπτιδάσες. Τα πεπτίδια που προκύπτουν μεταφέρονται με τα συστήματα μεταφοράς μέσα στο κύτταρο και διασπώνται στα απαραίτητα στοιχεία από τις εσωκυτταρικές δι-, τρι- και αμινοπεπτιδάσες.

Η θέση των πεπτιδίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Οι διάφορες μελέτες δείχνουν ότι σχεδόν όλες οι αμινοπεπτιδάσες των λακτοκόκκων βρίσκονται μέσα στο κύτταρο ενώ μπορεί μερικές να είναι συνδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη (Tan *et al.*, 1992; Pritchard and Coolbear, 1993). Από την άλλη μεριά, μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη εξωκυτταρικής πεπτιδασικής δράσης όταν μελετήθηκαν άθικτα κύτταρα (Requena *et al.*, 1991; Arizcum *et al.*, 1997b). Η εκροή πεπτιδίων από το κύτταρο ή καλύτερα η αυτόλυση των κυττάρων μπορεί να είναι οι λόγοι για την παρατηρούμενη πρωτεολυτική δραστηριότητα.

Ο βαθμός πρωτεόλυσης των καζεϊνών και τα παραγόμενα πεπτίδια καθορίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά του τυριού. Παράλληλα τα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα που παράγονται κατά την πρωτεόλυση συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού. Εκτός όμως από τα ελεύθερα αμινοξέα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης του τυριού παίζουν και τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους. Αυτά προέρχονται από αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, τρανσαμίνωσης, απαμίνωσης και υδρολυτικής αποικοδόμησης, οι οποίες καταλύονται από μικροβιακά ένζυμα, είτε των εναρκτήριων καλλιιεργειών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του τυριού, είτε της ενδογενούς μικροχλωρίδας του. Τα προϊόντα αυτά δεν είναι πάντα επιθυμητά. Έτσι, η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων προς αμίνες (όπως η τυραμίνη και η ισταμίνη), δημιουργεί δυσάρεστα οργανολυπτικά χαρακτηριστικά και μπορεί να προκαλέσει αλλεργικού τύπου τροφογενείς δηλητηριάσεις.

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η πρωτεόλυση των καζεϊνών που συσχετίζεται άμεσα με το άρωμα των τυριών (σχήμα 7.3) (Smit *et al.*, 2005).



Σχήμα 7.3: πρωτεόλυση των καζεϊνών (συσχετίζεται άμεσα με το άρωμα των τυριών) (Smith *et al.*, 2005).

7.3.3. Μεταβολισμός λίπους

Το λίπος του γάλακτος είναι σημαντικό συστατικό για τη βιογένεση των αρωματικών ενώσεων (Foda *et al.*, 1974). Δεν είναι μόνο τα προϊόντα της υδρόλυσης του λίπους που συνεισφέρουν στο άρωμα του τυριού αλλά και το λίπος καθαυτό καθώς έχει παρατηρηθεί η μη σωστή ανάπτυξη αρώματος σε τυριά από άπαχο γάλα αφού το λίπος λειτουργεί ως μέσο διάλυσης των αρωματικών ενώσεων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν εστερολυτικά / λιπολυτικά ένζυμα ικανά να υδρολύουν διάφορους εστέρες λιπαρών οξέων, καθώς και τρι-, δι-, και μονο-ακυλογλυκερίδια (Liu *et al.*, 2004). Παρά την παρουσία όμως αυτών των ενζύμων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ειδικά οι λακτόκοκκοι και οι γαλακτοβάκιλλοι θεωρούνται ελάχιστα λιπολυτικοί σε σχέση με άλλα βακτήρια όπως τα *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Flavobacterium* (Collins *et al.*, 2003). Ωστόσο, λόγω της παρουσίας τους σε μεγάλους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνεισφέρουν στην παραγωγή σημαντικών επιπέδων

ελεύθερων λιπαρών οξέων (Liu *et al.*, 2004). Αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, των οποίων η ανθρακική αλυσίδα ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το είδος του λίπους του γάλακτος, επηρεάζουν άμεσα το άρωμα των τυριών. Μπορούν επίσης να μεταβολισθούν προς άλλα αρωματικά συστατικά, όπως είναι οι μεθυλοκετόνες και οι θειοεστέρες. Τα δ-κετοξέα, τα δ-υδροξυ-οξέα και οι λακτόνες αποτελούν επίσης προϊόντα διάσπασης των τριγλυκεριδίων και συνεισφέρουν στο άρωμα των τυριών (El Soda *et al.*, 1995).

Οι εστεράσες εμπλέκονται στη σύνθεση των εστέρων από τα λιπαρά οξέα, συγκεκριμένα από λιπαρά οξέα μικρής και μεσαίας αλυσίδας ή από διάφορες αλκοόλες, συγκεκριμένα αλειφατικές μονοαλκοόλες (αιθανόλη), αρωματικές αλκοόλες (φαινύλ-αιθανόλη) και θειόλες (μεθανοθειόλη) και στην υδρόλυση των εστέρων και των λιπαρών οξέων. Αυτή η διπλή τους ιδιότητα είναι σημαντική για τα βακτήρια που τις παράγουν. Διαφέρουν από τις λιπάσες στο μήκος της υδρολυμένης αλυσίδας (2-8 άτομα άνθρακα ενώ για τις λιπάσες αναλογούν περισσότερα) και στο γεγονός ότι οι εστεράσες υδρολύουν κατά προτίμηση υποστρώματα που βρίσκονται διαλυμένα σε νερό σε αντίθεση με τις λιπάσες που προτιμούν υποστρώματα σε μορφή γαλακτώματος (Tsakalidou and Kalantzopoulos, 1992). Έχουν βρεθεί εστεράσες σε στελέχη *Lc. Lactis* (Tsakalidou και Kalantzopoulos 1992, Holland και Coolbear 1996) και σε άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως σε στελέχη *Lb. plantarum* (Gobbetti *et al.*, 1997), στελέχη *Leuconostoc* και ετεροζυμωτικών λακτοβακίλλων (Vafopoulou Mastrojiannaki *et al.*, 1996). Η εστερολυτική δραστηριότητα των λακτοκόκκων των *Leuconostoc* και ετεροζυμωτικών λακτοβακίλλων ήταν πάνω σε μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα. Προφανώς, η συμβολή των γαλακτικών εστερασών στη λιπόλυση ξεκινά όταν το λίπος του γάλακτος έχει ήδη υδρολυθεί από την ενδογενή λιπάση του γάλακτος ή από άλλες μικροβιακές λιπάσες (Durlu-Ozkaya *et al.*, 2001). Εστερολυτική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί σε στελέχη εντεροκόκκων από πολλούς ερευνητές όπως σε κυτταρικά εκχυλίσματα στελεχών *E. faecium* και *E. durans* (Tsakalidou *et al.*, 1993), σε στελέχη *E. faecium*, *E. faecalis* και *E. durans* (Sarantinopoulos *et al.*, 2001), σε στελέχη *E. faecium* απομονωμένα από Αιγυπτιακά τυριά (El-Din *et al.*, 2002).

8. *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565

Ο μικροοργανισμός *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 απομονώθηκε με την μέθοδο της SDS-PAGE ολικών πρωτεϊνών και αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA από δείγμα τυριού Μάνας Κοπανιστής. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο *Lactobacillus rennini* και ο *Lactobacillus acidipiscis* αποτελούν την μοναδική μικροχλωρίδα που απομονώθηκε από δείγματα Κοπανιστής και Μάνας Κοπανιστής (Asteri *et al.*, 2009). Ο *Lactobacillus rennini* αποτελεί ένα είδος που περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα για απομονώσεις που προέρχονται από αλλοιωμένη πυτιά (Chenol *et al.*, 2006), ωστόσο στο παρελθόν δεν έχει απομονωθεί από καμία άλλη πηγή.

Ο *Lactobacillus rennini* χαρακτηρίστηκε ως ομοζυμωτικός μεσόφιλος γαλακτοβάκιλλος Gram + με σχήμα μακρύ και λεπτό. Οι βάκιλλοι σχηματίζουν μακρές και λεπτές αλυσίδες όπως φαίνεται και στις παρακάτω φωτογραφίες (φώτο 8.1, 8.2).



Φωτο 8.1: Μικροσκοπική παρατήρηση του *Lactobacillus rennini*



Φωτο 8.2: Μικροσκοπική παρατήρηση του *Lactobacillus rennini*

Είναι ένα στέλεχος με μικρή ικανότητα παραγωγής οξέος στο γάλα αλλά με μεγάλη ικανότητα παραγωγής πτητικών ενώσεων. Βρέθηκε ότι οι κύριοι μεταβολίτες που παράγονται από αυτό το στέλεχος είναι η 3-μεθυλο-βουτανάλη, η 3-μέθυλο-βουτανόλη και η βενζαλδεύδη και αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης των ελεύθερων αμινοξέων (Asteri *et al.*, 2009). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο καταβολισμός των αμινοξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρείται ως ένα από τα πιο σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή ενώσεων που συμβάλουν στη διαμόρφωση αρώματος και γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Smith *et al.*, 2005, Yvon and Rijner, 2001). Επίσης το στέλεχος *Lactobacillus rennini* παρουσίασε έναν εξαιρετικά ενδιαφέρον αλόφιλο χαρακτήρα καθώς βρέθηκε να αναπτύσσεται ακόμα και σε συγκέντρωση 10% χλωριούχου νατρίου (Asteri *et al.*, 2009).

9. Σκοπός του πειράματος

Στη συγκεκριμένη μελέτη παρασκευάστηκε ένα τυρί Φέτα με τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς καλλιεργείων: Α, χωρίς την χρήση συμπληρωματικής καλλιέργειας αλλά μόνο με την μεικτή εναρκτήρια καλλιέργεια (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ACA-DC 0052 plus *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0007+ *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ACA-DC 0084), Β, με την χρήση της ίδιας εναρκτήριας καλλιέργειας στο Α και με την προσθήκη του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματικής και Γ, με την χρήση της ίδιας εναρκτήριας καλλιέργειας στο Α και με την προσθήκη του *L. lactis* ssp. *cremoris* ACA-DC 0736 ως συμπληρωματικής. Για την παρασκευή των συγκεκριμένων τυριών χρησιμοποιήθηκε πρόβειο γάλα, το οποίο παραλήφθηκε από την κτηνοτροφική μονάδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδραση του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως επιπρόσθετη καλλιέργεια στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα και η σύγκριση όσον αφορά αυτά τα χαρακτηριστικά των τριών τυριών.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, λοιπόν, έγιναν κάποιες αναλύσεις οι οποίες ήταν ενδεικτικές της σύστασης και της ποιότητας των τυριών που παρασκευάστηκαν. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, θα προκύψουν κάποια συμπεράσματα σχετικά με τους διαφορετικούς συνδυασμούς καλλιεργείων που χρησιμοποιήθηκαν.

10. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

10.1. Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Για την παρασκευή της Φέτας χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο τρεις (3) διαφορετικοί συνδυασμοί καλλιέργειών σε ποσοστό 1,5% (v/v). Ο πρώτος συνδυασμός (Α) περιείχε τις εναρκτήριες καλλιέργειες *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0007, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ACA-DC 0052 και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0084. Ο δεύτερος συνδυασμός (Β) περιείχε τις εναρκτήριες καλλιέργειες μαζί με την συμπληρωματική καλλιέργεια *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565. Ο τρίτος συνδυασμός (Γ) περιείχε τις εναρκτήριες καλλιέργειες μαζί με την συμπληρωματική καλλιέργεια *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ACA-DC 0736. Τα στελέχη των καλλιέργειών που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκουν στη Συλλογή ACD-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας (Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

10.2. Τυροκομήσεις και δειγματοληψία

Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές πειραματικές τυροκομήσεις Φέτας σε διάστημα τριών εβδομάδων. Σε κάθε τυροκόμηση παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά τυριά από πρόβειο γάλα, σε τρία διαφορετικά καζάνια (Α, Β και Γ), χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους συνδυασμούς των καλλιέργειών που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παστερίωση 90 kg γάλακτος στους 68 °C για 10 λεπτά, ακολούθησε η τοποθέτηση 30kg παστεριωμένου γάλακτος σε κάθε καζάνι και η ψύξη του στους 36 °C. Στη θερμοκρασία των 36 °C πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός με τον αντίστοιχο συνδυασμό οξυγαλακτικής καλλιέργειας που έχει προαναφερθεί σε ποσοστό 1,5 % (v/v). Μετά από 10 λεπτά προστέθηκαν 6ml διαλύματος CaCl₂ (40%) και πυτιά σε ποσότητα 1,2 gr υπό ανάδευση σε κάθε καζάνι. Η πρόπτυξη πραγματοποιήθηκε στα 7 min από την ώρα που προστέθηκε η πυτιά, ενώ η συνολική διάρκεια πήξης ήταν 40 min. Μετά την ολοκλήρωση της πήξης, ακολούθησε η διαίρεση του τυροπήγματος σε ισομερείς κύβους και αφέθηκε για περίπου 10 min σε ηρεμία. Έπειτα, το κάθε τυρόπηγμα τοποθετήθηκε σε καλούπι με ειδικές σχισμές για φέτα. Τα καλούπια τοποθετήθηκαν σε κλίση στην τυροτράπεζα για να απομακρυνθεί

το τυρόγαλα και αφέθηκαν για 24 h (μετά τις πρώτες τρεις ώρες τα καλούπια αναποδογυρίστηκαν για να διευκολυνθεί το στράγγισμα).

Την επόμενη ημέρα από την ημέρα της τυροκόμησης πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των τριών τυριών από τα καλούπια και η τοποθέτησή τους σε στρώσεις στα δοχεία ωρίμανσης. Κατά την τοποθέτηση του τυριού στα δοχεία πραγματοποιήθηκε η προσθήκη αλατιού σε ποσοστό 2,5% με ομοιόμορφη διασπορά του σε κάθε στρώση.

Η φέτα τοποθετήθηκε σε θάλαμο θερμοκρασίας 16-18°C για 15 ημέρες για προωρίμανση (μέχρι το pH να φτάσει την τιμή ~4,5). Έπειτα, ακολούθησε η πλύση του με καθαρό νερό (ή αραιή άλμη) και η τοποθέτησή του σε νέα δοχεία όπου, καλύφθηκε με άλμη 6%. Ύστερα πραγματοποιήθηκε η τοποθέτησή του στο ψυγείο για ωρίμανση για τουλάχιστον 45 ημέρες.

Πριν από κάθε τυροκόμηση πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από το νωπό και το παστεριωμένο γάλα. Οι αναλύσεις που έγιναν στα γάλατα ήταν φυσικοχημικές και μικροβιολογικές για τον προσδιορισμό της ποιότητάς τους. Επίσης κατά τη διάρκεια ωρίμανσης της Φέτας ελήφθησαν δείγματα από το εσωτερικό της, με σκοπό τη πραγματοποίηση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών αναλύσεων. Δείγματα τυριών για τις αναλύσεις ελήφθησαν κατά την 1^η, 15^η, 30^η και 60^η ημέρα της ωρίμανσης.

10.3. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Στο νωπό γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την κάθε τυροκόμηση, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της σύστασής του (λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη, ολικά στερεά) μέσω του οργάνου Milkoscan 133 A/S N (Foss). Επίσης, έγινε μέτρηση του pH με πεχάμετρο HANA Hi 92240 και μέτρηση της οξύτητας με την παρακάτω μέθοδο: σε 10 ml δείγματος γάλακτος προστίθενται 1-2 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και ακολουθεί τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH N/9 (Ανυφαντάκης, 1992).

Στα τυριά πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλύσεις. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν.

i. Προσδιορισμός του pH

Πραγματοποιήθηκε με τη βύθιση ηλεκτροδίου (Methohm Herisau, 632 pH-Meter, Swizerland) στη μάζα του τυριού.

ii. Προσδιορισμός ξηράς ουσίας και υγρασίας

Ο προσδιορισμός της ξηράς ουσίας, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της FIL-IDF 58:1970 και με τη μετέπειτα τροποποίησή του και περιγραφή του στο ISO 2920/IDF 058:2004. Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο τοποθετούνται σε μια πορσελάνινη κάψα με ένα γυάλινο ραβδάκι και περίπου 30gr αλάτι στον κλίβανο ($\theta=100^{\circ}\text{C}$) για 24 ώρες. Αφού περάσουν οι 24 ώρες τότε τοποθετούνται 3gr από το κάθε τυρί σε κάθε κάψα και αναμειγνύονται με το αλάτι με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου, ώστε να γίνει ένα ομοιογενές μείγμα. Ζυγίζεται η κάθε κάψα με αναλυτικό ζυγό και όλες τοποθετούνται στον κλίβανο για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες στον κλίβανο τοποθετούνται σε ξηραντήριο όπου αφήνονται μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό και υπολογίζεται το ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας από τους παρακάτω τύπους αντίστοιχα:

$$\% \text{Υγρασία} = [(\alpha - \beta) / (\gamma - \delta)] \times 100$$

Όπου α =βάρος μετά την αποξήρανση και β = το απόβαρό του

γ =βάρος πριν την αποξήρανση και δ = το απόβαρό του

$$\% \text{Ξ.Ουσία} = 100 - \% \text{Υγρασία}$$

iii. Προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας

Ο προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Gerber and Van Gulik. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, τοποθετούνται 3 gr τυριού στον υποδοχέα του βουτυρόμετρου τυριού Van Gulik και στη συνέχεια εφαρμόζεται ο

υποδοχέας στο σώμα του βουτυρομέτρου. Ακολουθεί η εισαγωγή πυκνού θεικού οξέος (ειδικού βάρους 1,53%), μέχρι να καλυφθεί όλη η μάζα του τυριού. Στη συνέχεια το βουτυρόμετρο τοποθετείται σε υδατόλουτρο, στους 65°C για 60 λεπτά περίπου μέχρι να διαλυθεί η μάζα του τυριού. Έπειτα, προστίθεται 1 σταγόνα αμυλικής αλκοόλης και το βουτυρόμετρο συμπληρώνεται με θεικό οξύ μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του λαιμού του. Τέλος, το βουτυρόμετρο τοποθετείται σε φυγόκεντρο με θερμοκρασία 65°C και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 1200 στροφές/min. Αφού το βουτυρόμετρο βγει από τη φυγόκεντρο, τοποθετείται σε υδατόλουτρο των 65°C για 5 λεπτά και πραγματοποιείται η ανάγνωση της κατώτερης τιμής, που αντιστοιχεί στη διαχωριστική γραμμή μεταξύ λίπους και υπόλοιπου περιεχομένου του βουτυρομέτρου, και της ανώτερης που αντιστοιχεί στο μηνίσκο που σχηματίζεται στην κορυφή της στήλης του λίπους. Υπολογίζεται το ποσοστό του λίπους που έχει το τυρί με αναγωγή στο ακριβές βάρος που έχει ζυγιστεί, με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$\% \text{Λίπος} = (\alpha - \beta) \times 3 / P$$

Όπου α = ανώτερη τιμή βουτυρόμετρου

β = κατώτερη τιμή βουτυρόμετρου)

P= gr τυρού

Επίσης υπολογίστηκε και το Λίπος % Ξηράς ουσίας μέσω του παρακάτω τύπου:

$$\text{Λίπος \% Ξηράς ουσίας} = \% \text{Λίπος} \times 100 / \text{Ξηρά ουσία}$$

iv. Προσδιορισμός του NaCl

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της IDF, FIL-IDF 17A:1972. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε 2g τυριού προστίθενται 25ml Νιτρικού αργύρου 0,1N και 25ml πυκνού Νιτρικού οξέος. Ακολουθεί η θέρμανση του δείγματος και μόλις αρχίσει ο βρασμός του τοποθετούνται σε αυτό 10ml κορεσμένου διαλύματος υπερμαγγανικού καλίου με αποτέλεσμα το δείγμα να χρωματιστεί καστανοκόκκινο. Ενώ ο βρασμός συνεχίζει υπό ανάδευση, επέρχεται ο αποχρωματισμός του και τοποθετούνται τόσα ml υπερμαγγανικού καλίου, ώστε το δείγμα να μην αποχρωματίζεται ούτε ιδιαίτερα αργά αλλά ούτε και γρήγορα. Μετά τον τελικό

αποχρωματισμό του δείγματος η θέρμανση του διακόπτεται και ακολουθεί η προσθήκη 100ml ψυχρού απεσταγμένου νερού και 5ml διαλύματος στυπτηρίας. Τέλος πραγματοποιείται η τιτλοδότηση του δείγματος με 0,1 N Θειοκυανιούχο Αμμώνιο με τη χρήση προχοΐδας μέχρι να αποκτήσει καστανόχρουν (κεραμιδί) χρώμα. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του τυριού σε χλωριούχο νάτριο χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Αλάτι} = [0,585 \times (V_1 - V_2)] / P$$

Όπου V_1 = ml Νιτρικού αργύρου 0,1N που προστέθηκαν στο δείγμα

V_2 = ml Θειοκυανιούχου Αμμώνιου 0,1 N που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση

P = gr τυριού

Ακολούθως υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο % Υγρασίας μέσω του παρακάτω τύπου:

$$\text{Αλάτι \% Υγρασίας} = \% \text{ Αλάτι} \times 100 / \text{Υγρασία}$$

v. Προσδιορισμός ολικού αζώτου (OA) (Total Nitrogen-TN) και πρωτεΐνης (%).

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahd όπως περιγράφεται από τους Ardo *et al.* (1999). Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην καύση των οργανικών ουσιών του τυριού με τη βοήθεια της θέρμανσης και του θειϊκού οξέος και στη μετατροπή του αζώτου του δείγματος σε αμμωνιακό. Έπειτα, η αμμωνία ελευθερώνεται με την επίδραση Καυστικού Νατρίου, αποστάζεται, παραλαμβάνεται σε βορικό οξύ και τιτλοδοτείται με υδροχλωρικό οξύ.

Συγκριμένα για τον προσδιορισμό των ολικών αζωτούχων ουσιών, σε μια φιάλη Kjeldahd τοποθετούνται: α) 2,5gr από το τυρί προς εξέταση, β) 2 ταμπλέτες καταλυτών που αντιστοιχούν σε 7gr θειϊκού καλίου, 0,210gr ένυδρο θειϊκό χαλκό και 0,210gr διοξειδίου του τιτανίου, γ) 10ml πυκνό θειϊκό οξύ(97-98%), δ) 3-4 σταγόνες αντιαφριστικό παράγοντα (υδατικό διάλυμα σιλικόνης 30%) και ε) 5ml υπεροξειδίου του υδρογόνου 30%. Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετούνται στις ειδικές εστίες καύσης

με σύστημα απαγωγής ατμών, όπου παραμένουν για 3 ώρες περίπου σύμφωνα με ένα πρόγραμμα καύσης (συνδυασμός θερμοκρασίας και χρόνου) (πίνακας 10.1).

Πίνακας 10.1: Πρόγραμμα καύσης για το ολικό άζωτο (ΟΑ) (Total Nitrogen-TN)

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΑΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΟΛΙΚΟ ΑΖΩΤΟ (ΟΑ) (Total Nitrogen-TN)	
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ (Min)
200	20
220	20
240	20
260	20
280	20
300	20
320	20
340	20
388	45

Εκτός από τα δείγματά, έχει παρασκευαστεί και ένα λευκό δείγμα, το οποίο αποτελείται από όλα τα αντιδραστήρια, και 2,5ml διαλύματος σουκρόζης 10% αντί τυριού. Η συσκευή καύσης που χρησιμοποιήθηκε για την καύση των δειγμάτων είναι η Tecator 2020 Digestor. Μετά την καύση των δειγμάτων μας ακολουθεί η απόσταξη αυτών από την ειδική συσκευή απόσταξης. Η συσκευή αυτή αποτελείται από 1 υποδοχή της φιάλης Kjeldhal η οποία περιέχει το δείγμα που είναι προς απόσταξη και μια υποδοχή για κωνική φιάλη στην οποία λαμβάνεται το απόσταγμα μετά την επεξεργασία του με βορικό οξύ 4%. Στο απόσταγμα προστίθεται και ένας δείκτης-χρωστική ο οποίος βοηθά στην τιτλοδότηση του δείγματός μας με HCl 0,2N. Τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης χρησιμοποιούνται στον τύπο (1) για να τον υπολογισμό του ολικού αζώτου για το κάθε δείγμα τυριού.

Τέλος με βάση τον παρακάτω τύπο υπολογίζεται το ολικό άζωτο του τυριού:

$$\text{Ολικό Άζωτο\%} = [1,4 \times N \times (V_1 - V_0)] / P$$

Όπου N = Κανονικότητα HCl 0,2 N

V_1 = ml HCl 0,2 N που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του δείγματος

V_0 = ml HCl 0,2 N που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του λευκού δείγματός.

P = gr τυριού

Το ποσοστό του αζώτου των πρωτεϊνών προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό του αποτελέσματος του τύπου (1) με το 6,38.

vi. Προσδιορισμός του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA soluble nitrogen (12% TCA) και του συντελεστή ωρίμανσης (%).

Κατά τον προσδιορισμό αυτόν πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 10gr τυριού με 190ml διαλύματος Κιτρικού Νατρίου (0,1 mol/l trisodium citrate) που βρίσκεται σε θερμοκρασία 30 °C και η ανάδευσή τους για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών ακολουθεί η ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 4,4 με τη χρήση Υδροχλωρικού οξέος (1 mol/l hydrochloric acid). Ακολουθεί η παραμονή του δείγματος για 30 λεπτά στους 30 °C και η διήθησή του με τη χρήση χωνιού και διηθητικού ηθμού τύπου Whatman No 40. Στη φάση αυτή λαμβάνεται το υδατοδιαλυτό εκχύλισμα (WSN extract). Στη συνέχεια σε 25 ml του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος τοποθετούνται 25 ml διαλύματος 24% τριχλωρικού οξέος και ακολουθεί ανάδευση. Έπειτα από παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες (με ανάδευση κατά διαστήματα) πραγματοποιείται η διήθησή του με τη χρήση χωνιού και διηθητικού ηθμού τύπου Whatman No 40.

Η διαδικασία για τον προσδιορισμό του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA είναι η ίδια με αυτή των ολικών πρωτεϊνών, μόνο που αντί για τυρί στα δείγματά μας χρησιμοποιούμε 25ml από το παραπάνω διήθημα και ακολουθείται διαφορετικό πρόγραμμα καύσης (συνδυασμός θερμοκρασίας και χρόνου) (πίνακας 10.2).

Πίνακας 10.2: Πρόγραμμα καύσης για το υδατοδιαλυτό άζωτο σε 12% TCA soluble nitrogen (12% TCA)

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΑΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟ ΑΖΩΤΟ ΣΕ 12% TCA soluble nitrogen (12% TCA)	
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ (Min)
100	60
150	30
200	30
220	15
240	15
260	15
280	15
380	45

Ο προσδιορισμός του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Υδατοδιαλυτό Άζωτο σε 12\% TCA} = [1,40 \times N \times (V_1 - V_0) \times 0,994] / P$$

Όπου N = Κανονικότητα HCl 0,1 N

V_1 = ml HCl 0,1 N που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του δείγματος

V_0 = ml HCl 0,1 N που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του λευκού δείγματός.

P = gr τυριού

Τέλος μέσω του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA και του ολικού αζώτου (%) είναι μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής ωρίμανσης (%) από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Συντελεστής Ωρίμανσης} = (\text{Υδατοδιαλυτό Άζωτο σε 12\% TCA} / \text{Ολικό Άζωτο \%}) \times 100$$

10.4. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο νοπό και στο παστεριωμένο γάλα της κάθε τυροκόμησης για τον προσδιορισμό της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας και χρησιμοποιήθηκε το υλικό P.C.A. με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης σε τρυβλία, τα οποία επωάστηκαν στους 30°C για 72 ώρες.

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις των τυριών, 20 gr τυριού αναμίχθηκαν με 180 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (2%, w/v; pH 7,5) και ομογενοποιήθηκαν για 2 λεπτά σε συσκευή Stomacher 400 (Seward-Laboratory Blender, BA 7021, London SE1 1PP, UK). Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (IDF Standard No 122C, 1996). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν εκφράστηκαν σε cfu/ml.

Καταμετρήθηκαν οι παρακάτω ομάδες μικροοργανισμών υπό τις εξής συνθήκες:

- Θερμόφιλοι βάκιλλοι σε MRS agar (pH 5,2) στους 42 °C για 48 h αναερόβια.
- Μεσόφιλοι κόκκοι σε M17 agar στους 22 °C για 48 h.
- Θερμόφιλοι κόκκοι σε M17 agar στους 42 °C για 48 h.
- Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) σε Rogosa agar (pH 5,5) στους 30 °C για 72 h αναερόβια.
- Εντερόκοκκοι σε KAA agar στους 37 °C για 24 h.
- Μικρόκοκκοι σε Mannitol Salt Agar (MSA) που περιείχε το αντιβιοτικό κυκλοεξιμίδιο (100 µg/ml) στους 30 °C για 72 h.
- Κολοβακτηρίδια σε Violet Red Bile Agar (VRBA) στους 37 °C για 24 h.
- Ζύμες σε YGC agar στους 22 °C για 72 h.
- Για τον προσδιορισμό του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 έγινε η χρήση Rogosa agar 6% NaCl στους 30 °C για 6 ημέρες αναερόβια.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι από τα τρυβλία με επιλεκτικό υπόστρωμα (Rogosa agar 6% NaCl) για τον προσδιορισμό του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 πραγματοποιείται η λήψη αποικιών, η εφαρμογή χρώσης Gram και στη συνέχεια η μικροσκοπική παρατήρηση αυτών με στόχο την επιβεβαίωση της ταυτοποίησής του με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του.

10.5. Οργανοληπτικός έλεγχος

Σε δείγματα της ώριμης Φέτας (60 ημέρες) πραγματοποιήθηκε τυφλός οργανοληπτικός έλεγχος από 35-μελή ομάδα του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας (Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Τα δείγματα αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν ως προς τη γεύση και το άρωμα, τη συνεκτικότητα, το χρώμα και γενικά την ολική αποδοχή με κλίμακα 0-5. Η βαθμολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αντιστοιχεί στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.1).

Πίνακας 10.1: Βαθμολόγηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της Φέτας.

Χαρακτηριστικό	Βαθμός	Περιγραφή χαρακτηριστικού
Άρωμα - Γεύση	5	Πολύ ευχάριστη
	4	Ευχάριστη, ελαφρά όξινη ή άρωμα διακετυλίου
	3	Έντονη γεύση με άρωμα λιπόλυσης
	2	Ελαφρώς πικρή γεύση με ίχνη ταγγού (αποδεκτό)
	1	Πολύ πικρή γεύση, έντονη τάγγιση (μη αποδεκτό)
	0	Γεύση και άρωμα ξένη προς το τυρί
Συνεκτικότητα	5	Μαλακό, πολύ καλή συνεκτικότητα, λίγα ανοίγματα
	4	Μαλακό, καλή συνεκτικότητα, λίγα ανοίγματα
	3	Μέτρια συνεκτικότητα. Εύθρυπτο ή σκληρό, δεν κόβεται
	2	Μαλακό χωρίς καλή συνεκτικότητα
	1	Πολύ μαλακό
	0	Λασπώδες
Χρώμα	5	Λευκό τυπικό χρώμα της φέτας
	4	Λευκό
	3	Λευκωπό (αποχρώσεις)
	2	Ελαφρώς κίτρινο
	1	Εκτεταμένες περιοχές δυσχρωμίας
	0	Χρώμα ξένο προς το προϊόν
Ολική αποδοχή	5	Πολύ καλό – Άριστο (βαθμολογία σε όλα 5)
	4	Καλό (βαθμολογία 4 ή 5)
	3	Ικανοποιητικό (βαθμολογία 3 ή 4)
	2	Αποδεκτό (βαθμολογία 2 ή 3)
	1	Μη αποδεκτό (βαθμολογία 1 ή 0)
	0	Ελαττωματικό (βαθμολογία 1 ή 0)

10.6. Στατιστική επεξεργασία

Για την στατιστική ανάλυση των φυσικοχημικών και των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Centurion XV.I. Αρχικά έγινε ανάλυση διασποράς ως προς ένα παράγοντα (one-way analysis of variance – ANOVA) και στη συνέχεια εξετάστηκε ο κάθε παράγοντας χωριστά (τυριά Α,Β,Γ και ημέρα δειγματοληψίας 1, 15, 30, 60), αλλά και η αλληλεπίδραση των επεμβάσεων ανά περίπτωση (two-way analysis of variance – ANOVA). Η επίδραση του υπό εξέταση παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των παραγόντων θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν $P < 0,05$. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς. Για την σύγκριση των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Duncan.

Στις περιπτώσεις που δεν καλύπτονταν οι ανωτέρω προϋποθέσεις χρησιμοποιήθηκε παραμετρική μέθοδος (Kruskal – Wallis). Στους πίνακες και στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπή, ενώ στις περιπτώσεις που εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, η διαφοροποίηση εμφανίζεται με διαφορετικά γράμματα στους εκθέτες.

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1. Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

Οι μεταβολές των διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων των τυριών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης τους είναι καθοριστικής σημασίας, αφού είναι αυτές που τελικά θα καθορίσουν τη δομή, την υφή, τη γεύση και το άρωμά τους. Σημαντικό στοιχείο επίσης αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης των διαφόρων συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στις παραπάνω φυσικοχημικές παραμέτρους.

11.1.1. Μεταβολή του pH

Οι διαφορές στις τιμές του pH μεταξύ των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1.

Συγκρίνοντας τις επεμβάσεις μεταξύ τους, φαίνεται ότι από την 15^η έως την 60^η ημέρα το pH του τυριού με την επέμβαση Α εμφανίζεται μεγαλύτερο σε σχέση με τα υπόλοιπα τυριά χωρίς όμως οι διαφοροποιήσεις να είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 3.1).

Το pH μειώθηκε γρήγορα σε όλα τα τυριά κατά τη διάρκεια της 1^{ης} ημέρας, φτάνοντας τη τιμή περίπου 4,94, λόγω της ταχείας ανάπτυξης και δράσεις των εναρκτήριων καλλιεργειών. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης το pH των τυριών παρουσίαζε πτώση. Μετά από της 60 ημέρες της ωρίμανσης, η τιμή του pH και για τα τρία τυριά ήταν μειωμένη, ωστόσο παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση στο τυρί Γ ακολούθησε το τυρί Β και το τυρί Α χωρίς όμως οι διαφοροποιήσεις αυτές να είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.1).

Πίνακας 11.1.: Μεταβολή του pH κατά την ωρίμανση της φέτας.

pH			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	4,94±0,083	4,93±0,096	4,97±0,120
15	4,59±0,044	4,50±0,042	4,44±0,017
30	4,46±0,103	4,34±0,028	4,34±0,106
60	4,48±0,009	4,36±0,021	4,27±0,046

11.1.2. Μεταβολή της υγρασίας

Συγκρίνοντας τις επεμβάσεις μεταξύ τους, η υγρασία την 1^η μέρα ήταν μεγαλύτερη στο τυρί με τη επέμβαση A (~ 57%) σε σύγκριση με τα τυριά με τις επεμβάσεις B και Γ (~55%). Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης οι τιμές της υγρασίας του τυριού με την επέμβαση A εμφανίζονται μεγαλύτερες από αυτές των τυριών με τις επεμβάσεις B και Γ, χωρίς ωστόσο να εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις (πίνακας 11.2).

Η υγρασία σε όλα τα τυριά από τη 1^η έως την 15^η ημέρα παρουσιάζει μείωση. Στο τυρί με την επέμβαση A από τη 15^η έως την 30^η ημέρα η υγρασία παρουσίασε αύξηση και από την 30^η έως την 60^η ημέρα παρουσίασε μείωση. Η υγρασία των τυριών με τις επεμβάσεις B και Γ από την 15^η έως την 60^η ημέρα παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα, δηλαδή ~ 53% και ~51% αντίστοιχα. Οι διαφοροποιήσεις της υγρασίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης για την κάθε επέμβαση ξεχωριστά δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.2).

Πίνακας 11.2: Μεταβολή της υγρασίας (%) κατά την ωρίμανση της φέτας.

ΥΓΡΑΣΙΑ (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	57,05 ± 1,121	55,86 ± 1,572	55,08 ± 0,664
15	56,45 ± 1,280	53,61 ± 1,800	51,22 ± 1,210
30	58,54 ± 1,226	53,79 ± 1,537	51,97 ± 1,084
60	57,29 ± 0,667	53,85 ± 0,672	51,66±1,47

11.1.3. Μεταβολή του λίπους (%)

Το λίπος την 1^η ημέρα και για τα τρία τυριά βρίσκεται στο επίπεδο του 21%. Την 15^η και 30^η ημέρα το τυρί με την επέμβαση Γ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος ακολουθούμενο από το τυρί με την επέμβαση Β και Α. Οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι στατιστικώς σημαντικές ($P < 0,05$) (πίνακας 11.3).

Το ποσοστό του λίπους από τη 1^η μέχρι την 15^η ημέρα μειώθηκε για το τυρί με την επέμβαση Α και αυξήθηκε για τα υπόλοιπα τυριά. Από την 15^η έως την 30^η ημέρα το ποσοστό του λίπους μειώθηκε και από την 30^η έως την 60^η ημέρα αυξήθηκε σε όλα τα τυριά (πίνακας 11.3).

Πίνακας 11.3: Μεταβολή του λίπους (%) κατά την ωρίμανση της φέτας (σύγκριση των διαφορετικών επεμβάσεων).

Λίπος (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιέργειών		
	A	B	Γ
1	21,68 ±0,536	21,26±0,421	21,48±0,570
15	19,28 ^a ±0,333	22,26 ^b ±0,677	23,44 ^b ±0,755
30	18,14 ^a ±0,882	20,11 ^{ab} ±0,670	22,49 ^b ±0,517
60	20,93 ±1,190	23,02 ±0,129	23,47 ±0,566

11.1.4. Μεταβολή του λίπους επί ξηρού (%)

Το (%) λίπος επί ξηρού από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα μειώνεται στο τυρί με την επέμβαση Α, στο τυρί με την επέμβαση Β παρουσιάζει μικρότερη μείωση ενώ στο τυρί με την επέμβαση Γ παρουσιάζει μικρή αύξηση. Από την 15^η έως την 30^η ημέρα και για τα τρία τυριά μειώνεται ενώ από την 30^η έως την 60^η το (%) λίπος επί ξηρού αυξάνεται. Τέλος το λίπος επί ξηρού (%) στις 60 ημέρες είναι μεγαλύτερο στο τυρί με την επέμβαση Β λαμβάνοντας την τιμή 49,90% σε σχέση με τα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Γ που οι τιμές τους είναι 48,90% και 48,02% αντίστοιχα. Οι διαφοροποιήσεις που παρουσιάζονται δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.4).

Πίνακας 11.4: Μεταβολή του λίπους επί ξηρού (%) κατά την ωρίμανση της φέτας.

Λίπος επί ξηρού (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	50,53±1,419	48,29±1,959	47,80±0,743
15	44,30±0,616	48,04±1,265	48,03±0,360
30	43,71±0,992	44,48±0,405	46,83±0,617
60	48,90±1,501	49,90±0,698	48,02±0,005

11.1.5. Μεταβολή της περιεκτικότητας σε αλάτι (%)

Η περιεκτικότητα σε αλάτι (%) ξεκινάει την 1^η ημέρα σε ποσοστό περίπου 0,09 % και παρουσιάζεται αυξανόμενη καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης και για τα τρία τυριά (πίνακας 11.5).

Πίνακας 11.5: Μεταβολή του αλατιού (%) κατά την ωρίμανση της φέτας.

Αλάτι (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	0,10±0,023	0,09±0,029	0,08±0,022
15	2,35±0,127	2,45±0,067	2,46±0,157
30	3,39±0,022	3,34±0,266	3,26±0,166
60	3,67±0,202	3,50±0,167	3,44±0,060

11.1.6. Μεταβολή της περιεκτικότητας σε (%) αλάτι επί της υγρασίας

Η περιεκτικότητα σε (%) αλάτι επί της υγρασίας ξεκινάει την 1^η ημέρα σε ποσοστό περίπου 0,17 % και παρουσιάζεται αυξανόμενη καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης και για τα τρία τυριά (πίνακας 11.6).

Πίνακας 11.6: Μεταβολή του (%) αλατιού επί της υγρασίας κατά την ωρίμανση της φέτας

Συντελεστής άλατος επί υγρασίας (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	0,18±0,043	0,17±0,055	0,16±0,040
15	4,16±0,222	4,58±0,069	4,80±0,211
30	5,81±0,155	6,08±0,337	6,26±0,198
60	6,39±0,276	6,48±0,307	6,34±0,392

11.1.7. Μεταβολή του ολικού αζώτου (%)

Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης οι μεγαλύτερες τιμές του ολικού αζώτου εμφανίζονται στο τυρί με την επέμβαση Γ σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά.

Το ολικό άζωτο (%) από την 1^η έως την 15^η ημέρα μειώνεται στο τυρί με την επέμβαση Α, παραμένει σχεδόν σταθερό στο τυρί με την επέμβαση Β, ενώ αυξάνεται στο τυρί με την επέμβαση Γ. Από την 15^η μέχρι την 30^η ημέρα το ολικό άζωτο (%) παρουσιάζει μείωση και για τα τρία τυριά ενώ την 60^η ημέρα παρουσιάζει αύξηση στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β και παραμένει σταθερό στο τυρί με την επέμβαση Γ. Οι παραπάνω διακυμάνσεις στο ολικό άζωτο (%) δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.7).

Πίνακας 11.7: Μεταβολή του ολικού αζώτου (%) κατά την ωρίμανση της φέτας

Ολικό Άζωτο (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	3,25±0,217	3,03±0,053	3,03±0,042
15	2,79±0,104	3,04±0,087	3,23±0,064
30	2,64±0,140	2,73±0,159	3,01±0,066
60	2,71±0,078	2,80±0,043	3,01±0,082

11.1.8. Μεταβολή της πρωτεΐνης (%)

Η μεταβολή της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι αντίστοιχη της μεταβολής του ολικού αζώτου. Από την 1^η έως την 15^η ημέρα μειώνεται στο τυρί με την επέμβαση Α, παραμένει σχεδόν σταθερή στο τυρί με την επέμβαση Β, αυξάνεται ενώ στο τυρί με την επέμβαση Γ. Από την 15^η μέχρι την 30^η ημέρα παρουσιάζει μείωση και για τα τρία τυριά ενώ την 60^η ημέρα παρουσιάζει αύξηση στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β και παραμένει σταθερό στο τυρί με την επέμβαση Γ. Οι παραπάνω διακυμάνσεις δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.8).

Πίνακας 11.8: Μεταβολή της πρωτεΐνης (%) κατά την ωρίμανση της φέτας

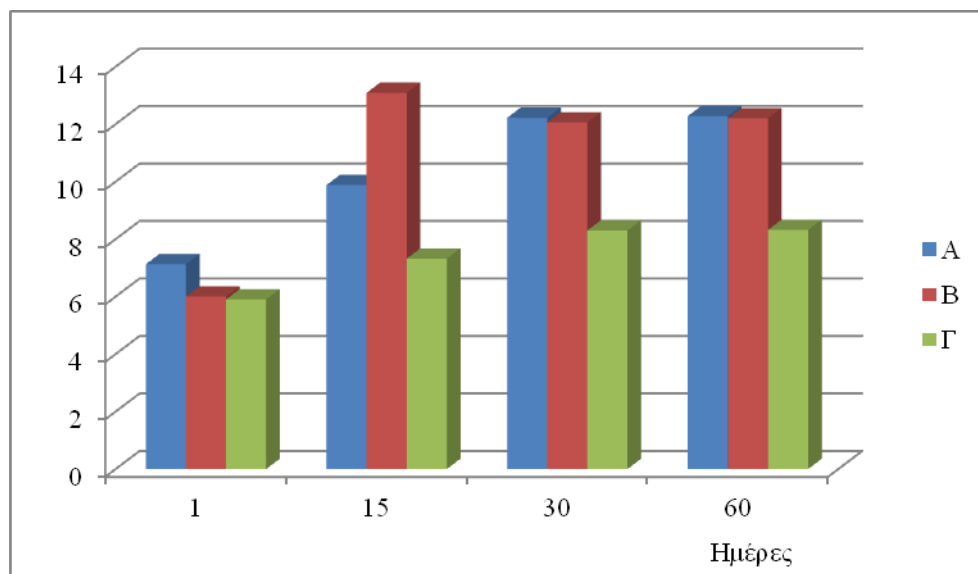
Πρωτεΐνη (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιέργειών		
	A	B	Γ
1	20,75±1,386	19,35±0,340	19,33±0,263
15	17,81±0,681	19,38±0,363	20,61±0,416
30	16,84±0,881	17,40±1,015	19,20±0,421
60	17,32±0,497	17,82±0,277	19,22±0,514

11.1.9. Μεταβολή του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA/TN

Το υδατοδιαλυτό άζωτο σε 12% TCA/TN στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Γ παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το τυρί με την επέμβαση Β από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα παρουσιάζει μεγάλη αύξηση φτάνοντας την τιμή 13,9% (μεγαλύτερη σε σχέση με τα άλλα δύο τυριά των οποίων οι τιμές στο ίδιο διάστημα είναι 9,88% για το τυρί με την επέμβαση Α και 7,32% για το τυρί με την επέμβαση Γ) στις 30 ημέρες μειώνεται στο επίπεδο του 12,06% και στις 60 ημέρες λαμβάνει την τιμή 12,2% (πίνακας 11.9, διάγραμμα 11.1).

Πίνακας 11.9: Μεταβολή του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA/TN κατά την ωρίμανση της φέτας

Συντελεστής ωρίμανσης (%)			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	7,12±0,945	6,00±1,972	5,90±0,295
15	9,88±0,428	13,09±2,339	7,32±0,225
30	12,22±2,611	12,06±2,063	8,30±0,141
60	12,28±1,238	12,2±0,010	8,32±1,500



Διάγραμμα 11.1: Μεταβολή του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA/TN κατά την ωρίμανση της φέτας

11.2. Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

Η μεταβολή του πληθυσμού των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια παρασκευής και ωρίμανσης των τυριών αποτελεί ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους, το οποίο βοηθάει τους μικροβιολόγους και τεχνολόγους τροφίμων να εκτιμήσουν καλύτερα την επίδραση αυτών των ομάδων στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τυριών.

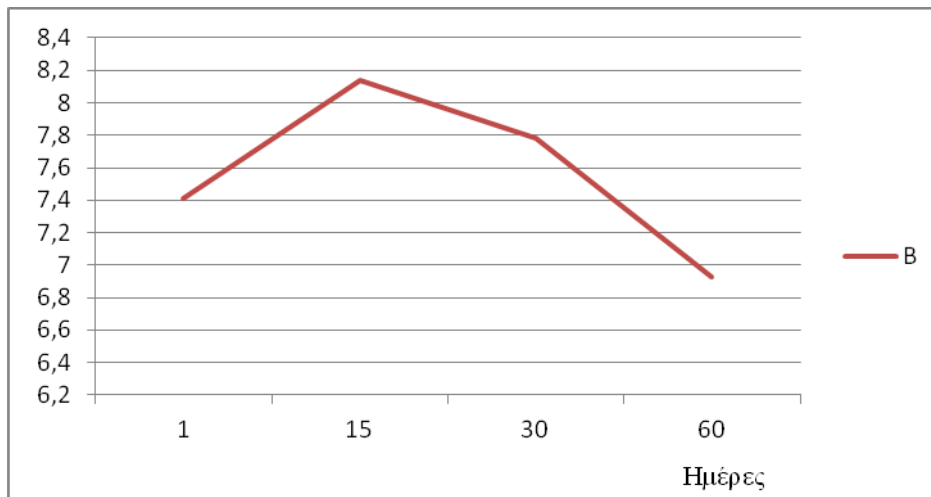
11.2.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια

11.2.1.1. *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565

Σε επιλεκτικό υπόστρωμα Rogosa agar 6% NaCl προσδιορίστηκε η παρουσία του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 στο τυρί με την επέμβαση Β. Ο μικροοργανισμός βρέθηκε στο τυρί καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Την 1^η ημέρα η τιμή του είναι 7,41 (log cfu/g) και την 15^η αυξάνεται σε 8,14 (log cfu/g). Από την 15^η μέχρι την 60^η ημέρα ο αριθμός των αποικιών του *Lactobacillus rennini* παρουσιάζει μικρή μείωση με τιμές 7,78 (log cfu/g) στις 30 και 6,93 (log cfu/g) στις 60 ημέρες αντίστοιχα. Οι διαφοροποιήσεις που αναφέρθηκαν δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.10, διάγραμμα 11.2).

Πίνακας 11.10: Μεταβολή του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

<i>Lactobacillus rennini</i> ACA-DC 565	
	Επεμβάσεις καλλιεργειών
Ημέρες	B
1	7,41 ± 0,102
15	8,14±0,010
30	7,78 ± 0,081
60	6,93 ± 0,611



Διάγραμμα 11.2: Μεταβολή του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

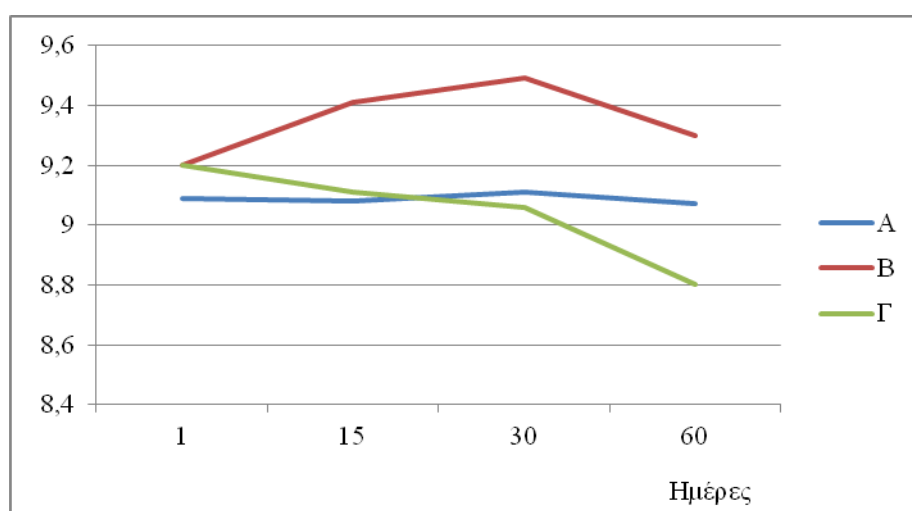
11.2.1.2. Θερμόφιλοι κόκκοι

Ο αριθμός των Θερμόφιλων κόκκων από την 15^η ημέρα μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος ($P < 0,05$) στο τυρί με την επέμβαση B σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά. Την 60^η ημέρα η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται μεταξύ του τυριού με την επέμβαση B (έχει την μεγαλύτερη τιμή) και του τυριού με την επέμβαση Γ (έχει την μικρότερη τιμή) (πίνακας 11.11, διάγραμμα 11.3).

Από την 1^η μέχρι την 30^η ημέρα στα τυριά με τις επεμβάσεις A και B ο αριθμός των θερμόφιλων κόκκων αυξάνεται και από την 30^η μέχρι την 60^η ημέρα μειώνεται. Στο τυρί με την επέμβαση Γ ο αριθμός των Θερμόφιλων κόκκων μειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης παρουσιάζοντας την μικρότερη τιμή την 60^η ημέρα (πίνακας 11.11, διάγραμμα 11.3).

Πίνακας 11.11: Μεταβολή των Θερμόφιλων κόκκων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας (σύγκριση των διαφορετικών επεμβάσεων).

Θερμόφιλοι κόκκοι			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	9,09±0,190	9,20±0,035	9,34±0,027
15	9,08 ^a ±0,013	9,41 ^b ±0,086	9,11 ^a ±0,028
30	9,11 ^a ±0,067	9,49 ^b ±0,078	9,06 ^a ±0,012
60	9,07 ^{ab} ±0,034	9,30 ^b ±0,147	8,80 ^a ±0,175



Διάγραμμα 11.3: Μεταβολή των Θερμόφιλων κόκκων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας (σύγκριση των διαφορετικών επεμβάσεων).

11.2.1.3. Θερμόφιλοι βάκιλλοι

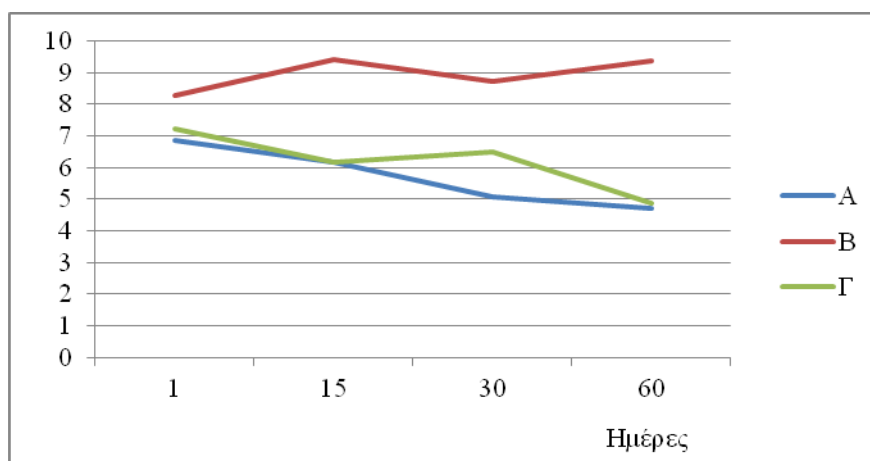
Ο αριθμός των θερμόφιλων βακίλλων από την 15^η ημέρα μέχρι και 60^η ημέρα είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος ($P < 0,05$) στο τυρί με την επέμβαση B σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά. Την 30^η ημέρα η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται μεταξύ του τυριού με την επέμβαση B (έχει την μεγαλύτερη τιμή) και του τυριού με την επέμβαση A (έχει την μικρότερη τιμή) (πίνακας 11.12).

Στα τυριά με τις επεμβάσεις A και B ο αριθμός των θερμόφιλων βακίλλων μειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στο τυρί με την επέμβαση B ο αριθμός

των θερμοφίλων βακίλλων από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα αυξάνεται, από την 15^η μέχρι την 30^η ημέρα μειώνεται και από την 30^η ημέρα μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης παρουσιάζει πάλι αύξηση (πίνακας 11.12, διάγραμμα 11.4).

Πίνακας 11.12: Μεταβολή των Θερμόφιλων βακίλλων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

Θερμόφιλοι βάκιλλοι			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	6,86 ± 0,325	8,27 ± 0,622	7,21 ± 0,080
15	6,16 ^a ± 0,500	9,40 ^b ± 0,282	6,16 ^a ± 0,350
30	5,09 ^a ± 0,351	9,22 ^b ± 0,106	6,51 ^{ab} ± 1,132
60	4,71 ^a ± 0,871	9,36 ^b ± 0,036	4,88 ^a ± 0,368



Διάγραμμα 11.4: Μεταβολή των Θερμόφιλων βακίλλων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

11.2.1.4. Μεσόφιλοι κόκκοι

Ο αριθμός των μεσόφιλων κόκκων από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα παρουσιάζει αύξηση στο τυρί με την επέμβαση A και μείωση στα υπόλοιπα τυριά. Από την 15^η μέχρι την 30^η ημέρα μειώνεται σε όλα τα τυριά, ενώ από την 30^η μέχρι το τέλος της ωρίμανσης αυξάνεται σε όλα τα τυριά. Οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.13).

Πίνακας 11.13: Μεταβολή των Μεσόφιλων κόκκων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

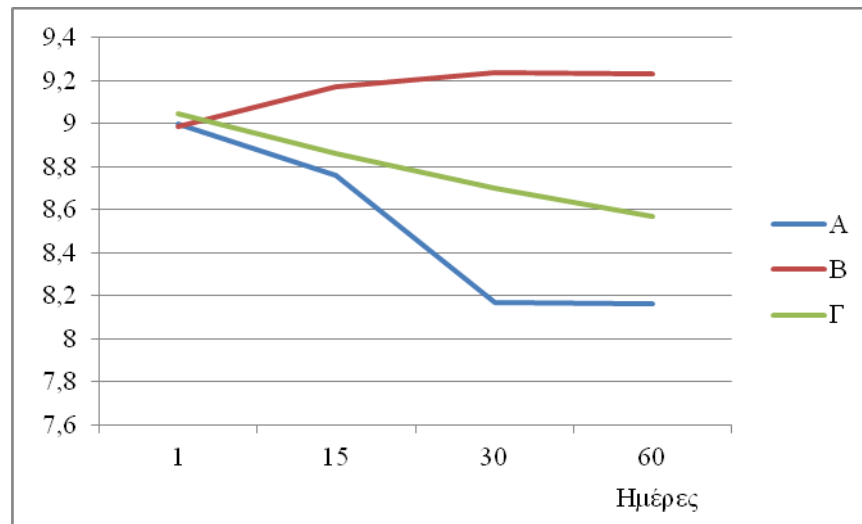
Μεσόφιλοι κόκκοι			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	8,98 ± 0,095	9,03 ± 0,152	9,21 ± 0,066
15	9,14 ± 0,060	8,64 ± 0,150	8,91 ± 0,127
30	8,92 ± 0,116	8,09 ± 0,480	8,77 ± 0,150
60	9,13 ± 0,042	9,11 ± 0,186	8,89 ± 0,135

11.2.1.5. Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB)

Ο αριθμός των NSLAB στα τυριά με τις επεμβάσεις A και Γ μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στο τυρί με την επέμβαση B ο αριθμός των NSLAB αυξάνεται από την 1^η μέχρι την 30^η ημέρα και κατόπιν παρουσιάζει μικρή μείωση μέχρι το τέλος της ωρίμανσης. Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης το τυρί με την επέμβαση B παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό NSLAB σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά (πίνακας 11.14, διάγραμμα 11.5).

Πίνακας 11.14: Μεταβολή των NSLAB (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

NSLAB			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	9,00 ± 0,133	9,01 ± 0,050	9,05 ± 0,055
15	8,76 ± 0,165	9,17 ± 0,082	8,86 ± 0,050
30	8,17 ± 0,345	9,24 ± 0,130	8,70 ± 0,130
60	8,16 ± 0,215	9,23 ± 0,265	8,57 ± 0,035



Διάγραμμα 11.5: Μεταβολή των NSLAB (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

11.2.2. Άλλα βακτήρια

11.2.2.1. Εντερόκοκκοι

Ο αριθμός των εντεροκόκκων από τη 1^η μέχρι την 30^η ημέρα μειώνεται και στα τρία τυριά. Από την 30^η μέχρι την 60^η ημέρα ο αριθμός των εντεροκόκκων παρουσιάζει αύξηση για τα τυριά με τις επεμβάσεις A και Γ, ενώ εμφανίζει περεταίρω μείωση στο τυρί με την επέμβαση B. Οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.15).

Πίνακας 11.15: Μεταβολή των Εντεροκόκκων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

Εντερόκοκκοι			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιέργειών		
	A	B	Γ
1	4,22 ± 0,666	4,20 ± 0,791	3,89 ± 1,100
15	2,87 ± 0,490	2,80 ± 0,327	1,43 ± 0,722
30	2,52 ± 0,320	2,69 ± 0,266	1,08 ± 0,573
60	2,63 ± 0,335	2,31 ± 0,517	1,82 ± 0,289

11.2.2.2. Μικρόκοκκοι

Ο αριθμός των μικρόκοκκων από την 1^η έως την 15^η ημέρα αυξάνεται στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β ενώ μειώνεται στο τυρί με την επέμβαση Γ. Από την 15^η μέχρι το τέλος της ωρίμανσης ο αριθμός των μικρόκοκκων μειώνεται όπου την 60^η ημέρα σε όλα τα τυριά είναι μηδενικός. Οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.16).

Πίνακας 11.16: Μεταβολή των Μικρόκοκκων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

Μικρόκοκκοι			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	1,13 ± 0,566	1,50±0,100	2,14±0,263
15	2,08 ± 1,041	1,89±0,500	1,39±0,939
30	1,42 ± 0,803	0,00±0,000	0,00±0,000
60	0,00 ± 0,000	0,00±0,000	0,00±0,000

11.2.2.3. Κολοβακτηρίδια

Ο αριθμός των κολοβακτηριδίων στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β αυξάνεται από την 1^η μέχρι την 30^η ημέρα, ενώ στο τυρί με την επέμβαση Γ ο αριθμός τους μειώνεται από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα και μειώνεται από την 15^η έως την 30^η ημέρα. Τέλος την 60^η ημέρα και στα τρία τυριά ο αριθμός των κολοβακτηριδίων είναι μηδενικός. Οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.17).

Πίνακας 11.17: Μεταβολή των Κολοβακτηριδίων (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

Κολοβακτηρίδια			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	0,00 ± 0,000	0,49 ± 0,493	3,48 ± 1,750
15	1,70 ± 1,700	1,67 ± 1,670	1,72 ± 1,720
30	1,74 ± 1,743	1,87 ± 1,873	1,92 ± 1,923
60	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000

11.2.2.4. Ζύμες

Ο αριθμός των ζυμών και στα τρία τυριά την 1^η ημέρα είναι μηδενικός. Από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα αυξάνεται και από την 15^η ημέρα μέχρι το τέλος της ωρίμανσης μειώνεται και στα τρία τυριά, ωστόσο οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (πίνακας 11.18)

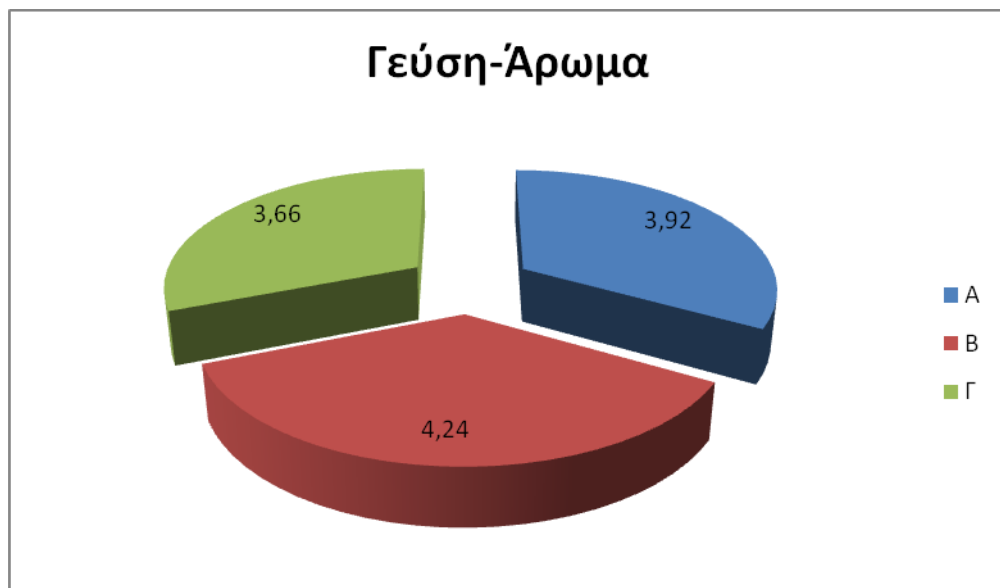
Πίνακας 11.18: Μεταβολή των Ζυμών (log cfu/g) κατά την ωρίμανση της Φέτας.

Ζύμες			
Ημέρες	Επεμβάσεις καλλιιεργειών		
	A	B	Γ
1	00,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
15	4,47 ± 0,158	4,33 ± 0,176	4,47 ± 0,365
30	2,80 ± 0,402	2,90 ± 0,302	2,14 ± 0,587
60	2,32 ± 0,543	2,01 ± 1,027	1,36 ± 0,756

11.3. Επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών οξυγαλακτικών καλλιεργειών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των ζυμώσιμων γαλακτοκομικών προϊόντων και ειδικότερα των τυριών αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο που βοηθά στην εκτίμηση της πιθανής επίδρασης των εναρκτηρίων καλλιεργειών ή της υπόλοιπης μικροχλωρίδας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των προϊόντων.

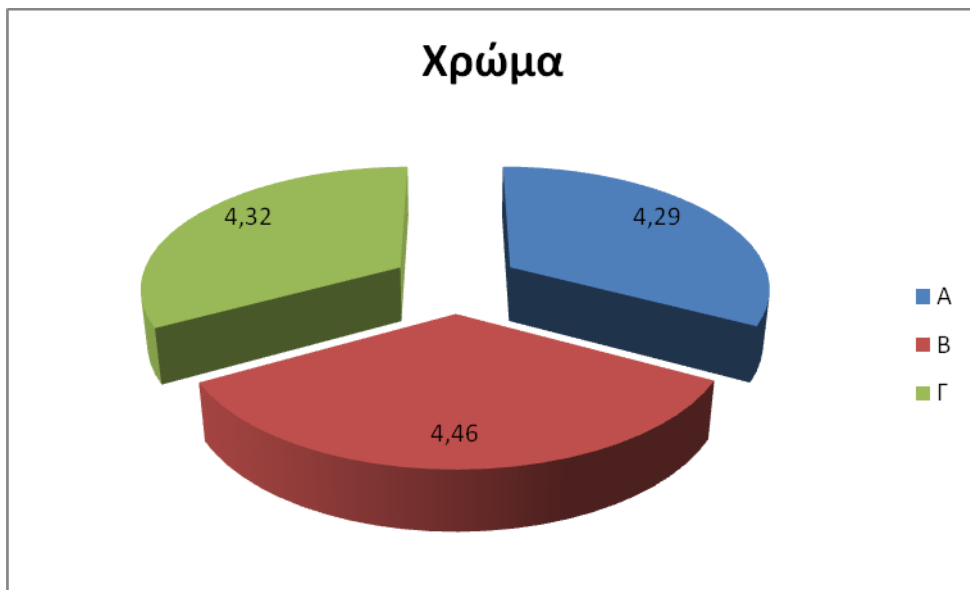
Η οργανοληπτική αξιολόγηση των τριών τυριών (Α, Β, Γ) της παρούσας μελέτης αφορά το άρωμα και τη γεύση, την συνεκτικότητα, το χρώμα και την συνολική αποδοχή σε βαθμολογική κλίμακα από 0-5. Το τυρί με την επέμβαση Β έλαβε μεγαλύτερη βαθμολογία σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά σε όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα (διάγραμμα 11.6, διάγραμμα 11.7, διάγραμμα 11.8, διάγραμμα 11.9).



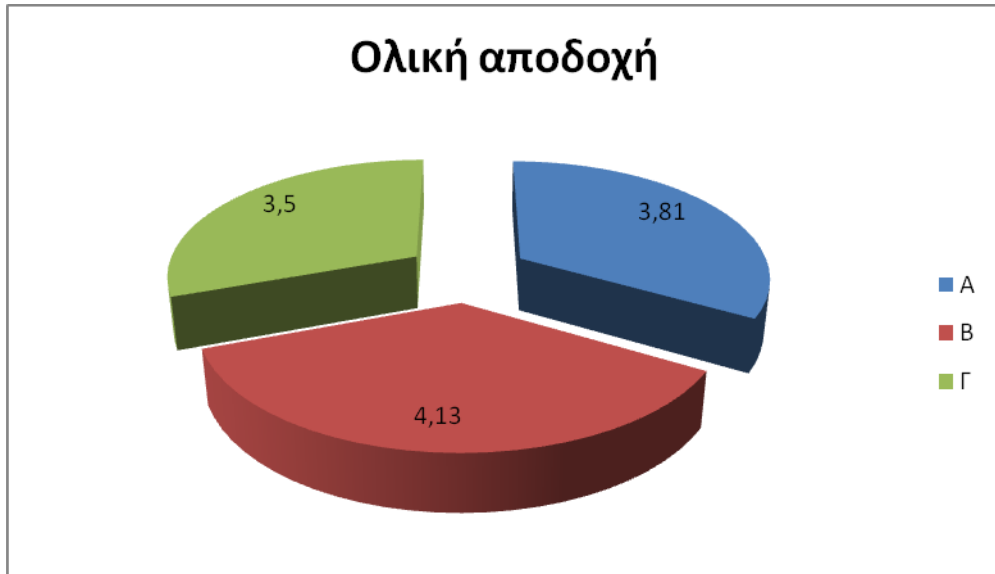
Διάγραμμα 11.6: Αξιολόγηση γεύσης και αρώματος (0-5)



Διάγραμμα 11.7: Αξιολόγηση συνεκτικότητας (0-5)



Διάγραμμα 11.8: Αξιολόγηση χρώματος (0-5)



Διάγραμμα 11.9: Αξιολόγηση ολικής αποδοχής (0-5)

12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέσα στις πρώτες 24 ώρες το pH όλων των τυριών παρουσίασε πτώση με αποτέλεσμα τη δεύτερη ημέρα να είναι κάτω του 5,0. Και οι τρεις οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν επηρέασαν σε μεγάλο βαθμό την πτώση του pH στα τυριά. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η πτώση αυτή συνεχίστηκε σε όλα τα τυριά ωστόσο το τυρί με την επέμβαση Α παρουσίασε μικρότερο ρυθμό μείωσης του pH σε σχέση με τα υπόλοιπα τυριά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η προσθήκη του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 στο τυρί με την επέμβαση Β και του *L. lactis ssp. cremoris* ACA-DC 0052 στο τυρί με την επέμβαση Γ ως συμπληρωματικές καλλιέργειες συνέβαλλαν στην αύξηση της οξυπαραγωγικής ικανότητας της εναρκτήριας καλλιέργειας.

Η υγρασία σε όλα τα τυριά μειώθηκε τις πρώτες 15 ημέρες. Στα τυριά με τις επεμβάσεις Β και Γ παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα μέχρι το τέλος της ωρίμανσης, δηλαδή ~53% και ~51% αντίστοιχα. Στο τυρί με την επέμβαση Α η υγρασία μετά τις 15 ημέρες παρουσίασε αυξητική τάση μέχρι τις 30 ημέρες και στη συνέχεια μειώθηκε, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης ήταν μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα τυριά. Η περιορισμένη αποβολή υγρασίας στο τυρί με την επέμβαση Α σχετίζεται άμεσα με τον ρυθμό πτώσης του pH στο τυρί αυτό, ο οποίος είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τα άλλα τυριά. Αντίθετα στο τυρί με την επέμβαση Γ επικρατεί αυξημένη στράγγιση κατά την ωρίμανση και συμπίπτει με τον αυξημένο ρυθμό πτώσης του pH. Το γεγονός αποδίδεται στην δράση της επιπρόσθετης οξυγαλακτικής καλλιέργειας *L. lactis ssp. cremoris* που δεν υπάρχει στα άλλα τυριά. Επίσης η αύξηση της υγρασίας στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης είναι σύνηθες φαινόμενο στη Φέτα και γενικότερα στα λευκά τυριά άλμης. Η ικανότητα των τυριών να παίρνουν ή να απελευθερώνουν νερό στην άλμη μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των πρωτεϊνών να συγκρατούν νερό στις χαμηλές θερμοκρασίες (Guerts *et al.*, 1974), στη διόγκωση των πρωτεϊνών κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης των τυριών (Abd El-Salam 1987) και στη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών και ιδιαίτερα εκείνων της αs1-καζεΐνης, που σχηματίζουν το δίκτυο των πρωτεϊνών του τυριού, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων ιονικών ομάδων που δεσμεύουν νερό (Creamer and Olson, 1982, Lawrence *et al.*,

1987). Τέλος, σύμφωνα με το Γενικό Χημείο του Κράτους (1998), η Φέτα ‘πρώτης’ ποιότητας έχει υγρασία <56%. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα τυριά με τις επεμβάσεις Β και Γ και οριακά όχι το τυρί με την επέμβαση Α που παρουσίασε υγρασία ~57 %.

Το ποσοστό του λίπους καθ’ όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης και ιδιαίτερα στις 15 και 30 ημέρες ήταν σημαντικά μικρότερο ($P < 0,05$) στο τυρί με την επέμβαση Α σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη υγρασία του συγκεκριμένου τυριού με αποτέλεσμα την μειωμένη ποσότητα στερεών συστατικών στο τυρί.

Όσον αφορά το λίπος επί ξηρού (%) παρουσίασε σε όλα τα τυριά αύξηση από την 30^η ημέρα μέχρι το τέλος της ωρίμανσης λαμβάνοντας τιμή μεγαλύτερη από την ελάχιστη τιμή (>43%) που πρέπει να έχει το τυρί Φέτα σύμφωνα με το Γενικό Χημείο του Κράτους (1998). Η περιεκτικότητα σε λίπος επί ξηρού είναι η δεύτερη παράμετρος μαζί με την υγρασία που λαμβάνεται υπ’ όψιν για την κατάταξη των τυριών σε ποιότητες. Η λιποπεριεκτικότητα είναι σημαντικός παράγοντας στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού (Katsiari and Voutsinas, 1994). Η μείωση της λιποπεριεκτικότητας στο τυρί με την επέμβαση Α από την 1^η μέχρι την 15^η ημέρα και σε όλα τα τυριά από την 15^η μέχρι την 30^η ημέρα, πιθανόν οφείλεται στη μικρή απώλεια λίπους από το τυρί μαζί με το τυρόγαλα κατά τη στράγγιση. Τέλος με δεδομένο ότι το λίπος κανονικά υδρολύεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης από τις λιπάσες των μικροοργανισμών, η αύξηση της τιμής του λίπους επί ξηρού που παρατηρήθηκε από την 30^η μέχρι το τέλος της ωρίμανσης, πιθανόν να οφείλεται στην αντίστοιχη μείωση άλλων συστατικών που διασπώνται σε πτητικά προϊόντα όπως πτητικά οξέα, αμμωνιακές ενώσεις, καρβονυλικοί ανυδρίτες (Manolkidis *et al.*, 1970a). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή μείωση της περιεκτικότητας σε ξηρά ουσία και κατ’ επέκταση την αύξηση του λίπους επί ξηρού.

Η περιεκτικότητα σε αλάτι (%) αυξήθηκε καθ’ όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης στα τρία τυριά και στις 60 ημέρες είχε τιμή ~3,50%. Η τιμή αυτή είναι ικανή να προφυλάξει τα τυριά από την ανάπτυξη των περισσότερων παθογόνων βακτηρίων και δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα των ενζύμων που συγκεντρώνονται στο τυρί (Litoroulou-Tzanetaki *et al.*, 1993). Είναι γνωστό ότι η περιεκτικότητα του τυριού σε

αλάτι επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή ανάπτυξη, καθώς και τη μικροβιακή και ενζυμική δραστηριότητα (Aly, 1995). Ωστόσο η τιμή αυτή είναι αρκετά μεγάλη για το τυρί Φέτα του οποίου η περιεκτικότητα σε αλάτι στις 65 ημέρες υπολογίζεται στο 2,80% (Βεϊνογλου *et al.*, 1969). Μικρές διαφορές παρουσιάστηκαν στην περιεκτικότητα σε αλάτι (%) μεταξύ των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και οφείλονταν κυρίως στις διαφορές στην υγρασία των τυριών, δεδομένου ότι ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος αλάτισης σε όλους τους συνδυασμούς και η περιεκτικότητα σε αλάτι της άλμης ήταν ίδια για όλα τα τυριά.

Την πορεία της περιεκτικότητας σε αλάτι (%) ακολούθησε και η περιεκτικότητα σε (%) αλάτι επί της υγρασίας. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση του άλατος στην άλμη είναι ισοδύναμη με τη συγκέντρωση του άλατος στο τυρί, όταν η τελευταία υπολογίζεται με βάση την υγρασία του τυριού και για να επιτευχθεί αυτή η ισορροπία απαιτούνται περίπου 3 εβδομάδες (Tukan and Humeid, 1991, Pappas *et al.*, 1996b).

Το ολικό άζωτο και αντίστοιχα η πρωτεΐνη παρουσίασε διακυμάνσεις μη στατιστικώς σημαντικές οι οποίες προφανώς οφείλονται στην πιθανή διαφυγή υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών λόγω εξισορρόπησης της άλμης με την υγρασία καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Τις τελευταίες ημέρες της ωρίμανσης η περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο και πρωτεΐνη αυξήθηκε ή παρέμεινε σταθερή στα τυριά. Όλα τα παραπάνω πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι η πρωτεόλυση προχωρεί με γρήγορους ρυθμούς στους 16°C (τις πρώτες 15 ημέρες) ενώ μετά την τοποθέτηση του τυριού Φέτα στους 5°C ο ρυθμός της μειώνεται (Vaforoulou *et al.*, 1989) αλλά και στην αποβολή στην άλμη των οροπρωτεϊνών, που έχουν παγιδευτεί στο τυρόπηγμα μετά την αρχική στράγγιση (Katsiari *et al.*, 2000). Επίσης μπορεί να οφείλεται στην αποβολή τυρογάλακτος, που συμπαρασύρει μια σημαντική ποσότητα του διαλυτού αζώτου (Manolkidis *et al.*, 1970b).

Το υδατοδιαλυτό άζωτο σε 12% TCA/TN σε όλα τα τυριά παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στο τυρί με την επέμβαση Β εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση τις πρώτες 15 ημέρες σε σχέση με τα υπόλοιπα τυριά (3πλασια αυτής του Α και 5πλασια του Γ). Η αύξηση αυτή απεικονίζει την αύξηση της πεπτιδασικής πρωτεόλυσης και κατ' επέκταση την ποσότητα των μεσαίων και μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων, η οποία είναι ιδιαίτερα μεγάλη, εάν λάβουμε υπ' όψη ότι ένα

μέρος των πολύ μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων διαφεύγουν στη άλμη (Polychroniadou and Vlachos, 1979). Η αύξηση του κλάσματος αυτού οφείλεται κυρίως στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων των οξυγαλακτικών βακτηρίων και μάλιστα ενζύμων ενεργών σε χαμηλό pH (Manolkidis *et al.*, 1970b, Tzanetakis *et al.*, 1995). Παρόμοια αύξηση στο κλάσμα του διαλυτού αζώτου έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Litoroulou-Tzanetaki *et al.*, 1993, Pappas *et al.*, 1996a).

Μελετώντας την μεταβολή των πληθυσμών των διαφόρων μικροοργανισμών στα τυριά, σημαντικές είναι οι παρατηρήσεις που αφορούν τον *Lactobacillus rennini*. Η χρήση του υποστρώματος Rogosa agar με 6% NaCl ως επιλεκτικού, σε κάθε δείγμα του τυριού με την επέμβαση Β (που τον περιείχε ως πρόσθετη καλλιέργεια) και η παραμονή του στους 30 °C για 6 ημέρες αναερόβια, είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μικρών χαρακτηριστικών αποικιών του *Lactobacillus rennini*. Η επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή χρώσης κατά Gram και με την μικροσκοπική παρατήρηση, ενέργειες που επαλήθευσαν την παρουσία του *Lactobacillus rennini* καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Ωστόσο ο πληθυσμός του μικροοργανισμού παρουσίασε μεγάλη αύξηση την 15^η ημέρα φτάνοντας τον αριθμό 8,14 (log cfu/g).

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι το στέλεχος *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 στο τυρί με την επέμβαση Β συνέβαλλε στην αύξηση της πεπτιδασικής πρωτεόλυσης. Ο πληθυσμός του *Lb. rennini* αυξήθηκε σημαντικά στο διάστημα της προωρίμανσης των 15 ημερών κατά 1 λογ. μονάδα συμβάλλοντας ταυτόχρονα σημαντικά και στην ανάπτυξη της θερμοφιλης οξυγαλακτικής χλωρίδας με την απελευθέρωση των απαραίτητων ελεύθερων αμινοξέων για την αναπτυξή τους στο διάστημα αυτό στις 9 λογ. μονάδες όπου διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη την διάρκεια ωρίμανσης. Αντιθέτως, στα τυριά Α και Γ ο πληθυσμός της θερμοφιλης οξυγαλακτικής χλωρίδας ήταν σε χαμηλα αρχικά επίπεδα (6 λογ.) και μειώθηκε περαιτέρω στις 4 λογ. μονάδες στο τέλος της ωρίμανσης.

Στην παρακάτω φωτογραφία απεικονίζεται η μικροσκοπική παρατήρηση του *Lactobacillus rennini*, η οποία λήφθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος (φωτογραφία 12.1)



Φωτογραφία 12.1: Μικροσκοπική παρατήρηση *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565.

Σε όλα τα τυριά, οι γαλακτοβάκιλλοι και οι λακτόκοκκοι βρίσκονταν σε σχετικά υψηλούς πληθυσμούς από την πρώτη ημέρα της τυροκόμησης. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των οξυγαλακτικών στελεχών να αναπτύσσονται γρήγορα μετά την προσθήκη τους στο προς τυροκόμηση γάλα (Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992, Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Η φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης, τόσο των λακτοβακίλλων όσο και των λακτοκόκκων, συμπίπτει με την ταχεία πτώση του pH της καλλιέργειας. Είναι γνωστό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν τόσο μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος, όσο μεγαλύτερη είναι η ανάπτυξη τους (Olivares *et al.*, 1993). Στη συνέχεια, μετά από μια γρήγορη αύξηση, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων μειωνόταν επίσης γρήγορα, πιθανόν εξαιτίας του χαμηλού pH της καλλιέργειας. Η χρήση των πρόσθετων συμπληρωματικών καλλιιεργειών φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό τόσο των λακτοβακίλλων όσο και των λακτοκόκκων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν την κυρίαρχη ομάδα στα ώριμα λευκά τυριά άλμης. Η συνδυασμένη δράση της υψηλής οξύτητας και της υψηλής αλατότητας, στα τυριά αυτά, ασκεί εκλεκτική επίδραση στις ομάδες των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα σε σχέση με τους λακτόκοκκους, να διατηρούν το κυτταροπλασματικό τους pH σε επίπεδα υψηλότερα από το μέσο στο οποίο βρίσκονται και η ανάπτυξή τους ευνοείται σε υψηλή οξύτητα (Nannan και Hutkins, 1991). Κάτω όμως από ένα επίπεδο, το κύτταρο δεν μπορεί να διατηρήσει το ενδοκυτταρικό του pH σε επιθυμητά επίπεδα και τότε χάνει τη δραστηριότητά του ή και τη ζωικότητά του (Hutkins και Nannan, 1993).

Ο αριθμός των θερμοφίλων κόκκων από την 15^η ημέρα μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος στο τυρί με την επέμβαση Β σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά. Το γεγονός αυτό συμπίπτει με τη αύξηση του στελέχους *Lactobacillus rennini* την ίδια περίοδο στο τυρί αυτό. Η διαπίστωση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο *Lactobacillus rennini* συνέβαλλε στην ενίσχυση των θερμοφίλων κόκκων. Στο τυρί με την επέμβαση Γ οι θερμοφιλοι κόκκοι (*Streptococcus thermophilus*) βρέθηκαν να μειώνονται σημαντικά ($P < 0,05$) καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι θερμοφιλοι κόκκοι είναι ευαίσθητοι στην υψηλή αλατότητα (Michels *et al.*, 1979) και σε $pH < 5,0$ (Nannan and Hutkins, 1991, Mansour and Alais, 1973). Κατά συνέπεια ο πληθυσμός τους μειώθηκε στο τυρί αυτό κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης λόγω χαμηλότερου pH έναντι των άλλων τυριών. Στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β ο αριθμός των θερμοφίλων κόκκων παρέμεινε σε σχετικά υψηλά επίπεδα αποδεικνύοντας μεγάλη αντοχή και ανθεκτικότητα στην πτώση του pH.

Είναι γνωστό ότι, τα θερμοφιλα στελέχη αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 20-50°C με άριστη τους 40-42°C. Κατά συνέπεια αναπτύσσονται γρήγορα κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης όταν η θερμοκρασία είναι 32°C, στη συνέχεια όμως καθώς η θερμοκρασία μειώνεται προς τους 16°C ο πολλαπλασιασμός τους επιβραδύνεται και τέλος σταματά. Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Γ των οποίων ο αριθμός των θερμοφίλων βακίλλων μειώθηκε σταδιακά όσο προχωρούσε η ωρίμανση. Ωστόσο, στο τυρί με την επέμβαση Β αριθμός των θερμοφίλων βακίλλων από την 1^η ημέρα βρέθηκε σε μεγάλους πληθυσμούς και διατηρήθηκε σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στο γεγονός αυτό είναι δυνατόν να συμβάλλει η παρουσία του γαλακτοβάκιλλου *Lactobacillus rennini* στο τυρί αυτό. Συγκεκριμένα την

15^η ημέρα ο αριθμός των θερμοφίλων βακίλλων παρουσίασε αύξηση στο τυρί με την επέμβαση Β γεγονός που συμπίπτει με την αύξηση του *Lactobacillus rennini* την ίδια χρονική περίοδο στο τυρί αυτό. Μπορεί λοιπόν να θεωρηθεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός είχε ενισχυτική επίδραση, μέσω μεταβολιτών που παράγει, στην ανάπτυξη και επιβίωση των θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων σε όλη την διάρκεια της ωρίμανσης.

Όσον αφορά τους μεσόφιλους κόκκους ως παρατήρηση μπορεί να αναφερθεί η μικρή αύξηση που παρουσίασαν σε όλα τα τυριά στις 60 ημέρες, ενώ μέχρι τότε η πορεία τους ήταν πτωτική. Γενικότερα, τα μεσόφιλα στελέχη, αναπτύσσονται καλά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και ιδιαίτερα σε θερμοκρασίες γύρω από τους 15°C, οπότε παρουσιάζουν τις υψηλότερες μέσες λογαριθμικές τιμές μετά την 15^η ή την 30^η ημέρα ή και ακόμα αργότερα.

Τα NSLAB δεν επηρεάζονται σημαντικά από τις συνθήκες που επικρατούν στο τυρί και είναι ικανά να αναπτυχθούν κατά την διάρκεια παρασκευής και ιδιαίτερα κατά την διάρκεια ωρίμανσης του τυριού. Ωστόσο, χρειάζονται ενέργεια για να αναπτυχθούν. Οι πιθανές πηγές ενέργειας περιλαμβάνουν συστατικά του γάλακτος, προϊόντα μεταβολισμού και προϊόντα λύσης βακτηρίων. Σύμφωνα με τον Thomas (1987) υποστήριξε ότι το γαλακτικό οξύ που παράγεται με την ζύμωση της λακτόζης από την καλλιέργεια εκκίνησης, είναι δυνατό να αποτελεί πηγή ενέργειας για τα NSLAB. Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης το τυρί με την επέμβαση Β παρουσίασε μεγαλύτερο αριθμό NSLAB σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά και συγκεκριμένα εμφάνισε αύξηση τις πρώτες 30 ημέρες της ωρίμανσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, στο τυρί με την επέμβαση Β ο αριθμός των στελεχών της εναρκτήριας καλλιέργειας, δηλαδή οι γαλακτοβάκιλλοι και οι λακτόκοκκοι, βρέθηκαν και αυτοί σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα τυριά, γεγονός που συσχετίστηκε με την παρουσία του *Lactobacillus rennini*. Έτσι, τα προϊόντα του μεταβολισμού τους αποτέλεσαν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των NSLAB.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα βακτήρια δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων.

Οι εντερόκοκκοι μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ωστόσο για τα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Γ παρουσίασαν μία μικρή αύξηση στο τέλος της ωρίμανσης. Η εμφάνισή τους στα τυριά που παρασκευάστηκαν, οφείλεται πιθανόν στην παρουσία τους στο γάλα που τυροκομήθηκε. Η ανθεκτικότητα των

μικροοργανισμών αυτών τόσο στην παστερίωση όσο και στις συνθήκες που επικρατούν στα τυριά άλμης, εξηγεί τη διατήρηση του πληθυσμού τους κατά τη διάρκεια της ωρίμασης. Η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών σε λευκά τυριά άλμης έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές με τον τελικό πληθυσμό τους να κυμαίνεται μεταξύ 10^4 και 10^6 cfu/ml στο ώριμο προϊόν (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992, Litoroulou-Tzanetaki *et al.*, 1993). Σε άλλες όμως περιπτώσεις έχουν αναφερθεί και χαμηλότεροι πληθυσμοί εντεροκόκκων. Οι Tzanetakis και Litoroulou (1992), ανέφεραν ότι οι εντεροκόκκοι δεν αποτελούσαν σημαντική ομάδα στα τυριά φέτα και τελεμέ (10^2 - 10^4 cfu/ml), αφού οι γαλακτοβάκιλλοι ήταν η κυρίαρχη ομάδα.

Ο αριθμός των μικρόκοκκων και των κολοβακτηριδίων παρουσίασε μία άνοδο στην αρχή της ωρίμανσης στα τυριά με τις επεμβάσεις Α και Β, ωστόσο στο τέλος της ωρίμανσης, σε όλα τα τυριά ήταν μηδενικός.

Οι ζύμες και στα τρία τυριά την 1^η ημέρα δεν ανιχνεύτηκαν ενώ μετά από 15 ημέρες έφτασαν σε πληθυσμούς 10^4 cfu/ml. Ύστερα ακολούθησαν πτωτική πορεία. Πιθανώς ο πληθυσμός τους αυξήθηκε, γιατί οι συνθήκες που επικρατούν στη Φέτα επιτρέπουν την ανάπτυξή τους και κυρίως των αλόφιλων στελεχών (Kaminarides and Laskos, 1992, Vivier *et al.*, 1994). Θεωρείται ότι οι ζύμες συνεισφέρουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τυριών και έχει βρεθεί ότι τα είδη που βρίσκονται στο τυρί είναι χαρακτηριστικά του τυροκομείου στο οποίο παρασκευάζεται (Westall and Filtenborg, 1998). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν μείωση του πληθυσμού των ζυμών στη Φέτα (Mallatou *et al.*, 1994, Tzanetakis *et al.*, 1995).

Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση το τυρί με την συμπληρωματική καλλιέργεια *Lactobacillus rennini* (B) έλαβε μεγαλύτερη βαθμολογία σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τυριά για το άρωμα και τη γεύση, την συνεκτικότητα, το χρώμα και την συνολική αποδοχή του. Χαρακτηρίστηκε από ευχάριστη και ελαφρά όξινη γεύση, με καλή συνεκτικότητα και λίγα ανοίγματα, ενώ το χρώμα του χαρακτηρίστηκε λευκό (τυπικό χρώμα της Φέτας). Ωστόσο και τα τρία τυριά θεωρήθηκαν αλμυρά γεγονός που προκύπτει από την αυξημένη περιεκτικότητα σε αλάτι (%) όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Συμπερασματικά, ο *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565, είναι ένας ομοζυμωτικός μεσόφιλος γαλακτοβάκιλλος Gram+, όπου χαρακτηρίζεται από μικρή ικανότητα παραγωγής οξέος στο γάλα αλλά με μεγάλη ικανότητα παραγωγής πτητικών

ενώσεων. Η προσθήκη αυτού του μικροοργανισμού ως συμπληρωματική καλλιέργεια κατά την παρασκευή του τυριού Φέτα είχε σαν αποτέλεσμα να επηρεάσει ορισμένα χαρακτηριστικά του τυριού αυτού. Αρχικά μία σημαντική παρατήρηση είναι ότι ο μικροοργανισμός αυτός παρέμεινε ενεργός στη Φέτα καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, εμφανίζοντας την μεγαλύτερη ανάπτυξη στις 15 ημέρες. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ο *Lactobacillus rennini* είχε ενισχυτική επίδραση στην επιβιωσιμότητα των θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων σε όλη την διάρκεια της ωρίμανσης με το πληθυσμό να παραμένει στις 9 λογ. μονάδες στα ώριμα τυριά, σε αντίθεση με τα άλλα τυριά όπου ο πληθυσμός τους μειώθηκε σημαντικά στις 4 λογ. μονάδες. Ομοίως, ο πληθυσμός των μη εναρκτήριων οξυγαλακτικών γαλακτοβακίλλων (NSLAB) διατηρήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στο συγκεκριμένο τυρί (B). Επίσης, στο τυρί με την επέμβαση B η αυξημένη ανάπτυξη του *Lactobacillus rennini* μαζί με την σημαντική αύξηση θερμοφίλων οξυγαλακτικών και μη εναρκτήριων οξυγαλακτικών (NSLAB) βακτηρίων τις πρώτες 15 ημέρες της ωρίμανσης συμπίπτουν και με την αυξημένη τιμή του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% TCA. Η διαπίστωση αυτή υποδηλώνει ότι το στέλεχος αυτό, συνέβαλλε στην αύξηση της πεπτιδασικής πρωτεόλυσης εκφρασμένης ως υδατοδιαλυτό άζωτο % (TCA-TN) και κατ' επέκταση της ποσότητας των μεσαίων και μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων. Η πεπτιδασική πρωτεόλυση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρείται ως μία από τις πιο σημαντικές διεργασίες κατά την ωρίμανση για την παραγωγή ενώσεων, που συμβάλουν στη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης.

Παρασκευάστηκε λοιπόν μία Φέτα με τα παραπάνω ιδιαίτερα μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά η οποία όχι μόνο έγινε αποδεκτή αλλά επιδοκιμάστηκε και ως προς τα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά γεγονός που αποδεικνύει ότι ο μικροοργανισμός *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική καλλιέργεια στην παρασκευή του τυριού Φέτα.

Βιβλιογραφία

- Abd El-Salam M. H., 1987. Domiati and Feta type cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, ed. P. F. Fox. *Elsevier Applied Science*, London, p. 277-309.
- Abd El-Salam M. H. and Alichanidis E., 2004. Cheese varieties ripened in brine. In P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee (Ed.) 3rd ed. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 2, pp. 227-249).
- Abd El-Salam M. H., Allichanidia E. and Zerfiridis G. K., 1994. Domiati and Feta Type Cheeses”, in Fox, P.F., eds, “*Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol 2, Major Cheese Groups*.” *Chapman and Hall*, London, U.K.
- Ali A. E., Andrews A. T., Cheeseman G. C., 1980a. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. *J. Dairy Res.*, 47:371-382.
- Ali A. E., Andrews A. T., Cheeseman G. C., 1980b. Factors influencing casein distribution in cold-stored milk and their effects on cheese-making parameters. *J. Dairy Res.*, 47: 383-391. Abd El-Salam MH (1987). Domiati and Feta type cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, ed. P. F. Fox. *Elsevier Applied Science*, London, p. 277-309.
- Alichanidis E, Anifantakis EM, Polychroniadou A, Nanou M (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *J. Dairy Res.* 51:141-147.
- Aly M.E., 1995. An Attempt for producing low-sodium Feta-type cheese. *Food Chem.* 52:295-299.
- Anifantakis E. M., 1980. Influence de la penicilline sur la technologie et la qualite du fromage Feta fabrique a partir du lait de brebis. *Lait* 60:525-536.
- Anifantakis E. M., 1991a. Traditional Feta cheese. In: *Feta and Related Cheese*, eds. R. K. Robinson and A.Y. Tamime. *Ellis Horwood limited, England*, p. 49-69.

- Anifantakis E. M., 1991b. Greek Cheeses a tradition of centuries, *National Dairy Committee of Greece*.
- Arizcum C., Barcina Y., Torea P., 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. Isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 38:17-24.
- Asteri I. A., Robertson N., Kagkli D. M., Andrewes P., Nychas G., Coolbear T., Holland R., Crow V. and Tsakalidou E., 2009. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses – A pool of novel species and starters. *Int. Dairy Journal* 19: 595-604.
- Axelsson L. T., 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology, in: Lactic Acid Bacteria, Vol. 1, eds Seppo Salminen and Atte von Wright, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-63.
- Banks J., 1990. The quality of milk in relation to cheese manufacture. *J. Soc. Dairy Technol.*, 43:35-39.
- Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. and Cogan T. M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259-74.
- Beresford T. and Williams A., 2004. The Microbiology of Cheese Ripening. In: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, eds. *CHEESE. Chemistry, Physics and Microbiology. (3rd edition)* London: Elsevier Academic Press, pp 287-317.
- Bertozzi L. and Panari G., 1993. Cheeses with Appellation d'Origine Contrôlée (AOC): factors that affect quality. *International Dairy Journal* 3: 297-312.
- Bockelmann W. and Hoppe Seyler T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow_s and goat_s milk. *Int. Dairy J.*, 11: 307–314.
- Bockelmann W., Krusch U., Engel G., Klijn N., Smit G. and Heller K.J., 1997. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* 41: 208–212.

- Casey M. G., Hani J. P., Gruskovnjak J., Schaeren W. and Wechsler D., 2006. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyere PDO cheese. *Lait* 86: 407-414.
- Chenoll E., Macian M. C. and Aznar R., 2006. *Lactobacillus reninni* sp. Nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 449-452.
- Christiani G. and Monnet V., 2001. Food micro-organisms and aromatic ester synthesis. *Sci. Aliments*, 21: 211–230.
- Cocaign-Bousquet M., Garriques C., Loubiere P., Lindley N.D., 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 253-267.
- Cogan T. M., 1996. History and taxonomy of starter cultures. In: Dairy Starter Cultures, ed. T. M. Cogan and J. P. Accolas, *VCH Publishers, Inc*, New York, p. 1-23.
- Cogan T. M., Beresford T.P., Steele J., Broadbent J., Shah N. P. and Ustunol Z., 2007. Invited Review: Advances in Starter Cultures and Cultured Foods. *J. Dairy Sci.* 90: 4005-4021.
- Collins Y. F., McSweeney P. L. H, Wilkinson M. G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13:841-866.
- Creamer LK, Olson NF (1982). Reological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 47:631-636, 646.
- Davis G, 1965. Cheese, Basic Technology. *J. and A. Churchill Ltd. London Vol. I*, pp. 1-51.
- Doeven M. K., Kok J. and Poolman B., 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganism. *Mol Microbiol*, 57(3):640-649.
- Dumont J. P., Delespaul G., Miguot B., Adda J., 1977. Influence des bacteries psychrotropes sur les qualites organoleptiques de fromages a pate molle. *Lait* 57:619-630.

- Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V., Tinail N. and Litopoulou-Tzanetaki E., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *J. Appl. Microbiol.* 91: 861-870.
- El-Din B.B., El-Soda M., Ezzat N., 2002. Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enteococci strains isolated from Egyptian dairy products. *Lait* 82: 289-304.
- El Soda M., Law J., Tsakalidou E. and Kalantzopoulos G., 1995. Lipolytic activity of cheese-related microorganisms and its impact on cheese flavour. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, pp. 1823-1847.
- FAO/HHO, 2000. Codex Alimentarius, Milk and milk products, 2nd ed., Vol. 12, Rome pp:22-26.
- Fairbairn D. J, Law B. A., 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria. Their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53:139-177.
- Foda F. A., Hammond E. G., Reinbold G. W., Hotchkiss D. K., 1974. Role of fat in flavour of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 57: 1137-1142.
- Fox P. F., Law J., Mc Sweeney P. L. H. and Wallace J., 1999. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1, Chapter 10: *Biochemistry of cheese ripening* (Aspen Publication).
- Fox P. F., Lucey J. A., Cogan T. M., 1990. Glycolysis and related reactions during manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29:237-253.
- Fox P. F., Mc Sweeney P. L. H., Lynch C. M., 1998. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Austr. J. Dairy Technol.*, Vol 53, pp 83-89.
- Fox P. F., Wallace J. M., Morgan S., Lynch C. M., Niland E. J. and Tobin J., 1996. Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 271-297.
- Garrity G. M. and Holt J. G., 2001. The road map to the manual. In: abaoone DR, Castenholz RW (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York.

- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R. and Rizzello C. G., 2007. The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of 121 cheese. In: Bart C. Weimer, ed. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge: *Woodhead Publishing Limited*, pp 121-156.
- Gobbetti M., Fox P. F., Stepaniak L., 1997. Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum*-2739. *J. Dairy Sci.* 80:3099-3106.
- Griffiths M. W., 1989. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychotropic bacteria during growth in milk. *Milchwissenschaft* 44:539-543.
- Guerts T. J., Walstra P., Mulder H., 1974. Water binding to milk protein, with particular referenceto cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 28:46-72.
- Hansen E. B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119-241.
- Holland R., Coolbear T., 1996. Purification of trybutyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* E8. *Journal of Dairy Research* 63: 131-140
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. and Schillinger U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S-373S.
- Juillard V., Foucaud C., Desmazeaud M., Richard J., 1996. Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Lait* 76:13-24.
- Juillard V, Lebars D, Kunji E. R. S., Konings W. N., Gripon J. C., Richard J., 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3024-3030.
- Kaminarides S. E., Laskos N. S., 1992. Yeasts in factory brine of Feta cheese. *Austr. J. Dairy Technol.* 47:68-71.
- Kandler O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.

- Kandler O. and Weiss N., 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Beijerinck: Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp 1209-1234.
- Katsiari M. C., Alichanidis E., Voutsinas L. P., Roussis I. G., 2000. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 10:635-646.
- Katsiari M. C., Voutsinas L. P., 1994. Manufacture of low-fat Feta cheese. *Food Chem.* 49:53-60.
- Kosikowski F.V. 1982. Cheese and Fermented Milk Foods. *F.V. Kosikowski and Associates*. New York, pp. 90-91.
- Kosikowski F. V. and Mistry, V. V., 1997. Origins and principles. Cheese and Fermented Milk Foods, vol. 1. N.Y.F.V. Kosikowski and Associates, Brooktondale.
- Kunji E. R. S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N., 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.
- Law B. A., 1997. Microbiology of cheese and fermented milk. Second edition. *Blackie academic and professional*. London, UK.
- Law J., Haandrikman A., 1997. Proteolytic-Enzymes of Lactic-Acid Bacteria. *Int. Dairy J.*, 7:1-11.
- Law B. A., Seggin E., Sharpe M. E., 1976. Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone-supplemented whey media. *J. Dairy Res.* 43:291-300.
- Lawrence R. C., Creamer L. K., Gilles J., 1987. Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1748-1760.
- Limsowtin G., 1992. Inhibition of starter cultures. *Austr. J. Dairy Technol.*, 47:100-102.
- Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., 1992. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.*, 9:13-19.

- Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., 1993. Effect of the type of lactic starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* 10:31-41.
- Lou S. Q., Holland R., and Crow V. L., 2004. Esters and their biosynthesis in fermenter dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14 (11): 923-945.
- Mallatou H., Pappas C. P., Voutsinas L. P., 1994. Manufacture of Feta cheese from cheep's milk, goat's milk or mixtures of these milks. *Int. Dairy J.* 4:641-664.
- Manolkidis C., Polychroniadou A., Alichanidis E., 1970b. Study of proteolysis during ripening of Teleme cheese. *Lait* 50:128-135.
- Manolkidis C., Polychroniadou A., Alichanidis E., 1970a. Variation dans la composition du fromage Teleme au cours de sa maturation. *Lait* 50:38-48.
- Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., McSweeney P. L. H., Fox P. F., Lucey J. A., Jordan K. N., Cogan T. M., 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 3: 613-634.
- Mansour R., Alais C., 1973. Etude du salage et de l' affinage du fromage en saumure. *III Aspect bacteriologique. Lait* 53:137-145.
- Marilley L. and Casey M. G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 139-159.
- McSweeney P. L. H., Sousa M. J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80:293-324.
- Michels P. A. M., Michels J. P. J., Boonstra J., Konings W. N., 1979. Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiol. Lett.* 5:357-364 Cited by: Axelsson LT (1993).
- Molimard P. and Spinnler H. E., 1996. Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184.

- Monnet V, Condon S, Cogan T. M., Gripon J.C., 1996. Metabolism of starter cultures. In: Dairy starter cultures, ed. T. M. Cogan and J. P. Accolas, *VCH Publishers, Inc*, New York, p. 47-99.
- Nannen N. L., Hutkins R. W., 1991. Intracellular pH effects in Lactic - Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 74:741-746.
- Olivares J. C., Rua B., Susaeta I., Aldamizechevarria P., 1993. Growth-kinetics of several lactic bacteria useful as starter for ewes cheese production. *Biotech. Letters* 15:1071-1076.
- Pappas C. P., Kondyli E., Voutsinas L. P., Mallatou H., 1996a. Effects of starter level, draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of Feta cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 49:73-78.
- Pappas C. P., Kondyli E., Voutsinas L. P., Mallatou H., 1996b. Effects of salting method and storage time on composition and quality of Feta cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 49:113-118.
- Peterson S.D., Marshall R.T., 1990. Nonstarter Lactobacilli in Cheddar cheese: A review. *J.Dairy Sci.*, 73:1395-1410.
- Polychroniadou A., Vlachos J., 1979. The free amino acids of Teleme cheese. *Lait* 59:234-243.
- Postma P. W., Lengeler J. W. and Jacobson G. R., 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3):543-594. Pritchard GG, Coolbear T (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:179-206.
- Requena T., Pelaez C., Desmazeaud M. J., 1991. Characterization of Lactococci and Lactobacilli isolated from semihard goats cheese. *J. Dairy Res.* 58:137-145.
- Salminen S. and von Wright A., 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Schiffmann A. P., Schutz M., Wiesner H. U., 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk .1. The Influence of antibiotic residues

- in bulk milk on lactic-acid production of starter cultures. *Milchwissenschaft* 47:712-715.
- Skeie S. and Ardo Y., 2000. Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Leb. Wissensch. Technol.*, 33: 499-505.
- Smith G., Smith B. A. and Engels W. J. M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:591-610.
- Stanton C., Gardiner G., Lynch P. B., Collins J. K., Fitzgerald G. and Ross R.P., 1998. Probiotic Cheese. *Int. Dairy Journal* 8: 491-496.
- Tamime A. Y., 1990. Microbiology of "Starter Cultures". In: R.K. Robinson, ed. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products. (2nd edition)* London: Elsevier Science Publishers LTD, pp 131-201.
- Tan P. S. T., Chapotchartier M. P., Pos K. M., Rousseau M., Boquien C. Y., Gripon J. C., Konings W. N., 1992. Localization of peptidases in Lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:285-290.
- Thomas T. D, Pritchard G. G., 1987. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews* 46:245-268.
- Tsakalidou E., Kalantzopoulos G., 1992. Purification and partial characterization of an esterase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis* strain ACA-DC 127. *Lait* 72: 533-543.
- Tsakalidou E., Manolopoulou E., Tsilibari V., Georgalaki M., Kalantzopoulos G., 1993. Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal* 47: 145-150.
- Tukan S. K., Humeid M. A., 1991. Salt and moisture relationships in brined cheese. *Austr. J. Dairy Technol.* 46:85-87.
- Turner K. W., Lawrence R. C. and Levriere J., 1986. A microbiological specification for milk for aseptic cheese making. *N. Z. J. Dairy Sci.* 21: 249-254.

- Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., 1992. Changes in numbers and kinds of Lactic-Acid Bacteria in Feta and Teleme. 2 Greek cheeses from ewes milk. *J. Dairy Sci.* 75:1389-1393.
- Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., 1995. The quality of white-brined cheese from goats milk made with different starters. *Food Microbiol.* 12:55-63.
- Vafopoulou A., Alichanidis E., Zerfiridis G., 1989. *Journal of Dairy Research* 56: 385.
- Vafopoulou A., Litopoulou E., Tzanetakis N., 1990. Mikrobiologie-Aliments-Nutrition 8: 53.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., 1996. Esterase activities of cell-free extracts from 'wild' strains of leuconostocs and heterofermentative lactobacilli isolated from traditional Greek cheese. *Letters in Applied Microbiology* 23: 376-370.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. and Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium*, pp. 408-414.
- Visser, S., 1991. Symposium: Proteolytic enzymes and cheese ripening. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science* 76: 329-350.
- Visser S., 1993. Proteolytic-enzymes and cheese ripening. Proteolytic-enzymes and their relation to cheese ripening and flavor. An overview. *J. Dairy Sci.*, 76:329-350.
- Vivier D., Rivemale M., Reverbel J. P., Ratomahenina R., Galzy P., 1994. Study of the growth of yeasts from feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 22:207-215.
- Walstra P. and Jenness R., 1984. Dairy Chemistry and Physics (John Wiley & Sons Publication).
- Walstra P., Noomen A. and Geurts T. J., 1993. Dutch type varieties. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Fox, P., Ed.), Chapman & Hall, London., vol. 2, pp. 39-82.

- Walter H. E. and Hagrove R. C., 1972. Cheese of the World. *Dover publications*. Inc. New York.
- Westall S., Filtenborg O., 1998. Yeast occurrence in Danish Feta cheese. *Food Microbiol.* 15:215-222.
- Yvon M. and Rijnen L., 2001. Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11: 185-201.
- Ανυφαντάκης Ε., 1993, Τυροκομία, Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
- Ανυφαντάκης Ε., 2004. Τυροκομία, Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
- Ανυφαντάκης Ε., 1998. Ελληνικά τυριά, Αθήνα: Εκδόσεις Κύτταρο.
- Αποστολόπουλος Κ. και Φωτόπουλος Χ., 1999. Τα μεσογειακά προϊόντα ως παραδοσιακά ελληνικά προϊόντα και το μέλλον των μηχανισμών στηριξής τους. *Αθήνα: Υπουργείο γεωργίας*, σελ. 239.
- Βάκρου Α., Φωτόπουλος Χ. και Μάττας, 1999, «Φέτα», κεφ.10, «Τα μεσογειακά προϊόντα ως παραδοσιακά ελληνικά προϊόντα και το μέλλον των μηχανισμών στηριξης τους, ΕΘΙΑΓΕ, εκδόσεις Υπουργείου Γεωργίας, Αθήνα, σελ 336.
- Βασταρδής Ι., 1989. Φυσικχημικές ιδιότητες τυριών άλμης. Μεταπτυχιακή διατριβή Γ.Π.Α.
- Βεϊνογλου Β., Καλατζόπουλος Γ., Σταμέλος Ν., Ανυφαντάκης Ε., 1969. Δελτιο Αγροτικής Τραπεζής 168/1.
- Βουδούρης Ε., Δραϊνάς Κ., Ρούσσης Ι., Σαρρή Χ., 1986. Τελική αναφορά του προγράμματος “Μελέτη εξωκυτταρικών πρωτεολυτικών και λυπολυτικών ενζύμων από ψυχρότοφα βακτήρια και οι επιδράσεις τους στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα”. Υπουργείο Έρευνας και Τεχνολογίας.
- Γαζέλας Εμ., Καλδής Π., Μιχαλόπουλος Γ., Παπαγεωργίου Κ., Πατσή Π., Τσουκαλάς Στ., 1992. *Έρευνα της Ελληνικής αγοράς τυριών και βουτύρου*. Αθήνα: Αγροτική Τράπεζα της Ελλάδος, σελ:129.
- Γενικό Χημείο του Κράτους, 1988. ΦΕΚ, τεύχος Β, Νο 892, σελ 8400. Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα.

ΕΦΕΤ, 2011. Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων. Γενικός οδηγός για την εφαρμογή συστήματος βάσει των αρχών του HACCP σε μικρές γαλακτομικές επιχειρήσεις.

Ζερφυρίδης Γ., 2001, «Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος-Τυροκομία», Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ.332.

Κ.Τ.Π., 1998. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα 1998.

Καμινारीδης Στ., Μοάτσου Γ., 2009. *Γαλακτοκομία*, Εκδόσεις Έμβρυο.

Μάντης Α. Ι., 2000. Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του. Αφοι Κυριακίδη. Θεσ/νίκη.

Πηγές στο διαδίκτυο

www.codexalimentarius.net

www.icap.gr