

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ε. ΠΑΥΛΙΔΗΣ
Πτυχιούχος Γεωπόνος «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων»

«Απομόνωση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός δυνητικών προβιοτικών
οξυγαλακτικών βακτηρίων από τυριά της περιοχής Basilicata, Νότια Ιταλία»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αθήνα, 2013

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Ε. ΠΑΥΛΙΔΗ
Πτυχιούχος Γεωπόνος «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων»

«Απομόνωση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός δυνητικών προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων από τυριά της περιοχής Basilicata, Νότια Ιταλία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης : 05 Ιουνίου 2013

Εξεταστική Επιτροπή

1. Δροσινός Ελευθέριος
2. Σκανδάμης Παναγιώτης.
3. Τσακαλίδου Έφη, (Υπεύθυνη καθηγήτρια).

«Απομόνωση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός δυνητικών προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων από τυριά της περιοχής Basilicata, Νότια Ιταλία»

ISBN

© Δημήτριος Ε. Παυλίδης (d.e.pav@windowslive.com)

«Η έγκριση της παρούσης Μεταπτυχιακής Διατριβής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2).

Αφιερωμένη στον φίλο μας «Γιάννη», που σαν πριν ένα χρόνο έφυγε από κοντά μας.

Abstract

In the present research, 20 different cheese samples from different varieties and periods of ripening, which produced in the Region of Basilicata (Southern Italy), collected from different producers. They belong to the big families of 'pecorino' (Canestrato di Moliterno, Pecorino Abriola, Filiano, Lucano) and 'pasta-filata' (Caciocavallo Lucano, Caciocavallo Podolico, Caciocavallo Silano, Cacio Bucato, Provolone Lucano, Provolone semipicante, Scamorza). The microbial diversity of the isolated strains and the typical physicochemical composition determined utilizing standard analytical techniques, with the combination of classical methods and sequence-analysis. A modified mMRS agar, which contained Bromophenol blue and Cysteine was used for the differential measurement of the lactic acid bacterium in mixed culture, and therefore to lead to the molecular identification. Furthermore, it was measured the population of mesophilic NSLAB lactobacilli and the population of the mesophilic lactic acid bacteria (LAB), which were probably able to survive under treatment with simulated gastric juice. Finally, in selected strains some functional properties have been examined, such as the resistance in bile salts, the aggregation ability and the BSH-activity (Bile Salt Hydrolysis).

The pasta-filata cheeses, compared to pecorino cheese, have shown higher values in all the measured parameters. The water activity values for 'pecorino' cheeses ranged from 0.874 to 0.902 and for 'pasta-filata' from 0.903 to 0.956, while the pH from 4.97 to 5.25 and from 4.95 to 5.6 respectively. Also, a wide range of values noticed for the percentage of moisture, with 26.5-49.0% for 'pasta-filata' unlike to 28.6-32.3% for 'pecorino' and almost proportional the percentage of salt in moisture (s/m) with 2.55-7.38% and 5.97-10.25% respectively. In addition, high populations of mesophilic NSLAB lactobacilli found in both types ranging from 4.8-7.4 log₁₀cfu/g in pecorino cheeses and in pasta-filata 6.2 to 8.6 log₁₀cfu/g. Almost equal numbers had the mesophilic LAB, which were able to survive after the treatment with simulated gastric juice both in pecorino and pasta-filata, with the first reaching numbers from 4.8 to 7.4 log₁₀cfu/g and the second from 4.7 to 8.5 log₁₀cfu/g.

Totally, 325 colonies with different morphologies were isolates randomly from the last plate dilution. However, 27 (8.3%) were cat⁽⁺⁾ and 14 (4.3%) did not manage to survive in MRS broth pH 6.8. Randomly amplified polymorphic DNA-PCR was applied in 284 strains with the primer M13 for lactobacilli (78.8%) and the primer coc-1 for the cocci (18.3%). However, 8 (2.9%) show no band detection. The "Unweighted paired-group with arithmetic averages" method (UPGMA) and clustering algorithm was applied in order to discriminate the strains, whereas better classification was appeared only for lactobacilli. Generally, 162 different RAPD-profiles were obtained and these unique strains identified with species specific-PCR for *Lactobacillus casei* group and *Lb. plantarum* group, with ITS-PCR and with amplification and sequence of the gene of 16S rRNA region, as well as with combination of phenotypic and genotypic methods.

The identification of the species showed the LAB microflora was consisted of 48.5% (134 strains) with bacteria of *Lactobacillus casei* group (*Lb.*

paracasei/rhamnosus). The other identified strains were other species of lactobacilli and also some cocci.

As with pasta-filata cheeses, most of the strains successfully identified as *Lactobacillus paracasei* and *Lb. rhamnosus*. More specifically, 11 strains from 216 identified as *Enterococcus faecium* (5.1%), 4 as *Lactobacillus buchneri* (1.85), 1 as *Lb. curvatus* (0.5%), 13 as *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii* (6.0%), 48 as *Lb. fermentum* (22.22%), 13 as *Lb. parabuchneri* (6.0%), 78 as *Lb. paracasei* (36.1%), 30 as *Lb. rhamnosus* (13.9%), 2 as *Lb. spp* (Lspp), 3 as *Lactococcus lactis* (Lcl), 1 as *Lb. casei* (Lca), 1 as *Lb. plantarum* (0.5%), 4 as *Lb. rhamnosus/paracasei* (1.8%), 5 as *Pediococcus acidilactici* (2.3%), 1 as *P. pentosaceus* (0.5%), and 1 as *Streptococcus thermophilus* (0.5%). Regarding the composition of 'pecorino' cheese (60 strains), 1 (1.66%) was *Enterococcus durans*, 13 (21.66%) *E. faecium*, 1 (1.66%) *E. faecium/faecalis*, 1 (1.66%) *E. mundtii*, 1 (1.66%) *Lactobacillus brevis*, 19 (31.66%) *Lb. paracasei*, 6 (10%) *Lb. rhamnosus*, 11 (18.33%) *Pediococcus acidilactici*, 6 (10%) *P. pentosaceus*, and 1 (1.66%) *Streptococcus macedonicus*.

The assessment of potential functional properties (potential probiotic action) applied in identified strains of the species *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, and *Lb. plantarum*. The majority of the strains (64%) were unable to grow even in the minimum concentration of bile salts (0.3%). Also, the percentage of the *Lb. rhamnosus* and *Lb. paracasei* strains were almost equal. Unfortunately, only seven from the strains manage to grow under all the concentrations of biles tested. Furthermore, 54 (60%) did not of ability of aggregation neither in MRS broth pH 6.8, nor under microscopic examination, whereas 25 (27.8%) showed positive results under both tests. The percentage of positive strains in the test of BSH-activity was almost the same for both most numerous specie (*Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus*) that was checked, with around 39% of the strains of each specie to be positive. Finally, the only strain *Lb. plantarum* was the most resistant in all concentration of bile salts, showed remarkable BSH-activity, but not any aggregation ability.

In conclusion the differential modified mMRS-BPB substrate was a useful tool to drive the molecular identification with PCR-based molecular techniques, without be easy the differential counting of colonies in mixed culture and the combination of a specific colony with a specific specie.

Περίληψη

Στην παρούσα επιστημονική έρευνα μελετήθηκαν 20 διαφορετικά δείγματα τυριών από ποικιλίες οι οποίες παρασκευάστηκαν στην περιφέρεια «Basilicata» της Νότιας Ιταλίας, και ανήκουν στους τύπους ‘pecorino’ (*Canestrato di Moliterno*, *Pecorino Abriola*, *Filiano*, *Lucano*) και ‘pasta-filata’ (*Caciocavallo Lucano*, *Caciocavallo Podolico*, *Caciocavallo Silano*, *Provolone Lucano*, *Provolone semipicante*, *Scamorza*), διαφορετικών παραγωγών και χρόνων ωρίμανσης. Η μικροβιακή ποικιλότητα των στελεχών που απομονώθηκαν και η τυπική φυσικοχημική σύσταση προσδιορίστηκαν με τη χρήση προτύπων αναλυτικών τεχνικών, με συνδυασμό κλασσικών μεθόδων και ανάλυση αλληλουχίας. Χρησιμοποιήθηκε επίσης τροποποιημένο mMRS agar το οποίο περιείχε Κυανούν της Βρωμοφαινόλης και Κυστεΐνη για τη διαφορική καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μικτή καλλιέργεια, και να οδηγήσει τη μοριακή ταυτοποίηση. Καταμετρήθηκε επίσης ο NSLAB πληθυσμός των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων, όπως και ο πληθυσμός των μεσόφιλων οξυγαλακτικών που πιθανώς επιβιώνει κατά τη διέλευση στο γαστρικό σωλήνα. Τέλος, σε επιλεγμένα στελέχη εξετάστηκαν ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες όπως η αντοχή σε χολικά άλατα, η ικανότητα συσσωμάτωσης και η δραστηριότητα υδρόλυσης των χολικών αλάτων.

Τα τυριά pasta-filata συγκριτικά με τα pecorino έδειξαν μεγαλύτερες τιμές όπως σε όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν. Οι τιμές της ενεργότητα νερού στα τυριά ‘pecorino’ κυμάνθηκαν από 0.874 έως 0.902 και στα ‘pasta-filata’ από 0.903 ως 0.956, ενώ το pH από 4.97 έως 5.25 και 4.95 με 5.6 αντίστοιχα. Ακόμη μεγάλος εύρος τιμών είχε το % υγρασίας 26.5-49.0% για τα pasta-filata εν αντιθέση του άλλου των pecorino με 28,6-32.3%, και σχεδόν αναλογικά το %αλατιού στη υδατική φάση 2.55-7.38% και 5.97-10.25% αντίστοιχα. Υψηλοί πληθυσμοί μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων βρέθηκαν με τα δε pecorino να κυμαίνονται από 4.8-7.4 $\log_{10}\text{cfu/g}$ και τα pasta-filata 6.2-8.6 $\log_{10}\text{cfu/g}$. Πιθανόν να επιβιώνουν κατά τη διέλευση στο γαστρικό σωλήνα 4.8-7.4 $\log_{10}\text{cfu/g}$ και 4.7-8.5 $\log_{10}\text{cfu/g}$ αντίστοιχα.

Συνολικά απομονώθηκαν 325 αποικίες, εκ των οποίων οι 27 (8.3%) ήταν *cat*⁽⁺⁾ και 14 (4.3%) δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε MRS broth pH 6.8. Εφαρμόστηκε η τεχνική RAPD-PCR σε 284 στελέχη με τους εκκινητές M13 για γαλακτοβακίλλους (78.8%) και *coc-1* για τους κόκκους (18.3%). 8 (2.9%) από τα στελέχη δεν ενισχύθηκαν. Με τη χρήση UPGMA κατάφεραν να διαχωριστούν τα στελέχη, ενώ καλύτερη ταξινόμηση παρουσιάστηκε μόνο για τους γαλακτοβάκιλλους. Λήφθησαν 162 διαφορετικά RAPD-προφίλ, και τα μοναδικά στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν με multiplex-PCR για το *Lactobacillus casei* group, και *Lb. plantarum* group, ITS-PCR, με ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου του 16S rRNA όπως και με συνδυασμό φαινοτυπικών και γενοτυπικών μεθόδων.

Η ταυτοποίηση των ειδών έδειξε ότι ο οξυγαλακτικός πληθυσμός αποτελείται κατά 48.5% (134 στελέχη) από βακτήρια του *Lactobacillus casei* group (*Lb. paracasei/rhamnosus*). Τα άλλα ταυτοποιηθέντα ανήκουν σε άλλα είδη γαλακτοβάκιλλων και κόκκων. Όσον αφορά τυριά τα pasta-filata, τα περισσότερα στελέχη ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς σαν *Lactobacillus paracasei* και *Lb. rhamnosus*.

Συγκεκριμένα 11 στελέχη από τα 216 ταυτοποιήθηκαν ως *Enterococcus faecium* (5.1%), 4 ως *Lactobacillus buchneri* (1.85), 1 ως *Lb. curvatus* (0.5%), 13 ως *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii* (6.0%), 48 ως *Lb. fermentum* (22.22%), 13 ως *Lb. parabuchneri* (6.0%), 78 ως *Lb. paracasei* (36.1%), 30 ως *Lb. rhamnosus* (13.9%), 2 ως *Lb. spp* (Lspp), 3 ως *Lactococcus lactis* (Lcl), 1 ως *Lb. casei* (Lca), 1 ως *Lb. plantarum* (0.5%), 4 ως *Lb. rhamnosus/paracasei* (1.8%), 5 ως *Pediococcus acidilactici* (2.3%), 1 ως *P. pentosaceus* (0.5%), και 1 ως *Streptococcus thermophilus* (0.5%). Όσον αφορά τη σύσταση των 'pecorino' τυριών (από 60 ταυτοποιήσεις) 1 (1.66%) ήταν *Enterococcus durans*, 13 (21.66%) *E. faecium*, 1 (1.66%) *E. faecium/faecalis*, 1 (1.66%) *E. mundtii*, 1 (1.66%) *Lactobacillus brevis*, 19 (31.66%) *Lb. paracasei*, 6 (10%) *Lb. rhamnosus*, 11 (18.33%) *Pediococcus acidilactici*, 6 (10%) *P. pentosaceus*, και 1 (1.66%) *Streptococcus macedonicus*.

Η αξιολόγηση πιθανών λειτουργικών ιδιοτήτων (δυννητικής προβιοτικής δράσης) έγινε σε ταυτοποιημένα στελέχη των ειδών *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, και *Lb. plantarum*. Η πλειοψηφία των στελεχών (64%) καθέστη ανίκανη να αναπτυχθεί και να σχηματίσει αποικίες ακόμη και στην ελάχιστη συγκέντρωση των χολικών αλάτων (0.3%). Τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών *Lb. rhamnosus* και *Lb. paracasei* ήταν σχεδόν ίδια. Μόλις επτά από τα στελέχη κατάφεραν να αναπτυχθούν κάτω από όλες τις συγκεντρώσεις χολικών αλάτων που δοκιμάστηκαν. Τα 54 (60%) δεν έδειξαν συσσωμάτωση (aggregation) είτε στον σωλήνα MRS broth pH 6.8, είτε κάτω από μικροσκοπική παρατήρηση, ενώ 25 (27.8%) έδειξαν θετική δοκιμή κάτω και από τα δυο τεστ. Το ποσοστό των θετικών στελεχών στην δοκιμή της υδρόλυσης των χολικών αλάτων είναι σχεδόν ίδια για τα δυο πιο πολυάριθμα στελέχη που ελέγχθηκαν (*Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus*) με περίπου το 39% των στελεχών θετικά. Τέλος το στέλεχος *Lb. plantarum* ήταν το πιο ανθεκτικό κατά τον έλεγχο αντοχής σε χολικά άλατα σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ παρουσίασε και δραστηριότητα-BSH, αλλά δεν έδειξε ικανότητα συσσωμάτωσης.

Εν κατακλείδι το διαφορικό υπόστρωμα mMRS-BPB αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο οδήγησης της μοριακής ταυτοποίησης με μοριακές μεθόδους βασισμένες στην PCR, χωρίς να είναι εύκολη η διαφορική καταμέτρηση σε μίγμα αποικιών. Επίσης δεν καθέστη δυνατός ο ακριβής συνδυασμός συγκεκριμένης αποικίας με συγκεκριμένο είδος.

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε μέσω του προγράμματος “Socrates-Erasmus” στο εργαστήριο «Βιομηχανικής Μικροβιολογίας» του Πανεπιστημίου “Università degli studi della Basilicata (UNIBAS)”, στην Potenza της Ιταλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου Έφη Τσακαλίδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου πρόσφερε την ευκαιρία να διεκπεραιώσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εξωτερικό. Επίσης την ευχαριστώ για τη συνεχή στήριξη της κατά την παραμονή εκεί, όπως και για τις υποδείξεις πάνω στη συγγραφή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Eugenio Parente, καθηγητή «Μικροβιολογίας Τροφίμων», «Βιομηχανικής και Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας» του Πανεπιστημίου UNIBAS της Ιταλίας, για την αποδοχή του στην εργαστηριακή του ομάδα, για τη γνώση που μεταλαμπάδευσε και εμπειρία που μου προσέφερε. Ευχαριστώ επίσης την καθηγήτρια Annamaria Riciardi, την ερευνήτρια Tereza Zotta, όπως και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (Rocco Ianiello) για τη φιλοξενία τους και την βοήθεια τους. Ευχαριστώ οφείλω επίσης στην μετά-διδασκατορική φοιτήτρια Angela Guidone για τη βοήθεια της τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο, όσο και σε θεωρητικό παρέχοντας συμβουλές, επεξηγήσεις σε τυχόν απορίες, όπως και γνώση σε όργανα του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Ελευθέριο Δροσινό και Παναγιώτη Σκανδάμη, καθηγητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου, που απεδέχθησαν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κρίση της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής.

2.6.2. In-vitro δραστηριότητα-BSH	59
2.7.3. Ικανότητα συσσωμάτωσης.....	60
2.8. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	60
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	
3.1. Φυσικοχημικές παράμετροι.....	61
3.1.1. Ενεργότητα νερού (a_w).....	62
3.1.2. pH.....	62
3.1.3. Υγρασία.....	64
3.1.4. Περιεκτικότητα σε αλάτι.....	65
3.2. Καταμέτρηση πληθυσμών.....	67
3.2.1. Μεσόφιλοι NSLAB γαλακτοβάκιλλοι (Rogosa agar).....	67
3.2.2. Μεσόφιλα Οξυγαλακτικά βακτήρια (mMRS-BPB agar).....	70
3.2.3. Σύγκριση πληθυσμών μεταξύ των δυο υποστρωμάτων.....	73
3.2.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων της καταμέτρησης.....	76
3.3. Απομόνωση αποικιών και βελτιστοποίηση του mMRS-BPB.....	77
3.4. Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων αποικιών.....	79
3.4.1. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων.....	79
3.4.2. Γενοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών.....	80
3.4.2.1. Διαφοροποίηση των στελεχών με RAPD-PCR.....	80
3.4.2.1.1. Διαφοροποίηση γαλακτοβακίλλων με RAPD-PCR.....	81
3.4.2.1.2. Διαφοροποίηση κόκκων με RAPD-PCR.....	89
3.4.2.2. Ταυτοποίηση των στελεχών με PCR μεθόδους.....	92
3.4.2.2.1. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “ <i>casei</i> group”.....	92
3.4.2.2.2. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “ <i>plantarum</i> group”.....	94
3.4.2.3. Ταυτοποίηση δυνητικών στρεπτοκόκκων (ITS-PCR).....	95
3.4.2.4. Ταυτοποίηση στελεχών με ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου του 16S rRNA.....	98
3.4.2.5. Ταυτοποίηση στελεχών με συνδυασμό μεθόδων.....	101
3.5. Κατανομή ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων ανά ποικιλία τυριού.....	101
3.5.1. Κατανομή ειδών LAB στις ποικιλίες ‘ <i>pasta-filata</i> ’.....	103
3.5.2. Κατανομή ειδών LAB στις ποικιλίες ‘ <i>pecorino</i> ’.....	109
3.5.3. Στατιστική επεξεργασία και ομαδοποίηση των δειγμάτων τυριών.....	115
3.6. In vitro λειτουργικές ιδιότητες επιλεχθέντων στελεχών.....	117
3.6.1. In vitro αντοχή σε χολικά άλατα.....	117
3.6.2. In vitro Δραστηριότητα-BSH.....	119
3.6.3. Ικανότητα συσσωμάτωσης.....	121
3.7. Αξιολόγηση της εφαρμογής του υποστρώματος mMRS-BPB.....	121
4. Συμπεράσματα.....	128
5. Βιβλιογραφία.....	130
6. Παράρτημα.....	137
6.1. Υλικά για μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων.....	137
6.2. Προετοιμασία προσομοιωμένου γαστρικού υγρού (S1).....	137
6.3. Προετοιμασία mMRS-BPB agar.....	138

6.3.1. Προετοιμασία των διαλυμάτων Κυανού της Βρωμοφαινόλης και Κυστεΐνης.....	138
6.4. Αντιδραστήρια.....	139
6.4.1. Αντιδραστήρια για την παραλαβή του DNA των LAB.....	139
6.4.2. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της PCR.....	139
6.4.3. Αντιδραστήρια για ηλεκτροφόρηση.....	140
6.5. Δενδρογράμματα RAPD-PCR για κάθε είδος τυριού χωριστά.....	141
6.5.1. Δενδρογράμματα RAPD-PCR με M13.....	141
6.5.2. Δενδρογράμματα RAPD-PCR με τον εκκινητή coc-1.....	150
6.6. Πηκτές Αγαρόζης κατά την ταυτοποίηση των στελεχών.....	152
6.6.1 Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με multiplex-PCR, casei group.....	152
6.6.2. Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με multiplex-PCR, plantarum group..	158
6.6.3. Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με ITS-PCR.....	158
6.7. Ποσοστιαία σύσταση στελεχών.....	160
6.8. Στατιστική Ανάλυση πάνω σε mMRS-BPB.....	161
6.9. Ερμηνευτικό λεξικό και συντομεύσεις.....	166

1. Εισαγωγή

Η Ιταλία είναι από τις σημαντικότερες χώρες παγκοσμίως στην παραγωγή τυριών από αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο, και βουβαλίσιο γάλα (Coda et al., 2006). Με εξαίρεση τη Γαλλία, παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες και ταυτόχρονα διαθέτουν τη μεγαλύτερη ποικιλία τυριών (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO, Food and Agriculture Organization) το 2001 παρήχθησαν στην Ιταλία 1,020,712 τόνοι τυριών (www.FAO.org). Για την Ελλάδα η παραγωγή το ίδιο έτος έφτασε τους 236,200 tn. Έρευνα του ίδιου Οργανισμού το 2000 φέρει την Ελλάδα στην πρώτη θέση της κατά κεφαλήν κατανάλωσης τυριού ετησίως, με μέσο όρο τα 25.4kg /άτομο και την Ιταλία να κατέχει υψηλή θέση με 20.5kg/άτομο/έτος

Τα τυριά περιέχουν ευρεία ποικιλία θρεπτικών συστατικών, όπως αμινοξέα, υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών και βιταμίνες έχουν χαμηλό pH και ποικίλα υγρασία. Υπό αυτές τις συνθήκες αποτελούν ένα βολικό μέσο, όπου μπορούν να επιβιώσουν και ακόμη να αναπτυχθούν ευρέως είδη μικροοργανισμών, από παθογόνους έως χρήσιμους και απαραίτητους για την τεχνολογία παραγωγής, αλλά και μερικές φορές ευεργετικούς για την υγεία του ανθρώπου. Από τα ευεργετικά στελέχη, τα πιο σημαντικά είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria, **LAB**), κάποια εκ των οποίων έχουν χαρακτηριστεί ως «προβιοτικά». Η παρουσία τους στο τελικό προϊόν οφείλεται στη χρήση εναρκτήριων καλλιεργείων, στο νωπό γάλα που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη ή στην εμφάνιση τους στην περιοχή παρασκευής των τυριών (Settanni & Moschetti, 2010). Χάρη στις μεταβολικές τους ιδιότητες χρησιμοποιούνται επειδή συμβάλλουν σημαντικά στη γεύση, την υφή, και στη μικροβιακή ασφάλεια των ζυμούμενων προϊόντων (Settanni & Corsetti, 2008).

Από ετών παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαινοτυπικές και γενοτυπικές μελέτες, σχετικά με τα «άγρια» (ισχυρά) στελέχη μικροοργανισμών, τα οποία απομονώνονται κυρίως από τυριά παραδοσιακής παραγωγής, τα οποία παρασκευάζονται χωρίς την προσθήκη καλλιεργείων εκκίνησης (Cogan et al., 1997; Desmasures et al., 1998; Baruzzi et al., 2000; Suzzi et al., 2000; Coppola et al., 2001; Randazzo et al., 2002). Η παρούσα εργασία αποτελεί συμβολή στη μακρόχρονη έρευνα αυτή.

1.1. Οξυγαλακτικά Βακτήρια (Lactic Acid Bacteria)

Ο S. Orla-Jensen το 1919 περιέγραψε ένα τυπικό οξυγαλακτικό βακτήριο το οποίο αναπτύσσεται κάτω από σταθερές (standard) συνθήκες (μη περιοριστική συγκέντρωση γλυκόζης, παράγοντες ανάπτυξης, και περιορισμοί οξυγόνου), είναι Gram⁺, μη-σπορογόνο, συνήθως μη-κινητό, αρνητικό στην καταλάση απουσία αίμης, οξυάντοχο, οργανότροφο, και αυστηρά ζυμωτικό. Από τους Kandler και Weiss, (1986) αναφέρεται επίσης πως είναι αεροάντοχο με χαμηλό ποσοστό G+C (<55%).

Η παρατήρηση άνοιξε την έρευνα για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, **LAB** (Lactic Acid Bacteria) που περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα από γένη και είδη, ευρέως καταναμημένα στο περιβάλλον, κάποια εκ των οποίων αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας της γαστρεντερικής οδού ανθρώπων και θηλαστικών. Στο σύνολό

τους αρνητικά στην αντίδραση καταλάσης, μπορούν να παράξουν καταλάση και κυτοχρώματα (cytochromes) παρουσία αίμης (heme) και έτσι να μεταβολίσουν το γαλακτικό οξύ περαιτέρω, παράγοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (König & Fröhlich, 2009). Είναι ανίκανα να συνθέσουν πορφυρίνες και έχουν υψηλές απαιτήσεις σε αυξητικούς παράγοντες, όπως οι βιταμίνες και τα αμινοξέα. Η ονομασία τους οφείλεται στην ικανότητά τους να ζυμώνουν τα σάκχαρα (εξόζες, πεντόζες) πρωτίστως σε γαλακτικό οξύ μέσω ομο- ή ετερο- ζυμωτικού μεταβολισμού (Salminen & von Wright, 1998). Τα ομοζυμωτικά είδη παράγουν γαλακτικό οξύ (<85%) ως το μόνο τελικό προϊόν, ενώ τα ετεροζυμωτικά είδη παράγουν γαλακτικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη/οξικό. Τα δεύτερα χρησιμοποιούν το βιοχημικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, το οποίο εναλλακτικά αναφέρεται ως οδός φωσφοκετολάσης (König & Fröhlich, 2009).

Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ειδών με παρόμοια φυσιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία ποικίλουν ανάλογα με τις συνθήκες. Η ετερογένεια αυτής της βακτηριακής ομάδας εκφράζεται μέσω των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών, καθώς μπορούν να εμφανιστούν με την μορφή κόκκων ή ραβδίων, ως μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη, τετράδες, κοντές ή μακριές αλύσους (Orla-Jensen, 1919; Settanni & Moschetti, 2010).

Εξαιτίας των περιορισμένων βιοσυνθετικών τους δυνατοτήτων (Klaenhammer et al., 2005) και των υψηλών τους απαιτήσεων σε πηγές άνθρακα και αζώτου (Salminen & von Wright, 1998) βρίσκονται ως φυσική μικροχλωρίδα σε περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται πλούσια, όσο αφορά τα θρεπτικά τους χαρακτηριστικά. Έτσι μπορούν να βρεθούν ευρέως στο περιβάλλον (νερό, απόβλητα, φυτικό υλικό, ενσιρωμένο χόρτο) και σε μεγάλη ποικιλία νωπών τροφίμων (φρούτα, παντζάρια, πατάτες, πουρές), σε προζύμι, σε ποτά, σε προϊόντα ζύμωσης (λάχανο τουρσί, κρασί, ζυμωμένες ελιές, λουκάνικα, και τυριά), σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σε χυμούς, σε κοιλότητες (στόμα, γεννητικά όργανα, εντερική οδός, αναπνευστική οδός) ανθρώπων και ζώων (König & Fröhlich, 2009). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται στο φυσικό γάλα ως μιαντές. Η μόλυνση επέρχεται από την επιφάνεια των μαστών των ζώων, τον εξοπλισμό άμελης, το περιβάλλον και τις διαδικασίες μεταφοράς ή πλήρωσης, τις επιφάνειες αποθήκευσης, και το γαλακτοκομικό εργοστασιακό περιβάλλον (Settanni & Moschetti, 2010). Από τα LAB, που απομονώνονται από ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές, τα κυρίαρχα είδη ανήκουν στα γένη *Lactococcus* (γάλα), *Lactobacillus* (τυρί, γάλα, κρέας, λαχανικά, δημητριακά), *Leuconostoc* (λαχανικά, γάλα), *Pediococcus* (λαχανικά, κρέας), *Oenococcus* (κρασί), και *Streptococcus* (γάλα) (De Vuyst & Tsakalidou, 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν διαφορετική επίπτωση και συμμετοχή στην παραγωγική διαδικασία των τυριών. Ορισμένα λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της ζύμωσης, ενώ άλλα εμπλέκονται στην διαδικασία της ωρίμανσης (Settanni & Moschetti, 2010).

Το γένος *Lactobacillus*, από τα πιο διαδεδομένα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, περιλαμβάνει 140 περίπου είδη gram⁽⁺⁾, catalase⁽⁻⁾, μη κινητά, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια, τα οποία αναπτύσσονται κάτω από μικροαερόφιλλες, έως αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Klein et al., 1998). Τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικά γένους <i>Lactobacillus</i>	
Χρώση Gram	+
Καταλάση (Catalase)	- (απουσία αίμης)
Κινητικότητα (Motility)	- (*Εξ: <i>Lactobacillus agilis</i> και <i>Lb. ghanensis</i> – πηγή: Nielsen et al., 2007) (*Εξ: <i>Lb. capillatus</i> – πηγή: Chao et al., 2008)
Σπόρια	No
Απαιτήσεις σε O ₂ Εύρος Ανάπτυξης	Αναερόβια (Υποχρεωτικά-Προαιρετικά (Μικροαερόφιλα – strictly anaerobic conditions)
Απαιτήσεις	Άνθρακας & Άζωτο (Salminen and von Wright, 1998)
%G+C	Χαμηλό (44-47%) (*Εξ: <i>Lb. fermentum</i> : 52-54%)
Porphorinoids	- (πηγή: König H. and Fröhlich J, 2009)
Παθογένεια	No
Μορφολογία	Βάκιλλοι, σχήματος κόκκων
Κύτταρα	Μονοί / ζεύγη
	Αλυσίδες μακριές ή κοντές
Πηγή: Klein et al., 1998	

Οι γαλακτοβάκιλλοι ανήκουν στην φυσική ανθρώπινη μικροχλωρίδα του βλεννογόνου του στόματος και του εντέρου (Ahrne' et al., 1998). Επίσης είδη του μεγάλου αυτού γένους απαντώνται φυσικά σε διάφορα προϊόντα ζύμωσης και ενίοτε αντιπροσωπεύουν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα (De Angelis et al., 2001; Corsetti & Settanni, 2007) σε πολλά τυριά σαν βιομηχανικές εναρκτήριες καλλιέργειες ή σαν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας τους (Cogan & Baresford, 2002). Μπορούν είτε να επιβιώσουν κατά την παστερίωση, είτε να εισέλθουν στο τυρόγαλα και στο τυρόπηγμα σαν μianτές μετά από αυτήν, ενώ είναι η μόνη μικροβιακή ομάδα η οποία αναπτύσσεται καλά στο εχθρικό περιβάλλον του εσωτερικού του τυριού, όσο αυτό ωριμάζει (Fox et al., 1998). Τέλος η μικροβιακή κοινότητα αυτή θεωρείται σημαντική τόσο κατά την παραγωγική διαδικασία, όσο για την ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Baruzzi et al. 2000; Albenzio et al. 2001; Randazzo et al. 2002; Cronin T. et al., 2007).

Εντός του γένους *Lactobacillus* τέσσερις ομάδες συγγενικών ειδών μπορούν να διαφοροποιηθούν στις ακόλουθες: *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subspecies and *Lb. plantarum* (Singh et al., 2009). Τα μέλη αυτών των ομάδων δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν με τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου του 16S rRNA, επειδή σε αυτές τις αλληλουχίες μοιράζονται πάνω από 99% ομοιότητα με μόλις 0.3% διαφορά (Singh et al., 2009). Η θερμοανθεκτικότητα τους εξαρτάται από το στέλεχος και το είδος. Για παράδειγμα, οι Fox et al., (2004) αναφέρουν ότι τα είδη *Lactobacillus paracasei*, και *Lb. rhamnosus* είναι πιο θερμοανθεκτικά από το *Lb. plantarum*.

Βάση της αλληλουχίας του γονιδίου του 16S rRNA, γύρω στο 1980 το γένος *Streptococcus* διαχωρίστηκε σε τρία επιμέρους γένη, τα *Enterococcus*, *Lactococcus*,

και *Streptococcus* (Giraffa, 2002). Όσον αφορά το γένος *Enterococcus* αποτελείται από οξυγαλακτικά μη σπορογόνα βακτήρια, αρνητικά στην καταλάση και την οξειδάση, προαιρετικά αναερόβια, τα οποία μορφολογικά είναι κόκκοι, οι οποίοι απαντώνται μονήρεις, σε ζεύγη ή σε πολύ μικρές αλυσίδες (Πίνακας 1.2). Είναι επίσης ανθεκτικά στο αλάτι (NaCl), και μπορούν να επιβιώσουν σε αύξηση της θερμοκρασίας, και υπό ακραίες τιμές pH (Foulquie Moreno et al., 2006).

Πίνακας 1.2: Χαρακτηριστικά του γένους <i>Enterococcus</i>	
Χρώση Gram	+
Καταλάση (Catalase)	-
Οξειδάση (Oxidase)	-
Σπόρια (Spores)	-
Απαιτήσεις σε Οξυγόνο	Προαιρετικά αναερόβια (μικροαερόφιλα – αυστηρά αναερόβιες συνθήκες)
Παθογένεια	No (*Εξ: σύνδεση με νοσοκομειακά κρούσματα)
Θερμοκρασιακή Ανάπτυξη	10-45°C (opt: 35°C)
Μορφολογία	Rods – Coccal shaped
Κύτταρο	Μικροί κόκκοι, μονοί, σε ζευγάρια, μικρές και μεγάλες αλυσίδες
Πηγή: Foulquie Moreno et al., 2006	

Τα βακτήρια του γένους είναι πανταχού παρόντα και διαμορφώνουν μέρος του κανονικού μικροβιακού πληθυσμού των γαστρεντερικού σωλήνα των θηλαστικών (Suzzi et al., 2007), αποτελούν μέρος της εντερικής χλωρίδας και της πεπτικής οδού του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων (Morandi et al., 2006). Είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον και ορισμένα βρίσκονται στο χώμα, σε επιφανειακά νερά, σε φυτά, λαχανικά, και έντομα (Mundt, 1986). Το γένος περιλαμβάνει πάνω από 20 είδη, με τα *Enterococcus faecium* και *E. faecalis* να αποτελούν τα πιο συχνά απαντώμενα ειδικά στα τρόφιμα (Giraffa, 2003). Μαζί με το *E. durans* μπορούν επίσης να βρεθούν στα κόπρανα.

Ο μεγάλος τους επιπολασμός σε νωπά, τελικά και ζυμωμένα τρόφιμα (π.χ. κρέας, ελιές) (Foulquie Moreno et al., 2006) οφείλεται στην ικανότητα τους να ανθίστανται σε ακραίες συνθήκες, όπως είναι το όξινο περιβάλλον (χαμηλό pH), η υψηλή αλατότητα (υψηλό %NaCl) και οι υψηλές θερμοκρασίες (Giraffa 2002; 2003; Morandi et al., 2006). Ο Giraffa (2002), και οι Bonomo με Salzano (2012) αναφέρουν ότι οι εντερόκοκκοι όχι μόνο επιβιώνουν αλλά και αναπτύσσονται κατά τη ζύμωση κρέατος και γαλακτοκομικών, ειδικά όταν δεν χρησιμοποιούνται ανταγωνιστικές εναρκτήριες καλλιέργειες. Έτσι λοιπόν απομονώνονται σε μεγάλους αριθμούς από παραδοσιακά τυριά, που παράγονται στην περιοχή της Μεσογείου από νωπό ή παστεριωμένο γάλα (Andrighetto2001; Giraffa, 2003; Suzzi et al., 2000). Η παρουσία εντερόκοκκων σχετίζεται με μη αποτελεσματικές συνθήκες υγιεινής κατά την παραγωγή και επεξεργασία του γάλακτος. Στα παστεριωμένα τυριά οφείλεται κυρίως σε μίανση μετά τη θερμική επεξεργασία ή στη θερμοανθεκτικότητα τους (Giraffa, 2002) και έχει σημαντικές τεχνολογικές επιπτώσεις στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών. Ο ρόλος στην ανάπτυξη οργανοληπτικών (άρωμα και γεύση)

χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση των τυριών δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Giraffa et al., 1997) παρ' όλο που σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν προταθεί στη χρήση ως συστατικά εναρκτηρίων καλλιέργειών (Giraffa, 2002).

Ορισμένα στελέχη που παρουσιάζουν αυξανόμενο επιπολασμό, είναι εγγενώς ανθεκτικοί σε ορισμένα αντιβιοτικά, όπως η αμπικιλίνη, βανκομυκίνη (vancomycin) αμινογλυκοσίδια και γλυκοπεπτίδια, ενώ εμφανίζουν και μια μοναδική ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό. Η αντίσταση αυτή σε διαθέσιμες θεραπείες θέτει σημαντικές δυσκολίες στις κλινικές θεραπείες (Giraffa, 2002). Οι Morandi et al., (2006) αναφέρονται στην εμπλοκή τους τελευταίως σε νοσοκομειακές λοιμώξεις και γι' αυτό δεν έχουν χαρακτηριστεί ως «QPS» (Qualified Presumption of Safety) καθεστώς ανάλογο του GRAS (EFSA, 2007). Πολλά στελέχη αυτού του γένους παράγουν βακτηριοσίνες και παρουσιάζουν προβιοτική δραστηριότητα (Foulquie Moreno, 2006). Παρ' όλο που δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί σαν «GRAS» ουσίες (Generally Recognized As Safe) (Giraffa et al., 1997), γίνονται προσπάθειες αξιολόγησης του δυνητικού προβιοτικού δυναμικού τους. Αξίζει να αναφερθεί πως το στέλεχος *E. faecium* PR88 χρησιμοποιήθηκε σαν συμπληρωματική προβιοτική καλλιέργεια στην Ιρλανδική ποικιλία τυριού «Cheddar» (Giraffa et al., 2003).

Στο γένος *Pediococcus* πρόσφατα αναγνωρίστηκαν δέκα είδη, περιλαμβάνοντας τα *P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* και *P. stilesii*. (Pffannebecker & Fröhlich, 2008

1.2. Γενικές πληροφορίες πάνω στα τυριά.

Τα τυριά αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη ομάδα των γαλακτοκομικών προϊόντων (Coda et al., 2006) και είναι προϊόντα ζύμωσης. Τα τυριά αποτελούν γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, βασικό χαρακτηριστικό στην παραγωγή τους αποτελεί ο μεταβολισμός της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ από επιλεγμένες καλλιέργειες οξυγαλακτικών γνωστές ως «εκκινητές» (McSweeney, 2004). Σύμφωνα με τους Fox & McSweeney (2004) η μετατροπή του γάλακτος σε τυρόπηγμα, και μετέπειτα σε τυρί είναι μια περίπλοκη διαδικασία, η οποία στα περισσότερα τυριά μπορεί να χωριστεί σε δυο φάσεις: α) παραγωγή (5–24 h, από την προετοιμασία του γάλακτος έως το αλάτισμα) β) ωρίμανση (2 εβδομάδες έως 2 χρόνια ανάλογα με την ποικιλία). Η Γαλλία έχει κατοχυρώσει 44 ονομασίες τυριών, η Ιταλία 32, η Ισπανία 19, η Πορτογαλία 12 και το Ηνωμένο Βασίλειο 11 (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2007).

Οι μικροοργανισμοί στα παραδοσιακά τυριά απαντώνται είτε ως φυσικοί μιλαντές, είτε ως φυσικές ή βιομηχανικές καλλιέργειες (Piraino et al., 2008) και περιλαμβάνουν βακτήρια, ζύμες, και μύκητες. Συμμετέχουν θετικά είτε άμεσα μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας, είτε έμμεσα μέσω απελευθέρωσης ενζύμων στη μήτρα του τυριού εξαιτίας της αυτόλυσης τους (Beresford & Williams, 2004).

1.2.1. Παραδοσιακά τυριά της περιφέρειας «Basilicata» της Νότιας Ιταλίας.

Ποιμενικά συστήματα και κτηνοτροφικές πρακτικές αναπτύχθηκαν σε όλη την Ευρώπη, ώστε να αξιοποιηθούν μειονεκτικές ορεινές περιοχές και βοσκοτόπια (Dubeuf et al., 2010). Η κύρια μεταποίηση πρόβειου και κατσικίσιου (S&G) γάλακτος στην Ιταλία αλλά και σε άλλες χώρες είναι η παραγωγή τυριών. Το «Ιταλικό Εθνικό Ινστιτούτο Στατιστικής» για το 2011 αναφέρει ότι η παραγωγή τυριών από πρόβειο και κατσικίσιο γάλα είναι πιο διαδεδομένη στην νότιο-κεντρική Ιταλία. Η τυροπαραγωγή από βόειο (bovine) γάλα είναι νομικά περιορισμένη σε ορισμένες περιφέρειες της Νότιας Ιταλίας, όπως Calabria, Campania, Molise, Puglia και Basilicata, όπου η οροσειρά του “Sila” (Gobbetti et al., 2002). Τα περισσότερα από τα Ιταλικά τυριά από πρόβειο γάλα είναι ημί-σκληρα ή σκληρά τύπου Pecorino.

Τα παραδοσιακά τυριά ειδικότερα στην περιοχή της Μεσογείου, παρασκευάζονται συχνά με γάλα πρόβειο (sheep) ή κατσικίσιο (goat) σε βιομηχανίες μικρού ή μεγάλου μεγέθους, και πιο σπάνια από αγελαδινό (cow) και βουβαλίσιο (buffalo) γάλα. Κάποια έχουν πιστοποιηθεί σε τοπικό επίπεδο σαν «ΠΓΕ» (Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης), ή έχουν επισημανθεί σαν προϊόντα «ΠΟΠ» (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης). Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός **No 510/2006** (Regulation EC. No 510/2006. Official Journal of the European Union. L93/12, 31 March 2006.) αναφέρει τις απαραίτητες προϋποθέσεις χαρακτηρισμού για ένα τυρί «ΠΟΠ» και «ΠΓΕ». Η ονομασία «ΠΟΠ» προϋποθέτει ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ της περιοχής προέλευσης, της παραδοσιακής παραγωγικής διαδικασίας και των ιδιαίτερων συγκεκριμένων χαρακτηριστικών του προϊόντος (Piraino et al., 2005). Τεχνολογικές παράμετροι, οι οποίες περιλαμβάνουν ξεχωριστά επιμέρους στάδια όπως η προσθήκη πυτιάς στο γάλα, η οξίνιση, η θέρμανση, η στράγγιση του ορού του γάλακτος, το αλάτισμα και η ωρίμανση ασκούν μεγάλη επιρροή στα τελικά χαρακτηριστικά των τυριών και παίζουν κύριο ρόλο στη μικροβιολογική σύσταση, ενισχύοντας τη βιοποικιλότητα (Randazzo, Caggia & Neviani, 2009). Πολλά από τα πιστοποιημένα αυτά τυριά χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη πρόβειο γάλα και οι ονομασίες τους ταυτοποιούν την προέλευση ενός προϊόντος, του οποίου η παραγωγή, επεξεργασία και μεταποίηση πραγματοποιείται σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή και θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από μια αναγνωρισμένη και αποδεχτή αξιολόγηση (Pirisi et al., 2011).

Γενικά τα τυριά μπορούν προέρχονται από παστεριωμένο, θερμισμένο ή/και παστεριωμένο γάλα διαφορετικών πηγών προέλευσης. Λόγω του ότι τα περισσότερα ΠΟΠ παράγονται από νωπό γάλα, η αυτόχθονη γλωρίδα (εναρκτήρια, μη-εναρκτήρια) αξιώνεται στον κύριο ρόλο για τον προσδιορισμό της ιδιαιτερότητας του τυριού και την ποικιλότητα της μικροχλωρίδας εντός της περιοχής προέλευσης. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ποικιλίες τυριών από νωπό γάλα, αποδείχθηκε μεγαλύτερης σημασίας, σε σχέση με τα ίδια τυριά από παστεριωμένο γάλα, στα οποία προστίθενται καλλιέργειες εκκίνησης (McSweeney et al. 1993), η αιτία του φαινομένου όμως παραμένει ανερμήνευτη. Από την άλλη μεριά η χρήση παστεριωμένου γάλακτος ενώ διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στον έλεγχο των παθογόνων βακτηρίων, οδηγεί σε σημαντική μείωση των φυσικών βακτηριακών

πληθυσμών οι οποίοι εμπλέκονται στην διαδικασία τυροπαραγωγής (Baruzzi et al., 2002).

Σύμφωνα με τους Dubeuf et al., (2010) 24,000,000 τόνοι γάλακτος παράγονται στην περιφέρεια Basilicata της Μεσογειακής Ιταλίας (Πίνακας 1.3), και από 128 τυροκομεία παράγονται τα ακόλουθα τυριά «Pecorino di Filiano, ΠΟΠ», διάφορα μικρής κλίμακας τυριά, όπως το «Caciocavallo Silano, ΠΟΠ», «Caciocavallo podolico Lucano», «Caciocavallo Lucano dolce», «Caciocavallo Lucano semi-picante», «Provolone», «Provolone semi-picante», «Cacio bucato», «Fior di latte apennino meridionale», «Cacioricotta», «Padaccio», «Casieddu», «Manteca», «Formaggio di Zaccuni», «Scarmorza», «Pecorino Abriola», και το «Canestrato di Moliterno» (ΠΓΕ).

Πίνακας 1.3: Αριθμός προβατοειδών και αιγοειδών ζώων και γαλακτοπαραγωγή από αυτά.							
Έτος		Προβατοειδή (ovine)		Αιγοειδή (Caprine)		Πρόβειο γάλα (q)	Κατσικίσιο γάλα (q)
		Σύνολο	Ewe's	Σύνολο	Κατσικίσιο		
2009	Basilicata	377,902	341.273	101.383	87.032	1.793	4.324
	Italy	8.012.651	7.101.226	960.950	803.785	4.406.684	225.925
	%	4,71632	4,80583	10,5503	10,8278	0,04069	1,91391

Πηγή: Dubeuf et al., 2010
(Τα δεδομένα συλλέχτηκαν από την Ιταλικό Εθνικό Ινστιτούτο Στατιστικής για το 2009.

1.2.2. Τυριά οικογένειας «Pasta-filata».

Ο Ιταλικός όρος '*pasta-filata*' προέρχεται από την φράση "spun paste" η οποία κυριολεκτικά σημαίνει «τεντωμένο τυρόπηγμα» ("*stretched curd*") (Kindstedt, 2002; Kindstedt, Caric & Milanovic, 2004). Αναφέρεται σε μια ιδιαίτερη μοναδική διαδικασία ευπλαστοποίησης (πλαστικοποίησης) και έκτασης (τεντώματος) του τυροπήγματος χαρακτηριστική για όλα τα τυριά αυτής της ποικιλίας, η οποία προσδίδει σε αυτή την ποικιλόμορφη ομάδα το κοινό τους προσδιοριστικό χαρακτηριστικό. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία τυριών, τα οποία παράγονται από είδη γάλακτος διαφόρων πηγών (αγελάδων, προβάτων, αιγών και νεροβούβαλων (water-buffalos). Τα περισσότερα από αυτά τα τυριά προέρχονται από τις περιοχές της Μεσογείου και ιδιαίτερα της Ιταλίας, της Ελλάδας, και της Ισπανίας, ορισμένων χωρών των Βαλκανίων, της Τουρκίας και της Ανατολικής Ευρώπης. Από τους Baruzzi et al., (2002) αναφέρεται πως στη Νότια Ιταλία το γάλα χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή αυτών των τυριών.

Η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει τρία ευδιάκριτα στάδια, με το πρώτο να οδηγεί σε ένα πλαστικό τυρόπηγμα, το δεύτερο να περιλαμβάνει το ζεμάτισμα του οξινομένου τυροπήγματος προς διαμόρφωση τελικού σχήματος και το τρίτο την ωρίμανση του (Settani et al., 2012). Η ποικιλία αυτή μπορεί να παρασκευαστεί από νοπό ή παστεριωμένο γάλα, με ή χωρίς την προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης. Σε όλες τις περιπτώσεις προστίθεται μοσχαρίσια πυτιά ώστε να πήξει το γάλα. Το φρέσκο τυρόπηγμα ζυμώνεται σε ζεστό νερό, το οποίο θα προσδώσει τη χαρακτηριστική δομή και ιδιότητες τήξης και εφελκυσμού (τέντωμα). Το τυρόπηγμα

κόβεται σε κομμάτια ώστε να ξεκινήσει η συνέραιση. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι ένα μοναδικό στάδιο κατά το τέλος της παραγωγικής διαδικασίας, όπου το τυρόπηγμα εμβαπτίζεται σε ζεστό νερό ή σε ζεστή άλμη θερμοκρασίας $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ώστε να δημιουργηθεί μια «πλαστική» συνοχή. Αυτή η καυτή πλαστική μάζα, ζυμώνεται χειρονακτικά ή μηχανικά (χρησιμοποιώντας συνεχή μίξερ μονού ή διπλού κοχλία), ώστε τελικώς το υλικό να προσλάβει μια λεία και εξαιρετικά συνεχή δομή. Αποτέλεσμα της έλασης αυτής (εφελκυσμός) είναι η εντυπωσιακή αναδιάταξη της δομής του τυροπήγματος, η οποία δημιουργεί μοναδικά χαρακτηριστικά τήξεως και υφής. Η ημίρρευση πλαστική συνεκτική μάζα αυτή μπορεί να φορμαριστεί, ή να χυτευτεί σε ποικιλία σχημάτων. Το τυρόπηγμα μπορεί να υποστεί ξηρό αλάτισμα πριν την έκταση του (τέντωμα), ή το τελικό προϊόν να εμβαπτιστεί σε άλμη. Η υφή τους είναι μαλακή (soft), ή ήμι-μαλακή (semi-soft), και περιλαμβάνει ποικιλίες οι οποίες καταναλώνονται φρέσκες (π.χ. Mozzarella, Scamorza), σκληρή (hard), ή ημίσκληρη (semi-hard), ποικιλίες οι οποίες υποβάλλονται σε σύντομη περίοδο ωρίμανσης (π.χ. Scarmorza) ή και ύστερα από αισθητά μεγαλύτερο χρόνο ωρίμανσης, όπως τα “Caciocavallo” και “Provolone” (Kindstedt, 1995; Albenzio et al., 2013).

Συμπερασματικά η θερμική επεξεργασία που εφαρμόζεται στο φρέσκο τυρόπηγμα επηρεάζει τα μικροβιολογικά, βιοχημικά, φυσικοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των τυριών, τα οποία με τη σειρά τους επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Kindstedt et al., 2010). Πιθανότατα επίσης βοηθά στη συντήρηση βελτιώνοντας κι επιμηκύνοντας την εμπορική διάρκεια ζωής του τυριού, διότι αδρανοποιούνται θερμικά ορισμένοι μικροοργανισμοί και ένζυμα.

Ο τύπος ‘pasta-filata’ στην Ιταλία περιλαμβάνει τις ποικιλίες “mozzarella”, το “Cacio-bucato”, τη “Scarmorza”, το “Caciocavallo Lucano” («γλυκό», ημιπικάντικο), το “Caciocavallo Podolico”, το “Caciocavallo Silano”, “Provolone” (πικάντικο-ημιπικάντικο), το παραδοσιακό Σικελικό Ragusano (Randazzo et al., 2002), και το Provola dei Nebrodi (Cronin T. et al., 2007). Η τυπική σύσταση ποικιλιών της περιοχής Basilicata της Νότιας Ιταλίας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4: Τυπική σύσταση κυριότερων pasta-filata τυριών της περιοχής Basilicata.

Είδος τυριού	Υγρασία (%)	Λίπος (%)	Ολική πρωτεΐνη (%)	NaCl (%)
Cacciocavallo	30	27	33	3.9
Provolone	38	32	21	3.2
Scarmorze	45	35	24	1.5

Πηγή: Kindstedt, 2002

Η ποικιλία «Caciocavallo», ένα από τα πιο τυπικά pasta-filata τυριά, τα οποία έχουν μεγάλη αγοραστική ζήτηση και φήμη, παρασκευάζεται με τη χρήση φυσικής μικροχλωρίδας σε τρεις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές: Βαλκάνια (Kashkaval Balkan; Kindstedt, Caric & Milanovic, 2004), Ρωσία (Kashkaval), και Ιταλία (Gobbetti et al., 2002; Morea et al., 2007). Η αντιστοιχία της ποικιλίας αυτής στον Αγγλικό (και Ιρλανδικό) τύπο είναι το τυρί «Cheddar», και στην Ελλάδα το «Κασέρι»

(Kindstedt, Caric & Milanovic, 2004). Διάφοροι τύποι της ποικιλίας μπορούν να παραχθούν με διαφορετικές τεχνολογίες οι οποίες ποικίλουν σε πρώτες ύλες, εναρκτήριες καλλιέργειες, τυρόπηγμα και συνθήκες ωρίμανσης με αποτέλεσμα τη λήψη τελικών προϊόντων τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (Ercolini et al., 2008). Τα περισσότερα Caciocavallo τυριά που παράγονται στην Ιταλία, χρησιμοποιούν νωπό πλήρες αγελαδινό γάλα και φυσικές καλλιέργειες ορού (natural whey starter) οι οποίες προέρχονται από προηγούμενες επιτυχείς παρτίδες (διαδικασία back-slopping). Σαν συνέπεια η μικροχλωρίδα των pasta-filata τυριών παρέχεται από φυσικά και τυχαία βακτήρια τα οποία βρίσκονται στο γάλα. Όπως αναφέρεται από τους Gobbetti et al., (2002) για το Caciocavallo Pugliese, το τυπικό σχήμα της ποικιλίας Caciocavallo είναι οβάλ σαν φλασκι ως συνέπεια των χειρισμών έλασης.

Υπάρχουν ποικίλες μελέτες και τεχνολογίες πάνω στους διαφορετικούς τύπους Caciocavallo της Νότιας Ιταλίας, όπως το Caciocavallo Corleonese, Lucano (Piraino et al., 2005), Molisano (Coppola et al., 2003), Pugliese (Gobbetti et al., 2002; Morea M. et al., 2007), Palermitiano (Settani et al., 2012; Bonanno A. et al., 2013), και Silano (Piraino et al., 2005; Ercolini D. et al., 2008). Στον ίδιο τύπο, και με παρόμοιες τεχνολογίες ανήκει το "Pronola dei Nebrodi" Σικελικό τυρό (Cronin T. et al., 2007).

Το "**Caciocavallo Lucano**" είναι ένα ημίσκληρο τυρί το οποίο παράγεται αποκλειστικά από γάλα αγελάδων «*Cinisara*». Το όνομα "Lucano" έχει αρχαίες ρίζες που συνδέονται με το υψηλό οροπέδιο της περιφέρειας Lucania ή Basilicata (www.gustolucano.it). Όπως και το Caciocavallo Pugliese παράγεται με δυο διακριτά βήματα: παραγωγή εύπλαστου τυροπήγματος και μετασχηματισμός αυτού σε ώριμο τυρί. Στη φάση ελαστικοποίησης (εφελκυσμού) χρησιμοποιείται θερμοκρασία άνω των 60°C, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό ινών παρακαζείνης με σχετικά υψηλή αντοχή στον εφελκυσμό και προσδίδει ινώδη υφή στο τυρί. Το τυρόπηγμα μπορεί να αλατιστεί κατά την διαδικασία πλαστικοποίησης ή μετά τον τελικό σχηματισμό του προϊόντος (Petrova, 1975). Όπως και τα άλλα επώνυμα τυριά αυτής της ποικιλίας (π.χ. Palermitano, Pugliese) περιβάλλονται από λεπτή και λεία κρούστα, απαλού κίτρινου χρώματος, σχηματίζοντας μια συμπαγή ομοιογενή πάστα. Επίσης εξωτερικά παρουσιάζουν έντονα μικρούς θύλακες (οπές) λευκού ή κίτρινου χρώματος, και λιγότερες στο εσωτερικό. Το τελικό φυσικό προϊόν είναι πλούσιο σε βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία και πρωτεΐνες, με πλούσιο άρωμα και γλυκιά γεύση. Στα «μικρής ηλικίας» τυριά η γεύση είναι απαλή, ενώ ύστερα από συγκεκριμένη περίοδο ωρίμανσης γίνεται δυνατή και πικάντικη και υποδηλώνει τον βοσκοτόπο εκτροφής των ζώων. Το βάρος κατά κεφαλήν κυμαίνεται μεταξύ 1 με 3 κιλών.

Το **Caciocavallo Podolico** αποτελεί την αιχμή του δόρατος μιας περιφερειακής παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας και σαν πρώτη ύλη χρησιμοποιεί το γάλα αγελάδων "*Podolica*", οι οποίες εκτρέφονται στην οροσειρά των Απεννίνων, έως τον ορεινό όγκο Pollino. Αποτελούν ιδιαίτερη φυλή που διαβιώνει στην άγρια φύση, σε μέρη πλούσια σε αρωματικά φυτά, θάμνους, και φυτά χαμηλής βλάστησης (π.χ. χλόη), σε πυκνά δάση και κατά μήκος των ποταμών "Lucan" και προσδίδει έτσι στο γάλα μοναδικές γεύσεις και αρώματα. Αξίζει να αναφερθεί πως είναι ράτσα χαμηλής γαλακτοπαραγωγής. Τα ζώα αρμέγονται μια

φορά την ημέρα κατά τους ανοιξιάτικους και θερινούς μήνες. Το τελικό προϊόν έτσι παράγεται σε μικρές ποσότητες. Τέλος παρασκευάζεται με προσθήκη πυτιάς και στην περιοχή Abriola της επαρχίας Potenza.

Το “*Caciocavallo Silano*” είναι ένα ημίσκληρο “*pasta-filata*” τυρί το οποίο έχει πιστοποίηση «ΠΟΠ» (Ευρωπαϊκή Νομοθεσία 1236/96) το 1996 και παράγεται σε πέντε διαφορετικές επιλεγμένες περιοχές της Νότιας Ιταλίας, γνωστές και ως Καμπανία (Campania), Λουκανία (Lucania ή Basilicata), Καλάμπρια (Calabria), Πούλια (Puglia) και Μολίζ (Molise). Το πρότυπο πιστοποίησης έχει πρόσφατα τροποποιηθεί από τον EC No. 1204/03. Παρασκευάζεται από νωπό ή θερμασμένο (≤ 58 °C, 30 s) αγελαδινό γάλα, το οποίο πήζει στους 36–38 °C χρησιμοποιώντας πυτιά μοσχारीού και αποτελεί μια από τις σημαντικότερες Ιταλικές ποικιλίες τυριών (Piraino et al., 2005, Ercolini et al., 2008). Το «Caciocavallo Silano», παρασκευάζεται από γάλα αγελάδων οι οποίες εκτρέφονται σε βοσκοτόπια, Εφαρμόζονται παραδοσιακές διαδικασίες, σε μικρές φάρμες, με τη χρήση ξύλινων σκευών και τη δράση συγκεκριμένης εγγενούς ντόπιας μικροχλωρίδας (Settanni et al., 2012). Η ζύμωση λαμβάνει χώρα με φυσική καλλιέργεια ορού, NWCs (natural whey culture), η οποία παρασκευάζεται στην ίδια τυροκομική μονάδα, και προκύπτει από προηγούμενες παραγωγές, σύμφωνα με την παραδοσιακή «back-slopping» διαδικασία (Piraino et al., 2005). Η ζύμωση διακόπτεται εμπειρικά όταν το τυρόπηγμα είναι έτοιμο να εκταθεί στο ζεστό νερό. Ύστερα από το τεμαχισμό και την απομάκρυνση του ορού, το τυρόπηγμα τοποθετείται σε τραπέζια και ωριμάζει για 4-10 ώρες (ή περισσότερο αν κρίνεται απαραίτητο), μέχρι το pH να φθάσει την κατάλληλη τιμή για έκταση/τέντωμα σε ζεστό νερό (75–95 °C). Το τελικό προϊόν σχήματος οβάλ, ζυγίζει κατά κεφαλήν 1.5-2.5 κιλά (Gobbetti et al., 2002). Ψύχεται σε νερό, αλατίζεται με εμβάπτιση σε άλμη για πάνω από έξι ώρες, αναρτάται ελεύθερα, ξηραίνεται στον αέρα, και παραμένει προς ωρίμανση για τουλάχιστον ένα μήνα, ώστε να αποκτήσει το λογότυπο «ΠΟΠ». Η πιο συνήθης περίοδος ωρίμανσης είναι 3-4 μήνες, αλλά μπορούν στην αγορά να βρεθούν κεφάλια ακόμη και ετήσιας ωρίμανσης. Το 1999, η παραγωγή του Caciocavallo Silano εκτιμήθηκε στους 1800 t, με απόδοση 1 kg τυρί ανά 10 kg γάλα. Περίπου το ένα τρίτο αυτής της παραγωγής διοχετεύτηκε σε Ευρωπαϊκές αγορές, και μικρές ποσότητες στις ΗΠΑ.

Η ποικιλία “*Cacio bucato*” είναι ένα pasta-filata τυρί, το οποίο παρασκευάζεται από παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, πυτιά, αλάτι, και θερμόφιλες εναρκτήριοιες καλλιέργειες έχει υψηλή θρεπτική αξία, λόγω των υψηλών ποσοστών λίπους και πρωτεϊνών. Το βάρος του τελικού προϊόντος είναι 8-9 κιλά.

Η Ιταλική ποικιλία τυριού “*Provolone*” είναι ένα τυπικό ημί-σκληρό τυρί «συνάρτησης τυροπήγματος» (drawn-curd), του οποίου η εδαφική προέλευση θεωρείται πως είναι η Basilicata και πιο συγκεκριμένα η επαρχία της Potenza (Ministero Agricoltura e Foreste, 1992). Παρασκευάζεται από παστεριωμένο αγελαδινό γάλα και οι τεχνολογίες ποικίλουν ανάλογα με τις προτιμήσεις των καταναλωτών (Favati et al, 2007). Εξωτερικά σχηματίζει ένα φυσικό φλοιό μια κρούστα επικαλυμμένη με κερί, το οποίο την καθιστά μη βρώσιμη. Η τελική τους μορφή έχει σχήμα κολοκύθας, και ωριμάζει δεμένη σε σχοινί. Η γεύση του ποικίλει από «γλυκιά», «ημι-πικάντικη», έως και «πικάντικη», με την τελευταία να

παραπέμπει στην ηλικία του αγελαδινού γάλακτος. Τα ηλικιωμένα pasta-filata τυριά χαμηλότερης υγρασίας, όπως το Provolone «ψήνονται» σε υψηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. $48\pm 52^{\circ}\text{C}$). Μικρογραφήματα ηλεκτρονικής σάρωσης (Scanning electron micrographs) στο τυρί «Kashkaval» (Ρώσικος τύπος της ποικιλίας Caciocavallo) έδειξαν ότι η εσωτερική δομή του είναι παρόμοια με εκείνη του Provolone (Kindstedt, Caric & Milanovic, 2004) και του «Ras» αλλά ξεκάθαρα διαφορετική από μη πλαστικοποιημένες ποικιλίες, όπως Gouda και Emmental.

Όσον αφορά την ποικιλία pasta-filata "*Scamorza*", παρασκευάζεται από πλήρες αγελαδινό γάλα και το όνομα της προέρχεται κατά το κόψιμο της κεφαλής στη φάση της κατανάλωσης. Υγρή πυτιά προστίθεται στο παστεριωμένο με διήθηση γάλα, το οποίο εμβολιάζεται με 1% (v/v) της φυσικής καλλιέργεια ορού (pH 3.8) και θερμαίνεται έως τους 37 με 38°C (Baruzzi et al., 2012). Η μη-επιλεγμένη εναρκτήρια καλλιέργεια παραλαμβάνεται από τη θέρμανση στους $40-42^{\circ}\text{C}$ του φρέσκου ορού που προκύπτει από την τυροπαραγωγή προηγούμενης φοράς. Εν συνεχεία το τυρόπηγμα κόβεται σε κομμάτια 2×2 cm και αφήνεται για 2 ώρες κάτω από ορό (37°C). Με αποστράγγιση απομακρύνεται ο ορός και το τυρόπηγμα που προκύπτει μεταφέρεται σε επιφάνεια απ ανοξείδωτο χάλυβα, κόβεται σε αρκετά μεγάλα κομμάτια, καλύπτεται και αφήνεται προς ωρίμανση για 18-24 ώρες. Έπειτα το τυρόπηγμα (pH 5.32) δουλευμένο με το χέρι τεντώνεται σε ζεστό νερό, ώστε να δοθεί κυλινδρικό σχήμα σαν φλασκι και ένα σχετικό βάρος 300 g. Τέλος βυθίζεται σε κρύο νερό ώστε να σταθεροποιηθεί η μάζα του και αλατίζεται με άλμη (27-30% NaCl) για 2 ώρες. Μπορεί να καταναλωθεί φρέσκο, ή μετά από ωρίμανση μικρής περιόδου σε συνθήκες θερμοκρασίας $8-10^{\circ}\text{C}$ και σχετικής υγρασίας 75-80%. Τέλος οι Baruzzi et al., (2002) αναφέρουν πως η μικροχλωρίδα του ορού παίζει ρόλο τόσο στη ζύμωση, όσο στην περίοδο ωρίμανσης.

1.2.3. Τυριά οικογένειας “pecorino”.

Η δεύτερη μεγάλη ποικιλία τυριών είναι τα πεκορίνο. “Pecorino” είναι το ασήμαντο (trivial) όνομα που δίνεται στα Ιταλικά τυριά, τα οποία παράγονται από νωπό ή παστεριωμένο πρόβειο γάλα (ewes' milk) (Gobbetti & Di Cagno 2002; Di Cagno et al., 2003). Τα εγγενή χαρακτηριστικά τους εξαρτώνται από τοπικές και περιφερειακές πρακτικές (Coda et al., 2006). Παράγονται κυρίως στη κεντρική και Νότια Ιταλία με παραδοσιακά μέσα και παραγωγικές διαδικασίες και το τελικό προϊόν έχει υψηλό ποσοστό λίπους (fat matter), και σκληρή δομή (De Angelis et al. 2001. Κοινά χαρακτηριστικά των περισσότερων σκληρών Ιταλικών τυριών τύπου «πεκορίνο», βασιζόμενα σε αρχαίες παραδοσιακές τεχνικές είναι η χρήση νωπού γάλακτος και φυσικών θερμόφιλων καλλιεργείων εκκίνησης, η θέρμανση υπό ανάδευση («ψήσιμο») του τυροπήγματος σε υψηλές θερμοκρασίες, η μακρά περίοδος ωρίμανσης, και τα πολύ χαμηλά επίπεδα υγρασίας, (Gobbetti & Di Cagno 2002). Τυριά από νωπό γάλα χαρακτηρίζονται συχνά από πλουσιότερη και εντονότερη αίσθηση γεύσης, σε σχέση με τα τυριά εκείνα από παστεριωμένο γάλα (Buchin et al., 1998). Τα Ιταλικά σκληρά τυριά χαρακτηρίζονται συνήθως από βαθμιδωτή μείωση του εμπεριεχόμενου NaCl από την επιφάνεια προς το κέντρο, και με αντίθετη

διαβάθμιση της υγρασίας η οποία αντικατοπτρίζεται στις τιμές ενεργότητας του νερού (Gobbetti & Di Cagno 2002).

Η ποιότητα του νωπού γάλακτος, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η παραδοσιακή τεχνική παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των παραδοσιακών τυριών πεκορίνο, και έχουν ξεκάθαρη επίδραση στον μικροβιακό τους πληθυσμό. Ο «Codex Alimentarius FAO/WHO» ορίζει ως «σκληρά» τα τυριά εκείνα τα οποία έχουν τιμές υγρασίας σε βάση χωρίς λίπος (MFFB) και σε λίπος επί ξηράς βάσης (FDB) χαμηλότερη από 56% και υψηλότερη από 45%. Γενικά τα σκληρά τυριά παρουσιάζουν σκληρότητα, ελαστικότητα και επανεκτασιμότητα ιδιότητες, οι οποίες σε λογαριθμική κλίμακα, ξεπερνούν τις 8.0, 5.8 και 2.0 μονάδες, αντίστοιχα. Η χαρακτηριστική επιθυμητή γεύση και οσμή, η οποία χαρακτηρίζει τα «Pecorino» τυριά (Romano, Siciliano, Sardo, Filiano) Fiore Sardo και Canestrato di Moliterno και Pugliese προέρχεται κυρίως από τη δράση μιας πρεγαστρικής εστεράσης PGE (Pregastric esterase), η οποία περιέχεται στην πάστα πυτιάς, και χρησιμεύει ταυτόχρονα ως παράγοντας πήξης και λιπόλυσης κατά τη διάρκεια παρασκευής των τυριών (Gobbetti & di Cagno, 2002). Σε επίπεδο μικρής παραγωγής (αγροκτήματος) τα “pecorino” τυριά συνήθως παράγονται από νωπό γάλα χωρίς προσθήκη καλλιέργειών εκκίνησης και συνεπώς η οξίνιση και η διαδικασία της ωρίμανσης εξαρτάται εξ ολοκλήρου από τους αυτόχθονους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία προέρχονται από το νωπό γάλα και το περιβάλλον της γαλακτοβιομηχανίας (Aquilanti et al., 2007). Το ίδιο τυρί μπορεί να παραχθεί σε μεγάλο αριθμό σκληρών ποικιλιών στο οποίο διαφέρει το γάλα που χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη, η εποχή άμελξης, η τεχνολογία και η ωρίμανση, μπορεί να δώσει χαρακτηριστικά τα οποία διαφέρουν εμπορικά (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Τέλος, η πυτιά μπορεί να είναι αρνίσια, μοσχαρίσια, κατσικίσια ή και βοδινή. Σήμερα στην Ιταλία υπάρχουν πάρα πολλά διαφορετικά είδη τυριών πεκορίνο, με διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης και χρησιμοποιούμενης πυτιάς και έτσι υπάρχουν διάφορες σχετικές μελέτες, όπως το Pecorino Abruzzese (Serio et al., 2007), Crotonese (Randazzo et al., 2010), Marche (Aquilanti et al., 2007), Pugliese, Romano (Gobbetti & di Cagno, 2002), Sardo (Mannu et al., 2002; Madrau et al., 2006), Siciliano (Randazzo et al., 2002), και Pecorino del Poro (Caridi et al., 2003), Canestrato di Moliterno (Rubino et al., 2009), Canestrato Pugliese (Albenzio et al., 2001). Η εμφάνιση και γεύση του τυριού «Fossa» πλησιάζει αρκετά εκείνη των πολύ σκληρών Pecorino τυριών (Gobbetti et al., 1999). Η πρωτεόλυση είναι αδιαμφισβήτητη η πιο σημαντική βιοχημική διεργασία όσον αφορά την οσμή, γεύση, και υφή των ημί-σκληρών και σκληρών τύπων τυριών (Randazzo et al., 2010) και τα ένζυμα που λαμβάνουν χώρα σε αυτή την διεργασία καλούνται πρωτεολυτικά

Πίνακας 1.5: Χαρακτηριστικά πιστοποιημένων pecorino τυριών της Basilicata

Περιοχή	Τυρί	Χαρακτηρισμός	Τύπος γάλακτος	Πυτιά	Τύπος τυριού	Βάρος (kg)	Ωρίμανση (μήνες)
Basilicata	Canestrato di Moliterno	PGI	S, G	Lamb or kid paste	Hard, uncooked	2-5,5	6-12
	Pecorino Filiano	PDO	S		Hard, semi-cooked	2,5-5	>6
*S: Sheep's milk G: Goat's milk				* PDO: Protected Designation of Origin PGI: Protected Geographical Indication			
Πηγή: Pirisi et al., 2011							

Το “*Pecorino Abriola*” ένα άλλο πεκορίνο τυρί παράγεται στην περιοχή Abriola της region Basilicata της Νότιας Ιταλίας.

Το “*Pecorino di Filiano*” είναι ένα ημί-θερμασμένο (semi-cooked) παραδοσιακό σκληρό τυρί το οποίο παράγεται στη αποκλειστικά στη Νοτιοδυτική περιοχή της Basilicata (Νότια Ιταλία) από μικρές τυροκομικές μονάδες (Bonomo & Salzano, 2012). Έχει πιστοποίηση σαν προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προελεύσεως (ΠΟΠ) σε συμφωνία με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (EU 1992; EU 2007). Όπως το ΠΟΠ *Pecorino Sardo* (Manu et al., 1999; Mannu et al., 2002; Madrau et al., 2006) και το *Pecorino Romano* (Gobbeti & di Cagno, 2002) παράγεται χρησιμοποιώντας παραδοσιακές τεχνικές από νωπό πλήρες πρόβειο γάλα χωρίς την προσθήκη επιλεγμένων, ή φυσικών εναρκτήριων καλλιέργειών, και έτσι το “εμβόλιο” παρέχεται από βακτηριακά κύτταρα, τα οποία περιέχονται ήδη στο γάλα. Τα πρόβατα εκτρέφονται έως την ενηλικίωση τους στην κορυφογραμμή των Απεννίνων, η οποία βρίσκεται στη Βορειοδυτική Λουκανία σε υψόμετρο μεταξύ 900-1400 μέτρων. Η νομαδοποίηση των ζώων πραγματοποιείται σε φυσικά κρησφύγετα, ή τεχνητές εγκαταστάσεις, οι οποίες είναι διασκορπισμένες στην ζώνη εκτροφής. Μέχρι το 1600, η διαδικασία ωρίμανσης λάμβανε χώρα σε φυσικά σπήλαια πορόλιθου που προσδίδουν φρεσκάδα και μοναδικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν.

Οι παραγωγικές διαδικασίες είναι συγκεκριμένες και κατοχυρώνονται ως ΠΟΠ από την Ευρωπαϊκή Ένωση (EU 2007). Συνοπτικά, το νωπό πρόβειο γάλα θερμαίνεται στους 68 °C για 20 s, ψύχεται στους 36–40 °C, και πήζει προσθέτοντας αρνίσια (100 g/q) ή κατσικίσια πάστα πυτιάς. Η συσσωμάτωση/κροκίδωση λαμβάνει χώρα σε 10–14 min και μετά από 25–30 min το τυρόπηγμα κόβεται σε κόκκους διαστάσεων 0.3–0.5 cm³. Μετά την ανάδευση, το τυρόπηγμα τοποθετείται στο κάτω μέρος του κάδου, όπου και πιέζεται μηχανικά δημιουργώντας κυλινδρικό σχηματισμό, με επακόλουθη αφαίρεση του ορού. Εν συνεχεία το πήγμα συμπιέζεται ξανά και έπειτα κόβεται και μορφοποιείται. Το τυρόπηγμα θερμαίνεται στους 60–65 °C για 10 min και έπειτα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες, όπου και αλατίζεται (ξυρό αλάτισμα ή εμβάπτιση σε άλμη). Στο επόμενο στάδιο, το προκύπτον τυρί χωρίζεται σε δυο παρτίδες: α) η μία τοποθετείται στις χαρακτηριστικές-φυσικές πορολιθικές σπηλιές (tuff caves) για τουλάχιστον 6 μήνες, και β) η δεύτερη τοποθετείται σε θάλαμο ωρίμανσης με ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία: 12–14 °C, σχετική υγρασία: 80–85%) για 120 ημέρες ωρίμανσης. Γίνεται συχνά δειγματοληψία από την επιφάνεια και τον πυρήνα του τυριού, ύστερα από το αλάτισμα (t=0) σε μέση ωρίμανση (t = 30 days) και στο τέλος της (t=120 days). Οι Rubino et al., (2009) αναφέρουν πως ωρίμανση σε φυσικά κελία επιφέρει μεγαλύτερα ποσά πρωτεόλυσης και λιπόλυσης από εκείνη σε τεχνητούς θαλάμους. Οι Bonomo & Salzano (2012) αποδίδουν την επικράτηση των NSLAB (Non-Starter Lactic Acid Bacteria) στη μικροχλωρίδα του Pecorino di Filiano λόγω της παραγωγής τους (νωπό γάλα, πάστα πυτιάς, χωρίς εναρκτήριες καλλιέργειες). Οι Capece και Romano (2009) σε μελέτη τους πάνω στις ζύμες που αποικίζουν το παραδοσιακό τυρί Pecorino di Filiano απομόνωσαν τα είδη *Debaryomyces hansenii* (96% των απομονώσεων), 3% *Kluveromyces lactis* και 1% *Dekkera anomala*.

Πίνακας 1.6: Στοιχεία παραγωγής ΠΟΠ & ΠΓΕ pecorino τυριών (τόνοι).								
Τυρί	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Canestrato di Moliterno	-	-	-	-	-	20		
Pecorino di Filiano	-	-	-	-	8,0	8,0		
Σύνολο	42614,44	28252,46	29349,52	38413,93	35510,7	31682,79		
Πηγή: Clal.it (2011); Pirisi et al., 2011								

Το "*Canestrato (Pecorino) di Moliterno-IGP*" είναι τυρί πιστοποιημένο με τον εμπορικό τίτλο «ΠΓΕ» και παράγεται στην περιοχή Moliterno της περιφέρειας Basilicata της Νότιας Ιταλίας (Πίνακας 1.5-1.6). Όπως και στο "Canestrato Pugliese (Aquilanti L. et al., 2007), ΠΟΠ τυρί της περιοχής Apulia, το όνομα και το παραδοσιακό του σχήμα προέρχεται από το καλάθι '*canestro*', μέσα στο οποίο ωριμάζει το τυρόπηγμα. Γενικά χρησιμοποιείται νωπό πλήρες πρόβειο γάλα, μιας ή δυο ημερών άμελης, αλλά μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί και θερμασμένο ή παστεριωμένο κατά την παραγωγή (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Οι Pirisi et al., (2011) αναφέρει πιο συγκεκριμένα ότι είναι ένα σκληρό τυρί, το οποίο προέρχεται από 70-90% πλήρες πρόβειο γάλα και 10-30% πλήρες κατσικίσιο, τα οποία σχετίζονται με τον τόπο εκτροφής. Μπορεί να παρασκευαστεί είτε με χρήση παστεριωμένου ή θερμασμένου γάλακτος και τον εμβολιασμό καλλιεργείων εκκίνησης είτε σε ορισμένες φάρμες από νωπό γάλα, χωρίς προσθήκη καλλιεργείων εκκίνησης (starters). Στην τελευταία περίπτωση, η διαδικασία ωρίμανσης εξαρτάται εξ' ολοκλήρου από τους ενδογενείς βακτηριακούς πληθυσμούς που μαιίνουν το νωπό γάλα, και το τυρόπηγμα κατά την τυροπαραγωγή. Περιστασιακά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και φυσικές εναρκτήριες καλλιέργειες. Το γάλα πήζει με τη χρήση πάστας αρνίσιας ή κατσικίσιας πυτιάς σε θερμοκρασία 36-40 °C. Ο χρόνος θρόμβωσης/πήξης συνήθως είναι 10-15 min, και μετά από 2.5 φορές του χρόνου αυτού, το πήγμα κόβεται σε κομμάτια 3-4 mm, αναδεύεται και ύστερα τοποθετείται στο κάτω μέρος ενός κάδου, όπου πιέζεται ελαφρώς χειροκίνητα. Μόλις το πήγμα συμπιεστεί, κόβεται σε μικρά τεμάχια, και κάθε ένα από αυτά τοποθετείται σε καλούπια. Τέλος υποβάλλεται σε αλάτισμα με ξερό αλάτι ή τοποθέτηση σε άλμη και η ωρίμανση λαμβάνει χώρα στα γνωστά '*fondaci*' (αποθήκες): ειδικοί χώροι ωρίμανσης αποκλειστικά στην περιοχή του «Moliterno», σε υψόμετρο άνω των 700 m από το επίπεδο της θάλασσας. Το Canestrato di Moliterno χαρακτηρίζεται σαν "*primitivo*", μετά περίοδο ωρίμανσης 6 μηνών, "*stagionato*", 6-12 μηνών, και "*extra*", (άνω του έτους). Το τυρί με εποχική θερινή παραγωγή, έχει συνεκτική υφή, κιτρινωπό χρώμα άχυρου, πικάντικη δυνατή γεύση και είναι πλούσιο σε αρώματα. Το τελικό σχήμα της κεφαλής είναι κυλινδρικό, και ζυγίζει 2-3 kg. Από τους Rubino et al., (2009), αναφέρεται πως η πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση οφείλεται στο μοτίβο ωρίμανσης, και ακόμη πως το σύστημα εκτροφής επηρεάζει τη σύσταση σε λιπαρά οξέα, όπως και το ποσοστό του συζευγμένου λινολενικού οξέος.

1.3. Οξυγαλακτικά βακτήρια ως καλλιέργειες εκκίνησης (Starters)

Οι εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες (Starter cultures) για παραγωγή τυριών και ξινογάλακτος εισήχθησαν περί το 1890, αν και τροφές που έχουν υποστεί ζύμωση χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο εδώ και 5000 χρόνια (Holzapfel 1997; Schlegel 1999). Οι εναρκτήριες καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: **α)** παραδοσιακές (περιλαμβάνοντας πρόσθετες, φυσικές και καλλιέργειες μίγματος-στελεχών), και **β)** προσδιορισμένες /τυποποιημένες καλλιέργειες (defined starters) (Limsowtin et al., 1995) και **γ)** προστατευτικές καλλιέργειες.

Η χρήση των καλλιεργιών στοχεύει στην ανάπτυξη αρκετού γαλακτικού οξέος κατά την τυροπαραγωγή (Bonomo & Salzano, 2012) και ιδιαίτερα στα τυριά pasta-filata να από-ανοργοποιήσει (demineralize) και να μετατρέψει το τυρόπηγμα σε κατάσταση εφελκίσιμη σε ζεστό νερό στο pH-στόχο (Kindstedt, 2002). Στα pasta-filata ο δευτερογενής ρόλος τους σε μεγάλης ηλικίας τυριά είναι η πρωτεόλυση, κατά την οποία παράγονται μικρά πεπτίδια και αμινοξέα πολύ σημαντικά.

Οι εναρκτήριες καλλιέργειες, SLAB (Starter Lactic Acid Bacteria) περιλαμβάνουν μεσόφιλα (*Lactococcus lactis*; *Lc cremoris* και *Leuconostoc* spp.) και θερμόφιλα (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* και *Lb. helveticus*) οξυγαλακτικά είδη (Fox et al., 2004). Στα περισσότερα pasta-filata τυριά χρησιμοποιούνται θερμόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. *Streptococcus thermophilus*, μόνα τους ή σε συνδυασμό με *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ή *Lb. helveticus*) επειδή η θερμοκρασία ανάδευσης και θέρμανσης («ψησιμο») κατά την τυροπαραγωγή, υπερβαίνει τη μέγιστη ανεκτή των μεσόφιλων καλλιεργιών (Kindstedt, Carie. & Milanovic, 2004).

Οι φυσικές εναρκτήριες καλλιέργειες ορού, NWCs (Natural whey starter cultures) προκύπτουν από θέρμανση σε κατάλληλη θερμοκρασία του ορού προηγούμενης παραγωγής, σύμφωνα με την παραδοσιακή διαδικασία «back-slopping». Παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως το ότι δεν επηρεάζονται από «επιθέσεις» φάγων (Scechaud et al., 1992; Reinheimer et al., 1997), είναι ικανές να παράγουν ουσίες τύπου-βακτηριοσινών (bacteriocin-like) (McKay, 1990; Casla et al., 1996) και είναι πλούσια πηγή πολλών διαφορετικών βιοτύπων με ασυνήθιστες ιδιότητες, οι οποίες συμβάλλουν στην παραγωγή της τυπικής γεύσης και οσμής του τυριού (Fortina et al., 1998; Gaya et al., 1999; Mannu et al., 2000; Xanthopoulos et al., 2000). Η ποικιλία «*Provolone*», καθώς και διάφορα τυριά «*pecorino*», παράγονται με φυσικές καλλιέργειες ορού (NWC), οι οποίες προκύπτουν από επώαση ορού των τυριών σε περίπου εκλεκτικές θερμοκρασίες επώασης. Όσον αφορά την pasta-filata ποικιλία «*Caciocavallo*» οι φυσικές καλλιέργειες ορού προτιμούνται, επειδή συμβάλλουν στο τυπικό άρωμα και γεύση του τελικού προϊόντος, ποιοτικά χαρακτηριστικά, τα οποία αποδίδονται στην πολύπλοκη μικροχλωρίδα, η οποία παρουσιάζει και ανθεκτικότητα έναντι των φάγων λόγω της πολυστελεχικής καλλιέργειας. Επίσης τα τυριά pecorino δεν χρησιμοποιούν καλλιέργειες εκκίνησης.

Η συμπληρωματική καλλιέργεια προστίθεται στα αρχικά στάδια της τυροκόμησης, μαζί με την καλλιέργεια εκκίνησης με σκοπό την επιτάχυνση της ωρίμανσης και την

ανάπτυξη χαρακτηριστικού προφίλ γεύσης και αρώματος. Ο έλεγχος της γεύσης και αρώματος έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί με αυτόν τον τρόπο το προϊόν μπορεί να αποκτήσει ποιοτικές σταθερές. Η συμπληρωματική καλλιέργεια ουσιαστικά λοιπόν α) συμμετέχει σε άλλα στάδια, εκτός της παραγωγής οξέως, β) μπορεί μέσω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών της ιδιοτήτων, να διαμορφώσει το άρωμα και τη γεύση του τυριού και γ) επιταχύνει την ωρίμανση. Στέλεχος *Lb. casei subsp. rhamnosus* το οποίο δοκιμάστηκε μαζί με *Lc. lactis*, φάνηκε να έχει θετική επίδραση στην πρωτεόλυση κατά την ωρίμανση Κεφαλογραβιέρας με χαμηλά λιπαρά (Michailidou et al., 2003). Γενικά, οι εντερόκοκκοι επιδεικνύουν χαμηλή ικανότητα οξίνισης του γάλακτος (Morandi et al., 2006, Morea et al., 1999; 2007), γεγονός που πιθανότατα τους καθιστά μάλλον ως συμπληρωματικές καλλιέργειες για την παραγωγή των τυριών, παρά ως εκκινητές (Morandi et al., 2006).

Τέλος ως «προστατευτικές» καλλιέργειες θεωρούνται οι μικροοργανισμοί που προσφέρουν ένα πρόσθετο παράγοντα προστασίας συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στη μικροβιακή σταθερότητα των τροφίμων, μειώνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης και επιβίωσης παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων (Holzapfel et al., 1995).

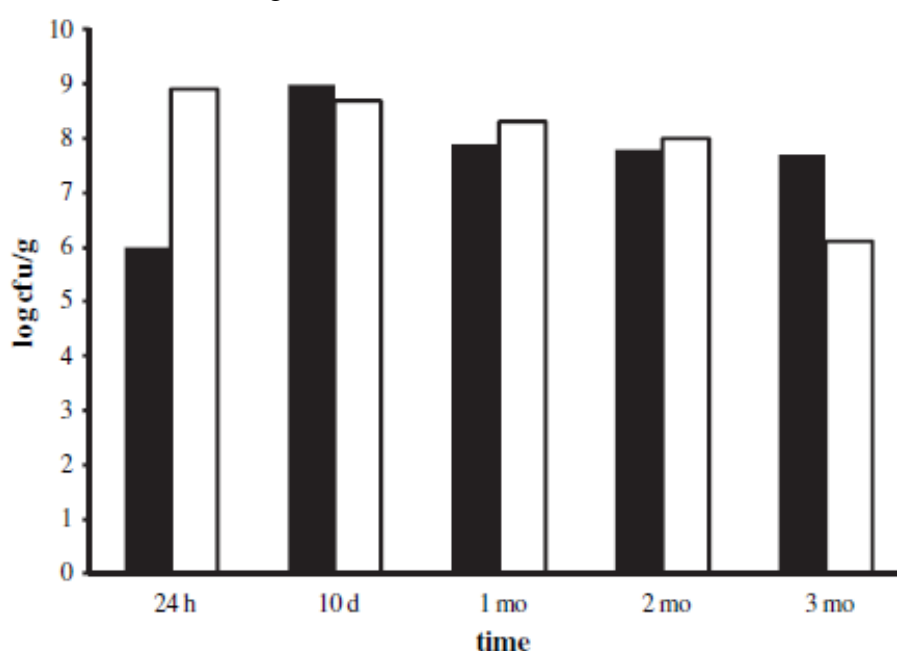
1.4. Ωρίμανση και μικροχλωρίδα τυριών.

Η ωρίμανση των τυριών αποτελεί αργή και περίπλοκη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται μικροβιολογικές, χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως είναι η γλυκόλυση, η λιπόλυση και η πρωτεόλυση, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο τυρόπηγμα (Singh, Drake, & Caldwell, 2003) με αποτέλεσμα χαρακτηριστική γεύση και υφή για κάθε συγκεκριμένη ποικιλία (McSweeney, 2004). Μετά το σχηματισμό του τυροπήγματος, τα ενζυμικά συστήματα επιδρούν σε διαφορετικά συστατικά του, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ουσιών που εμφανίζονται κατά την ωρίμανση. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος ωρίμανσης ποικίλλουν, είναι όμως συγκεκριμένες για κάθε τύπο τυριού. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο φαινόμενο της ωρίμανσης προέρχονται από το γάλα, την πυτιά και τους μικροοργανισμούς.

Αν και η μικροχλωρίδα που σχετίζεται με την ωρίμανση των τυριών είναι υπερβολικά ποικίλη, για πρακτικούς λόγους κατανέμεται σε δυο επιμέρους κατηγορίες: **α)** πρωτογενής μικροχλωρίδα η οποία περιλαμβάνει τις εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων (SLAB) και **β)** δευτερογενής μικροχλωρίδα (Beresford T., & Williams A., 2004), η οποία είναι τυχαία. Τα SLAB είναι σημαντικά για τη ζύμωση της γλυκόζης, με άμεσο αποτέλεσμα την ταχεία μείωση του pH και την αυτόλυση των κυττάρων τους, απελευθερώνοντας διάφορα ένζυμα και ουσίες ανάπτυξης (Fitzsimons et al., 1999). Η πρωτογενής αυτή χλωρίδα εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του τυριού που πρόκειται να παραχθεί. Η δευτερογενής χλωρίδα είναι περιστασιακή, δεν έχει ενεργό ρόλο κατά τη παραγωγή του τυριού, αλλά συμμετέχει με τα εναρκτήρια οξυγαλακτικά στην διαδικασία ωρίμανσης (Fox et al., 2004) και όπως αναφέρεται από τους Franciosi et al., (2008) η τυχαία μικροχλωρίδα αυτή δεν μπορεί να ελεγχθεί από τον τυροπαραγωγό. Η δευτερογενής

μικροχλωρίδα μπορεί να χωριστεί στις ακόλουθες υποομάδες (i) τα Μη-εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια NSLAB (Non-Starter Lactic Acid Bacteria), τα οποία αποτελούνται από είδη του γένους *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* και του γένους *Leuconostoc*, και είναι κατά τους Fox et al., (2004) ο κύριος εκπρόσωπος (ii) Βακτήρια προπιονικού οξέος (PAB), (iii) μύκητες, και (iv) διάφορα άλλα βακτήρια και ζύμες, τα οποία αναπτύσσονται στην επιχρισμένη επιφάνεια των ωριμασμένων τυριών (Beresford & Williams, 2004).

Τα τυριά αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα με περίπλοκους συνδυασμούς μικροοργανισμών, ο οποίος αλλάζει με το χρόνο και ενώ στην αρχή περιέχουν μεγάλους αριθμούς εναρκτήριων οξυγαλακτικών βακτηρίων (SLAB) με την ωρίμανση διαδέχονται τα «μη-εναρκτήρια» οξυγαλακτικά (Ross et al., 2002). Οι μικροβιακές αυτές αλλαγές κατά την ωρίμανση οφείλονται στο θάνατο και τη λύση των κυττάρων των εναρκτήριων καλλιιεργειών, με συνέπεια την ανάπτυξη μιας τυχαίας οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας («Μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια» με κύριους αντιπρόσωπους τους προαιρετικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους). (Bonomo & Salzano, 2012). Όπως παρατηρείται και από την παρακάτω εικόνα (Γράφημα 1) τα NSLAB συνήθως αυξάνονται σταδιακά και από χαμηλό ποσοστό στο τυρόπηγμα, καθίστανται η επικρατούσα χλωρίδα των ώριμων τυριών (Peterson & Marshall, 1990; De Angelis et al., 2001).



Γράφημα 1.1.: Γενικό μοντέλο εξέλιξης της SLAB και NSLAB χλωρίδας σε τυριά από νοπό γάλα. (Λευκή κλίμακα: SLAB; Μαύρη Κλίμακα: NSLAB)

Πηγή: Settani & Moschetti, 2010 (Μελέτη των Franciosi et al., 2008 πάνω στο «Puzzone di Moena»)

Οι τυχαίοι μικροοργανισμοί της NSLAB προέρχονται από την πρώτη ύλη, δηλαδή το νοπό γάλα (Berthier et al., 2001) ή από το περιβάλλον και τις επιφάνειες εξοπλισμού της βιομηχανίας γαλακτοκομικών (Somers et al., 2001). Αναπτύσσονται κατά την παραγωγή και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ωρίμανση (Fox et al., 1996). Πιθανόν και το αλάτι να είναι άμεσα υπεύθυνο προσθήκη οποιασδήποτε χλωρίδας και έμμεσα επηρεάζει αυτήν που θα επικρατήσει. Τα πεπτίδια και τα

αμινοξέα σε αφθονία στο τυρόπηγμα, συνιστούν τα κύρια θρεπτικά συστατικά των NSLAB (Fox et al., 2004). Η λακτόζη η οποία παραμένει πιθανώς να μεταβολίζεται από τα NSLAB (McSweeney & Fox, 2004). Από την λύση των SLAB απελευθερώνονται πεντόζες οι οποίες ζυμώνονται από τα ετεροζυμωτικά είδη (Settanni & Moschetti, 2010). Σε γενικές γραμμές, τα LAB διαθέτουν ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό ενζυμικό σύστημα, λόγω των τροφικών απαιτήσεων τους σε αμινοξέα (McSweeney, 2004). Έχουν καθοριστικό ρόλο στην διάσπαση των καζεϊνών και των πεπτιδίων, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων (FAA). Οι De Angelis et al., (2001) αναφέρουν πως παρ' όλο που τα Ιταλικά τυριά από πρόβειο γάλα χρησιμοποιούν θερμοφίλες εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες, τελικώς εμφανίζουν σημαντικό μέρος της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας από ετερογενή NSLAB.

Ο όρος «μη-εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια» χρησιμοποιείται για τη βακτηριακή χλωρίδα η οποία αναπτύσσεται τυχαία και είναι ικανή να αναπτυχθεί υπό εκλεκτικές συνθήκες (οι τυπικές παράμετροι είναι: υγρασία 32-39%, αλάτι στην υγρή φάση 4-6%, pH 4.9-5.3, και θερμοκρασία 5-13°C) ωρίμανσης των τυριών (Franklin & Sharpe, 1963). Έτσι λοιπόν στην ιδιαίτερα ετερογενή αυτή ομάδα, απαντώνται περισσότερο οι γαλακτοβάκιλλοι: *Lactobacillus farciminis* μεταξύ των υποχρεωτικά ομοζυμωτικών ειδών, η ομάδα *Lactobacillus casei* (π.χ. *L. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans*, De Angelis et al., 2001; Coueret et al., 2004; Švec et al., 2005), *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus* και *Lb. rhamnosus* μεταξύ των αναερόβιων προαιρετικά αναερόβιων ειδών και *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. parabuchneri* και *Lb. brevis* μεταξύ των υποχρεωτικά ετεροζυμωτικών ειδών (Gobbetti et al., 2002). Παρ' όλο που στην NSLAB οικογένεια κυριαρχούν οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, είναι δυνατόν να διάφοροι πεδιόκοκκοι και μικρόκοκκοι (Fryer & Sharpe, 1966; Fitzsimons et al., 1999). Οι τυχαίοι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι συνήθως προέρχονται από μίανση μετά την παστερίωση, αλλά επίσης αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος και έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν μετά την παστερίωση (De Angelis et al., 2001). Οι εντερόκοκκοι επίσης αποτελούν ένα ικανό ποσοστό των μικροβιακών πληθυσμών των παραδοσιακών τυριών, επηρεάζοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Lopes et al., 1999; Mannu et al., 1999; García et al., 2002; Giraffa, 2002; Beresford & Williams, 2004).

Επισημαίνεται πως η συμμετοχή και ο ρόλος των LAB στην ανάπτυξη δομικών (υφή) και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή και γεύση) στα τυριά, εξαρτάται από το ενζυμικό δυναμικό των στελεχών, τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία τυροπαραγωγής (Cronin et al., 2007). Οι βιοχημικές αλλαγές κατά την ωρίμανση μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε πρωταρχικά φαινόμενα όπου περιλαμβάνονται ο μεταβολισμός της υπολειπόμενης λακτόζης, του γαλακτικού (lactate) και του κιτρικού (citrate), η λιπόλυση και η πρωτεόλυση (McSweeney, 2004). Τέτοιες αντιδράσεις καταβολισμού (και τροποποιήσεις πλευρικής αλυσίδας) μπορούν να απελευθερώσουν κετο-οξέα, αμμωνία, αμίνες αλδεύδες, οξέα και αλκοόλες, προϊόντα τα οποία και τελικά προσδίδουν ιδιαίτερη γεύση και άρωμα του τυριού (Hemme et al., 1981).

Η βιοχημική διεργασία της πρωτεόλυσης επιτελείται από δυο επιμέρους στάδια *α)* πρωταρχική φάση η οποία αποδίδεται στην πλασμίνη σε τυριά από πρόβειο γάλα και τις θερμόφιλες εναρκτήριες καλλιέργειες, και *β)* δευτερογενής φάση περισσότερο εκτενής και πραγματοποιούμενη από τα NSLAB (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Η υφή του τυριού μαλακώνει κατά την ωρίμανση, εξαιτίας της υδρόλυσης των καζεϊνών μέσω της πρωτεόλυσης, λόγω μεταβολής της ικανότητας κατακράτησης ύδατος του τυροπήγματος και λόγω αλλαγής του pH (φαινόμενο το οποίο με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει άλλες αλλαγές, όπως η μετανάστευση και καθίζηση του φωσφορικού ασβεστίου (McSweeney, 2004). Μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια που συμμετέχουν στην ανάπτυξη οσμής και γεύσης σε κάποιες ποικιλίες τυριών μπορούν έτσι να θεωρηθούν ως επιθυμητοί μιαντές (τυχαίοι από τον εξοπλισμό του τυροκομείου, είτε συγκεκριμένοι από προηγούμενα τυριά) (Morea et al., 2007). Η ρακεμοποίηση του Ι-γαλακτικού εξαρτάται από τη σύσταση της NSLAB χλωρίδας, όπου οι πεδιόκοκκοι πραγματοποιούν ταχύτερα το φαινόμενο από τους λακτοβάκιλλους. Επίσης ταχύτερα συμβαίνει και στα τυριά από νωπό γάλα σε σχέση με εκείνα από παστεριωμένο (McSweeney & Fox, 2004), πιθανώς διότι δεν ελέγχεται η χλωρίδα που αναπτύσσεται.

Στα σκληρά και ημί-σκληρα Ιταλικά τυριά η πρωτεόλυση επηρεάζεται επίσης από το χαμηλό ποσοστό υγρασίας, το υψηλό ποσοστό αλατιού, και την ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια τους (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Στις χώρες της Μεσογείου (Ιταλία, Ελλάδα, Ισπανία, Πορτογαλία), μελέτες για τη μικροχλωρίδα των παραδοσιακών τυριών από νωπό κατσικίσιο και πρόβειο γάλα, και των λιγότερο κοινών από αγελαδινό, έδειξαν ότι οι εντεροκόκκοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση τους (Morandi et al., 2006). Η συμβολή αυτή επέρχεται πιθανώς με την πρωτεολυτική, λιπολυτική, και εστερολυτική δραστηριότητα (Sarantinopoulos et al., 2001) που επιδεικνύουν κάποια στελέχη εντεροκόκκων, όπως και η ικανότητα τους να μεταβολίζουν τα κίτρινα προς κατάρρευση τους. Ως εκ τούτου συμβάλουν στην τυπική χαρακτηριστική οσμή και γεύση (Manolopoulou et al., 2003; Foulquie Moreno et al., 2006) παράγοντας διακετύλιο και διάφορα άλλα πτητικά προϊόντα. Ο επιπολασμός αυτής της χλωρίδας σε τέτοιου είδους προϊόντα θεωρείται ως αποτέλεσμα ανθυγιεινών συνθηκών κατά την παραγωγή και επεξεργασία του γάλακτος, όπως είναι η άμεση μίανση από ανθρώπινα και ζωώδη κόπρανα (Foulquie Moreno et al., 2006), με συχνότερα απαντώμενα στελέχη τα *E. faecium*, *E. faecalis*, και *E. durans* (Wessels et al., 1990; Centeno et al., 1999; Suzzi et al., 2000, Giraffa 2002). Όχι μόνο επηρεάζουν τη γεύση, οσμή και άρωμα των τυριών μέσω του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού τους, αλλά μπορούν να παράξουν διάφορα ένζυμα τα οποία αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του γάλακτος ευνοώντας βιοχημικούς μετασχηματισμούς (Giraffa, 2003). Από διάφορους ερευνητές έχει αναφερθεί η ικανότητα υδρόλυσης των γλυκεριδίων του γάλακτος (Sarantinopoulos et al., 2001; Durlu-Ozkaya et al., 2001), με τον *E. faecalis* και σε μικρότερο βαθμό τον *E. faecium* να παράγουν μεταβολίτες, όπως ακεταλδεΐδη, αιθανόλη, διακετύλιο, και ακετοΐνη.

Η ωρίμανση των περισσότερων τυριών συνοδεύεται από χαμηλού επιπέδου λιπόλυση αλλά σε ορισμένες από τις «σκληρές» Ιταλικές ποικιλίες (πεκορίνο) μπορεί

να είναι πιο εκτεταμένη (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Η διάρκεια ωρίμανσης επηρεάζει την λιπόλυση, και επειδή διαφέρει αξιοσημείωτα ανάμεσα ακόμη και στην ίδια ποικιλία, τυριά έτοιμα προς πώληση ίσως διαφέρουν σημαντικά. Μελέτες στον NSLAB πληθυσμό ο οποίος αυξάνεται κατά την ωρίμανση έδειξαν ότι ο *Lb. plantarum* παράγει λιπάση και εστεράση υποστρώματα τα οποία είναι προτιμότερα συγκριτικά από την πάστα τυριάς και την παγκρεατική λιπάση (Gobbetti & Di Cagno 2002). Οι Mauriello et al. (2001) παρατήρησαν ότι οι γαλακτοβάκιλλοι παράγουν υψηλότερο αριθμό ουσιών από τους λακτοκόκκους. Οι *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* και *E. durans* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στην τελική μορφή, υφή και γεύση (Gobbetti et al., 2002).

Η μεταβολική δραστηριότητα των LAB δεν έχει μόνο θετικές επιδράσεις και ενισχυτικό ρόλο στην ωρίμανση των τυριών. Ο μεταβολισμός των αμινοξέων της πρώτης ύλης μπορεί να δώσει εκτός από τα επιθυμητά αρωματικά συστατικά, και ουσίες που κρίνονται τοξικές για την υγεία του ανθρώπου, όπως είναι οι βιογενείς αμίνες. Οι αμίνες αυτές είναι μικρού μοριακού βάρους οργανικές βάσεις με βιολογική δραστηριότητα. Αρκετές παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού (Halasz et al., 1994), ο ίδιος αναφέρει πως δεν υπάρχει συσχέτιση της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών με τον βακτηριακό πληθυσμό. Μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων στο τυρί, οι εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνουν τα αμινοξέα ιστιδίνη, τυροσίνη, ορνιθίνη και λυσίνη, με τις αποκαρβοξυλάσες που διαθέτουν και παράγουν τις βιογενείς αμίνες ισταμίνη, τυραμίνη, κανταβερίνη και πουτρεσκίνη, αντίστοιχα (Joosten & Northold, 1989).

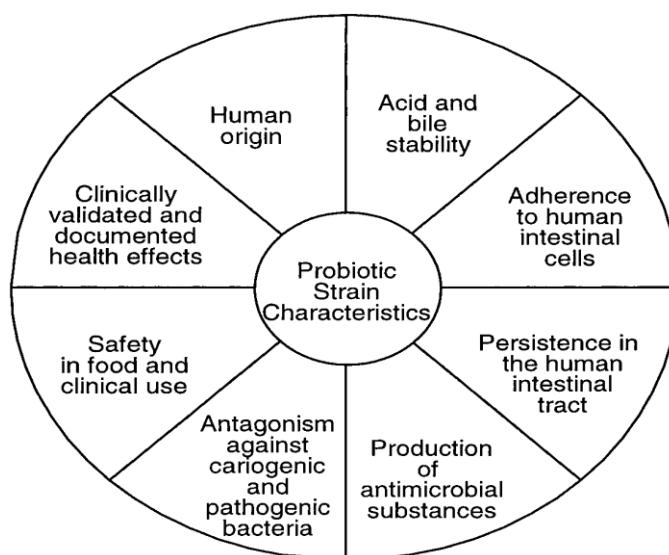
Όταν το τυρί παραχθεί από νωπό γάλα ακολουθώντας παραδοσιακές διαδικασίες, η περιβαλλοντική μικροχλωρίδα (τυροκομείο) παίζει θεμελιώδη ρόλο στη ζύμωση και αποτελεί από τις σημαντικότερες παραμέτρους οι οποίες επηρεάζουν την ποιότητα των τυριών (Marino, Maifreni & Rondinini et al., 2003). Έτσι λοιπόν οι μικροοργανισμοί που θα αναπτυχθούν και θα επικρατήσουν δεν είναι συγκεκριμένοι για ειδικές ποικιλίες τυριών και με τα πρωτεολυτικά και λιπολυτικά ένζυμα, συμμετέχουν στις επιμέρους βιοχημικές διεργασίες και συνεπώς επηρεάζουν τη δομή, οσμή, γεύση και άρωμα, όπως και τη χημική σύσταση και την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Baruzzi et al. 2000).

1.5. Προβιοτικά χαρακτηριστικά Οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Το 1989, ο Fuller όρισε ως «προβιοτικό» ένα ζωντανό μικρόβιο, το οποίο επηρεάζει ευεργετικά το ζώο-ξενιστή βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία του. Ο όρος σχετικά πρόσφατος, σημαίνει κυριολεκτικά «(απαραίτητο) για την ζωή» (“*for life*”), και χρησιμοποιείται σήμερα να περιγράψει μη-παθογόνα ζωντανά βακτήρια, τα οποία όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες. Μετέπειτα ο Scheinbach, 1998 τα ερμήνευσε ως εκείνα που «παρέχουν όφελος στην υγεία του ξενιστή, συμπεριλαμβάνοντας ανθρώπους και ζώα», ερμηνεία η οποία υιοθετήθηκε από τον «Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας» (FAO/WHO 2001; 2006) μεταγενέστερα.

Ορθογραφικά προέρχεται από την Ελληνική λέξη «βίος» (Shah, 2001). Ο Fuller (1992) αναφέρει ως προβιοτικό κυρίως το ζωντανό μικροβιακό διατροφικό συμπλήρωμα, το οποίο βελτιώνει την γαστρεντερική ισορροπία αν και προβιοτικά μπορεί να είναι ακόμη και λειτουργικά τρόφιμα (Shah, 2001).

Όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες οι τυχόν προβιοτικές δραστηριότητες που παρουσιάζουν ορισμένα βακτήρια είναι εξαρτώμενες από το στέλεχος και όχι από το είδος. Τα κριτήρια επιλογής προβιοτικών ποικίλουν. Το στέλεχος θα πρέπει να έχει τα ακόλουθα βασικά χαρακτηριστικά, ώστε να ελεγχθεί περαιτέρω για ανθρώπινη προβιοτική χρήση: α) να είναι ανθρώπινης προέλευσης, β) να ανθίστανται σε βιολογικά εμπόδια (αντοχή κατά τη διέλευση στον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα; Fuller, 1989) και γ) να επικολλάται (adhere) στον εντερικό επιθηλιακό ιστό (Morelli, 2000; Gorbach, 2002)). Ιδιαίτερα η ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα αποτελεί την πιο αναγκαία συνθήκη κατά την επιλογή δυνητικά προβιοτικών στελεχών.



Εικόνα 1.1: Γενικά χαρακτηριστικά επιλογής μικροοργανισμών για χαρακτηρισμό ως «Προβιοτικά». **Πηγή:** Saarela M. et al.,2000.

Όσον αφορά τις ιδιότητες τους ο Fuller, (1989) αναφέρει την υδροφοβία (hydrophobicity), αποσύζευξη των χολικών αλάτων (deconjugation of bile salts). Οι De Smet et al. (1995) αναφέρουν πως η δραστηριότητα- BSH ορισμένων στελεχών, η οποία περιλαμβάνει την αποσύζευξη των χολικών αλάτων σε πρωτογενή χολικά άλατα, προστατεύει τα βακτήρια από την τοξικότητα των συζευγμένων χολικών αλάτων και θεωρείται ένας μηχανισμός αποτοξίνωσης ζωτικής σημασίας για τους βακτηριακούς πληθυσμούς, οι οποίοι σχετίζονται με το ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Ο Scheinbach (1998) προσθέτει την συνεισφορά ενός ενζύμου στο λεπτό έντερο, όπως η β-γαλακτοζιδάση (κοινώς λακτάση), την οποία στερούνται ορισμένοι ενήλικοι, ενώ ο την ικανότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα. Άλλα βακτήρια παράγουν οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό οξύ), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και βακτηριοσίνες ως αντιμικροβιακές ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων παθογόνων και αλλοιογόνων

μικροοργανισμών (Shah, 2007). Αξίζει να αναφερθεί πως οι υψηλοί αριθμοί της αυτόχθονης μικροχλωρίδας παρουσιάζουν μεγάλο ανταγωνισμό έναντι οποιουδήποτε αλλόχθονου βακτηρίου για τα θρεπτικά συστατικά (Scheinbach, 1998). Άμεση συνέπεια της παραγωγής των οξέων αυτών είναι η μείωση του pH στο ανθρώπινο έντερο, με επακόλουθη βακτηριοκτόνο (bacteriocidal) και βακτηριοστατική (bacteriostatic) δράση. Μειώνεται έτσι η συχνότητα των διαρροιών και ελέγχονται οι λοιμώξεις. Ο ίδιος αναφέρει επίσης πως προστατεύουν έναντι του καρκίνου των όρχεων και του παχέος εντέρου διατηρώντας ισορροπημένη και υγιεινή εντερική χλωρίδα.

Επίσης είναι αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση ορισμένων στελεχών αφού αφαιρούν προ-καρκινικές πηγές (ή ένζυμα που προκαλούν το σχηματισμό τους), ομαλοποιούν τη γαστρεντερική περατότητα η οποία οδηγεί σε καθυστέρηση απορρόφησης των τοξινών και ενεργοποιούν μη συγκεκριμένους κυτταρικούς παράγοντες (μακροφάγοι-“killers”) (Morelli, 2000). Ακόμη αναφέρεται αντιγονοτοξική δραστηριότητα εξαρτώμενη από το στέλεχος (Corsetti et al., 2008).

Σήμερα τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Prasad et al., 1998). Έχει βρεθεί πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μικροχλωρίδας ανθρώπων με παχύσαρκα, μη-παχύσαρκα και με διαβήτη τύπου-2 (Morelli L., 2000). Έχει αποδειχτεί πως μικρής αλύσειας λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται από ορισμένα στελέχη *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, *L. plantarum*, και *L. rhamnosus* αναστέλλουν το σχηματισμό καρκινογόνων προϊόντων μειώνοντας τις ενζυμικές δραστηριότητες (Cenci et al., 2002; Shah, 2007). Από το γένος *Lactobacillus*, η ομάδα *Lactobacillus casei* αποτελεί μέρος των προαιρετικά αναερόβιων λακτοβάκιλλων. Ανάμεσα στα οφέλη της ομάδος υπάρχουν στελέχη ειδών με ιδιότητες όπως η ανοσορύθμιση (immunomodulation), η ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι γαστρεντερικών παθογόνων, μεταβολές στη χοληστερόλη και στον μεταβολισμό της λακτόζης, αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες (Vasiljevic & Shah, 2008). Οι περισσότερες μελέτες σε προβιοτικές ιδιότητες επικεντρώνονται σε είδη των γενών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Streptococcus*, ή *Enterococcus*, τα οποία έχουν ανθρώπινη εντερική προέλευση (Scheinbach, 1998). Έρευνες σε προβιοτικά που απομονώνονται από τρόφιμα έγιναν για τα *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* και *L. casei* (Shah, 2007). Αποδεδειγμένα κλινικά αποτελέσματα κατέληξαν στα *L. johnsonii* La1, *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* NCFB 1478, *B. animalis* Bb12 and *L. reuteri* (Shah, 2004). Ενώ αρχικά θεωρείτο ελάχιστο βιώσιμα επίπεδα τα 10^5 cfu/g (Shah, 1997; Shah et al., 1995), και μετέπειτα 10^6 cfu/g, ο De Vuyst (2000) αναφέρει με γενική συμφωνία για σήμερα μια ελάχιστη συγκέντρωση προβιοτικού στα 10^7 cfu/g ή ml τροφίμου τη στιγμή της κατανάλωσης, ώστε να διασφαλιστεί ένα επιθυμητό αποτέλεσμα στην υγεία του καταναλωτή.

Ορισμένα LAB εμφανίζουν επίσης ανταγωνιστική δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων και εγκαθίστανται στην γαστρεντερική οδό (Corfield et al., 2001) πραγματοποιώντας ζυμώσεις, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων με θετικά (ή και αρνητικά) αποτελέσματα στη φυσιολογία του εντερικού συστήματος. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα για τις ευεργετικές τους προβιοτικές

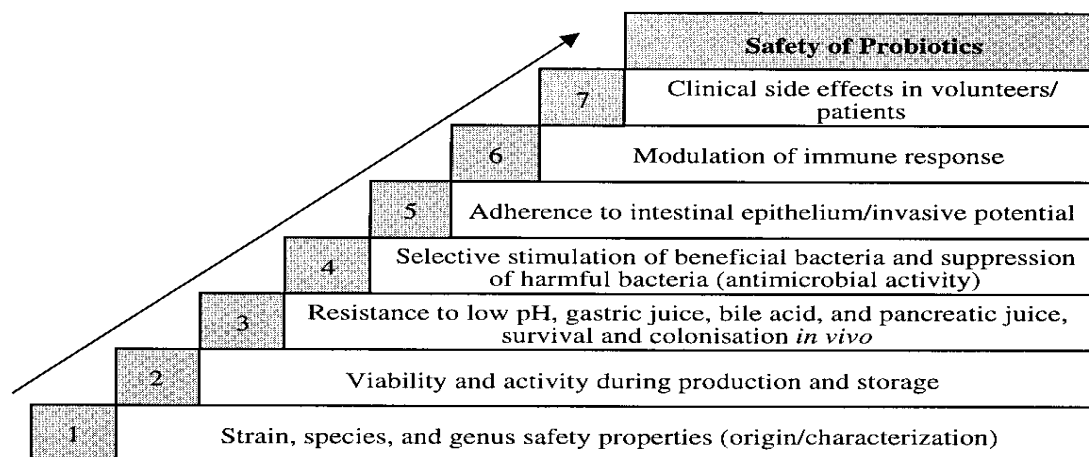
ιδιότητες. Η δράση έναντι στους παθογόνους οφείλεται στην παραγωγή βακτηριοσινών. Οι βακτηριοσίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια παραγόμενα στο ριβόσωμα των βακτηρίων, που έχουν την ιδιότητα να «σκοτώνουν» συγγενικά βακτήρια (Klaenhammer, 1993). Κατά τον ίδιο (1988), το 99% των βακτηρίων παράγει έστω και μία βακτηριοσίνη. Η παραγωγή βακτηριοσινών από τα LAB εξαρτάται από το στέλεχος και τη φάση ανάπτυξής του, από το θρεπτικό μέσο ή καλύτερα τη σύνθεση του τροφίμου και από τις συνθήκες παρασκευής του (π.χ. τεχνολογία και συνθήκες ωρίμανσης τυριού όπως pH, θερμοκρασία) (Parente & Ricciardi, 1999).

Οι εντερόκοκκοι έχουν την ιδιότητα να παράγουν βακτηριοσίνες, τις γνωστές «εντεροσίνες», οι οποίες είναι μικρά πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση έναντι στενά συνδεδεμένων Gram⁽⁺⁾ βακτηρίων περιλαμβάνοντας τόσο αλλοιωγόνα, όσο και παθογόνα βακτήρια (De Vuyst & Vandamme, 1994; Rivas. et al., 2012). Η ικανότητα τους να αναστέλλουν *Listeria spp* μπορεί να εξηγηθεί λόγω της στενής φυλογενετικής τους σχέσης με τις λιστέριες (Stackebrandt & Teuber, 1988; Devriese & Pot, 1995; Foulquie Moreno et al., 2006). Επίσης, κάποιος και ειδικότερα ο *E. faecium* δείχνει αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Αξίζει να αναφερθεί πως το στέλεχος *E. faecium PR88* χρησιμοποιήθηκε σαν συμπληρωματική προβιοτική καλλιέργεια στην Ιρλανδική ποικιλία «Cheddar» (Giraffa, 2003). Τόσο τα είδη του γένους *Bifidobacterium*, όσο και το *Lactobacillus acidophilus* παράγουν βακτηριοσίνες ονόματι *Lactocidin*, *Acidolin*, *Acidophilin*, *Lactacium-B*, και αναχαιτιστική πρωτεΐνη. Ο *Lb. plantarum* παράγει την βακτηριοσίνη πλανταροσίνη, ενώ ορισμένοι πεδιόκοκκοι την Πεδιοκοκίνη Α (Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Παρόλα αυτά, η ικανότητα τους να παράγουν βακτηριοσίνες είναι βασικής σημασίας σε στρατηγικές βιολογικής συντήρησης τροφίμων (βιοσυντήρηση), όπου επιτυγχάνεται η επέκταση διάρκειας ζωής και ασφάλειας των προϊόντων με τη χρήση μικροοργανισμών και/ή των μεταβολιτών τους (Ross et al., 2002).

Βιβλιογραφικά, έχει αναφερθεί, η αναχαιτίση του *Helicobacter pylori* από το *L. casei Shirota*, *L. johnsonii* και *L. acidophilus* (Cats et al., 2003; Shah N.P., 2007). Τα στελέχη *L. rhamnosus GG*, και *L. reuteri* αποτελεσματικά αναστέλλουν τη διάρροια οφειλόμενη στον ρετροϊό 'rotavirus' (Shah, 2007).

Η βοήθεια ασφάλεια των προβιοτικών είναι πρωταρχικής σημασίας και κατευθυντήριες γραμμές για την εκτίμηση της ασφάλειας τους βρίσκονται σε διάφορα άρθρα. Η γνώση της επιβίωσης των προβιοτικών στο γαστρεντερικό σωλήνα, οι ιδιότητες μετεγκατάστασης και αποικισμού και ο τρόπος δράσης των ενεργών ουσιών τους είναι σημαντικά για την αξιολόγηση των πιθανών θετικών ή αρνητικών επιδράσεων της κατανάλωσης προβιοτικών (Saarela et al., 2000). Η επιβίωση διαφορετικών προβιοτικών στελεχών σε διαφορετικά σημεία του γαστρεντερικού σωλήνα ποικίλει: κάποια στελέχη καταστρέφονται άμεσα στο στομάχι ενώ άλλα διατρέχουν όλη την εντερική οδό και επιβιώνουν σε μεγάλους πληθυσμούς. Η εκτίμηση των κινδύνων που ενέχει η κατανάλωση προβιοτικών μπορεί να είναι μια εξαιρετικά ακριβή και χρονοβόρα διαδικασία. Ένα μικρό ποσοστό κινδύνου πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν όταν συστήνεται η κατανάλωση

τους σε άτομα υπό ανοσοκαταστολή, και σε κάθε περίπτωση να εδραιώνεται η αναγκαιότητα τους και η πιθανή τους θετική επίδραση



Εικόνα 1.2: Διαστάσεις της ασφάλειας των προβιοτικών (Saarela et al., 2000).

Τα ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την ιδιότητα τους να περιέχουν προβιοτικά βακτήρια (Saxelin et al., 2005; Settanni & Moschetti, 2010). Τα τυριά αποδεικνύονται άριστα προϊόντα μεταφοράς ζωντανών (προβιοτικών) βακτηρίων στο ανθρώπινο έντερο (Settanni & Moschetti, 2010) συγκριτικά με άλλα όξινα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γιαούρτι εξαιτίας των ειδικών χημικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (Albenzio et al., 2013). Τούτο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η μάζα έχουν συμπαγή μάζα, στερεή μήτρα, και συγκριτικά με τα υπόλοιπα ζυμωμένα προϊόντα υψηλότερο pH και χαμηλότερη ελεύθερη οξύτητα (Ross et al., 2002), και επιπρόσθετα δημιουργούν ένα ρυθμιστικό έναντι στο ισχυρώς όξινο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα, προστατεύοντας μαζί με τη λιποπεριεκτικότητα αποτελεσματικά το βακτηριακό κύτταρο κατά τη διέλευση προς το πεδίο δράσης τους (Karimi et al., 2011).

Πρόσφατα τα LAB θεωρούνται μικροοργανισμοί κατάλληλοι για τρόφιμα, οι οποίοι είναι ασφαλείς στην ανθρώπινη κατανάλωση. Αν και πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης για να θεωρηθούν προβιοτικά, πολλά NSLAB, όπως *Lactobacillus paracasei* και *Lb. plantarum*, που άλλωστε αποτελούν και την πλειοψηφία σε πολλές ποικιλίες τυριών (Pisano et al., 2008), χρησιμοποιούνται ως εμπορικά προβιοτικά προϊόντα. Τέλος αναφέρουμε πως ορισμένες προβιοτικές ιδιότητες είναι εξαρτώμενες από το στέλεχος (Holzapfel et al., 2001). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως τα προβιοτικά, όπως για παράδειγμα το είδος *Lactobacillus acidophilus* εκκρίνουν το ένζυμο «υδρολάση των χολικών αλάτων, BSH (bile salt hydrolase) (χοληγλυκίνη Υδρολάση), το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της υδρόλυσης των γλυκίνη- και ταυρίνη- συζευγμένων χολικών αλάτων σε υπολείμματα αμινοξέων και ελεύθερα χολικά άλατα (χολικά οξέα) (Shah, 2005).

Πίνακας 1.7: Στελέχη γένους *Lactobacillus* που χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικές καλλιέργειες.

Table 1
Lactobacilli used as probiotic cultures^a

Species	Strains
<i>L. acidophilus</i>	LA-1/LA-5 (Chr. Hansen)
<i>L. acidophilus</i>	NCFM (Rhodia)
<i>L. acidophilus</i> Johsonii	La1 (Nestle)
<i>L. acidophilus</i>	DDS-1 (Nebraska Cultures)
<i>L. acidophilus</i>	SBT-2062 (Snow Brand Milk Products)
<i>L. bulgaricus</i>	Lb12
<i>L. lactis</i>	L1A (Essum AB)
<i>L. casei</i> Immunitas	(Danone)
<i>L. plantarum</i>	299v, Lp01
<i>L. rhamnosus</i>	GG (Valio)
<i>L. rhamnosus</i>	GR-1 (Urex Biotech)
<i>L. rhamnosus</i>	LB21 (Essum AB)
<i>L. reuteri</i>	SD2112/MM2 (Biogaia)
<i>L. rhamnosus</i>	271 (Probi AB)
<i>L. plantarum</i>	(Probi AB)
<i>L. reuteri</i>	SD2112 (also known as MM2)
<i>L. casei</i>	Shirota (Yakult)
<i>L. paracasei</i>	CRL 431 (Chr. Hnasen)
<i>L. fermentum</i>	RC-14 (Urex Biotech)
<i>L. helveticus</i>	B02

^aAdapted from Krishnakumar and Gordon (2001), Holm (2003), Playne et al. (2003); Shah (2004).

Πηγή: Shah, 2007

Στην Ιταλία, διατίθενται στην αγορά προβιοτικές καλλιέργειες για ανθρώπινη κατανάλωση με μορφή «φαρμακευτική», και ως τρόφιμα «ζυμούμενα», «συμπληρώματα» και «νέα τρόφιμα» (novel foods) (Aureli et al., 2010). Ο παραπάνω πίνακας αναφέρει τα στελέχη γαλακτοβάκιλλων που χρησιμοποιούνται σήμερα ως προβιοτικά στελέχη (Πιν...). Παρά τη μεγάλη ποικιλία «προβιοτικών διατροφικών συμπληρωμάτων» για ανθρώπινη κατανάλωση, που περιέχουν μονές ή μικτές καλλιέργειες αποξηραμένων (dried) ή λυοφυλιωμένων μικροοργανισμών (freeze-dried), θα ήταν προτιμότερη η αναζήτηση ζωντανών βακτηρίων σε ζυμούμενα τρόφιμα, όπως είναι τα τυριά.

1.6. Σκοπός της παρούσας μελέτης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η έρευνα και μελέτη των φυσικών ενδογενών βακτηριακών πληθυσμών, οι οποίοι αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης παραδοσιακών τυριών της περιοχής Basilicata της Νότιας Ιταλίας.

Επίσης έγινε προσπάθεια να απομονωθούν τυχόν προβιοτικά οξυγαλακτικά στελέχη από τυριά τύπου *'pasta-filata'* και *'pecorino'*, και να αξιολογηθούν οι δείγματα ποικιλιών τυριών ως προς το προβιοτικό τους δυναμικό. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές εξαρτώμενες από καλλιέργεια ώστε να ταυτοποιηθεί η μικροχλωρίδα παραδοσιακών τυριών, η οποία επιβιώνει σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό ("in vitro" έρευνα). Τέλος σε επιλεγμένα απομονωθέντα και ταυτοποιηθέντα στελέχη εξετάστηκαν κάποιες από τις δυναμικές λειτουργικές τους ιδιότητες.

2. Υλικά και Μέθοδοι.

2.1 Δειγματοληψία τυριών.

Κατά τη παρούσα μελέτη εξετάστηκαν είκοσι διαφορετικά δείγματα τυριών, που αγοράστηκαν από λιανοπωλητές και επισημάνθηκαν σαν δείγματα A, B, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O, P, R, S, T, U, X, Z. Όλα προέρχονται από εννιά (9) διαφορετικούς παραγωγούς, που επισημάνθηκαν ως ακολούθως: La Lucana: **A**, local producer: **B**, PaceBio: **C**, Piano della Spina: **D**, Posticchia: **E**, Salvia Maria: **F**, San Rocco: **G**, Tavola P.: **H**, Tripaldi: **I**. Τα δείγματα είχαν παραχθεί στην περιφέρεια της Basilicata (Lucania, Northern Italy), και ανήκουν στις μεγάλες ποικιλίες “*pasta-filata*” και “*pecorino*” τυριών. Τα δείγματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1).

Όλα τα δείγματα έφτασαν στο εργαστήριο αμέσως για περαιτέρω ανάλυση, κάτω υπό συνθήκες ψύξης (4°C), και αναλύθηκαν εντός 6 ωρών από την συλλογή τους.

Πίνακας 2.1: Δείγματα τυριών προς ανάλυση, παραγωγοί, και τύπος τυριού.

Δείγμα	Ποικιλία τυριού	Ηλικία	Τύπος τυριού	Παραγωγός
A	Caciocavallo Lucano	1	Pasta-filata	F
B	Caciocavallo Lucano	2,5	Pasta-filata	F
C	Provolone	2,5	Pasta-filata	F
D	Scarmorza	1	Pasta-filata	F
E	Pecorino Lucano	3.5	Pecorino	B
F	Caciocavallo Podolico	5	Pasta-filata	B
G	Provolone semipicante	6	Pasta-filata	B
H	Caciocavallo Lucano	3	Pasta-filata	I
I	Caciocavallo Lucano	6	Pasta-filata	I
L	Caciocavallo Lucano	2	Pasta-filata	I
M	Caciocavallo Lucano	7	Pasta-filata	C
N	Caciocavallo Lucano	4.5	Pasta-filata	C
O	Cacio Bucato	5	Pasta-filata	C
P	Pecorino Abriola	11	Pecorino	C
R	Scarmorza	3	Pasta-filata	C
S	Canestrato di Moliterno	6	Pecorino	A
T	Caciocavallo Lucano	3	Pasta-filata	E
U	Caciocavallo Silano	3	Pasta-filata	D
X	Pecorino Filiano	3	Pecorino	H
Z	Caciocavallo Lucano	2	Pasta-filata	G

Κωδικοποίηση παραγωγών

A: La Lucana	D: Piano della Spina	G: San Rocco
B: Τοπικός παραγωγός	E: Posticchia	H: Tavola P.
C: PaceBio	F: Salvia Maria	I: Tripaldi

2.2. Φυσικοχημικές παράμετροι.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις μικροβιολογικές μετρήσεις και τα είδη των μικροοργανισμών (στελέχη, που ενδεχομένως θα απομονωθούν) σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τα είδη των τυριών, μετρήθηκαν ορισμένες φυσικοχημικές παράμετροι, όπως το pH, η ενεργότητα του νερού (a_w), το ποσοστό (%) της υγρασίας, το ποσοστό άλατος (%NaCl), και έτσι υπολογίστηκε το ποσοστό του άλατος στην υγρή φάση (salt in moisture percentage -%SM).

2.2.1. Μέτρηση της ενεργότητας νερού (a_w) των δειγμάτων.

Η ενεργότητα του νερού (a_w) των δειγμάτων, υπολογίστηκε σε 10g (± 0.05) αλεσμένου τυριού (με οικιακό τρίφτη τυριών (Magic Grater Bob Home), μέσω του οργάνου Rotronic HygroPalm, σειρά (21/22/23/23-AW/TP22) με αισθητήρα HC2-AW, συνδεδεμένο κυκλικά με υδατόλουτρο (Haake Fisons) σταθερής θερμοκρασίας 25°C. Ύστερα από περίπου 90 λεπτά ήταν δυνατή η σταθεροποίηση των συνθηκών, και η ανάγνωση της μέτρησης της a_w στην οθόνη του οργάνου σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία «συμβατική μέτρηση» (conventional measurement of water activity, **AwE**), όπου ο ψηφιακός αισθητήρας ανιχνεύει αυτόματα τις συνθήκες ισορροπίας (υγρασία και θερμοκρασία). Η μέτρηση τελειώνει τη στιγμή που οι τιμές είναι σταθερές στην οθόνη.

$$* 1.000 a_w = 100\%rh$$

2.2.2. Μέτρηση του pH των δειγμάτων.

Ζυγίστηκαν 10g (± 0.05) κάθε δείγματος τυριού, αλέσθηκαν με οικιακό τρίφτη τυριών (Magic Grater Bob Home), και αναμίχθηκαν με αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 (10ml H₂O). Ύστερα από ομογενοποίηση με το «στόμαχερ» (STOMACHER, Lab-Blender 400) επί 1 λεπτό, μετρήθηκε το pH δια ηλεκτροδίου (Hamilton), το οποίο είναι συνδεδεμένο με το pH-μετρο Orion 420A plus. Παράλληλα έγινε με ειδικό ηλεκτρόδιο η μέτρηση της θερμοκρασίας, για αναγωγή της τιμής στην εκάστοτε θερμοκρασία.

2.2.3. Μέτρηση της υγρασίας των δειγμάτων.

Το ποσοστό υγρασίας υπολογίστηκε με τη μέθοδο της “Ξήρανσης φούρνου στους 102° C” (“oven drying at 105°C”, IDF, 1982). Πιο αναλυτικά, το ποσοστό του εμπεριεχόμενου νερού υπολογίστηκε μέσω ενός δίσκου αλουμινίου, ο οποίος περιείχε 15.00 g (± 0.05) θειϊκού αμμωνίου, και μια υάλινη ράβδο. Μετά από ξήρανση 24 ωρών σε φούρνο στους 105°C ο δίσκος ζυγίστηκε (**p₁**). Εν συνεχεία προστέθηκαν 10g (± 0.05) τριμμένου τυριού, που αναμίχθηκαν καλά με το θειϊκό αμμώνιο, με τη βοήθεια της υάλινης ράβδου, και ζυγίστηκε το μίγμα (**p₂**). Ο δίσκος τοποθετήθηκε πάλι στο φούρνο στους 105°C, και το περιεχόμενο αποξηράνθηκε πάλι. Μετά από 24

ώρες ζυγίστηκε ο δίσκος αλουμινίου, με την γυάλινη ράβδο, και το αποξηραμένο τριμμένο τυρί (p_3).

Το ποσοστό της περιεχόμενης υγρασίας υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Υγρασίας} = 100 * (p_2 - p_3) / (p_2 - p_1)$$

όπου: p_1 : βάρος (g) δίσκου αλουμινίου, υαλίνης ράβδου και 15.00g (± 0.05) θειϊκού αμμωνίου, ύστερα από 24 ώρες ξήρανση στον φούρνο (105°C),

p_2 : βάρος (g) δίσκου αλουμινίου, υαλίνης ράβδου και 15.00 (± 0.05) θειϊκού αμμωνίου, και 10g (± 0.05) αλεσμένου τυριού,

p_3 : βάρος (g) δίσκου αλουμινίου, υαλίνης ράβδου και 15.00 (± 0.05) θειϊκού αμμωνίου, και 10g (± 0.05) αλεσμένου τυριού, ύστερα από 24 ώρες ξήρανση στον φούρνο (105°C).

2.2.4. Μέτρηση συγκέντρωσης άλατος (NaCl) των δειγμάτων.

Η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) μετρήθηκε έμμεσα σε υδατικό διάλυμα δείγματος, το οποίο αποτελείται από 10 g (± 0.05) δείγματος τυριού και 90 ml υπερκαθαρού νερού (1:10 αραίωση). Χρησιμοποιήθηκε ένα εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων χλωρίου (Mettler Toledo ISE Chlorid 51,340,400). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε στα υδατικά διαλύματα ηλεκτρόδιο αναφοράς (Crison 5241) ηλεκτρολύτη KNO_3 .

Πρότυπα διαλύματα NaCl (g/l) (το οποίο προηγουμένως ξηράνθηκε σε φούρνο στους 105°C για 24 ώρες), και ανταποκρίνονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου (Cl^- , από 0.0005 έως 0.1 mol/l) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς (standard curve). Στα 100ml κάθε διαλύματος (10 g τυρί και 90 ml υπερκαθαρό νερό) προστέθηκαν 2 ml NaNO_3 5 mol/l (reagent ISA, ionic strength adjuster), με σκοπό να αποκτήσουν όλα τα διαλύματα την ίδια ιονική ισχύ. Όλες οι μετρήσεις έλαβαν χώρα στην ίδια θερμοκρασία και κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάδευσης.

Με απευθείας είσοδο ηλεκτροδίων ελήφθη η τιμή αγωγιμότητας σε mV. Σχεδιάζοντας την πρότυπη καμπύλη για κάθε τιμή mV στον αντίστοιχο $\log C$ πρότυπου διαλύματος προέκυψε εξίσωση μέσω της οποίας υπολογίσαμε την συγκέντρωση διαλύματος σε οποιοδήποτε μετρούμενο mV.

2.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις και απομόνωση των στελεχών.

Οι μικροβιολογικές έλεγχοι, και η απομόνωση των στελεχών έλαβαν χώρα με τέτοιο τρόπο ώστε τα αποτελέσματα να έχουν επαναληψιμότητα. Περίπου ~10g από κάθε δείγμα τυριού αραιώθηκαν σε 90 ml (1:10) διαλύματος 1% w/v κιτρικού νατρίου (trisodium citrate, Carlo Erba Reagents), και εν συνεχεία ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή «στόμαχερ» (Stomacher Lab-Blender 400, PBI International, Milan, Italy) για δυο

λεπτά. Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε 1% w/v κιτρικού νατρίου.

Τέλος τρυβλία Rogosa Agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης («*spread*») εις διπλούν. Οι μεσόφιλοι λακτοβάκιλλοι, οι οποίοι αποτελούν μέρος της NSLAB δευτερογενούς μικροχλωρίδας των τυριών καταμετρήθηκαν ύστερα από επώαση στους 30°C για 96hrs (4 ημέρες) αναερόβια (GENbox anaer, bioMérieux SA, France).

Με σκοπό να καταμετρήσουμε και να απομονώσουμε στελέχη που πιθανώς επιβιώνουν κατά τη διέλευση τους στο γαστρικό σωλήνα, η δεκαδική αραιώση 10^{-2} πραγματοποιήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε 9 μέρη προσομοιωμένου γαστρικού υγρού (S1), (Simulated Gastric Fluid) και το κυτταρικό αιώρημα (1 ml) και επώαστηκε σε υδατόλουτρο 37°C για 30 min. Ύστερα από την επώαση, οι επιτυχείς επόμενες δεκαδικές αραιώσεις (10^{-3} - 10^{-7}) πραγματοποιήθηκαν σε 1% w/v κιτρικό-νάτριο και τέλος μέσω της επιφανειακής εξάπλωσης (“*spread*, 100μl”) εμβολιάστηκαν τρυβλία mMRS-BPB, pH 6.8 (βλ. παράρτημα) εις διπλούν. Τα μεσόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια καταμετρήθηκαν ύστερα από επώαση στους 30°C για 48hrs, σε συνθήκες αναερόβιες (GENbox anaer, bioMérieux SA, France).

Ύστερα από την επώαση και την καταμέτρηση, από τα τρυβλία mMRS-BPB με τις τελευταίες μετρήσιμες αραιώσεις, απομονώθηκαν τυχαία 15-20 αποικίες για κάθε δείγμα τυριού χρησιμοποιώντας ένα δίσκο Harrison (Harrison disk, Harrigan and McCance, 1976). Οι αποικίες αυτές πιθανών διαφορετικών μορφολογιών, καθαρίστηκαν με γραμμική εξάπλωση (“*streaking*”) σε mMRS-BPB agar (βλ. παράρτημα), και επώαστηκαν αναερόβια (GENbox anaer, bioMérieux SA, France) στους 30°C για 48hrs.

Σε όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν 1. ελέγχθηκε η μορφολογία της αποικίας (βάση του πρωτοκόλλου που περιγράφεται παρακάτω), 2. ελέγχθηκε η αντίδραση της καταλάσης, 3. εξετάστηκε η μορφολογία μικροσκοπικά, 4. Εν συνεχεία εμβολιάστηκαν (1% v/v) σε τροποποιημένο All Purpose Tween (APT) broth, pH 6.8 για τον έλεγχο παραγωγής αερίου CO₂, και 5. διατηρήθηκαν κατεψυγμένα αποθέματα σε 250μl 50% γλυκερόλης ως κρυοπροστατευτική ουσία. Τέλος αποθηκεύτηκαν στους -20°C σαν αποθέματα καλλιιεργειών (“*stock*”) για περαιτέρω χρήση.

2.4. Βελτιστοποίηση του υποστρώματος mMRS-BPB agar (Lee and Lee, 2008) για την απομόνωση και τη διαφοροποίηση των μετρούμενων οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά.

Στην μελέτη των Lee and Lee (2008) χρησιμοποιήθηκε MRS (deMan, Rogosa, Sharpe, 1960) agar, το οποίο περιείχε **Κυανούν της Βρωμοφαινόλης (BromoPhenol Blue)**, και **Κυστεΐνη (Cysteine)**, με σκοπό τη διαφοροποίηση ως προς την ανάπτυξη των ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 8 στελέχη του γένους *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Lb. brevis* ATCC14869, *Lb. bulgaricus* ATCC11842, *Lb. gasseri* ATCC33323, *Lb. paracasei* ATCC25302, *Lb. plantarum* ATCC14917, *Lb. reuteri* ATCC23272,

Weissella confusa ATCC1088), και 2 στελέχη του γένους *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum* ATCC29521; *B. infantis* ATCC15697).

2.4.1. Προετοιμασία του υποστρώματος mMRS-BPB agar.

Προετοιμάστηκε MRS broth, pH 6.8 (Πίνακας 2.2) και εν συνεχεία προστέθηκε 12 g/l agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά, και ψύχτηκε στους 48°C σε υδατόλουτρο. Εν συνεχεία προστέθηκε αποστειρωμένο μέσω διήθησης (filter-steriled solution) διαλύματος BromoPhenol Blue (BPB τελική συγκέντρωση 0.02 g/l) και διηθημένο και αποστειρωμένο διάλυμα L-cysteine-HCl (τελική συγκέντρωση 0.5 g/l). Ύστερα από καλή ανάμιξη «στρώσιμο» (pour) του υποστρώματος σε τρυβλία Petri. Τέλος επώαση των τρυβλίων με το εμβόλιο της δειγματοληψίας, ή του καθαρισμού (purification) στους 30 °C για 48 ώρες κάτω από αναερόβιες συνθήκες (GENbox anaer, bioMérieux SA, France; 1-2 bags AnaeroGen, Oxoid).

Ο παρακάτω πίνακας περιέχει τη σύσταση (g/l) για την προετοιμασία του MRS agar, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη μελέτη.

Πίνακας 2.2.: Σύσταση MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Tween 80	1 ml
Βακτηριολογική Πεπτόνη (LP0037, OXOID)	10g
Εκχύλισμα κρέατος (*Εναλλακτικά: “Lab Lemco = 8g, LP0029, OXOID)	10g
Εκχύλισμα Ζύμης (LP0021, OXOID)	10g
Άνυδρη Γλυκόζη (* Εναλλακτικά: “D(+)-glucose-monohydrate = 22g)	20g
Άνυδρο φωσφορικό κάλιο Potassium Hydrogen Phosphate Anhydrous (K ₂ HPO ₄)	2g
Οξικό Νάτριο (C ₂ H ₃ NaO ₂)	5g
Triammonium citrate (* Εναλλακτικά: Κιτρικό αμμώνιο, Διβασικό) (A-8170, Sigma)	2g
Magnesium sulfate 7-hydrate	200mg
Manganese sulfate monohydrate (Διάλυμα)	50mg
Agar bacteriological (LP0011, OXOID), Agar No1)	12g/l
Αποσταγμένο νερό	1 l
pH	6.8

Αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

2.4.2. Χαρακτηριστικά αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στο mMRS-BPB.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), τα οποία αναπτύσσονται στο mMRS-BPB Agar, μπορούν να παρατηρηθούν, και να καταγραφούν χρησιμοποιώντας ως αναφορά μια καλά απομονωμένη, και καθαρισμένη αποικία. Η παρατήρηση των αποικιών, οι οποίες προέρχονται από τις

πρώτες δυο προσπάθειες καθαρισμού, μπορεί να προκαλέσει τα ακόλουθα σφάλματα ανάγνωσης:

- 1) Παρατήρηση συσσωρευμένων αποικιών ή ακόμη και «λάσπη κυττάρων», με ασαφή και μπερδεμένα χρώματα, και
- 2) Παρατήρηση μη αληθών χρωματισμών, και γενικά πιο σκούρες ή κίτρινες αποχρώσεις, εξαιτίας του χαμηλού pH σε εκείνο το μέρος του τρυβλίου.

Στόχος του υποστρώματος είναι η απευθείας καταγραφή της εμφάνισης και η καταμέτρηση των αποικιών, ούτως ώστε να οδηγηθούμε σε διαφορεική καταμέτρηση των Οξυγαλακτικών βακτηρίων που εμπεριέχονται, ή να επιλεγθούν στελέχη μεταξύ άλλων. Με σκοπό να αποφευχθούν τα παραπάνω λάθη, είναι προτιμότερο να επιλέγουμε τρυβλία με τις πιο αξιόπιστες αραιώσεις, όπου οι αποικίες είναι καλύτερα διαχωρισμένες.

Ο ακόλουθος πίνακας (πίνακας 2.3) περιγράφει και κωδικοποιεί τα κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών.

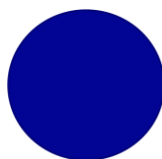
Πίνακας 2.3: Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών LAB σε mMRS-BPB-agar.

a. Διάσταση

Κωδικός: 0



1



0 = Μικρή αποικία colony, σαν κουκίδα / διάμετρος: <1mm.

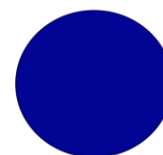
1 = Μεγάλη αποικία / διάμετρος:> 1mm

b. Σχήμα, Περιθώριο, Επιφάνεια

Κωδικός: 0



1



0 = Αποικία ακανόνιστου σχήματος / Ανώμαλο περιθώριο / τραχεία επιφάνεια

1 = Κυκλική αποικία / ολόκληρο περιθώριο / Λεία επιφάνεια

c. Χρώμα

Κωδικός: 0

1

2

3

4

5

6



0: Λευκό

1: Απαλό κίτρινο

2: Γκρίζο

3: Γαλάζιο

4: Απαλό μπλε

5: Σκούρο μπλε βιολετί

6: Μπλε της Πρωσίας /Πρωσικό μπλε

2.5.1.2. Παραγωγή αερίου CO₂

Ο έλεγχος παραγωγής αερίου CO₂ από τα στελέχη, και συνεπώς ο χαρακτηρισμός τους σαν ομοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά έγινε με τη χρήση σωλήνων τροποποιημένου «All Purpose Tween» (APT) broth, pH 6.8, εμβολιάζοντας (refresh) με 1% w/w. Η σύσταση του τροποποιημένου broth περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.4.: Σύσταση τροποποιημένου APT broth.

<u>Συστατικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
Εκχύλισμα ζυμών	7.5g
Tryptone (LP0042, Oxoid)	12.5g
D(+) Glucose Monohydrate (346971, RPH, Carlo Erba Reagents) MW=198,17g/mol	22g
Κιτρικό Νάτριο	5g
Χλωριούχο Νάτριο	5g
Οξικό νάτριο	5g
Μονοϋδρογονικό Φωσφορικό Κάλιο	5g
Θειικό Μαγνήσιο 7-hydrate	0.8g
Θειικό-Μαγγάνιο-μονοϋδρογονικό	0.16g
Ferrus Sulphate 7-hydrate	0.04g
Tween 80	0.2ml
Διάλυμα θειαμίνης*	1 ml
Αποσταγμένο Νερό	1l
pH	6.8

* Διάλυμα Θειαμίνης: 0,001g θειαμίνης σε 10 ml αποσταγμένο νερό.

Αποστείρωση στους 121°C για 15 min.

Η θετική δοκιμή παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα εκδηλώνεται με την παραγωγή φυσαλίδων και την άνοδό τους κατά την ανακίνηση του σωλήνα στο vortex αρκετά εκατοστά, ή εφαρμόζοντας την τεχνική «καυτού-κρίκου» (hot-loop technique, Sperber & Swan, 1976).

2.5.1.3. Μικροσκοπική εξέταση των στελεχών.

Η κυτταρική μορφολογία των απομονωθέντων στελεχών μελετήθηκε σε μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης Axioskop Zeiss (Carl Zeiss, Germany). Σε υάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται σταγόνα καλλιέργειας, μετά από ολονύχτια επώαση σε τροποποιημένο APT (ή MRS) broth, pH 6.8, καλύπτουμε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα, και τοποθετούμε πάνω σε αυτή μια σταγόνα κεδραλαιίου (έλαιο οπτικής ομοιογένειας για καταδυτικούς φακούς). Τέλος παρατηρούμε τη μορφολογία των κυττάρων με φακό αντίστροφης φάσης 100x (Achromplan 100x Oil Ph3 lense).

Γενικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν. Τα αποτελέσματα κωδικοποιούνται και περιγράφονται από έναν διψήφιο κωδικό όπως ακολούθως: οι κόκκοι καταγράφηκαν

ως «0», και οι βάκιλλοι (ραβδία) ως «1». Όσον αφορά τη συγκόλληση κυττάρων, οι κόκκοι σε μικρότερες ή μεγαλύτερες αλυσίδες (στρεπτόκοκκοι, και διπλόκοκκων) και τα ραβδία σε αλυσίδες (το ελάχιστο 3-4 κύτταρα έως 14) επισημάνθηκαν με το «1». Απεναντίας οι κόκκοι σε τετράδες και οι απομονωθέντες μονοί βάκιλλοι ή σε ζεύγη με «0». Ο συνδυασμός αυτών των δυο επιμέρους κωδικών αντιπροσωπεύει τη μορφολογία.

Πίνακας 2.5.: Κωδικοποίηση μορφολογίας μέσω μικροσκοπικής εξέτασης.

Μορφολογία		Αποτελέσματα
Κόκκοι		0
Ραβδία/βάκιλλοι		1
Σύνδεση των κυττάρων		
Κόκκοι σε αλυσίδα	Διπλόκοκκοι, Στρεπτόκοκκοι	1
Κόκκοι σε τετράδες	Τετράκοκκοι	0
Ραβδία σε αλυσίδες	≥ 3 κύτταρα	1
Απομονωθέντα ραβδία	Σπάνια αλυσίδες, ≤ 2 κύτταρα	0

2.5.2. Γενοτυπικός χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των στελεχών.

2.5.2.1. Παραλαβή DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Η παραλαβή του DNA των απομονωθέντων οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της «εξαλάτωσης» σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Dr. Lara Aponte (salting-out method). Η εξαγωγή του DNA λαμβάνει χώρα σε 1.5ml (ή 2 ml) ολονύχτιας καλλιέργειας 1% ό/ό (16hrs) του στελέχους σε 5 ml MRS broth, pH 6.80 (ή σε τροποποιημένο APT broth, pH 6.80) που επώαστηκε σε θερμοκρασία 30°C. Τα ακόλουθα βήματα περιγράφουν τη διαδικασία.

- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min 1.5ml ολονύχτιας (16hrs) καλλιέργειας σε MRS broth (ή APT), κυττάρων τα οποία βρίσκονται στη λογαριθμική¹ φάση ανάπτυξης.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου. Αν το κυτταρικό ίζημα (pellet) είναι ανεπαρκές η διαδικασία επαναλαμβάνεται με άλλο 1.5ml καλλιέργειας κυττάρων.
- Αιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml διαλύματος STE (βλ. παράρτημα).
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 λεπτά, και ολοκληρωτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1ml STE, ώστε να εκπλυθεί η βιομάζα 2 φορές.
- Διαλυτοποίηση εκ νέου του pellet σε 250μl ρυθμιστικού διαλύματος **Lysis Buffer** (βλ. παράρτημα), και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 hrs.
- Προσθήκη 25μl **SDS 25%** (w/v) και ήπια ανάδευση με απλή αναστροφή του erppendorf. Σε αυτή τη φάση μπορούμε να παρατηρήσουμε το σχηματισμό λευκών και ιξωδών νηματίων.

- Προσθήκη 2μl **Pronase E** (20mg/ml).
- Επανεπώαση σε υδατόλουτρο για μια ακόμη ώρα στους 37°C.
- Ψύξη στους 0°C (σε πάγο) επί 15 min.
- Προσθήκη ενός όγκου (280μl) **Οξικού Αμμωνίου 5M** 4°C.
- Επώαση στους 4°C επί 15 min.
- Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm επί 15 min στους 4°C (Centrifuge Allegra 64R, Beckman Coulter).
- Προσεκτική ανάκτηση του υπερκειμένου (≈400μl) με ακρίβεια, το οποίο θα πρέπει να περιέχει το βακτηριακό DNA. Αν είναι θολό, και διαταραχτεί το κυτταρικό ίζημα, θα πρέπει να επαναληφθεί η διαδικασία
- Προσθήκη 0.7 όγκου (280μl) κρύας **Ισοπροπανόλης** (Isopropanol) (-20°C).
- Επώαση στους 0°C (πάγος) επί 15min.
- Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C, και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Elimination of the supernatant.
- Έκπλυση του ιζήματος με 250μl **Αιθανόλη 70%** (EtOH 70%). Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση του Οξικού Αμμωνίου 5M, το οποίο αναστέλλει τις αντιδράσεις επιμήκυνσης (amplification) του DNA. Αν κριθεί απαραίτητο επαναλαμβάνεται η διαδικασία έκπλυσης.
- Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C, και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Στέγνωμα του ιζήματος με αναστροφή του Eppendorf πάνω σε στρώμα χαρτιού, και κάτω από ροή αέρα, με σκοπό να απομακρυνθεί πλήρως η Αιθανόλη. Αφήνουμε να στεγνώσει, μέχρι το ίζημα να γίνει διάφανο.
- Αραιώση του pellet σε 50μl διαλύματος **TE** (βλ. παράρτημα), με καλή αλλά όχι βίαιη ανακίνηση, διότι μέρος του DNA πιθανώς να έχει παραμείνει στα τοιχώματα του eppendorf.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C για 1hr.
- Έλεγχος της ποιότητας, και της συγκέντρωσης του διαλύματος του DNA σε NanoDrop[®], ή σε gel Αγαρόζης 1.0% με 10μl/well.
- Το DNA διατηρείται στους 4°C για περίπου 24hrs για άμεση χρήση, και για μεγαλύτερες περιόδους στους -20°C ή καλύτερα στους -80°C.

2.5.2.1.1. Έλεγχος συγκέντρωσης, και ποιότητας DNA στο Nanodrop[®].

Ο έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με το Nanodrop[®], σε 1-2μl του εκχυλίσματος. Το όργανο αυτό μετράει σε μήκος κύματος $\lambda=260\text{nm}$ την συγκέντρωση του DNA σε ng/μl. Επίσης δίνει χρήσιμες τιμές για άλλες παραμέτρους, που αφορούν την ποιότητα του DNA, όπως είναι η απορρόφηση (A) στα 280nm και 230nm, και τους λόγους 260/280, και 260/230. Οι δυο αυτοί λόγοι αποτελούν δείκτες της καθαρότητας του DNA. Ο πρώτος δείχνει το λόγο της απορρόφησης των δειγμάτων DNA στα 260 και 280nm αντίστοιχα και ο δεύτερος το λόγο στα 260 και 230nm, και αποτελεί δευτερογενές μέτρο της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Μια τιμή ~1.8 είναι γενικά αποδεκτή σαν «καθαρό» DNA. Τιμή

εμφανώς χαμηλότερη μαρτυρά, την ύπαρξη πρωτεϊνών, φαινολών, ή άλλων προσμίξεων, οι οποίες απορροφούν έντονα ή κοντά στα 280nm. Οι τιμές 260/230 για καθαρό νουκλεϊκό οξύ είναι συχνά υψηλότερες από τις τιμές 260/280, και είναι συχνά στο εύρος 1.8-2.2. Αν οι τιμές είναι χαμηλότερες, μαρτυράται η παρουσία συνεκχυλιζόμενων προσμίξεων. Για παράδειγμα τιμή των λόγων γύρω στο 1.2 θα προκαλέσει μετέπειτα προβλήματα κατά την ενίσχυση του βακτηριακού DNA.

2.5.2.1.2. Προετοιμασία των δειγμάτων προς ενίσχυση.

Απόψυξη των κατεψυγμένων διαλυμάτων (-20°C/-80°C) τα οποία περιέχουν το βακτηριακό DNA αραιωμένο σε 50μl TE, και πραγματοποίηση (βάσει της συγκέντρωσης του DNA που λήφθηκε από το NanoDrop®) αραιώσεων των δειγμάτων σε TE, έτσι ώστε να επέλθουν συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 20 έως 30 ng/μl DNA. Το αραιωμένο δείγμα θα πρέπει να αναμιχθεί αντιστοίχως με το εκάστοτε μίγμα της αντίδρασης PCR, όπως εξηγείται στις επιμέρους διαδικασίες (RAPD-PCR, multiplex-PCR tuf gene, multiplex-PCR recA, ITS-PCR, 16SrRNA sequencing-PCR).

2.5.2.2. Διαφοροποίηση των στελεχών με RAPD-PCR.

Για τη διαφοροποίηση των στελεχών χρησιμοποιήσαμε τη μοριακή τεχνική της Τυχαίας Ενίσχυσης Πολυμορφικού DNA (Randomly, Amplified Polymorphic DNA) Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) (RAPD-PCR). Η ενίσχυση (amplification) του DNA διεξάγεται με δυο διαφορετικούς εκκινητές (primers):

M13 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' (για Λακτοβάκιλλους)

Coc-1 5'-AGCAGCGTGG-3' (για κόκκους)

και χρησιμοποιούνται για διαφορετικά συγκεκριμένα μίγματα αντίδρασης και συνθήκες ενίσχυσης.

2.5.2.2.1 Διαφοροποίηση γαλακτοβακίλλων με RAPD-PCR.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική RAPD-PCR, ώστε να διαφοροποιηθούν τα στελέχη, αποδιπλασιάσουμε τους κλώνους, και να χαρακτηρίσουμε γενοτυπικά τους μεσόφιλλους γαλακτοβάκιλλους. Με σκοπό να χρησιμοποιήσουμε μια μέθοδο χαμηλού κόστους, χρησιμοποιήσαμε έναν «εκκινητή» (primer). Η ενίσχυση του DNA (amplification) πραγματοποιήθηκε με τον εκκινητή M13 (primer M13), σύμφωνα με τους Rossetti & Giraffa (2005).

Είναι προτιμότερο να παρασκευάσουμε μια μόνο παρτίδα του μίγματος αντίδρασης, το οποίο περιέχει όλα τα επιμέρους συστατικά, εκτός από το δείγμα το οποίο επρόκειται να ενισχυθεί, αυστηρά σε πάγο. Κατόπιν κατανέμουμε 19μl του μίγματος μέσα σε στα PCR-Eppendorfs, και προσθέτουμε 1μl του κατάλληλα αραιωμένου DNA, ώστε να αποκτήσουμε έναν τελικό όγκο αντίδρασης **20μl**.

Πίνακας 2.6.: Συστατικά μίγματος για RAPD-PCR με primer M13.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (αραιωμένο)	-----	-----	1
H ₂ O υπερκαθαρό ^b	-----	-----	9.8
PCR Buffer	10x	1x	2.0
MgCl ₂	50 mM	4.0 mM	1.6
dNTPs mix (βλ. παρ)	10 mM each	0.2 mM each	0.4
Primer M13	10 μM	2.5 μM	5
Taq πολυμεράση ^c	5U/μl	1U/20 μl	0.2
Σύνολο			20 (19 μl MIX + 1 μl DNA)

^a Όλα τα συστατικά του μίγματος παρέχονται από την εταιρία “Euroclone”.

^b Προσθήκη πρώτα του υπερκαθαρού H₂O, και διάλυσε μέσα σε αυτό τα υπόλοιπα συστατικά

^c Απόψυξη της Taq Πολυμεράσης (EuroTaq Polymerase EuroClone, 1000 UN) τη στιγμή της χρήσης. Ύστερα από την προσθήκη (εύκολα παρατηρήσιμη από την παρουσία της γλυκερόλης) ανακατεύουμε το αντιδραστήριο μίγμα με ανακίνηση με απλή κίνηση του καρπού αποφεύγοντας τον σχηματισμό φυσαλίδων αέρα, και εν συνεχεία διαμοιράζουμε στα επιμέρους PCR-Eppendorfs.

Κύκλοι ενίσχυσης του εκκινητή M13. (Amplification cycles)

Αρχική μετουσίωση	2 min, 94°C => 1 κύκλος	
Μετουσίωση	1 min, 94°C	} 40 κύκλοι
Αναδιάταξη	20 sec, 40°C	
Επιμήκυνση	2 min, 72°C	
Τελική Επιμήκυνση	10 min, 72°C => 1 κύκλος	
Ψύξη (διατήρηση)	4°C, max 24 hrs	

Ύστερα από την ενίσχυση του DNA, στο ενισχυμένο περιεχόμενο (20μl) πρέπει να προστεθούν 4μl Sample Buffer 6x (βλ. παράρτημα), και να διαχωριστεί αμέσως μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή Αγαρόζης 1.5% w/v (GellyPhor[®] Agarose LE, EuroClone) σε TBE 0.5x (Euroclone, Milan Italy) το οποίο περιέχει 0.5 μg ml⁻¹ Βρωμιούχο Αιθίδιο. Μαζί με τα δείγματα, στην ίδια πηκτή Αγαρόζης τοποθετούμε το λιγότερο σε δυο θέσεις 20μl από 100bp δείκτη κλίμακας DNA (DNA-ladder, Euroclone S.p.A., Milan Italy), προηγουμένως αραιωμένο κατάλληλα σε TE (βλ. παράρτημα), σύμφωνα με τον κατασκευαστή (τελική συγκέντρωση: 0.5ng DNA/ml), εφόσον έχει αναμιχθεί με Sample Buffer 6x (βλ. παράρτημα).

2.5.2.2.2. Διαφοροποίηση κόκκων με RAPD-PCR.

Όπως και για τους λακτοβάκιλλους, χρησιμοποιήθηκε η μοριακή τεχνική RAPD-PCR, ώστε να αποδιπλασιάσει τους κλώνους, και να χαρακτηρίσει γονοτυπικά τους απομονωθέντες κόκκους. Με σκοπό να χρησιμοποιηθεί μια μέθοδος χαμηλού κόστους χρησιμοποιήσαμε έναν εκκινητή (primer). Η ενίσχυση έλαβε χώρα με τον εκκινητή coc-1, σύμφωνα με τον Parente και τους συναδέλφους του (2010). Όπως και στην προηγούμενη τεχνική RAPD-PCR, έτσι και σε αυτή η ενίσχυση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο **20μl** (19μl μίγμα, και 1μl κατάλληλα αραιωμένο

DNA). Ο ακόλουθος πίνακας περιέχει τα επιμέρους συστατικά του μίγματος για την αντίδραση PCR.

Πίνακας 2.7.: Συστατικά μίγματος για RAPD-PCR με primer coc-1.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (αραιωμένο)	-----	-----	1
H ₂ O υπερκαθαρό ^b	-----	-----	12
PCR Buffer	10x	1x	2.0
MgCl ₂	50 mM	3.75 mM	1.5
dNTPs mix	10 mM each	0.25 mM each	0.5
Primer Coc-1	10 μM	1 μM	2
Taq πολυμεράση ^b	5U/μl	5U/20 μl	1.0
Σύνολο			20 (19 μl MIX + 1 μl DNA)

Κύκλοι ενίσχυσης (Amplification cycles) του primer Coc-1:

Αρχική μετουσίωση	7 min, 94°C => 1 κύκλος	
Μετουσίωση	1 min, 94°C	} 45 κύκλοι
Αναδιάταξη	1 min, 29°C	
Επιμήκυνση	2 min, 72°C	
Τελική επιμήκυνση	5 min, 72°C => 1 κύκλος	
Ψύξη (διατήρηση)	4°C, max 24 hrs	

Στο τέλος της ενίσχυσης του DNA, ακολουθείται ηλεκτροφόρηση όπως και κατά την τεχνική RAPD-PCR με primer M13. Και στις δυο περιπτώσεις ύστερα από την τοποθέτηση των δειγμάτων, ρυθμίζουμε το ρεύμα (Power Pack Basic; Bio-Rad) στα 100 συνεχή Volts, συνεχούς τάσης και “τρέχουμε” για περίπου 3 ώρες. Σταματάμε την ηλεκτροφόρηση όταν η γραμμή των δειγμάτων, που υποδηλώνεται από τη χρωστική μπλε βρωμοφαινόλης απέχει 0.5 cm πριν το τέλος του gel. Το gel εμφανίζεται χρησιμοποιώντας την κατάσταση «trans-UV illuminator» (Gel Doc XR, Biorad). Η εικόνα που λαμβάνεται και αποθηκεύεται θα πρέπει να μετατραπεί σε αρχείο Tiff υψηλής ανάλυσης (300dpi), και τα μοτίβα των ζωνών ανιχνεύονται και υφίστανται επεξεργασία με τη βοήθεια του λογισμικού «FPQuestTM II Database» (Bio-Rad), ύστερα από κανονικοποίηση (normalization) των ζωνών.

2.5.2.2.3. Ομαδοποίηση των στελεχών της RAPD-PCR.

Τα αποτυπώματα της RAPD-PCR αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού FPQuestTM II (Bio-Rad). Η αναπαραγωγιμότητα, και επαναληψιμότητα τους ελέγχθηκε με διπλά δείγματα ανεξάρτητων μιγμάτων αντίδρασης, από στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τα δείγματα I και L (η επιλογή των δυο αυτών δειγμάτων έγινε τυχαία). Ο υπολογισμός της ομοιότητας στα προφίλ των ζωνών (bands) έγινε βάσει του συντελεστή συσχέτισης Pearson product-moment.

Η ανάλυση συστάδων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ομαδοποιήσει τα RAPD-PCR προφίλ, χρησιμοποιώντας τη «Μέθοδο Μη σταθμισμένου ζεύγους-ομάδας με αριθμητικούς μέσους UPGMA» (unweighted pair-group method with arithmetic averages) (Sokal and Michener, 1958; Everitt, 1974) και αλγόριθμο συστάδων (Vauterin and Vauterin, 1992). Με αυτό το στατιστικό εργαλείο, προκύπτει δένδρογραμμα, το οποίο δείχνει τη σχέση μεταξύ των γαλακτοβάκιλλων, και των κόκκων, και έτσι καθίσταται εύκολος ο αποδιπλασιασμός των όμοιων στελεχών από κάθε δείγμα τυριού. Ο υποδιπλασιασμός στοχεύει στην μείωση των στελεχών προς ταυτοποίηση, και την καταμέτρηση του στελέχους που επαναλαμβάνεται κατά τις απομονώσεις. Για κάθε δείγμα τυριού πραγματοποιήθηκε ξεχωριστό δένδρογραμμα (βλ. παράρτημα), και επιλέχθηκε ως συντελεστής ομοιότητας ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (Pearson's correlation). Για τα στελέχη, τα οποία έδειξαν χαμηλή ομοιότητα ή διαφορετικό αποτύπωμα πραγματοποιήθηκε νέο δένδρογραμμα χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισης "Dice". Αυτό έγινε τόσο για τους βακίλους, όσο για τους κόκκους.

Συντελεστής συσχέτισης πάνω από 85% επιλέχθηκε αυθαίρετα, ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ των συστάδων. Τα στελέχη εκείνα τα οποία συνδέονται με υψηλή ομοιότητα (>95%) ή παρουσιάζουν τα ίδια «αποτυπώματα» χαρακτηρίστηκαν σαν όμοια.

2.5.2.3. Ομαδοποίηση και ταυτοποίηση των στελεχών με PCR μεθόδους.

Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου «Industrial Microbiology» του Πανεπιστημίου της Basilicata (Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Italy) για τη βελτιστοποίηση του τροποποιημένου υποστρώματος mMRS-BPB πάνω στις αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες, και εν συνεχεία εφαρμόστηκε συγκεκριμένο PCR-πρωτόκολλο για την ταυτοποίησή τους.

Στα στελέχη, τα οποία πιθανώς ανήκουν στο "*Lactobacillus casei* group" ενισχύεται το γονίδιο "*tuf*", σε εκείνα που πιθανώς ανήκουν στο "*Lb. plantarum* group" το γονίδιο "*recA*", και στους στρεπτόκοκκους η περιοχή 16-23SrDNA. Σε όσα δεν ανήκαν στις ανωτέρω κατηγορίες, ή παρουσίασαν μεγάλες διαφορές τα γονιδιακά αποτυπώματα τους κατά την RAPD-PCR, ή είχαν χαμηλό ποσοστό ομοιότητας στα δένδρογραμματα, εφαρμόσαμε την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, και έπειτα χρησιμοποιώντας τη διαδικτυακή βάση δεδομένων «Ribosomal Database project» τα ταυτοποιήσαμε με ομοιότητα 98-100% με άλλα στελέχη της βάσης (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

2.5.2.3.1. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “*casei* group”.

Η ενίσχυση του βακτηριακού DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων που πιθανώς ανήκουν στο «*Lactobacillus casei* group» έγινε με τη μέθοδο multiplex-PCR και βασίζεται στην αλληλουχία του γονιδίου “*tuf*”, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ventura *et al.* (2003) με κάποιες τροποποιήσεις.

Η multiplex-PCR διεξάγεται χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικούς εκκινητές (primers):

PAR 5'-GACGGTTAAGATTGGTGAC-3' (εμπρός)

CAS 5'-ACTGAAGGCGACAAGGA-3' (εμπρός)

RHA 5'-GCGTCAGGTTGGTGTG-3' (εμπρός)

CPR 5'-CAANTGGATNGAACCTGGCTTT-3' (αντίστροφα)

Αντίδραση PCR

Είναι προτιμότερο να παρασκευάσουμε μια μόνο παρτίδα του μίγματος αντίδρασης, το οποίο περιέχει όλα τα επιμέρους συστατικά, εκτός από το δείγμα το οποίο πρόκειται να ενισχυθεί, αυστηρά σε πάγο. Κατόπιν κατανέμουμε 24μl του μίγματος μέσα σε στα επιμέρους PCR-Eppendorfs, και προσθέτουμε 1μl του κατάλληλα αραιωμένου DNA, ώστε να αποκτήσουμε έναν τελικό όγκο αντίδρασης **25μl**.

Πίνακας 2.8.: Συστατικά μίγματος αντίδρασης για multiplex-*casei* group.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (αραιωμένο)	-----	-----	1.0
H ₂ O υπερκαθαρό ^b	-----	-----	15.75
PCR Buffer	10x	1x	2.5
MgCl ₂	50 mM	2.0 mM	1.0
dNTPs mix	10 mM each	0.2 mM each	0.5
Primer CAS	10 μM	0.2 μM	0.5
Primer PAR	10 μM	0.2 μM	0.5
Primer RHA	10 μM	0.2 μM	0.5
Primer CPR	10 μM	1.0 μM	2.5
Taq Πολυμεράση ^c	5U/μL	0.05U/25 μL	0.25
Total			25μl (24μl mix+1μl DNA)

Πρόγραμμα PCR

Αρχική μετουσίωση	7 min, 95°C	=> 1 κύκλος
Μετουσίωση	30sec, 95°C	} 30 κύκλοι
Αναδιάταξη	1 min, 54°C	
Επιμήκυνση	1.5 min, 72°C	
Τελική επιμήκυνση	7 min, 72°C	=> 1 κύκλος
Ψύξη (αποθήκευση)	4°C, max 24 hrs	

Στο τέλος της διαδικασίας, στο ενισχυμένο περιεχόμενο (25μl) προστίθενται 5μl Sample Buffer 6x (βλ. παράρτημα), και γίνεται αμέσως διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Αγαρόζης 2.0% w/v (GellyPhor[®] Agarose LE, EuroClone) σε TBE 0.5x και το οποίο περιέχει 0.5 μg ml⁻¹ Βρωμιούχο Εθίδιο. Παράλληλα με τα

δείγματα «τρέχουμε» κατ' ελάχιστο δυο κλίμακες DNA (1kb DNA ladder, Euroclone, Milan Italy), ως δείκτη των ζευγών βάσεων. Μαζί με τα δείγματα, στην ίδια πηκτική Αγαρόζης τοποθετούμε το λιγότερο σε δυο θέσεις 20μl από 100bp δείκτη κλίμακας DNA (DNA-ladder, Euroclone S.p.A., Milan Italy), προηγουμένως αραιωμένο κατάλληλα σε TE (βλ. παράρτημα), σύμφωνα με τον κατασκευαστή (τελική συγκέντρωση: 0.5ng DNA/ml), και εφόσον έχει αναμιχθεί με Sample Buffer 6x (βλ. παράρτημα).

Ύστερα από την τοποθέτηση των δειγμάτων, ρυθμίζουμε το ρεύμα (Power Pack Basic; Bio-RAD) στα 80 συνεχή Volts (7 V/cm), και “τρέχουμε” για περίπου 2.5 ώρες. Σταματάμε την ηλεκτροφόρηση όταν η γραμμή που αντιπροσωπεύει τη χρωστική μπλε βρωμοφαινόλης είναι στα 0.5 cm πριν το τέλος του gel. Το gel εμφανίζεται χρησιμοποιώντας την κατάσταση «trans-UV illuminator (Gel Doc XR, Biorad)». Η εικόνα που λαμβάνεται και αποθηκεύεται θα πρέπει να μετατραπεί σε αρχείο Tiff υψηλής ανάλυσης (300dpi), και τα μοτίβα των ζωνών ανιχνεύονται και επεξεργάζονται με τη βοήθεια του λογισμικού «GelDoc XR» (Bio-Rad).

Αναμενόμενα αποτελέσματα:

Lactobacillus casei χαρακτηρίζεται δύο ζώνες στις 540 και 350 bp

Lb. paracasei χαρακτηρίζεται από δυο ζώνες στις 540 bp, και μια άλλη στις 200bp.

Lb. rhamnosus χαρακτηρίζεται από μια ζώνη στις 500bp.

2.5.2.3.2. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “plantarum group”.

Η ενίσχυση του βακτηριακού DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων που πιθανώς ανήκουν στο «*Lactobacillus plantarum group*» πραγματοποιείται με multiplex-PCR και στηρίζεται στην αλληλουχία του γονιδίου “*recA*”, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Torriani et al. (2001).

Η multiplex-PCR διεξάγεται χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικούς εκκινητές (primers):

Primers:

paraF (5'- GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3')

pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3')

planF (5'- CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3')

pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3')

Αντίδραση PCR:

Η αντίδραση της PCR, λαμβάνει χώρα σε τελικό όγκο δείγματος **20μl**, με την ακόλουθη σύσταση:

Πίνακας 2.9.: Συστατικά μίγματος προς ενίσχυση με multiplex-plantarum group.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (αραιωμένο)	-----	-----	1.0
H ₂ O υπερκαθαρό ^b	-----	-----	13.46
PCR Buffer	10x	1.0	2.0
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1.2
dNTPs mix	10 mM each	0.2 mM	0.4
Primer paraF	10 μM	0.25 μM	0.5
Primer pentF	10 μM	0.25 μM	0.5
Primer pRev	10 μM	0.25 μM	0.5
Primer plantF	10 μM	0.12 μM	0.24
TaqΠολυμεράση ^c	5U/μL	0.05 U/μl	0.2
Σύνολο			20μl (19μl mix + 1μl DNA)

Πρόγραμμα PCR:

Αρχική μετουσίωση	3 min, 94°C => 1 κύκλος
Μετουσίωση	30sec, 94°C
Annealing	10 sec, 56°C
Επιμήκυνση	30 sec, 72°C
Τελική επιμήκυνση	5 min, 72°C => 1 κύκλος
Ψύξη (αποθήκευση)	4°C, max 24 hrs

} 30 κύκλοι

Στο τέλος της ενίσχυσης του DNA, ακολουθείται η διαδικασία σε όλο το ενισχυμένο περιεχόμενο όπως παραπάνω στη Multiplex-PCR του γονιδίου “tuf”. Τα μοτίβα των ζωνών των ζευγών βάσεων ανιχνεύονται και επεξεργάζονται με τη βοήθεια του λογισμικού «GelDoc XR» (Bio-Rad)

Αναμενόμενα αποτελέσματα

Lb. plantarum subsp. plantarum χαρακτηρίζεται από μια ζώνη (band) στις 318 bp.

Lb. plantarum subsp. argentoratensis χαρακτηρίζεται από δυο ζώνες στις 318 bp, και μια άλλη στις 120 bp.

Lb. paraplantarum χαρακτηρίζεται από μια ζώνη στις 107bp.

Lb. pentosus χαρακτηρίζεται από μια ζώνη στις 218 bp.

2.5.2.3.3. Ταυτοποίηση δυνητικών στρεπτοκόκκων.

Η ταυτοποίηση των στελεχών, οι οποίοι πιθανώς να είναι στρεπτόκοκκοι (π.χ. *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Blaiotta et al., (2002), ελαφρώς τροποποιημένη. Η διαγονιδιακή περιοχή **ISR** (*intergenic spacer region*) μεταξύ των γονιδίων 16S rRNA και 23S rRNA μπορεί να διαφοροποιήσει, και να ταυτοποιήσει με αξιοπιστία διάφορα είδη Οξυγαλακτικών βακτηρίων με βάση των πολυμορφισμό τους. Μελέτες πάνω σε αυτά τα γονίδια έχουν

πραγματοποιηθεί στο γένος *Lactococcus* από τους Moschetti et al., (1998), και Blaiotta et al., (2002).

Για την ενίσχυση της ISR περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

primer G1: 5'-GAAGTCGTAACAAGG -3' (εμπρός)

primer L1: 5'-CAAGGCATCCACCGT -3' (αντίστροφα)

Ο εκκινητής G1 (εμπρός) αποτελεί μέρος μιας περιοχής, η οποία είναι τοποθετημένη 30-40 ζεύγη βάσεων (bp) πάνω από την περιοχή 16S-23S rDNA ISR, ενώ ο L1 (αντίστροφος) είναι μέρος μιας περιοχής του 23 rDNA τοποθετημένη γύρω στα 20 ζεύγη βάσεων κάτω από την περιοχή 16S-23S rDNA ISR.

Αντίδραση PCR:

Η αντίδραση της PCR λαμβάνει χώρα σε συνολικό όγκο δείγματος **50μl**, ο οποίος προκύπτει από 49μl μίγματος (mix) και 1 μl αραιωμένου DNA.

Πίνακας 2.10.: Συστατικά μίγματος προς ενίσχυση με ITS-PCR.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (~25ng/μl)	-----	-----	1.0
H ₂ O υπερκαθαρό ^b	-----	-----	39.24
PCR Buffer	10x	1.0x	5.0
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	10 mM each	0.1 mM	0.5
Primer G1	10 μM	0.25 μM	1.25
Primer L1	10 μM	0.25 μM	1.25
Taq Πολυμεράση ^c	5U/μL	1.3 U/μl	0.26
Σύνολο			50μl (49μl mix + 1μl DNA)

Πρόγραμμα PCR

Αρχική μετουσίωση	3 min, 94°C => 1 κύκλος	
Μετουσίωση	1 min, 94°C	} 25 κύκλοι
Αναδιάταξη	2 min, 55°C	
Επιμήκυνση	3 min, 72°C	
Τελική επιμήκυνση	10 min, 72°C => 1 κύκλος	
Ψύξη (αποθήκευση)	4°C, max 24 hrs	

Στο τέλος της ενίσχυσης του DNA, ακολουθείται η διαδικασία σε 20μl ενισχυμένου περιεχομένου όπως παραπάνω στη Multiplex-PCR του γονιδίου “tuf”. Τα μοτίβα των ζωνών των ζευγών βάσεων ανιχνεύονται και επεξεργάζονται με τη βοήθεια του λογισμικού «GelDoc XR» (Bio-Rad)

Αναμενόμενα Αποτελέσματα (Blaiotta et al., 2002):

Lactococcus garvieae, χαρακτηρίζεται από 1 ζώνη στις 430bp.

Lc. lactis χαρακτηρίζεται από 1 ζώνη στις περίπου 380bp.

Lc. raffinolactis χαρακτηρίζεται από 1 ζώνη στις περίπου 450bp.

Streptococcus thermophilus και *S. salivarius* χαρακτηρίζονται από 1 ζώνη στις 360bp.

Enterococcus faecalis, *E. casseliflavus*, και *E. durans* χαρακτηρίζονται από 2 ζώνες στις 300 και 400 bp)

E. faecium χαρακτηρίζεται από 2 ζώνες στις 310 και 410 bp.

Leuconostoc mesenteroides χαρακτηρίζεται από 1 band σε περίπου 470bp.

2.5.2.3.4. Ταυτοποίηση στελεχών με ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου του 16S rRNA.

Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν με οποιοδήποτε από τα τρία παραπάνω ειδικά PCR πρωτόκολλα, χρησιμοποιήσαμε την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, σύμφωνα με τους Amann και συν (1995), Suzuki και Giannoni (1996), και Rajendram (2006).

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 27F, and 1522R.

primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

primer 1522R (5'-GGAGGTGATCCANCCRCA-3')

Αντίδραση PCR:

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε τελικό όγκο **50μl**, ο οποίος περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους συστατικά:

Πίνακας 2.11.: Σύσταση μίγματος προς ενίσχυση με 16S rRNA sequencing-PCR.

Συστατικά ^a	Διαθέσιμο διάλυμα (stock)	Συγκέντρωση προς αντίδραση	Ποσότητα προς Αντίδραση (μl)
DNA (25-30ng/μl)	-----	-----	1.0
H ₂ O νεπρκαθαρό ^b	-----	-----	35.25
PCR Buffer	10x	1.0x	5.0
MgCl ₂	50 mM	1.5mM	2.5
dNTPs mix	10 mM each	0.2 mM	1.0
Primer 27F	10 μM	0.25 μM	2.5
Primer 1522R	10 μM	0.25 μM	2.5
Taq Πολυμεράση ^c	5U/μL	1.25U/μl	0.25
Σύνολο			50μl (49μl mix + 1μl DNA)

Πρόγραμμα PCR:

Αρχική μετουσίωση	3 min, 94°C => 1 κύκλος
Μετουσίωση	1 min, 96°C
Αναδιάταξη	1 min, 55°C
Επιμήκυνση	3 min, 72°C
Τελική επιμήκυνση	5 min, 72°C => 1 κύκλος
Ψύξη (διατήρηση)	4°C, max 24 hrs

Στο τέλος της ενίσχυσης του DNA, σε 15μl ενισχυμένου περιεχομένου πρέπει να προστεθούν 2μl Sample Buffer 6x (βλ. παράρτημα), και να διαχωριστεί αμέσως μέσω

ηλεκτροφόρησης σε gel Αγαρόζης 1.5% w/v (GellyPhor[®] Agarose LE, EuroClone) σε TBE 0.5x (Euroclone, Milan Italy), το οποίο περιέχει 0.5 μg ml⁻¹ Βρωμιούχο Αιθίδιο (Euroclone, Milan Italy). Παράλληλα με τα δείγματα «τρέχουμε» το ελάχιστο δείγμα DNA (1kb DNA ladder, BioLabs, England), ως δείκτη του μοριακού βάρους των ζευγών βάσεων.

Ύστερα από την τοποθέτηση των δειγμάτων, ρυθμίζουμε το ρεύμα (Power Pack Basic; Bio-RAD) στα 10 συνεχή Volts /cm, και “τρέχουμε” για περίπου 2.5 ώρες. Σταματάμε την ηλεκτροφόρηση όταν η γραμμή των δειγμάτων που αντιπροσωπεύεται από τη χρωστική μπλε βρωμοφαινόλης είναι στα 0.5 cm πριν το τέλος του gel. Το gel εμφανίζεται χρησιμοποιώντας την κατάσταση «trans-UV illuminator (Gel Doc XR, Biorad)». Η εικόνα που λαμβάνεται και αποθηκεύεται θα πρέπει να μετατραπεί σε αρχείο Tiff υψηλής ανάλυσης (300dpi), και τα μοτίβα των ζωνών των ζευγών βάσεων ανιχνεύονται και επεξεργάζονται με τη βοήθεια του λογισμικού «GelDoc XR» (Bio-Rad). Το ενισχυμένο προϊόν θα πρέπει να έχει περίπου 1500 ζεύγη βάσεων (base pairs).

Μετά την ενίσχυση του βακτηριακού DNA λαμβάνει χώρα ένας ταχύς καθαρισμός (Rapid purification), με σκοπό να απομακρύνουμε όλα τα ανεπιθύμητα συστατικά που τυχόν περιέχονται στο προϊόν, όπως είναι ρπερίσσεια εκκινητών, νουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση, λιπίδια, και άλατα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το «Sigma – kit» (Sigma-Aldrich), και ακολουθήθηκε η κατωτέρω μεθοδολογία.

- Εισαγωγή mini στήλης GenElute πλασμιδίου σε ειδικό eppendorf σωλήνα συλλογής.
- Προσθήκη 0.5ml of “Column Preparation solution”, το οποίο μεγιστοποιεί τη κατακράτηση του DNA στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση στα 12000 xg για 1 min, και απόρριψη του υγρού έκλουσης.
- Προσθήκη 5 όγκων “Binding solution” σε 1 όγκο PCR-ενισχυμένο προϊόν.
- Μεταφορά του διαλύματος που προκύπτει σε στήλη σύνδεσης (binding column).
- Φυγοκέντρηση στα 16000 xg (μέγιστη ταχύτητα) για 1 min, και απόρριψη του υγρού έκλουσης.
- Εφαρμογή 0.5ml of “diluted Wash solution” (Αιθανόλη) μέσα στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση στα 16000 xg για 1 min.
- Επαναφυγοκέντρηση χωρίς την προσθήκη οιαδήποτε διαλύματος στα 16000 xg για 2 min.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf σωλήνα συλλογής.
- Εφαρμογή 50μl of “Elution solution” στο κέντρο της στήλης.
- Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (16000 xg) για 2 min.
- Έλεγχος συγκέντρωσης, και ποιότητας του εκχυλιζόμενου DNA στο Nanodrop[®].

2.7. In-vitro λειτουργικές ιδιότητες στελεχών.

Καθώς όλα τα στελέχη έδειξαν ικανότητα να επιβιώνουν κάτω από μεταχείριση με Προσομοιωμένο Γαστρικό Υγρό (SGJ, επώαση στους 37°C για 30min) πιθανώς να έχουν και άλλες λειτουργικές ιδιότητες, ευεργετικές για τον άνθρωπο. Ενδιαφέρον για

τις λειτουργικές αυτές ιδιότητες παρουσίασαν τα βακτήρια του *Lb. casei* group, και *Lb. plantarum* group. Για κάθε ταυτοποιημένο στέλεχος πραγματοποιήθηκαν δυο διαδοχικές ανακαλλιέργειες από ενεργό απόθεμα (stock) σε MRS broth με 1% ό/ό εμβόλιο και ολονύχτια επώαση στους 30°C.

2.7.1. In-vitro ανθεκτικότητα σε χολικά άλατα.

Με στόχο να ελεγχθεί η επιβίωση των στελεχών κατά την εντερική διέλευση και την αντίσταση στο γαστρικό υγρό, στο οποίο περιέχονται τα χολικά άλατα, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες ολονύχτιας επώασης σε αυτά που ανήκουν στα “casei” και “plantarum” group.

Οι ενοφθαλμισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του “spot” (5μl, 9 spots/τρυβλίο) σε de Man Rogosa and Sharpe (M.R.S.) agar τρυβλία καλά στεγνωμένα, τα οποία περιείχαν εκχυλίσματα χολικών αλάτων χοίρων (B8631/Sigma-Aldrich), με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις 0, 0.3, 0.6, 1.2, και 3.6% β.κ.ό. Ακολούθως τα τρυβλία επώαστηκαν αναερόβια στους 37°C για 96hrs (4 ημέρες).

Τέλος, ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε MRS χωρίς χολικά άλατα, όπου και ενοφθαλμίζουμε σημεία με τη μέθοδο του «spot» κάθε στελέχους για σύγκριση. Η ελάχιστη συγκέντρωση ανασχεσης, MIC (Minimal Inhibitory concentration) των χολικών για κάθε στέλεχος ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση η οποία παρεμποδίζει ολικά την ανάπτυξη των σημείων (spots), όπως κρίνεται κατά την οπτική εξέταση (Penacchia et al., 2004).

2.7.2. In-vitro δραστηριότητα-BSH.

Η ικανότητα της υδρόλυσης των χολικών αλάτων των επιλεγθέντων στελεχών που ανήκαν στο “casei” ή “plantarum” group ανιχνεύτηκε χρησιμοποιώντας μια διαδικασία διαλογής τρυβλίου (plate screening) σύμφωνα με τη μέθοδο Zago (Zago και συν., 2009) με μικρές τροποποιήσεις.

Ολονύχτιες (16hrs) καλλιέργειες δεύτερης ανακαλλιέργειας ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο του «spot» (5μl, 9 spots/plate) σε MRS agar τρυβλία καλά στεγνωμένα, τα οποία περιέχουν 0.37g/l CaCl₂ and 0.5% άλας νατρίου του ταυρο-δεόξυ-χολικού οξέος (sodium salt of taurodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich). Ύστερα από τον εμβολιασμό αφήνουμε τα τρυβλία, ώστε να απορροφηθεί το εμβόλιο από το άγαρ. Τέλος επωάζουμε στους 37°C για 72/96 hrs (4 ημέρες).

Λευκές αδιαφανείς αποικίες, ή παρουσία λευκής άλω γύρω από αυτές υποδεικνύουν θετική BSH δραστηριότητα. Επιπρόσθετα το στέλεχος *Enterococcus faecium* E9 χρησιμοποιήθηκε σαν BSH⁽⁺⁾. Τέλος ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε MRS χωρίς συμπληρώματα (CaCl₂, taurodeoxycholic acid), όπου και ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο του «spot» τα στελέχη για σύγκριση.

2.7.3. Ικανότητα συσσωμάτωσης (πιθανός σχηματισμός βιοϋμενίων-biofilm).

Μέσω απλής παρατήρησης σε MRS broth, και εν συνεχεία σε μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό αντίστροφης φάσης 100x (Achromplan, Phase contrast 100x lense) κατέστη πιθανή η παρατήρηση, και η καταγραφή των στελεχών εκείνων που πιθανώς δημιουργούν συσσωματώματα. Η συσσωμάτωση είναι μια μορφή ανάπτυξης των κυττάρων, κατά την οποία αναπτύσσονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Τα στελέχη εκείνα που δημιουργούν συσσωματώματα, πιθανώς να σχηματίζουν βιοϋμένια (biofilms), κατάσταση η οποία αποτελεί προβιοτική ιδιότητα.

2.8. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, τα πειραματικά αποτελέσματα αναφέρθηκαν ως μέσοι όροι και δόθηκαν επίσης οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation, **StD**). Πολυμεταβλητή ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Systat για Windows (Systat 11.0 Inc., USA). Με σκοπό να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα των μικροβιακών, φυσικοχημικών, και λειτουργικών ιδιοτήτων των στελεχών που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση των κύριων συνιστωσών (**PCA**) πάνω στον συντελεστή συσχέτισης των τυποποιημένων δεδομένων χωρίς περιστροφή παράγοντα (Morrison, 1976). Το στατιστικό αυτό εργαλείο χρησιμοποιήθηκε ώστε να παραλάβουμε διαγράμματα (plots), τα οποία συνοψίζουν όλες τις μεταβλητές σε κάθε δείγμα τυριού, και τις σχέσεις μεταξύ τους. Έτσι διεξήχθη PCA στο συντελεστή συσχέτισης των αποτελεσμάτων, ώστε να παρατηρήσουμε τα αποτελέσματα σε μοναδικό γράφημα, και να ομαδοποιήσουμε τυριά με όμοιες ιδιότητες. Τα γραφήματα (box-plots; bi-plots; 3D bar-plots; cluster analysis) πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο πρόγραμμα 11 (Systat 11, Systat Inc., USA).

Ανάλυση των συστάδων (Cluster analysis) πραγματοποιήθηκε στα απομονωθέντα στελέχη που ανήκουν σε κάθε ομάδα με >3 απομονώσεις. Η στατιστική παράμετρος «Phi-square» χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση των αποστάσεων και χρησιμοποιήθηκε ο UPGMA αλγόριθμος συστάδων. Τα στελέχη με τις ίδιες ιδιότητες ομαδοποιήθηκαν στους ίδιους κόμβους (nodes), και εν συνεχεία χρησιμοποιώντας την παράμετρο “Gini” ταξινομήθηκαν τα γένη. Τέλος για εκείνα τα στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση του γονιδίου 16SrRNA, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα «Crustal W/X Multiple Sequence Alignment» για την ανάλυση συστάδων των στελεχών.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.

3.1. Φυσικοχημικές παράμετροι.

Οι κυριότερες φυσικοχημικές παράμετροι υποβλήθηκαν σε μετρήσεις προκειμένου να σχηματισθεί μια εικόνα της σύστασης των τυριών και να γίνει αξιολόγηση της επίδρασης των παραμέτρων αυτών στον πληθυσμό της μικροχλωρίδας των τυριών, όπως και για τα είδη που επικρατούν στο τέλος της ωρίμανσης. Έτσι λοιπόν τα αποτελέσματα του pH, η ενεργότητα του νερού (a_w), το ποσοστό (%) της υγρασίας, το ποσοστό άλατος (%NaCl) και η αναγωγή του σε ποσοστό άλατος στην υγρή φάση (%SM) συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Φυσικοχημικές παράμετροι των δειγμάτων.

Δείγμα	Ποικιλία τυριού	Ηλικία	Τύπος τυριού	Π	Υ	a_w	pH	NaCl _{dw}	S/M
A	CL	1	PF	F	43,5	0,956	5,15	2,05	2,66
B	CL	2,5	PF	F	41,3	0,921	5,39	2,91	4,14
C	Provolone	2,5	PF	F	38,6	0,91	5,08	3,52	5,59
D	Scamorza	1	PF	F	42,6	0,948	5,29	1,52	2,05
E	Pecorino Lucano	3,5	PE	B	31,4	0,874	5,22	4,69	10,25
F	CP	5	PF	B	26,5	0,861	5,1	2,13	5,91
G	Provolone semipicante	6	PF	B	38,7	0,922	5,3	2,535	4,02
H	CL	3	PF	I	49,0	0,963	5,59	3,09	3,21
I	CL	6	PF	I	34,0	0,908	5,18	3,79	7,38
L	CL	2	PF	I	44,3	0,954	5,23	3,03	3,81
M	CL	7	PF	C	33,7	0,903	5,1	2,55	5,01
N	CL	4,5	PF	C	38,7	0,921	5,25	3,41	5,42
O	Cacio Bucato	5	PF	C	39,5	0,938	5,51	3,00	4,60
P	Pecorino Abriola	11	PE	C	32,3	0,894	4,94	2,84	5,97
R	Scamorza	3	PF	C	40,2	0,931	5,09	3,65	5,41
S	Canestrato di Moliterno	6	PE	A	28,6	0,890	5,17	3,88	9,66
T	CL	3	PF	E	40,0	0,931	5,45	3,09	4,63
U	CS	3	PF	D	39,3	0,922	4,97	3,16	4,87
X	Pecorino Filiano	3	PE	H	31,5	0,902	5,26	2,85	6,19
Z	CL	2	PF	G	44,5	0,945	5,28	2,82	3,52

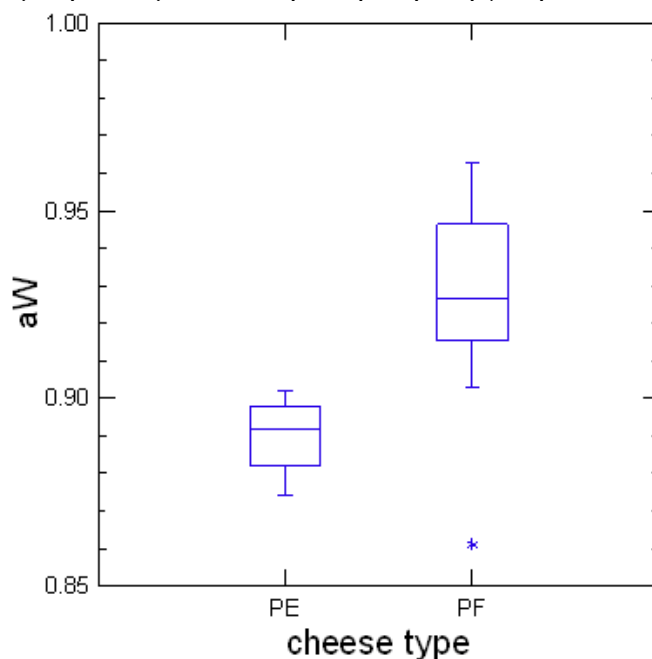
Υ: Ποσοστό υγρασίας, **Π:** Παραγωγός, **a_w :** ενεργότητα νερού, **NaCl_{dw}:** Αλάτι σε ξηρή φάση, **S/M:** Αλάτι σε υγρή φάση (συγκέντρωση σε αλάτι εκφρασμένη σαν ποσοστό υγρασίας: s/m; g NaCl/100g H₂O).

Παραγωγός: La Lucana: **A**, local producer: **B**, PaceBio: **C**, Piano della Spina: **D**, Posticchia: **E**, Salsia Maria: **F**, San Rocco: **G**, Tavola P.: **H**, Tripaldi: **I**.

Ποικιλία Τυριού: Caciocavallo Lucano: **CL**; Caciocavallo Silano: **CS**; Caciocavallo Podolico: **CP**

3.1.1. Ενεργότητα νερού (a_w).

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τον πίνακα (Πίνακας 3.1), και από το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.1), τα τυριά τύπου 'pecorino' είχαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα νερού, σε σχέση με τα 'pasta-filata'. Συγκεκριμένα στα πρώτα κυμαίνεται από 0.874 (Pecorino Lucano) έως 0.902 (Pecorino Filiano). Από την άλλη, ο τύπος pasta-filata έδειξε μεγαλύτερο εύρος στις τιμές, που κυμαίνονταν από 0.903 (Caciocavallo Lucano, 7 μήνες) σε 0.956 (Caciocavallo Lucano, 1 μήνας). Αξίζει να αναφερθεί πως το Caciocavallo Podolico (5 μήνες ωρίμανσης) αν και pasta-filata τυρί έδειξε αρκετά χαμηλή τιμή (0.861) σε σχέση με τα υπόλοιπα, πολύ κοντά στις τιμές των pecorino. Η διαφορά αυτή στις τιμές ενεργότητας νερού μπορεί να οφείλεται στην τεχνολογία παραγωγής, η οποία διαφέρει μεταξύ των δυο ειδών, καθώς και στο χρόνο ωρίμανσης αυτού. Επίσης λόγω του ότι τα τυριά pecorino περιέχουν σημαντικά υψηλότερες τιμές αλατιού, συνεπώς μειώνεται και το a_w τους. Τέλος μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όσο αυξάνεται η ηλικία (μήνες ωρίμανσης) των τυριών, τόσο το a_w είναι χαμηλότερο, μέχρι να φτάσει μια κρίσιμη τιμή, πέρα από την οποία δεν μπορεί να μειωθεί περαιτέρω η ενεργότητα του νερού.

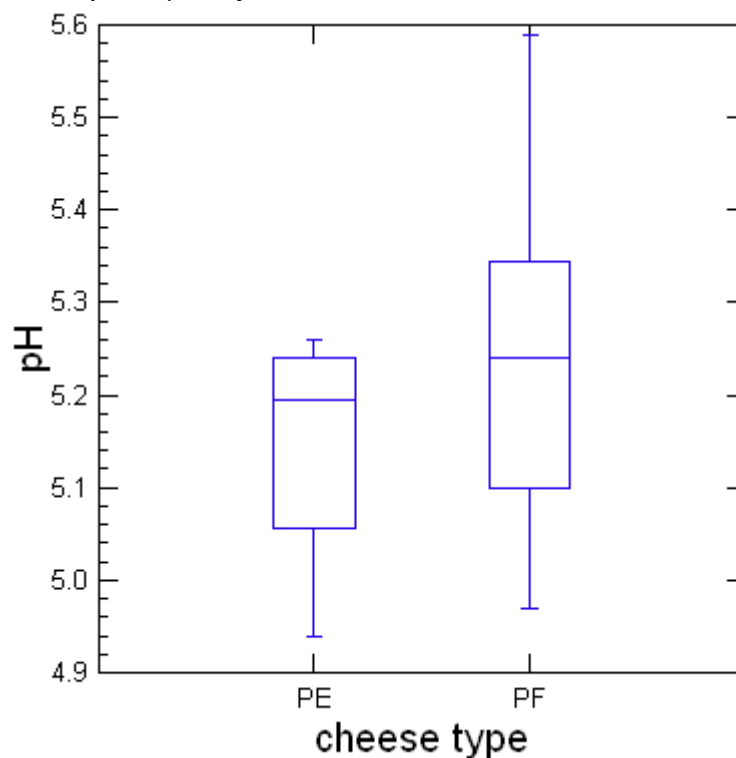


Σχήμα 3.1: Διακύμανση τιμών ενεργότητας νερού (a_w) των τυριών.

3.1.2. pH.

Σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα, με μικρότερες διακυμάνσεις είχαμε και για την παράμετρο του pH, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και από το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.2). Συγκεκριμένα οι τιμές στα τυριά pecorino ήταν χαμηλότερες σε σχέση με την ποικιλία pasta-filata, η οποία είχε μεγαλύτερο εύρος, με υψηλότερη τιμή το 5.6 και χαμηλότερη το 4.95 (βλ. Πίνακα 3.1). Αντίθετα, στα pecorino οι τιμές κυμαίνονται από 4.97 έως 5.25. Αυτές οι σημαντικές διαφορές ίσως προκύπτουν από το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη, το οποίο εκτός από το αρχικό pH του, επηρεάζει και τη μικροχωρίδα η οποία θα επικρατήσει και θα

αναπτυχθεί. Το υψηλό pH ορισμένων μπορεί να εξηγηθεί από την εποχικότητα παραγωγής, όπου όταν το τυρόπηγμα έχει χαμηλές θερμοκρασίες, και έτσι καθυστερείται η ανάπτυξη και δράση των ενδογενών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πιθανόν οι υψηλές τιμές pH, που βρέθηκαν σε ορισμένα τυριά να σχετίζονται με υψηλό αριθμό ελεύθερων αμινοξέων (FAA) (Piraino et al., 2005).



Σχήμα 3.2: Διακύμανση τιμών pH των δειγμάτων.

Τη χαμηλότερη τιμή από όλα τα δείγματα τυριών έδειξε η ποικιλία Caciocavallo Silano (δείγμα U), με 4.97, και τη μεγαλύτερη, ένα Caciocavallo Lucano 3 μηνών ωρίμανσης με τιμή 5.59 (δείγμα H). Οι τιμές pH σε ένα άλλο Ιταλικό pasta-filata τυρί, το Provolone dei Nebrodi (Cronin et al., 2007) 1.5 μήνα ωριμασμένο κυμαίνονται μεταξύ 4.9–5.4. Ένα Βουλγάρικο τυρί pasta-filata όμοιο με το Caciocavallo το «Kashkaval» ωριμασμένο για 2 μήνες έχει pH 5.35–5.49, τιμή όμοια με το Caciocavallo Lucano 2μηνών (δείγμα B). Το pH σε διάφορα τυριά caciocavallo (Lucano-Silano) προηγούμενης μελέτης (Piraino et al., 2005) κυμαινόταν από 5.43–5.57 (με εξαίρεση το δείγμα ένα δείγμα caciocavallo με pH 5.11 ± 0.05). Στην ίδια μελέτη (Piraino et al., 2005) δυο ΠΟΠ Provolone τυριά έδειξαν τιμές 5.45 και 5.78, τιμές υψηλότερες από τα δείγματα αυτής της μελέτης, όπως και η ποικιλία scamorza με 5.58. Σημαντικά χαμηλότερες τιμές είχε η ποικιλία scamorza της περιοχής Puglia (Albenzio et al., 2013) με pH 4.98. Λόγω του ότι το pH επηρεάζει την υφή του τυροπήγματος, επηρεάζοντας τη διαλυτότητα των καζεϊνών, οι τιμές αυτές είναι λογικές, διότι τα τυριά υψηλού pH είναι σημαντικά μαλακότερα (soft, semi-soft) από τα πιο όξινα τυριά.

Σε αντίστοιχα τυριά τύπου ‘pecorino’, και συγκεκριμένα στο «Pecorino Romano» το pH ήταν αισθητά χαμηλότερο ($\text{pH } 5.04 \pm 0.1$) συγκριτικά με άλλο τυρί από πρόβειο γάλα, τα Fiore Sardo (5.31 ± 0.1) (Di Cagno, 2003). Από μελέτη (De Angelis et al.,

2001) σε διάφορα τύπου 'pecorino' τυριά (Pecorino Umbro 1.5μήνα, Pecorino Sardo 1.5 και 6 μηνών, Pecorino Toscano 1 μήνα, Pecorino Romano 10 μηνών, Fossa 6 μηνών, και Canestrato Pugliese 3 μηνών) παρατηρήθηκε πως η τιμή pH διέφερε ελάχιστα, και κυμάνθηκε από 5.0 έως 5.4. Παρόμοια είναι και η τιμή στο Canestrato Pugliese με pH 5.4 ± 0.2 (Di Cagno, 2003). Στο Pecorino del Poro (Caridi et al., 2003) το pH στο τέλος της ωρίμανσης κυμαινόταν από 5.0 έως 5.5. Στα Ιταλικά σκληρά τυριά από γάλα αγελάδας Grana Padano το pH είναι γύρω στο 5.5-5.6, στο Parmigiano Reggiano 5.4-5.5, και στο Asiago 5.5 (Gobbetti & Di Cagno, 2002). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν πως σε εκείνα από πρόβειο γάλα, Pecorino Romano το pH ήταν 5.3-5.4, στο Pecorino Siciliano 5.2-5.5, στο Pecorino Sardo 5.2-5.5, στο Fiore Sardo 5.1-5.3, Canestrato Pugliese 5.0-5.2. Τέλος το Castelmagno από αγελαδινό ή μίγμα αγελαδινού κατσικίσιου και πρόβειου έδειξε pH 5.0-5.3, και το Fossa από πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και αγελαδινού 5.0-5.2.

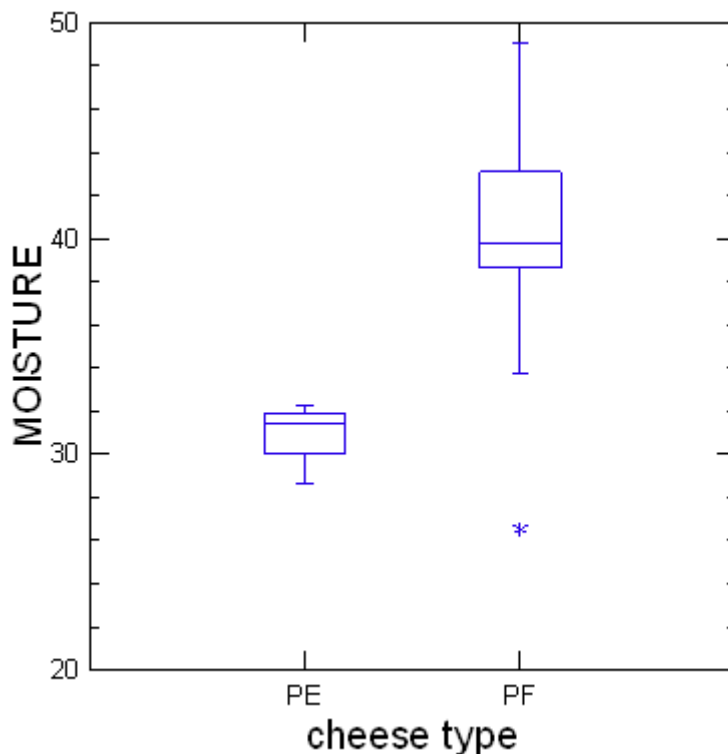
3.1.3. Υγρασία.

Όπως ήταν αναμενόμενο τα ίδια αποτελέσματα με την ενεργότητα του νερού λήφθηκαν κατά τη μέτρηση του ποσοστού (%) υγρασίας. Το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.3) συνοψίζει το %υγρασίας συγκριτικά με την ποικιλία τυριού. Έτσι, τα τυριά pasta-filata είχαν υψηλότερες τιμές υγρασίας εν αντιθέσει με τα pecorino (Πίνακας 3.1). Σύμφωνα και με άλλους ερευνητές, όσο αυξάνεται η περίοδος ωρίμανσης, τόσο μειώνεται το ποσοστό υγρασίας. Η υγρασία γενικά αυξάνεται από μέσα προς τα έξω, πράγμα που σημαίνει ότι τα εξωτερικά στρώματα έχουν χαμηλότερη υγρασία σε σχέση με το εσωτερικό.

Αξίζει να αναφέρουμε πως οι τιμές στα pecorino τυριά ήταν «κοντά» σχεδόν σε όλα τα δείγματα, χωρίς να έχουν μεγάλη διακύμανση, με χαμηλότερη τιμή εκείνη το 28.6% του Canestrato di Moliterno (S), 3 μήνες ωριμασμένο, και μεγαλύτερη 32.3% Pecorino Abriola 11 μηνών (P). Στο επώνυμο Canestarto Pugliese (Di Cagno, 2003) βρέθηκε %υγρασίας 33.5 ± 0.9 . Όσον αφορά τα ποσά της υγρασίας για 'pecorino' τυριά (Pecorino Umbro 1.5μήνα, Pecorino Sardo 1.5 και 6 μηνών, Pecorino Toscano 1 μήνα, Pecorino Romano 10 μηνών, Fossa 6 μηνών, και Canestrato Pugliese 3 μηνών), διέφερε ποικίλα, και κυμαινόταν από 31.2-44.5%, και εξαρτάται από την περίοδο ωρίμανσης, και τομέγεθος του τυριού (De Angelis et al., 2001). Σε δύο άλλα σκληρά Ιταλικά τυριά, τα Fiore Sardo και Pecorino Romano το ποσοστό υγρασίας ήταν $30.4 \pm 1.8\%$, και $34.8 \pm 0.6\%$ αντίστοιχα (Di Cagno, 2003).

Από την άλλη μεριά, τα pasta-filata τυριά παρουσίασαν μεταβλητές τιμές κυμαίνοντας από 26.5 έως 49.0%. Αξίζει να αναφερθεί πως ακόμα και ίδιοι τύποι τυριών (π.χ. Caciocavallo Lucano), αλλά διαφορετικών μηνών ωρίμανσης έδειξαν διαφορετικές τιμές. Πολύ μακριά από το μέσο όρο των τιμών, αποτελεί το Caciocavallo Podolico (δείγμα F), 5 μηνών, το οποίο έδειξε σημαντικά χαμηλή τιμή υγρασίας, 26.5%, τιμή χαμηλότερη ακόμα και από εκείνες των «pecorino». Το ποσοστό της υγρασίας στα Caciocavallo Lucano, και άλλα pasta-filata τυριά της παρούσης μελέτης συμφωνούν με τις τιμές άλλων τυριών της ίδιου τύπου, όπως το Caciocavallo Pugliese (Gobbetti et al., 2002) και το Caciocavallo Silano (Paolo et al.,

2005) με την υγρασία να κυμαίνεται από 37-55% (w/w). Επίσης δυο «Provolone» τυριά της περιοχής Basilicata, έδειξαν περιεχόμενη υγρασία 38.5% (w/w), σε παρόμοια μελέτη των Piraino et al. (2005).

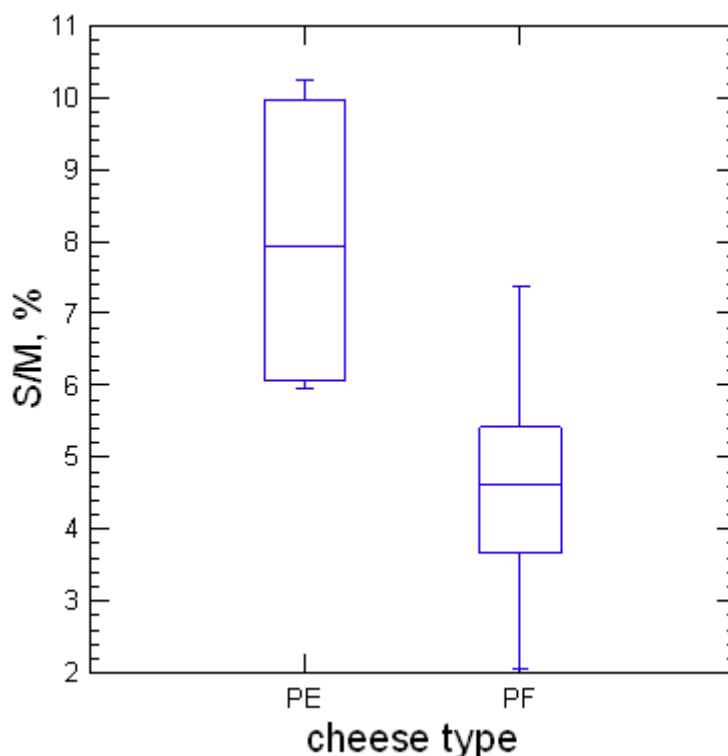


Σχήμα 3.3: Διακύμανση τιμών υγρασίας των δειγμάτων.

Αρκετά υψηλές τιμές υγρασίας είχε και η φρέσκια scarmorza κατά τους ίδιους ερευνητές (Piraino et al., 2005). Τα αποτελέσματα για αυτό τυρί πλησιάζουν μελέτη πάνω στην ποικιλία scamorza της περιοχής Puglia (Albenzio et al., 2013) με υγρασία 44-46%, και άλλη να αναφέρει >50% w/w (Rankin et al., 2006). Παρόμοιες τιμές βρεθήκαν και για το pasta-filata Ιταλικό τυρί Provola dei Nebrodi, 1.5 μήνα με τιμές να κυμαίνονται από 37.1% έως 41.8% (Cronin et al., 2007).

3.1.4. Περιεκτικότητα σε αλάτι.

Όσον αφορά το % αλατιού στην υγρή φάση τα pecorino τυριά είχαν αξιοσημείωτα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αλάτι, και συνεπώς στην υγρή φάση, συγκριτικά με τα pasta-filata όπως παρατηρούμε και από το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.4). Συγκεκριμένα το εύρος για τα δεύτερα κυμαίνεται από 2.66% (Caciocavallo Lucano ενός μήνα, δείγμα A) έως 7.38 (Caciocavallo Lucano 6 μηνών, δείγμα I), ενώ για τα pecorino από 5.97 (Pecorino Abriola 11 μηνών, δείγμα P) σε 10.25 (Pecorino Lucano 5 μηνών, δείγμα E).



Σχήμα 3.4: Διακύμανση τιμών %αλατιού στην υγρή φάση των δειγμάτων.

Η s/m τιμή του Caciocavallo Lucano 2 μήνες ωρίμανσης (δείγμα L) συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Gobbetti et al., (2002) πάνω στο Caciocavallo Pugliese δύο μηνών με τιμή 3.7. Το αλάτι στην υδατική φάση στο Provolone dei Nebrodi (Cronin et al., 2007) 1.5 μήνα ένα Ιταλικό pasta-filata τυρί κυμαίνεται από 4.0 με 5.8%. Η συγκέντρωση (% w/w) του αλατιού σε υγρή φάση (S/M) των τυριών ποικίλει σε εύρος μεταξύ 2.01–7.78% (w/w) σε μελέτη των Piraino et al. (2005), πάνω σε ‘pasta-filata’ τυριά (Caciocavallo Lucano, Silano, Provolone) της περιοχής Basilicata. Τιμές να πλησιάζουν τα ααντλιστοιχα provolone της παρούσας μελέτης έδειξαν ένα ΠΟΠ με τιμή 5.38, ενώ ένα άλλο εμφανώς είχε εμφανώς υψηλότερη τιμή (Piraino et al., 2005). Χαμηλό % αλατιού στην υγρή φάση είχε και ποικιλία scamorza προηγούμενης μελέτης των ίδιων με τιμή 3.55%, τιμή πολύ κοντά με εκείνη (3.64%) των Albenzio et al. (2013).

Επίσης μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι όπως αναφέρουν και οι Randazzo, et al (2010) σε μελέτη πάνω στο Pecorino Crotonese, το εμπιερχόμενο NaCl αυξάνει όσο αυξάνεται ο χρόνος ωρίμανσης, μέχρι να φθάσει μια κρίσιμη τιμή πέρα από την οποία δεν μπορεί να μειωθεί περαιτέρω, λόγω μη περαιτέρω μείωση της υγρασίας. Αρκετά μεγάλη συγκέντρωση αλατιού σε υδατική φάση (%9.66 w/w) έδειξε το Canestto di Moliterno pecorino τυρί, όπως και το αντίστοιχο του Canestarto Pugliese (Di Cagno, 2003) το ποσοστό αλατιού 2.9 ± 0.3 %w/w, και ανάγωντας αυτό σε ποσοστό στην υδατική φάση ήταν 8.9 ± 1.5 %w/w. Το ίδιο αναλογικά αποτελέσματα μεταξύ εξέλιξης της υγρασίας, και αλατιού στην υδατική φάση για τα ‘pecorino’ τυριά (Pecorino Umbro 1.5μήνα, Pecorino Sardo 1.5 και 6 μηνών, Pecorino Toscano 1 μήνα, Pecorino Romano 10 μηνών, Fossa 6 μηνών, και Canestrato Pugliese 3 μηνών), διέφερε ποικίλα με μεγάλο εύρος διακύμανσης (4.0-10.2%) και εξαρτάται από την αφενός

από την περίοδο ωρίμανσης, και το μέγεθος του τυριού (De Angelis et al., 2001) και αφετέρου από την εξέλιξη της υγρασίας. Άλλα σκληρά τυριά όπως το Fiore Sardo, (Di Cagno et al., 2003) παρουσίασαν τιμές αλατιού $1.7 \pm 0.1\%$, με $s/m\%$ 5.6 ± 0.2 , ενώ το Pecorino Romano πολύ υψηλότερες τιμές με το %αλατιού να είναι 8.7 ± 0.1 , και να βρίσκεται στην υδαρή φάση σε $24.5 \pm 0.8\%$ (Gobbeti & Di Cagno, 2002).

3.2. Καταμέτρηση πληθυσμών.

Ο μέσος όρος των μικροβιακών πληθυσμών και οι τυπικές τους αποκλίσεις οι οποίες λαμβάνονται από μεθόδους κλασσικής καταμέτρησης απευθείας στο τρυβλίο στα είκοσι διαφορετικά δείγματα τυριών διαφορετικών παραγωγών, και χρόνων ωρίμανσης παρουσιάζονται στους παρακάτω Πίνακες (Πίνακας 3.2 και 3.3).

3.2.1. Μεσόφιλοι NSLAB γαλακτοβάκιλλοι (Rogosa agar)

Η καταμέτρηση των μεσόφιλων NSLAB γαλακτοβάκιλλων έγινε με τη χρήση του εκλεκτικού υποστρώματος “Rogosa agar”. Γενικά τα τυριά τύπου pasta-filata έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές πληθυσμών σε σχέση με τις ποικιλίες pecorino. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως στα ώριμα τυριά η τυχαία χλωρίδα μεσόφιλων γαλακτοβάκιλλων (NSLAB), φθάνουν τους 10^7 – 10^8 cfu g^{-1} , και παρουσιάζονται συχνά εξαιτίας μετά-παστεριωτικής μίανσης ή αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος (Mannu et al., 2000) και επίσης επιβιώνουν κατά την παστερίωση (De Angelis et al., 2001). Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας τα οποία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2) συμφωνούν με τους προηγούμενους, με εξαίρεση τα δυο δείγματα pecorino Pecorino Lucano, και Canestrato di Moliterno.

Όπως παρατηρούμε και από τον πίνακα (Πίνακας 3.2), η ποικιλία Scamorza 1 μήνα (δείγμα D) έδειξε το μεγαλύτερο αριθμό μεσόφιλων λακτοβακίλλων με πληθυσμό $8.63 \pm 0.09 \log_{10}$ CFU/g, και τη μικρότερη το δείγμα Canestrato di Moliterno 6 μηνών (δείγμα S) με πληθυσμό 4.86 ± 0.07 . Τα αποτελέσματα για τη Scamorza συμφωνούν με εκείνα των Baruzzi et al., (2002) στην επώνυμη ποικιλία Scamorza Altamura οι οποίοι αναφέρουν πληθυσμό μεσόφιλων NSLAB οξυγαλακτικών 10^8 cfu/g. Αξιοσημείωτο είναι πως στο Pecorino Lucano (E) δεν βρέθηκαν καθόλου γαλακτοβάκιλλοι. Αξίζει να αναφερθεί πως η τιμή στο Pecorino Abriola ($\sim 6.9 \log_{10}$ cfu/g) 11 μηνών ωρίμανσης πλησιάζει με την τιμή των NSLAB στο Pecorino Romano 10 μηνών το οποίο έδειξε αποτελέσματα μεταξύ 5.5 – $6.2 \log_{10}$ cfu/g (Gobbeti & Di Cagno, 2002). Οι Coda et al., (2006) αναφέρουν πως η μικροχλωρίδα στο Pecorino di Filiano αποτελείται κυρίως από μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλοι με πληθυσμό $>7 \log$ CFU/g. Όσον αφορά τους μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλους σε έρευνα των Di Cagno et al (2003) στο Canestrato Pugliese βρέθηκαν πληθυσμοί $7.2 \pm 0.4 \log$ cfu/g, στο Fiore Sardo 7.6 ± 0.2 , και στο Pecorino Romano $7.8 \pm 0.2 \log$ cfu/g. Στο Pecorino del Poro (Caridi et al., 2003) οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι επικρατούν στο ανοιξιάτικο τυρί, ενώ οι θερμόφιλοι στο θερινό.

Πίνακας 3.2: Καταμέτρηση πληθυσμών των δειγμάτων τυριών σε Rogosa agar.

Δείγμα	Ποικιλία τυριού	Ηλικία	Τύπος τυριού	Παραγωγός	Rogosa (logcfu/g)
A	CL	1	PF	F	8.30093±0.12625
B	CL	2,5	PF	F	8.19526±0.12452
C	Provolone	2,5	PF	F	6.26879±0.06360
D	Scarmorza	1	PF	F	8.63451±0.09964
E	Pecorino Lucano	3,5	PE	B	1.00000±0.0000
F	CP	5	PF	B	6.82827±0.20279
G	Provolone semipicante	6	PF	B	6.57916±0.14448
H	CL	3	PF	I	7.91942±0.06274
I	CL	6	PF	I	7.06248±0.09432
L	CL	2	PF	I	7.45250±0.13414
M	CL	7	PF	C	6.56687±0.08302
N	CL	4,5	PF	C	7.77537±0.10937
O	Cacio Bucato	5	PF	C	7.23677±0.00534
P	Pecorino Abriola	11	PE	C	6.88489±0.33629
R	Scarmorza	3	PF	C	7.66461±0.06142
S	Canestrato di Moliterno	6	PE	A	4.86931±0.07038
T	CL	3	PF	E	6.89179±0.12262
U	CS	3	PF	D	6.90220±0.13150
X	Pecorino Filiano	3	PE	H	7.39468±0.05320
Z	CL	2	PF	G	7.85771±0.56552

Οι τιμές εκφράζονται σαν log cfu/g. Ο κάθε αριθμός είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (StD) των δυο μετρήσεων στα τρυβλία Petri. Producer: La Lucana: **A**, local producer: **B**, Posticchia: **E**, Piano della Spina: **D**, PaceBio: **C**, Salvia Maria: **F**, San Rocco: **G**, Tavola P.: **H**, Tripaldi: **I**.
Ποικιλία Τυριού: Caciocavallo Lucano: **CL**; Caciocavallo Silano: **CS**; Caciocavallo Podolico: **CP**

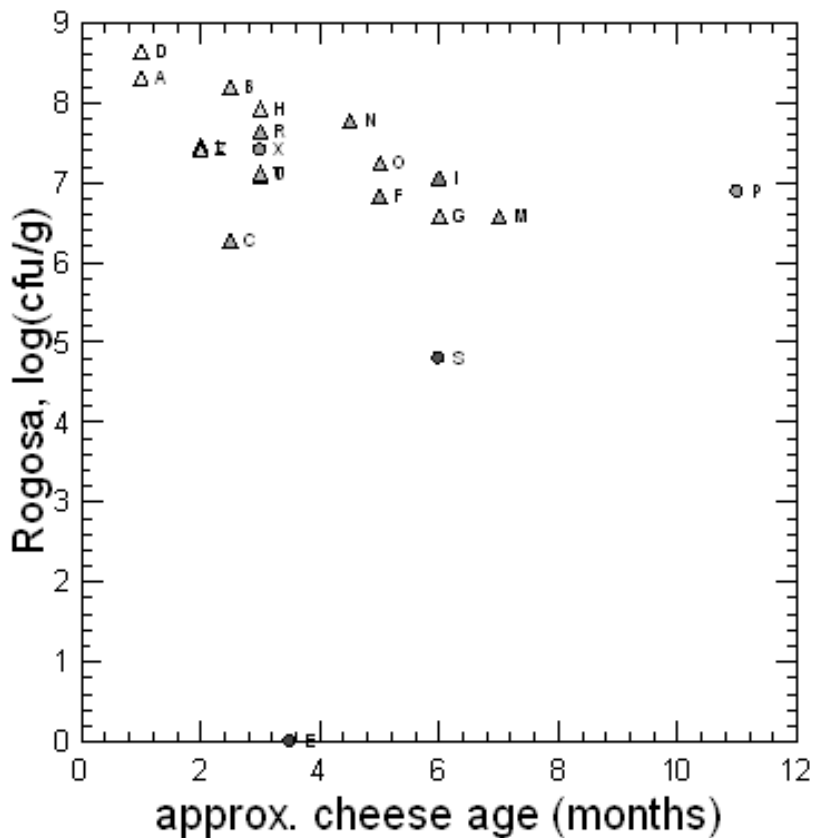
Οι τιμές πλησιάζουν και αυτές άλλων παραδοσιακών Ιταλικών τυριών από πρόβειο γάλα, όπως στο Pecorino Umbro (De Angelis et al., 2001) 1.5 μήνα ωρίμανσης η τιμή της NSLAB χλωρίδας κυμαινόταν από 7.3-8.2 log₁₀ cgu/g. Στην ίδια μελέτη στην ποικιλία Pecorino Sardo από νοπό γάλα 6 μηνών ωρίμανσης λήφθηκε η χαμηλότερη τιμή 6.8 log₁₀ cgu/g, ενώ τα επώνυμα εκείνα μικρότερης ηλικίας (1.5 μήνες) από 7.9-8.4. Επιπρόσθετα στο Pecorino Toscano 1 μήνα ωρίμανσης από νοπό γάλα, οι τιμές κυμαίνονταν από 7.2-7.8 log₁₀ cgu/g, και στο σκληρό τυρί Fossa 6 μηνών ήταν 7.6. Στο Pecorino Sardo (Manu et al., 1999) η μικροχλωρίδα φθάνει τα 10⁹ cfu/g.

Σύμφωνα με έρευνες (Gobbetti et al., 2002; Coppola et al., 2003; Piraino et al., 2008) μετρήσεις του πληθυσμού των LAB στα Caciocavallo τυριά είναι μάλλον σταθερή μέχρι τους πρώτους 3 μήνες ωρίμανσης και ποικίλει μεταξύ 7.5 και 8.5 log₁₀ cfu/g. Σε παρόμοια μελέτη πάνω σε ΠΟΠ Caciocavallo Silano της περιοχής Basilicata, και σε ομότιμα Caciocavallo Lucano οι μετρήσεις κυμαίνονταν από 7.64-

8.99 log₁₀ cfu/g (Piraino et al., 2005). Στο επώνυμο Caciocavallo Pugliese ο πληθυσμός των μεσόφιλων γαλακτοβάκιλλων οι οποίοι επικρατούν, ήταν σταθεροί με log 8.0 cfu g⁻¹ μέχρι και τον 2^ο μήνα ωρίμανσης (Gobbeti et al., 2002), όπως συμβαίνει και στο Caciocavallo Lucano 1 και 2 μηνών, όπου οι τιμές είναι σχεδόν ίδιες και σταθερές. Ο αριθμός των μεσόφιλων λακτοβάκιλλων στο ΠΟΠ Ιταλικό τυρί «Montasio» 1 μήνα (Marino, Maifreni, & Rondinini, 2003) το οποίο παρασκευάζεται από γάλα αγελάδας βρέθηκε 8.42 log₁₀ cfu/g, και στο αντίστοιχο 2 μηνών βρέθηκε 7.96, τιμές πολύ κοντά με εκείνη των Caciocavallo Lucano 1 μήνα (δείγμα Α), και Caciocavallo Lucano δείγμα Ζ.

Όσον αφορά τους επιμέρους πληθυσμούς συγκριτικά με το χρόνο ωρίμανσης, όπως μπορούμε να δούμε ξεκάθαρα από τα παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.5), υπάρχει μια υψηλή (γραμμική) συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού που καταμετρήθηκε στο Rogosa agar, και μεταξύ του χρόνου ωρίμανσης των τυριών. Πιο συγκεκριμένα μειώνεται αυτός ο πληθυσμός, καθώς ο χρόνος ωρίμανσης αυξάνει, με εξαίρεση ενός δείγματος (E) pecorino τυριού, του “Pecorino Lucano”, στο οποίο δεν αναπτύχθηκαν καθόλου γαλακτοβάκιλλοι. Οι Randazzo et al. (2010) αναφέρουν πως οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι ενώ ξεκινούν από χαμηλούς αριθμούς (10⁴ cfu/g) στο τυρόπηγμα φθάνουν τα 10⁸ cfu g⁻¹ ύστερα από 2 μήνες ωρίμανσης, και διατηρούνται μέχρι και τον τέταρτο μήνα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος ωρίμανσης, μειώνεται το %υγρασίας, με συνέπεια την αύξηση του εμπεριεχόμενου αλατιού στην υγρή φάση. Έτσι λοιπόν πιθανώς τα κύτταρα να στρεσάρονται λόγω αύξησης του αλατιού, και να μην καταφέρνουν τελικά να επιβιώσουν και αν αναπτυχθούν στο εκλεκτικό υπόστρωμα Rogosa agar. Όπως αποδείχτηκε και από άλλη μελέτη (Piraino et al., 2005), τα τυριά με υψηλότερα ποσά αλατιού είχαν χαμηλότερες μετρήσεις.

Παρατηρούμε επίσης ότι τα δείγματα ίδιων χρόνων ωρίμανσης ανεξαρτήτου ποικιλίας βρλισκονταν πολύ κοντά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα τα δείγματα Caciocavallo Lucano (CLd A) και Scamorza (D) 1 μήνα ωρίμανσης βρίσκονται στην πάνω αριστερά γωνία του διαγράμματος, με πολύ υψηλούς αριθμούς μεσόφιλων γαλακτοβάκιλλων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δείγματα H, R, X U διαφορετικών ποικιλιών (CLd, Scamorza, Pecorino Filiano, Caciocavallo Silano αντίστοιχα) αλλά ίδιων χρόνων ωρίμανσης εμφάνισαν τις ίδιες τιμές με χαμηλότερη του ΠΟΠ Caciocavallo Silano και επομένως ομαδοποιούνται. Εξαίρεση αποτελεί το τυρί Pecorino Abriola (δείγμα P) το οποίο αν και με σχεδόν ένα χρόνο ωρίμανσης είχε υψηλό πληθυσμό (~10⁷ cfu/g) μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων. Από το ίδιο γράφημα βλέπουμε επίσης πως το Provolone 2.5 μηνών (C) το οποίο έδειξε σχετικά χαμηλούς πληθυσμούς σε σχέση με τα υπόλοιπα παρόμοιες ηλικίας. Για τις ποικιλίες εκείνες μέσης περιόδου ωρίμανσης (6 μήνες) παρατηρήθηκε βαθμοδοτήξ μείωση των οληθυσμών με βαλση τη σκληρότητα τους. Έτσι λοιπόν το μαλακό τυρί Caciocavallo Lucano (δείγμα I) έδειξε υψηλότερους πληθυσμούς, το ημί-σκληρο τυρί Provolone semipicante (δείγμα G) ελαφρά χαμηλότερες, και τέλος το σκληρό τυρί Canestato di Moliterno (δείγμα S) πολύ χαμηλότερες τιμές με διαφορά δυο λογαρίθμων. Τέλος το Caciocavallo Lucano 7 μηνών (M) αν και διαφορετικού χρόνου ωρίμανσης έδειξε ίδιες τιμές με την pasta-filata ποικιλία Provolone G.



Σχήμα 3.5: Πληθυσμοί μεσόφιλων NSLAB γαλακτοβακίλλων. (○: Pecorino, Δ: pasta-filata)

3.2.2. Μεσόφιλα Οξυγαλακτικά βακτήρια (mMRS-BPB agar).

Ενώ υπάρχει μια καλή συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων του Rogosa και της ηλικίας των τυριών, δεν θα μπορούσαμε να πούμε το ίδιο και στην περίπτωση των μεσόφιλων οξυγαλακτικών, τα οποία καταμετρήθηκαν ύστερα από μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (S1, 37°C x 30min; Βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Έτσι λοιπόν, περαιτέρω ανάλυση απαιτείται, ώστε να ελέγξουμε ποιού μικροοργανισμού επιβιώνουν κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, και κάτω από τη μεταχείριση με γαστρικό υγρό καθορίζοντας τη σύνθεση των οξυγαλακτικών. Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 3.3) συνοψίζονται τα αποτελέσματα στο mMRS διαφορικό υπόστρωμα.

Όπως παρατηρούμε ο πληθυσμός στα περισσότερα δείγματα κυμαίνεται 10^6 - 10^8 cfu/g. Εξαιρέση αποτελούν τα δυο pecorino δείγματα “Pecorino Lucano” (E) και “Canestrato di Moliterno” (S), με μόλις 10^5 log cfu/g πληθυσμό να καταφέρνει να επιβιώσει κατά τη μεταχείριση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό. Τα αποτελέσματα για το δείγμα E, όπου όπως αποδεικνύεται η μικροχλωρίδα απαρτίζεται αποκλειστικά από εντερόκοκκους, βρίσκονται σε συμφωνία με τους Teuber, Perreten & Wirsching (1996) οι οποίοι αναφέρουν πως τα επίπεδα των εντερόκοκκων σε διάφορα τυριά στο τέλος της ωρίμανσης κυμαίνονται από 10^5 έως 10^7 cfu/g.

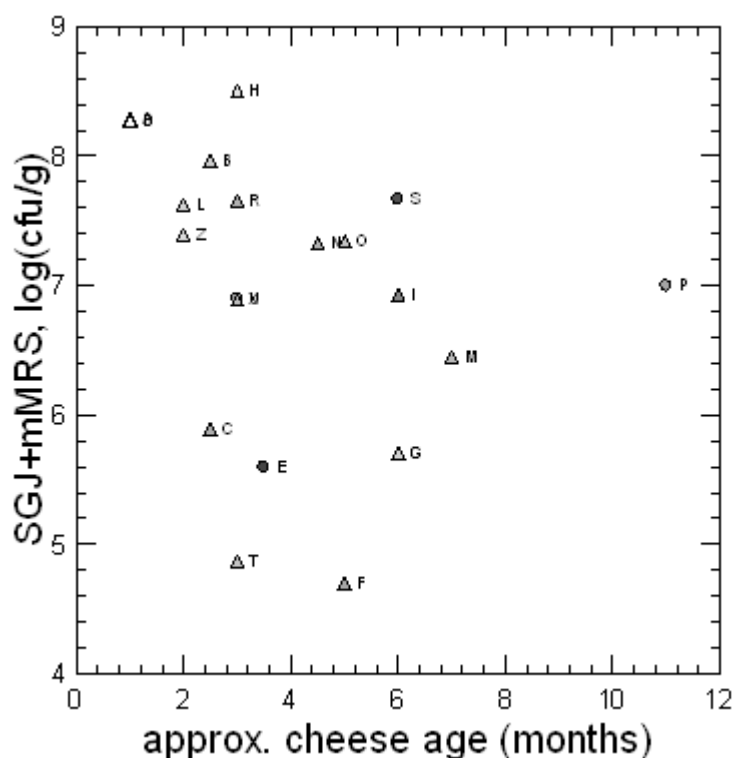
Πίνακας 3.3: Καταμέτρηση πληθυσμών των δειγμάτων τυριών σε mMRS agar.

Δείγμα	Ποικιλία τυριού	Ηλικία	Τύπος τυριού	Παραγωγός	mMRS (logcfu/g)
A	CL	1	PF	F	8.28678±0.05734
B	CL	2,5	PF	F	7.96394±0.05049
C	Provolone	2,5	PF	F	5.88918±0.07118
D	Scarmorza	1	PF	F	8.27150±0.09906
E	Pecorino Lucano	3,5	PE	B	5.59612±0.28266
F	CP	5	PF	B	4.70070±0.06716
G	Provolone semipicante	6	PF	B	5.70623±0.04827
H	CL	3	PF	I	8.50135±0.11109
I	CL	6	PF	I	6.93172±0.05805
L	CL	2	PF	I	7.62693±0.07902
M	CL	7	PF	C	6.44582±0.04211
N	CL	4,5	PF	C	7.32429±0.04217
O	Cacio Bucato	5	PF	C	7.34218±0.04445
P	Pecorino Abriola	11	PE	C	6.99689±0.04018
R	Scarmorza	3	PF	C	7.65378±0.07345
S	Canestrato di Moliterno	6	PE	A	4.80049±0.06309
T	CL	3	PF	E	7.09158±0.01243
U	CS	3	PF	D	7.11600±0.04698
X	Pecorino Filiano	3	PE	H	7.40808±0.01680
Z	CL	2	PF	G	7.41061±0.10060

Οι τιμές εκφράζονται σαν log₁₀cfu/g.
 Ο κάθε αριθμός είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (StD) των δυο μετρήσεων στα τρυβλία Petri.
 Παραγωγός: La Lucana: A, local producer: B, Posticchia: E, Piano della Spina: D, PaceBio: C, Salvia Maria: F, San Rocco: G, Tavola P.: H, Tripaldi: I.
 Ποικιλία Τυριού: Caciocavallo Lucano: CL; Caciocavallo Silano: CS; Caciocavallo Podolico: CP

Η παρουσία υψηλών αριθμών εντερόκοκκων στο τέλος της ωρίμανσης του, υποδεικνύει ότι αυτή η ομάδα παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση αυτής της ποικιλίας, όπως συμβαίνει και στην ΠΟΠ ποικιλία Montasio (Marino, Maifreni, & Rondinini, 2003). Επίσης πιθανώς τα εντεροκοκκικά είδη που αναπτύσσονται να παράγουν ουσίες, όπως βακτηριοσίνες, οι οποίες να αστέλλουν την ανάπτυξη των γαλακτοβάκιλλων. Οι Cogan et al., (1997) αναφέρουν πως η επικράτηση των ειδών αυτού του γένους σε πολλά τυριά έγκειται στο ότι αποτελούν μια από τις ανθεκτικότερες μικροβιολογικές ομάδες σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως αλατότητα και οξύτητα. Η παρουσία εντερόκοκκων στο Pecorino Abruzzese κυμαίνονται από 10⁴ έως 10⁶ log₁₀cfu/g στην αρχή της ωρίμανσης, και στο τέλος έχουν φθάσει τους 10⁹ log₁₀cfu/g σε τυριά που υφίστανται ωρίμανση το καλοκαίρι (Serio et al., 2007).

Συγκρίνοντας τον πληθυσμό των μεσόφιλων οξυγαλακτικών με το χρόνο ωρίμανσης των τυριών, παρατηρούμε στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.6), πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους, όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση του πληθυσμού των μεσόφιλων γαλακτοβάκιλλων. Η ανομοιόμορφη διασπορά τους στο διάγραμμα υποδεικνύει πως τα επιμέρους ενδογενή μοναδικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών τα καθιστούν μοναδικά. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό επηρέασε με διαφορετικό τρόπο την επικρατούσα μικροχλωρίδα των δειγμάτων.



Σχήμα 3.6: Πληθυσμοί μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων ύστερα από μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό, έναντι χρόνου ωρίμανσης των τυριών. (ο: Pecorino, Δ: Pasta-filata).

Από το ανωτέρω σχήμα λοιπόν παρατηρούμε πως στα δυο Caciocavallo Lucano τυριά 2 μηνών ωρίμανσης το καθένα (δείγματα L και Z), αν και από διαφορετικούς παραγωγούς, κατάφερε να επιβιώσει ο ίδιος πληθυσμός κατά τη μεταχείριση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό. Ακόμη βλέπουμε πως η ποικιλία Caciocavallo Lucano (H) 3 μηνών ήταν ο καλύτερος «φορέας» δυνητικών προβιοτικών διότι είχε τον υψηλότερο πληθυσμό. Επιπρόσθετα τα pasta-filata O και N (Cacio Bucato και CLd) ίδιων μηνών ωρίμανσης λόγω όμοιων πληθυσμών μπορούν να ομαδοποιηθούν. Τα Pecorino Lucano και Provolone Semipicante αν και διαφορετικών χρόνων ωρίμανσης έδειξαν παρόμοιες τιμές.

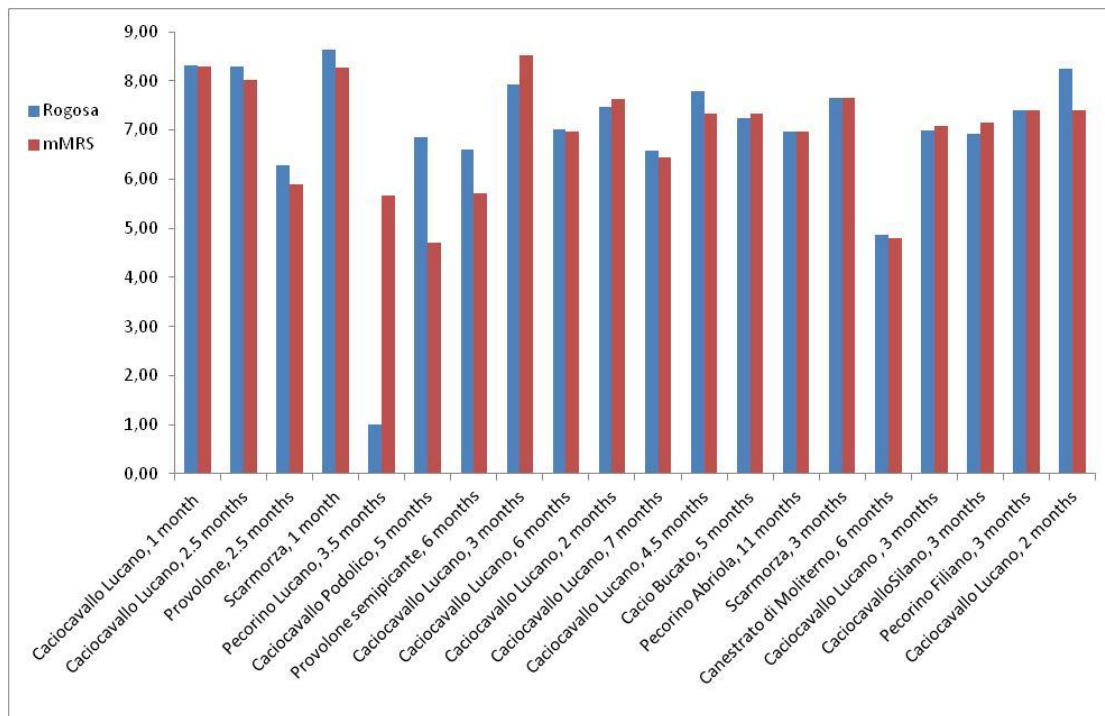
Οι τιμές στο MRS ύστερα από μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (S1) στο «Pecorino Filiano» ωριμασμένο για 3 μήνες είναι υψηλότερο σε σχέση με ένα αντίστοιχο ωριμασμένο για 4 μήνες (120 ημέρες) όπου οι Bonomo και Salzano (2012) βρήκαν ότι ο πληθυσμός κυμαινόταν σε 6.38 ± 0.09 τόσο στην περίπτωση ωρίμανσης σε σπηλιά, όσο σε θάλαμο. Οι Coda et al. (2006) σε μελέτη στην ίδια

ποικιλία απέδειξαν ότι η οξυγαλακτική μεσόφιλη μικροχλωρίδα φθάνει πληθυσμούς $>7 \log_{10}$ cfu/g. Αξιοσημείωτες χαμηλές τιμές εμφανίζει επίσης το 'pecorino' τυρί Canestrato di Moliterno 6 μηνών ωρίμανσης (S), με μόλις (4.9 ± 0.07), ενώ το αντίστοιχο από την περιοχή Puglia (Canestrato Pugliese, De Angelis et al., 2001) 3 μηνών ωρίμανσης είχε τιμή NSLAB χλωρίδας $7.8 \log_{10}$ cgu/g. Στο Pecorino Sardo (Mannu et al., 2002) κατά την ωρίμανση 1 με 2 μήνες από την παραγωγή, οι μικροβιακοί πληθυσμοί στο MRS μειώθηκαν κατά 1–2 λογαριθμικές μονάδες από τον πληθυσμό (10^8 - 10^9 cfu/g).

Όλα τα caciocavallo τυριά με εξαίρεση το Caciocavallo podolico (δείγμα F) έδειξαν υψηλούς αριθμούς οξυγαλακτικών χωρίς σημαντικές διαφορές (Piraino et al., 2005), φαινόμενο το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα οξυγαλακτικά ανθίστανται στις υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια του «τεντώματος» του τυροπήγματος (Kindstedt, Caric & Milanovic, 2004). Όπως παρατηρούμε και από το διάγραμμα τα pasta-filata δείγματα N (Caciocavallo Lucano, 4.5 μήνες) και O (Cacio Bucato, 5 μήνες) βρίσκονται κοντά, έχοντας σχεδόν τον ίδιο πληθυσμό στον ίδιο χρόνο ωρίμανσης. Επίσης η ποικιλία scarmorza (1 μήνας, δείγμα D) με την Caciocavallo Lucano 1 μήνα, δείγμα A. Ακόμη τα δείγματα Z και L και B, 2 μηνών ωρίμανσης Caciocavallo Lucano αν και διαφορετικών παραγωγών πλησιάζουν μεταξύ τους, με το B να βρίσκεται ελάχιστα ψηλότερα στο γράφημα. Οι Gobetti & Di Cagno (2002) αναφέρουν πως στα περισσότερα Ιταλικά σκληρά τυριά η NSLAB χλωρίδα φθάνει τα 10^7 - 10^8 cfu/g ύστερα από μερικούς μήνες ωρίμανσης, η οποία συνήθως διατηρείται έως το τέλος της. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και αποτελέσματα παρόμοιας μελέτης (Piraino et al., 2005) όπου συμφωνούν τα αποτελέσματα για τη scarmorza με τιμή 8.18, ενώ πλησιάζαν και οι τιμές στα ΠΟΠ provolone. Υψηλές τιμές (7.89 - $8.89 \log_{10}$ CFU/g) είχαν και caciocavallo τυριά, πράγμα που υποδεικνύει πως η μεταχείριση σε γαστρικό υγρό κατά τον πειραματικό σχεδιασμό επέφερε μικρές μειώσεις και δεν επηρέασε αξιοσημείωτα τους πληθυσμούς. Στο Ιταλικό pasta-filata, Provolone dei Nebrodi (Cronin et al., 2007) ο βιώσιμος βακτηριακός πληθυσμός σε mMRS υπόστρωμα ενισχυμένο με μουπιροκίνη (mupirocin) κυμαινόταν από 4.1 έως $5.5 \log_{10}$ cfu/g, και ο αριθμός των εντεροκόκκων από 4.8 έως $7.6 \log_{10}$ CFU/g.

3.2.3. Σύγκριση πληθυσμών μεταξύ των δυο υποστρωμάτων.

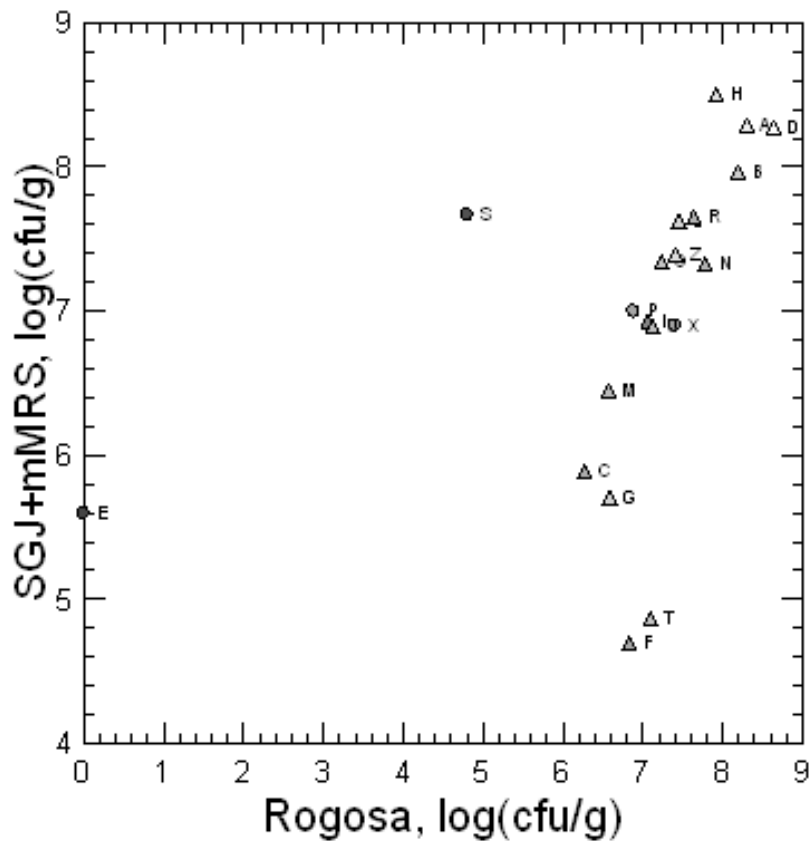
Το παρακάτω γράφημα (Γράφημα 3.1) παρατηρούμε πως γενικά οι πληθυσμοί στα δυο υποστρώματα είναι κοντά μεταξύ τους, με εξαίρεση ορισμένα δείγματα, όπως για παράδειγμα στο Caciocavallo Podolico (F), όπου η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από 2 λογαρίθμους. Ίδιος είναι ο πληθυσμός της μεσόφιλης χλωρίδας στο Rogosa και MRS pH 6.8 στην ποικιλία scarmorza 3 μηνών (δείγμα R).



Γράφημα 3.1: Ραβδόγραμμα σύγκρισης πληθυσμών (logcfu/g) σε Rogosa, και mMRS.

Με σκοπό να ομαδοποιηθούν διαφορετικές ποικιλίες τυριών το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.7) συγκρίνει τους πληθυσμούς στο Rogosa έναντι στο mMRS ύστερα από μεταχείριση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό, όπου με κύκλους παρουσιάζονται τα τυριά ποικιλίας pecorino, και με τρίγωνα τα pasta filata. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε πως το Rogosa είναι ένα υπόστρωμα εκλεκτικό για την ανάπτυξη της NSLAB δευτερογενούς μικροχωρίδας. Το παρόν προϊόν συσχέτισης του Pearson, r (Person's product moment correlation) μεταξύ των δυο πληθυσμών είναι 0.776. Υπάρχει μια εύλογα καλή συσχέτιση αν αποκλείσουμε τα δυο pecorino δείγματα ($r=0.78$).

Η επισκίαση των πληθυσμών των δειγμάτων είναι ανάλογη με το % s/m (% αλατιού σε υδαρή φάση). Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα υπάρχει μια καλή συσχέτιση μεταξύ των δυο πληθυσμών εκτός από δυο Pecorino δείγματα (E, S) τα οποία έχουν τα υψηλότερα ποσοστά αλατιού σε υδατική φάση, και στα οποία καταμετρήθηκαν χαμηλοί πληθυσμοί στο Rogosa. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα κύτταρα στρεσάρονται εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης αλατιού, ειδικότερα στα τυριά τύπου pecorino και έτσι δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν, και να αναπτυχθούν στο Rogosa, το οποίο είναι πολύ εκλεκτικό υπόστρωμα, εξαιτίας του χαμηλού pH (5.4) και του προστιθέμενου κρυσταλλικού οξικού οξέος. Επίσης το χαμηλό ενδογενές pH στη μήτρα του τυριού έπαιξε σημαντικό ρόλο στη μείωση του πληθυσμού κατά την μεταβολή της περιόδου ωρίμανσης (Marino, Maifreni, & Rondinini, 2003).

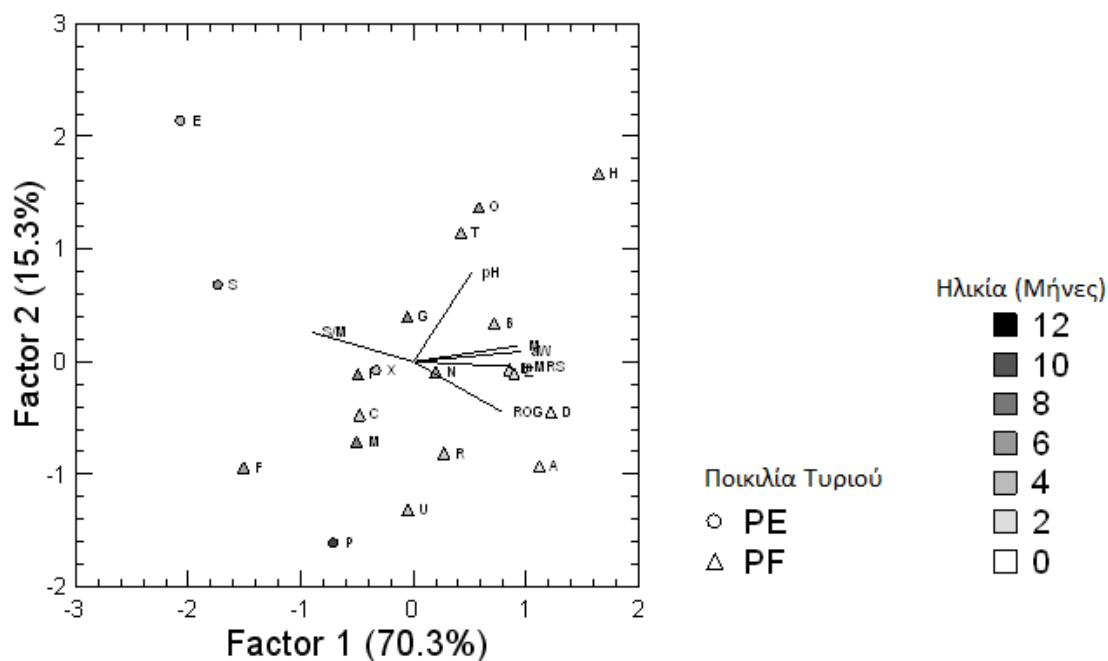


Σχήμα 3.7: Διάγραμμα αλληλοεπικάλυψης πληθυσμών μεταξύ των δειγμάτων (ο: Pecorino, Δ: Pasta-filata)

Όπως προκύπτει στην κάτω δεξιά μεριά του σχήματος (Σχήμα 3.7) βρίσκονται τα δείγματα F, και T με σχετικά χαμηλές τιμές στο MRS, ενώ τα δείγματα D, A, H που αντιστοιχούν σε Scarmorza 1 μήνα, Caciocavallo Lucano 1 μήνα, και Caciocavallo Lucano 3 μηνών έδειξαν τις μεγαλύτερες τιμές και στα 2 υποστρώματα και βρίσκονται στην πάνω δεξιά μεριά του γραφήματος. Αυτό υποδεικνύει πως τα σχετικά «νέα» τυριά αποτελούν καλύτερους φορείς ζωντανών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επίσης τα δυο τυριά provolone C και G αν και διαφορετικών τεχνολογιών και περιόδου ωρίμανσης βρίσκονται κοντά, και σχετικά στη μέση του γραφήματος, λόγω του ότι δεν έδειξαν μέσες τιμές πληθυσμών γύρω στο 5.7-6.5. Η συγκέντρωση των NSLAB στα τυριά κατά την ωρίμανση κυμαίνονται από 5.5-8.2 log₁₀ CFU/g, τιμές (Fox, McSweeney, & Lynch, 1998; Fitzsimons, Cogan, Condon, & Beresford, 1999). Επίσης το δείγμα M (CLd) το οποίο έδειξε και το μεγαλύτερο χρόνο ωρίμανσης από όλα τις ποικιλίες pasta-filata και δη τα caaciocavallo δεν πλησίαζε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα τυριών. Αξιοσημείωτο είναι πως τα δυο τυριά pecorino Pecorino Filiano (X) Pecorino Abriola (P) διαφορετικής τεχνολογίας και χρόνου ωρίμανσης ομαδοποιούνται με τα pasta-filata δείγματα είδους caciocavallo I και U (CLd 6 μηνών και CLSilano 3 μηνών). Ακόμη ομαδοποιούνται οι διαφορετικές ποικιλίες pasta-filata Z και O (Caciocavallo Lucaano 2 μηνών και Cacio Bucato) με το δείγμα N (CLd), όπως και οι ποικιλίες Scamorza (R) και CacioavalloLucano 2 μηνών. (δείγμα L)

3.2.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων της καταμέτρησης.

Η «Ανάλυση των Κύριων Συνιστωσών, PCA» (Principal Component Analysis), πραγματοποιήθηκε στη μήτρα συσχέτισης των αποτελεσμάτων, με σκοπό να παραστήσουμε τα αποτελέσματα σε μοναδικό διάγραμμα, και να δούμε αν τυχόν γκρουπάρονται σε ομάδες τυριά με όμοιες ιδιότητες. Αυτό το στατιστικό εργαλείο (PCA) χρησιμοποιήθηκε ώστε να ληφθεί ένα διάγραμμα το οποίο συνοψίζει όλες τις μεταβλητές του κάθε τυριού, να δούμε αν μπορούμε να ομαδοποιήσουμε διαφορετικά τυριά, και αν μπορούμε να βρούμε σχέσεις μεταξύ μεταβλητών και των παρατηρήσεων (π.χ. δείγματα τυριού). Το παρακάτω διάγραμμα είναι ένα BI-διάγραμμα (BI-PLOT), και ονομάζεται έτσι γιατί, περιέχει τα αποτελέσματα (scores) σαν θέσεις των δειγμάτων τυριών στον πίνακα με τις κύριες συνιστώσες που είναι σαν ακτίνες. Όπως παρατηρούμε και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.8) οι δυο συνιστώσες εξηγούν το 86% της διακύμανσης. Παρατηρώντας τις συνιστώσες, όσο μειώνεται το αλάτι αυξάνεται ο πληθυσμός στο Rogosa agar. Επίσης αυξάνοντας η ενεργότητα νερού, και η υγρασία, αυξάνεται και ο πληθυσμός στο MRS agar.



Σχήμα 3.8: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών των αποτελεσμάτων. (ο: Pecorino, Δ: Pasta-filata)

Προσπαθώντας να ομαδοποιήσουμε τα δείγματα, θα μπορούσαμε να πούμε πως το δείγμα O (Cacio bucatato, 5 μήνες ωρίμανσης) είναι κοντά με το T (Caciocavallo Lucano, 3 μηνών ωρίμανσης). Αυτό επιβεβαιώνεται με τις κοντινές τιμές που έχουν σε όλες τις παραμέτρους (pH, aw, υγρασία, αλάτι, s/m, και βακτηριακοί πληθυσμοί). Ακόμη τα δυο pasta-filata τυριά C (Provolone Lucano, 2.5 μηνών), και M (Caciocavallo Lucano, 7 μηνών) είναι κοντά μεταξύ τους, πράγμα που σημαίνει πως έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά. Στην ίδια ομάδα αν και διαφορετικής ποικιλίας θα μπορούσαμε να πούμε πως ανήκουν και το pecorino τυρί «Pecorino Filiano, 3 μηνών ωρίμανσης» (δείγμα X) με το pasta-filata «Caciocavallo Lucano, 6 μηνών» (δείγμα I), τα οποία σημεία τους στο διάγραμμα βρίσκονται πάρα πολύ κοντά. Τέλος στην ίδια ομάδα με τα ίδια χαρακτηριστικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως βρίσκονται τα δυο

Caciocavallo Lucano τυριά, 2 μηνών ωρίμανσης Z και L, τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς παραγωγούς.

Εντελώς διαφορετικά είδη, τα οποία δεν κατατάσσονται σε καμία ομάδα, αποτελούν τα δείγματα E (Pecorino Lucano, 3.5 μηνών ωρίμανσης), το H (Caciocavallo Lucano, 3 μηνών ωρίμανσης), S (Canestrato di Moliterno, 6 μηνών ωρίμανσης), F (Caciocavallo Podolico, 5 μηνών ωρίμανσης), U (Caciocavallo Silano, 3 μηνών), R (Scarmorza, 3 μηνών), A (Caciocavallo Lucano, 1 μήνα), B (Caciocavallo Lucano, 2 μηνών), D (Scarmorza, ενός μήνα), G (Provolone semipicante, 6 μηνών), P (Pecorino Abriola, 11 μηνών), N (Caciocavallo Lucano, 4.5 μηνών).

Παρατηρούμε επίσης πως αν και ίδιες ποικιλίες τυριών με ίδιους χρόνους ωρίμανσης, αλλά προέρχονται από διαφορετικούς παραγωγούς όπως είναι τα Caciocavallo Lucano, 3 μηνών ωρίμανσης, το δείγμα από τον παραγωγό «Posticchia», και το δείγμα H από τον παραγωγό «Tripialdi» διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Με τα παραπάνω διαφέρει και το ΠΟΠ τυρί Caciocavallo Silano, 3 μηνών του παραγωγού «Piano della Spina». Επιπρόσθετα τα δυο pecorino τυριά “Pecorino Lucano” (E), και “Pecorino Filiano” (X) περίπου ίδιου χρόνου ωρίμανσης, αλλά διαφορετικών παραγωγών τοποθετήθηκαν πολύ μεταξύ τους, πράγμα που σημαίνει πως έχουν εντελώς διαφορετικά χαρακτηριστικά. Τα δυο Caciocavallo Lucano, 2 μηνών B, και L από διαφορετικούς παραγωγούς αν και βρίσκονταν σχετικά κοντά δεν βρίσκονται στην ίδια ομάδα μεταξύ τους.

3.3. Απομόνωση αποικιών και βελτιστοποίηση του mMRS-BPB.

Συνολικά τριακόσιες-είκοσι-πέντε (325) αποικίες διαφορετικής μορφολογίας στο mMRS-BPB απομονώθηκαν τυχαία από το mMRS-BPB χρησιμοποιώντας ένα δισκίο Harrison (Harrigan & McCance, 1976), και καθαρίστηκαν σε mMRS-BPB. Πιο αναλυτικά 245 (75.4%) από τα στελέχη απομονώθηκαν από την ποικιλία «pasta-filata», και 80 (24.6%) από τα «pecorino». Δυστυχώς, κάποια στελέχη δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν σε τροποποιημένο APT (MRS) broth, pH 6.8.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο υπόστρωμα MRS (deMan-Rogosa-Sharpe) άγαρ, το οποίο περιείχε Κυανούν της Βρωμοφαινόλης και κυστεΐνη (mMRS-BP; Lee & Lee, 2008), για την διαφορική ανάπτυξη διαφορετικών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από τυριά. Το υπόστρωμα αυτό είχε χρησιμοποιηθεί πρώτα από τους Lee & Lee (2008) για την ταχεία διαλογή απομονώσεων Οξυγαλακτικών βακτηρίων από το γιαούρτι. Επιπλέον, δεν έχει αποδειχθεί εάν το υπόστρωμα είναι σε θέση να διακρίνει φυλογενετικά συγγενικά είδη, όπως εκείνα που ανήκουν στην ομάδα "*plantarum*" (*Lb. plantarum subsp. plantarum*, *Lb. plantarum subsp. argentoratensis*, *Lb. pentosus*, *Lb. paraplantarum*), στην ομάδα "*casei*" (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*) ή στην ομάδα "*acidophilus*" (*Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*).

Σκοπός του τροποποιημένου υποστρώματος mMRS-BPPB είναι η απευθείας καταγραφή της εμφάνισης των αποικιών και η καταμέτρηση των διαφορετικών, ούτως ώστε να οδηγηθούμε σε διαφορική καταμέτρηση των Οξυγαλακτικών βακτηρίων που εμπεριέχονται. Με σκοπό να αποφευχθούν τα παραπάνω λάθη, είναι προτιμότερο να επιλέξουμε τρυβλία με τις πιο αξιόπιστες αραιώσεις, όπου οι αποικίες είναι πιο διαχωρισμένες. Δευτερεύον ρόλος αυτού του υποστρώματος ήταν η εγκατάσταση μια απλής διαδικασίας για τη διαλογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων

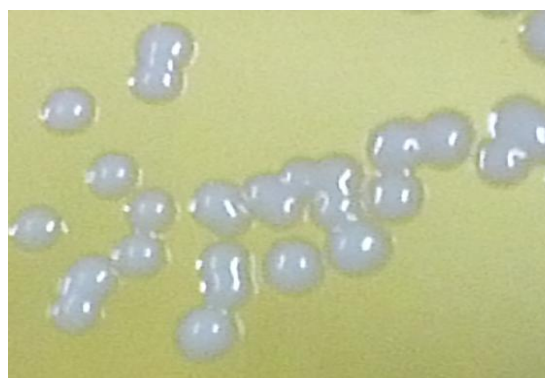
πριν την ταυτοποίηση, μέσω της χρήσης ενός διαφορικού μέσου (differential medium), ώστε να «οδηγήσουμε» την μοριακή ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από τα τυριά και στα ζυμούμενα γάλατα. Η εγκατάσταση μιας τέτοιας μεθόδου θα γλίτωνε σημαντικό κόστος από την έρευνα διότι η ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA περίπλοκη και ακριβή μέθοδος.

Καθώς τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτυχθεί και πωλούνται σε μικτές μορφές, είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί μια μέθοδος για την καταμέτρηση τους σε μίγμα (Lee & Lee, 2008). Η διαφορική καταμέτρηση τους σε MRS agar ή PCA-BCP agar (Plate Count Agar-bromocresol purple) δεν είναι εύκολη. Έτσι προτάθηκε η προσθήκη *Κυανούν της Βρωμοφαινόλης*, **BPB** (BromoPhenol blue) σε τροποποιημένο MRS υπόστρωμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), το οποίο περιείχε cysteine-HCl (**mMRS**) (Sykes and Skinner 1973). Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων καταγράφουμε το κάθε στέλεχος με ένα τετραψήφιο κωδικό ο οποίος περιλαμβάνει σχήμα, μέγεθος, επιφάνεια, χρώμα, και συνδυασμό χρώματος (βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 τα στελέχη που ανήκουν στο είδος *Lb. rhamnosus* έδειξαν αποικίες γενικά μονόχρωμου λευκού ή μπλε χρώματος, με τραχιά επιφάνεια, ακανόνιστου σχήματος και με κυματιστό περιθώριο. Ο τετραψήφιος κωδικός για αυτό το είδος είναι «1010» ή «1030» ή «0010, 0030». Αντίθετα, τα είδη *Lb. casei* εκπροσωπήθηκαν από μονόχρωμες λευκές αποικίες λείες (εικ. 2), με στρογγυλό σχήμα και λείο περιθώριο, και κωδικοποιήθηκαν με «1110», ή «1130». Το είδος *Lb. paracasei* χαρακτηρίστηκε από την παρουσία μονόχρωμων αποικιών με μεταβλητό χρώμα από γαλάζιο σε πιο σκούρο μπλε, με στρογγυλό σχήμα, λεία επιφάνεια και ολόκληρο περιθώριο (εικ. 3). Όπως και στην μελέτη των Lee & Lee (2008), διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια σχημάτισαν αποικίες ίδιου λευκού χρώματος, καθιστώντας έτσι δύσκολη την διαφοροποίηση του κάθε είδους. Συχνά είδη του *Lb. plantarum group* εμφανίζονται σαν άσπρες, ή γαλάζιες με μπλε κέντρο, στρογγυλές, με λεία επιφάνεια, και ολόκληρο περιθώριο όπως φαίνεται και από την εικόνα 4 του παρακάτω πίνακα.

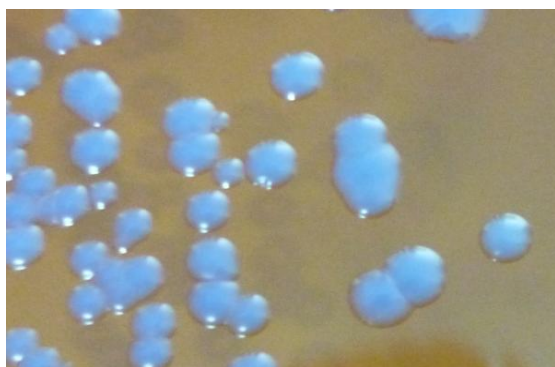
Πίνακας 3.4: Μορφολογία αποικίας και πρόβλεψη μέσω μοριακής ταυτοποίησης.



Εικ. 3.1: Παράδειγμα αποικίας *Lb. rhamnosus*.



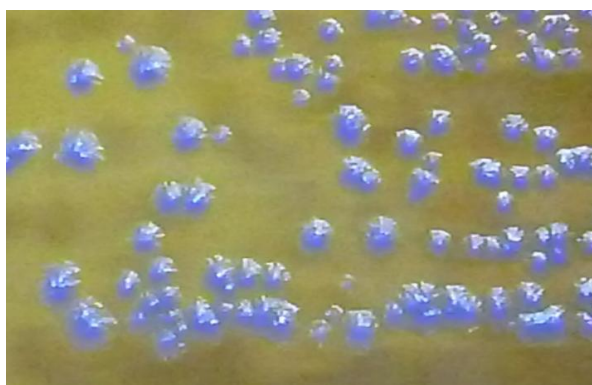
Εικ. 3.2: Παράδειγμα αποικίας *Lb. casei*.



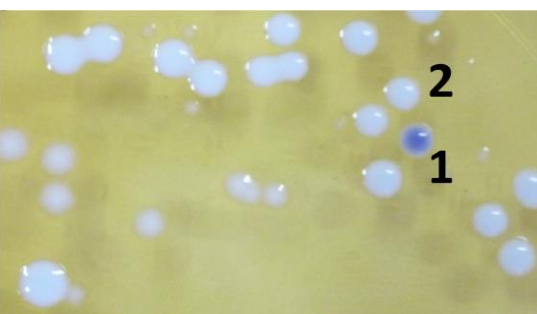
Εικ.3.3: Παράδειγμα αποικίας *Lb. paracasei*.



Εικ. 3.4: Παράδειγμα αποικίας *Lb. plantarum*.



Εικ. 3.5: *Lb. spp.*



Εικ. 3.6: 1: *Lb. paracasei*/ 2: *Pediococcus spp.*

33.4. Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων αποικιών.

Οι απομονωθέντες αποικίες χαρακτηρίστηκαν τόσο φαινοτυπικά, όσο γενοτυπικά.

3.4.1. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια γενικά έχουν κύτταρα σχήματος κόκκων ή ραβδιών, και μπορούν να βρεθούν μόνα τους, σε ζευγάρια, ή σε αλυσίδες ποικίλου μεγέθους. Το μέγεθος των κυττάρων (κόκκοι-γαλακτοβάκιλλοι), και το μήκος του (μόνο στην περίπτωση των λακτοβάκιλλων), όπως και ο αριθμός τους ο οποίος απαρτίζει την αλυσίδα, εξαρτάται αυστηρά από το είδος, και κάποιες φορές από τις συνθήκες ανάπτυξης. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση κάτω από μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης, 120 στελέχη ταξινομήθηκαν ως κόκκοι, και τα υπόλοιπα ως ραβδόμορφα βακτήρια.

Μορφολογικά 41 από τα στελέχη ήταν κόκκοι οι οποίοι εμφανίζονταν μονοί είτε σε ζεύγη και κωδικοποιήθηκαν σαν «00». Δεκατέσσερις από τους κόκκους οι οποίοι εμφανίζονταν σε αλυσίδες διαφόρου μήκους, και σαν ζεύγη κωδικοποιήθηκαν με «01». Από τους γαλακτοβάκιλλους, μικροσκοπικά 51 εμφανίστηκαν είτε ως μονοί, είτε σε ζεύγη, είτε πολύ σπάνια σε μικρές αλυσίδες, κωδικοποιήθηκαν σαν «01», ενώ 170 οι οποίοι παρουσιάζονταν τόσο ως μονοί και σε ζεύγη, όσο και σε μακριές ή κοντές αλυσίδες με «11». Από σύνολο 276 στελεχών που δοκιμάστηκαν για

παραγωγή CO₂ από γλυκόζη, τα 79 (28,6%) ήταν θετικά, ενώ τα υπόλοιπα δεν παρήγαγαν αέριο κατά την ανάπτυξη τους. Τόσο οι μεσόφιλοι, όσο και οι θερμόφιλοι κόκκοι (100%) δεν ήταν ικανοί να παράξουν CO₂. Από τους θετικούς γαλακτοβάκιλλους, 1 (1.2%) χαρακτηρίστηκε αργότερα με χρήση μοριακών μεθόδων σαν *Lb. brevis*, 1 (1.2%) σαν *Lb. casei*, 2 (2.5%) σαν *Lb. buchneri*, 48 (63.1%) ως *Lb. fermentum*, 12 (15.8%) ως *Lb. parabuchneri*, 12 (15.8%) σαν *Lb. paracasei*, και 3 (4%) σαν *Lb. rhamnosus*.

3.4.2. Γενοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών.

Στον γενοτυπικό χαρακτηρισμό περιλαμβάνεται η διαφοροποίηση με RAPD-PCR μεταξύ των στελεχών και η τυχόν ομαδοποίηση τους, όπως και η ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους.

3.4.2.1. Διαφοροποίηση των στελεχών με RAPD-PCR

Η μοριακή τεχνική RAPD-PCR με έναν εκκινητή (primer) χρησιμοποιήθηκε στη διερεύνηση της ποικιλομορφίας μεταξύ των γαλακτοβακίλλων και των κόκκων σε μεμονωμένα δείγματα τυριών και σε τυριά από διαφορετικούς παραγωγούς. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες από προηγούμενους ερευνητές στη μελέτη του πληθυσμού της NSLAB μικροχλωρίδας σε ώριμα, εμπορικά τυριά (Fitzsimons, et al., 1999). Η τεχνική αυτή διαλογής χρησιμοποιήθηκε ώστε να ομαδοποιήσει μεγάλους αριθμούς της ίδια απομόνωσης στελέχους, με στόχο την μείωση των στελεχών προς περαιτέρω ανάλυση. Μέσω του λογισμικού 'FPQuest™ II Database' (Biorad) πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση συστάδων και χρησιμοποιώντας στη μήτρα συσχέτισης του Pearson (συντελεστής r) τη «Μέθοδο Μη σταθμισμένου ζεύγους-ομάδας με αριθμητικούς μέσους, UPGMA» βρέθηκε η ομοιότητα μεταξύ των στελεχών. Τα αποτυπώματα της RAPD-PCR μας επέτρεψαν να χαρακτηρίσουμε τους κυρίαρχους πληθυσμούς μετά το πέρας της ωρίμανσης, και να επιλέξουμε τυχαία διαφορετικούς πληθυσμούς με υψηλή ποικιλότητα που προέρχονται από διαφορετικές συστάδες. Όλες οι απομονώσεις οι οποίες ανήκαν σε μια συστάδα (cluster) θα μπορούσε να θεωρηθούν σαν αντίγραφα (κλώνοι) ενός και μόνο στελέχους, το οποίο έχει απομονωθεί αρκετές φορές λόγω του ότι τα προφίλ των επιμέρους στελεχών ήταν όμοια (Manu et al., 1999).

Έτσι λοιπόν εφαρμόστηκε σε σύνολο 285 απομονωθέντων στελεχών, τα οποία αναπτύχθηκαν και ήταν αρνητικά στην καταλάση, ώστε να γίνει ο γενοτυπικός διαχωρισμός των ειδών και των βιοτύπων τους. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, λήφθησαν RAPD-PCR αποτυπώματα για 277 στελέχη (97.2%), ενώ μόλις 8 δεν κατάφεραν να ενισχυθούν, και έτσι δεν χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ταυτοποίηση. Όπως προκύπτει από τα παρακάτω δενδρογράμματα η τεχνική RAPD-PCR επιτρέπει τη διαφοροποίηση μεταξύ ειδών, και σε κάποιο βαθμό, μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Randazzo, Caggia, & Neviani, 2009).

3.4.2.1.1. Διαφοροποίηση γαλακτοβακίλλων με RAPD-PCR.

Εφαρμόζοντας τη μοριακή τεχνική στις απομονώσεις των επιμέρους δειγμάτων προκύπτουν μοναδικά RAPD-προφίλ. Το DNA των απομονωθέντων λακτοβακίλλων υποβλήθηκε σε RAPD-PCR με τον εκκινητή M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Rossetti & Giraffa (2005). Έτσι λοιπόν από το δείγμα A είχαμε 9 διαφορετικά RAPD-προφίλ, από το B και από το C πέντε, από το D επτά, από το E έντεκα, από το F δεκατρία, από το G έξι, από το H επτά, από το I εννιά, και από το L δέκα (βλ. παράρτημα επιμέρους δενδρογράμματα). Επίσης από το M και το O δέκα, από το N έντεκα, από το P, το R και το T έξι, από το S δύο, από το U 12, από το X δέκα, και τέλος από το Z οκτώ. Με τα επιλεχθέντα προφίλ κατασκευάζουμε νέο δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 1).

Πιο συγκεκριμένα όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από το δενδρόγραμμα για το **δείγμα** τυριού **A** (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) τα στελέχη A2, και A7 είναι όμοια κατά σχεδόν 100%, και ενώνονται σε μια συστάδα. Επίσης τα στελέχη A8 και A15, όπως και τα A10 με A14 έχουν όμοια αποτυπώματα κατά 95%. Έτσι από το παραπάνω δενδρόγραμμα παρατηρούμε πως εμφανίζονται μια φορά τα RAPD-προφίλ PA11, PA12, PA3, PA5, και PA6 με ποσοστό 8.33% το καθένα. Ακόμη εμφανίζονται 2 φορές τα προφίλ PA14, το PA2 και PA15 με ποσοστό 16.66% το κάθε ένα. Τα στελέχη A1, A4, και A13 δυστυχώς δεν ενισχύθηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου. Όσον αφορά το **δείγμα** τυριού **B** (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) τα αποτυπώματα των απομονωθέντων στελεχών B14, B15, B12, B7, B8, B10, B11, B3, B6, B2, σχετίζονται ισχυρά και συνδέονται κάτω από κοινή συστάδα, σε επίπεδο ομοιότητας >95%. Λόγω του ότι μορφολογικά δεν κατατάσσονται σε κανένα ειδικό group, πραγματοποιήθηκε 16SrRNA sequencing-PCR, και ταυτοποιήθηκε επιτυχώς με 99% ομοιότητα με γνωστό στέλεχος σαν *Lb. parabuchneri*. Επίσης τα στέλεχος B1 και B9 εμφανίζοντας σχεδόν ίδιο αποτύπωμα συνδέονται με την ίδια συστάδα. Έτσι εμφανίζεται το PB1 προφίλ 2 φορές (13.33%), το PB10 10 φορές (66.66%), και τα PB4, PB5 και PB13 μία φορά το καθένα (6.66%).

Στο **δείγμα** τυριού **C** (Provone) οι γαλακτοβακίλλοι διακρίνονται αισθητά μεταξύ τους. Όπως παρατηρούμε από το αντίστοιχο δενδρόγραμμα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) τα προφίλ PC2, PC8 και PC12 εμφανίζονται μια φορά (7.7% το καθένα). Τέλος τα στελέχη C06 και C13 δεν κατάφεραν να ενισχυθούν κατά την εφαρμογή της RAPD-PCR. Από το pasta-filata **δείγμα** τυριού Scamorza (**D**) 1 μήνα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3), παρατηρούμε πως τα στελέχη D10, και D12 συνδέονται σε κοινή συστάδα με 90% ομοιότητα, έτσι λοιπόν δεχόμαστε το PD10 RAPD-προφίλ. Στα στελέχη D01, D05, D09, D11, D15, τα οποία έδειξαν ίδια προφίλ, και οι συστάδες τους συνδέθηκαν σε επίπεδο ομοιότητας 91%, επιλέξαμε το PD01 RAPD-προφίλ για περαιτέρω ταυτοποίηση. Τέλος τα στελέχη D7, D13, D14, και D04, έδειξαν μοναδικά προφίλ, και έτσι ταυτοποιήθηκε το κάθε ένα χωριστά. Έτσι συνολικά έχουμε 7 μοναδικά RAPD-προφίλ. Το PD1, εμφανίζεται 5 φορές (35.7%), το PD10 2 (14.3%), το PD3 τρεις (21.4%), και τα PD13, PD14, PD4, PD7 με ποσοστό 7.14% το καθένα.

Το **δείγμα** τυριού **F** (Caciocavallo Podolico; βλ. παράρτημα, κεφ. 3) εμφανίζει μεγάλη βιοποικιλότητα όσον αφορά τον διαχωρισμό των στελεχών του.

Συγκεκριμένα τα στελέχη F16, F10, F14, F05, F19. Τα στελέχη F17, F20, F22 ενώ ενώνονται μεταξύ τους με συστάδα με ποσοστό ομοιότητας 95%, έχουν όμοιο αποτύπωμα με το στέλεχος F16 και συνδέονται με αυτό με συστάδα σε επίπεδο 84%. Επίσης τα στελέχη F02, F04 τα οποία έχουν όμοια RAPD-αποτυπώματα συνδέονται με συστάδα με ποσοστό ομοιότητας 98%, και εν συνεχεία με νεότερη συστάδα με τα στελέχη F03 και F11 σε επίπεδο ομοιότητας 95%. Αξιοσημείωτο είναι πως ανάμεσα στις δυο αυτές συστάδες παρεμβάλλεται το στέλεχος F05 το οποίο ανήκει σε διαφορετικό είδος και χαρακτηρίζεται ως *Lb. buchneri* με τα υπόλοιπα 4 τα οποία ταυτοποιούνται ως *Lb. paracasei*. Έτσι τα προφίλ PF10, PF14, PF19, PF05 παρουσιάζονται 1 φορά (5% το καθένα), το PF17 3 φορές (15%), και το PF02 4 φορές (20%).

Μικρή ποικιλότητα παρουσίασαν τα στελέχη του δείγματος G (*Provolone semipicante*). Τα στελέχη G2, G4 παρουσιάζουν ίδια RAPD-αποτυπώματα και ενώνονται με κοινή συστάδα με ομοιότητα 94%. Τα στελέχη G08, G10 και G07 ήταν όμοια κατά 90% με βάση το δενδρόγραμμα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3). Τα στελέχη G06 και G15 δεν έδειξαν να μοιάζουν με άλλα. Έτσι το προφίλ PG02 εμφανίστηκε 2 φορές (18.2%), τα PG15 και PG6 μία (9.1% το καθένα), και τέλος το PG10 3 φορές (27.3%). Όπως παρατηρούμε για το δείγμα *Caciocavallo Lucano*, 3 μηνών ωρίμανσης (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) τα στελέχη H10 και H12 έδειξαν κατά 99% (~100%) ομοιότητα. Επίσης τα στελέχη H1, H13, και H17 συνδέονται με συστάδες με ομοιότητα ~95%, όπως και τα H04, H14 και H05 με συστάδα σε 93% ομοιότητα. Ακόμη τα στελέχη H08 και H06 διαχωρίστηκαν πλήρως και έτσι εφαρμόστηκε σε αυτά ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA και εν συνεχεία ταυτοποιήθηκαν με γνωστά στελέχη με επίπεδο 0.99-1.00. Συμπερασματικά το προφίλ PH12 εμφανίζεται 2 φορές (15.4%), τα PH13 και PH4 τρεις φορές (23.1%) και τα PH6, PH8 από μία (7.7%) φορά το καθένα. Σημειωτέον το προφίλ PH16 είναι κόκκοι και δεν εμφανίζεται σε αυτό το δενδρόγραμμα, και εμφανίζεται 3 φορές (23.1%). Όπως προκύπτει από το δενδρόγραμμα του δείγματος τυριού I (βλ. παράρτημα, κεφ. 3), τα στελέχη I07 και I14 εμφανίζουν ίδια RAPD-αποτυπώματα και ενώνονται με συστάδα σε ομοιότητα 95%. Επιπρόσθετα τα I08 με το I09, τα I05 με I10, και I11 με I15 είναι όμοια μεταξύ τους. Τέλος τα στελέχη I13, I12, I02, και I06 διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα. Έτσι προκύπτουν 10 μοναδικά προφίλ: PI07 (7.7%; όμοιο με PH13 προφίλ), PI1 (7.7%; βλ. δενδρόγραμμα *Coc-1*), PI11 (15.4%), PI12 (7.7%), PI13 (7.7%), PI2 (7.7%), PI5 (15.4%), PI6 (7.7%), PI7 (15.4%), και PI9 (15.4%).

Στο *Caciocavallo Lucano* 2 μηνών (δείγμα L) τα στελέχη L13 και L14 έδειξαν ομοιότητα 98% (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) και συνδέονται με συστάδα (95%) με το L11 και όλα μαζί με συστάδα με τα L01 και L02 τα οποία είναι όμοια κατά 93%. Τα L08 και L15 όμοια κατά 90%, όπως και τα L10 με L06. Τα RAPD-αποτυπώματα των στελεχών L07, L05, L03 είναι μοναδικά. Συμπερασματικά αποδεχόμαστε τα PL07 (7.7%), PL5 (7.7%), PL13 (15.4%; όμοιο με το PH13; βλ. δενδρόγραμμα RAPD-M13), PL10 (15.4%), PL3 (7.7%), PL1 (PH13; 15.4%), και PL8 (15.4%) RAPD-προφίλ. Μοναδικό προφίλ αποτελεί και το PL12 (7.7%) το οποίο απομονώνεται μια φορά και ανήκει στους κόκκους.

Πολύ καλά αποτελέσματα διαχωρισμού και ομαδοποίησης έδειξε η τεχνική RAPD-PCR για το **δείγμα** τυριού **M** (βλ. παράρτημα, κεφ. 3). Τα στελέχη M01, M13, M04 και M05 αν και ενώνονται με συστάδες με ομοιότητα >90%, λόγω του ότι τα προφίλ τους εμφανίζουν μικρές διαφορές τα ταυτοποιούμε ξεχωριστά, ενώ το στέλεχος M03 διαχωρίζεται καθαρά από τα υπόλοιπα 4. Το ίδιο συμβαίνει και με τα στελέχη M08, M11 και M14 όπου εσωκλείονται σε κοινή συστάδα με >90% ομοιότητα παρ' όλο που τα αποτυπώματα τους διαφέρουν ελάχιστα. Τέλος τα στελέχη M06, M10 και M16 διαχωρίζονται πλήρως από τα υπόλοιπα. Το στέλεχος M07 ενώ δεν ενισχύθηκε με την τεχνική αυτού επιλέχθηκε για περαιτέρω ταυτοποίηση. Έτσι μοναδικά είναι τα PM1, PM13, PM4, PM5, PM3, PM16, PM10, PM6, PM14 (8.33% το καθένα), PM8 (16.7%), και M07 (PL8, δενδρόγραμμα RAPD-M13).

Όπως παρατηρούμε από το αντίστοιχο δενδρόγραμμα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) **δείγμα N** υπάρχει μεγάλη βιοποικιλότητα μεταξύ των στελεχών. Μοναδικά προφίλ παρ' όλο που προέρχονται από το ίδιο είδος παρουσιάζουν τα στελέχη N09, N13. Επίσης μοναδικό είναι και το N09, N01 και N08, N06. Τα στελέχη N10 με N15, είναι όμοια κατά περίπου 95%. Το ίδιο συμβαίνει και με τα N04 και N05, τα οποία συνδέονται με συστάδα με ομοιότητα 92%, εμφανίζουν διαφορετικά αποτυπώματα και έτσι δεχόμαστε και τα δυο για περαιτέρω ταυτοποίηση. Τα στελέχη N02, N11, N12, και N14, εμφανίζουν όμοια αποτυπώματα και συνδέονται με κοινή συστάδα με ομοιότητα 95%. Όμοια κατά το ίδιο ποσοστό είναι και τα στελέχη N03, N17 και N16. Έτσι προκύπτουν τα μοναδικά RAPD-προφίλ PN8, PN6, PN1, PN13, PN7, PN9, PN4, PN5 (6.25% το καθένα), PN10 και PN3 (12.5% το καθένα), και PN12 (25%).

Τα στελέχη O7, O14, O11, και O12 του τυριού Cacio Bucato (**Δείγμα O**; βλ. παράρτημα, κεφ. 3) είναι όμοια με το O05 σε επίπεδο ομοιότητας ~90%, και έτσι επιλέγουμε προς ταυτοποίηση το προφίλ PO5 διότι βρισκόταν θεωρητικά πιο απομακρυσμένο. Αν και τα στελέχη O9, O12, και O15 είναι όμοια κατά 92% βάσει της συστάδας, λόγω του ότι εμφανίζουν διαφορετικά αποτυπώματα, δεχόμαστε και τα 3 προς περαιτέρω ταυτοποίηση. Εν συνεχεία τα στελέχη O16 και O17 είναι 100% όμοια μεταξύ τους, και κατά 95% με το O1. Το στέλεχος O8 με ελάχιστα διαφορετικό αποτύπωμα πλησιάζει κατά 90% τα στελέχη O3 και O6 τα οποία είναι όμοια μεταξύ τους κατά 96%. Ακόμη τα O2 και O4 στελέχη όμοια κατά 98%, και συνδέονται με συστάδα με τα O1, O16 και O17 κατά 93% ομοιότητα. Τέλος το στέλεχος O10 διαχωρίζεται πλήρως από τα υπόλοιπα στελέχη. Έτσι δεχόμαστε τα PO10, PO9, PO8, PO13, PO15 (6.25% το καθένα), PO6 και PO2 (12.5% το καθένα), PO16 (18.7%) και PO5 (31.2%) ως μοναδικά προφίλ για περαιτέρω ταυτοποίηση.

Όσον αφορά το δείγμα τυριού Pecorino Abriola (**Δείγμα P**; βλ. παράρτημα, κεφ. 3) παρουσίασε μικρή ποικιλομορφία γαλακτοβάκιλλων, τα οποία διαχωρίζονταν σε επίπεδο ομοιότητας 88%. Όπως προκύπτει τα P07 και P09 δεν ενισχύθηκαν, ενώ το P02 στέλεχος αν και κόκκος ενισχύθηκε με τον εκκινητή M13. Τα στελέχη P05, P06, P08, P11, P12 και P17 παρουσιάζουν ίδια RAPD-αποτυπώματα και συνδέονται με κοινή συστάδα με ομοιότητα 96%. Το ίδιο ισχύει και για τα στελέχη P03, P13, και P18, όπως και τα P10, P15 και P16. Το P01 διαχωρίζεται με περισσότερα ζεύγη βάσεων να απαρτίζουν το αποτύπωμα του. Συμπερασματικά προκύπτουν έξι

μοναδικά RAPD-προφίλ: PP1 (6.25%), PP15 (18.7%), PP18 (18.75%), PP5 (37.5%), PP02 (6.25%, κόκκος) και PP04 (12.5%, κόκκοι, βλ. δενδρόγραμμα RAPD-coc1).

Όπως παρατηρούμε από το παρακάτω δενδρόγραμμα για το τυρί Scamorza 3 μηνών (**Δείγμα R**; βλ. παράρτημα, κεφ. 3), η μικροχλωρίδα του έχει μεγάλη βιοποικιλότητα και απαρτίζεται από τέσσερα διαφορετικά είδη. Τα στελέχη R12, R14, R08 συνδέονται με την ίδια συστάδα καθ' ομοιότητα 90%, και με το R05 κατά 70%, παρουσιάζουν ίδια RAPD-αποτυπώματα. Όμοια κατά 90% είναι επίσης και τα στελέχη R01, R15, και R10 αποδεχόμαστε το PR01 προφίλ. Τα στελέχη R16 και R17 εμφανίζουν το ίδιο αποτύπωμα. Δυνατότητα αποκλωνοποίησης έχουμε και για τα R07, R09, R11 στελέχη τα οποία είναι όμοια κατά ~95%, και συνδέονται με τη συστάδα του PR01 και σε επίπεδο ομοιότητας 80% συνδέονται με τα στελέχη R13 και R16. Τέλος τα στελέχη R03 και R04 έδειξαν να εμφανίζονται σε κλώνους. Έτσι λοιπόν αποπολλαπλασιάζοντας κρατάμε το PR12 προφίλ. (25%), το PR3 και PR4 (6.25% το καθένα), το PR1 (18.7), PR9 (31.25%), και PR17 (12.5%).

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το Casiocavallo Lucano 3 μηνών (**Δείγμα T**) έδειξαν μικρή ποικιλότητα. Καθώς η μοριακή αυτή τεχνική κατάφερε να διαχωρίσει τα είδη *Lb. rhamnosus/paracasei* η ειδική για το είδος PCR (species-specific PCR) μέθοδος που εφαρμόστηκε μετέπειτα ενισχύοντας το γονίδιο *tuf* δεν κατάφερε να χαρακτηρίσει πλήρως όλα τα στελέχη. Όπως προκύπτει από το αντίστοιχο δενδρόγραμμα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3), τα στελέχη T02 και T07 είναι όμοια κατά 95% και ενώ το T15 εμφανίζει περίπου ίδιο αποτύπωμα, συνδέεται με χαμηλότερο % ομοιότητας (80%). Τα T01 και T10 έχουν όμοια αποτυπώματα και συνδέονται σε κοινή συστάδα κατά ~90%, ενώ τα T08, T11 και T14 στελέχη είναι όμοια κατά ~100%. Το στέλεχος T04 διαχωρίζεται πλήρως από όλα τα υπόλοιπα στελέχη. Συμπερασματικά προκύπτουν τα ακόλουθα μοναδικά RAPD-προφίλ: PT01 (11.11%), PT10 (11.11%), PT15 (11.11%), PT4 (11.11%), PT7 (22.22%), και PT8 (33.33%).

Μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού έδειξαν και τα στελέχη του ΠΟΠ τυριού Casiocavallo Silano (**Δείγμα U**). Όπως προκύπτει (βλ. παράρτημα, κεφ. 3), τα στελέχη U4, U5 και U6 έχοντας όμοιο αποτύπωμα συνδέονται με κοινή συστάδα κατά 96%, όπως και μεταξύ τους τα U2, U9 και U21. Όμοια είναι επίσης τα U8 και U13 (96%) και τα U12 και U17 (95%). Ακόμη τα U15 και U16 είναι όμοια σχεδόν 100%, και συνδέονται σε επίπεδο ομοιότητας 95% με τα U3 και U18 των οποίων τα προφίλ διαφέρουν ελάχιστα. Τέλος διαχωρίζονται πλήρως τα U01, U07, U19 και U20. Εν συμπεράσματι επιλέγονται τα μοναδικά RAPD-αποτυπώματα PU1, PU07, PU19 και PU20 (5% το καθένα), PU16, PU12, PU08 και PU03 (10% το καθένα), PU05 και PU09 (15%). Μοναδικό είναι και τα προφίλ PU11 και PU14 (5% το καθένα) των κόκκων.

Όσον αφορά το πεκορίνο τυρί Pecorino Filiano (**Δείγμα P**), μικρή ήταν η ποικιλότητα μεταξύ των στελεχών του, ενώ η τεχνική RAPD-PCR καταφέρνει να τα κατατάξει με σειρά. Έτσι λοιπόν όπως προκύπτει από το δενδρόγραμμα (βλ. παράρτημα, κεφ. 3) τα στέλεχος X06 θεωρείται κλώνος του X07 λόγω 100% όμοιων RAPD-αποτυπωμάτων. Τα X08 και X12 διαχωρίζονται πλήρως από τα υπόλοιπα στελέχη. Αν και τα στελέχη X14 και X15 συνδέονται με την ίδια συστάδα κατά 98%, τα αποτυπώματα τους διαφέρουν ελάχιστα και συνεπώς δεχόμαστε και τα δυο προς

περαιτέρω ταυτοποίηση. Το ίδιο με τα προηγούμενα στελέχη ισχύει και για τα X10 και X11. Το στέλεχος X5, ενώ συνδέεται με τη συστάδα των δυο προηγούμενων με υψηλό ποσοστό ομοιότητας 97%, και το γονιδιακό αποτύπωμα διαφέρει, εφαρμόζοντας multiplex-PCR ταυτοποιήθηκε επιτυχώς σαν *Lb. paracasei*, πράγμα που αποδεικνύει πως η RAPD έδωσε καλά αποτελέσματα. Έτσι επιλέγουμε τα PX05, PX8, PX10, PX11, PX12, PX14 και PX15 (7.7% το καθένα), PX7 (15.4%) προφίλ για περαιτέρω ταυτοποίηση.

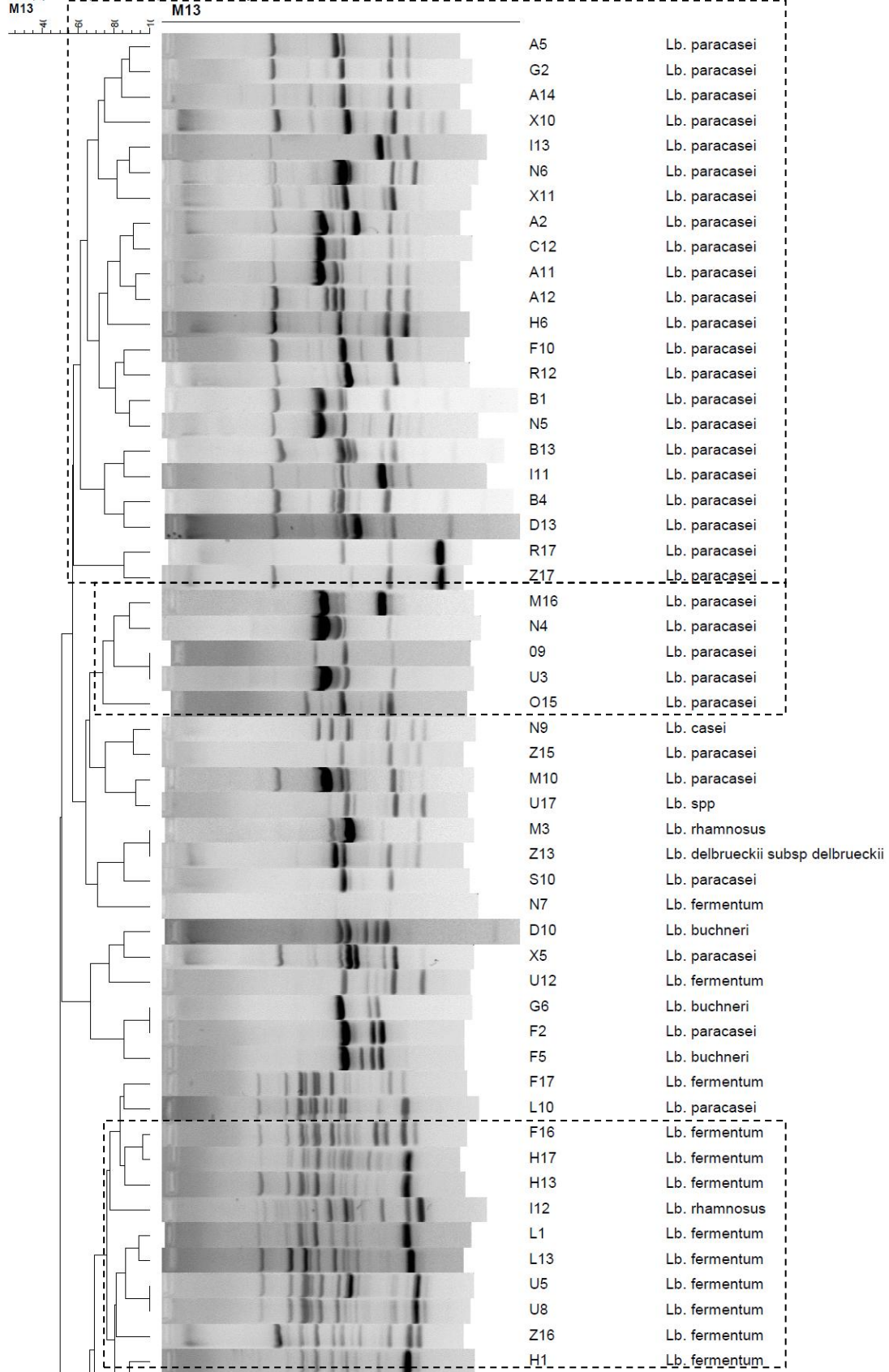
Τέλος συμπεραίνεται ξεκάθαρα από το δενδρόγραμμα για το δείγμα Casiocavallo Lucano 2 μηνών (**Δείγμα Z**; βλ. παράρτημα, κεφ. 3) η τεχνική RAPD-PCR κατάφερε να διαχωρίσει επιτυχώς τα στελέχη τα οποία απαρτίζουν τη μικροχλωρίδα του τυριού. Αποκλωνοποιώντας τα στελέχη Z01 και Z03 έχουν όμοια προφίλ (96%), όπως και τα Z09 και Z16. Παρ' όλο που το στέλεχος Z04 ενώνεται με συστάδα με το Z01 εμφανίζει ελαφρώς διαφορετικό αποτύπωμα. Το ίδιο συμβαίνει και με το στέλεχος Z15. Συνεχίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε πως τα στελέχη Z11, Z12, Z08, Z10, Z13, Z05, είναι κλώνοι του στελέχους Z07. Λόγω του ότι το Z07 βρίσκεται «πιο μακριά» (92%) σε σχέση με τα υπόλοιπα εφαρμόζοντας σε αυτό 16SrRNA sequencing-PCR μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τα άλλα στελέχη. Τέλος τα Z06, Z02 και Z17 διαχωρίζονται πλήρως από τα υπόλοιπα στελέχη. Έτσι λοιπόν προκύπτουν τα μοναδικά προφίλ: PZ15, PZ17, PZ2, PZ4, PZ6, (6.25%), PZ16, PZ01 (12.5% το καθένα) και PZ7 (43.75%).

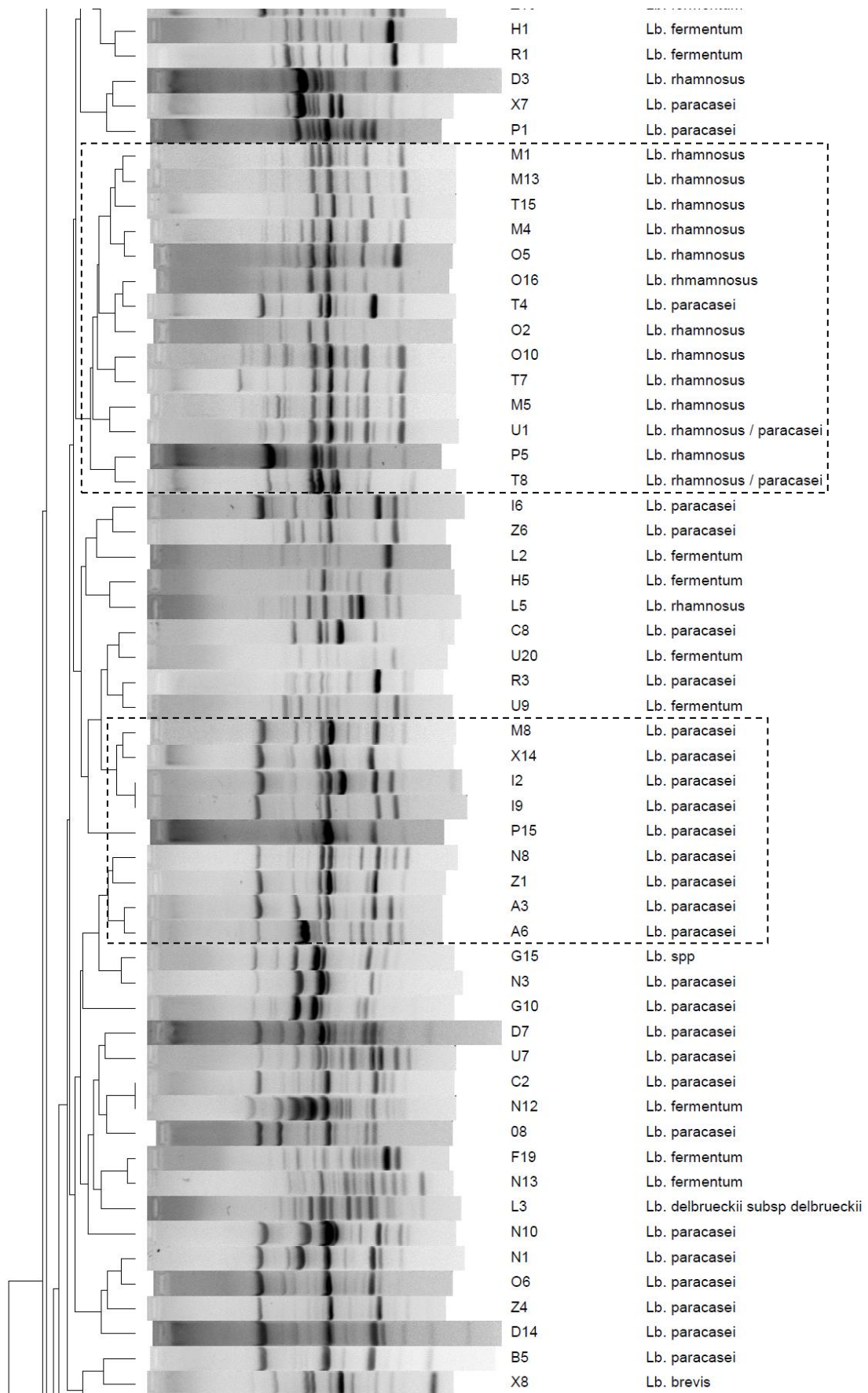
Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3.5) συνοψίζει τον αριθμό των στελεχών από κάθε είδος γαλακτοβακίλλων και κάθε δείγμα τυριού, που παρουσίασαν μοναδικά RAPD-προφίλ. από αυτά τα μοναδικά προφίλ προέκυψε το ακόλουθο δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 1).

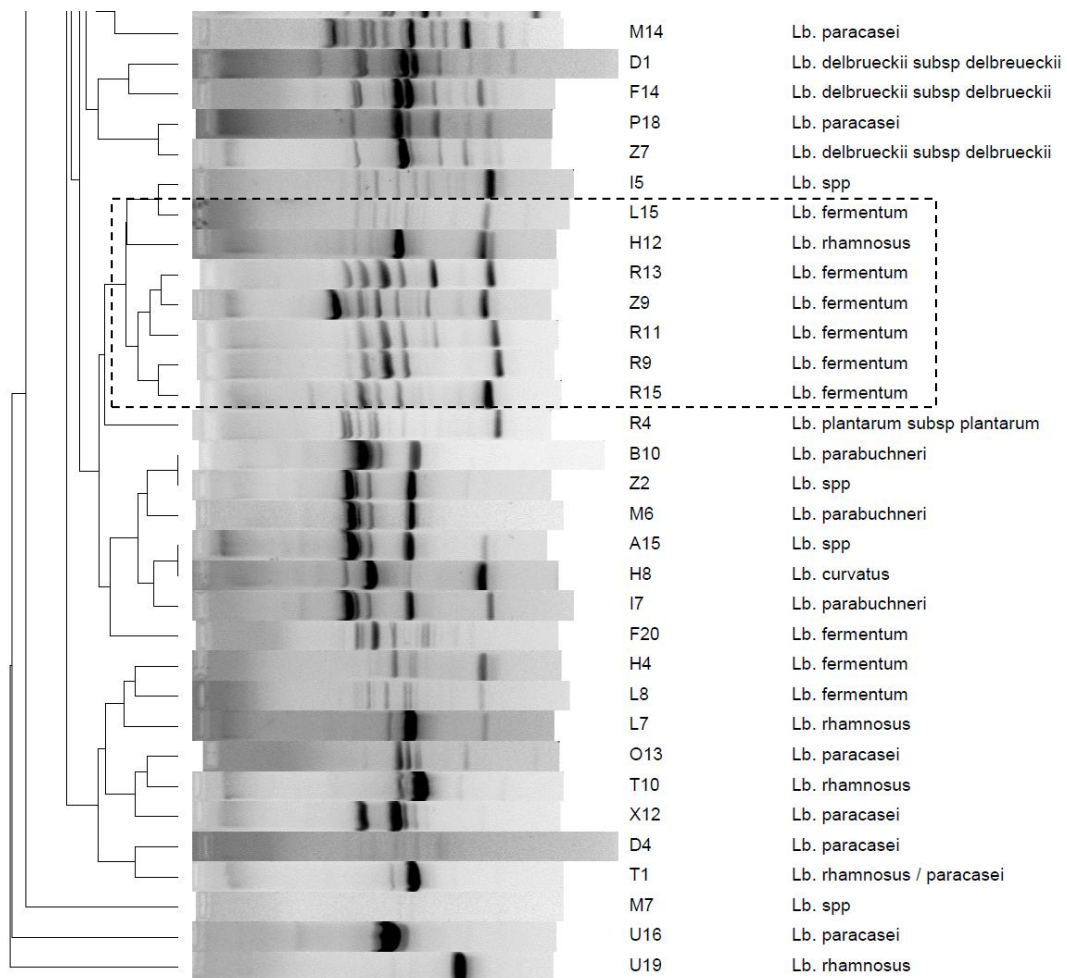
Πίνακας 3.5 Αριθμός στελεχών ανά είδος, ανά δείγμα τυριού, με μοναδικά RAPD-προφίλ.

Δείγμα τυριού	Είδος μικροοργανισμού	Αριθμός Στελεχών
A	<i>Lb. paracasei</i>	7
	<i>Lb. spp</i>	1
B	<i>Lb. paracasei</i>	4
	<i>Lb. parabuchneri</i>	1
C	<i>Lb. paracasei</i>	3
D	<i>Lb. buchneri</i>	1
	<i>Lb. delbrueckii subsp delbrueckii</i>	1
	<i>Lb. paracasei</i>	4
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1
F	<i>Lb. buchneri</i>	1
	<i>Lb. fermentum</i>	5
	<i>Lb. paracasei</i>	2
G	<i>Lb. buchneri</i>	1
	<i>Lb. paracasei</i>	3
H	<i>Lb. curvatus</i>	1
	<i>Lb. fermentum</i>	5
	<i>Lb. paracasei</i>	1
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1
I	<i>Lb. fermentum</i>	1
	<i>Lb. parabuchneri</i>	1
	<i>Lb. paracasei</i>	5
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1
L	<i>Lb. delbrueckii subsp delbrueckii</i>	1
	<i>Lb. fermentum</i>	5
	<i>Lb. paracasei</i>	1
	<i>Lb. rhamnosus</i>	2
M	<i>Lb. parabuchneri</i>	1
	<i>Lb. paracasei</i>	4
	<i>Lb. rhamnosus</i>	6
N	<i>Lb. casei</i>	1
	<i>Lb. fermentum</i>	3
	<i>Lb. paracasei</i>	7
O	<i>Lb. paracasei</i>	5
	<i>Lb. rhamnosus</i>	4
P	<i>Lb. paracasei</i>	3
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1
R	<i>Lb. fermentum</i>	5
	<i>Lb. paracasei</i>	3
	<i>Lb. plantarum</i>	1
S	<i>Lb. paracasei</i>	1
T	<i>Lb. paracasei</i>	1
	<i>Lb. rhamnosus</i>	3
	<i>Lb. rhamnosus/paracasei</i>	2
U	<i>Lb. fermentum</i>	6
	<i>Lb. paracasei</i>	3
	<i>Lb. rhamnosus</i>	2
X	<i>Lb. brevis</i>	1
	<i>Lb. paracasei</i>	7
Z	<i>Lb. delbrueckii subsp delbrueckii</i>	2
	<i>Lb. fermentum</i>	2
	<i>Lb. paracasei</i>	6

Dice (Opt:2.29%) (Tol:1.6%-1.6%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]







Δενδρόγραμμα 1: Δενδρόγραμμα RAPD-PCR με primer M13.

Αν και ορισμένα στελέχη πλησίαζαν αρκετά μεταξύ τους και παρουσίαζαν κοινό προφίλ με άλλα στελέχη, λόγω του ότι προέρχονταν από διαφορετικούς παραγωγούς, κρίθηκε ορθή η περαιτέρω ταυτοποίηση τους. Η ταυτοποίηση των στελεχών με μοριακές μεθόδους (multiplex-PCR, ενίσχυση και αλληλούχηση του γονιδίου του 16S rRNA ταίριαζαν αρκετά καλά με τις συστάδες. Έτσι παρατηρείτε επίσης πως τα στελέχη τοποθετούνται με σχετικά καλή ταξινομική σειρά. Η τυποποίηση των στελεχών με τον εκκινητή M13 μέσω της RAPD-PCR έδειξε επίσης μεγάλη βιοποικιλότητα, στο *L. casei* group, όπως συνέβη και στην μελέτη των Corsetti et al. (2008) πάνω σε αυτή την ομάδα.

3.4.2.1.2. Διαφοροποίηση κόκκων με RAPD-PCR.

Ο γονιδιακός χαρακτηρισμός των κόκκων με RAPD-PCR, πραγματοποιήθηκε με τον εκκινητή coc-1 (AGCAGCGTGG) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Parente et al., (2010). Σύμφωνα με την διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τους γαλακτοβάκιλλους, ακολούθως σε όσα δείγματα τυριών απομονώθηκαν αρκετοί κόκκοι (>5) πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ανάλυσης συστάδων.

Έτσι λοιπόν για το Pronolone (Δείγμα C) όπου 10 από τα 15 στελέχη που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε RAPD-PCR με τον εκκινητή coc-1, και

παρατηρήθηκε μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών του. Όπως προκύπτει από το δένδrogramma (βλ. παράρτημα, κεφ. 3.2) τα στελέχη C07, C09, C04, C14, C01, C03, C10, και C11 είναι κλώνοι του στελέχους C15 λόγω του ότι εμφανίζουν το ίδιο RAPD-αποτύπωμα. Έτσι επιλέγουμε το προφίλ PC15 για περαιτέρω ταυτοποίηση. Απεναντίας το στέλεχος C05 διαχωρίζεται πλήρως από τα υπόλοιπα και εμφανίζει μοναδικό προφίλ (PC5, 7.7%).

Όσον αφορά το τυρί pecorino Pecorino Lucano (**Δείγμα Ε**) όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν ήταν κόκκοι. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής RAPD-PCR με τον εκκινητή coc-1, όπως παρατηρούμε και από το αντίστοιχο δένδrogramma (βλ. παράρτημα, κεφ. 3.2) 3 στελέχη κατάφεραν να διαχωριστούν από τα υπόλοιπα (E01, E03, E15). Από τα υπόλοιπα παρατηρούμε μικρό διαχωρισμό και ίσως ομαδοποίηση τους. Τα στελέχη E07 με E13, E06 και E09 εμφανίζουν όμοιο προφίλ και συνδέονται με την ίδια συστάδα. Το E14 διαφοροποιείται ελάχιστα από αυτά, και έτσι ταχτοποιείται χωριστά. Επίσης το E11 είναι κλώνος του E08, το E04 και E05 κλώνος του E02, και τέλος το E15 του E10. Έτσι προκύπτουν τα ακόλουθα προφίλ σαν μοναδικά για περαιτέρω χρήση και ταυτοποίηση: PE01, PE03, PE12, PE14 (6.7% το καθένα), PE13, PE8, PE9, PE10 (13.33%), και PE2 (20%). Στην ειδική ποικιλία τυριού Casiocavallo Podolico όπως παρατηρούμε από το αντίστοιχο δένδrogramma (βλ. παράρτημα, κεφ. 3.2) υπάρχει μεγάλη βιοποικιλότητα ειδών, όσο και σε επίπεδο στελέχους. Όπως συμπεραίνουμε το στέλεχος F09, F08, F15, F06, και F07 διαχωρίζονται πλήρως από τα υπόλοιπα στελέχη. Τα στελέχη F21, F23, F24, και F18 εμφανίζουν ίδια αποτυπώματα και συνδέονται με συστάδα σε επίπεδο ομοιότητα ~85%. Ακόμη, τα στελέχη F12 και F13 όμοια κατά 95%. Έτσι λοιπόν προκύπτουν τα ακόλουθα μοναδικά RAPD-προφίλ προς περαιτέρω ταυτοποίηση: PF12 (10%), PF21 (20%), PF06, PF15, PF07, PF8, και PF9 (5% το καθένα).

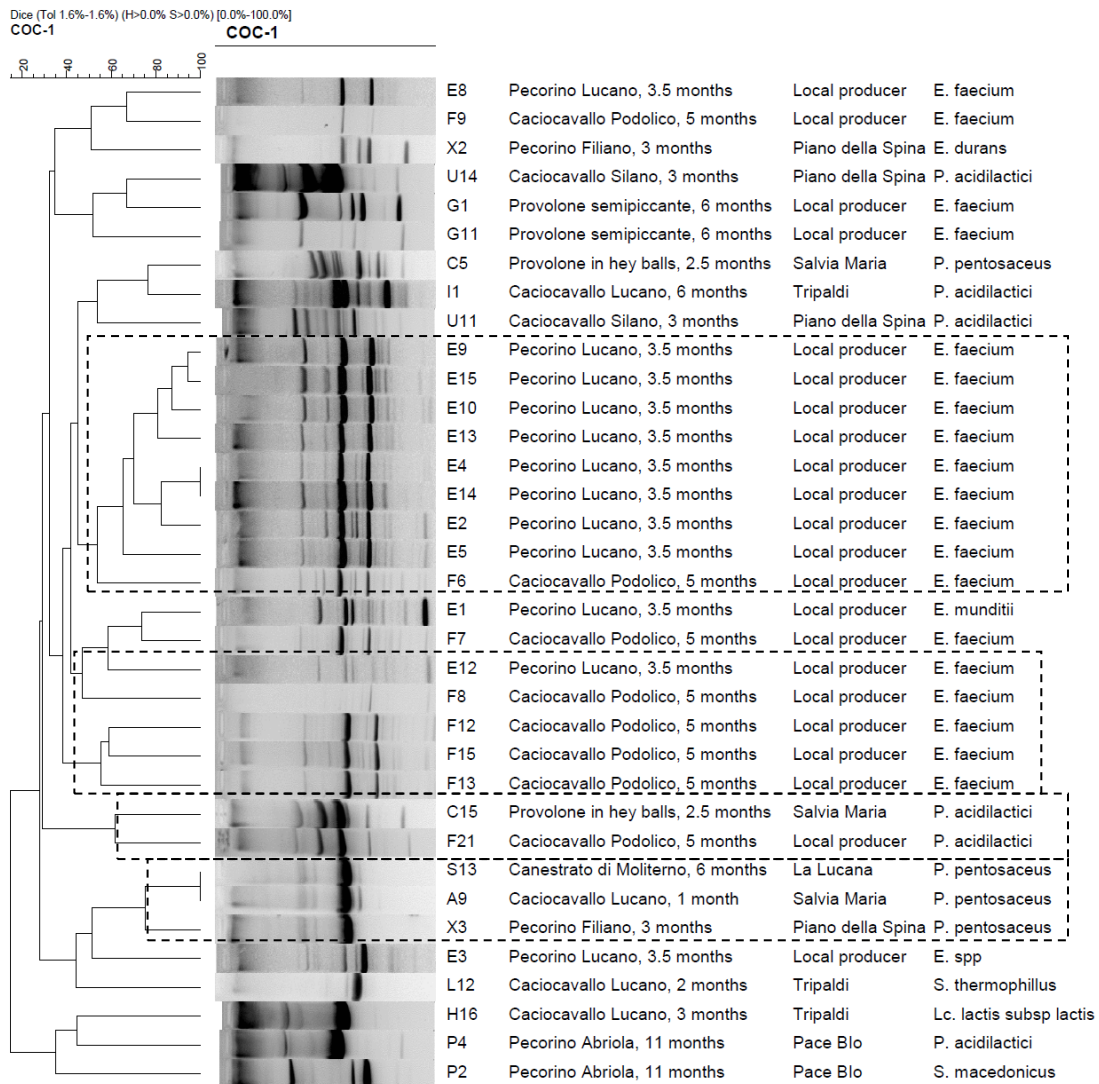
Τέλος όσον αφορά τους απομονωθέντες κόκκους από το Pecorino Filiano απομονώθηκαν 2 είδη, τα οποία όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από το παρακάτω δένδrogramma (βλ. παράρτημα, κεφ. 3.2) διαχωρίζονται πλήρως με την εφαρμογή της τεχνικής RAPD-PCR. Αποκλωνοποιώντας τα θα μπορούσαμε να πούμε πως τα X09 και X06 είναι όμοια (99%), και συνδέονται με το X3 με μια άλλη συστάδα με ομοιότητα 96%. Επομένως επιλέγουμε το PX3 προφίλ (23.1%) για περαιτέρω χρήση. Επίσης το στέλεχος X02, διαφοροποιείται πλήρως από τα υπόλοιπα, και επιλέγεται το προφίλ του PX2 (7.7%) προς περαιτέρω ταυτοποίηση. Αυτό επιβεβαιώνεται μέσω της 16SrRNA αλληλουχίας, που ταυτοποιείται με 99% ομοιότητα ως *Enterococcus durans*. Αξίζει να αναφέρουμε πως το X15 αν και γαλακτοβάκιλλος (*Lb. paracasei*) ενισχύθηκε κατά τη μέθοδο.

Γενικά θα πρέπει να αναφερθεί πως τα στελέχη που επιλέχτηκαν από την ομαδοποίηση των απομονώσεων, είχαν τις καλύτερες τιμές συγκέντρωσης και ποιότητας DNA κατά τη χρήση του NanoDrop®. Σε ορισμένες περιπτώσεις επιλέχτηκε το σχετικά πιο απομακρυσμένο στέλεχος που εσωκλειόταν στην συστάδα.

Πίνακας 3.6 Αριθμός στελεχών ανά είδος κόκκων, ανά δείγμα τυριού, με μοναδικά RAPD-προφίλ.

Δείγμα τυριού	Είδος μικροοργανισμού	Αριθμός Στελεχών
A	<i>P. pentosaceus</i>	1
B	-	-
C	<i>P. acidilactici</i>	1
	<i>P. pentosaceus</i>	1
D	-	-
E	<i>E. faecium</i>	10
	<i>E. faecalis/faecium</i>	1
	<i>E. mundtii</i>	1
F	<i>E. faecium</i>	7
	<i>P. acidilactici</i>	1
G	<i>E. faecium</i>	2
H	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	1
I	<i>P. acidilactici</i>	1
L	<i>S. thermophilus</i>	1
M	-	-
N	-	-
O	-	-
P	<i>P. acidilactici</i>	1
	<i>S. macedonicus</i>	1
R	-	-
S	<i>P. pentosaceus</i>	1
T	-	-
U	<i>P. acidilactici</i>	2
X	<i>E. durans</i>	1
	<i>P. pentosaceus</i>	1
Z	-	-

Ο παραπάνω πίνακας (Πίνακας 3.6) συνοψίζει τον αριθμό των στελεχών από κάθε είδος κόκκων που έδειξε μοναδικό RAPD-προφίλ σε κάθε δείγμα τυριού. Με τα παραπάνω στελέχη δημιουργήθηκε νέο διάγραμμα ώστε να διαχωρίσει τους κόκκους στο σύνολο τους ή/ και να τους ομαδοποιήσει. Όπως παρατηρούμε και από το παρακάτω δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 2), δεν λήφθησαν αποτελέσματα με καλή ταξινομική σειρά όπως έγινε με τον εκκινητή M13. Έτσι λοιπόν η RAPD-PCR αποδείχτηκε μια αξιόπιστη και μέθοδος ακριβείας για την ταυτοποίηση των στελεχών, όπως σε παρόμοιες μελέτες στην ταυτοποίηση των εντερόκοκκων (Morandi et al., 2006), και στην ανίχνευση γενετικής ποικιλότητας σε επίπεδο στελέχους.



Δενδρόγραμμα 2: Δενδρόγραμμα RAPD-PCR με primer coc-1.

3.4.2.2. Ταυτοποίηση των στελεχών με PCR μεθόδους.

3.4.2.1. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “*casei* group”.

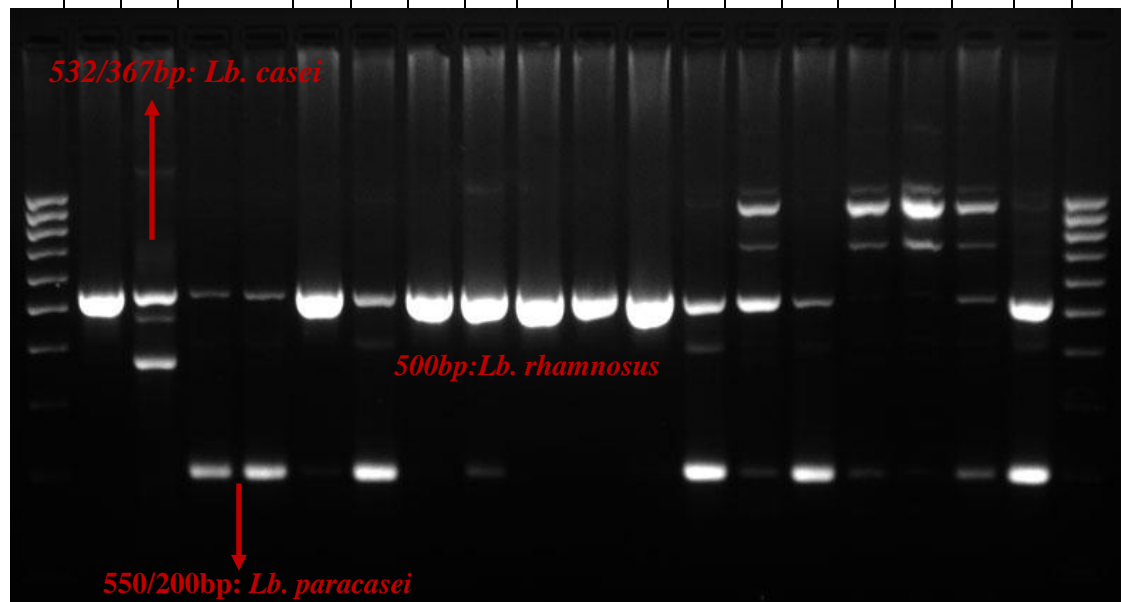
Προχωρώντας στην ταυτοποίηση των στελεχών, αυτή έγινε βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τροποποιημένο mMRS-BPB υπόστρωμα. Έτσι λοιπόν όσα στελέχη παρουσίασαν μοναδικά RAPD-αποτυπώματα κατά την εφαρμογή της RAPD-PCR μεθόδου, και η αποικία τους στο τροποποιημένο υπόστρωμα ήταν μονοχρωματική με χρώμα άσπρο, απαλό κίτρινο, γαλάζιο ή/και απαλό μπλε (κλίμακα 0, 1, 3,4; Βλ. Υλικά και Μέθοδοι, κεφ. 2.4.2) θεωρήθηκε πως ανήκαν στο “*Lactobacillus casei* group”. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίστηκαν με χρήση multiplex-PCR, τεχνική η οποία αναπτύχθηκε για την διαφοροποίηση των στελεχών *L. casei*, *L. paracasei* και *L. rhamnosus* (Ventura et al., 2003; Sisto A. et al., 2009) και κατά την οποία λαμβάνει χώρα η ενίσχυση του γονιδίου “*tuf*”. Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακού βάρους 100bp Euroclone (Euroclone, Milan, Italy), με τις ζώνες βάσεων: $b_1=1000\text{bp}$, $b_2=900\text{bp}$, $b_3=800\text{bp}$, $b_4=700\text{bp}$, $b_5=600\text{bp}$, $b_6=400\text{bp}$, $b_7=300\text{bp}$, $b_8=200\text{bp}$, και $b_9=100\text{bp}$. Για κάθε πηκτή

ηλεκτροφόρησης πραγματοποιώντας την ανάλυση των ζωνών οι οποίες αντιπροσωπεύουν ζεύγη βάσεων (bp) με το πρόγραμμα GelDoc της Bio-Rad.

Από σύνολο 139 μοναδικών RAPD-αποτυπωμάτων λακτοβάκιλλων στα 129 από αυτά εφαρμόστηκε η ειδική-PCR (species-specific) τεχνική ενίσχυσης του γονιδίου “tuf”. Από το σύνολο τα 65 (46,76%) ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς σαν *L. paracasei subsp paracasei*, 21 (15.1%) ως *Lb. rhamnosus*, και 2 (1.4%) ως *Lb. rhamnosus/paracasei*.

Πιο αναλυτικά, μετά την επεξεργασία των αποτυπωμάτων ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των πηκτών (βλ. παράρτημα, Κέφ 3.1), λόγω του ότι κατά την παρουσίασαν δύο ζώνες βάσεων στις 550 bp και 200bp τα στελέχη A02, A03, A05, A06, A11, A12, A14, B01, B04, B05, C02, C08, και C12 ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *Lactobacillus paracasei*. Ακόμη τα D04, D07, D13, D14, F02, F10, G02, G10, G15, H06, I02, I06, I09, και I11. Επίσης τα I13, L10, M08, M10, M14, M16, N01, N03, N04, N05, N06, N08, N10, O06, O08, O09, O15, P01, P15, P18, R03, R12, R17, S10, T04, U03, U07, U16, X05, X07, X10, X11, X12, X14, Z01, Z02, Z04, Z06, Z15, Z17. Ακόμη τα στελέχη D03, H12, L05, L07, M01, M03, M04, M05, O2, O05, O10, O16, P05, T07, T10, T15, U01, U19, και T01 με ζώνη βάσεων στις 500bp ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *Lactobacillus rhamnosus*. Τέλος στο στέλεχος T08 ήταν αδύνατος ο ξεκάθαρος διαχωρισμός των ζωνών βάσεων και δεν μπορεί να γίνει εύκολος διαχωρισμός μεταξύ *Lactobacillus paracasei/rhamnosus*.

100 bp	Lrh	Lca	Lpa	Lpa (d)	T 1	T 4	T 7	T 8	T 10	T 15	U 1	U 3	U 5	U 7	U 8	U 9	U 12	U 16	100 bp
-	Lrh	ca sei	Lpa	Lrh	Lpa	Lrh	Lrh ?	<i>Lb. rhamnosus</i>			Lpa	-	Lpa	-	-	-	Lpa	-	



Εικόνα 3.7: Παράδειγμα εφαρμογής multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

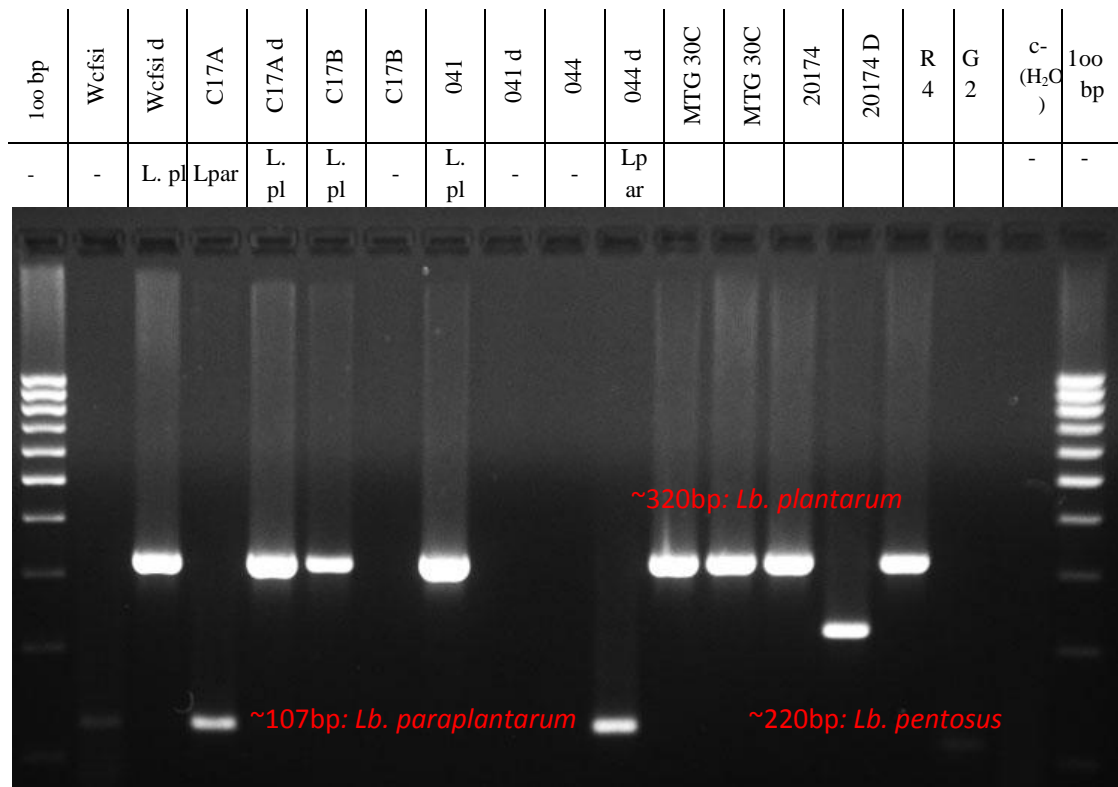
Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3.7) συνοψίζει τον αριθμό των στελεχών που ταυτοποιήθηκαν από κάθε είδος του *Lb. casei* group, από κάθε δείγμα τυριού.

Πίνακας 3.7: Αριθμός στελεχών που ταυτοποιήθηκε ανά είδος βακτηρίου

Δείγμα τυριού	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
A	-	7	-
B	-	3	-
C	-	3	-
D	-	4	1
E	-	-	-
F	-	2	-
G	-	3	-
H	-	1	1
I	-	5	1
L	-	1	2
M	-	4	6
N	1	7	-
O	-	4	4
P	-	3	1
R	-	3	-
S	-	1	-
T	-	1	2 (& 2 <i>Lb. rh/pa</i>)
U	-	3	2
X	-	6	-
Z	-	6	-

3.4.2.2. Ταυτοποίηση δυνητικών στελεχών “*plantarum* group”.

Βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τροποποιημένο υπόστρωμα mMRS-BPB, στα στελέχη που απομονώθηκαν από χαρακτηριστική λεία αποικία, επίπεδης επιφάνειας, στρογγυλή γαλάζια ή λευκή με ένα μπλε σημείο στο κέντρο της εφαρμόσαμε ειδική multiplex-PCR για το «*Lactobacillus plantarum* group». Η μοριακή τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ενίσχυση του γονιδίου “*recA*” (βλ. Υλικά & Μέθοδοι). Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακού βάρους 100bp Euroclone (Euroclone, Milan, Italy), με τις ζώνες βάσεων: $b_1=1000\text{bp}$, $b_2=900\text{bp}$, $b_3=800\text{bp}$, $b_4=700\text{bp}$, $b_5=600\text{bp}$, $b_6=400\text{bp}$, $b_7=300\text{bp}$, $b_8=200\text{bp}$, και $b_9=100\text{bp}$. Για κάθε πηκτή ηλεκτροφόρησης πραγματοποιώντας την ανάλυση των ζωνών οι οποίες αντιπροσωπεύουν ζεύγη βάσεων (bp) με το πρόγραμμα GelDoc της Bio-Rad. Αν και η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 32 στελέχη σε σύνολο 140 μοναδικών αποτυπωμάτων γαλακτοβακίλλων, μόλις 1 (**R04**) κατάφερε να ενισχυθεί και να ταυτοποιηθεί επιτυχώς σαν *Lb. plantarum subsp plantarum*, με ζώνη βάσεων στις 320bp.

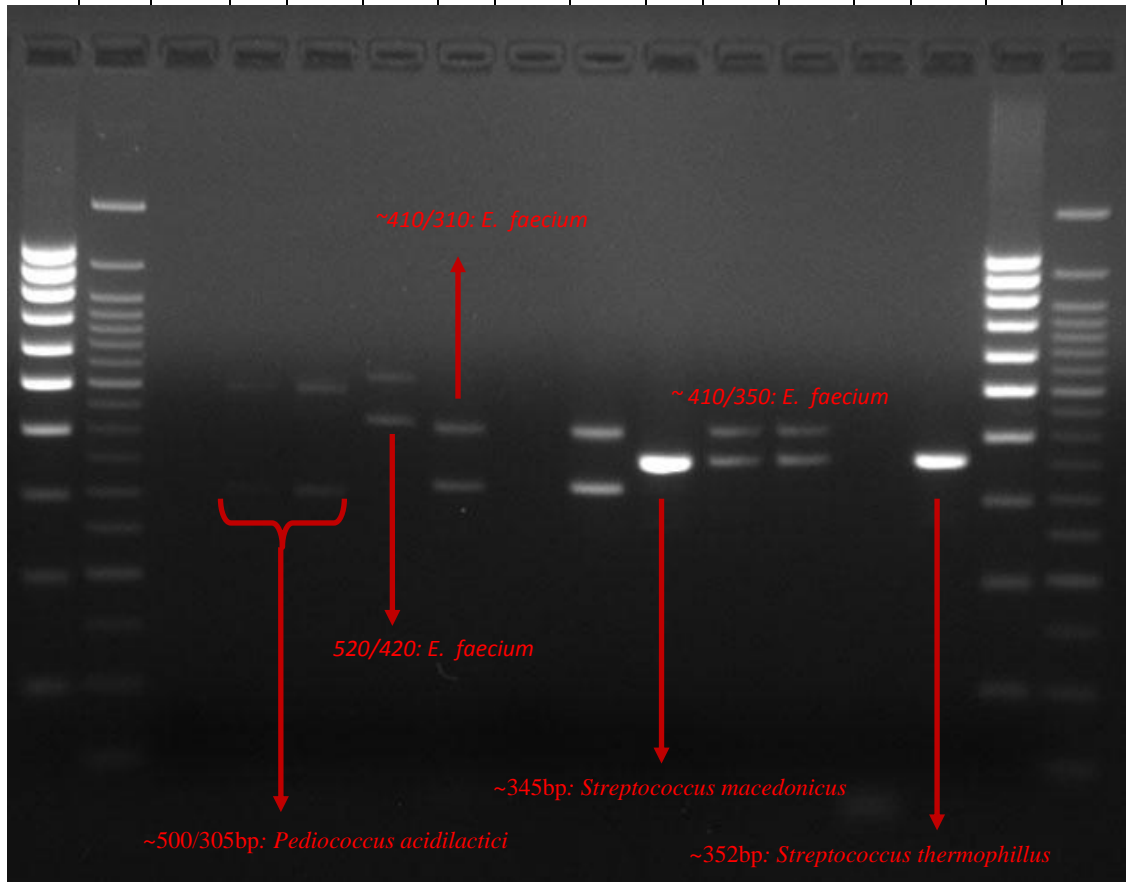


Εικόνα 3.8.: Παράδειγμα εφαρμογής multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “recA”

3.4.2.3. Ταυτοποίηση δυνητικών στρεπτοκόκκων (ITS-PCR).

Στη μελέτη των Moschetti et al., (1998) η περιοριστική ανάλυση του πολυμορφισμού της περιοχής που αναφέρεται ως «Ενδογονιδιακή-ISR» αποδείχθηκε ως έγκυρη μέθοδος για το διαχωρισμό των στελεχών μεταξύ του γένους *Streptococcus*. Η μοριακή αυτή τεχνική εφαρμόστηκε σε σύνολο 35 απομονωθέντες κόκκους ποικίλων μορφολογιών κυττάρου και αποικίας. Παρ’ όλο λοιπόν που εφαρμόστηκε δεν κατάφεραν να δώσουν αποτελέσματα όλα τα στελέχη, και έτσι τα υπόλοιπα ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση και ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακού βάρους 100bp Euroclone (Euroclone, Milan, Italy), με τις ζώνες βάσεων: $b_1=1000\text{bp}$, $b_2=900\text{bp}$, $b_3=800\text{bp}$, $b_4=700\text{bp}$, $b_5=600\text{bp}$, $b_6=400\text{bp}$, $b_7=300\text{bp}$, $b_8=200\text{bp}$, και $b_9=100\text{bp}$.

100	50	H	P	U	F	E	U	E	P	G	G	C	L	100	50
bp	bp	16	4	14	8	12	11	3	2	1	11	5	12	bp	bp



Εικόνα 3.9: Παράδειγμα Πηκτή ηλεκτροφόρησης για ταυτοποίηση ITS-PCR

Έτσι λοιπόν για κάθε πηκτή ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ζωνών (βλ. Παράρτημα) οι οποίες αντιπροσωπεύουν ζεύγη βάσεων (bp) με το πρόγραμμα GelDoc της Bio-Rad. Για όσα στελέχη ανταποκρίνονται στα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου, τα ταυτοποιούμε, ενώ τα υπόλοιπα αν είναι εφικτό τα ομαδοποιούμε. Από κάθε ομάδα που προκύπτει επιλέγουμε το στέλεχος του οποίου το DNA είχε καλύτερη συγκέντρωση και ποιότητα, προς ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Για όσα δεν ενισχύονται με την ITS-PCR, και δεν ταυτοποιούνται από μόνα τους, ή δεν κατατάσσονται σε οποιαδήποτε ομάδα, προχωράμε σε αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Επιλέγεται το στέλεχος με τις καλύτερες τιμές συγκέντρωσης και ποιότητας DNA. Αν και η μοριακή τεχνική RAPD-PCR διαφοροποιεί εν μέρει τις απομονώσεις του δείγματος E, η ITS-PCR τα ομαδοποιεί, λόγω όμοιων ζευγών βάσεων.

Το στέλεχος E03 (ομάδα F), λόγω του ότι δεν έδωσε ακριβή αριθμό ζευγών βάσεων ταυτοποιήσιμο με γνωστά στελέχη στρεπτόκοκκων, και οι ζώνες βάσεων που έδωσε ήταν μεταξύ *E. faecium* και *E. faecalis* χαρακτηρίστηκε σαν *Enterococcus spp.* Το στέλεχος E12, χαρακτηρίστηκε σαν *E. faecium*. Το L12 ταυτοποιήθηκε σαν *Streptococcus thermophilus*

Όπως προκύπτει από το δενδρόγραμμα των κόκκων με τον primer coc-1 τα στελέχη A9 και S13 είναι όμοια κατά 100%, με όμοιο αποτύπωμα. Επίσης το X03 πλησιάζει με αυτά τα RAPD-προφίλ με ομοιότητα 95%. Έτσι λοιπόν πραγματοποιώντας

16SrRNA sequencing-PCR σε ένα από τα τρία (S13) ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *P. pentosaceus*. Τα F12, και E09 ταυτοποιήθηκαν με συνδυασμό 16S rRNA και ITS-PCR σαν *E. faecium*. Επίσης 15 στελέχη (F21, E02, E04, E05, E08, E10, E13, E14, E15, F07, F08, F13, F15, G01) ταυτοποιήθηκαν με συνδυασμό ITS-PCR και RAPD.

Πίνακας 3.8: Ομαδοποίηση στελεχών μέσω αποτελεσμάτων της ITS-PCR.

Απομονωθέν στέλεχος	Band 1 (bp)	Band 2 (bp)	Ομαδοποίηση
E09	527	428	530bp + 440bp A
E13	534	437	
E14	531	432	
E08	539	437	
E02	547	444	
E05	544	442	
E10	537	440	
E15	539	438	
F07	544	441	
F06	No	No	
C15	516	323	520bp + 320bp B
F21	519	318	
X02	427	370	~430bp + 370bp Γ
F09	No	No	16s
H16	No	No	16s
P04	502	305	500bp + 300bp Δ
U14	492	305	
X15	504	303	
F08	521	423	520bp + 420bp E
F13	519	414	
F15	512	412	
F12	520	420	
E12	407	310	16s
E03	402	309	16s
U11	No	No	16s
P02	345	No	-
L12	352	No	16S
G01	403	352	405bp + 350bp Z
G11	408	354	
C05	No	No	16s
I01	No	No	16s
S13	No	No	16s
E01	No	No	16s
A09	No	No	16s
X03	No	No	16s

Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα της ITS-PCR (Πίνακας 3.8) τα στελέχη E02, E05, E08, E09, E10, E13, E14, E15 και F07 έδειξαν τις ίδιες ζώνες βάσεων στις 530/440 bp (ομάδα A). Τα στελέχη C15 και F21 στις 520/320bp (ομάδα B). Το X02 στέλεχος αν και ενισχύεται με 430/370 bp δεν καταφέρνει να ταυτοποιηθεί με οποιαδήποτε από

τα γνωστά στελέχη του πρωτοκόλλου, και έτσι ενισχύεται το γονίδιο 16SrRNA. Επίσης τα στελέχη P04, U14, και X15 με 500/300bp ομαδοποιούνται (ομάδα Δ). Τα στελέχη F08, F13, F15, F12 με 520/420bp ομαδοποιούνται (ομάδα Ε). Τέλος ομαδοποιούνται τα G01 και G11 με 405/350bp (ομάδα Ζ). Έτσι από την ομάδα Α επιλέγουμε λόγω καλύτερων τιμών συγκέντρωσης και ποιότητας DNA επιλέγεται το στέλεχος E09, από την Β το C15, από την Δ το P04 και U14 για επαλήθευση της μεθόδου, από την Η το G01. Ακόμη ενισχύεται το ίδιο γονίδιο για F06, E01, H16, I01, U11, C05, S13, και P02.

3.4.2.4. Ταυτοποίηση στελεχών με ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου του 16S rRNA.

Συνολικά σαράντα-τρία (43) αντιπροσωπευτικά απομονωθέντα στελέχη τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν με καμία από τις παραπάνω μεθόδους, αλλά διαχωρίστηκαν με την RAPD-PCR οδηγήθηκαν σε 16SrRNA sequencing-PCR. Σχεδόν όλα τα στελέχη κατά τον έλεγχο της ποιότητας της ενίσχυσης ύστερα από τον καθαρισμό τους (rapid purification, βλ. Y&M) έδειξαν 1200-1500bp (1.5-kb) (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Μετά την εφαρμογή της εφαρμογής της μοριακής τεχνικής αυτής και τον καθαρισμό του καθαρισμένου περιεχομένου, αυτό στάλθηκε σε άλλο εξωτερικό εργαστήριο για την αλληλουχία των βάσεων. Οι αλληλουχίες καταδειχθήσαν με τη μεγαλύτερη διαθέσιμη ταυτοποίηση (96-99% με άλλα στελέχη της βάσης δεδομένων) μέσω του προγράμματος «**The Ribosomal Database Project**» (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), και τα στελέχη ανήκαν στα γένη *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, and *Lactococcus* της GenBank (Cole, J. R., και συν 2009). Παρακάτω παρουσιάζεται δενδρόγραμμα το οποίο πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Crystal W», οποίο συνδέει τα στελέχη με την αλληλουχία των βάσεων τους.

Από σύνολο 140 λακτοβακίλλων, σε 26 (18.5%) από τα στελέχη οι οποίοι έδειξαν διαφορετικά RAPD-αποτυπώματα εφαρμόστηκε η τεχνική ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA. Επίσης ένα ταυτοποιήθηκε και επιβεβαιώθηκε με συνδυασμό της τεχνικής αυτής και με multiplex-PCR.

Η PCR τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στα ακόλουθα λακτοβακίλλικα στελέχη: B10, B13, D01, D10, F05, F17, F19, G06, H08, H13, I07, L03, L08, M06, N07, N09, N12, N13, R09, U08, U12, U20, X08, X15, Z07, και Z16. Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων «Ribosomal Database» τα στελέχη B10, I07, M06 ταυτοποιήθηκαν κατά 99% σαν *Lb. parabuchneri*, B13 και X15 σαν *Lb. paracasei*, και N09 σαν *Lb. casei*. Τα D01, L03 και Z07 σαν *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*. Τα στελέχη D10, F05, G06 σαν *Lactobacillus buchneri*. Επίσης τα F17, F19, H13, L08, N07, N12, N13, R09, U08, U12, U20, και Z16 σαν *Lb. fermentum*. Τέλος το στέλεχος H08 ταυτοποιήθηκε σαν *Lb. curvatus*, και το X08 σαν *Lb. brevis*.

Όσον αφορά τους απροσδιόριστους κόκκους, από σύνολο 35 στελέχη τα οποία έδειξαν μοναδικά RAPD-προφίλ, τα 16 (45.7%) ταυτοποιήθηκαν με την ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, και τα υπόλοιπα με συνδυασμό μοριακών

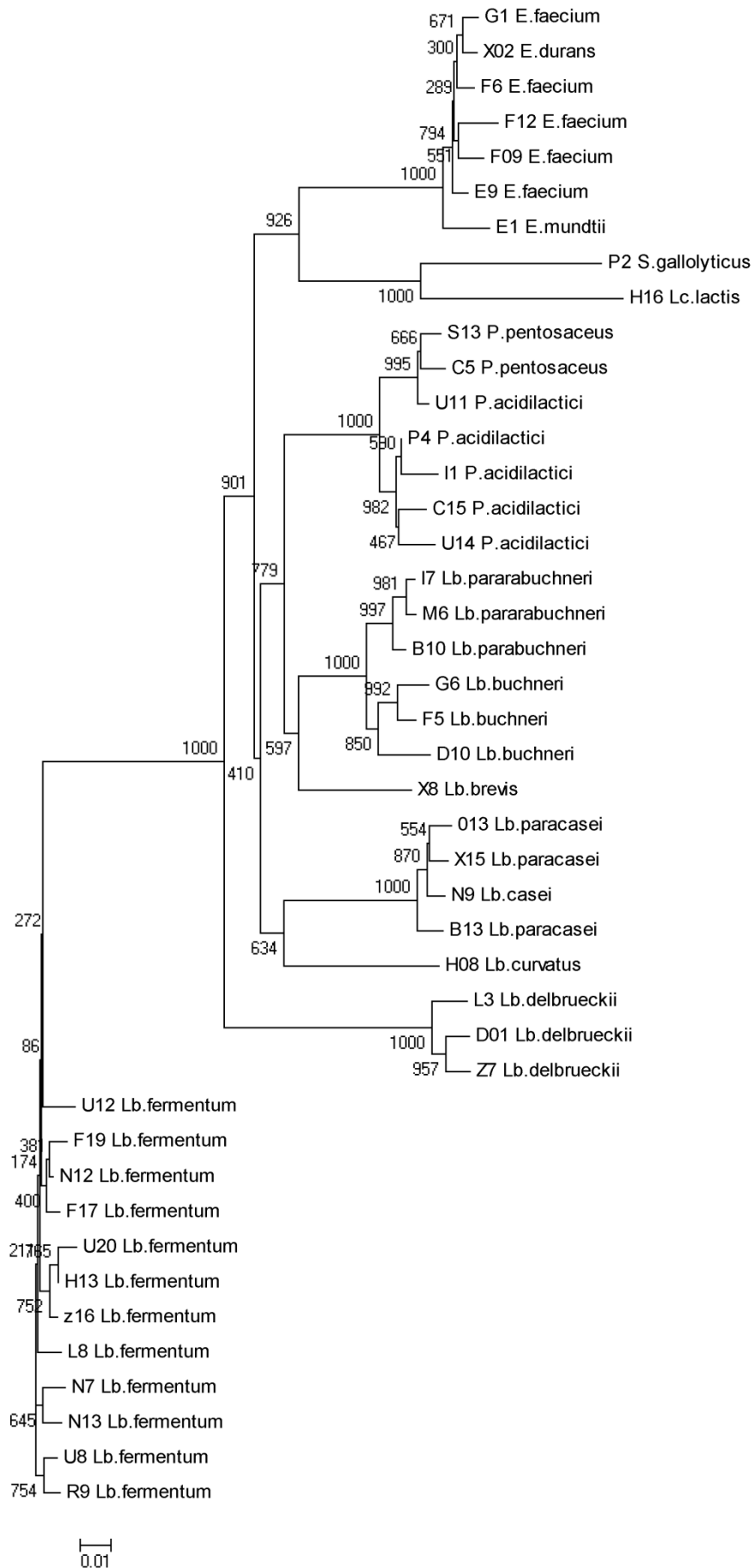
μεθόδων και αποτελεσμάτων. Έτσι λοιπόν το στέλεχος X02 ταυτοποιήθηκε σαν *Enterococcus durans*, F09, F06 και F12 σαν *E. Faecium*. Επίσης τα E09, G01, σαν *E. faecium*, το E01 σαν *E. mundtii*. Το H16 σαν *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Το C15, I01, P04, U11, U14 σαν *P. acidilactici*, και τα C05, S13 σαν *P. pentosaceus*. Το P02 σαν *Streptococcus macedonicus*. Τέλος όσοι από τους κόκκους είχαν ομαδοποιηθεί, λόγω ομοιότητας στις ζώνες βάσεων, χαρακτηρίστηκαν με το ταυτοποιηθέν στέλεχος της 16S rRNA sequencing-PCR.

Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3.9) συνοψίζει τον αριθμό των στελεχών που ταυτοποιήθηκαν με αυτή τη μέθοδο. Όπως παρατηρούμε στα δυο Caciocavallo Lucano δείγματα A και T, όπως και στο Cacio Bucato (O), δεν ταυτοποιήθηκαν καθόλου στελέχη με αυτή τη μοριακή τεχνική. Όσον αφορά τα υπόλοιπα τουλάχιστον ένα ταυτοποιήθηκε από κάθε δείγμα, με μέγιστο τα 4 στα δείγματα F, U και N. Τρία στελέχη ταυτοποιήθηκαν με ενίσχυση και αλληλούχηση του γονιδίου του 16S rRNA στο Pecorino Filiano, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν δυο από τις απομονώσεις.

Πίνακας 3.9 Αριθμός ειδών από κάθε δείγμα που ταυτοποιήθηκαν με 16SrRNA seq-PCR.

Δείγμα τυριού	Είδος 1	Είδος 2	Είδος 3
A	-	-	-
B	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. paracasei</i>	-
C	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	-
D	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. buchneri</i>	-
E	<i>E. faecium</i>	<i>E. mundtii</i>	-
F	<i>Lb. buchneri</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Lb. fermentum</i> (x2)
G	<i>Lb. buchneri</i>	<i>E. faecium</i>	-
H	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. curvatus</i>	-
I	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>P. acidilactici</i>	-
L	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. fermentum</i>	-
M	<i>Lb. parabuchneri</i>	-	-
N	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i> (x2)
O	-	-	-
P	<i>S. macedonicus</i>	<i>P. acidilactici</i>	-
R	<i>Lb. fermentum</i>	-	-
S	<i>P. pentosaceus</i>	-	-
T	-	-	-
U	<i>P. acidilactici</i> (x2)	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i> (x2)
X	<i>Lb. brevis</i>	<i>E. durans</i>	<i>Lb. paracasei</i>
Z	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. fermentum</i>	-

Τοποθετώντας τις αλληλουχίες των βάσεων στο πρόγραμμα “CrystalX 2.1” λαμβάνεται το παρακάτω δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 3). Η γραμμή μήκους υποδεικνύει 0.01% απόκλιση αλληλουχίας. Αυτό σημαίνει πως η ταυτοποίηση έγινε σε πολύ καλό ποσοστό.



Δενδρόγραμμα 3: 16S Bootstrap N-j tree, CrystalX 2.1. program.

3.4.2.5. Ταυτοποίηση στελεχών με συνδυασμό μεθόδων.

Ορισμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με συνδυασμό φαινοτυπικών και γενοτυπικών μεθόδων. Συγκεκριμένα 21 στελέχη (15%) λακτοβακίλλων ταυτοποιήθηκαν με συνδυασμό RAPD και της παραγωγής αερίου (CO₂). Τα F14, F16, F20, H01, H04, H05, H17, I05, L01, L02, L13, L15, M07, R01, R13, R15, U05, U09, U17, και Z09 λόγω του ότι πλησίαζαν μεταξύ τους στο RAPD-προφίλ, και ήταν θετικά κατά την παραγωγή CO₂, χαρακτηρίστηκαν σαν *Lactobacillus fermentum*. Το στέλεχος O13 ταυτοποιήθηκε επιτυχώς σαν *Lb. paracasei subsp paracasei* και με ενίσχυση του γονιδίου tuf, και 16S rRNA.

3.5. Κατανομή ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων ανά ποικιλία τυριού.

Ο χαρακτηρισμός του μικροβιακού πληθυσμού του τυριού, μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των αποτελεσμάτων (εμφάνιση, άρωμα, γεύση) των οικολογικών διαδικασιών τα οποία προκύπτουν από μικροβιακή αλληλεπίδραση στο τυρί και των τεχνολογικών τους χαρακτηριστικών (Randazzo et al., 2010).

Από τα δείγματα των τυριών γενικά απομονώθηκαν τόσο θερμόφιλοι, όσο και μεσόφιλλοι κόκκοι, και βάκιλλοι. Αν και Ιταλικά τυριά από πρόβειο γάλα χρησιμοποιούν θερμόφιλες οξυγαλακτικές εναρκτήριες καλλιέργειες, ετερογενή NSLAB αποτελούν ένα μεγάλο μέρος της ενδογενής χλωρίδας της μικροβιακής κοινότητας (De Angelis et al., 2001). Από κάθε ποικιλία ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς το λιγότερο τρία (3) στελέχη, με μέγιστο τα είκοσι (20), και μέσο όρο τα δεκατέσσερα (14). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η επιλογή των αποικιών έγινε τυχαία (Harrigan & McCance, 1976) και από τα τρυβλία με την τελευταία μετρήσιμη αραίωση, τα στελέχη αυτά αποτελούν τους πιο μετρήσιμους και επαναλήψιμους πληθυσμούς που κυριαρχούν στα τυριά.

Η ταυτοποίηση των ειδών έδειξε ότι ο οξυγαλακτικός πληθυσμός αποτελείται κατά 48.5% (134 στελέχη) από βακτήρια του *Lactobacillus casei* group (*Lb. paracasei/rhamnosus*). Τα άλλα ταυτοποιηθέντα ανήκουν σε άλλα είδη γαλακτοβάκιλλων, και κόκκων (Πίνακας 3.10). Όσον αφορά τα pasta-filata τυριά, τα περισσότερα στελέχη ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς σαν *Lactobacillus paracasei* και *Lb. rhamnosus*. Συγκεκριμένα 11 στελέχη από τα 216 ταυτοποιήθηκαν ως *Enterococcus faecium* (5.1%), 4 ως *Lactobacillus buchneri* (1.85), 1 ως *Lb. curvatus* (0.5%), 13 ως *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii* (6.0%), 48 ως *Lb. fermentum* (22.22%), 13 ως *Lb. parabuchneri* (6.0%), 78 ως *Lb. paracasei* (36.1%), 30 ως *Lb. rhamnosus* (13.9%), 2 ως *Lb. spp* (Lspp), 3 ως *Lactococcus lactis* (Lcl), 1 ως *Lb. casei* (Lca), 1 ως *Lb. plantarum* (0.5%), 4 ως *Lb. rhamnosus/paracasei* (1.8%), 5 ως *Pediococcus acidilactici* (2.3%), 1 ως *P. pentosaceus* (0.5%), και 1 ως *Streptococcus thermophilus* (0.5%). Όσον αφορά τη σύσταση των 'pecorino' τυριών (από 60 ταυτοποιήσεις) 1 (1.66%) ήταν *Enterococcus durans*, 13 (21.66%) *E. faecium*, 1 (1.66%) *E. faecium/faecalis*, 1 (1.66%) *E. mundtii*, 1 (1.66%) *Lactobacillus brevis*, 19 (31.66%) *Lb. paracasei*, 6 (10%) *Lb. rhamnosus*, 11 (18.33%) *Pediococcus acidilactici*, 6 (10%) *P. pentosaceus*, και 1 (1.66%) *Streptococcus macedonicus*. Στη βιβλιογραφία

αναφέρεται πως οι *Lactobacillus parabuchneri* είναι ένα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικό οξυγαλακτικό βακτήριο που απομονώνεται περιστασιακά από διάφορα τυριά. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ποικιλίες τυριών από νοπό γάλα όπως τα pecorino, έχει αποδειχτεί πως ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με τα ίδια τυριά από παστεριωμένο γάλα, στα οποία προστίθενται καλλιέργειες εκκίνησης (McSweeney et al. 1993), η αιτία του φαινομένου όμως παραμένει ανερμήνευτη. Αναφέρεται πως η σχετική αφθονία ορισμένων ειδών και ειδικότερα η ετερογένεια των NSLAB στελεχών στο τυρί, καθορίζει ίσως τις σχέσεις μεταξύ των NSLAB και της γεύσης τους (De Angelis et al., 2001).

Πίνακας 3.10: Αριθμός ειδών που απομονώθηκαν από κάθε είδος τυριού.

	mMRS count	Edu	Efa	Emu	Esp	Lbr	Lbu	Lca	Lcl	Lcu	Lde	Lfe	Lpa	Lpb	Lpl	Lrh	Lrp	Lspp	Pac	Ppe	Sma	Sth	Σύνολο
PECM_A_6 (S)	4.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3
PEPA_C_11 (P)	6.97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	6	0	0	2	0	1	0	16
PEPF_H_3 (X)	7.41	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	3	0	0	0	13
PEPL_B_3.5 (E)	5.66	0	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
PFCEB_C_5 (O)	7.34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	10	0	0	0	0	0	0	16
PFCL_C_4.5 (N)	7.33	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	16
PFCL_C_7 (M)	6.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	1	0	5	0	0	0	0	0	0	12
PFCL_E_3 (T)	7.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	4	0	0	0	0	0	9
PFCL_F_1 (A)	8.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	2	0	1	0	0	12
PFCL_F_2 (B)	8.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10	0	0	0	1	0	0	0	0	15
PFCL_G_2 (Z)	7.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16
PFCL_I_2 (L)	7.63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	2	0	0	2	0	0	0	0	0	1	13
PFCL_I_3 (H)	8.51	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	6	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	13
PFCL_I_6 (I)	6.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	2	0	1	0	0	1	0	0	0	13
PFCEP_B_5 (F)	4.70	0	7	0	0	0	1	0	0	0	1	4	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	20
PFCEU_D_3 (U)	7.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	5	0	0	2	0	0	2	0	0	0	20
PFCEG_B_6 (G)	5.71	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
PFCEC_F_2.5 (C)	5.89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	9	1	0	0	13
PFCEC_C_3 (R)	7.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	16
PFCEC_F_1 (D)	8.28	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0	4	0	0	3	0	0	0	0	0	0	14
Σύνολο	-	1	24	1	1	1	4	1	3	1	14	47	96	12	1	36	4	4	16	7	1	1	276

Η ετικετοποίηση των δειγμάτων προέρχεται από τα ακόλουθα: τα πρώτα δύο γράμματα αντιπροσωπεύουν την ποικιλία, pasta-filata (PF), ή pecorino cheese (PE).

Το αμέσως επόμενο γράμμα δείχνει το είδος του τυριού όπως ακολούθως: Caciocavallo Lucano (CL), Provolone (P), Scamorza (S), Pecorino Lucano (PL), Caciocavallo Podolico (CP), Provolone semipicante (PS), Cacio Bucato, (CB), Pecorino Abriola (PA), Canestrato di Moliterno (CM), Caciocavallo Silano (CS), Pecorino Filiano (PF).

Το τελευταίο γράμμα είναι χαρακτηριστικό για τον εκάστοτε παραγωγό (A-F).

Τέλος ο αριθμός που συνοδεύει τον κωδικό στο τέλος υποδεικνύει του μήνες ωρίμανσης των τυριών.

Edu: *Enterococcus durans*, **Efa:** *Enterococcus faecium*, **Emu:** *E. mundtii*, **Esp:** *Enterococcus spp.*,

Lbu: *Lactobacillus buchneri*; **Lca:** *Lb. casei*, **Lcl:** *Lactococcus lactis subsp lactis*; **Lde:** *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii*; **Lfe:** *Lb. fermentum*, **Lcu:** *Lb. curvatus*, **Lpa:** *Lb. paracasei*; **Lpb:** *Lb. parabuchneri*; **Lpl:** *Lb. plantarum*; **Lrh:** *Lb. rhamnosus*; **Lrp:** *Lb. rhamnosus/paracasei*, **Pac:** *Pediococcus acidilactici*; **Ppe:** *P. pentosaceus*

Γενικά η μικροχλωρίδα που χαρακτηρίστηκε στα δείγματα τυριού, ήταν ποικίλα σε διάφορα δείγματα. Ο χρόνος ωρίμανσης λόγω του ότι επηρεάζει το περιβάλλον του τυριού και αλλάζει παραμέτρους όπως η υγρασία, η συγκέντρωση του άλατος, το pH, και το ολικό στερεό περιεχόμενο, παίζει ρόλο στην βιοποικιλότητα, και ποικιλομορφία των οξυγαλακτικών που θα αναπτυχθούν και τελικά θα επικρατήσουν.

3.5.1. Κατανομή ειδών LAB στις ποικιλίες 'pasta-filata'.

Οι περισσότερες ποικιλίες του είδους pasta-filata αποτελούνταν από μικροχλωρίδα μεγάλης ποικιλότητας. Όπως παρατηρούμε από τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.11) απομονώθηκαν τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη, με εξαίρεση το δείγμα B (Caciocavallo Lucano, 2 μηνών). Επίσης το είδος *Lb. paracasei* απομονώθηκε από όλα τα δείγματα. Τέλος σε 4 δείγματα (F, G, H και I) ταυτοποιήθηκαν 5 διαφορετικά είδη.

Πίνακας 3.11: Διαφορετικά είδη που απομονώθηκαν από κάθε pasta-filata τυρί.

Δείγμα τυριού	Είδος 1	Είδος 2	Είδος 3	Είδος 4	Είδος 5
CL-A	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. spp</i>	<i>P. pentosaceus</i>	-	-
CL-B	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	-	-	-
P-C	<i>Lb. paracasei</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	-	-
S-D	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. buchneri</i>	-
CP-F	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. acidilactici</i>
Ps-G	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. buchneri</i>	<i>E. faecium</i>	-	-
CL-H	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lc. Lactis subsp lactis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
CL-I	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
CH-L	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	-
CH-M	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	-
CH-N	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. casei</i>	-
CB-O	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-	-
S-R	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	-	-
CL-T	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei/rhamnosus</i>	-	-
CS-U	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	-
CL-Z	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	-	-

Δείγμα τυριού: Το πρώτο γράμμα υποδηλώνει το είδος της ποικιλίας του τυριού, και το δεύτερο γράμμα την αρχική κωδικοποίηση του δείγματος.

CL: Caciocavallo Lucano; **CP:** caciocavallo Podolico; **CS:** Caciocavallo Silano; **CB:** Cacio Bucato; **P:** Provolone; **Ps** Provolone semipicante; **S:** Scamorza;

Από το Caciocavallo Lucano «dolce», 1 μήνα ωρίμανσης (**δείγμα Α**), από συνολικά 15 απομονώσεις, 3 στελέχη δεν κατάφεραν να ενισχυθούν κατά την εφαρμογή της RAPD-PCR. Από τα υπόλοιπα 12 είχαμε 9 διαφορετικά προφίλς (βλέπε παράρτημα «Δενδρόγραμμα δείγμα Α»). Εννέα από τα στελέχη (75%) ταυτοποιήθηκαν είτε με multiplex, είτε μέσω των όμοιων rapd αποτυπωμάτων ως *Lactobacillus paracasei* (Lpa), 1 (8.33%) ως *Pediococcus pentosaceus* (Pre), και 2 (17%) ως *Lb. spp* (Lspp). Έτσι λοιπόν από το όλο τον πληθυσμό που καταφέρνει να επιβιώσει από τη μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό $6.2 \log_{10} \text{cfu/g}$ αποτελούνται από *Lb. paracasei*. Τα αποτελέσματα πλησιάζουν με εκείνα των Gobbetti et al, (2002) πάνω στη μελέτη σε πλήρες ώριμο «Caciocavallo Pugliese», οι οποίοι αναφέρουν την απομόνωση 7 βιοτύπων *Pediococcus pentosaceus*, σαν μέρος της NSLAB χλωρίδας. Στο pasta-filata «Provola dei Nebrodi» (Cronin et al., 2007), το οποίο είναι τύπου Caciocavallo, από έξι δείγματα τυριού, βρέθηκαν 3 στελέχη *Lb. casei*, και *Pe. pentosaceus*.

Από έναν ίδιο τύπο τυριού και από τον ίδιο παραγωγό, αλλά 2 με 2.5 μήνες ωριμασμένο (**δείγμα Β**), από τα 15 στελέχη που απομονώθηκαν, μόνο 5 έδειξαν διαφορετικά RAPD αποτυπώματα. Έτσι 4 (26.7%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus paracasei* (Lpa), 10 (66.7%) ως *Lb. parabuchneri* (Lpb), και 1 (6.7%) ως *Lb. spp* (Lspp) διότι δεν καθέστη δυνατός ο πλήρης διαχωρισμός του και η κατάταξη του σε είδος. Έτσι προκύπτει πως οι $5.3 \log_{10} \text{cfu/g}$ από το σύνολο που επιβιώνει από τη μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό ήταν *Lb. parabuchneri*. Τα αποτελέσματα αυτά ταιριάζουν με εκείνα των Gobbetti et al. (2002) οι οποίοι αναφέρουν την παρουσία μεσόφιλων λακτοβάκιλλων όπως οι *L. parabuchneri* και *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* να αποτελούν την οξυγαλακτική NSLAB χλωρίδα στο επώνυμο Caciocavallo Pugliese αποτελώντας συνολικά το 76% (29&47%) και 95% (60.5&34.7%), τη 42^η και 60^η ημέρα ωρίμανσης αντίστοιχα. Επίσης στο επώνυμο της 42^{ης} ημέρας απομονώθηκε και το είδος *Ped. Pentosaceus*.

Από τον παραγωγό “Tripialdi” συλλέχτηκαν τρία «Caciocavallo Lucano dolce» τυριά διαφορετικών χρόνων ωρίμανσης. Από το αντίστοιχο 3 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα Η**) από σύνολο 17 απομονώσεις, δυστυχώς πέντε δεν κατάφεραν να επιβιώσουν περαιτέρω. Από τα υπόλοιπα λήφθησαν 7 διαφορετικά RAPD-προφίλ (β. παράρτημα). Έτσι λοιπόν ταυτοποιήθηκαν είτε μέσω της ομοιότητας στο δενδρόγραμμα, είτε με μοριακές μεθόδους, 3 (23.1%) σαν *Lactococcus lactis subsp lactis* (Lcl), 1 (7.7%) σαν *Lactobacillus curvatus* (Lcu), 6 (46.1%) σαν *Lb. fermentum* (Lfe), 1 (7.7%) σαν *Lb. paracasei* (Lpa), και 2 (15.4%) σαν *Lb. rhamnosus* (Lrh). Προκύπτει λοιπόν πως από το σύνολο που επιβιώνει κατά τη μεταχείριση σε γαστρικό υγρό περίπου 10^4 cfu/g ήταν *Lb. fermentum*. Ένα στέλεχος δεν κατάφερε να αναπτυχθεί σε APT broth pH 6.8, από σύνολο 15 απομονωθέντα στελέχη από ένα «Caciocavallo Lucano dolce», 6 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα Ι**), το οποίο προέρχεται από τον ίδιο παραγωγό (I). Από τα υπόλοιπα 14, ένα δεν κατάφερε να ενισχυθεί κατά την RAPD-PCR, και τα υπόλοιπα εμφάνισαν δέκα μοναδικά προφίλ (βλ. παράρτημα). Αξίζει να σημειωθεί πως το PI05 προφίλ ήταν όμοιο (βλ. Δενδρόγραμμα 1) με το PH13. Σαν αποτέλεσμα, 2 (15.4%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Lactobacillus fermentum* (Lfe), 7 (53.8%) σαν *Lb. paracasei* (Lpa), 2 (15.4) σαν *Lb. parabuchneri* (Lpb), 1 (7.7%) σαν *Lb. rhamnosus* (Lrh), και 1 (7.7%) as *Pediococcus acidilactici* (Pac).

Πληθυσμός περίπου 10^4 cfu/g αποτελούμενος από *Lb. paracasei* αποτελεί την επικρατούσα χλωρίδα που επιβιώνει κατά τη μεταχείριση με γαστρικό υγρό. Από την ίδια ποικιλία και τον ίδιο παραγωγό (**δείγμα L**), αλλά δύο μηνών ωρίμανσης από σύνολο 15 απομονώσεις δυστυχώς δυο δεν κατάφεραν να επιβιώσουν, και τα υπόλοιπα 13 έδειξαν 11 μοναδικά RAPD-αποτυπώματα. Με συνδυασμό μεθόδων ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 1 (7.7%) στέλεχος *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii* (Lde), 7 (53.8%) σαν *Lb. fermentum* (Lfe), 2 (15.4%) σαν *Lb. paracasei* (Lpa), 2 (15.4%) σαν *Lb. rhamnosus*, και 1 (7.7%) σαν *Streptococcus thermophilus* (Sth). Περίπου $4.1 \log_{10}$ cfu/g αποτελούνται από *Lb. fermentum* από σύνολο 7.6 λογαρίθμους μικροοργανισμών που επιβιώνουν κατά τη μεταχείριση με γαστρικό υγρό. Το είδος *S. thermophilus* πιθανόν να προέρχεται από το περιβάλλον του τυροκομείου, όπως συμβαίνει και σε Δανέζικα τυριά από νωπό γάλα (Masaud et al., 2011) Το θερμόφιλο είδος *S. thermophilus*, το οποίο όχι μόνο επιβιώνει κατά το ψήσιμο του τυροπήγματος, αλλά ενισχύεται και η ανάπτυξη του κάτω από αυτή τη διαδικασία, αλλά παραμένει ως επικρατές στα ψημένα και απολακτισμένα φρέσκα τυριά. Τα αποτελέσματα αυτά πλησιάζουν με εκείνα των Randazzo και συν. (2002), πάνω στο παραδοσιακό Σικελικό «Ragusano» τυρί, οι οποίοι χρησιμοποίησαν τεχνικές ανεξάρτητες καλλιέργειας (DGGE) και βρήκαν πως στην μικροβιακή κοινότητα κυριαρχούσαν στελέχη *Lactobacillus delbrueckii* και *Lb. fermentum*.

Συλλέχτηκαν από έναν άλλο παραγωγό “PaceBio (C)” δυο ακόμα ποικιλίες «Caciocavallo Lucano dolce» τυριών. Από το επώνυμο τυρί, 7 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα M**), 3 από τα 15 απομονωθέντα στελέχη, τα οποία φαινοτυπικά πιθανώς να ήταν πεδιόκοκκοι, αποδείχτηκαν $cat^{(+)}$. Έντεκα RAPD-προφίλ λήφθηκαν κατά την PCR μέθοδο. Συνολικά 1 (8.33%) χαρακτηρίστηκε σαν *Lactobacillus fermentum* (Lfe), 5 (41.6%) as *Lb. paracasei* (Lpa), 5 (41.6%) as *Lb. rhamnosus* (Lrh), και στο τελευταίο (8.34%) ως *Lb. parabuchneri* (Lpb). Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε πως ο πληθυσμός που επιβιώνει αποτελείται από *Lb. paracasei/rhamnosus* με ίδιους πληθυσμούς (~2.5 λογαρίθμους). Από το δεύτερο επώνυμο (CLd), 4.5 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα N**), συνολικά απομονώθηκαν 16 στελέχη, εκ τα οποία λήφθησαν τα παρακάτω μοναδικά αποτυπώματα. Όλα τα στελέχη όπως προέκυψε ήταν $cat^{(-)}$ γαλακτοβάκιλλοι, ενώ σε αυτό το δείγμα δεν βρέθηκαν κόκκοι. Συνδυάζοντας μοριακές τεχνικές 1 (6.25%) από τα στελέχη ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus casei* (Lca), 6 (37.5%) σαν *Lb. fermentum* (Lfe), 8 (50%) σαν *Lb. paracasei* (Lpa), και 1 (6.25%) σαν *Lb. rhamnosus* (Lrh). Ο πληθυσμός του *Lb. paracasei* συμβάλλει κατά 3.6 λογαρίθμους στον συνολικό πληθυσμό που επιβιώνει κατά τη μεταχείριση σε γαστρικό υγρό. Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε πως και από τις δυο ποικιλίες όλα τα στελέχη προέρχονται από την NSLAB δευτερογενή μικροχλωρίδα. Επίσης μπορούμε ξεκάθαρα να παρατηρήσουμε πως το ποσοστό των ετεροζυμωτικών λακτοβάκιλλων (*Lb. fermentum*; *Lb. paracasei*) ήταν υψηλότερο στο δείγμα τυριού με μέση περίοδο ωρίμανσης (δείγμα N). Όπως και σε άλλες μελέτες (Corsetti et al., 2001; Coppola et al., 2003; Piraino et al., 2005) το τελικό προϊόν χαρακτηρίζεται κυρίως από τα μεσόφιλα μη-εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus plantarum*, *Lb. paracasei*, και *L. fermentum*. Τα είδη *Lactobacillus casei*, *Lb. casei subsp. pseudoplantarum* και *Lb. rhamnosus* κυριαρχούν στο Parmigiano Reggiano

(Gobbeti et al., 2002) από αγελαδινό γάλα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση του.

Από 3 μηνών ωρίμανσης «Caciocavallo Lucano dolce» (δείγμα T), από τον παραγωγό Posticchia (E) από 15 απομονώσεις, 6 ήταν cat⁽⁺⁾, και πιθανώς φαινοτυπικά να ήταν πεδιόκοκκοι, οι οποίοι μερικές φορές είναι ψευδό-cat⁽⁺⁾. Παρέμειναν έξι μοναδικά RAPD-PCR προφίλ. Συνοψίζοντας 1 (11.11%) ταυτοποιήθηκε σαν *Lactobacillus paracasei* (Lpa), 4 (44.44%) σαν *Lb. rhamnosus*, και 4 (44.44%) τα οποία ανήκαν στο *Lb. casei* group, δεν καθέστη πιθανή η διάκριση ανάμεσα στα είδη *Lb. rhamnosus/paracasei*, διότι δεν ήταν ξεκάθαρη η εμφάνιση των ζωνών βάσεων στο αποτύπωμα. Το τελευταίο τυρί αυτής της ποικιλίας (CLd), 2 μηνών ωρίμανσης (δείγμα Z) του παραγωγού “San Rocco” από σύνολο 16 απομονώσεων, 8 RAPD-αποτυπώματα ήταν μοναδικά. Ταυτοποιήθηκαν μέσω ομοιότητας σε προφίλ και διάφορες PCR μεθόδους: 7 (43.75%) σαν *Lactobacillus paracasei* (Lpa), 7 (43.75%) σαν *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii*, και 2 (12.5%) as *Lb. fermentum*. Και σε αυτό το δείγμα δεν απομονώθηκαν κόκκοι.

Η πιο ειδική ποικιλία caciocavallo, «Caciocavallo Podolico», από τοπικό παραγωγό (B), 5 μηνών ωρίμανσης (δείγμα F), έδειξε μεγάλη βιο-ποικιλότητα στα στελέχη που απομονώθηκαν. Συνολικά 20 απομονώσεις εκ των οποίων προέκυψαν 13 μοναδικά RAPD-προφίλ. Από το σύνολο των cat⁽⁻⁾, 11 (60%) ήταν γαλακτοβάκιλλοι, ενώ τα υπόλοιπα κόκκοι (πεδιόκοκκοι, εντερόκοκκοι). Αναλυτικά 7 (35%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Enterococcus faecium* (Efa), 2 (10%) σαν *Pediococcus acidilactici* (Pac), 1 (5%) σαν *Lactobacillus buchneri* (Lbu), 1 (5%) σαν *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii* (Lde), 4 (20%) σαν *Lb. fermentum* (Lfe), και 5 σαν (25%) *Lb. paracasei* (Lpa). Το αποτελέσματα συμφωνούν με μελέτη στο pasta-filata τυρί Provola dei Nebrodi 1.5 μήνα ωρίμανσης (Cronin et al., 2007), το οποίο έδειξε χαμηλή ποικιλότητα με την απομόνωση ειδών *L. casei* group, με το *L. delbrueckii* να ακολουθεί, και με μικρότερο ποσοστό (7%) *P. pentosaceus*, ενώ απομονώθηκαν μόλις μερικοί εντεροκόκκοι.

Τέλος, συλλέχθηκε μια άλλη ποικιλία caciocavallo, το «Caciocavallo Silano, ΠΟΠ» 3 μήνες ωρίμανσης (δείγμα U) όπου συνολικά 20 αποικίες καθαρίστηκαν. Όλα χαρακτηρίστηκαν σαν cat⁽⁻⁾, με 2 από αυτά να είναι κόκκοι, και οι υπόλοιποι γαλακτοβάκιλλοι. Δώδεκα RAPD-μοτίβα επιλέχθηκαν ως μοναδικά. Χαρακτηρίζοντας τα 2 από αυτά (10%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Pediococcus acidilactici* (Pac), 2 (10%) σαν *Lactobacillus rhamnosus* (Lrh), 5 (25%) σαν *Lb. paracasei*, και 11 (55%) σαν *Lb. fermentum* (Lfe). Έτσι λοιπόν περίπου 4 λογάριθμοί πληθυσμού *Lb. fermentum* αποτελούσαν το σύνολο των οξυγαλακτικών που επιβίωσαν κατά τη μεταχείριση σε γαστρικό υγρό. Επιπρόσθετα, 12 από αυτά (60%) βρέθηκαν CO₂⁽⁺⁾, 11 από τα οποία ήταν *Lb. fermentum* και 1 *Lb. rhamnosus*. Άλλη έρευνα (Beresford et al., 2001) στα ΠΟΠ Caciocavallo Silano τυριά δείχνει την παρουσία *L. paracasei*, *L. plantarum* και *L. fermentum*, τα οποία κατατάσσονται στα NSLAB βακτήρια. Συνολικά η μικροχλωρίδα διαφόρων ποικιλιών “Caciocavallo” σε μελέτη των Piraino et al., (2005) αποτελούταν από *L. paracasei* (25.8%), *Lac. Lactis* (20.0%), και *L. delbrueckii* (11.1%), *L. fermentum* (8.4%), *E. faecalis* (7.4%), και *L. rhamnosus* (5.8%), και 5% άλλα είδη. Από το τυρί Cheddar (Fitzsimons et al., 1999)

ήταν κυρίως *L. paracasei subsp. paracasei*, and μόλις μερικά στελέχη *L. plantarum*, *L. curvatus*, και *L. brevis*.

Από το pasta-filata τυρί «Scarmorza», ενός μήνα ωρίμανσης (δείγμα **D**) από τον παραγωγό «Salvia Maria, F», από σύνολο 15 απομονώσεων, ένα δυστυχώς δεν κατάφερε να αναπτυχθεί στο APT broth. Τα υπόλοιπα 14, όπως παρατηρούμε και από το δενδρόγραμμα για το δείγμα τυριού D (βλ. παράρτημα) έδειξαν 7 διαφορετικά RAPD-προφίλ. Έτσι λοιπόν 2 (14.29%) ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *Lactobacillus buchneri* (Lbu), 5 (35.71%) ως *Lb. delbrueckii subsp delbrueckii* (Lde), 4 (28.57%) ως *Lb. paracasei* (Lpa), και 3 (21.43%) ως *Lb. rhamnosus* (Lrh). Η ίδια ποικιλία, αλλά τριών μηνών ωρίμανσης (δείγμα **R**), και από διαφορετικό παραγωγό (PaceBio, C) δεν έδειξε σχεδόν καμία ομοιότητα με τα στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν με το άλλο δείγμα (D). Από τις συνολικά 17 απομονώσεις ένα στέλεχος ήταν cat⁽⁺⁾, και τα υπόλοιπα 16 έδειξαν έξι διαφορετικά προφίλ. Έτσι λοιπόν, 8 (50.0%) ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus fermentum* (Lfe), 7 (43.7%) ως *Lb. paracasei* (Lpa), και 1 (6.3%) ως *Lb. plantarum* (Lpl). Αξίζει να αναφερθεί πως και στα δυο τυριά ποικιλίας scarmorza δεν ταυτοποιήθηκαν κόκκοι. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τους Baruzzi et al., (2002) στην ποικιλία Scamorza Altamurana, οι οποίοι αναφέρουν την ύπαρξη *Lb. delbrueckii* στην μικροχλωρίδα του ορού, του είδους *Lb. fermentum* τόσο στον ορό, όσο και στο τυρόπηγμα και του *Lb. paracasei* με *Lb. fermentum* στο τελικό προϊόν. Μελέτη στον NSLAB πληθυσμό ενός Ιρλανδικού τυριού Cheddar, αποκάλυψε ότι αποτελείται από 55% *Lactobacillus paracasei*, 28% *Lb. plantarum*, and 14% *Lb. curvatus* (Jordan & Cogan. 1993). Λόγω του ότι η ποικιλία αυτή παρασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα, η φυσική μικροχλωρίδα του ορού παίζει κύριο ρόλο σε δυο διαφορετικά στάδια της ζύμωσης με το πρώτο να λαμβάνει χώρα κατά τη ζύμωση του ανάλατου τυροπήγατος σε θερμοκρασία δωματίου για 18 με 24 ώρες και το δεύτερο κατά τη διάρκεια μιας σύντομης ωρίμανσης σε ελεγχόμενη θερμοκρασία και υγρασία ύστερα από την έκταση και το αλάτισμα του τυροπήγατος (Baruzzi et al., 2002).

Συνεχίζοντας με τον τύπο τυριών “pasta-filata” όσον αφορά το «Provolone Lucano» 2.5 μηνών ωρίμανσης (δείγμα **C**), σε συνολικά 15 απομονώσεις που εφαρμόστηκε RAPD-PCR, 2 δεν ενισχύθηκαν, ενώ από τα υπόλοιπα 13 λήφθηκαν 5 μοναδικά προφίλ (βλ. Δενδρόγραμμα, δείγμα C). Το επικρατέστερο στέλεχος της χλωρίδας είναι ο *Pediococcus acidilactici* (Pac) με 9 (69.2%) από τα στελέχη να ταυτοποιούνται επιτυχώς, ακολουθεί ο *Lactobacillus paracasei* (Lpa) με 3 (23.1%), και τέλος 1 (7.7%) *P. pentosaceus* (Ppe). Προκύπτει πως κατά τη μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό 4.1 log₁₀cfu/g ήταν *P. acidilactici*. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους Franciosi et al., (2008) στο Puzzone di Moena. Από άλλη ποικιλία provolone το «Provolone semipicante» 6 μηνών ωρίμανσης (δείγμα **G**), από “τοπικό παραγωγό (B)”, δυστυχώς 4 από τα 15 απομονωθέντα στελέχη δεν κατάφεραν να επιβιώσουν. Έτσι λοιπόν εφαρμόστηκε η τεχνική RAPD-PCR σε 11 στελέχη, εκ των οποίων μόλις 6 έδειξαν χη που έξι μοναδικά αποτυπώματα. Αναλυτικά, η σύσταση της μικροχλωρίδας είναι 1 (9.1%) *Lactobacillus buchneri* (Lbu), 6 (54.5%) *Lb. paracasei* (Lpa) και 4 (36.4%) *Enterococcus faecium* (Efa). Προκύπτει πως κατά τη μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό 3.1 log₁₀cfu/g

ήταν *Lb. paracasei*. Στο Πορτογαλικό τυρί “*Picante da Beira Baixa*” ή απλά *Picante* (Freitas C. A. et al., 1999) 6 μηνών ωρίμανσης τα πιο άφθονα είδη που απαντώνται είναι οι εντερόκοκκοι (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis* & *E. durans*) και οι γαλακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus plantarum* και *Lb. paracasei*), με τον *E. faecium* να δείχνει τον μεγαλύτερο επιπολασμό σαν πιο πολύ μετρούμενος στο MRS agar. Σε παρόμοια μελέτη στο Provolone (Piraino et al., 2005) έδειξε ότι οι οξυγαλακτικές κοινότητες ήταν παρόμοιες με κάποιες ποικιλίες Casciocavallo τυριών.

Στην μεγάλη κατηγορία των ‘pasta-filata’ τυριών ανήκει και το «Cacio bucato», 5 μηνών ωρίμανσης (δείγμα O). Συνολικά απομονώθηκαν 16 στελέχη, τα οποία μορφολογικά ήταν όλα βάκιλλοι και έδειξαν 9 μοναδικά προφίλ (βλ. παράρτημα). Σε αυτή την ποικιλία δεν είχαμε μεγάλη ποικιλότητα, με στελέχη του *Lactobacillus casei* group να απαρτίζουν τη μικροχλωρίδα. Αναλυτικά 6 (37.5%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Lb. paracasei* (Lpa), και 10 (62.5%) σαν *Lb. rhamnosus* (Lrh). Προκύπτει πως κατά τη μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό 4.6 log₁₀cfu/g ήταν *Lb. rhamnosus*.

Συμπερασματικά για τα ‘pasta-filata’ μπορούμε να πούμε πως μικροοργανισμοί με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στα πρώιμα στάδια ωρίμανσης ήταν οι εναρκτήριες καλλιέργειες (Cogan et al., 1997). Το *Lact. delbrueckii* έχει απομονωθεί από όλα τα στάδια ωρίμανσης από Ιταλικές ποικιλίες τυριών pasta-filata (Morea et al. 1999; Gobetti et al. 2002), και προσαρμόζεται καλά στις περιβαλλοντικές συνθήκες ωρίμανσης συμμετέχοντας σε ανάπτυξη χαρακτηριστικής οσμής και γεύσης (Randazzo et al., 2002). Η επικρατούσα NSLAB χλωρίδα η οποία βρίσκεται σε διάφορους τύπους ωριμασμένων τυριών αποτελείται κυρίως από στελέχη *L. casei/paracasei* (Coueret et al., 2004; De Angelis et al., 2001). Όπως παρατηρήθηκε και από άλλες μελέτες (Corsetti et al., 2001; Coppola et al., 2003; Piraino et al., 2005) τα τελικά προϊόντα βρέθηκε να χαρακτηρίζονται κυρίως από μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλοι και κυρίως από μεσόφιλα μη-εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, και *L. fermentum*. Οι Baresoft & Williams, (2004) βρήκαν επίσης πως ο *Lb. paracasei* βρίσκεται από την αρχή της ωρίμανσης στο Ricotta forte και στο τέλος 12 μηνών αποτελεί την επικρατούσα χλωρίδα. Οι Švec et al. (2005) ανέφεραν όμως μια στενή ομοιότητα ανάμεσα στα είδη *L. casei* και *L. paracasei subsp. paracasei* γαλακτοκομικά στελέχη, ύστερα από ταξινόμική τους μελέτη βασισμένη στον ριβότυπο (ribotyping) EcoRI και HindIII. Οι McSweeney et al., (1993) βρήκαν πως όλα τα απομονωθέντα NSLAB βακτήρια σε τυριά ποικιλίας «Cheddar» ήταν γαλακτοβάκιλλοι με μεγάλη ετερογένεια. Οι Chamba & Irlinger (2004) αναφέρουν πως μπορούν επίσης να απομονωθούν μη-λακτοβακιλικά είδη, τα οποία ανήκουν στην NSLAB μικροχλωρίδα, όπως τα *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* και ορισμένου γένους *Leuconostoc*. Μελέτη των Jordan & Cogan (1993) σε ένα Ιρλανδικό Cheddar 8 εβδομάδων (2 μήνες) αποκάλυψαν ότι αποτελείται από 55% *Lactobacillus paracasei*, 28% *Lactobacillus plantarum*, και 14% *Lactobacillus curvatus*. Ο Masaud et al., (2011) αναφέρει πως σε Δανέζικα τυριά που παράχθηκαν από νωπό γάλα απομονώθηκαν στελέχη *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *S. thermophilus*, *Lc. Lactis*.

3.5.2. Κατανομή ειδών LAB στις ποικιλίες ‘pecorino’.

Από την άλλη μεριά τα τυριά ‘pecorino’ έδειξαν μικρότερη βιο-ποικιλότητα μεταξύ των ειδών που απομονώθηκαν σε σχέση με τις ‘pasta-filata’ ποικιλίες. Όπως παρατηρούμε και από τον πίνακα (Πίνακας 3.12) βρέθηκαν από 2 έως 4 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων να επιβιώνουν κατά τη διέλευση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό. Τούτο μπορεί να οφείλεται στο είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται (πρόβειο). Όπως παρατηρούμε στα 3 από τα 4 δείγματα απομονώνεται το είδος *Lb. paracasei*. Τέλος σχεδόν όλα τα είδη κατατάσσονται στην NSLAB μικροχλωρίδα.

Πίνακας 3.12.: Διαφορετικά είδη που απομονώθηκαν από κάθε pecorino τυρί.

Δείγμα τυριού	Είδος 1	Είδος 2	Είδος 3	Είδος 4
PL-E	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium/faecalis</i>	<i>E. mundtii</i>	-
PA-P	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>S. macedonicus</i>	<i>P. acidilactici</i>
CM-S	<i>Lb. paracasei</i>	<i>P. pentosaceus</i>	-	-
PF-X	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. durans</i>

Δείγμα τυριού: Το πρώτο γράμμα υποδηλώνει το είδος της ποικιλίας του τυριού, και το δεύτερο γράμμα την αρχική κωδικοποίηση του δείγματος.

PA: Pecorino Abriola; **PF:** Pecorino Filiano; **PL:** Pecorino Lucano; **CM:** Canestrato di Moliterno

Όσον αφορά τις ποικιλίες ‘pecorino’ παρακάτω ακολουθεί η σύσταση των επιμέρους δειγμάτων. Από 15 απομονώσεις από το παραδοσιακό τυρί «Pecorino Lucano» 3.5 μήνες ωρίμανσης (**δείγμα E**), από έναν τοπικό παραγωγό, αξίζει να αναφέρουμε πως δεν κατάφεραν να απομονωθούν γαλακτοβάκιλλοι. Εφαρμόζοντας RAPD-PCR παρατηρήθηκε η χαμηλή ποικιλότητα της μικροχλωρίδας. Ο *E. Faecium* ήταν ο πιο κυρίαρχος μικροοργανισμός σε αυτό το είδος του τυριού με 10^5 cfu/g. Από τις απομονώσεις 13 (86.6%) ταυτοποιούνται επιτυχώς ως *E. faecium* (Efa), 1 (6.7%) ως *E. mundtii* (Emu), και 1 (6.7%) ως *Enterococcus faecium/faecalis* (Esp). Αναφέρεται πως γενικά οι *E. faecium* και *E. faecalis* είναι τα είδη περισσότερο απαντώμενα σε τυριά (Giraffa et al., 1997; Franz, Holzapfel & Stiles, 1999; Foulquie Moreno et al. 2006). Σαφώς η παρουσία των εντερόκοκκων είναι αναπόφευκτη στα γαλακτοκομικά προϊόντα, και η ανάκτηση και εμμονή τους σε ορισμένα τυριά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης και ανοχή τους σε pH και το αλάτι (Giraffa, 2003).

Από ένα άλλο παραδοσιακό ‘pecorino’ δείγμα, το «**Pecorino Abriola**» 11 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα P**), της περιοχής Abriola (Basilicata), από τα 18 στελέχη που καθαρίστηκαν συνολικά, 2 δεν ενισχύθηκαν κατά την RAPD-PCR, ενώ τα υπόλοιπα έδειξαν 7 μοναδικά προφίλ. Συνολικά απομονώθηκαν 3 κόκκοι, ελ των οποίων οι 2 (12.5%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Pediococcus acidilactici* (**Pac**), και 1 (6.3%) σαν *Streptococcus macedonicus* (Sma), ενώ από τους υπόλοιπους βακίλους 7 (44%) ταυτοποιήθηκαν σαν *Lactobacillus paracasei* (Lpa), και 6 (37.5%) σαν *Lb. rhamnosus* (Lrh). Αξιοσημείωτο είναι πως σε αυτό το σκληρό τυρί δεν απομονώθηκαν είδη του γένους *Enterococcus*.

Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε ένα ΠΟΠ 'pecorino' τυρί, το «**Pecorino Filiano**» 3 μηνών ωρίμανσης (**δείγμα X**), όπου 3 από τα συνολικά 16 στελέχη ήταν cat⁽⁺⁾, μορφολογικά τόσο σε επίπεδο κυττάρου, όσο και σε επίπεδο αποικίας πιθανώς να είναι πεδιόκοκκοι, οι οποίοι μπορούν να είναι ορισμένες φορές ψευδό-cat⁽⁺⁾. Προχωρώντας στην ταυτοποίηση τους, 1 (7.7%) αποδείχτηκε *Lactobacillus brevis* (**Lbr**), 8 (61.5%) *Lb. paracasei* (**Lpa**), 1 (7.7%) *Enterococcus durans* (**Edu**), και 3 (23.1%) *Pediococcus pentosaceus* (**Ppe**). Από τον πληθυσμό που επιβιώνει σε γαστρικό υγρό, 4.5 log₁₀cfu/g αποτελούταν από *Lb. paracasei*. Η παρουσία του *L. brevis* οφείλεται κυρίως στο γεγονός πως το τυρί αυτό παράγεται με υψηλή θερμοκρασία κατά το «ψήσιμο» (cooking) του τυροπήγματος, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλατιού στην υδαρή φάση, και του μεγάλου χρόνου ωρίμανσης που υφίσταται (De Angelis et al., 2001). Το 7.8% των απομονώσεων που ταυτοποιήθηκε επιτυχώς ως *E. durans*, ποσοστό πολύ κοντά με εκείνο (11.5%) που απομονώνεται απ το Pecorino Abruzzese (Serio et al., 2007) και θεωρείται πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση αυτού του τυριού (Bonomo & Salzano, 2012). Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Randazzo και συν. (2008) σε μελέτη τους στο «Pecorino Siciliano» οι οποίοι ταυτοποίησαν και αξιολόγησαν τεχνολογικά ως προς τα πτητικά συστατικά του μεταβολισμού τους άγρια στελέχη μη-εναρκτήριων καλλιεργείων περιλαμβάνοντας *E. durans*, *Lb. rhamnosus*, και *Lb. casei*. Αυτή η μεταβλητή σύνθεση των στελεχών μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι αυτό το είδος τυριού παράγεται από νωπό πρόβειο γάλα. Ακόμα αναφέρεται από τους Coda et al. (2006) ότι λόγω των ιδιαίτερων τεχνολογικών χαρακτηριστικών (χρήση νωπού γάλακτος, πάστα πυτιάς, χωρίς την προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης) τα NSLAB εκπροσωπούν την επικρατούσα μικροχλωρίδα τους η οποία αποτελείται κυρίως από μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλοι(>7 log CFU/g) με κυριότερους εκπρόσωπους τα είδη *Lactobacillus plantarum* και *Lb. paracasei*. Από άλλη μελέτη (Bonomo & Salzano, 2012) πάνω στην ίδια ποικιλία, 4 μηνών ωρίμανσης (120 ημέρες) χρησιμοποιώντας την τεχνική ITS-PCR ταυτοποίησαν 34 στελέχη σαν *Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides*, 12 σαν *P. acidilactici*, και 6 σαν *Leu. paramesenteroides*. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα των Randazzo et al. (2008), οι οποίοι μάλιστα έδειξαν πως τα είδη *E. durans*, *Lb. rhamnosus*, και *Lb. casei* που βρήκαν στο Pecorino Siciliano Σικελικό τυρί, σχετίζονται με την παραγωγή πτητικών ουσιών. Στο Pecorino Abruzzese ο *E. Faecium*, *E. durans* ήταν ο πιο άφθονος στην ανοιξιάτικη παραγωγή, ενώ ο *E. Faecalis* κατά την καλοκαιρινή (Serio et al., 2007).

Όσον αφορά το ΠΓΕ τυρί «**Canestrato di Moliterno**» 6 μήνες ωρίμανσης (**δείγμα S**), από 16 στελέχη που συνολικά καθαρίστηκαν, μόνο 3 (19%) ήταν cat⁽⁻⁾, ενώ τα υπόλοιπα 13 θετικά μορφολογικά τόσο σε επίπεδο κυττάρου, όσο και σε επίπεδο αποικίας πιθανώς να είναι πεδιόκοκκοι, οι οποίοι μπορούν να είναι ορισμένες φορές ψευδό-cat⁽⁺⁾. Από τα 3 λοιπόν λήφθησαν 2 μοναδικά προφίλ (PS10, PS13), και ταυτοποιώντας τα, 2 (66.667%) ήταν *P. pentosaceus*, και 1 (33.33%) *Lb. paracasei*. Πιο ετερογενής μικροχλωρίδα, αποτελούμενη από *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, και *Lb. paracasei subsp. paracasei*, βρέθηκαν στο Canestrato Pugliese τυρί άλλης μελέτης (Aquilanti et al., 2001). Τα είδη *Lb. curvatus* και *Lb.*

paracasei subsp. paracasei έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στα Ιταλικά τυριά «Fiore Sardo» και Canestrato Pugliese (Albenzio et al., 2001; Mannu et al., 2000).

Οι Caldini et al., (2008) αναφέρουν την απομόνωση ειδών *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* και *Lactobacillus spp.* με πρωτεολυτικές ιδιότητες από παραδοσιακά τυριά νωπού πρόβειου γάλακτος, τα οποία παράγονται στην κεντρική Ιταλία (περιφέρεια της Umbria). Σε διάφορα άλλα pecorino τυριά (Pecorino Umbro 1.5 μήνα, Pecorino Sardo 1.5 και 6 μηνών, Pecorino Toscano 1 μήνα, Pecorino Romano 10 μηνών, Fossa 6 μηνών, και Canestrato Pugliese 3 μηνών) απομονώθηκαν σε ποσοστό 32% *Lactobacillus plantarum*, 15% *Lb. brevis*, 12% *Lb. paracasei subsp. paracasei*, 9% *Lb. curvatus*, 6% *Lb. fermentum*, 6% as *Lb. casei subsp. casei*, 5% as *Lb. pentosus*, 3% *Lb. casei subsp. pseudoplantarum*, και 1% *Lb. rhamnosus* (De Angelis et al. 2001). Στο Pecorino Sardo 6 μηνών βρέθηκε ο *L. rhamnosus*, ενώ στο ίδιο 1.5 μήνα δεν βρέθηκε. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του τυριού Pecorino Sardo (Mannu et al., 2002) αποκάλυψε ότι οι κύριες μικροβιακές ομάδες που βρίσκονται σε αυτή την ποικιλία τυριού είναι λακτόκοκκοι και εντερόκοκκοι, ενώ μικρότερος αριθμός μεσόφιλων λακτοβάκιλλων απομονώθηκε από το ίδιο τυρί ωριμασμένο για ένα με δυο μήνες. Σύμφωνα με την μελέτη των Randazzo et al., (2012) στο Pecorino Crotonese 190 στελέχη αποδόθηκαν σαν *Lb. rhamnosus/paracasei*, 38 σαν *E. faecalis* και 18 σαν *S. thermophilus*, 1 *Lactococcus lactis subs. cremoris*, και 31 σαν *L. lactis*, 34 σαν *L. brevis*, και 31 στο είδος *L. mesenteroides*. Ο Serio et al., (2007) στη μελέτη τους πάνω στο «Pecorino Abruzzese» βρήκαν πως 34 (48.57%) από τους 70 εντερόκοκκους που απομονώθηκαν τεκμηριώθηκαν μέσω του φαινοτυπικού τους προφίλ σαν *E. faecium*. Ο πληθυσμός του Pecorino Sardo αποτελείται από εντεροκόκκους και λακτοκόκκους (Mannu et al., 1999). Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως άλλα τυριά από θερμικά επεξεργασμένο γάλα, χωρίς θέρμανση και ανάδευση ('cooking') του τυροπήγματος, όπως είναι τα Ελληνικά «Φέτα», και «Τελέμές» χαρακτηρίζονται κατά κύριο λόγο από μεσόφιλη μικροχλωρίδα (Tzanetakis et al., 1992). Οι Bintsis et al. (2000) αναφέρουν πως στο παραδοσιακό τυρί «φέτα» καταφέρνει να επιβιώσει μικρός αριθμός NSLAB, και συγκεκριμένα *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum* ίσως εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης NaCl, και της θέρμανσης του γάλακτος σε υψηλή θερμοκρασία, γεγονός που ευνοεί τα θερμοφιλα LAB. Στο Ισπανικό τυρί από πρόβειο γάλα "Manchego" απομονώνονται *E. Faecium*, *faecalis*, και *avium*.

Οι Švec et al. (2005) αναφέρουν μια στενή ομοιότητα ανάμεσα στα γαλακτοκομικά είδη *L. casei* και *L. paracasei subsp. paracasei*, και συμφωνώντας οι Corsetti et al. (2008) αναφέρουν πως η εφαρμογή πολυφασικής προσέγγισης (φαινοτυπική και γενοτυπική) που εφαρμόστηκε σε μελέτη τους επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα αυτό και ταξινομεί στελέχη που απομονώθηκαν από νωπό πρόβειο γάλα από το τυρί "Pecorino d'Abruzzo" ως *L. casei/L. paracasei subsp. paracasei*, χωρίς σαφή διάκριση μεταξύ των δυο ειδών. Τόσο στα 'pasta-filata' όσο και στα 'pecorino' δείγματα της παρούσας μελέτης, όπως και σε pecorino άλλων περιοχών (Pecorino Umbro 1.5 μήνα, Pecorino Sardo 1.5 και 6 μηνών, Pecorino Toscano 1 μήνα, Pecorino Romano 10 μηνών, Fossa 6 μηνών, και Canestrato Pugliese 3 μηνών; De Angelis et al., 2001) και από διάφορα άλλα παραδοσιακά τυριά (Baruzzi et al. 2000; Marino et al. 2003; Dolci et al. 2008) ο

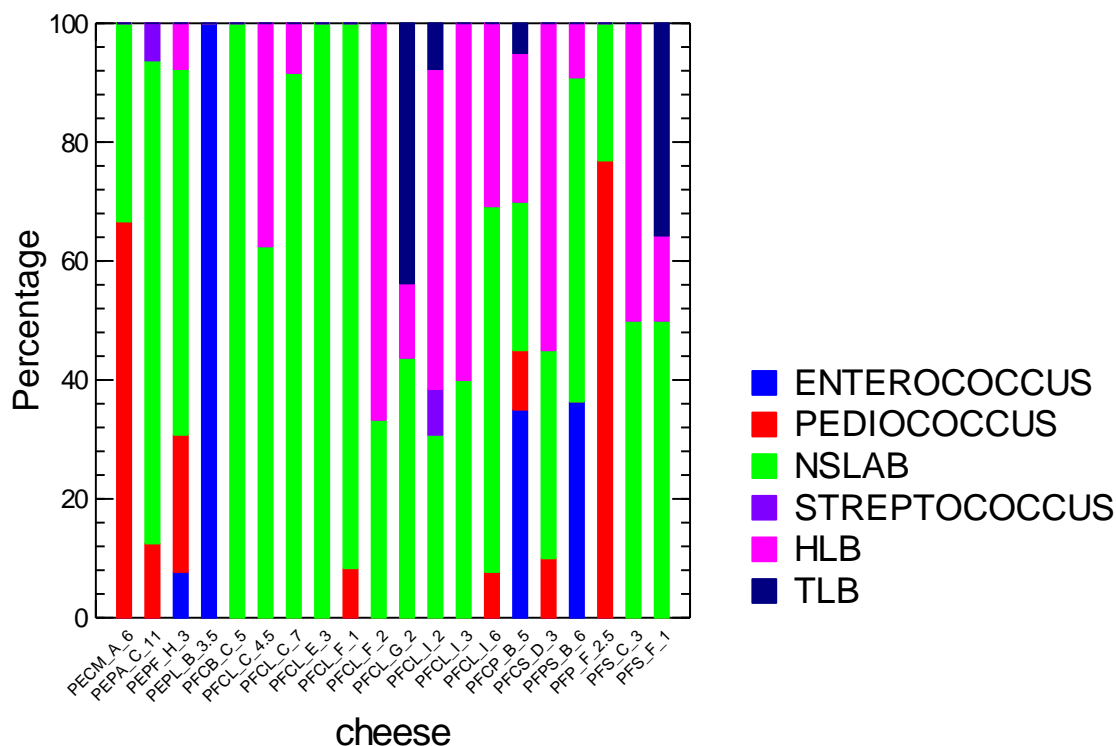
Lb. paracasei subsp paracasei εμφάνισε το μεγαλύτερο επιπολασμό με διακυμάνσεις στα ποσοτά εξαρτώμενες από την ποικιλία, και το τυροκομείο προέλευσης. Το είδος αυτό βρίσκεται πάντα σαν πιο επικρατές στα τυριά ποικιλίας «Cheddar» (Cogan et al., 1997; Fitzsimons et al., 1999). Στα ώριμα τυριά η επικρατούσα NSLAB χλωρίδα αντιπροσωπεύεται κυρίως από τα *L. casei/paracasei* στελέχη (De Angelis et al., 2001; Coueret et al., 2004). Σύμφωνα με τους Crow et al. (2001) κυρίαρχη μικροχλωρίδα στο τυρί Cheddar όσον αφορά τα NSLAB ήταν ο *Lb. paracasei* και ο *Lb. rhamnosus*. Ο *Lb. paracasei* ήταν και ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε ως κυρίαρχος της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας και στο ελληνικό σκληρό τυρί Μανούρα της Σίφνου (Gerasi et al., 2003). Σε ηλικιωμένα ώριμα τυριά Pecorino Crotonese τα είδη *L. rhamnosus/paracasei* ήταν τα πιο συχνά απομονωθέντα με εύρος 72.7-81.5%, και 56.3-79.2% αντίστοιχα Αξιοσημείωτο είναι πως δεν απομονώθηκε το είδος *Lb. plantarum* σε κανένα από τα pecorino τυριά εν αντιθέση με μελέτη των De Angelis, (2001) σε παραδοσιακά Ιταλικά τυριά από νωπό πρόβειο γάλα, οι οποίοι απομόνωσαν αυτό το είδος από όλες τις ποικιλίες. Επίσης ο *L. brevis* βρέθηκε μόνο σε τυρί Pecorino Filiano το οποίο παρασκευάζεται με πολύ αυστηρές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, καλλιέργειες).

Οι εντερόκοκκοι εμφανίζονται σε μεγάλη ποικιλία τυριών, και ειδικά στα παραδοσιακά, τα οποία παράγονται στη Νότιο-ανατολική Ευρώπη κυρίως απο νωπό ή παστεριωμένο πρόβειο και κατσικίσιο γάλα και από φυσικές εναρκτήριες καλλιέργειες γάλακτος (Giraffa, 2002; Manolopoulou et al., 2003). Αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση αυτών των τυριών. Η παρουσία υψηλών αριθμών εντεροκόκκων σε τυριά από νωπό πρόβειο γάλα εξηγείται από την ανθεκτικότητα τους στις υψηλές θερμοκρασίες κα σε συγκεντρώσεις αλάτων ή οξέων (Mundt, 1986; Caridi et al., 2003). Ακόμη η ενδογενής θερμοανθεκτικότητα των κόκκων (οι περισσότεροι από αυτούς ανθίστανται στους 62.8 °C για 30 min) εξηγεί την παρουσία τους σε υψηλούς αριθμούς στα τυριά από παστεριωμένο γάλα, στα οποία εμπεριέχονται σαν μικροχλωρίδα, είτε όταν χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετες εναρκτήριες καλλιέργειες ή όταν βρίσκονται ως συμπτωματική μικροχλωρίδα μέσω μετά-παστεριωτικής, περιβαλλοντικής ή εντερικής μίανσης (Giraffa, 2002; 2003). Τέτοιο παράδειγμα απομόνωσης από φυσική καλλιέργεια ορού αποτελεί η παρασκευή του τυριού Mozzarella, μέσω παραδοσιακής τεχνολογίας από νωπό γάλα νεροβούβαλων (Villani & Coppola, 1994).

Ο Giraffa (2002), και οι Bonomo με Salzano (2012), παρατήρησαν ότι οι εντερόκοκκοι όχι μόνο επιβιώνουν αλλά και αναπτύσσονται κατά τη ζύμωση κρέατος και γαλακτοκομικών, ειδικά όταν δεν χρησιμοποιούνται ανταγωνιστικές εναρκτήριες καλλιέργειες. Επίσης ο ρόλος τους σαν σχετικό συστατικό των φυσικών καλλιεργειών οι οποίες εμπλέκονται στην ζύμωση παραδοσιακών τυριών έχει περιγραφεί εκτενώς, και το είδος *E. faecium* συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των συμπληρωματικών οξυγαλακτικών εκκινητών από την Παγκόσμια Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών, IDF (2002). Οι *E. faecalis*, *E. faecium*, και *E. durans* αποτελούν τα εντεροκοκκικά είδη με τον μεγαλύτερο επιπολασμό σε παραδοσιακά Ευρωπαϊκά τυριά σύμφωνα με άλλες μελέτες (Neviani, et al., 1982; Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 1992; Gomez et al., 2000; Andrighetto et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001; Mannu & Paba, 2002;

Giraffa, 2003; Morandi et al., 2006), όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στην τελική μορφή δομής και γεύσης (Gobbetti et al., 2002). Όπως αναφέρουν και οι Chamba & Irlinger (2004) μπορούν να βρεθούν μη-λακτοβακιλικά είδη κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών όπως *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, και *E. Faecium*. Αναφέρεται επίσης από τους Franz et al., (1999) ότι αν και τα τρία αυτά είδη απομονώνονται συχνά από ανθρώπινα κόπρανα, εμφανίζουν χαμηλότερο επιπολασμό σε κόπρανα ζώων όπως οι χοίροι, τα βοοειδή και τα πρόβατα. Ο Mundt (1986) κατέδειξε ότι η κοινή παρουσία του *E. faecalis* σε πολλά τρόφιμα δεν σχετίζεται πάντα με άμεση μίανση από κόπρανα.

Η παρουσία χαμηλού αριθμού εντερόκοκκων στα 'pasta-filata' τυριά της παρούσας έρευνας συνάδει με άλλες μελέτες (Randazzo et al., 2002) σε παραδοσιακά Σικελικά τυριά (π.χ. Ragusano) εν αντιθέσει με τα pecorino από νωπό γάλα όπου μεταφέρονται σαν φυσικοί μίαντες από τους μαστούς των ζώων, και έχουν αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οσμής και γεύσης (Cogan et al. 1997). Παρατηρούμε πως από όλα τα casiocavallo τυριά, μόνο από το Casiocavallo Podolico (F) απομονώθηκαν εντεροκόκκοι, και συγκεκριμένα ο *E. Faecium* (Efa), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη μίανση από τους μαστούς των ζώων ή σε μίανση από το περιβάλλον του τυροκομείου. Από το ίδιο παραγωγό συλλέχθηκαν και άλλα δείγματα όπως το Pecorino Lucano (E), και Provolone Semipicante (G) στα οποία απομονώθηκαν εντερόκοκκοι. Ο επιπολασμός τους στα pecorino τυριά, εξαρτάται από τις ζωτροφές των κοπαδιών και την εποχή της παραγωγής (Serio et al., 2007). Κατά την άνοιξη, η διατροφή των περισσότερων κοπαδιών βασίζεται στη χορτονομή και σε μικρές ποσότητες χλόης, ενώ το καλοκαίρι όλα τα ζώα βόσκουν στα βουνά, και έτσι δεν χρησιμοποιείται οποιαδήποτε χορτονομή.



Γράφημα 3.2: Ποσοστιαία σύσταση ομάδων οξυγαλακτικών στα τυριά.

Η ετικετοποίηση των δειγμάτων προέρχεται από τα ακόλουθα: τα πρώτα δύο γράμματα αντιπροσωπεύουν την ποικιλία, pasta-filata (**PF**), ή pecorino cheese (**PE**). Το αμέσως επόμενο γράμμα δείχνει το είδος του τυριού όπως ακολούθως: Caciocavallo Lucano (**CL**), Provolone (**P**), Scarmorza (**S**), Pecorino Lucano (**PL**), Caciocavallo Podolico (**CP**), Provolone semipicante (**PS**), Cacio Bucato, (**CB**), Pecorino Abriola (**PA**), Canestrato di Moliterno (**CM**), Caciocavallo Silano (**CS**), Pecorino Filiano (**PF**). Το τελευταίο γράμμα είναι χαρακτηριστικό για τον εκάστοτε παραγωγό (A-F).

Τέλος ο αριθμός που συνοδεύει τον κωδικό στο τέλος υποδεικνύει τον μήνες ωρίμανσης των τυριών.

Enterococcus: *Enterococcus faecium*, *E. mundtii*, *E. spp.*; **Pediococcus:** *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*.; **NSLAB:** *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. spp.*; **Streptococcus:** *Streptococcus thermophilus*, *S. macedonicus*.

HLB: Ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι: *Lactobacillus fermentum*, *brevis*, *buchneri*, *parabuchneri*.

TLB: Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (π.χ. *Lactobacillus delbrueckii*).

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε πως τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ της οξυγαλακτικής μικροχώριδας, η οποία σχετίζεται με αρκετούς παράγοντες, όπως το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, η περιβαλλοντική μίανση, η τεχνολογία, και ειδικότερα η χρήση φυσικής καλλιέργειας ορού. Όπως μπορούμε να δούμε και από το παραπάνω γράφημα (Γράφημα 3.2) όλα τα τυριά περιέχουν NSLAB γαλακτοβάκιλλους σε μικρότερα ή μεγαλύτερα ποσοστά, με τα είδη *Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus* να εμφανίζουν το μεγαλύτερο επιπολασμό. Όπως αναφέρεται και από προηγούμενες μελέτες (Gobbetti et al., 2002; Piraino et al., 2005; Piraino et al., 2008) σε 'pasta-filata' τυριά το είδος *Lb. paracasei* κυριαρχεί κατά την ωρίμανση τους. Ο *Lb. paracasei* ήταν επίσης κυρίαρχος στο τυρί Montasio, όπου αν και δεν ανιχνεύτηκε αμέσως μετά την παραγωγή, ο πληθυσμός του έφτασε τα 107 cfu/g μετά από ένα μήνα, η οποίος και έμεινε σταθερή μέχρι τους 3 μήνες (Lomabrdi et al., 1995). Γενικά η ύπαρξη των θερμόφιλων ειδών *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lactococcus lactis* και *Streptococcus thermophilus*, οφείλεται ή στην ύπαρξη και τη χρήση φυσικών καλλιεργειών (NWS) ορού ή εμπεριέχονται στις φυσικές καλλιέργειες εκκίνησης των ημί-σκληρών, σκληρών, και φ'ρεσκων pasta filata Τυριών όπως η Mozzarella. Μετά από δυο μήνες ωρίμανσης το είδος *L. delbrueckii* είχε εξαλειφθεί (Mannu et al., 2002), ενώ επικρατούσαν είδη του *L. casei* group. Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί που απομονώνονται θεωρούνται συστατικά μιας τυχαίας μικροχλωρίδας, και συναρτήσει του τύπου και της συγκέντρωσης μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά των τυριών.

Η παρουσία υψηλού αριθμού NSLAB στα τυριά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι αυτοί επιβιώνουν από την παστερίωση, ή εισάγονται στο γάλα ή το τυρόπηγμα σαν μετά-μυαντές (Fox, McSweeney, & Lynch, 1998). Από τους ίδιους αναφέρεται ότι είναι η μόνη μικροβιακή ομάδα, η οποία αναπτύσσεται καλά στο δυσμενές περιβάλλον του εσωτερικού του τυριού, το οποίο είναι αναερόβιο, έχει χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση αλάτων, έλλειψη υδατανθράκων προς ζύμωση, και ίσως εμπεριέχει βακτηριοσίνες οι οποίες παρήχθησαν από τις εναρκτήριες καλλιέργειες. Άλλη πηγή μικροοργανισμών είναι το αλάτι, όπως και οι εμπορικές άλμες, όπου πληθώρα μελετών έχουν αποδείξει πως περιέχουν οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως για παράδειγμα *Lb. paracasei*, *Lb. casei* και *Lb. plantarum* (Bintsis et al., 2000) και διάφορες ζύμες, όπως για παράδειγμα *Debaromyces hansenii* και *Candida versatilis* (Seller & Busse, 1990). Επίσης η παρουσία μη-εναρκτήριων οξυγαλακτικών σε τυριά

από νωπό πρόβειο γάλα (pecorino), μαρτυρούν πως αυτά πιθανώς να βρίσκονταν σε υψηλούς αριθμούς στο τυρόγαλα (Di Cagno, 2003).

Αν και οι πεδιόκοκκοι θεωρούνται από ορισμένους ερευνητές να αποτελούν μικρό κομμάτι της NSLAB μικροχλωρίδας (Fox et al., 1998), αντιπροσωπεύουν το κύριο συστατικό της στο ώριμο Ιταλικό τυρί «Parmigiano Reggiano» και στο Ιρλανδικό «Cheddar» (Fitzsimons et al., 1999) και ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ωρίμανση, συμμετέχοντας θετικά στην πρωτεόλυση και λιπόλυση. Στο Σικελικό τυρί Ragusano αναπτύσσονται θερμοφιλοί γαλακτοβάκιλλοι, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus delbrueckii* και *Lb. fermentum*, κατά την ωρίμανση του, αλλά επίσης μπορεί να εμφανιστούν εντερόκοκκοι σε αξιοσημείωτους αριθμούς, με τη μικροχλωρίδα να σταθεροποιείται ύστερα από 1 μήνα ωρίμανσης (Randazzo et al., 2002).

3.5.3. Στατιστική επεξεργασία και ομαδοποίηση των δειγμάτων τυριών.

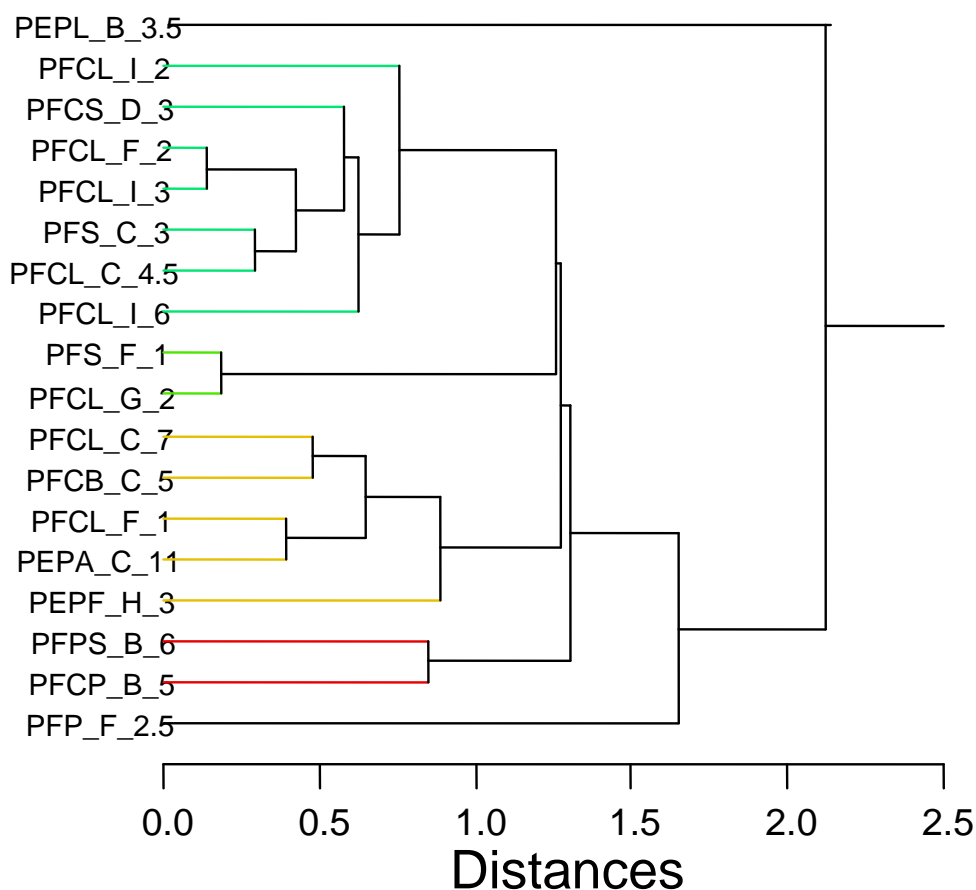
Με σκοπό να ομαδοποιήσουμε τυριά με όμοιο μικροβιακό πληθυσμό, πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση συστάδων στον αριθμό των απομονώσεων της κάθε ομάδας για δείγματα με ≥ 10 στελέχη. Η στατιστική παράμετρος Phi-square (παρόμοια με συντελεστή συσχέτισης του Pearson) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των αποστάσεων.

Όπως παρατηρούμε από το παραπάνω δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 4) διαφορετικά χρώματα χρησιμοποιούνται για να ομαδοποιήσουν διαφορετικές συστάδες. Πιο αναλυτικά έχουμε 6 χρώματα, και συνεπώς ομαδοποιούμε τα δείγματα σε τόσες κατηγορίες. Αξιοσημείωτο είναι πως τα δείγματα PFCP_B_5 και PFPS_B_ τα οποία προέρχονται από τον ίδιο παραγωγό Β (τοπικός παραγωγός) συνδέονται με κόκκινο χρώμα κάτω από κοινή συστάδα. Αυτό σημαίνει πως το Caciocavallo podolico 5 μηνών (δείγμα F), και Provolone semipicante 6 μηνών (δείγμα G) πως έχουν παρόμοια σύσταση στελεχών. Λόγω του ότι τα δείγματα αυτά δεν είχαν όπως αποδεικνύεται κοινά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η κοινή τους ομαδοποίηση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα τυριά μιάθηκαν από το περιβάλλον του τυροκομείου. Αξίζει να αναφερθεί πως τον μεγαλύτερο επιπολασμό έδειξε το στέλεχος *Lactobacillus paracasei subsp paracasei*.

Επίσης τα δείγματα τυριών PFCL_C_7, PF_CB_C_5, PFCL_F_1, PEPA_C_11, και PEPF_H_3 τα οποία ανταποκρίνονται στα επιμέρους δείγματα Caciocavallo Lucano (δείγμα M), Cacio Bucato (δείγμα O), Caciocavallo Lucano (δείγμα A), Pecorino Abriola (δείγμα P), και Pecorino Filiano (X) αντίστοιχα, έχουν κοινό χρώμα, συνδέονται σε κοινή συστάδα και επομένως θα μπορούσαμε να τα ομαδοποιήσουμε. Αν αναφέρουμε πως τρία από τα πέντε δείγματα προέρχονται από τον ίδιο παραγωγό C (PaceBio). Ακόμη τα δείγματα PFS_F_1, και PFCL_G_2 έχοντας «βαφτεί» με πράσινο χρώμα συνδέονται κάτω από κοινή συστάδα, πράγμα που μπορεί να αποδοθεί στην μικρή περίοδο ωρίμανση που υφίστανται με συνέπεια την απομόνωση εναρκτήριων καλλιιεργειών, όπως για παράδειγμα *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*. Επίσης από τον πίνακα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (Πίν. 1) τα δείγματα αυτά έχουν σχεδόν ίδια τιμή a_w , με την Scarmorza 1 μήνα (D) 0.948,

και το Caciocavallo Lucano dolce 2 μηνών (Z) με τιμή 0.945. Ακόμη παρουσιάζουν ίδιες τιμές pH (5.29 και 5.28 αντίστοιχα), ίδια τιμή %υγρασίας (42.6% και 44.7% αντίστοιχα), ενώ διαφέρει ελάχιστα το ποσοστό αλατιού στην υδαρή φάση. Τέλος ίδιες τιμές έχουν στο Rogosa agar.

Cluster Tree



Δενδρόγραμμα 4: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης τυριών.

Η ετικετοποίηση των δειγμάτων προέρχεται από τα ακόλουθα: τα πρώτα δύο γράμματα αντιπροσωπεύουν την ποικιλία, pasta-filata (PF), ή pecorino cheese (PE).

Το αμέσως επόμενο γράμμα δείχνει το είδος του τυριού όπως ακολούθως: Caciocavallo Lucano (CL), Provolone (P), Scarmorza (S), Pecorino Lucano (PL), Caciocavallo Podolico (CP), Provolone semipicante (PS), Cacio Bucato, (CB), Pecorino Abriola (PA), Canestrato di Moliterno (CM), Caciocavallo Silano (CS), Pecorino Filiano (PF).

Το τελευταίο γράμμα είναι χαρακτηριστικό για τον εκάστοτε παραγωγό (A-F).

Τέλος ο αριθμός που συνοδεύει τον κωδικό στο τέλος υποδεικνύει του μήνες ωρίμανσης των τυριών.

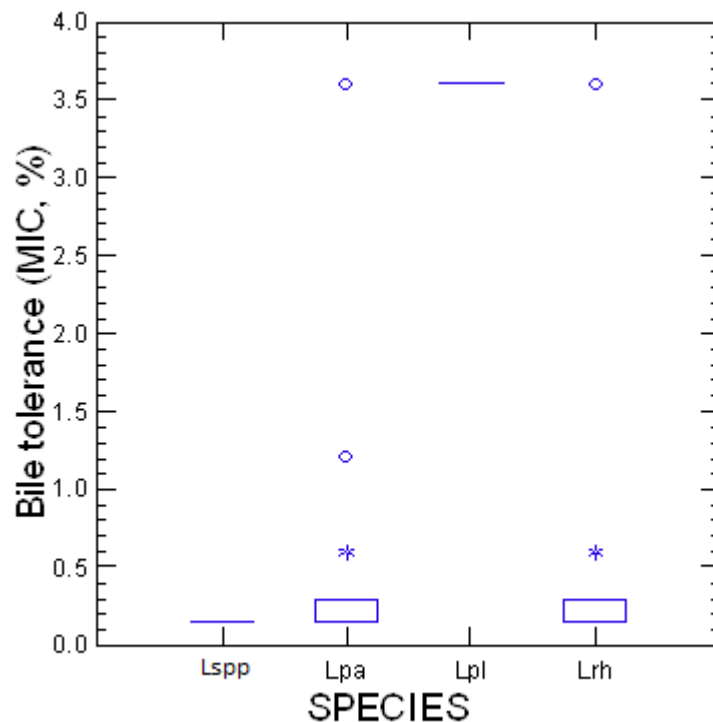
Τα δείγματα PFCL_I_2, PFCS_D_3, PFCL_F_2, PDCL_I_3, PFS_C_3, PFCL_C-4.5, και PFCL_I_6, «βάφονται» με το ίδιο χρώμα και συνεπώς ομαδοποιούνται. Όπως ήταν αναμενόμενο το δείγμα PEPL_B_3.5, το οποίο ήταν ένα το Pecorino Lucano (E) 3.5 μηνών ωρίμανσης δεν ομαδοποιήθηκε με κανένα άλλο δείγμα τυριού. Αυτό εξηγείται από το γεγονός πως όλες του οι παράμετροι ήταν πολύ διαφορετικές από τα υπόλοιπα, με την χαμηλότερη τιμή ενεργότητας νερού a_w και αλατιού. Ανάγοντας το αλάτι αυτό σε υγρή φάση προέκυψε η μεγαλύτερη τιμή απ' όλα τα δείγματα. Να υπενθυμίσουμε πως σε αυτό το δείγμα δεν απομονώθηκαν καθόλου γαλακτοβάκิลλοι. Τέλος το 'pasta-filata' τυρί Provolone (PFP_F_2.5) δεν ομαδοποιήθηκε με κανένα άλλο δείγμα τυριού. Σε αυτό το τυρί απομονώθηκαν κατά κύριο λόγο πεδιόκοκκοι όπως βλέπουμε και από το γράφημα 2.

3.6. In vitro λειτουργικές ιδιότητες επιλεγθέντων στελεχών.

Ο εν δυνάμει προβιοτικός χαρακτήρας των στελεχών εξετάστηκε μόνο για ορισμένα είδη γαλακτοβακίλλων, όπως εκείνων που ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *Lactobacillus paracasei*, *Lb. rhamnosus*, και *Lb. plantarum*. Στη βιβλιογραφία τα είδη αυτά αναφέρονται πως έχουν προβιοτικές ιδιότητες. Αυτό δεν εφαρμόστηκε στους εντεροκόκκους διότι δεν έχουν ακόμη όλοι QPS χαρακτηρισμό. Η δραστηριότητα τους αξιολογήθηκε σε "in vitro" μελέτες ως προς την ανθεκτικότητα τους σε χαμηλό pH, σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (έμμεσα), και άμεσα στην αντοχή τους στα χολικά άλατα, τυχόν παραγωγή συσσωματώσεων στο broth, με μικροσκοπική παρατήρηση, και τέλος για την ικανότητα υδρόλυσης των χολικών αλάτων (δραστικότητα-BSH).

3.6.1. In vitro αντοχή σε χολικά άλατα.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως οι σχετικές φυσιολογικές συγκεντρώσεις των χολικών αλάτων στον άνθρωπο κυμαίνονται από 0.3% (Dunne et al. 1999) σε 0.5% (Zavaglia et al. 1998; Di Cagno, 2003). Έτσι λοιπόν είναι χρήσιμη η "in vitro" μελέτη της ανθεκτικότητας τους στα χολικά άλατα.



Σχήμα 3.9: Κατανομή των στελεχών βάσει %MIC.

Όπως παρατηρούμε και από το παραπάνω σχήμα (Σχήμα 3.9) η πλειοψηφία των στελεχών (64%) καθέστη ανίκανη να αναπτυχθεί και να σχηματίσει αποικίες ακόμη και στην ελάχιστη συγκέντρωση των χολικών αλάτων (0.3%) που προστέθηκε στο MRS agar. Γενικά το στέλεχος *Lb. plantarum* ήταν το πιο ανθεκτικό, και το *Lb. spp* (πιθανώς *Lb. helveticus*) το πιο ευάλωτο. Τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών *Lb. rhamnosus* και *Lb. paracasei* ήταν σχεδόν ίδια. Συνολικά 57 (64%) στελέχη έδειξαν ελάχιστη συγκέντρωση αναχαίτισης της ανάπτυξης στο 0.15%, 18 (20%) mic ίση με 0.3%, 6 (6.7%) αναχαίτιση σε 0.6%, 1 (1.1%) αναχαίτιση σε 1.2%, και τέλος μόλις 7 από τα 90 (7.9%) κατάφεραν να αναπτυχθούν σε όλες τις συγκεντρώσεις χολικών αλάτων (Πίνακας 3.13)

. **Πίνακας 3.13.:** Ελάχιστη Συγκέντρωση αναχαίτισης (MIC) της ανάπτυξης των στελεχών.

Είδη	MIC (%)					Σύνολο	N
	0.15	0.3	0.6	1.2	3.6		
Lsp	100.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.000	1.000
Lpa	65.152	21.212	6.061	1.515	6.061	100.000	66.000
Lpl	0.000	0.000	0.000	0.000	100.000	100.000	1.000
Lrh	61.905	19.048	9.524	0.000	9.524	100.000	21.000
Σύνολο	64.045	20.225	6.742	1.124	7.865	100.000	
N	57.000	18.000	6.000	1.000	7.000		89.000

Lsp: Lactobacillus spp

Lpa: Lactobacillus paracasei

Lrh: Lactobacillus rhamnosus

Lpl: Lactobacillus plantarum

Τα στελέχη *Lactobacillus paracasei* A02, A05, A06, B04, B05, C02, C08, A11, A12, B04, B05, C02, C08, D04, D07, D14, F10, G10, H06, I02, I06, I09, I11, M08, M10, και M14 δυστυχώς δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν ούτε στην ελάχιστη συγκέντρωση 0.3% και έτσι παρουσίασαν MIC 0,15%. Επίσης τα *Lb. paracasei* O8, O9, O15, N03, N04, N05, N06, N10, P01, P15, P18, O08, O09, O15, P01, P18, R12, T04, U07, U16, Z10, X11, X12, X14, Z01, Z02, Z04, Z06, Z15, και Z17 έδειξαν τα ίδια αποτελέσματα. Ακόμη τα *Lactobacillus rhamnosus* I12, O2, O5, O10, O16, M01, M04, M05, M13, P05, T07, T10, U19 και δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν ούτε στην ελάχιστη συγκέντρωση 0.3% και έτσι παρουσίασαν MIC 0,15%.

Τα στελέχη *Lactobacillus paracasei* A03, A14, B01, C12, D13, F02, H06, I13, P15, R03, R17, S10, X05 και *Lb. rhamnosus* D03, L07, T15, U01 δεν αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 0.6% χολικών και έτσι παρουσίασαν MIC 0,3%. Ακόμη τα στελέχη *Lb. paracasei* L10, *Lb. rhamnosus* L05, M03, N08 δεν αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 1.2% χολικών και έτσι παρουσίασαν MIC 0,6%. Το στέλεχος *Lb. paracasei* N01, U03 δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση χολικών 3.6%, και έτσι έδειξε MIC 1.2%.

Μόλις επτά από τα στελέχη κατάφεραν να αναπτυχθούν κάτω από όλες τις συγκεντρώσεις χολικών αλάτων που δοκιμάστηκαν. Αυτά είναι τα *Lb. plantarum* R04, *Lb. rhamnosus* H12, *Lb. rhamnosus* M06, *Lb. paracasei* M16, *Lb. paracasei* O06, *Lb. paracasei* X07, και *Lb. paracasei* G02. Αυτή η ικανότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα στελέχη αυτά αποτελούσαν το επικρατές είδος που επιβίωσε στους μεγαλύτερους πληθυσμούς κατά την μεταχείριση με προσομοιωμένο γαστρικό υγρό.

Όλα τα στελέχη *Lb. casei/paracasei* που απομονώθηκαν από παραδοσιακά Ιταλικά από πρόβειο γάλα σε μελέτη των Corsetti et al., (2008), έδειξαν πολύ καλή ανθεκτικότητα σε 0.5% w/v χολικά άλατα, δόση υψηλότερη από τη συχνότερα συνιστώμενη (0.3% w/v) κατά την αξιολόγηση των προβιοτικών χαρακτηριστικών των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Γενικά έχει αποδειχτεί πως στελέχη *L. plantarum* έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κατά την γαστρική διέλευση και να αποικίζουν το εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των θηλαστικών (De Vries et al., 2006; Mathara et al., 2008; Georgieva et al., 2009). Αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα έδειξαν και στελέχη *Lb. plantarum* στη μελέτη των Zago et al., (2011), με διαφορετικά ποσοστά ρυθμών ανάπτυξης. Τα στελέχη έδειξαν παρόμοια ικανότητα ανάπτυξης σε όλες τις συγκεντρώσεις χολικών που δοκιμάστηκαν.

3.6.2. In vitro Δραστηριότητα-BSH.

Η μεγαλύτερη μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε σχετικά με τη κατανομή και το εύρος της BSH δραστηριότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων εμπλέκοντας πάνω από 300 στελέχη από τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, και τα είδη *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Streptococcus thermophilus* αναφέρεται από τους Tanaka et al., (1999). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η τυχόν δραστηριότητα υδρόλυσης των χολικών αλάτων (BSH- δραστηριότητα) σαν

πιθανό μέτρο της ικανότητας μείωσης της χοληστερόλης. Όσον αφορά την BSH-δραστηριότητα από τα 90 στελέχη που εξετάστηκαν, τα 36 (40%) έδειξαν θετική δοκιμή με παρουσία λευκών διάφανων αποικιών (δεδομένα δεν παρουσιάζονται), ενώ τα υπόλοιπα 54 (~60%) αρνητική.

Πίνακας 3.14: Αποτελέσματα σε % δοκιμής των στελεχών για δραστηριότητα -BSH.

Είδη	Δραστηριότητα-BSH			N
	0	1	Total	
Lsp	100.000	0.000	100.000	1.000
Lpa	60.606	39.394	100.000	66.000
Lpl	0.000	100.000	100.000	1.000
Lrh	61.905	38.095	100.000	21.000
Σύνολο	60.674	39.326	100.000	
N	54.000	35.000		89.000

Lsp: *Lactobacillus* spp

Lpa: *Lactobacillus paracasei*

Lrh: *Lactobacillus rhamnosus*

Lpl: *Lactobacillus plantarum*

Ο παραπάνω πίνακας (Πίνακας 3.14) συνοψίζει τα αποτελέσματα. Το ποσοστό των θετικών στην δοκιμή της υδρόλυσης των χολικών αλάτων είναι σχεδόν ίδια για τα δυο πιο πολυάριθμα στελέχη που ελέγχθηκαν (*Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus*) με περίπου το 39% των στελεχών θετικά. Τα αποτελέσματα συσχέτισης των ειδών με την BSH-δραστηριότητα προήλθαν με $p=0.531$ (~0.5), και με τιμή Pearson Chi-Square 2.204. Επίσης το στέλεχος *Lactobacillus plantarum* R04 έδειξε θετική BSH δραστηριότητα, και συμφωνεί με τους Vizoso-Pinto et al. (2006) και Pisano et al. (2008), οι οποίοι αναφέρουν πως η δραστηριότητα αυτή είναι χαρακτηριστικό ευρέως διαδεδομένο στο είδος *L. plantarum*. Στη μελέτη των Zago et al., (2011) όλα τα στελέχη *Lb. plantarum* κατέδειξαν ικανότητα να υδρολύουν ταυρο-δεόξυ-χολικού, και να σχηματίζουν λευκές διάφανες αποικίες.

Τα αποτελέσματα χαμηλής δραστηριότητας-BSH συμφωνούν με εκείνα των Schillinger et al. 2005 πάνω σε στελέχη *Lb. paracasei/rhamnosus* από γιαούρτια οι οποίοι αναφέρουν πως όλα έδειξαν αρνητική δραστηριότητα. Σε άλλη έρευνα (Botes et al., 2008) δεν ανιχνεύθηκε η δραστηριότητα σε κανένα από τα στελέχη λακτοβάκιλλων. Οι Di Cagno et al., (2003) αναφέρουν πως δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητας αποσύζευξης ή υδρόλυσης των χολικών αλάτων σε στελέχη *Lb. casei* και *Lb. rhamnosus*, ενώ τα *bifidobacteria* και στελέχη *Lb. acidophilus* εμφάνισαν ικανότητα υδρόλυσης.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως τα προβιοτικά, όπως για παράδειγμα το είδος *Lactobacillus acidophilus* εκκρίνουν το ένζυμο «υδρολάση των χολικών αλάτων, BSH (bile salt hydrolase) (χοληγλυκίνη Υδρολάση), το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της υδρόλυσης των γλυκίνη- και ταυρίνη- συζευγμένων χολικών αλάτων

σε υπολείμματα αμινοξέων και ελεύθερα χολικά άλατα (χολικά οξέα) (Shah, 2005). Κάτω από αναερόβιες συνθήκες ανθρώπινες απομονώσεις *L. acidophilus* μπορούν να αποσυζεύξουν και να υδρολύσουν τα χολικά άλατα (Tanaka et al., 1999). Έχει προταθεί από τους Tanaka et al., (1999) ότι στελέχη με BSH δραστηριότητα προέρχονται από εντερικό περιβάλλον, στο οποίο εκτίθενται σε χολικά άλατα. Η θεωρία αυτή αντικρούεται από τους Vinderola & Reinheimer (2003), οι οποίοι αναφέρουν πως το γεγονός ότι δεν έχουν όλα τα στελέχη γαστρεντερικής προέλευσης BSH, δείχνει πως βακτήρια χωρίς αυτό το ένζυμο μπορούν είτε να επιβιώσουν σε αυτό το περιβάλλον ή κατά τη διέλευση μέσω αυτού (Vinderola et al., 2003).

Πιθανώς τα στελέχη που έδειξαν θετική δραστηριότητα εν αντιθέσει με τα υπόλοιπα αρνητικά να βρίσκονταν στη στατική φάση ανάπτυξης σε στατική καλλιέργεια (Liong, Shah, 2005). Επίσης έχει προταθεί η αύξηση της δραστηριότητας σε χαμηλότερα pH του μέσου στην οποία βρίσκεται το στέλεχος/είδος στη στατική φάση ανάπτυξης (Corzo & Gilliland, 1999). Οι ίδιοι αναφέρουν πως διαφορετικά στελέχη του ίδιου βακτηριακού είδους έδειξαν διαφορετική δραστηριότητα BSH κάτω από όμοια επίπεδα pH. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας στα χολικά άλατα, και της υδρόλυσης των χολικών αλάτων. Οι Schmidt et al. (2001) έδειξαν επίσης πως η ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα των λακτοβακίλλων δεν σχετίζεται με την παρουσία υδρόλυσης των χολικών αλάτων. Οι Liong και Shah (2005) αναφέρουν πως υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της από-σύνδεσης των χολικών αλάτων και της BSH δραστηριότητας για τους λακτοβάκιλλους. Ανάμεσα στα προβιοτικά που χρησιμοποιούνται πλέον στη βιομηχανία, επιλεγμένα στελέχη *L. plantarum* είναι διαθέσιμα στην αγορά (De Vries et al., 2006).

3.6.3. Ικανότητα συσσωμάτωσης.

Από τα ενενήντα (90) στελέχη οποία εξετάστηκαν, τα 54 (60%) δεν έδειξαν συσσωμάτωση (aggregation) είτε στον σωλήνα MRS broth pH 6.8, είτε κάτω από μικροσκοπική παρατήρηση, ενώ 25 (27.8%) έδειξαν θετική δοκιμή κάτω και από τα δυο τεστ. Μόλις ένα (1.11%) έδειξε συσσωμάτωση μόνο κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση, και 10 (11.11%) μερική συσσωμάτωση στον σωλήνα, και όχι κάτω από το μικροσκόπιο. Τα στελέχη εκείνα τα οποία παρουσιάζουν συσσωμάτωση πιθανώς να σχηματίζουν βιοϋμένια (biofilms), αλλά αυτό θα πρέπει να διαπιστωθεί από ξεχωριστό πείραμα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως τα βιοϋμένια σχετίζονται με προβιοτική δραστηριότητα.

. 3.7. Αξιολόγηση της εφαρμογής του υποστρώματος mMRS-BPB.

Με σκοπό να αξιολογηθεί η λειτουργικότητα του υποστρώματος mMRS-BPB στα τυριά, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για την ανάλυση αυτή και την εγκατάσταση μιας ταχείας διαδικασίας εύρεσης και επιλογής οξυγαλακτικών στελεχών προς απομόνωση, χρησιμοποιήθηκαν 426 στελέχη από διαφορετικές πηγές απομόνωσης και από σύνολο 8 διαφορετικών ερευνητικών

προγραμμάτων του εργαστηρίου “Industrial Microbiology, του Πανεπιστημίου της Basilicata (Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Italy). Τα στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς με μοριακές τεχνικές, όπως multiplex-PCR *Lb. casei* group, multiplex-PCR *Lb. plantarum* group, ITS-PCR, αλληλούχιση και ενίσχυση του γονιδίου του 16S rRNA, και άλλες μοριακές τεχνικές.

Τα πιο πολυάριθμα είδη ήταν τα *Lb. paracasei* και *Lb. rhamnosus*, τα οποία έδειξαν το μεγαλύτερο επιπολασμό σε τρόφιμα, άνθρωπο και περιβάλλον. Ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 3.15) αναφέρει τον αριθμό των ταυτοποιημένων στελεχών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ερευνητική εργασία. Επίσης ο πίνακας (Πίνακας 3.16) αναφέρει τις πηγές και τον αριθμό των στελεχών κάθε είδους που απομονώθηκαν. Από την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν με μοριακές μέθοδοι και όχι όλες οι απομονώσεις, και κωδικοποιούνται ως «**CHD**».

Πίνακας 3.15: Αριθμός στελεχών τα οποία ταυτοποιήθηκαν από κάθε ερευνητική εργασία.

CAN	37		Cultcoll	36
CHD	134		FIRB	170
PRIN	28		TUN	15
other	4		yog	2
Σύνολο	426			

Πίνακας 3.16: Αριθμός στελεχών από κάθε είδος και προέλευση τους.

Ταυτοποιημένο είδος	Αριθμός στελεχών	Πηγή	Ερευνητικό πρόγραμμα
<i>Bifidobacterium animalis</i>	2	Περιττώματα αρουραίων, γιαούρτι	Cultcoll
<i>B. bifidum</i>	1	Κόπρανα από θηλάζων βρέφος	Cultcoll
<i>B. longum</i>	2	Έντερο βρέφους, κόπρανα χοίρων	Cultcoll
<i>Enterococcus durans</i>	2	Γαλακτοκομικό, τυρί Pecorino Filiano	Chd, Cultcoll
<i>E. faecalis</i>	1	Ενσιρωμένο χόρτο	Cultcoll
<i>E. faecium</i>	20	Γαλακτοκομικά (γάλα καμήλας Τυνησίας, Ιταλικά τυριά: Pecorino, Provolone, Caciocavallo Podolico), παστό κρέας Τυνησίας (kadidi), φυτικό υλικό (τρούφα Τυνησίας)	Chd, TUN
<i>E. hirae</i>	1	LMG6399	Cultcoll
<i>E. mundtii</i>	1	Τυρί Pecorino Lucano	Chd, FIRB,
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	Άνθρωπος	Cultcoll
<i>Lb. brevis</i>	3	Γαλακτοκομικά (τυριά, αγελαδινό γάλα Τυνησίας),	Chd, TUN, Cultcoll
<i>Lb. buchneri</i>	3	Τυρί: Caciocavallo Lucano	chd
<i>Lb. casei</i>	8	Γαλακτοκομικά (τυριά: Grana Granaolo), άνθρωπος (κόπρανα (Ιταλία)-ιδρώτας), κρασί (οίνος-γλεύκος), φυτικό υλικό, υγρό στάδιο καλαμποκιού (λικέρ)	Chd, FIRB,
<i>Lb. curvatus</i>	2	Γαλακτοκομικά (γάλα-	Chd, PRIN

		παραδοσιακά τυριά της Basilicata),	
<i>Lb. delbrueckii</i>	4	Γαλακτοκομικά (Ιταλικά τυριά της Basilicata, Βουλγάρικα γιαούρτια),	Chd,
<i>Lb. fermentum</i>	18	Γαλακτοκομικά (παραδοσιακά τυριά της Basilicata, αλμυρό τυρί Τυνησίας, τυρί με μαϊντανό Τυνησίας)	Chd, TUN, Cultcoll
<i>Lb. gasseri</i>	1	Συμβιωτικό ανθρώπου	Cultcoll
<i>Lb. johnsonii</i>	1	Ανθρώπινο αίμα	Cultcoll
<i>Lb. parabuchneri</i>	3	Τυρί: Caciocavallo Lucano	chd
<i>Lb. paracasei</i>	167	Γαλακτοκομικά (νωπό γάλα κατσίκας Σαρδηνίας-μηχανή άμελης φρέσκα-τυριά (Ιταλικά pasta filata και, pecorino περιοχής Basilicata, Ελβετικό έμμενταλ)-σπιτικό σκληρό τυρί-γαλακτοκομικά Κίνας), κρασί (οίνος-γλεύκος-κρασί Πόρτο Πορτογαλίας-επιτραπέζιος οίνος μικρής ηλικίας Πορτογαλίας-αλλοιωμένος οίνος Πόρτο-μηχανή παραγωγής κρασιού Πόρτο), άνθρωπος (δόντια (UK)-στοματική κοιλότητα-κόπρανα υγείων μωρών-ανθρώπινης συμβίωσης-κόπρανα (Ιταλία, UK, Βέλγιο)-κόπρανα υγιούς ενήλικα Φινλανδίας-σάλιο-παιδικό σάλιο-αίμα (Ιταλία, Βέλγιο)-ιδρώτας), προζύμι (ζυμούμενο Altamura-όξινο Potenza-Molise), ζυμούμενο ποτό, αλλοιωμένη μύρα, ελιξίριο	Chd, FIRB,
<i>Lb. paraplantarum</i>	4	Γαλακτοκομικά (τυρί, αγελαδινό γάλα Τυνησίας), Κρουασάν ζύμης	TUN, Cultcoll
<i>Lb. pentosus</i>	5	Γαλακτοκομικά (προϊόν Τυνησίας)	TUN
<i>Lb. plantarum</i>	29	Γαλακτοκομικά (γάλα αγελάδας- πρόβειο και κατσικίσιο γάλα Τυνησίας- τυριά: Ιταλικά scarmorza, caciocavallo, Ιρλανδίας Cheddar -ξινόγαλα (dégicha)-γαλακτοκομικό προϊόν Τυνησίας), φυτικό υλικό (χορτονομή: UK), mutant, ζυμούμενο προϊόν Νιγηρίας, ζυμούμενες ελιές, Προζύμι (ψωμί Zichi- Ζύμη Cornetto di Matera), άνθρωπος (σάλιο-χέρια), Ιρλανδία: τυρί-άγνωστη προέλευση-νερό άμελης-κόπρανα αγελάδας	Chd, TUN, Cultcoll, PRIN
<i>Lb. reuteri</i>	1	Έντερο ενήλικα	Cultcoll
<i>Lb. rhamnosus</i>	85	Γαλακτοκομικά (νωπό γάλα κατσίκας Σαρδηνίας-φρέσκα-τυριά (Caciocavallo: Lucano-Silano-Podolico-Iasparra (PZ)-	Chd, FIRB,

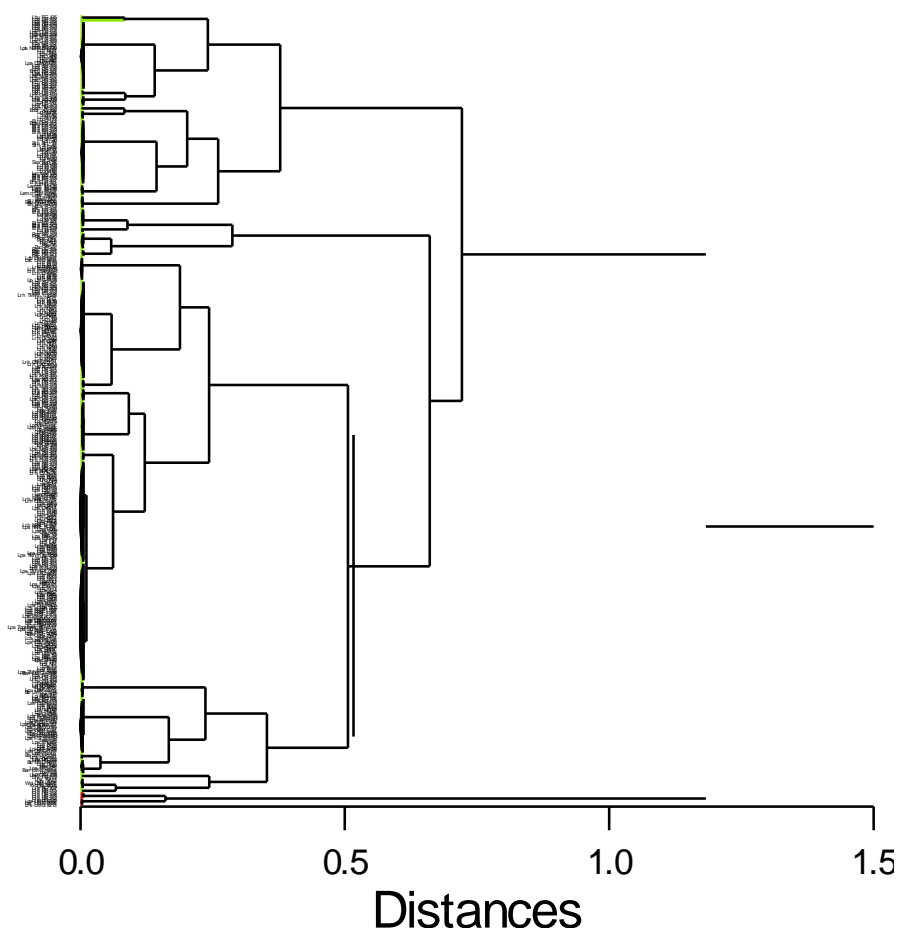
		Bocchiglione (CS)- Di Leo (SA), Cacio bucato, Scarmorza, Provolone PLAC)-τυρί με μαϊντανό Τυνησίας, άνθρωπος (ανθρώπινης συμβίωσης-κόπρανα ανθρώπων-κόπρανα υγείων μωρών-έντερο-ανθρώπινη εντερική πηγή-ουρήθρα-ιδρώτας), κρασί (οίνος-γλεύκος), φυτικό υλικό, σιτηρά, καφές, προβιοτική εναρκτήρια καλλιέργεια,	
<i>Lb. sakei</i>	2	Προϊόν κρέατος, ζυμούμενο ποτό	FIRB
<i>Lactococcus lactis</i>	19	Γαλακτοκομικό προϊόν (τυρί: Canestrato di Moliterno, Caciocavallo Lucano)	Chd, CAN
<i>Lc. lactis subsp</i>	12	Γαλακτοκομικό προϊόν (τυρί: Canestrato di Moliterno)	Chd, CAN
<i>Lc. raffinolactis</i>	1	τυρί: Canestrato di Moliterno	CAN
<i>Le. cremoris</i>	1	Αποξηραμένη εναρκτήρια καλλιέργεια σε σκόνη Hansen's	Cultcoll
<i>Le. mesenteroides</i>	6	Γαλακτοκομικό προϊόν (τυρί: Canestrato di Moliterno)	CAN
<i>Pediococcus acidilactici</i>	7	Γαλακτοκομικά (παραδοσιακά τυριά της Basilicata: Caciocavallo Lucano, Caciocavallo Podolico, caciocavallo Silano, Canestrato di Moliterno), άνθρωπος (σάλιο: Τυνησία,	Chd, TUN
<i>P. pentosaceus</i>	7	Γαλακτοκομικά (τυριά: Caciocavallo Lucano-Caciocavallo Silano-Caciocavallo Podolico-Canestrato di Moliterno, πρωτόγαλα αγελάδας Τυνησίας, πρόβειο γάλα από Ouerdanine), παστό κρέας Τυνησίας (kadidi)	Chd, TUN, Cultcoll
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	Γάλα	other
<i>S. thermophilus</i>	3	Γαλακτοκομικά (τυρί: Caciocavallo Lucano-γάλα-γιαούρτι)	Chd, yog,
<i>Weisella cibaria</i>	2	Ζύμη Cornetto di Matera, προϊόν κρέατος (Chili bo)	
Σύνολο	426	-	

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση συστάδων (cluster analysis) χρησιμοποιώντας «τυποποιημένες» τιμές μεταξύ 0 και 1, για κάθε μια από τις παραμέτρους, όπως π.χ. της μορφολογίας (μέγεθος, σχήμα, επιφάνεια, χρώμα, συνδυασμός χρώματος), του CO₂, κλπ. Αυτή η στατιστική ανάλυση έγινε, ώστε να παρατηρήσουμε αν διαφορετικά είδη θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε μεγαλύτερες ομάδες, διότι μερικά είδη είχαν μόνο μερικούς αντιπροσώπους. Κατά τη «συσταδοποίηση» (clustering) χρησιμοποιήθηκε ο γ-συντελεστής (gamma coefficient). Παρ' όλο που είναι παρόμοιος με τον συντελεστή Pearson r, προτιμάται για την κατάταξη των δεδομένων σε σειρά. Τέλος χρησιμοποιήθηκε και ο UPGMA

(μέθοδος «Μη-σταθμισμένου ζεύγους-ομάδας με αριθμητικούς μέσους») αλγόριθμος συστάδων (Vauterin and Vauterin, 1992). Έτσι λοιπόν προκύπτει το ακόλουθο δενδρόγραμμα:

Δενδρόγραμμα 5: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης στελεχών κατά βελτιστοποίηση mMRS-BPB.

Cluster Tree



Όπως παρατηρούμε σαφέστατα από το παραπάνω δενδρόγραμμα (Δενδρόγραμμα 5) υπάρχουν πολλές ομάδες στελεχών με κοινές ιδιότητες. Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ποιοτικούς δείκτες για τη συσταδοποίηση προκύπτει και επιλέγεται ένας αριθμός δεκαπέντε συστάδων. Κάθε κόμβος (node) είναι μια συστάδα στελεχών με όμοιες ιδιότητες. Η σύνθεση των ομάδων ακολουθεί στους πίνακες 1 και 2 του παραρτήματος (βλ. παράρτημα).

Όπως παρατηρούμε και από τους παραπάνω πίνακες, η «Ανάλυση Συστάδων» δεν έδειξε επιθυμητά αποτελέσματα και ξεκάθαρο διαχωρισμό στελεχών, με κατάταξη τους σε ξεχωριστό node (κόμβο), και έτσι δεν ήταν εύκολος ο διαχωρισμός τους βάσει των επιλεχθέντων ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών. Χρησιμοποιήθηκαν «δέντρα» ταξινόμησης ώστε να δημιουργηθεί ένας αλγόριθμος για την κατάταξη. Λόγω του ότι ορισμένα είδη είχαν μόλις μερικούς αντιπρόσωπους, αποκλείστηκαν

από την περαιτέρω διαδικασία, και τα υπόλοιπα είδη ομαδοποιήθηκαν σε μεγαλύτερες ομάδες. Έτσι λοιπόν αποκλείστηκαν τα *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbrueckii*, *Weissella cibaria*, *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*. Από διάγραμμα «Δείκτη Εγκυρότητας» (Validity Index Plot) προκύπτει αριθμός των συστάδων που επιλέγεται, ο οποίος ισούται με 7. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι κατηγοριοποιήσεις.

Πίνακας 3. 17: Τιμές των κατηγοριών που προέκυψαν κατά την επεξεργασία.

Ομάδα ειδών	Επίπεδα (7)
1	HLb
2	<i>Leuconostoc</i>
3	<i>Pediococcus</i>
4	<i>Streptococcus</i>
5	<i>paracasei</i>
6	<i>plantarum</i>
7	<i>Rhamnosus</i>

HLb: Ετεροζυμωτικά Οξυγαλακτικά: *Lactobacillus brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*
Streptococcus: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*
Leuconostoc: *Le. mesenteroides*, *Le. cremoris*
Pediococcus: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*
Rhamnosus: *Lb. rhamnosus*
Paracasei: *Lb. paracasei*
Plantarum: *Lb. plantarum*,

Για την διαδικασία εκτιμήθηκαν τόσο ο οι δείκτες «Gini» και «Twoing», οι οποίοι έδωσαν καλά αποτελέσματα, μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε ένα διευρυμένο μοντέλο, χρησιμοποιώντας συνδυασμό 2 χαρακτηριστικών. Χρησιμοποιώντας τον συντελεστή «Gini», η Αναλογική Μείωση σε Σφάλμα, PRE (Proportional Reduction in Error) ήταν 0.778. Επίσης όπως βλέπουμε στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.18) προκύπτουν 7 τερματικοί κόμβοι (terminal node).

Πίνακας 3.18: Τελική Ομαδοποίηση σε κόμβους.							
Node	From	Count	Mode	Impurity	Split Variable	Cut Value	Fit
1	0	407	paracasei	0.367	CODECOMBI-BC	-0.500	0.234
2	1	275	paracasei	0.249	CODEFORM-CO2	1.000	0.490
3	1	132	Streptococcus	0.348	BC+CO2	1.000	0.402
4	2	101	rhamnosus	0.207	CO2	1.000	0.369
5	2	174	paracasei	0.081			
6	3	74	Streptococcus	0.153	CODEDIM-ST_C	1.000	0.913
7	3	58	plantarum	0.278	CO2	1.000	0.692
8	6	61	Streptococcus	0.016			
9	6	13	Pediococcus	0.000			
10	7	34	plantarum	0.000			
11	7	24	HLb	0.207			
12	4	91	rhamnosus	0.145			
13	4	10	HLb	0.000			

Αν εφαρμοστεί αλγόριθμος (δεν παρουσιάζεται) στα δεδομένα προκύπτει οι κόμβοι ταξινομούνται όπως στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.19). Σ' αυτόν συνοψίζεται η εφαρμογή της διαδικασίας και συσχετίζονται πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές. Η πραγματική ταυτοποίηση είναι σε γραμμές, ενώ η προβλεπόμενη σε στήλες.

Πίνακας 3. 19: Ποσοστά πραγματικών και θεωρητικών τιμών κατά την κατάταξη.								Προβλεπόμενες
	Hlb	Pediococcus	Streptococcus	paracasei	plantarum	rhamnosus	Σύνολο	N
Hlb	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	27.0
Leuconostoc	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	7.0
Pediococcus	0.0	92.857	7.143	0.0	0.0	0.0	100.0	14.0
Streptococcus	0.0	0.0	98.361	1.639	0.0	0.0	100.0	61.0
paracasei	0.0	0.0	0.0	90.857	0.0	9.143	100.0	175.0
plantarum	0.0	0.0	0.0	10.526	89.474	0.0	100.0	38.0
rhamnosus	0.0	0.0	0.0	11.765	0.0	88.235	100.0	85.0
Σύνολο	8.354	3.194	14.988	42.752	8.354	22.359	100.0	
Αριθμός	34.0	13.0	61.0	174.0	34.0	91.0		407.0

Πραγματική ταυτοποίηση

Η σωστή ταξινόμηση είναι επί της διαγωνίου. Όπως προκύπτει και από τον πίνακα, όλα τα είδη του γένους *Leuconostoc* ταξινομήθηκαν εσφαλμένα. Παρ' όλα αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σωστά μέσω της κυτταρικής τους μορφολογίας (μεγάλοι σε μέγεθος κόκκοι σε μεσαίου μήκους αλυσίδες) και να ταυτοποιηθούν μεταγενέστερα μέσω μιας ειδικής PCR-μεθόδου για το γένος *Leuconostoc* (Lee, Park, & Kim, 2000). Πολύ καλά αποτελέσματα έδειξαν οι πεδιόκοκκοι, με 93% εξ' αυτών να κατατάσσονται σωστά. Έτσι μετέπειτα μπορούμε να τα ταυτοποιήσουμε σε επίπεδο είδους χρησιμοποιώντας ειδική για το γένος *Pediococcus* PCR-μέθοδο (Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Πολύ καλά αποτελέσματα ταξινόμησης έδωσε και η ομάδα των streptococcus (γένη: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) με 98% τούτιση θεωρητικών και πραγματικών τιμών, και συνεπώς μπορούν να διαχωριστούν με ITS-PCR (Moschetti et al., 1998; Blaiotta et al., 2002).

Ορθή ταξινόμηση κατά 91% έδειξε και η ομάδα paracasei, ενώ το υπόλοιπο 9% ταξινομήθηκε στην ομάδα rhamnosus. Έτσι λοιπόν εφαρμόζοντας multiplex-PCR και ενισχύοντας το γονίδιο '*tuf*' θα μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε τα επιμέρους είδη, λόγω του ότι ανήκουν στο *Lb. casei* group (Ventura et al., 2003). Τα ίδια αποτελέσματα είχαμε αναλογικά και για την ομάδα rhamnosus, όπου κατά 11% κατατάχτηκαν σαν paracasei και 89% σαν rhamnosus. Ενισχύοντας και σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο *tuf* μπορούμε να τα ταυτοποιήσουμε επιτυχώς. Ακόμη η ομάδα plantarum ταξινομήθηκε ορθά στην ομάδα του κατά 89.5%, με μόλις 10.5% να κατατάσσεται στην ομάδα paracasei. Εφαρμόζοντας ενίσχυση του γονιδίου *recA* (multiplex-PCR plantarum group) μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τα επιμέρους είδη της ομάδας. Τέλος όσα δεν ανήκαν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες και ήταν

ετεροζυμωτικά θα μπορούσαμε να ενισχύσουμε και να αλληλουχίσουμε το γονίδιο 16S rRNA.

4. Συμπεράσματα

Ως πρώτο συναγόμενο μπορούμε να διαπιστώσουμε πως οι βασικές φυσικοχημικές παράμετροι που μετρήθηκαν είναι αλληλένδετες, και συγκεκριμένα, όσο μειώνεται η υγρασία, αυξάνεται το αλάτι που εμπεριέχεται στην υγρή φάση. Επόμενη παρατήρηση είναι η ετερογένεια ως προς την επικρατούσα μικροχλωρίδα μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών, όπως και ομοίων ποικιλιών αλλά σε διαφορετικό χρόνο ωρίμανσης. Συνεπώς η τεχνολογία παραγωγής και το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη όπως και η περίοδος ωρίμανσης επηρέασε τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις και επομένως τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης σε ορισμένα τυριά ίδιων τυροκομείων παρατηρήθηκε η απομόνωση του ίδιου στελέχους, πράγμα που υποδηλώνει την μεγάλη τους διασπορά στα βιομηχανικά περιβάλλοντα.

Συνολικά απομονώθηκαν στελέχη τόσο της SLAB όσο και της NSLAB χλωρίδας, συμπεριλαμβανομένων και ετεροζυμωτικών γαλακτοβάκιλλων. Άξιο αναφοράς είναι πως μόνο στα σύντομης ωρίμανσης τυριά απομονώθηκαν εναρκτήριες καλλιέργειες, όπως *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*. Όπως ήταν αναμενόμενο, και όπως αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (De Angelis et al., 2001; Corsetti and Settanni, 2007), την επικρατούσα μικροχλωρίδα αποτέλεσαν οι γαλακτοβάκιλλοι. Αξιοσημείωτος είναι ο μεγάλος επιπολασμός του *Lb. paracasei subsp paracasei*, ο οποίος αναφέρεται πως αποτελεί την πλειοψηφία της NSLAB χλωρίδας σε ώριμες ποικιλίες τυριών (Pisano et al., 2008). Σε πολύ υψηλά ποσοστά απομονώθηκαν και τα είδη *Lb. rhamnosus* και *Lb. fermentum*. Σαφώς η παρουσία των εντεροκόκκων είναι αναπόφευκτη στα γαλακτοκομικά προϊόντα και η ανάκτηση και η σχεδόν σταθερή παρουσία τους σε ορισμένα τυριά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης και στην ενδογενή αντοχή τους σε ακραίες τιμές pH και αλατιού (Giraffa, 2003).

Η τεχνική RAPD-PCR με έναν εκκινητή (primer) έδωσε τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν βιότυποι από 290 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες απομονώθηκαν τυχαία από το mMRS. Σχετικά καλή συσχέτιση παρουσίασαν τα αποτελέσματα της RAPD-PCR με εκείνα της μοριακής ταυτοποίησης των στελεχών. Οι μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης για συγκεκριμένες ομάδες οξυγαλακτικών, βασισμένες στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (species-specific PCR) αποδείχτηκαν ένα χρήσιμο και γρήγορο εργαλείο με υψηλή επαναληψιμότητα και ικανότητα διάκρισης των στελεχών.

Ακόμη αποδείχτηκε πως το τροποποιημένο υπόστρωμα «deMan-Rogosa Sharpe» το οποίο περιέχει Κυανούν της Βρωμοφαινόλης και κυστεΐνη, κάτω από αναερόβιες συνθήκες αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για τη μέτρηση και διαφοροποίηση των ειδών των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μικτή καλλιέργεια. Στην παρούσα μελέτη αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο επιλογής επιθυμητών οικογενειών

οξυγαλακτικών βακτηρίων και ένα σημαντικό βήμα πριν την εφαρμογή της μοριακής ταυτοποίησης. Παρ' όλα αυτά απαιτείται περισσότερη έρευνα της μεθόδου, ώστε βελτιωμένη να δώσει την δυνατότητα για τη διάκριση ακόμα και σε διαφορετικά είδη, στενά συνδεδεμένων.

Καταλήγοντας μπορούμε να θεωρήσουμε πως, η παρούσα έρευνα έδειξε ότι τα παραδοσιακά τυριά, τα οποία αποτελούν μεγάλο μέρος της διατροφής του ανθρώπου, αποτελούν ένα μέσο παροχής ωφέλιμων οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Συνοψίζοντας συμπεραίνουμε ότι υψηλοί αριθμοί μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων $\sim 10^7$ cfu/g καταφέρνουν να επιβιώσουν παρουσία γαστρικού υγρού. Η μελέτη αποκάλυψε "in vitro", μια ομοιογένεια των προβιοτικών ιδιοτήτων μεταξύ των στελεχών *Lb. rhamnosus/paracasei*, τόνισε τη δυνατότητα να σχεδιαστούν πολλαπλές καλλιέργειες και τη δυνατότητα να ενώσει σε συνέργια στελέχη, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο εύρος χρήσιμων χαρακτηριστικών. Αξίζει να μελετηθούν επιπρόσθετες in vitro ιδιότητες των στελεχών, όπως για παράδειγμα η αντιμικροβιακή δράση, η παραγωγή βιοϋμενίων, η αποσύζευξη των χολικών αλάτων, η δραστηριότητα β-γαλακτοζιδάσης, και πιθανόν η ωφέλιμη εφαρμογή τους σε χρόνιες παθήσεις. Μετέπειτα βέβαια θα πρέπει να μελετηθεί και "in vivo" αν τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν στο ίδιο ποσοστό αυτές τις ιδιότητες, όπως και αν είναι ασφαλή κατά την ανθρώπινη κατανάλωση. Ακόμη ένα θέμα προς έρευνα είναι η τυχόν μετατόπιση τους (translocation) από το έντερο σε άλλα σημεία. Το στέλεχος R04 που ανήκε στο είδος *L. plantarum* θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω, επειδή περιλαμβάνεται στη λίστα των ταξινομημένων ειδών με QPS status.

Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών βακτηρίων είναι οι ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ξενιστή, όμως είναι σημαντική, για την επιλογή στελεχών για τροφικές εφαρμογές, 1. η αξιολόγηση των τεχνολογικών τους ιδιοτήτων, 2. η επίδραση τους πάνω στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών, και 3, η ανάπτυξη και επιβίωση τους στα τρόφιμα, (για παράδειγμα σε προϊόντα με βάση το γάλα), κατά τη διάρκεια παρασκευής τους και της εμπορικής διάρκειας ζωής (Vinderola et al., 2008). Η περαιτέρω μελέτη των απομονώσεων μπορεί να καταλήξει στην χρήση τους ως «πρόσθετη καλλιέργεια», ώστε να παραχθούν «προβιοτικά» ζυμούμενα τρόφιμα (π.χ. ζυμούμενο γάλα, τυριά). Θα πρέπει επίσης να μελετηθεί η συμπεριφορά τους σε συνθήκες «στρες» (που υφίστανται κατά την διάρκεια επεξεργασιών των τροφίμων), η ικανότητα συμβίωσης με εναρκτήριες καλλιέργειες, η αντοχή σε αντιβιοτικά και η ανθεκτικότητα τους σε «επιθέσεις» φάγων.

5. Βιβλιογραφία.

- Ahrne S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A.E. and Molin G., 1998, *The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa*, Journal of Applied Microbiology, vol. 85, pp. 88–94
- Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Braghieri A., Sevi A., and Napolitano F., 2013, *Composition and sensory profiling of probiotic Scamorza ewe milk cheese*, Journal of Dairy Science, vol. 96, pp. 2792–2800
- Amann, R.I., Wolfgang, L., Schleifer, K.H., 1995. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev. 59, 143–169.
- Antonsson, M., Molin, G. and Ardö, Y., 2003, *Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system*, International Journal of Food Microbiology 85:159–169.
- Aquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S. and Clementi F., 2007, *Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy*, Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072
- Aureli P., Fiore A., Scalfaro C., Casale M., Franciosa G., 2010, *National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy*, International Journal of Food Microbiology, vol. 137, p. 265–273
- Baruzzi F., Matarante A., Morea M., and Cocconcelli P. S., 2002, *Microbial Community Dynamics during the Scamorza Altamura Cheese Natural Fermentation*, Journal of Dairy Science, vol. 85, pp 1390–1397
- Beresford T., Williams A., 2004, *The Microbiology of Cheese Ripening*, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition- Volume 1: General Aspects
- Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F., Andolfi R., Moschetti G. 2002. 16S-23S rDNA intergenic space region polymorphism of Lactococcus garvieae, Lactococcus raffinolactis and Lactococcus lactis as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. Syst. Appl. Microbiol., 25, 4:520-527.
- Bonanno A., Tornambè G., Bellina V., De Pasquale C., Mazza F., Maniaci G., and Di Grigoli A., 2013, *Effect of farming system and cheesemaking technology on the physicochemical characteristics, fatty acid profile, and sensory properties of Caciocavallo Palermitano cheese*, Journal of Dairy Science, vol. 96, p. 710–724
- Bonomo M. G. and Salzano G., 2012, *Microbial diversity and dynamics of Pecorino di Filiano PDO, a traditional cheese of Basilicata region (Southern Italy)*, International Journal of Dairy Technology, vol. 65, No 4
- Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A., Sarullo V., 2003, *Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro*, International Dairy Journal, vol. 13, p. 191–200

- Baruzzi, F., Matarante, A., Morea, M., & Cocconcelli, P. S., 2002, *Microbial community dynamics during the Scamorza Altamura cheese natural fermentation*. Journal of Dairy Science, 85, 1390–1397.
- Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Davis R. and Robinson R.K. 2000, Microbiology of brines used to mature Feta cheese, International Journal Dairy Technology, vol. 53, p. 106-112.
- Claps S., Pizzillo M., Morone G., Rubino R., Pesce F., Santoro L., 2008, *Formaggi tradizionali-ovi-caprini della Basilicata*, CRA, Fraficon Edizioni Matera
- Cocconcelli P.S., Porro D., Galandini S., Senini L., 1995, *Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci*, Letters in Applied Microbiology, vol. 21, p. 376–379.
- Coda R., Brechany E., De Angelis M., De Candia S., Di Cagno R., and Gobbetti M., 2006, *Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses*, Journal of Dairy Science, vol. 89, p. 4126–4143
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37 (Database issue): D141-145; doi: 10.1093/nar/gkn879] [PMID: 19004872]
- Coppola, R., Succi, M., Sorrentino, E., Iorizzo, M., & Grazia, L. 2003. *Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise*. Le Lait, 83, 211–222.
- Corsetti A., Caldini G., Mastrangelo M., Trotta F., Valmorri S., Cenci G., 2008, *Raw milk traditional Italian ewe cheeses as a source of Lactobacillus casei strains with acid-bile resistance and antigenotoxic properties*, International Journal of Food Microbiology, vol. 125, p. 330–335
- Corzo, G., & Gilliland, S. E., 1999, *Bile salt hydrolase activity of three strains of Lactobacillus acidophilus*, Journal of Dairy Science, vol. 82, pp. 472–480.
- Cronin T., Ziino M., Conduro C., McSweeney P.L.H., Mills S., Ross R.P. and Stanton C., 2007, *A survey of the microbial and chemical composition of seven semi-ripened Provola dei Nebrodi Sicilian cheeses*, Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072
- Crow, V., Curry, B., Hayes, M., 2001, *The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar*, International Dairy Journal 11: 275-283.
- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M. R., and Gobbetti M., 2001, *Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Italian Ewe Cheeses Based on Phenotypic, Genotypic, and Cell Wall Protein Analyses*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 2011-2020
- De Vuyst, L., Tsakalidou, E., 2008. *Streptococcus macedonicus, a multi-functional and promising species for dairy fermentations*, International Dairy Journal, vol. 18, p. 476-485.
- de Man J. C., Rogosa M. , and Sharpe M. E. (1960) *A medium for the cultivation of lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology 23, 130-135.

- Di Cagno R., Banks J., Sheehan L., Fox F. P., Brechany E.Y., Corsetti A., Gobbetti M., 2003, *Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses*, International Dairy Journal, vol. 13, p. 961–972
- Dubeuf J.-P., F. Ruiz Morales de A., Genis Castel J.M., 2010, *Initiatives and projects to promote the Mediterranean local cheeses and their relations to the development of livestock systems and activities*, position paper, Small Ruminant Research, vol. 93, p. 67–75
- Ercolini D., Frisso G., Mauriello G., Salvatore F., Coppola S., 2008, *Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese*, International Journal of Food Microbiology, Vol. 124, p. 164-170
- FAO/WHO, 2001, *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder milk with live lactic acid bacteria*
- Fitzsimons N. A., Cogan T. M., Condon S., and Beresford T. 1999, *Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese*, Applied Environmental Microbiology, vol. 65, p. 3418–3426.
- Fortina M.G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P.L., 2003, *Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese*, Food Microbiology, vol. 20, p. 397–404
- Foulquie Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L., 2006, *The role and application of enterococci in food and health, Review*, International Journal of Food Microbiology, Vol. 106, p. 1 – 24
- Fox F.P., McSweeney L.H.P., Cogan M.T., Guinee P.T., 2004, Chapter: “*The microbiology of cheese ripening*”, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1, Third Edition, p. 287-317
- Franciosi E., Settanni L., Carlin S., Cavazza A., Poznanski E., 2008, *A Factory-Scale Application of Secondary Adjunct Cultures Selected from Lactic Acid Bacteria During Puzzone di Moena Cheese Ripening*, Journal of Dairy Science, Vol. 91, Issue 8, pp. 2981–2991
- Freitas C. A., Pintado A. E., Pintado M. E., Malcata X. F., 1999, *Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis*, International Dairy Journal, Vol. 9, n. 9 , p. 593-603
- Fuller Kindstedt P.S., 2002, “*Pasta-Filata Cheeses*”, CHEESE/Pasta-Filata Cheeses, Elsevier Science Ltd, p. 386-
- Giraffa G., 2002, *Enterococci from foods*, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 26, p. 163-171
- Giraffa G., 2003, *Functionality of enterococci in dairy products, Review*, International Journal of Food Microbiology, vol. 88, p.215– 222
- Gobbetti M. and Di Cagno R., 2002b, *CHEESE/Hard Italian Cheeses*, Elsevier Science Ltd., p. 378-385
- Gobbetti M., Folkertsma B., Fox P.F., Corsetti A., Smacchi E., De Angelis M., Rossi J., Kilcawley K., Cortini M., 1999, *Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese*, International Dairy Journal, vol. 9, p. 763-773

- Gobbetti M., Morea M., Baruzzi F., Corbo M.R., Matarante A., Considine T., Di Cagno R., Guinee T., Fox P.F., 2002, *Microbiological, compositional, biochemical and textural characterization of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening*, International Dairy Journal, vol. 12, p. 511–523
- Harrigan W. F. and McCance M. E., 1976, *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*, 2nd edition. London: Academic Press.
- International Dairy Federation, 1979. Cheese and processed cheese. Determination of chloride content: potentiometric titration method. Standard 88. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Kindstedt P., Caric M. and Milanovic S., 2004, *Pasta-filata cheeses*, p. 251-277
- Kongo Ma. J., Gomes A. M., Malcata X. F., McSweeney P.L.H., 2009, *Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal)*, Food Chemistry, vol. 112, p. 131–138
- König H. and Fröhlich J, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Chapter 1, Lactic Acid Bacteria,
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G., 1998, “*Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*”, International Journal of Food Microbiology, vol. 41, p. 103–125
- Lee H.-J., Park S-Y, Kim J., 2000, *Multiplex PCR-based detection and identification of Leuconostoc species*, FEMS Microbiology Letters, vol. 193, p. 243-247
- Lee H.M. and Lee Y., 2008, *A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture*, Original Article, Letters in Applied Microbiology, ISSN 0266-8254
- Liong M.T., Shah N.P., 2005, *Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains*, International Dairy Journal, vol. 15, p. 391–398
- Madrau M.A., Mangia N.P., Murgia M.A., Sanna M.G., Garau G., Leccis L., Caredda M., Deiana P., 2006, *Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening*, International Dairy Journal, vol. 16, p. 876–885
- Mannu L., Paba A., Pes M., Floris R., Scintu M.F., Morelli L., 199, *Strain typing among enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo cheese*, FEMS Microbiology Letters, vol. 170, p. 25-30
- Mannu L., Riu G., Comunian R., Fozzi M.C., Scintu Maria F., 2002, *A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening*, International Dairy Journal, vol. 12, p.17–26
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., 2003, *Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening*. International Journal of Food Microbiology, 82, 153-161.

- Marino M, Maifreni M., Rondinini G., 2003, *Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria*, FEMS Microbiology Letters, vol. 229, p. 133-140
- Marshall M.V., 1987, *Lactic acid bacteria: starters for flavor*, FEMS Microbiology Reviews, vol. 46, p. 327-336
- Masoud W., Takamiya M., Vogensen F. K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sørensen S.J., Jakobsen M., 2011, *Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing*, International Dairy Journal, vol. 21, p.142-148
- McSweeney L.H. P. 2004, *Biochemistry of cheese ripening*, International Journal of Dairy Technology, Vol 57, No 2/3, p. 127-144
- Michailidou, A., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Kondyli, E., Alichanidis, E. (2003). *Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese*. Int. Dairy J.13:743-753.
- Ministry of Health, 2005. Guidelines for Probiotics and Prebiotics. English version available from:
(<http://www.ministerosalute.it/alimenti/nutrizione/linee.jsp?lang=italiano&label=pro&id=398&dad=s>).
- Morandi S., Brasca M., Andrighetto C., Lombardi A., Lodi R., 2006, *Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products*, International Dairy Journal, vol. 16, p. 867–875
- Morea M., Matarante A., Di Cagno R., Baruzzi F., Minervini F., 2007, *Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese*, International Dairy Journal, vol. 17, p. 525–534
- Morelli L., 2000, *In Vitro Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal*, Current. Issues Intest. Microbiology, vol. 1(2): 59-67.
- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana P., Coppola S. 1998. *Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate Streptococcus thermophilus strains*. J. Appl.Microbiol., 85, 1:25-36.
- Mundt, O.J., 1986. *Enterococci*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2.
- Nieto-Arribas P., Seseña S., Poveda J.M., Chicón R., Cabezas L., Palop L., 2011, *Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects*, Food Microbiology, vol. 28, p. 891-899
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E., Torriani, S. 2010. *Diversity of stress tolerance in Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus paraplantarum: A multivariate screening study*. International Journal of Food Microbiology 144: 270-279
- Parente E., Rota M.-A., Ricciardi A., and Clementi F., 1997, *Characterization of Natural Starter Cultures used in the manufacture of Pasta Filata Cheese in Basilicata (Southern Italy)*, International Dairy Journal, vol. 7, p. 775-783
- Peterson, S. D., and R. T. Marshall. 1990. *Non-starter lactobacilli in Cheddar cheese: a review*. J. Dairy Sci. 73:1393–1410.

- Pfannebecker J., Fröhlich J., 2008, *Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci*, International Journal of Food Microbiology, vol. 128, p. 288–296
- Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney L.H. P., Parente E., 2008, *Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study*, International Dairy Journal, vol. 18, p. 81–92
- Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., Parente E., 2005, *Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis*, International Dairy Journal, vol.15, p. 1138–1149
- Pirisi A., Comunian R., Urgeghe P.-P., Scintu M.-F., 2011, *Sheep's and goat's dairy products in Italy: Technological, chemical, microbiological, and sensory aspects*, Small Ruminant Research, vol. 101, p. 102– 112
- Rajendram, D., Ayenza, R., Holder, F.M., Moran, B., Long, T., Shah, H.N., 2006. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. Journal of Microbiological Methods 67, 582–592
- Randazzo C.L., Pitino I., Ribbera A., Caggia C., 2010, *Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds*, Food Microbiology 27, p. 363-374
- Randazzo C. L., Torriani S., Akkermans A. D. L., de Vos W. M and Vaughan E. E., 2002, *Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 18(4), p.
- Rivas P. Fr., Castro P. Ma., Vallejo Ma., Marguet Em., Campos A. Ca., 2012, *Antibacterial potential of Enterococcus faecium strains isolated from ewes' milk*, LWT - Food Science and Technology, vol. 46, p. 428-436
- Rossetti L. and Giraffa G., 2005. *Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by MI3-generated, RAPD-PCR fingerprint databases*, Journal of Microbiological Methods 63:135-144.
- Rubino, R., Pizzillo, M., Morone, G., Schettino, M.V., Di Napoli, M.A., Claps, S., 2009. *Stabilità delle produzioni casearie ovine lucane e strumenti per una diagnosi veloce*. Sci. Tecn. Latt. Cas. 60, 149–153.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T., 2000, *Probiotics in Dairy Fermented Products*, Journal of Biotechnology, Volume 84, Issue 3, P. 197–215
- Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), 1998, *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Scheinbach S., 1998, *Probiotics: Functionality and commercial status*, Biotechnology Advances, Vol. 16, No. 3, p. 581-608
- Serio A., Paparella A., Chaves-Lopez C., Corsetti A., and Suzzi G., 2007, *Enterococcus Populations in Pecorino Abruzzese Cheese: Biodiversity and Safety Aspects*, Journal of Food Protection, vol. 70, No. 7, p. 1561–1568
- Settanni, L., A. Di Grigoli, G. Tornambé, V. Bellina, N. Francesca, G. Moschetti, and A. Bonanno. 2012. *Persistence of wild Streptococcus thermophilus strains on*

- wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 155, p. 73–81.
- Settanni L., Moschetti G., 2010, *Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits: A Review*, *Food Microbiology*, Vol. 27, p. 691-697
- Shah N. P., 2007, *Functional cultures and health benefits*, Review, *International Dairy Journal*, vol. 17, p. 1262–1277
- Sperber W. H., & Swan, J. (1976). *Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 990–991.
- Stackebrandt, E., Teuber, M., 1988. *Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria*. *Biochimie* 70, 317– 324
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630.
- Sykes, G. and Skinner, F.A. (1973) *Techniques for the Isolation and Characterization of Actinomyces and Bifidobacterium species*, Report of Panel Discussion. Society for Applied Bacteriology Symposium Series. No. 2. pp. 327–333. New York, NY: Academic Press.
- Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T. and Mierau I., 1999, *Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity*, *Journal of Dairy Science*, vol. 82, p. 2530–2535
- Torriani, S., Felis, G.E., and Dellaglio, F. (2001). *Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, p. 3450-3454.
- Tzanetakis N. & Litopoulou-Tzanetaki E., 1992, *Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, Two Greek Cheeses from Ewes' Milk*, *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 1389-1393
- Vincent D., Roy D., Mondou F., and Dery C., 1998. *Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification*, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 43, p. 185–193
- Vinderola C.G., Reinheimer J.A., 2003, *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*, *Food Research International*, vol. 36, p. 895–904
- Zago M., Fornasari M. E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G., 2011, *Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses*, *Food Microbiology*, vol. 28, p. 1033-1040
- Zeppa G., Fortina M.-G., Dolci P., Acquati A., Gandini A., and Manachini P.-L., 2004, *Characterization of autochthonous Lactic Acid Bacteria from an artisanal Italian cheese*, *Acta agriculturae slovenica*, vol. 84, p. 3–9

www.fao.org / www.gustoitaliano.it

6. Παράρτημα

6.1. Υλικά για μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων.

* Δίσκοι Αλουμινίου: Carlo Erba Reagenti SPA,

* Υάλινοι Ράβδοι: Thermowell™ Tubes (0,2 ml Tubes with Flat Cap / DNase and RNase free, Natural, Non-sterile)

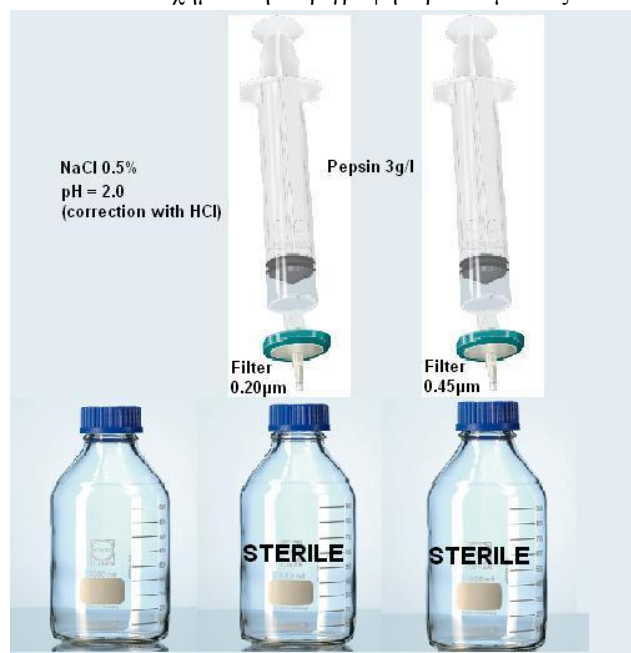
*Θειικό αμμώνιο: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MB=132,13-132,2) (AnalaR, BDH Laboratory Supplies poole, England or SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co.)

Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκε κιτρικό-νάτριο (tri-sodium citrate, Carlo Erba Reagents), $\text{D}^{(+)}$ Glucose Monohydrate(346971, RPH, Carlo Erba Reagents)

6.2. Προετοιμασία προσομοιωμένου γαστρικού υγρού (S1).

Με σκοπό να απομονώσουμε στελέχη τα οποία επιβιώνουν κατά τη διέλευση από το γαστρικό σωλήνα, πραγματοποιήθηκε επώαση του εμβολίου (1ml) της δεύτερης δεκαδικής αραιώσης σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό. Το διάλυμα προσομοιωμένου γαστρικού υγρού πρέπει να είναι φρέσκο και να προετοιμάζεται την ημέρα της χρήσης. Αρχικά παρασκευάζουμε υδατικό διάλυμα NaCl 0.5% w/v, και διορθώνουμε το pH στο 2.0 με HCl 6M. Εν συνεχεία το «αποστειρώνουμε» με διήθηση μέσω φίλτρου 0.2μm (Millex-GV, Millipore SpA, Milan, Italy) και το διοχετεύουμε απευθείας σε ήδη αποστειρωμένη φιάλη. Τέλος προσθέτουμε 3g/l πεψίνη (pepsin, Sigma- Aldrich) και επαναδιηθούμε το διάλυμα σε νέα αποστειρωμένη φιάλη Duran μέσω φίλτρου 0.45μm (τύπος HVLP, Millipore SpA, Milan, Italy) του οποίου οι πόροι έχουν χαμηλή κατακράτηση πρωτεϊνών. Αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία ψυγείου (~4°C), μέχρι τη χρήση του.

Εικόνα 6.1: Σχηματική περιγραφή προετοιμασίας διαλύματος προσομοιωμένου γαστρικού υγρού.



6.3.. Προετοιμασία mMRS-BPB agar

Το υπόστρωμα MRS pH 6.8 θα πρέπει γενικά να παρασκευάζεται από επιμέρους συστατικά (ειδικά όταν πρόκειται για ποσότητες >1l), ή αν χρειαστεί έτοιμο MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί έτοιμο MRS broth σε κουτί διορθώνουμε το pH στο 6.8, προσθέτουμε άγαρ (12 g/l) και αποστειρώνουμε (121 °C για 15 min). Να αναφερθεί ότι η τιμή του pH είναι κρίσιμη για τον σωστή μεταβολή του χρώματος της χρωστικής. Σε περίπτωση που δεν διορθωθεί το pH ο χρωματισμός του υποστρώματος μετά την προσθήκη του BPB και της κυστεΐνης δεν θα είναι σωστός για την κατάταξη των αποικιών. Για την αναερόβωση των τρυβλίων, χρησιμοποιήθηκαν ειδικές σακούλες (GENbox anaer, bioMérieux SA, France).

- Κιτρικό Αμμώνιο, Διβασικό (A-8170, Sigma-Aldrich): $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$
- Λόγω του ότι τα Θεϊκό-μαγνήσιο-7-ένυδρο και Μονοϋδρογονικό-Θεϊκό-Μαγγάνιο θα πρέπει να ζυγιστούν σε πολύ μικρά βάρη (μόλις μερικά mg), είναι προτιμότερο να παρασκευάσουμε διάλυμα τους, και να προσθέσουμε 10ml αυτού σε 1l αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα θα πρέπει να περιέχει 2g από το πρώτο και 400mg από το δεύτερο σε 100ml of distilled water.
- Τα υλικά “Rogosa agar”, “Bacteriological Agar”, , “Bacteriological Peptone”, “Yeast Extract”, “Tryptone”, προέρχονται από την εταιρία Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK.

6.3.1. Προετοιμασία των διαλυμάτων Κυανού της Βρωμοφαινόλης και Κυστεΐνης.

Μετά την Παρασκευή του υποστρώματος προσθέτουμε Κυανού της Βρωμοφαινόλης, **BPB** (Sigma-Aldrich) σε τελική συγκέντρωση 0,02 g/l, και κυστεΐνη (**L-cysteine-HCl**; Sigma-Aldrich) σε τελική συγκέντρωση 0,5 g/l. Και τα δυο διαλύματα θα πρέπει να παρασκευάζονται 100 φορές (100x) συμπυκνωμένα, δηλαδή παρασκευή διαλύματος «Κυανού της Βρωμοφαινόλης» σε συγκέντρωση 2g/l, και L-cysteine-HCl σε συγκέντρωση 50 g/l. Εν συνεχεία «αποστειρώνονται ψυχρά» μέσω διήθησης με φίλτρο οξικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0.22μm. Ύστερα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία ψυγείου (4 °C) μέχρι την ημέρα της χρήσης. Τέλος λόγω του ότι τα διαλύματα είναι 100 φορές συμπυκνωμένα, θα πρέπει να προστεθούν στο υπόστρωμα σε αναλογία (1ml διαλύματος σε 100 ml υποστρώματος MRS agar).

6.4. Αντιδραστήρια

6.4.1. Αντιδραστήρια για την παραλαβή του DNA των LAB.

1a) Ρυθμιστικό διάλυμα STE.

Το ρυθμιστικό διάλυμα STE χρησιμοποιείται για την έκπλυση των βακτηριακών κυττάρων, τα οποία λαμβάνονται από ολονύχτια καλλιέργεια επώασης (16 hrs). Περιέχει 100mM NaCl, 10mM TrisBase pH 8.0, και 1 mM EDTA pH = 8,0. Αρχικά προετοιμάζουμε το διάλυμα, προσθέτοντας TrisBase (Sigma-Aldrich) και EDTA (Sigma-Aldrich) σε ογκομετρική φιάλη, και διορθώνουμε το pH στο 8.0 με HCl 6M. Εφόσον αναμιξούμε καλά τις δυο αυτές ουσίες, εν συνεχεία προσθέτουμε NaCl (CarloErba Reagents, Milan, Italy) και επαναδιορθώνουμε το pH στο ίδιο σημείο.

1b) Ρυθμιστικό διάλυμα ET.

Το ρυθμιστικό διάλυμα ET περιέχει 50mM Tris-HCl, και 5mM EDTA, pH = 8.0
Σημείωση: Το διάλυμα αυτό είναι 5 φορές (5x) συμπυκνωμένο συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα TE.

1c) Lysis-buffer.

Το ρυθμιστικό διάλυμα «lysis-buffer» είναι **ET** το οποίο περιέχει **lysozyme** 10mg/ml; **RNase** 1mg/ml, και **mutanolysina** 50 U/ml. Η mutanolysina μπορεί να μην χρησιμοποιηθεί για τους στρεπτοκόκκους, εντεροκόκκους, λακτοκόκκους, αλλά είναι απαραίτητη για την λύση του βακτηριακού κυττάρου των γαλακτοβάκιλλων. Οι Andrighetto, Zampese, & Lombardi, (2001) χρησιμοποίησαν επίσης λυσοζύμη και mutanolysina για την παραλαβή DNA οξυγαλακτικών βακτηρίων από ζυμούμενα λουκάνικα.

1d) Ρυθμιστικό διάλυμα TE.

Το ρυθμιστικό διάλυμα TE περιέχει 10mM Tris pH 8.0 και 1mM EDTA pH 8.0. Είναι δηλαδή 5 φορές πιο αραιωμένο από το ρυθμιστικό διάλυμα ET. Χρησιμοποιείται για την αραιώση (τελική επώαση) και τη συντήρηση του DNA. Επίσης χρησιμοποιείται σαν «λευκό» (*blank*) κατά το μηδενισμό του NanoDrop[®] πριν τον έλεγχο της ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA.

6.4.2. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της PCR.

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία αναφέρονται παρακάτω παρέχονται από την εταιρία Euroclone S.P.A. (Euroclone, Milan, Italy) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Το PCR-Buffer 10x, το διάλυμα MgCl₂ 50 mM, και η Taq Polymerase (EuroClone EME010001) θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν όπως επισημαίνεται από τον παρασκευαστή. Ο δείκτης κλίμακας του DNA (DNA-ladder) που χρησιμοποιείται

RAPD-PCR, multiplex-PCR, είναι 100bp (50μg-0,2μg/μl) Euroclone (Euroclone S.p.A., Milan Italy). Για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA κατά την ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε μοριακός δείκτης 1kbp (1000bp). Με σκοπό να προετοιμάσουμε δείκτη κλίμακας DNA Ladder (Euroclone, Milan, Italy) αραιώνουμε 2.5 ml του μητρικού διαλύματος (100bp) σε 13.5 ml TE και προσθέτουμε 4ml Loading Buffer 6x, ώστε να προκύψει τελικός όγκος 20μl).

Το υπερκαθαρό νερό που χρησιμοποιείται στο μίγμα της αντίδρασης PCR είναι αποσταγμένο, απιονισμένο και τέλος αποστειρωμένο. Η πηκτή Αγαρόζης είναι της εταιρίας EuroClone (GellyPhor® Agarose LE, EuroClone, Milan, Italy).

1a) Προετοιμασία υδατικού διαλύματος dNTPs 10 mM:

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 100 μl dNTPs συγκέντρωσης 10 mM, το οποίο περιέχει τα επιμέρους συστατικά (Euroclone S.p.A., Milan Italy) του πίνακα (πίνακας 1). Εφόσον τα αναμιξούμε καλά με ανακίνηση αποθηκεύουμε στους -20°C, μέχρι την ώρα της χρήσης.

Πίνακας 6.1: Επιμέρους συστατικά διαλύματος dNTPs 10 mM		
Υπόστρωμα	Συγκέντρωση (mM)	Ποσότητα (μl)
dATP	100	10
dTTP	100	10
dCTP	100	10
dGTP	100	10
H ₂ O υπερκαθαρό	-	60
Σύνολο		100

2a) Προετοιμασία του διαλύματος των εκκινητών συγκεντρώσεων 10 μΜ:

Οι εκκινητές (primer) **M13** και **Coc-1** παρέχονται σε λυοφιλιωμένη μορφή από την εταιρεία Sigma-Aldrich S.r.l. Ο κάθε εκκινητής επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο υπερκαθαρού νερού όπως υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή, ώστε να παραληφθεί συγκέντρωση 10 μΜ. Εν συνεχεία αραιώνουμε 10 φορές ώστε να παραλάβουμε την απαιτούμενη συγκέντρωση 10 μΜ που θα χρησιμοποιηθεί στο μίγμα-PCR.

6.4.3. Αντιδραστήρια για ηλεκτροφόρηση.

2a) Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris-Boric acid-EDTA) 0,5x

Αραιώση 20 φορές με υπερκαθαρό νερό σε ογκομετρικό κύλινδρο κατάλληλο όγκο μητρικού διαλύματος TBE 10x (Bio-Rad, UK). Το διάλυμα αυτό είναι αποθηκευμένο στους 4°C.

2b) Sample Loading Buffer (6x) (από Sambrook Fritsch Maniatis):

Το ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα «φόρτωσης» των δειγμάτων αποτελείται από 0.25% (w/v) Κυανούν της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue) και 40% (w/v) σακχαρόζη (CarloErba Reagents, Milan Italy). Εναλλακτικά χρησιμοποιείται έτοιμο διάλυμα χρωστικής 6x (Gel loading Dye Blue 6x), το οποίο παρέχεται από την εταιρία Biolabs (Biolabs, New England).

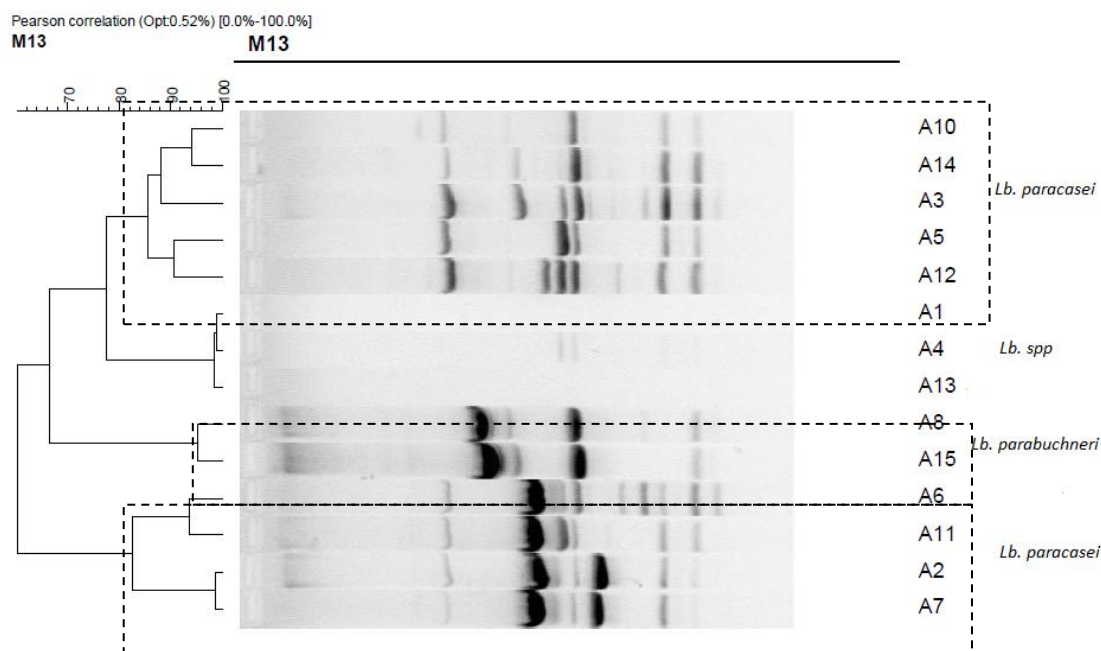
2c) Βρωμιούχο Αιθίδιο

Το Βρωμιούχο Εθίδιο (**Ethidium Bromide**) είναι ένα τοξικό αντιδραστήριο, και έτσι θα πρέπει να ληφθούν όλα τα απαραίτητα μέτρα κατά τη χρήση του, όπως για παράδειγμα χρήση εργαστηριακής ποδιάς, γάντια νιτριλίου, αποφυγή εισπνοής του, και χρήση κάτω από «laminar» ώστε να απομακρύνονται αέρια. Για πληροφορίες περί ασφάλειας: http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide

Είναι επιθυμητό μαζί με κάθε multiplex-PCR να «τρέχουμε» θετικά γνωστά δείγματα στελεχών, για να ελέγχεται η αξιοπιστία της μεθόδου.

6.5. Δενδρογράμματα RAPD-PCR για κάθε είδος τυριού χωριστά.

6.5.1. Δενδρογράμματα RAPD-PCR με M13.

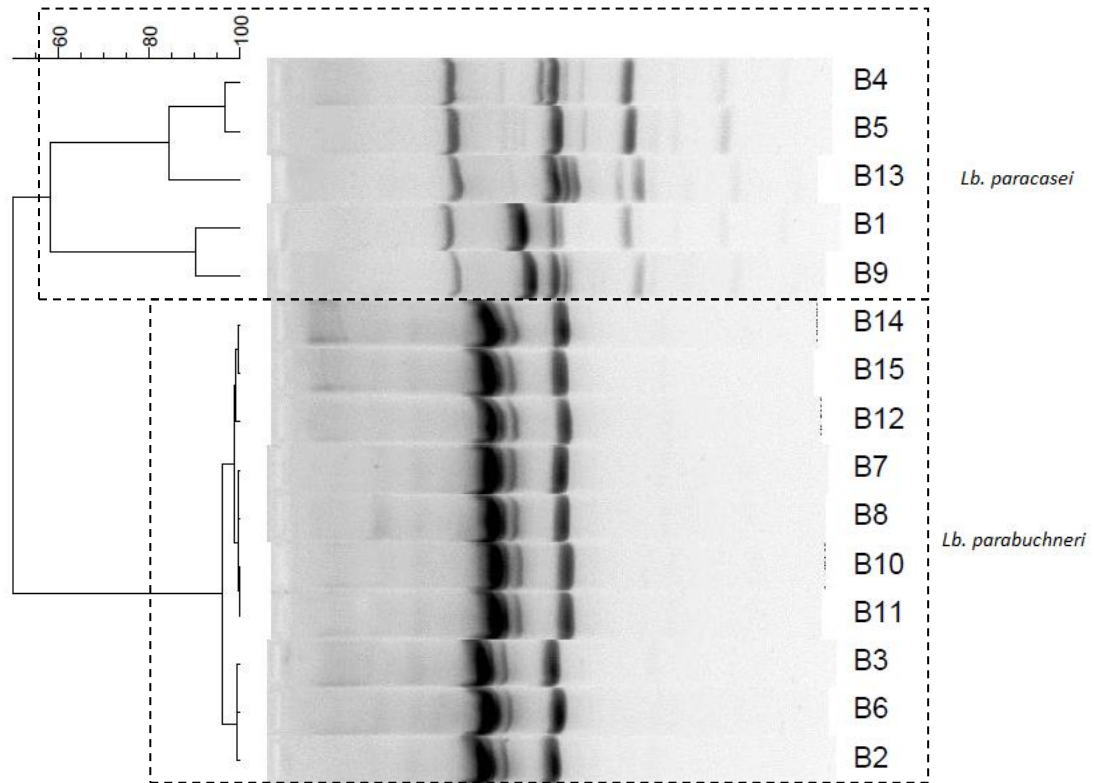


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα A

Pearson correlation (Opt:1.14%) [0.0% 100.0%]

M13

M13

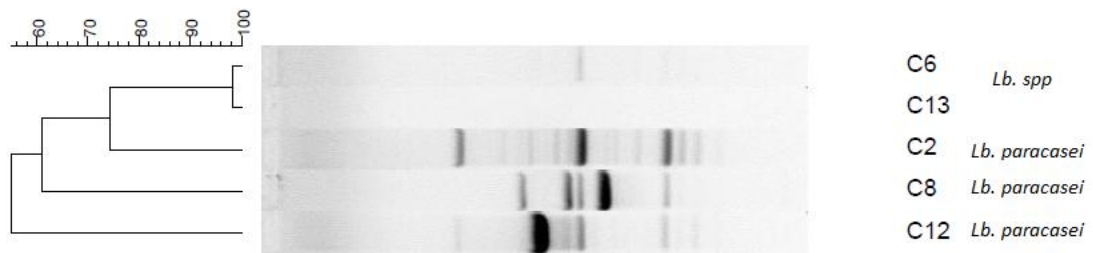


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα Β.

Pearson correlation (Opt:0.73%) [0.0%-100.0%]

M13

M13

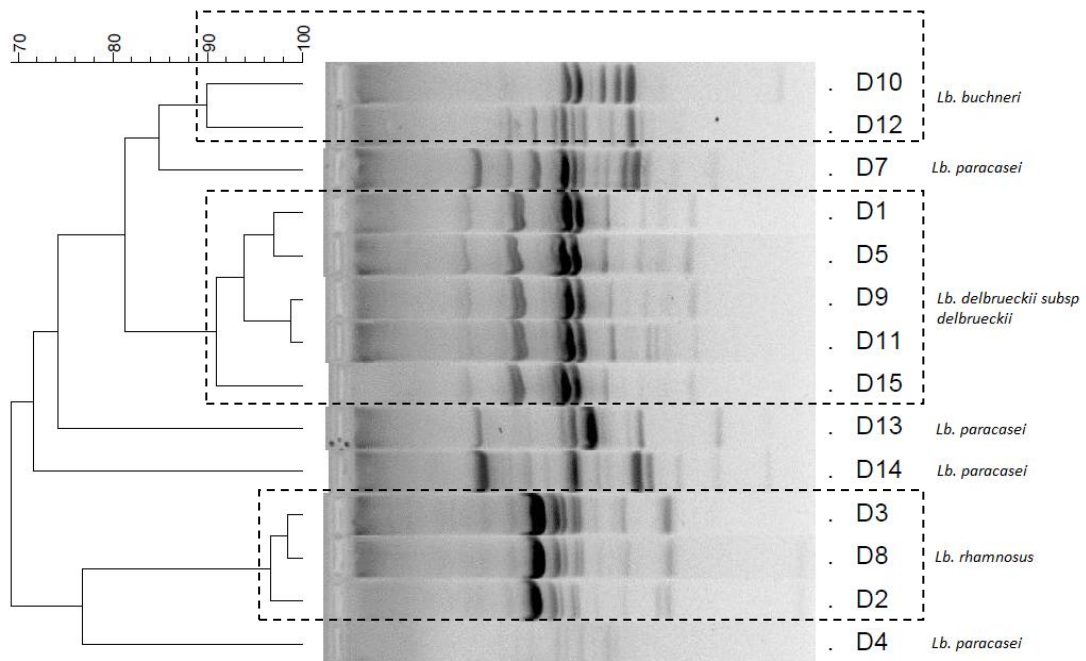


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα C.

Pearson correlation [0.0%-100.0%]

M13

M13

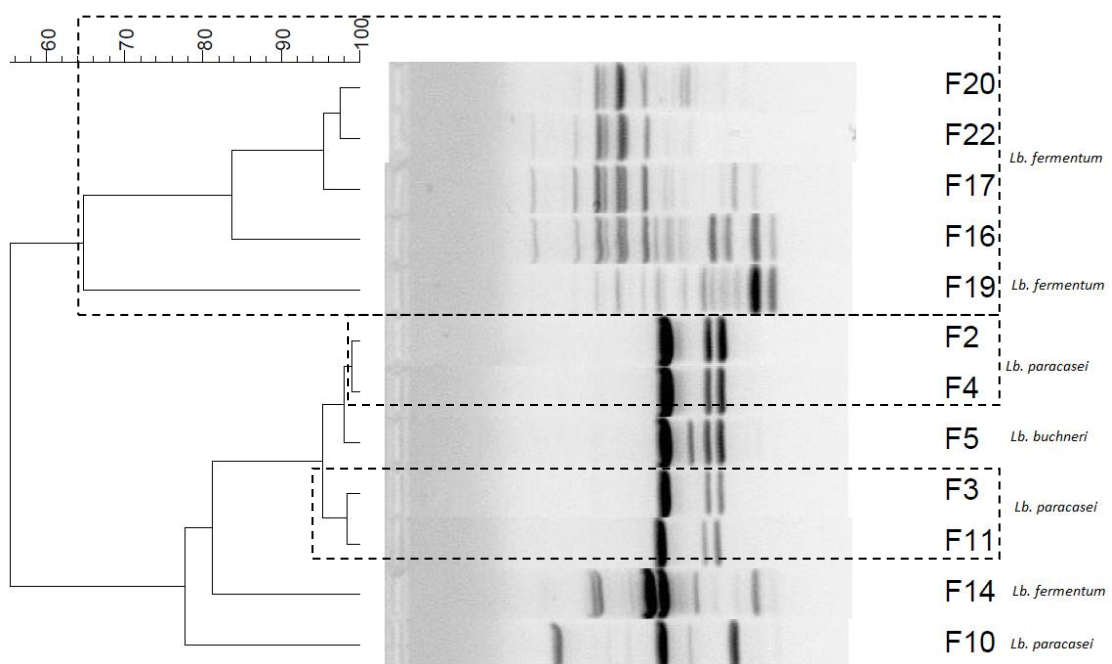


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα D

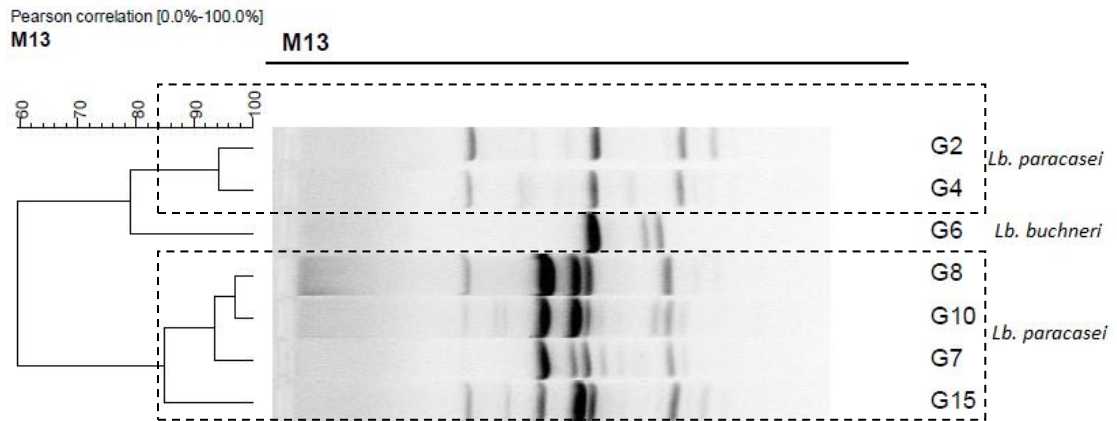
Pearson correlation (Opt:1.90%) [0.0%-100.0%]

M13

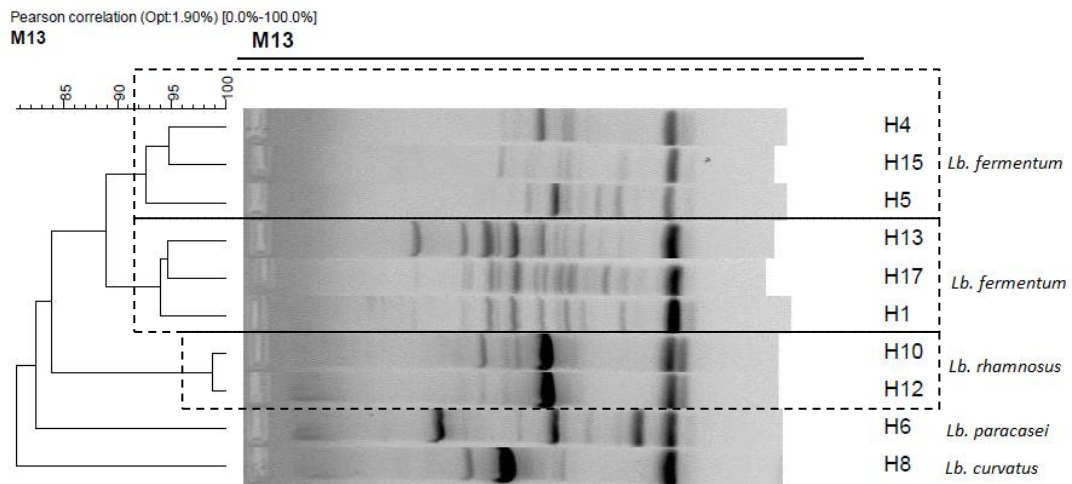
M13



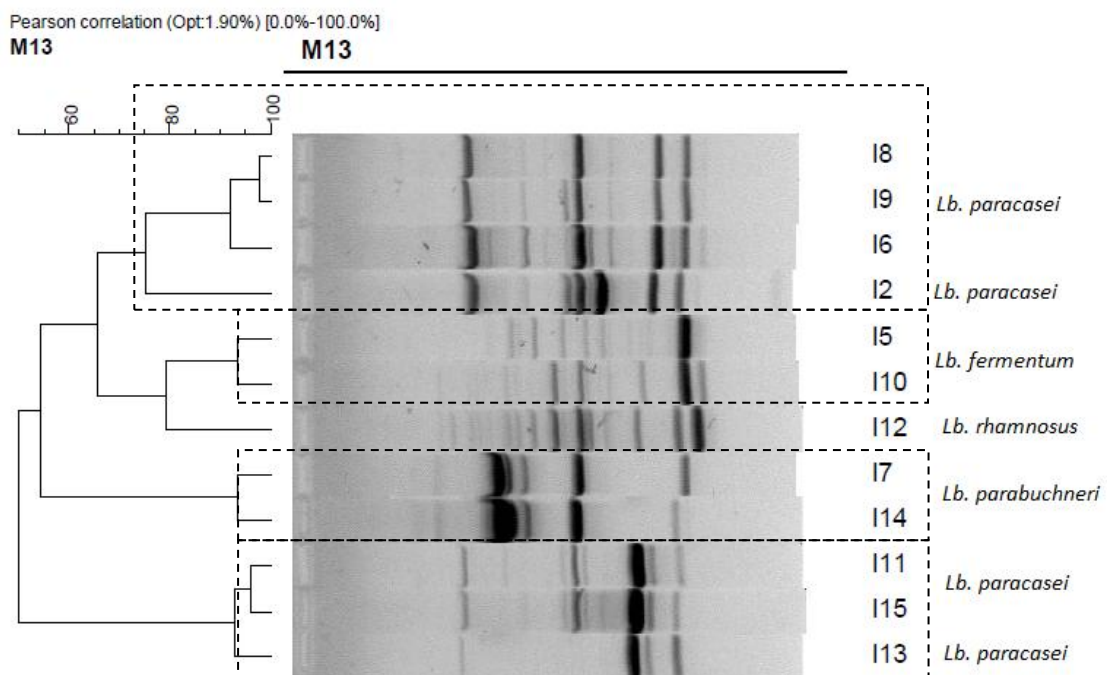
Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα F



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα G



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα H

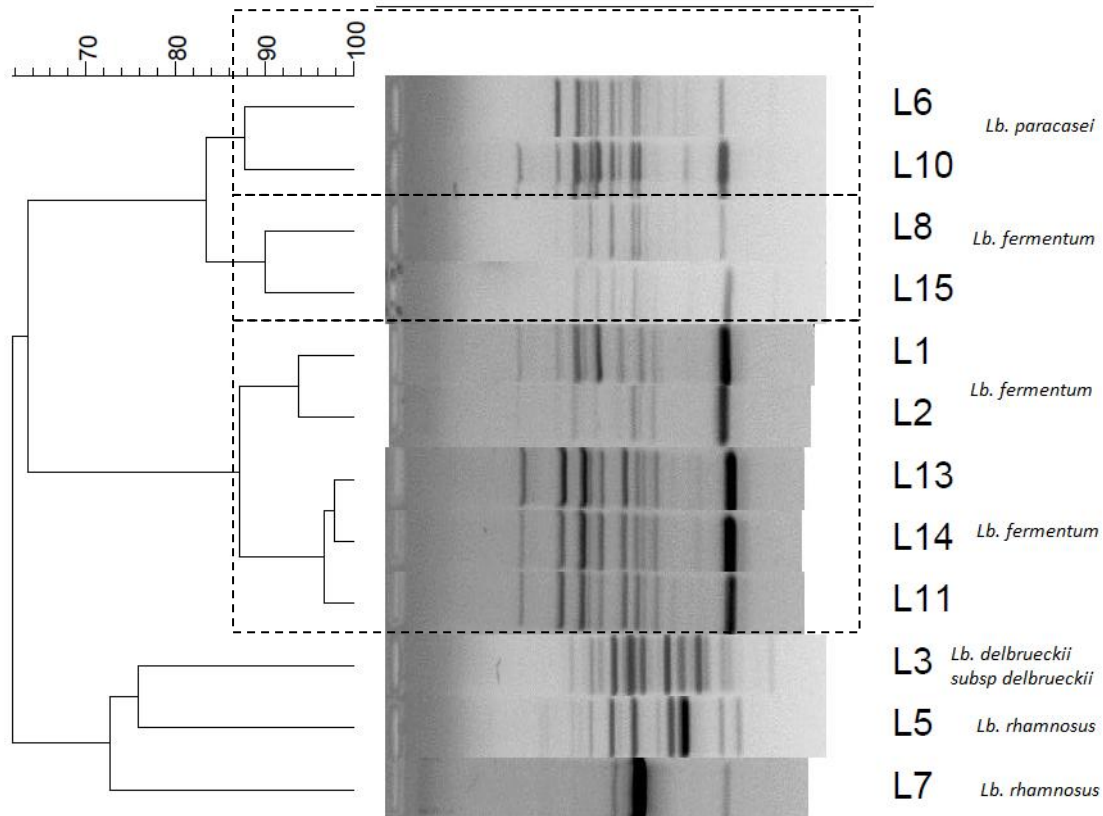


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα I

Pearson correlation (Opt:9.53%) [0.0%-100.0%]

M13

M13

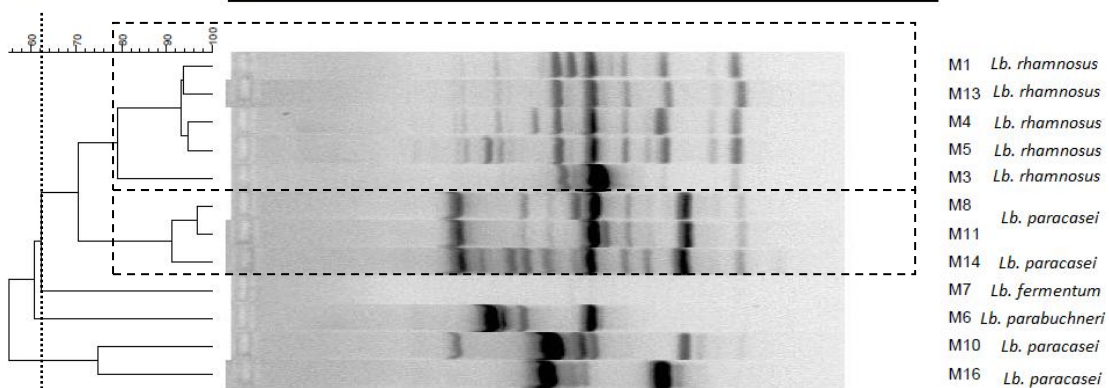


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα L.

Pearson correlation (Opt:0.35%) [0.0%-100.0%]

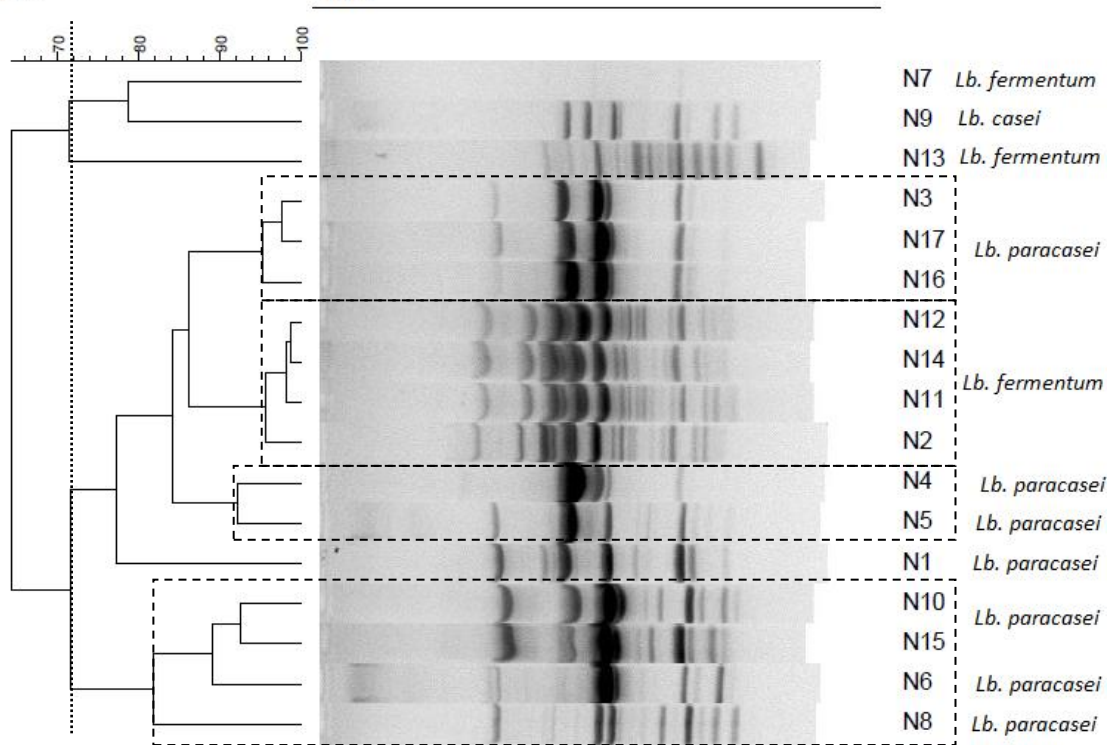
M13

M13



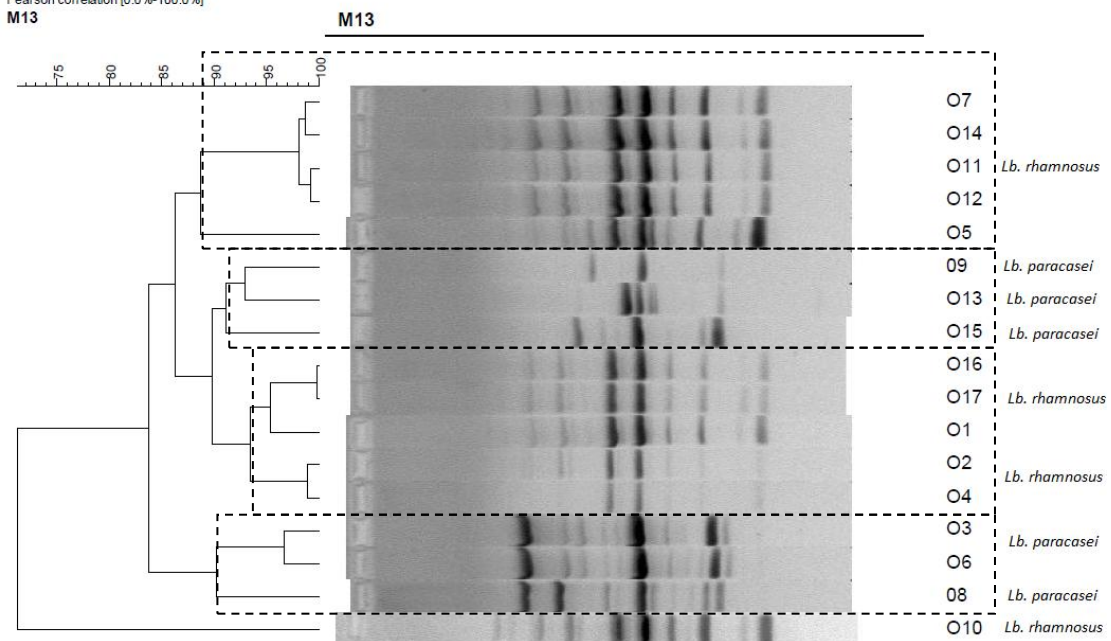
Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα M.

Pearson correlation (Opt:1.03%) [0.0%-100.0%]
M13

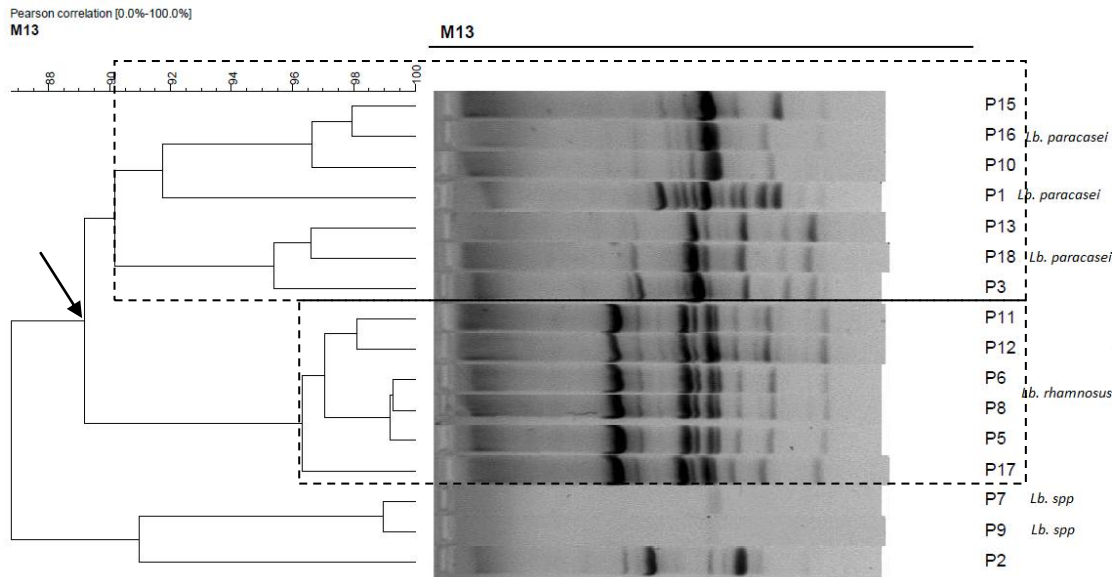


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα N.

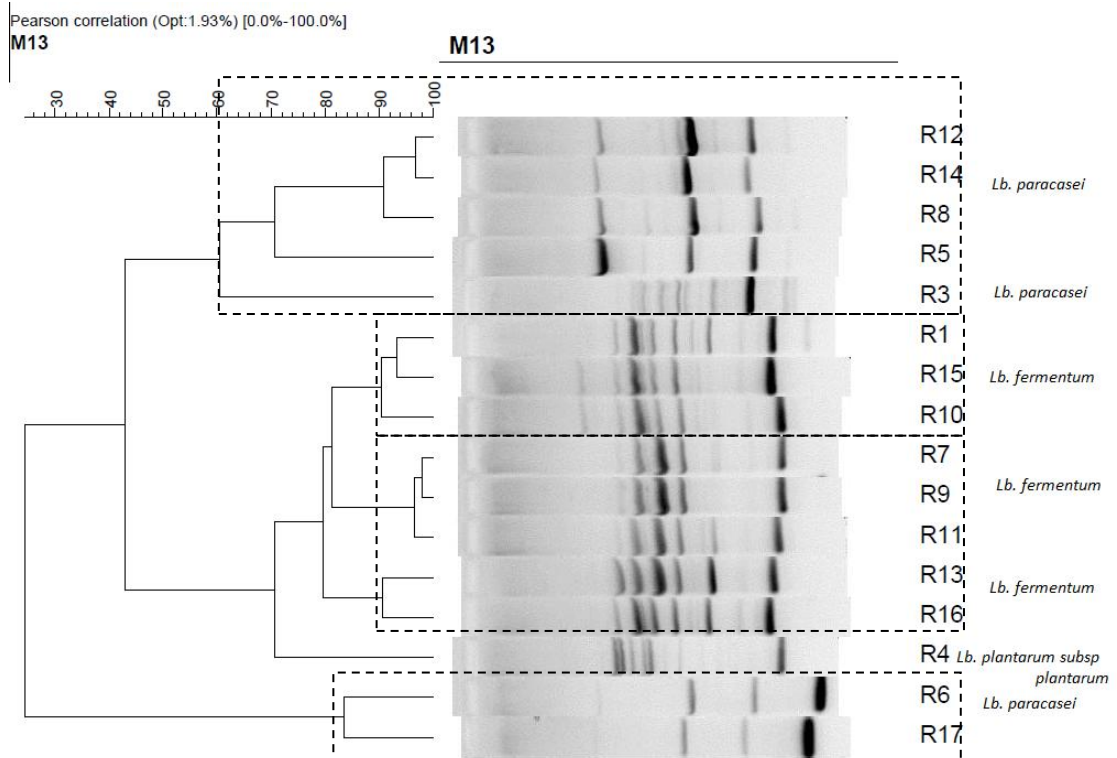
Pearson correlation [0.0%-100.0%]
M13



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα O.



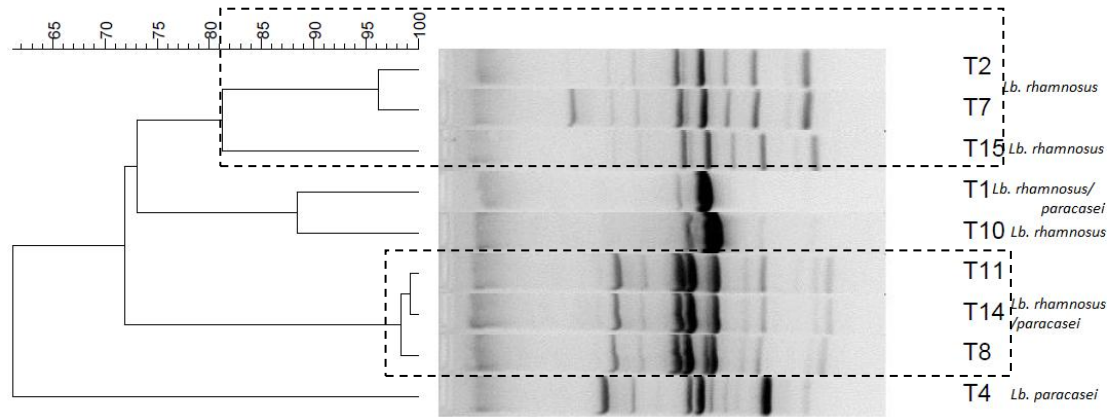
Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα P.



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα τυριού R.

Pearson correlation (Opt:0.56%) [0.0%-100.0%]
M13

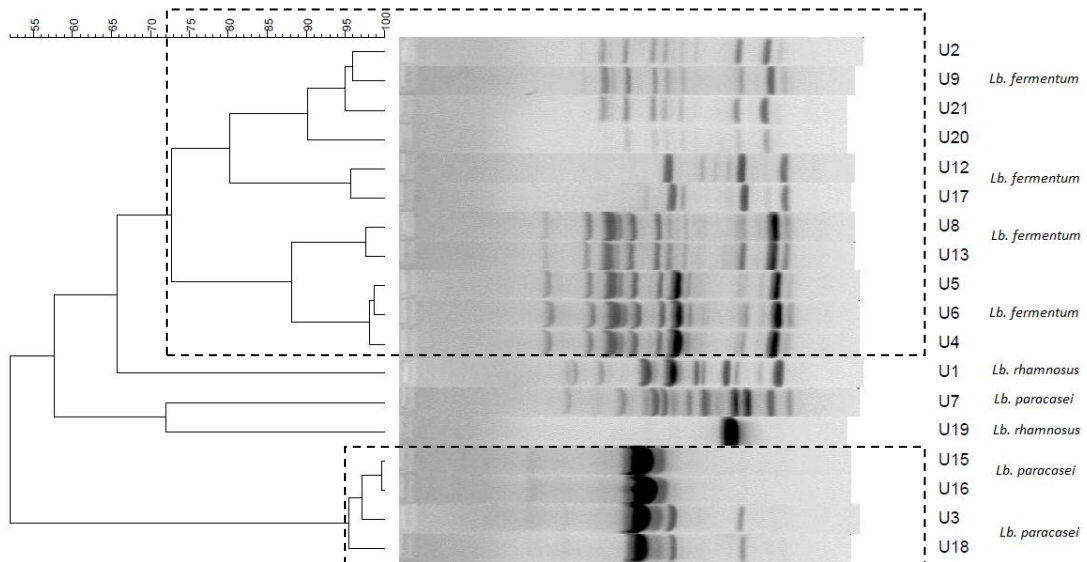
M13



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα T.

Pearson correlation (Opt:1.30%) [0.0%-100.0%]
M13

M13



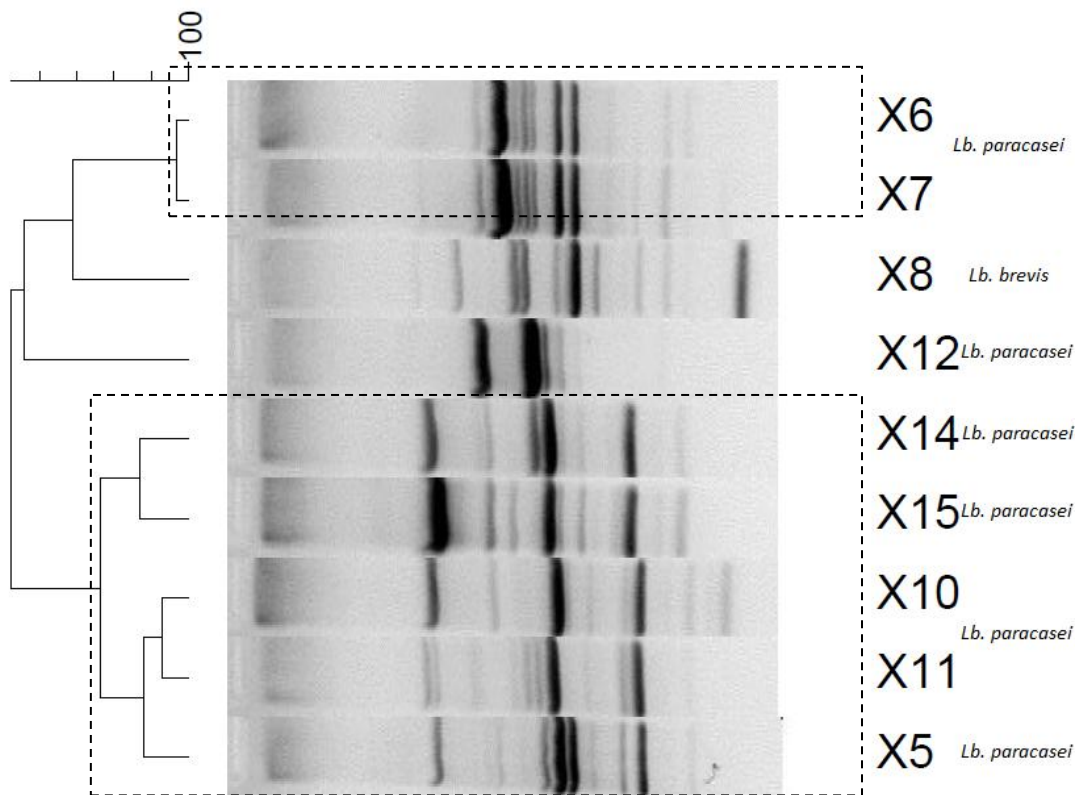
Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα U

06 καθεωρείται

Pearson correlation (Opt:0.78%) [0.0%-100.0%]

M13

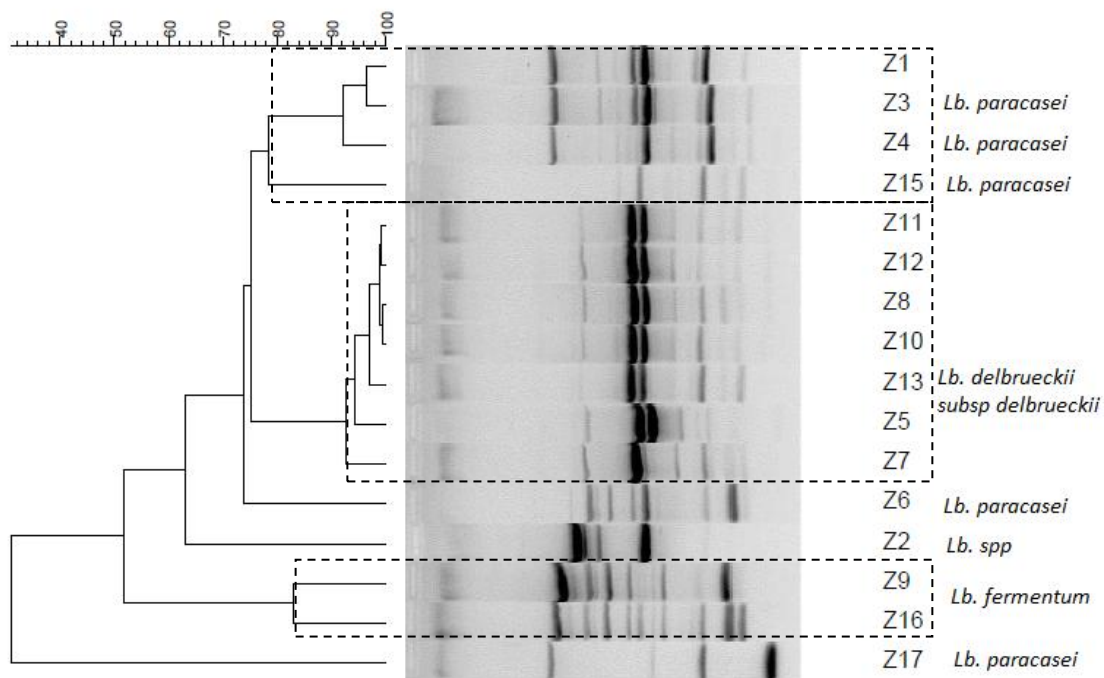
M13



Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα X.

Pearson correlation (Opt:1.30%) [0.0%-100.0%]
M13

M13

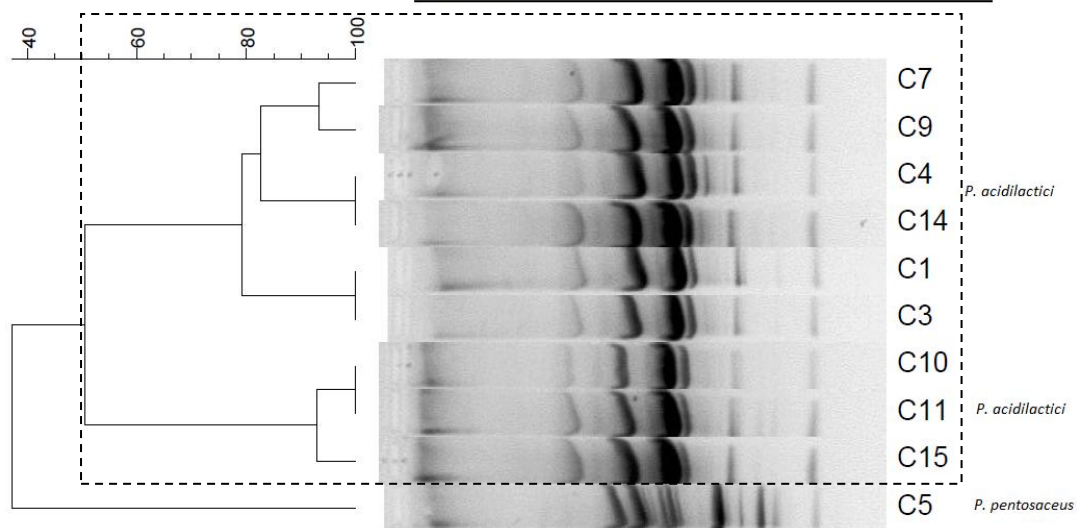


Δενδρόγραμμα M13, Δείγμα Z.

6.5.2. Δενδρογράμματα RAPD-PCR με τον εκκινητή coc-1.

Dice (Tol 1.1%-1.1%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
COC-1

COC-1

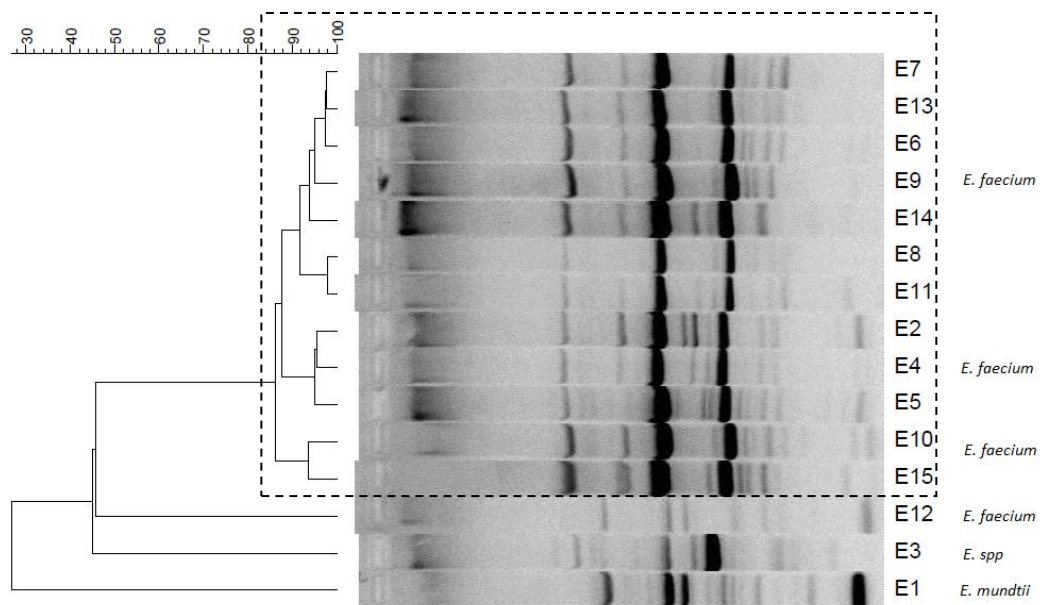


Δενδρόγραμμα coc-1, Δείγμα C

Pearson correlation (Opt:0.53%) [0.0%-100.0%]

COC-1

COC-1

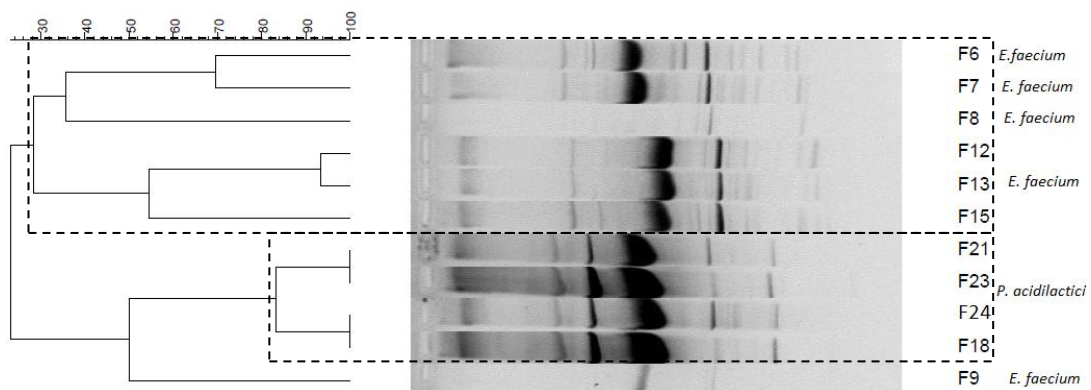


Δενδρόγραμμα coc-1, Δείγμα E.

Dice (Opt:0.74%) (Tol:0.7%-0.7%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

COC-1

COC-1

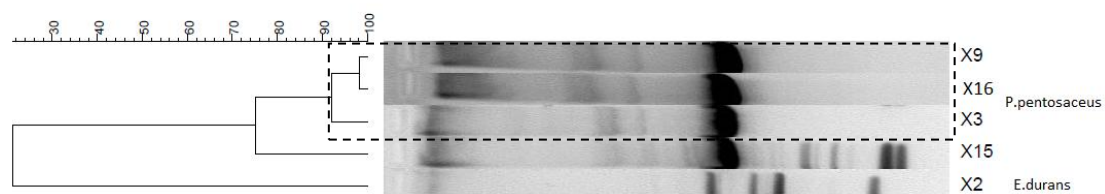


Δενδρόγραμμα coc-1, Δείγμα F

Pearson correlation [0.0%-100.0%]

COC-1

COC-1

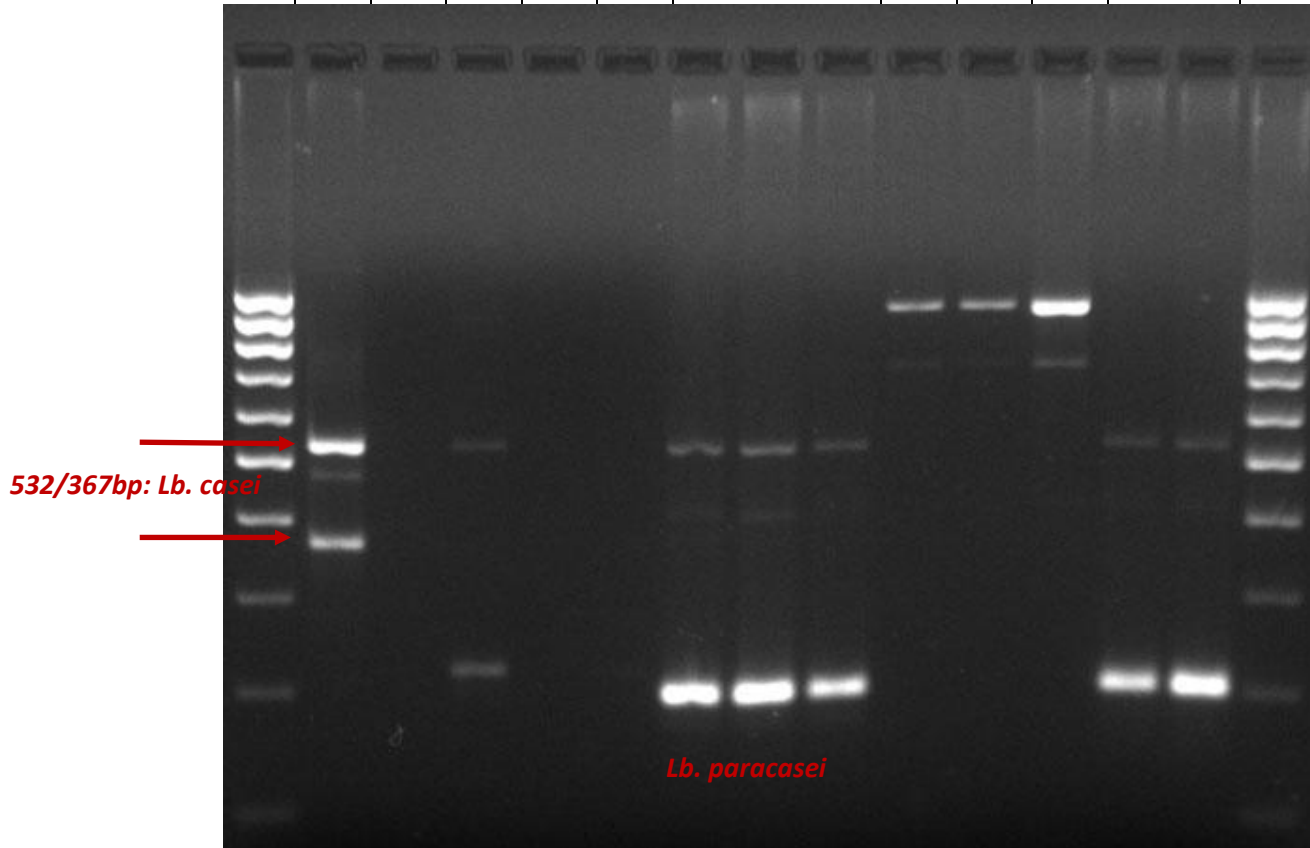


Δενδρόγραμμα coc-1, Δείγμα X

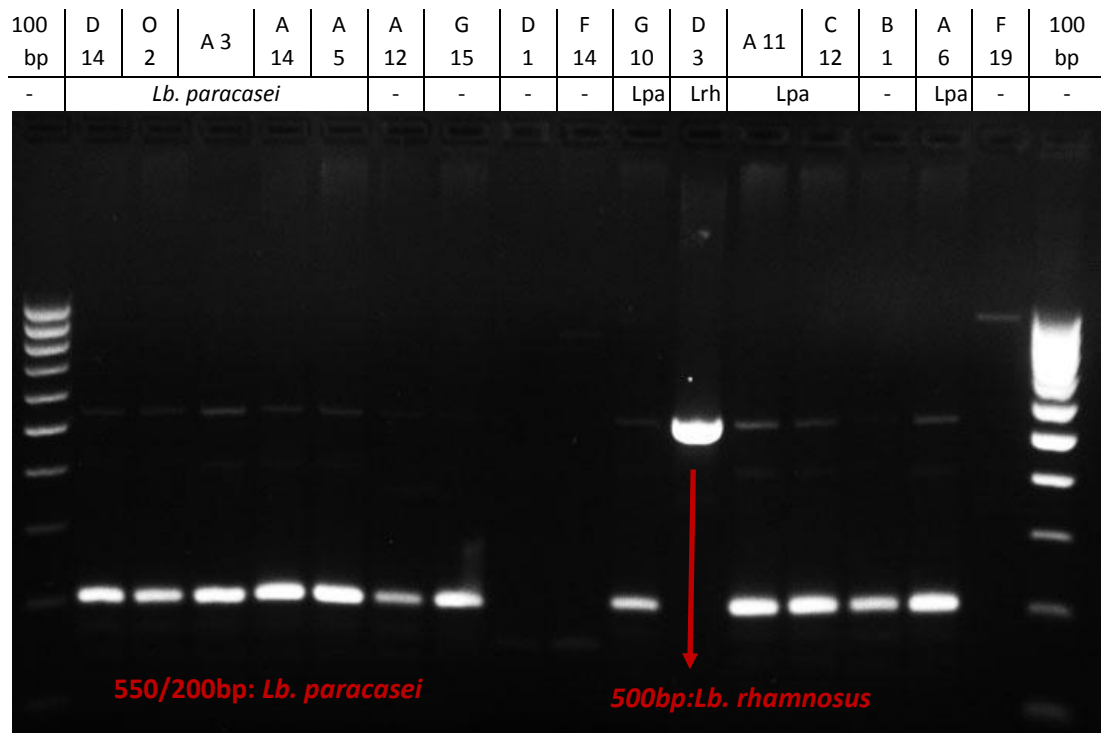
6.6. Πηκτές Αγαρόζης κατά την ταυτοποίηση των στελεχών.

46.1 Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με multiplex-PCR, casei group.

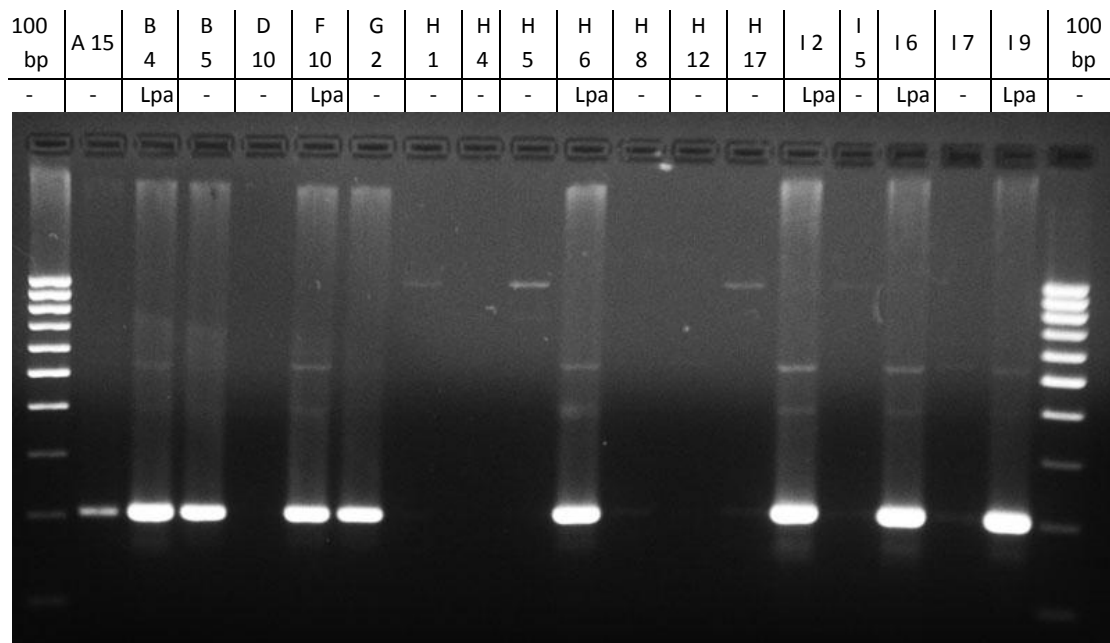
100 bp	Lb. casei	D 10	F 2	F 5	G 6	C 8	D 13	D 4	F 17	F 20	F 16	D 7	A 2	100 bp
-	Lb. casei	-	Lpa	-	-	Lpa			-	-	-	Lpa		-



Εικόνα 6.2 (casei1): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

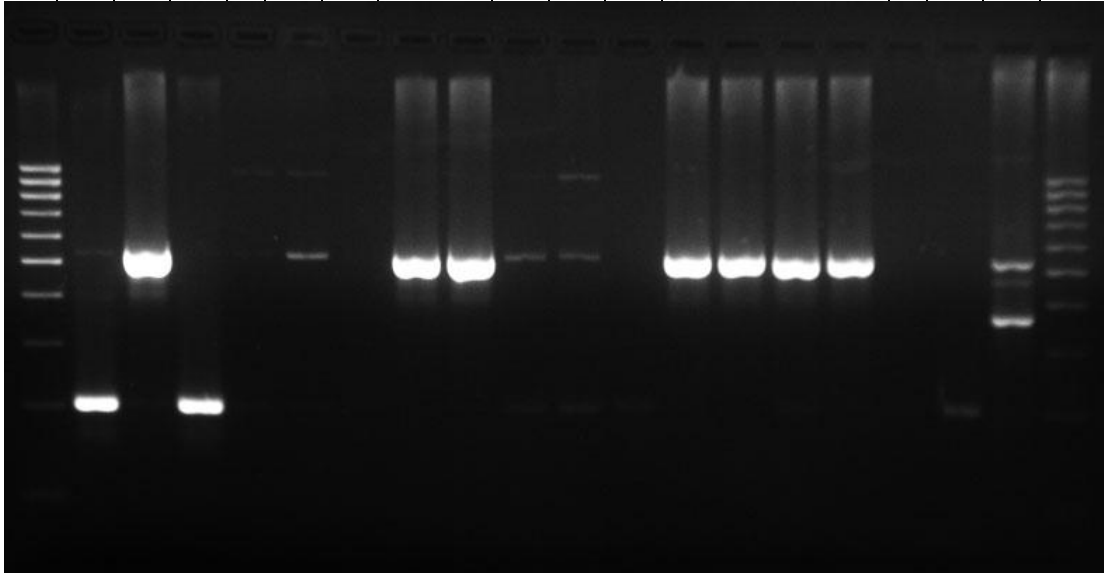


Εικόνα 6.3 (case2): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”



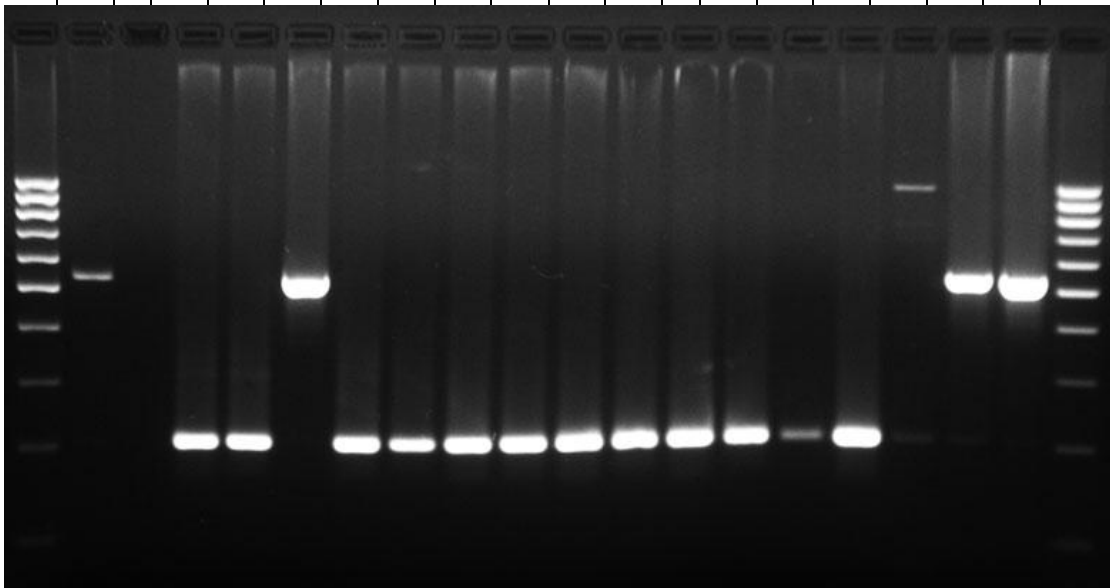
Εικόνα 6.4 (case3): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

100 bp	I 11	I 12	I 13	L 1	L 2	L 3	L 5	L 7	L 10	L 13	L 15	M 1	M 3	M 4	M 5	c -	Co c	casei	100 bp
-	Lpa	Lrh	-	-	-	-	Lrh		Lpa	-	-	<i>Lb. rhamnosus</i>				-	-	Lca	-



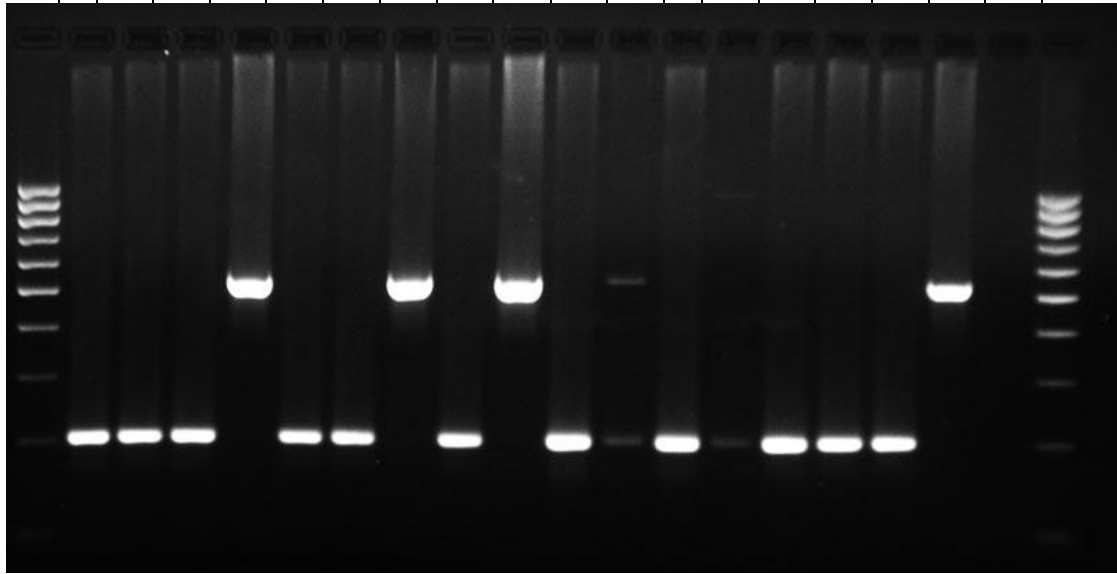
Εικόνα 6.4 (casei4): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

100 bp	M 6	M 7	M 8	M 10	M 13	M 14	M 16	N 1	N 3	N 4	N 5	N 6	N 8	N 9	N 10	N 12	O 2	O 5	100 bp
-	Lrh	-	-	-	Lrh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lrh	Lrh	-



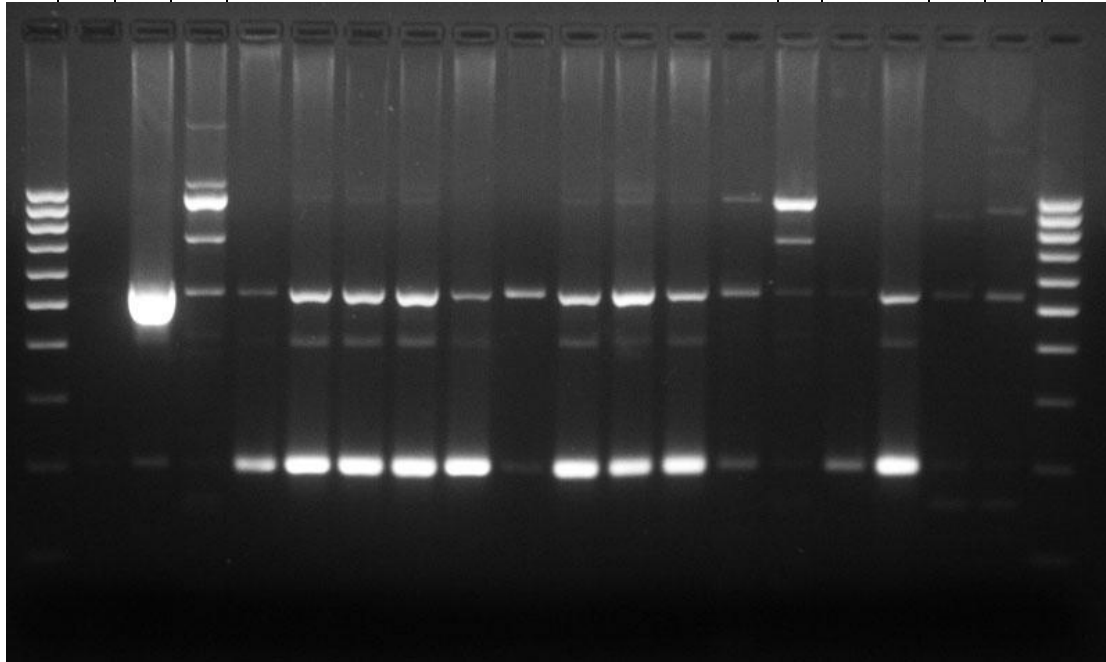
Εικόνα 6.5 (casei5): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

100 bp	O 6	O 8	O9	O10	O 13	O 15	O 16	P 1	P 5	P 15	P 18	R 3	R 11	R 12	R 17	S 10	Lrh	c-	100 bp
-	-	-	-	Lrh	-	-	Lrh	-	Lrh	-	Lpa	-	-	-	-	-	Lrh	-	-

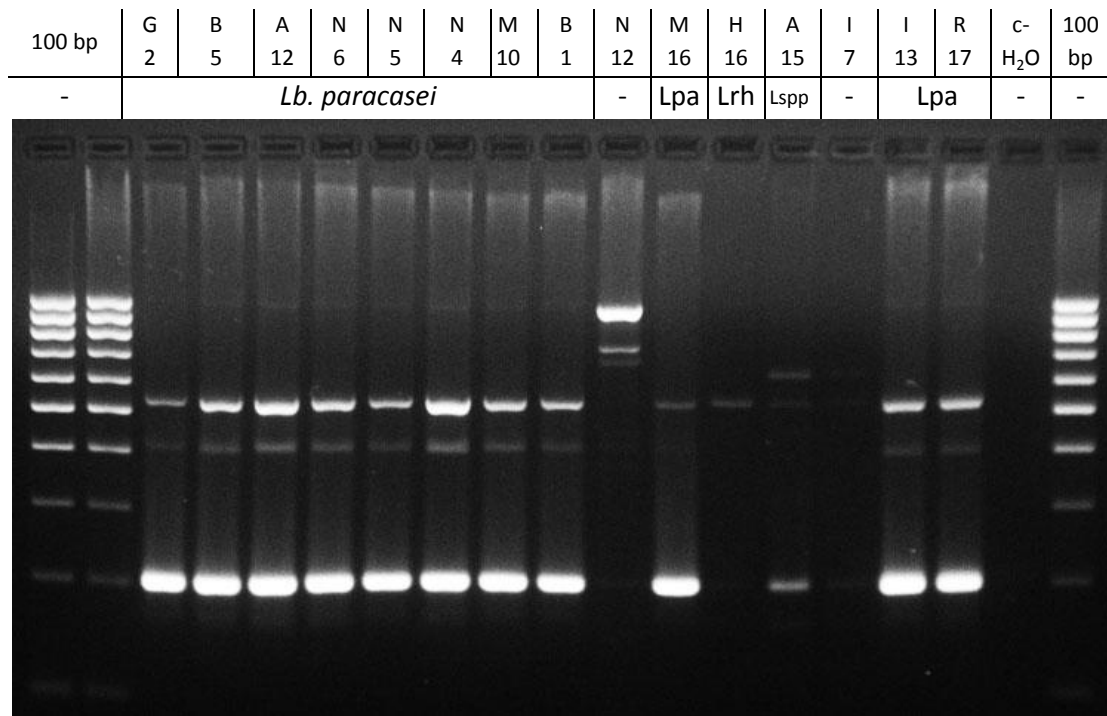


Εικόνα 6.6 (casei6): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

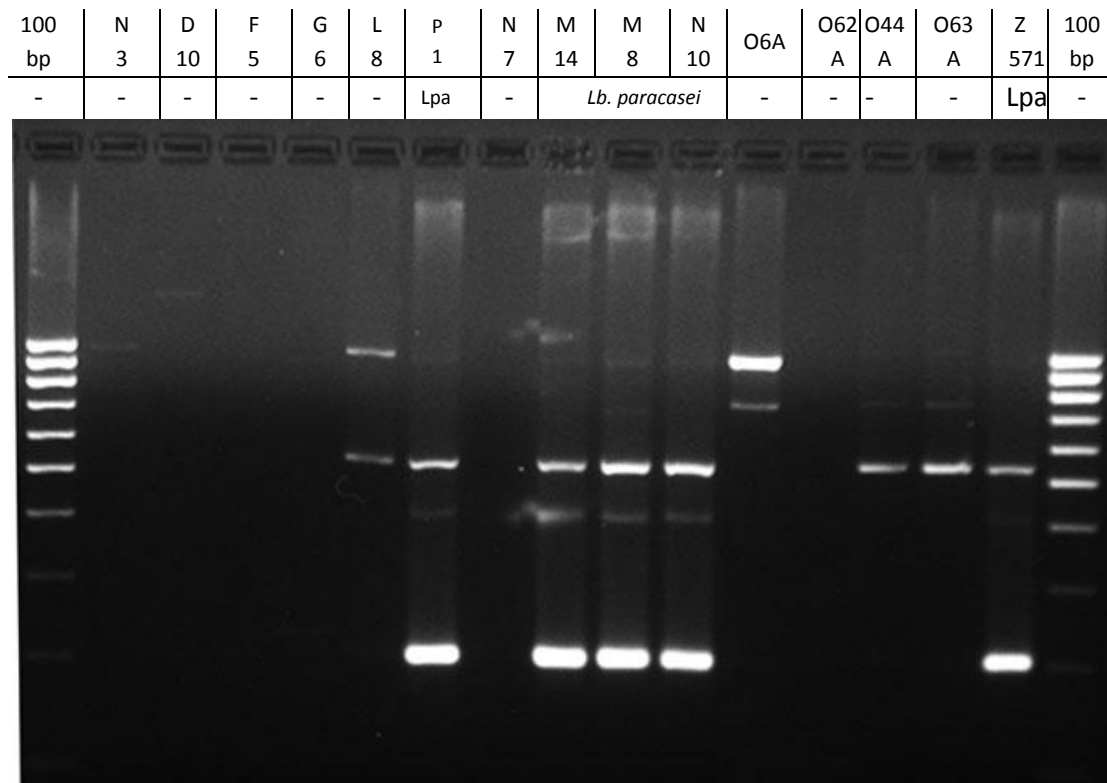
100 bp	U 17	U 19	U 20	X 7	X 10	X 14	X 5	X 11	X 12	Z 1	Z 2	Z 4	Z 6	Z 9	Z 15	Z 17	Z 13	Z 07	100 bp
-	-	Lrh	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>										-	Lpa	-	-	-	



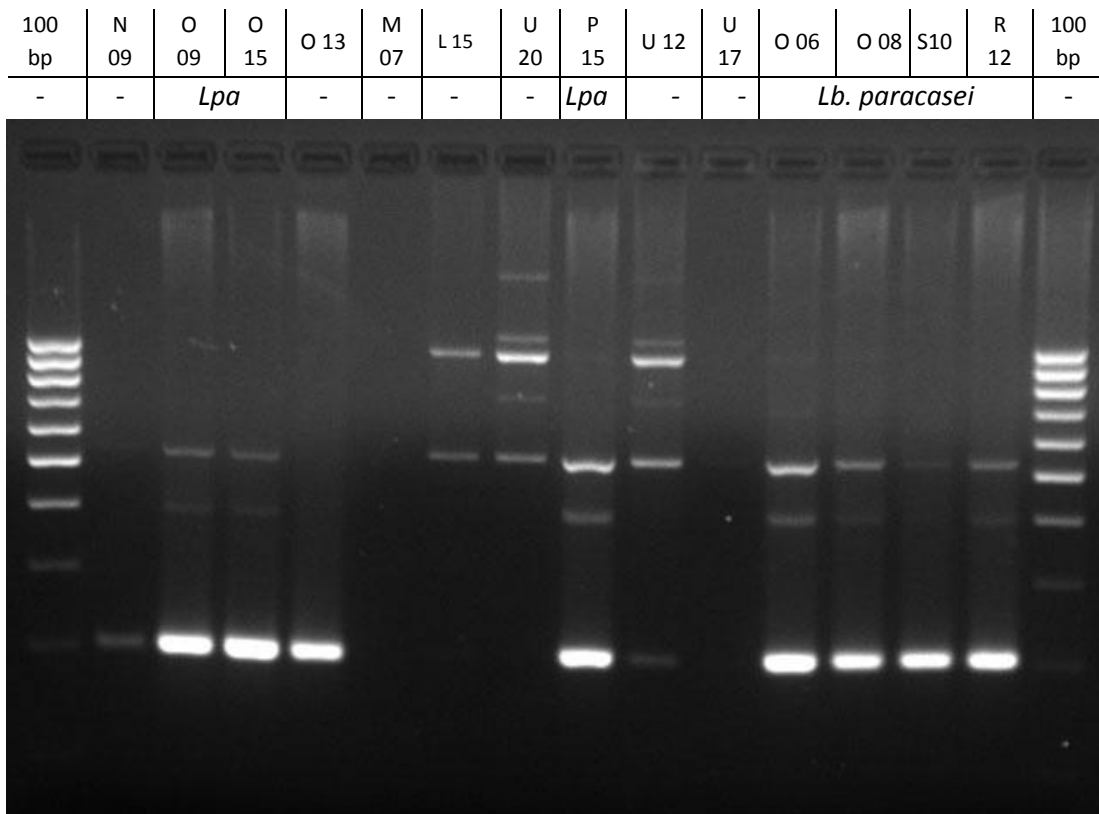
Εικόνα 6.7 (casei8): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”



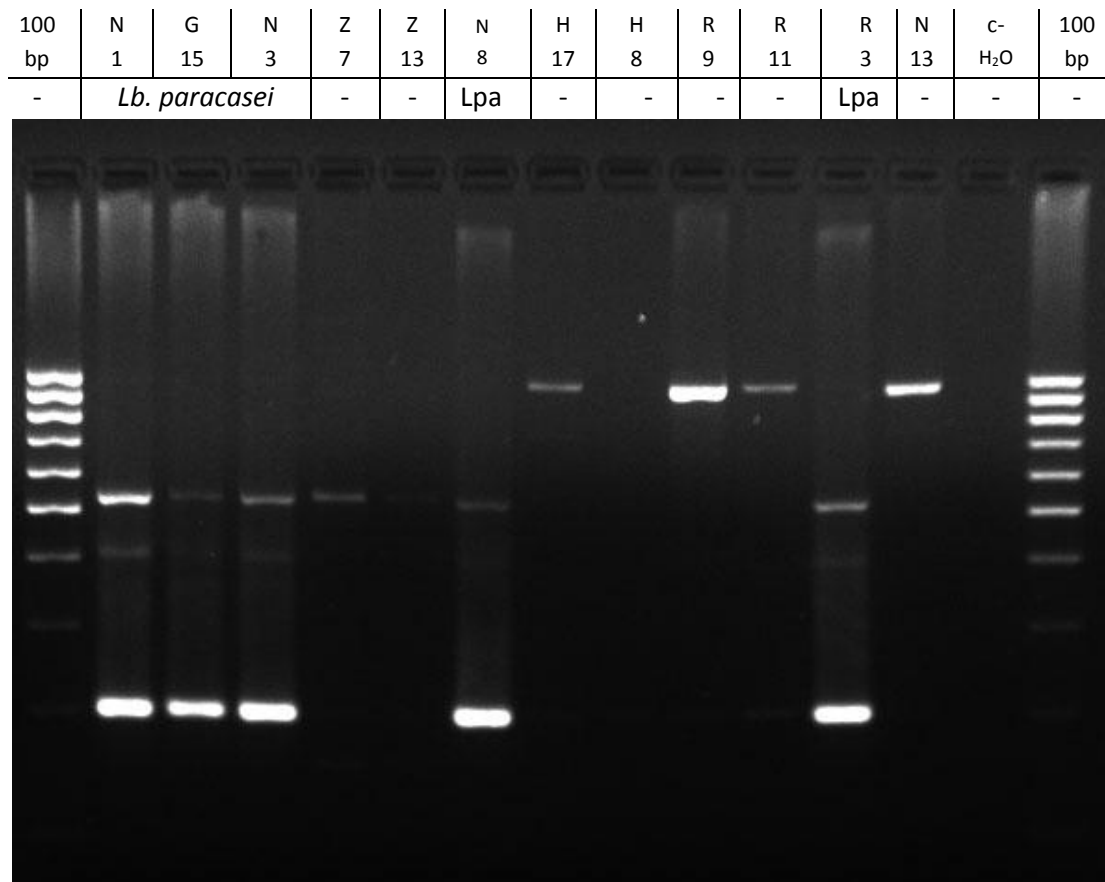
Εικόνα 6.8 (casei9): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”



Εικόνα 6.8 (casei10): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

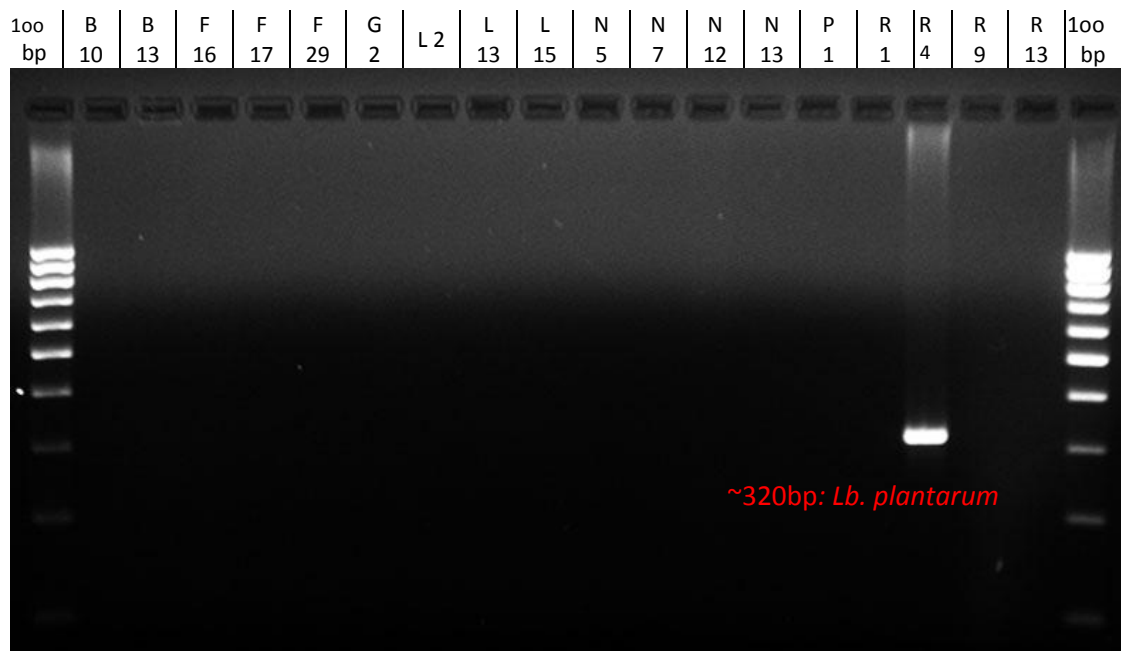


Εικόνα 6.10 (casei11): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”



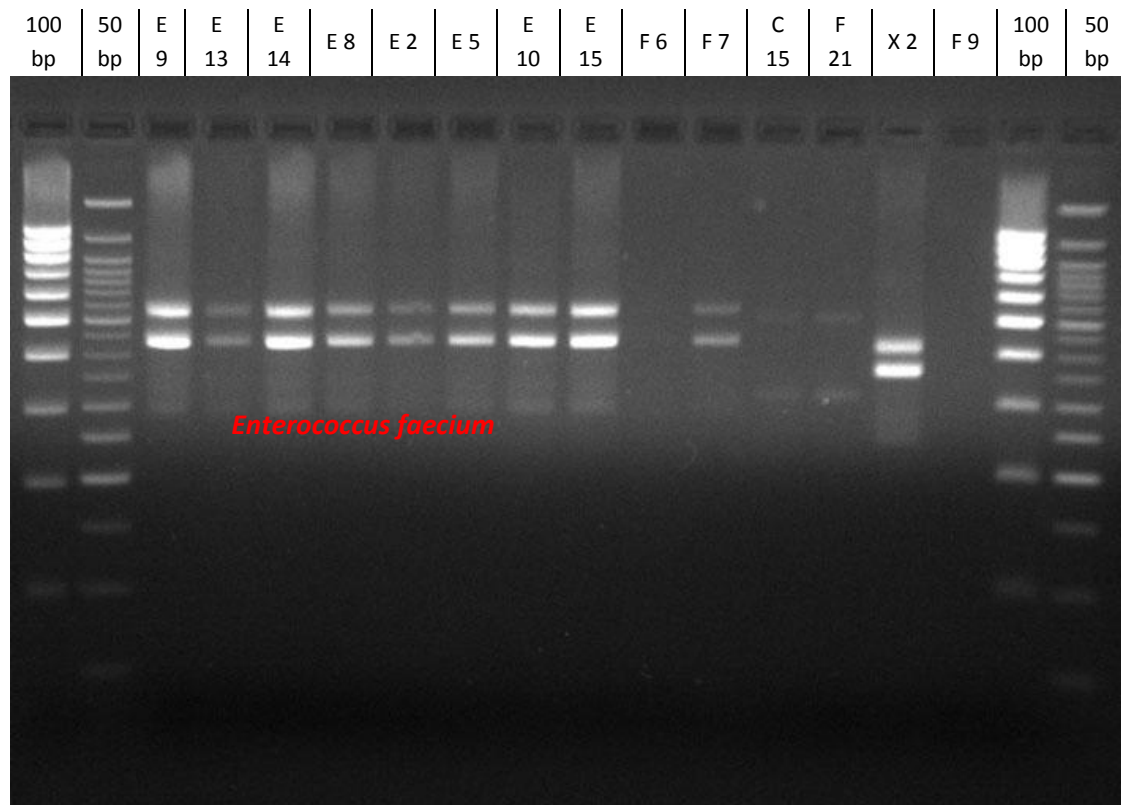
Εικόνα 6.11 (casei12): Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “tuf”

6.6.2. Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με multiplex-PCR, plantarum group.

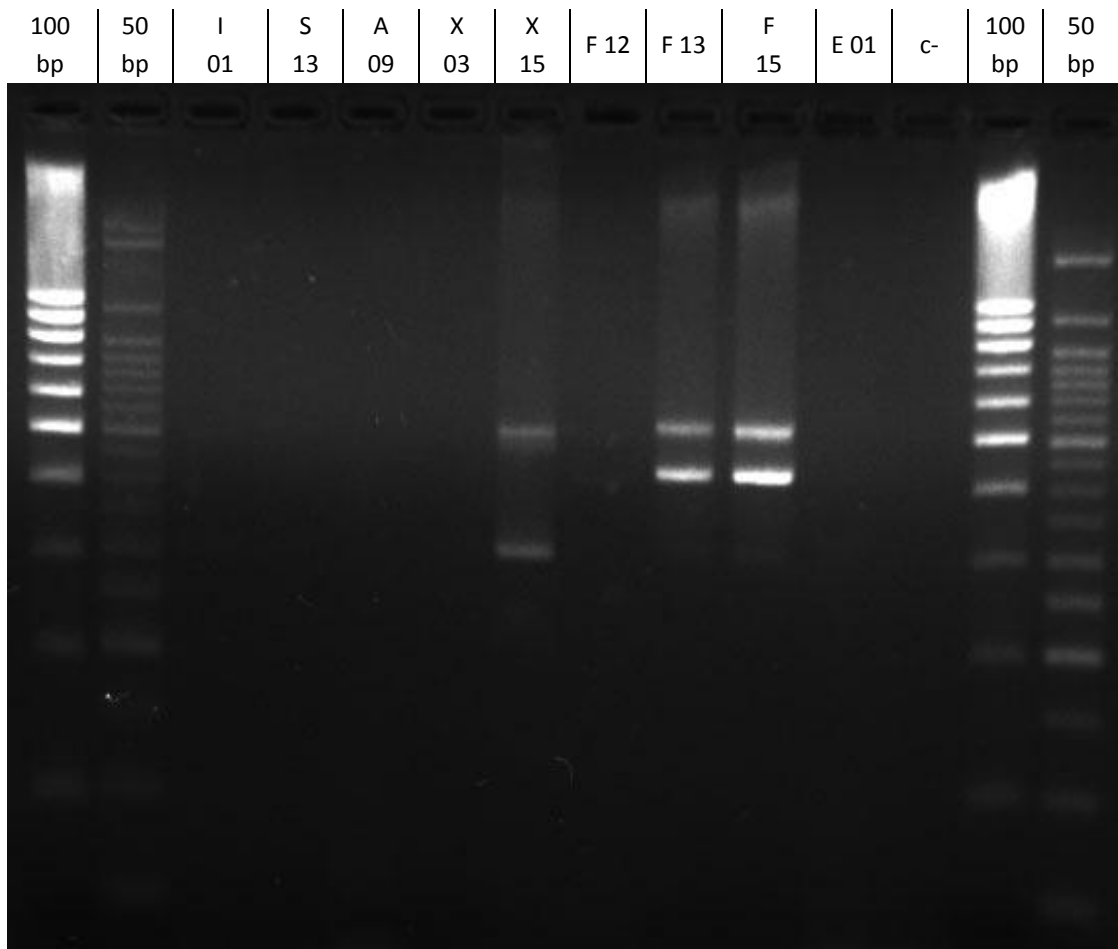


Εικόνα 6.12: Εφαρμογή multiplex-PCR με ενίσχυση γονιδίου “recA”

6.6.3. Πηκτές αγαρόζης ταυτοποίησης με ITS-PCR.



Εικόνα 6.13: Πηκτική ηλεκτροφόρησης για ταυτοποίηση ITS-PCR



Εικόνα 6.14: Πηκτική ηλεκτροφόρησης για ταυτοποίηση ITS-PCR

6.7. Ποσοστιαία σύσταση στελεχών.

Πίνακας 6.1: Ποσοστά στελεχών επί των δειγμάτων των τυριών.															
	Label	Lbr	Lbu	Lca	Lcl	Lcu	Lde	Lfe	Lpa	Lpb	Lpl	Lrh	Lrp	Lspp	Espp
PECM_A_6	S	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.333	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PEPA_C_11	P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	43.75	0.0	0.0	37.5	0.0	0.0	0.0
PEPF_H_3	X	7.692	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	61.538	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PEPL_B_3.5	E	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.667
PFCEB_C_5	O	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	37.5	0.0	0.0	62.5	0.0	0.0	0.0
PFCL_C_4.5	N	0.0	0.0	6.25	0.0	0.0	0.0	37.5	50.0	0.0	0.0	6.25	0.0	0.0	0.0
PFCL_C_7	M	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.333	41.667	0.0	0.0	41.667	0.0	8.333	0.0
PFCL_E_3	T	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.111	0.0	0.0	44.444	44.444	0.0	0.0
PFCL_F_1	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	75.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.667	0.0
PFCL_F_2	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.667	66.667	0.0	0.0	0.0	6.667	0.0
PFCL_G_2	Z	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	43.75	12.5	43.75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PFCL_I_2	L	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.692	53.846	15.385	0.0	0.0	15.385	0.0	0.0	0.0
PFCL_I_3	H	0.0	0.0	0.0	23.077	7.692	0.0	46.154	7.692	0.0	0.0	15.385	0.0	0.0	0.0
PFCL_I_6	I	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.385	53.846	15.385	0.0	7.692	0.000	0.0	0.0
PFCEP_B_5	F	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	20.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PFCEB_D_3	U	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	55.0	25.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0
PFCEB_B_6	G	0.0	9.091	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	54.545	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PFCEP_F_2.5	C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	23.077	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PFCEB_C_3	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	43.750	0.0	6.250	0.0	0.0	0.0	0.0
PFCEB_F_1	D	0.0	14.286	0.0	0.0	0.0	35.714	0.0	28.571	0.0	0.0	21.429	0.0	0.0	0.0
Σύνολο	20	0.362	1.449	0.362	1.087	0.362	5.072	17.029	34.783	4.348	0.362	13.043	1.449	1.449	0.362
N		1.0	4.0	1.0	3.0	1.0	14.0	47.0	96.0	12.0	1.0	36.0	4.0	4.0	1.0

Lbr: *Lactobacillus brevis*; **Lbu:** *Lb. buchneri*; **Lcl:** *Lactococcus lactis* subsp *lactis*; **Lcu:** *Lb. curvatus*; **Lde:** *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii*; **Lfe:** *Lb. Fermentum*; **Lpa:** *Lb. Paracasei*; **Lpb:** *Lb. parabuchneri*; **Lrh:** *Lb. rhamnosus*.

Πίνακας 6.1 (Συνεχισμός): Ποσοστά (%) κάθε στελέχους σε κάθε δείγμα τυριού (συνέχεια).											
	Label	Edu	Efa	Emu	Pac	Ppe	Sma	Sth	Total	N	
PECM_A_6	S	0.0	0.0	0.0	0.0	66.667	0.0	0.0	100.0	3.0	
PEPA_C_11	P	0.0	0.0	0.0	12.5	0.0	6.25	0.0	100.0	16.0	
PEPF_H_3	X	7.692	0.0	0.0	0.0	23.077	0.0	0.0	100.0	13.0	
PEPL_B_3.5	E	0.0	86.667	6.667	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	15.0	
PFCEB_C_5	O	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	16.0	
PFCL_C_4.5	N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	16.0	
PFCL_C_7	M	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	12.0	
PFCL_E_3	T	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	9.0	
PFCL_F_1	A	0.0	0.0	0.0	0.0	8.333	0.0	0.0	100.0	12.0	
PFCL_F_2	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	15.0	
PFCL_G_2	Z	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	16.0	
PFCL_I_2	L	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.692	100.0	13.0	
PFCL_I_3	H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	13.0	

PFCL_I_6	I	0.0	0.0	0.0	7.692	0.0	0.0	0.0	100.0	13.0
PFCP_B_5	F	0.0	35.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	100.0	20.0
PFCS_D_3	U	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	100.0	20.0
PFPS_B_6	G	0.0	36.364	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	11.0
PFP_F_2.5	C	0.0	0.0	0.0	69.231	7.692	0.0	0.0	100.0	13.0
PFS_C_3	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	16.0
PFS_F_1	D	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	14.0
Total		0.362	8.696	0.362	5.797	2.536	0.362	0.362	100.0	
N		1.0	24.0	1.0	16.0	7.0	1.0	1.0		276.0

The label derives from the following: the first two letters are for pasta-filata (**PF**), or pecorino cheese (**PE**).

The following g letter indicates the cheese variety as follows: Caciocavallo Lucano (**CL**), Provolone (**P**), Scarmorza (**S**), Pecorino Lucano (**PL**), Caciocavallo Podolico (**CP**), Provolone semipicante (**PS**), Cacio Bucato, (**CB**), Pecorino Abriola (**PA**), Canestrato di Moliterno (**CM**), Caciocavallo Silano (**CS**), Pecorino Filiano (**PF**).

The last letter is characteristic for the producer (A-F). Finally, the final number show the months of ripening.

Edu: *Enterococcus durans*; **Efa:** *E. faecium*; **Emu:** *E. mundtii*; **Pac:** *Pediococcus acidilactici*; **Ppe:** *P. pentosaceus*; **Sma:** *Streptococcus macedonicus*; **Sth:** *S. thermophilus*

6.8. Στατιστική Ανάλυση πάνω σε mMRS-BPB.

Πίνακας 6.2: Κόμβοι (Nodes) ομαδοποίησης στελεχών για αξιολόγηση mMRS agar.

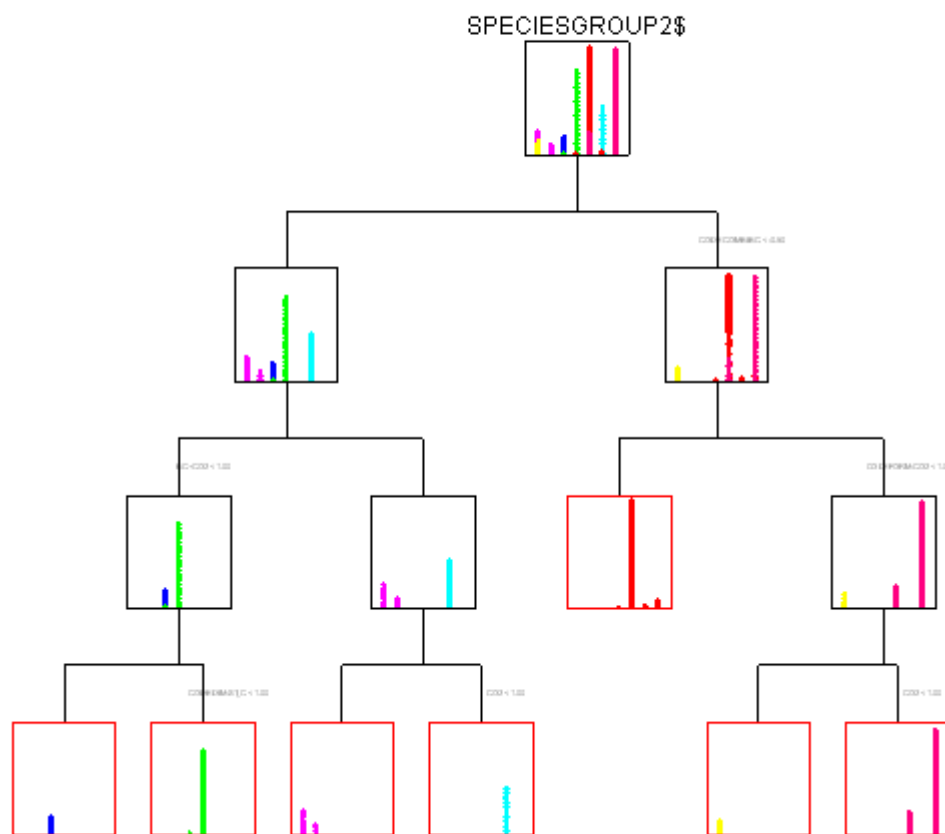
Node1	Node2	Node3	Node4	Node5	Node6	Node7	Node8
Lbu FGJ05	Lpa C4H8	Lcl L42	Lcl L40	Edu ATCC11576	Lcl L49	Ppe 8	Lrh FST3007R
Lpa NGJ10	Lpa R61	Lcl M128	Lcl M107	Efl ATCC14433	Lcl M107	Ppe 9G	Lrh FST9003R
Lpa ZGJ02	Lpa N24	Lem M203	Lcl M116	Ehi LMG6399	Lcl M108	Ppe 12G	Lrh PRA232
	Lrh 5A9T	Lcl M25	Lcl M155	Efa T29G	Lcl M110	Ppe T8	Lrh CI4362
	Lpa N161	Lcl M72	Lcl M77	Efa TO13	Lcl M155	Ppe T9G	Lrh M15
	Lpa N42	Lcl M257	Lcl M90	Efa T019	Lcl M221	Pac T15G	Lrh N178
	Lrh N131	Edur XGJ02	Lcl S402	Pac IGJ01	Lcl M234	Ppe CGJ05	Lrh B170
	Lpa DSMZ5622		Lcl S404		Efa EGJ08	Pac CGJ15	Lrh B172
	Lpla NCIMB12120		Lem M176		Efa EGJ10	Pac FGJ21	Lrh B173
	Lpl TO41		Lem M201		Efa EGJ13	Pac PGJ04	Lrh B175
	Lpa AGJ02		Lem M244		Efa FGJ08	Ppe SGJ13	Lac LMG9433
	Lpa AGJ03		Lemc DSM20346		Efa FGJ09	Pac UGJ11	Ljo LMG9436
	Lpa AGJ06		Sth Str-42		Efa FGJ13	Pac UGJ14	Ldb LMG6901
	Lpa AGJ12		Ssa Str-72				
	Lpa BGJ01		Sth Str-Y3				
	Lpa CGJ08		Lcl L35				
	Lpa CGJ12		Lcl L40				
	Lpa DGJ04		Lcl M109				
	Lbu DGJ10		Lcl M138				
	Emu EGJ01		Lcl M139				
	Lpa GGJ02		Lemm M176				
	Lpa HGJ06		Lem M206				

Lrh PRA331	Lpa Patarata 3	Lpl DPC6421	Lpa Gu T021		Lfe NGJ12	Lfe UGJ20
Lrh CF1350	Lpa NCIMB 30154	Lpl DPC1122	Lpa FP3004R		Lfe RGJ15	
Lrh CF377	Lpa PRSF-L453	Lpl M307	Lpa FP3006R			
Lrh D44	Lpa PRSF-L429		Lpa FST3009R			
Lrh H25	Lpa PRSF-L087		Lpa FP18004R			
Lrh 5D9T	Lpa PRSF-L046		Lpa FP18010R			
Lrh L9	Lpa PRSF-L322		Lpa FST18005R			
Lrh N171	Lpa Gu T024		Lca CI4368			
Lrh N95	Lca strain LC3		Lpa L24			
Lrh N83	Lpa Cst7		Lpa TH406			
Lrh N201	Lpa 3LC		Lpa TH1229			
Lrh N209	Lca DSM20178		Lpa N44			
Lrh N2012	Lpa DSM4905		Lrh N1710			
Lrh N132	Lpa FSL346		Lpa N715			
Lrh N22	Lpa FSL541		Lrh P1E4			
Lrh N26	Lpa DSM20020		Lpa P1E5			
Lrh N812	Lrh C1A3		Lrh B084			
Lrh N1110	Lpa C1B10		Lca B166			
Lrh N21	Lpa C1B3		Lpa B174			
Lrh N172	Lpa C3D10		Lpa CTC1675			
Lrh N2010	Lrh C1B9		Lca LACcas7			
Lrh N2013	Lrh C2A11		Lpl C17-m58			
Lrh N202	Lpa C3E8		Lpla DK36			
Lrh N25	Lpa C4G11		Lpla DKO22			
Lrh N176	Lpa C4G12		Lsk DSM6333			
Lrh N2011	Lrh C2F2		Lsk DSM20017			
Lrh B179	Lrh C2G7		Ban LMG18314			
Lrh DSMZ20021	Lrh C3E11		Bbi LMG11041			
Lrh GG	Lrh C4A2		Blo LMG8811			
Lrh LACcas13	Lpa C2A4		Lpl T038			
Lrh HA111	Lpa C3D2		Lpa AGJ14			
Lrh 2220	Lpa C2D4		Lcu HGJ08			
Lrh TMW 1.1538	Lpa C4F3		Lpa XGJ14			
Lpa AGJ11	Lpa C4F4		Ldd ZGJ07			
Lpa CGJ02	Lpa C4H9		Lpa ZGJ15			
Ldd DGJ01	Lrh DSM20021					
Lpa DGJ13	Lrh NRRL B-442					
Lfe FGJ16	Lrh NRRL B-176					
Lpa IGJ02	Lpa NRRL B-456					
Lrh IGJ12	Lpa PB18L					
Lpa IGJ13	Lpa PB8L					
Lrh LGJ07	Lpa PB4L					
Lrh MGJ03	Lpa PD9L					
Lrh MGJ05	Lpa PD11L					
Lrh MGJ13	Lpa PG16S					
Lpa NGJ06	Lpa C4E12					
Lrh OGJ02	Lpa M100P					
Lpa RGJ12	Lpa M86P					
Lpa XGJ05	Lpa DBTA34					
Lbr XGJ08	Lpa Q2					
Lpa XGJ11	Lpa Q4					
Lpa ZGJ17	Lpa S1					
	Lpa S3					
	Lpa V3					
	Lpa W11					
	Lpa DSG03					
	Lpa DSG05					
	Lpa DSG07					
	Lpa ESG10					

Lpa HSG09					
Lpa PSG06					
Lpa PSG09					
Lpa FST3021					
Lrh PRA204					
Lpa CF143					
Lpa F17					
Lpa H12					
Lpa SP57					
Lpa P71					
Lrh L47					
Lpa I1					
Lpa I2					
Lca N87					
Lpa N76					
Lrh N94					
Lca N811					
Lrh N2014					
Lrh N173					
Lpa I3					
Lpa P1E6, Lpa P2P3					
Lpa B061, Lpa B161					
Lpa B169, Lpa B171					
Lpa B195, Lpa B196					
Lpa B350					
Lrh CTC1676					
Lpa LACcas25					
Lpa LACcas29					
Lrh DIAL 40					
Lpa TMW 1.1444					
Lpa TMW 1.1259					
Lpa TMW 1.300					
Lca LACcas7					
Ban LMG10508					
Lpp MTG30L					
Lpp MTG8L					
Lpp B7N26					
Lpe 5TP, Lpe P13.3					
Lpl 1505, Lpl C17					
Lpl MTD2S					
Lpl WCFS1					
Lpl DPC2183					
Lpl DPC2190					
Lpl DPC2127					
Lpl DPC1115					
Lpl DPC2159					
Lpl DPC1121					
Lpl DPC6429					
Lpl DPC4229					
Lpl DPC2120					
Lpe T022					
Lpp TO63					
Lpl TO50, Lpl T044					
Lpl M308					
Lpa AGJ05					
Lpa BGJ04, Lpa BGJ05					
Lpb BGJ10					
Lrh DGJ03, Lpa DGJ07					
Lpa DGJ14					
Lpa FGJ02					
Lfe FGJ17					
Lpa GGJ10					
Lrh HGJ12					
Lfe HGJ13					
Lpa IGJ09					
Ldd LGJ03					

	Lrh MGJ04					
	Lpb MGJ06					
	Lpa MGJ08					
	Lpa MGJ16					
	Lpa NGJ03					
	Lrh OGJ05					
	Lpa OGJ08					
	Lrh OGJ16					
	Lpa PGJ01					
	Lpa PGJ18					
	Lpa RGJ03					
	Lpl RGJ04					
	Lfe RGJ09					
	Lfe RGJ13					
	Lpa XGJ10					
	Lpa ZGJ01					
	Lpa ZGJ04					
	Lfe ZGJ16					

Decision Tree



6.9. Ερμηνευτικό λεξικό και συντομεύσεις

Λεξικό.

Amplification=Ενίσχυση
Annealing=Αναδιάταξη
Cluster=Συστάδα
Components=Συνιστώσες
Correlation matrix: Μήτρα Συσχέτισης
Denaturation= μετουσίωση
Elongation=Επιμήκυνση
FAA: Ελεύθερα Αμινοξέα (Free Amino Acids)
Fingerprint=Αποτύπωμα
Normalization=κανονικοποίηση
Primer=Εκκινητής
Purification=Καθαρισμός
Starters=Εκκινητές
Streaking=Γραμμική εξάπλωση

Πίνακας 6.3: Συντομογραφίες

BPB	Κυανούν της Βρωμοφαινόλης (BromoPhenol Blue)
bp	Ζεύγη βάσεων
CLd	Caciocavallo Lucano dolce
LAB	Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria)
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
NSLAB	Non-Starter Lactic Acid Bacteria
NWCs	Φυσικές Καλλιέργειες Ορού (Natural Whey Starters)
PAB	Προπιονικά Βακτήρια (propionic acid bacteria)
PCA	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
PE	Τυριά “pecorino”
PF	Τυριά “pasta-filata”
PR _{xx}	RAPD-profile, xx: αριθμός στελέχους
RAPD	(Rapid Amplified Polymorphic DNA)
S/W	Αλάτι στην υδατική φάση (Salt in moisture)
SLAB	Starter Lactic Acid Bacteria
ΠΟΠ	Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης
ΠΓΕ	Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης