

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ “ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ”
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Η μικροχλωρίδα της Ελληνικής παραδοσιακής Φέτας και το
αντιμικροβιακό της δυναμικό”**

ΧΑΡΜΠΗ Γ. ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Επιβλέπουσα: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ “ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ”
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**‘‘Η μικροχλωρίδα της Ελληνικής παραδοσιακής Φέτας και το
αντιμικροβιακό της δυναμικό’’**

ΧΑΡΜΠΗ Γ. ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Επιβλέπουσα: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**‘Η μικροχλωρίδα της Ελληνικής παραδοσιακής Φέτας και το
αντιμικροβιακό της δυναμικό’**

ΧΑΡΜΠΗ Γ. ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μέλη: Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτης Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Φέτα είναι η ναυαρχίδα των Ελληνικών τυριών ΠΟΠ. Είναι ένα μαλακό λευκό τυρί που ωριμάζει σε άλμη. Παρασκευάζεται σε όλη την Ελλάδα με συγκεκριμένη τεχνολογία από πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και αίγειου γάλακτος, με το ποσοστό του δεύτερου να μην ξεπερνά το 30%. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η συνολική μικροχλωρίδα δύο παραδοσιακών τυριών Φέτας, που παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη εναρκτηρίων καλλιιεργειών, από τις περιοχές του Αγρινίου και της Κορίνθου, με κλασσικές μικροβιολογικές αλλά και σύγχρονες μοριακές μεθόδους. Αξίζει να σημειωθεί πως πρόκειται για την πρώτη μεταγονιδιωματική ανάλυση σε τυρί Φέτα. Χρησιμοποιώντας επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης, η κλασική μικροβιολογική ανάλυση αποκάλυψε ότι οι κυρίαρχες μικροβιολογικές ομάδες ήταν οι μεσόφιλοι και θερμόφιλοι κόκκοι, οι θερμόφιλοι βάκιλλοι και οι ζύμες. Συνολικά απομονώθηκαν 103 βακτήρια και 5 ζύμες. Τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική της *rep*-PCR και 19 αντιπροσωπευτικές απομονώσεις προσδιορίστηκαν σε επίπεδο είδους με ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA. Από την ταυτοποίηση προέκυψε πως όλες οι απομονώσεις άνηκαν στο γένος *Lactobacillus spp.*, δείχνοντας έτσι τον περιορισμό της επιλεκτικότητας των μέσων που χρησιμοποιούνται. Για τη μεταγονιδιωματική ανάλυση εφαρμόστηκε πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας και η ανάλυση των δεδομένων της μεταγονιδιωματικής έγινε με το διακομιστή MG-RAST. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, η οποία έδειξε ότι η μικροχλωρίδα της Φέτας αποτελείται από πληθώρα ειδών, με τον *Lactococcus lactis* να κυριαρχεί. Τέλος, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση 50 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δύο τυριά. Από τα εξεταζόμενα παραγωγά στελέχη, το στέλεχος *Lactobacillus casei* ATC2a παρουσίασε ανάσχεση της ανάπτυξης του στελέχους *Streptococcus pneumoniae* LMG 14545^T, ο οποίος είναι η κύρια αιτία της πνευμονίας.

ABSTRACT

Feta cheese is the flagship of the Greek PDO cheeses. It is a soft brined cheese manufactured throughout Greece from sheep milk or mixtures of sheep and goat milk up to 30%. In the present study, two traditionally produced Feta cheese samples, without the addition of starter cultures, from the regions of Agrinio and Korinthos, were studied. Towards this, both the conventional microbiological analysis as well as the metagenomics approach were implemented. Using selective growth media and conditions, the classical microbiological analysis revealed that mesophilic and thermophilic cocci, thermophilic rods and yeasts were the dominant microbiological groups. A total of 103 bacteria and 5 yeast isolates were selected for further analysis. These bacterial isolates were grouped using the genotyping technique of repetitive element sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) and 19 representative bacterial isolates were identified at the species level through 16S rDNA gene sequencing (bacteria). The identification revealed that all isolates belonged to the genus *Lactobacillus* spp., showing that these media favored the growth of *Lactobacilli* and the limitation of classical microbiological approach due to the nonselective media used. For the metagenomics analysis, a protocol developed in our laboratory has been applied and the DNA samples and analyzed on the MG-RAST server. This is the first report on the metagenomic analysis of the microbial diversity of traditional Feta cheese. The results of metagenomic analysis, showed that the microflora of Feta consists of a variety of species, with the species *Lactococcus Lactis* being the dominant one. Finally, we examined the antimicrobial potential of 50 strains of lactic acid bacteria isolated from both cheeses. The strain of *Lactobacillus casei* ATC2a presented antimicrobial activity of *Streptococcus pneumoniae* LMG 14545^T, the bacteria which is the major cause of pneumonia.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η Διπλωματική εργασία αυτή, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, με κατεύθυνση: "Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων ". Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τη συνδρομή τους στην εκπόνηση της εργασίας αυτής:

Πρώτα την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, κ. Έφη Τσακαλίδου, για τη σημαντική βοήθεια, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις άμεσες απαντήσεις σε ότι την χρειάστηκα. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός ότι με συμπεριέλαβε στο εν λόγω εργαστήριο, δίνοντάς μου την ευκαιρία να δουλέψω σε ένα περιβάλλον με άριστη οργάνωση και συνέπεια. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση και της συμβουλές της, στο πειραματικό και το συγγραφικό μέρος της εργασίας.

Τους κ.κ., Ευστάθιο Πανάγου και Παναγιώτη Σκανδάμη, Επίκουρους Καθηγητές για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής επίβλεψης και αξιολόγησης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Ράνια Αναστασίου και την Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη για όλες τις πολύτιμες συμβουλές, το χρόνο και την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Ακόμη, ευχαριστώ την Δρ. Γεωργία Ζουμπουλάκη για την ανεκτίμητη βοήθειά της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις υποψήφιες διδάκτωρες Βούλα Αλεξανδράκη, Μαρία Κάζου, για την πολύ σημαντική βοήθεια, στήριξη και το χρόνο που αφιέρωσαν σε όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για την άψογη συνεργασία μας και τη συμπαράστασή τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη και συμπαράσταση τους σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστώ από καρδιάς,

Χριστίνα Χαρμπί

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η ιστορία της ελληνικής τυροκομίας	8
1.2 Η ιστορία του ελληνικού τυριού	10
1.3 Η τυροκομία στην Ελλάδα σήμερα	11
1.4 Ελληνικά τυριά ΠΟΠ	12
1.4.1. Η περίπτωση κατοχύρωσης της Φέτας	15
1.5 Οικονομικά στοιχεία	16
1.5.1. Η ζήτηση	21
1.5.2. Η προσφορά του κλάδου	22
1.5.3. Πρωτογενής παραγωγή γάλακτος	23
1.5.4. Η αγορά των τυροκομικών προϊόντων	24
2. Γενικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα	27
2.1 Χημικές και μικροβιολογικές ιδιότητες της Φέτας	29
2.2 Στάδια παραγωγής Φέτας	30
3. Οξυγαλακτικά βακτήρια	36
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων	36
3.2 Ταξινόμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων	37
3.3 Μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων	40
3.4 Μεταβολισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων	41
3.4.1 Μεταβολισμός σακχάρων	42
3.4.2. Πρωτεόλυση και λιπόλυση	45
3.5 Αντιμικροβιακό δυναμικό οξυγαλακτικών βακτηρίων	46
3.5.1 Βακτηριοσίνες	47
3.6 Μεταγονιδιωματική ανάλυση	54
3.7 Σκοπός της μελέτης	59
4. Υλικά και μέθοδοι	60
4.1 Προέλευση στελεχών	60
4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις	60
4.3 Καθαρισμός στελεχών	62

4.3.1. Χρώση Gram	63
4.3.2 Δοκιμή καταλάσης	63
4.3.3 Συντήρηση	63
4.4 Απομόνωση DNA από βακτήρια	64
4.4.1 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA	66
4.5 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR	66
4.6 Ταυτοποίηση στελεχών με βάση την αλληλούχηση του 16S rDNA	70
4.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση	73
4.8 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης	76
5. Αποτελέσματα- Συζήτηση	79
5.1 Γενικά	79
5.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις	80
5.3 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR	86
5.4 Ταυτοποίηση στελεχών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA	88
5.5 Μεταγονιδιωματική ανάλυση	94
5.6 Αντιμικροβιακή δράση στελεχών	102
6. Συμπεράσματα	106
7. Βιβλιογραφία	107
8. Παράρτημα	123

Συντομογραφίες

ΕΕ: Ευρωπαϊκή Ένωση

ΕΛΣΤΑΤ: Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία

ΕΛΟΓΑΚ: Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος και Κρέατος

ΕΠΙΠ: Εγγυημένα Παραδοσιακά Ιδιότυπα Προϊόντα

ΚαΠ: Κοινή αγροτική Πολιτική

ΟΠΕΓΕΠ: Οργανισμός Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων

ΠΓΕ: Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη και ονομασιών προέλευσης

ΠΟΠ: Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης

CETA: Comprehensive Economic and Trade Agreement, Canada-EU

GRAS: Generally Regarded As Safe

1. Εισαγωγή

1.1 Η ιστορία της Ελληνικής τυροκομίας

Η τυροκομία στην Ελλάδα, όπως και σε άλλες χώρες, μέχρι και τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, δεν χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη τεχνολογική εξέλιξη. Η παραγωγή τυριών γινόταν σε μικρά τυροκομεία οικογενειακής μορφής ή σε μικρές βιοτεχνίες. Ο παραδοσιακός αυτός τρόπος παραγωγής τους είχε έναν τοπικό χαρακτήρα που διατηρείται και αναγνωρίζεται μέχρι και σήμερα και μάλιστα προστατεύεται από την εθνική και κοινοτική νομοθεσία.

Μέχρι και το τέλος του Β' παγκοσμίου πολέμου η εξέλιξη της τυροκομίας προχωρεί με αργό ρυθμό. Την εικόνα της συνέθεταν 1.300 περίπου τυροκομεία, διάσπαρτα σε όλη την χώρα, με δυναμικότητα σε ημερήσια εισκόμιση και επεξεργασία που έφτανε τα 100- 2000 κιλά γάλακτος. Η είσοδος της χώρας μας στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα το 1981 τη φέρνει αντιμέτωπη με έναν δύσκολο ανταγωνισμό. Οι δυσμενέστερες συνθήκες στην πρωτογενή παραγωγή και το κατά πολύ μεγαλύτερο κόστος παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων στην χώρα μας, σε συνδυασμό με τα άλυτα διαθρωτικά προβλήματα του κλάδου, του στέρησαν την όποια ανταγωνιστική ικανότητα.

Η απόκτηση γνώσεων χημείας και μικροβιολογίας άλλαξε σταδιακά την κατάσταση και στην αρχή του 20^{ου} αιώνα, και με την ταυτόχρονη ανάπτυξη του κτηνοτροφικού τομέα, η τυροκομία χάραξε μία νέα πορεία. Στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα οι συνεταιριστικές προσπάθειες με την συνδρομή της Αγροτικής Τράπεζας Ελλάδος αλλά και με κάποιες ιδιωτικές πρωτοβουλίες αλλάζουν το τοπίο με τη λειτουργία σύγχρονων εργοστασίων μεγάλης δυναμικότητας τυροκόμησης αιγοπρόβειου και αγελαδινού γάλακτος. Το τέλος του 20^{ου} αιώνα χαρακτηρίζεται από την είσοδο στον τομέα της τυροκομίας, μεγάλων βιομηχανιών που δραστηριοποιούνταν ήδη στο χώρο του γάλακτος ή και των τροφίμων γενικότερα. Εξαγοράζονται πρώην συνεταιριστικά ή μικρά τοπικά τυροκομεία, τα οποία αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς.

Παρόλα αυτά, ο παραδοσιακός χαρακτήρας της Ελληνικής τυροκομίας δεν αλλάζει ριζικά. Βασικό χαρακτηριστικό του κλάδου παραμένει ο μεγάλος αριθμός παραγωγικών

επιχειρήσεων, με την πλειοψηφία αυτών να περιλαμβάνει μονάδες μικρού κυρίως μεγέθους και παραγωγικής δυναμικότητας.

Ο 21^{ος} αιώνας βρίσκει την τυροκομία μας με ένα μεγάλο αριθμό μικρών τυροκομικών εγκαταστάσεων. που επεξεργάζονται λιγότερους από 500 τόνους αιγοπρόβειο γάλα ετησίως. Λαμβάνοντας υπόψη και τη χαμηλή αξιοποίηση των πάγιων κεφαλαίων των τυροκομείων που επεξεργάζονται αιγοπρόβειο γάλα (λειτουργούν 180 ημέρες το χρόνο, λόγω της διακύμανσης της εισκόμισης γάλακτος στη διάρκεια του χρόνου εξ αιτίας τη εποχικότητας στη παραγωγή του αιγοπρόβειου γάλακτος), η ανταγωνιστικότητα των προϊόντων τους είναι χαμηλή έναντι των τυριών από αγελαδινό γάλα, αφού απαιτούνται 2,5 φορές μεγαλύτερα πάγια έξοδα (Παππάς και Καλατζόπουλος, 2007).

Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός των ειδικών κλιματολογικών συνθηκών της Ελλάδας και το έντονο ανάγλυφο των περιοχών, διατηρούν τη διαθεσιμότητα κυρίως του αιγοπρόβειου γάλακτος με αποτέλεσμα την στήριξη του κλάδου. Επομένως, κερδισμένα, και προς όφελος των τοπικών οικονομιών, είναι τα τυροκομεία που παράγουν αιγοπρόβεια τυριά. Κατάφεραν να διατηρήσουν την παρουσία τους στην αγορά, προτείνοντας τυριά με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με την περιοχή παραγωγή τους.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο παραγωγικός τομέας του κλάδου στηρίζεται στην πρωτογενή παραγωγή γεωργικών εκμεταλλεύσεων. Οι εν λόγω μονάδες χαρακτηρίζονται από μεγάλη διασπορά και χαμηλή παραγωγική δυναμικότητα, και συνήθως στερούνται του απαιτούμενου σύγχρονου μηχανολογικού εξοπλισμού. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες εγχώριες μονάδες παραγωγής τυροκομικών αρκετές φορές προμηθεύονται την πρώτη ύλη (κυρίως το αγελαδινό γάλα) και από το εξωτερικό για να καλύψουν τις ανάγκες τους.

Καταλήγοντας, η Ελληνική τυροκομία σήμερα είναι μία ώριμη αγορά με ικανοποιητική εσωτερική κατανάλωση και με συνεχή αύξηση των εξαγωγών, κυρίως των τυριών ΠΟΠ. Ο καταναλωτής, διαπιστώνεται ότι επιλέγει κατά βάση Ελληνικά προϊόντα, με προτίμηση τα τυριά ΠΟΠ, καθώς θεωρεί ότι είναι πιο ποιοτικά.

1.2 Η ιστορία του Ελληνικού τυριού

Σήμερα και σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, ως τυρί νοείται το προϊόν ωρίμανσης του πήγματος του γάλακτος που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλο στον επιθυμητό βαθμό και το οποίο παρασκευάστηκε με την δράση πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε πλήρες γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδας, προβάτου, κατσίκας, θηλυκού βουβαλιού και μίγμα αυτών), ή σε αποβουτυρωμένο γάλα, ή σε μίγμα αυτών, ή και σε μίγμα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 83, ενότητα Α1)

Για τα περισσότερα τυριά που κυκλοφορούν στην αγορά, δεν είναι γνωστή με βεβαιότητα η προέλευση και η χρονολογία που πρωτοπαρασκευάστηκαν. Υποστηρίζεται πως το πρώτο Ελληνικό τυρί ήταν από αιγοπρόβειο γάλα, που αναφέρεται στην Ομηρική εποχή και η εξέλιξή του έδωσε την σημερινή Φέτα.

Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το τυρί ένα εξαιρετικό τρόφιμο και στα κείμενα πολλών Ελλήνων συγγραφέων γίνεται συχνά λόγος για αυτό. Οι περιπλανήσεις του Οδυσσέα και των συντρόφων του μας πληροφορούν ότι το τυρί ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένο στις παραμεσόγειες περιοχές κατά τον 8^ο π.χ. αιώνα. Ο Ιπποκράτης (460- 356 π.χ.) αναφέρει ότι το γάλα της κατσίκας και της φοράδας χρησιμοποιούνταν στην Ελλάδα για την παρασκευή τυριών. Οι Ελληνικές εδαφοκλιματικές συνθήκες είναι υπεύθυνες για την διαμόρφωση της πρώτης τυροκόμησης στην χώρα μας. Τα διάφορα πήγματα της αυθόρμητης οξύνισης, είναι τα βασικά τυριά που λόγω της οξύτητας τους διατηρούνταν σε ασκούς από δέρματα των σφαζόμενων ζώων (Καραμήτρου- Μεντεσίδη, 2007).

Η Φέτα ξεκινά την ιστορία της στο σπίτι του κτηνοτρόφου. Η παραγωγή της λάμβανε μέρος τους χειμερινούς μήνες, σε πεδινές κυρίως περιοχές, διότι δεν υπήρχε η δυνατότητα συντήρησής της σε ψυγεία. Σε θερμοκρασία 30 -35 °C το γάλα πήζει με την πυτιά, ξινίζει και στη συνέχεια ωριμάζει, με την ανάπτυξη μικροχλωρίδας (Ζυγούρης, 1914).

Το Ελληνικό Κεφαλοτύρι που παραλλάσσεται ανά περιοχή, είναι ο πρόγονος των σκληρών αναθερμασμένων τυριών μας. Το 1825 σε τιμοκατάλογο τροφίμων δημοσιευμένο σε εφημερίδα, αναφέρεται η τιμή Κεφαλοτυριού (Εφημερίδα Αθηνών, Αριθμ. 59, 28.04.1825-Ψύλας). Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ξεκινά να εφαρμόζεται η αναθέρμανση. Το τυρόπηγμα

αναθερμαίνεται και μαλάζεται με μορφή πάστας και έτσι δημιουργείται η οικογένεια των ελληνικών Κασεριών.

Τα τυριά τυρογάλακτος εμφανίστηκαν από τις πρώτες περιόδους της τυροκομίας κατά τη διάρκεια της Βυζαντινής αυτοκρατορίας στην Ελλάδα αξιοποιώντας μέρος των συστατικών του γάλακτος που αποβάλλονταν στον ορό. Με συνεχιζόμενη θέρμανση καταβυθίζονται οι πρωτεΐνες του ορού για να συλλεχθούν σε ειδικά καλούπια ως υποπροϊόντα πλούσια σε λίπος και υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, γνωστά ως μυζήθρες. Τα τουλουμοτύρια και τα λευκά τυριά αλοιφώδους υφής εμφανίζονται και αυτά από τις αρχές της τυροκόμησης στην Ελλάδα. Παράγονται σε ορεινές συνήθως περιοχές στο τέλος της γαλακτικής περιόδου του αιγοπρόβειου γάλακτος, τους καλοκαιρινούς μήνες.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα τα προϊόντα των τυροκομείων ήταν η Φέτα από τα μαλακά τυριά άλμης, με παραλλαγές όπως ο Τελεμές στην Βόρεια Ελλάδα, οι βελτιωμένες ομάδες των Κεφαλοτυριών, τα Κασέρια, τα τυριά τυρογάλακτος τύπου μυζήθρας, τα Τουλουμοτύρια αλοιφώδους υφής και τα υποπροϊόντα βουτύρου.

1.3 Η τυροκομία στην Ελλάδα σήμερα

Ο κλάδος των γαλακτοκομικών προϊόντων κατέχει εξέχουσα θέση στον κλάδο των τροφίμων. Η κατά κεφαλή κατανάλωση τυριού στην Ελλάδα φτάνει τα 30 κιλά ανά έτος, κατατάσσοντας την Ελλάδα μαζί με την Γαλλία πρώτες διεθνώς (ΕΛΣΤΑΤ).

Η τυροκομία σήμερα αποκτά ολοένα και περισσότερο βιομηχανικό χαρακτήρα, με την εφαρμογή νέων τεχνολογιών και τη δημιουργία σύγχρονων μονάδων. Σημαντική επίδραση στον τρόπο οργάνωσης και λειτουργίας των τυροκομικών μονάδων ήταν αφενός η υποχρεωτική εφαρμογή του συστήματος HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point-Ανάλυση Κινδύνων Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου) και αφετέρου η αυξανόμενη ζήτηση για συσκευασμένα και τυποποιημένα προϊόντα.

Οι μεγάλου μεγέθους παραγωγικές μονάδες καλύπτουν σημαντικό μέρος της εγχώριας αγοράς. Πρόκειται για μονάδες, οι οποίες διαθέτουν ευρεία γκάμα προϊόντων και σύγχρονο μηχανολογικό εξοπλισμό. Μέσω του οργανωμένου και ευρύτατου δικτύου διανομής τους,

έχουν κατορθώσει να καλύπτουν το σύνολο σχεδόν της Ελληνικής αγοράς, ενώ αρκετές έχουν αναπτύξει τα τελευταία έτη και σημαντική εξαγωγική δραστηριότητα. Ο κλάδος περιλαμβάνει και έναν σημαντικό αριθμό εισαγωγικών εταιριών, οι οποίες κατέχουν σημαντική θέση στην εγχώρια αγορά.

Πρώτα σε προτίμηση του καταναλωτή έρχονται τα τυριά ονομασιών προέλευσης (ΠΟΠ- Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης), με την Φέτα να είναι η ναυαρχίδα των Ελληνικών τυριών. Τα συσκευασμένα, τυποποιημένα προϊόντα αριθμούν μόνο δύο δεκαετίες παρουσίας στην Ελλάδα, συνεχώς αυξάνουν μερίδιο έναντι του χύμα παρότι το τελευταίο εξακολουθεί να κατέχει ηγετικό μερίδιο.

1.4 Ελληνικά τυριά ΠΟΠ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) θέσπισε τον κανονισμό 2081/92, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων (ΠΓΕ - Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη) και ονομασιών προέλευσης (ΠΟΠ - Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευση) και ΕΠΙΠ (Εγγυημένα Παραδοσιακά Ιδιότυπα Προϊόντα) των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων, ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό 510/2006. Ο τελευταίος τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό 1151/2012 (AGROCERT).

Τα ειδικά συστήματα ΠΟΠ- ΠΓΕ- ΕΠΙΠ, καθιερώθηκαν ώστε να συμβάλλουν στην ενθάρρυνση της διαφοροποίησης στην αγροτική παραγωγή, στην προστασία ονομασιών από κακή χρήση και μίμηση και στην καλύτερη κατανόηση του ιδιαίτερου χαρακτήρα των προϊόντων από τους καταναλωτές. Η Ελλάδα σήμερα έχει κατοχυρώσει 88 προϊόντα ΠΟΠ- ΠΓΕ εκ των οποίων τα 21 είναι τυριά ΠΟΠ. Ο έλεγχος των συγκεκριμένων προϊόντων έχει ανατεθεί στον Οργανισμό Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (ΟΠΕΓΕΠ)- AGROCERT.

Τα 21 ΠΟΠ Ελληνικά τυριά έχουν κάποιες κοινές προδιαγραφές. Παρασκευάζονται με παραδοσιακή τεχνολογία και από γάλα το οποίο προέρχεται από φυλές αιγών, προβάτων ή/και αγελάδων οι οποίες εκτρέφονται σε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή και έχουν προσαρμοστεί πλήρως στο περιβάλλον ενώ η διατροφή τους βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής. Η παρασκευή και ωρίμανση των τυριών πραγματοποιούνται σε εγκαταστάσεις που

βρίσκονται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής. Κατά την παρασκευή τους απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Επιπλέον, τα τυριά ΠΟΠ υπάγονται σε σύστημα ελέγχου, ώστε να κατοχυρώνονται τόσο οι παραγωγοί από απομιμήσεις, όσο και οι καταναλωτές από παραπλανητικές ενδείξεις στα τρόφιμα.

Έως σήμερα είναι καταγεγραμμένα περίπου 545 διαφορετικά είδη τυριών, ενώ παράγονται σε μικρές ή μεγαλύτερες ποσότητες περισσότερα από 300 είδη τυριών. Η συνολική παραγωγή ξεπερνά ετησίως τους 220.000 τόνους. 17 από τα 21 τυριά ΠΟΠ, παράγονται με πρόβειο ή γίδινο ή με μίγματα αυτών (Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικής Ανάπτυξης, 2016).

Πίνακας 1.1 Τα Ελληνικά τυριά ΠΟΠ

A/A	ΠΡΟΙΟΝ / ΟΝΟΜΑΣΙΑ	Είδος γάλακτος	ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ
1	Ανεβατό	Π-Γ	313060 / 14-01-1994(ΦΕΚ 24/18.01.94)
2	Γαλοτύρι	Π-Γ	313031 / 11-01-1994(ΦΕΚ 8/11-01-94)
3	Γραβιέρα Αγράφων	Π-Γ	313045 / 14-01-1994(ΦΕΚ 16/14-01-94)
4	Γραβιέρα Κρήτης	Π-Γ	313047 / 14-01-1994(ΦΕΚ 16/14-01-94) 313071 / 18-01-1994(ΦΕΚ 23/18-01-94)
5	Γραβιέρα Νάξου	Α-Π-Γ	& 318849/ 21-8-2008(ΦΕΚ 1725/28-8-2008)
6	Καλαθάκι Λίμνου	Π-Γ	313044 / 14-01-1994(ΦΕΚ 16/14-01-94)
7	Κασέρι	Π-Γ	313027 / 11-01-1994(ΦΕΚ 8/11-01-94)
8	Κατίκι Δομοκού	Π-Γ	313048 / 14-01-1994(ΦΕΚ 16/14-01-94)
9	Κεφαλογραβιέρα	Π-Γ	313032 / 11-01-1994(ΦΕΚ 8/11-01-94) Official Journal L148 21.06.1996 Official Journal C186 26.06.2012 Official Journal L129 14.05.2013
10	Κοπανιστή	Α-Π-Γ	
11	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Π-Γ	313058/17-01-1994(ΦΕΚ 25/18-01-94)
12	Μανούρι	Π-Γ	313028 / 11-01-1994(ΦΕΚ 8/11-01-94)
13	Μετσοβόνη	Α-Π-Γ	313070 / 18-01-1994(ΦΕΚ 23/18-01-94)
14	Μπάζος	Π-Γ	313057/17-01-1994(ΦΕΚ 25/18-01-94)
15	Ξυνομυζήθρα Κρήτης	Π-Γ	313051 / 14-01-1994(ΦΕΚ 18/14-01-94)
16	Πηχτόγαλο Χανίων	Π-Γ	313062 / 17-01-1994(ΦΕΚ 24/18.01.94)
17	Σαν Μιχάλη	Α	313069 / 18-01-1994(ΦΕΚ 23/18-01-94) 313025 / 11-01-1994(ΦΕΚ 8/11-01-1994)
18	Φέτα	Π-Γ	
19	Σφέλα	Π-Γ	313056/17-01-1994(ΦΕΚ 25/18-01-94)
20	Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού	Π-Γ	313063/17-01-1994(ΦΕΚ 25/18-01-94)
21	Ξύγαλο ή Ξίγαλο Σητείας	Π-Γ	C312/2010 ΣΕΛ.25(L200/2011 σελ.12)

Α: Αγελαδινό, Π: Πρόβειο, Γ: Γίδινο



Σχήμα 1.1 Εθνικό σήμα προϊόντων από τον AGROCERT

1.4.1. Η περίπτωση της κατοχύρωσης της Φέτας

Η κατοχύρωση της ονομασίας «Φέτα» συνιστά μία μακρά σειρά αιτήσεων, προσφυγών και αποφάσεων που ξεκίνησαν το 1984 με πρωτοβουλία της Δανίας για την ονομασία μιας σειράς τυριών άλμης. Με βάση το αίτημα της Δανίας στα πλαίσια λειτουργίας της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος και του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), ξεκίνησε η διαδικασία προορισμού διεθνών προδιαγραφών για τη Φέτα. Οι βορειοευρωπαϊκές χώρες (Δανία, Νορβηγία, Σουηδία, Βρετανία, Γερμανία και Ολλανδία) υποστήριζαν ότι η Φέτα παράγεται από αγελαδινό τυρί, ενώ οι νότιες χώρες (Πορτογαλία, Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Ελλάδα και Ελβετία) ότι παράγεται από αιγοπρόβειο γάλα (Ανυφαντάκης, 1991).

Το 1988, με τροποποίηση του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, δημοσιεύτηκαν οι προδιαγραφές για το τυρί Φέτα, ορίζοντας πως η Φέτα παράγεται από πρόβειο γάλα ή με πρόσμιξη αίγειου γάλακτος έως 30%. Με βάση αυτό τον νόμο απαγορεύτηκε η εισαγωγή αγελαδινού τυριού τύπου Φέτας στην Ελλάδα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τις συνεχείς προσφυγές της Δανίας στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Πετρίδου, 2006). Το 1994 κατατέθηκε από την Ελλάδα ο φάκελος για την κατοχύρωση του τυριού, στα πλαίσια του Καν.2081/92.

Στις 12 Ιουνίου 1996, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή κατοχυρώνει την Φέτα ως Προϊόν Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης και ορίζει για τα υπόλοιπα κράτη - μέλη περίοδο προσαρμογής πέντε ετών. Στη συνέχεια η Γερμανία, η Δανία και η Γαλλία προσφεύγουν στο Ευρωπαϊκό Δικαστήριο υποστηρίζοντας ότι η Φέτα αποτελεί «κοινή ονομασία» και αφορά μία πολύ βασική διαδικασία παραγωγής τυριού. Το 1999 το Ευρωπαϊκό Δικαστήριο ακυρώνει την κατοχύρωση της ονομασίας και η Φέτα αφαιρείται από τον κατάλογο των προϊόντων ΠΟΠ (MacMaoláin, 2007).

Έπειτα από κινήσεις της Ελληνικής πλευράς αποφασίζεται το 2003 εκ νέου η κατοχύρωση της Φέτας (Κανονισμός 1892/2002). Λίγο μετά την δεύτερη κατοχύρωση της Φέτας ακολούθησε προσφυγή της Δανίας και της Γερμανίας κατά του Κανονισμού 1829/02. Στη δίκη που πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο του 2005 εκδόθηκε απόφαση υπέρ της Ελληνικής κατοχύρωσης (Πετρίδου, 2006). Το 2007, το Ευρωπαϊκό Δικαστήριο επικύρωσε οριστικά την Φέτα ως Ελληνικό τυρί ΠΟΠ.

Η εμπορική συμφωνία CETA (Comprehensive Economic and Trade Agreement, Canada-EU) της ΕΕ με τον Καναδά για τη δημιουργία ζώνης ελεύθερων συναλλαγών θα λύσει ένα ευρύ φάσμα θεμάτων, με σκοπό την διευκόλυνση του εμπορίου μεταξύ ΕΕ και Καναδά, μεταξύ άλλων, θα αφαιρεθούν οι τελωνειακοί δασμοί, οι περιορισμοί στην πρόσβαση των δημόσιων συμβάσεων και θα βοηθήσει στην πρόληψη της παράνομης αντιγραφής των καινοτομιών και των παραδοσιακών προϊόντων της ΕΕ (European Commission).

Από τον Οκτώβριο του 2007, το τυρί Φέτα κυκλοφορεί αποκλειστικά ως ελληνικό προϊόν. Η απόφαση αφορά όμως, μόνο τις χώρες της ΕΕ και όχι το διεθνές εμπόριο. Στα πλαίσια της διαπραγμάτευσης της συμφωνίας CETA τέθηκε το θέμα αναγνώρισης από τον Καναδά του δικαιώματος χρήσης της ονομασίας Φέτα μόνο από την Ελλάδα, ως αποκλειστική παραγωγή και διακινήτρια του προϊόντος.

Σύμφωνα με τη CETA, όσες εταιρείες στον Καναδά εμπορεύονται ήδη προϊόντα με τη συγκεκριμένη ταμπέλα (η πλειονότητα των οποίων φτιάχνεται με αγελαδινό γάλα) δικαιούνται να διατηρήσουν μεν την ονομασία, αλλά υποχρεώνονται αφενός να αφαιρέσουν από τις συσκευασίες σύμβολα που παραπέμπουν στην Ελλάδα και αφετέρου να αναγράφουν ευκρινώς τη χώρα προέλευσης του τυριού. Επιπροσθέτως, όσοι στο εξής ασχοληθούν με την παρασκευή λευκού τυριού οφείλουν να το αναφέρουν ως «τύπου» ή «απομίμηση» Φέτας.

1.5 Οικονομικά στοιχεία

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η τυροκομία στην Ελλάδα κατέχει εξέχουσα θέση στον ευρύτερο κλάδο των τροφίμων καθώς περιλαμβάνει μερικές από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες ειδών διατροφής της χώρας μας. Βασικό σημείο αναφοράς του κλάδου είναι το γεγονός ότι το σύνολο της εγχώριας πρωτογενούς παραγωγής αγελαδινού γάλακτος καθορίζονταν μέχρι πρόσφατα από το κοινοτικό σύστημα των ποσοστώσεων.

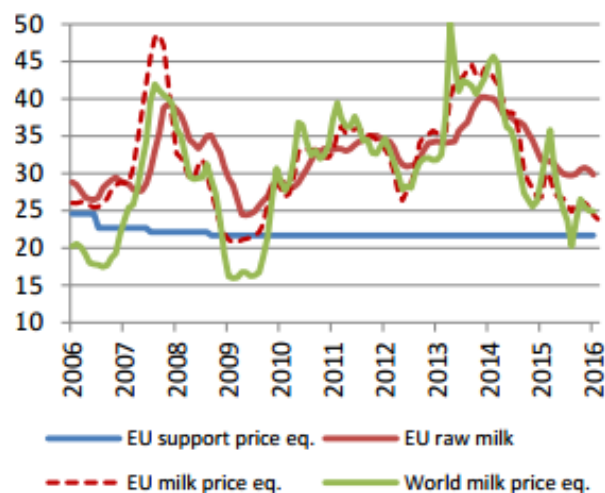
Το καθεστώς ποσοστώσεων, το οποίο ίσχυε από το 1984, εφαρμόσθηκε προκειμένου να αποφθεχθεί η υπερπαραγωγή του γάλακτος και των προϊόντων του, σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης και αφορούσε κυρίως χώρες της Βορείου Ευρώπης. Το καθεστώς αυτό όριζε πως η τιμή του γάλακτος προστατευόταν εφόσον οι συνολικές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος που παραδίδονταν στους αγοραστές σε κάθε κράτος - μέλος ήταν εντός

συγκεκριμένων ορίων. Σε περίπτωση υπέρβασης της εθνικής ποσόστωσης, επιβαλλόταν εισφορά επί του πλεονάσματος, η οποία καταβαλλόταν στο εμπλεκόμενο κράτος μέλος από τους παραγωγούς. Η εισφορά ανερχόταν σε €27,83 ανά 100 kg υπέρβασης.

Πιο συγκεκριμένα, κατά το έτος 2010/2011 οι παραδόσεις του αγελαδινού γάλακτος στην Ελλάδα υπολείπονταν κατά 173.091 τόνους σε σχέση με την εθνική ποσόστωση, ενώ το 2012/2011 κατά 205.444 τόνους (Δελτίο Τύπου Ευρωπαϊκής Επιτροπής, Βρυξέλλες, 18/10/2012). Σύμφωνα με η προβλεπόμενη γαλακτοκομική ποσόστωση για την Ελλάδα από 837 χιλ. τόνους το 2008/09 αυξάνεται σταδιακά σε 880 χιλ. τόνους την περίοδο 2013/2014 και 2014/15 (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 72/2009). Στη μεταρρύθμιση της ΚΓΠ (Κοινή Γεωργική Πολιτική) του 2003, αποφασίστηκε ότι οι ποσοστώσεις γάλακτος θα καταργηθούν σταδιακά έως την 1η Απριλίου 2015 (European Commission, 2008).

Η κατάργηση των ποσοστώσεων γάλακτος στην Ευρώπη την 1η Απριλίου 2015 οδήγησε μια σειρά από κορυφαία ιδρύματα να παρέχουν προβλέψεις για την πορεία του γαλακτοκομικού τομέα. Η σύντομη Γεωργική Έκθεση της ΕΕ έχει υπολογίσει ότι θα υπάρξει μια μέτρια αύξηση, της τάξεως του 1%, της παραγωγής γάλακτος στην Ευρώπη το 2016 (163 εκατομμύρια). Η μέση παραγωγή αναμένεται να αυξηθεί κατά 4 εκατομμύρια τόνους μέχρι το 2020, αν και αυτό θα εξαρτηθεί και από τις τιμές του γάλακτος κατά την περίοδο αυτή. Οι επιπτώσεις των ποσοστώσεων στον κλάδο τα τελευταία 5 - 10 έτη είχαν περιοριστεί σε πολλές χώρες. Ωστόσο, πολλές χώρες λαμβάνουν την παύση του καθεστώτος ως σήμα για αύξηση της παραγωγής, με τις μεγαλύτερες αυξήσεις να αναμένονται στη Γαλλία, τη Γερμανία, την Ιρλανδία, την Πολωνία, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ολλανδία.

Η διαμόρφωση της τιμής του γάλακτος, οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της κατάργησης του συστήματος των ποσοστώσεων της ΕΕ και την αύξηση της παραγωγής από τους ευρωπαϊούς αγρότες, τη ρωσική απαγόρευση των γαλακτοκομικών προϊόντων της ΕΕ και μια παγκόσμια υπερπροσφορά από τις χώρες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Μια σταδιακή βελτίωση στα γαλακτοκομικά προϊόντα αναμένεται το 2016 (Γράφημα 1.2).



Γράφημα 1.2 Διαμόρφωση της τιμής του νωπού γάλακτος της ΕΕ και της παγκόσμιας ισοδύναμη τιμής (ΕΕ, 2016)

Όσον αφορά την Ελλάδα, έπειτα από την κατάργηση των ποσοστόσεων, όπως ήταν αναμενόμενο, μειώθηκε ελαφρώς η τιμή πώλησης του γάλακτος, όπως επίσης και η παραγόμενη ποσότητα αγελαδινού γάλακτος (Πίνακας 1.2, 1.3) αφού αυξήθηκε η παραγωγή του εισαγωγίμου γάλακτος από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, καθώς η Ελλάδα είναι μια χώρα στην οποία οι παραδόσεις αγελαδινού γάλακτος υπολείπονταν κατά πολύ των εθνικών ποσοστώσεων.

Πίνακας 1.2 Ποσότητα αγελαδινού γάλακτος ανά μήνα, έτη 2015, 2016.

Μήνες	Ποσότητα σε τόνους	
	2015	2016
Ιανουάριος	50675	49104
Φεβρουάριος	47806	0
Μάρτιος	53 726	0
Απρίλιος	53 217	0
Μάιος	55 661	0
Ιούνιος	52 174	0
Ιούλιος	50 725	0
Αύγουστος	49 218	0
Σεπτέμβριος	47 168	0
Οκτώβριος	47 326	0
Νοέμβριος	45 699	0
Δεκέμβριος	48 934	0
ΣΥΝΟΛΟ	602 329	49104

Πηγή: ΕΛΟΓΑΚ 2016

Πίνακας 1.3 Μέση τιμή αγελαδινού γάλακτος ανά μήνα έτη 2015, 2016.

Τιμή πώλησης αγελαδινού γάλακτος		
Μήνες	2015	2016
Ιανουάριος	0,4291	0,4156
Φεβρουάριος	0,4277	
Μάρτιος	0,4243	
Απρίλιος	0,4216	
Μάιος	0,4198	
Ιούνιος	0,4174	
Ιούλιος	0,4174	
Αύγουστος	0,4167	
Σεπτέμβριος	0,4189	
Οκτώβριος	0,4188	
Νοέμβριος	0,415	
Δεκέμβριος	0,419	
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	0,4205	0,4156

Πηγή: ΕΛΟΓΑΚ 2016

Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία, το Μητρώο Επιχειρήσεων της ΕΛΣΤΑΤ, το 2008, είχε καταγεγραμμένες 796 γαλακτοκομικές επιχειρήσεις, εκ των οποίων, οι 605 δραστηριοποιούνται στα τυροκομικά προϊόντα σε όλη την επικράτεια (Eurostat, 2009). Οι επιχειρήσεις αυτές με βάση την Στατιστική Ταξινόμηση Οικονομικών Δραστηριοτήτων (ΣΤΑΚΟΔ) εντάσσονται στην κατηγορία «Παραγωγή Γαλακτοκομικών Προϊόντων (κωδικός: 10.5)», υποκατηγορία «Λειτουργία Γαλακτοκομείων και Τυροκομία (κωδικός: 10.51-0)». Οι περισσότερες εκ των οποίων δραστηριοποιούνται στην Βόρεια Ελλάδα.

Οι εισαγωγικές επιχειρήσεις τυροκομικών προϊόντων έχουν σημαντική παρουσία στην εγχώρια αγορά και το 2008 κάλυψαν το 30% της εγχώριας κατανάλωσης. Τα τελευταία χρόνια, η κατάσταση αυτή αλλάζει με τις Ελληνικές εταιρίες παραγωγής να αντιδρούν δυναμικά. Η ανταγωνιστικότητα της Ελληνικής οικονομίας είναι ιδιαίτερα χαμηλή και αποτελεί έναν από τους παράγοντες που οδήγησαν στην τωρινή κατάσταση της χώρας. Οι επιπτώσεις της έλλειψης ανταγωνιστικότητας ήταν η αποβιομηχάνιση και η αύξηση του εξωτερικού δανεισμού. Ο αγροτικός τομέας αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση αδυναμίας προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες συνθήκες της αγοράς.

Οι κοινοτικοί πόροι που εισέρρευσαν από το 1981 μέχρι σήμερα δεν αξιοποιήθηκαν για τον εκσυγχρονισμό της Ελληνικής γεωργίας, αλλά διαιώνισαν τις διαρθρωτικές αδυναμίες, δημιούργησαν στρεβλώσεις στην εσωτερική αγορά και περιόρισαν την επιχειρηματικότητα των αγροτών. Η μη επίλυση των χρόνιων διαρθρωτικών προβλημάτων (μικρό μέγεθος εκμεταλλεύσεων, πολυτεμαχισμός, υψηλή εξάρτηση από τις επιδοτήσεις, γήρανση, χαμηλό επαγγελματικό - μορφωτικό επίπεδο των αγροτών, μη ορθολογική αξιοποίηση των διαθέσιμων πόρων, έλλειψη ισχυρών διασυνδέσεων με τη βιομηχανία, κ.τ.λ.) δεν επέτρεψε τελικά τη δημιουργία μιας βιώσιμης και ανταγωνιστικής γεωργίας (Δαγκαλίδης, 2014).

Γενικότερα, μέχρι την ένταξη της χώρας μας στην ΕΕ, η Ελληνική γεωργία ήταν σχετικά ανταγωνιστική με πλεονασματικό εμπορικό ισοζύγιο και αυτάρκης σε αρκετά βασικά προϊόντα. Στη συνέχεια από τα μέσα της δεκαετίας του 80, η ανταγωνιστικότητα αρχίζει να μειώνεται, κυρίως λόγω της εγκατάλειψης ή της μερικής υποκατάστασης ορισμένων καλλιεργειών από άλλες υψηλότερα επιδοτούμενες. Μετά το 2000 η κατάσταση επιδεινώθηκε, ακόμη και σε προϊόντα, για τα οποία η Ελλάδα διέθετε ισχυρά συγκριτικά πλεονεκτήματα, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά. Παράλληλα, λόγω ποσοστώσεων, το εμπορικό έλλειμμα στα προϊόντα ζωικής προέλευσης αυξήθηκε σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα.

Οι αρνητικές επιπτώσεις του ανοίγματος της Ελληνικής γεωργίας στο διεθνή ανταγωνισμό μετριάστηκαν από την εφαρμογή της Κοινής Αγροτικής Πολιτικής. Επιπροσθέτως, οι θετικές τάσεις της παγκόσμιας ζήτησης για διαφοροποιημένα (προϊόντα ΠΟΠ) και βιολογικά προϊόντα καθώς και η στροφή προς τη Μεσογειακή διατροφή δημιουργούν προϋποθέσεις για μετατροπή πολλών μειονεκτημάτων της Ελληνικής γεωργίας σε συγκριτικά πλεονεκτήματα. Η επιλογή αυτή προϋποθέτει αλλαγή νοοτροπιών, σημαντικές προσπάθειες ευαισθητοποίησης - εκπαίδευσης των αγροτών, δημιουργία σοβαρών υποδομών έρευνας - ανάπτυξης, ελέγχου και πιστοποίησης, δικτύων προβολής και προώθησης των προϊόντων καθώς και δημιουργίας εθνικών σημάτων ποιότητας.

1.5.1. Η ζήτηση

Η ζήτηση των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται από την τιμή πώλησης αλλά και το διαθέσιμο εισόδημα του καταναλωτή. Από τα στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ, για το πρώτο 7μηνο των ετών 2012 - 2013, προκύπτει αύξηση των τιμών στη Φέτα ενώ στα σκληρά τυριά προκύπτει οριακή μείωση το 2013. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί πως οι προτιμήσεις των καταναλωτών συνδέονται, ως επί το πλείστον, με κατηγορίες - είδη τυριών ή περιοχές προέλευσης και λιγότερο με εμπορικά σήματα εταιρειών. Ωστόσο, με την πάροδο των χρόνων αυξάνεται ο βαθμός τυποποίησης των εξεταζόμενων προϊόντων, γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία “επώνυμης” ζήτησης.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη ζήτηση είναι τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε προϊόντος, όπως η γεύση και η θρεπτική του αξία. Οι τεχνολογικές εξελίξεις διαμορφώνουν την παραγωγή, για παράδειγμα αυξημένη ζήτηση για τυριά με χαμηλά λιπαρά. Περαιτέρω, η ηλιακή διάθρωση του πληθυσμού καθορίζει τη ζήτηση αφού ορισμένα τυριά φορούν ορισμένες ηλικιακές ομάδες. Τέλος, ο τουρισμός επηρεάζει την κατανάλωση κυρίως των παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων στις τουριστικές περιοχές. Για παράδειγμα, το 2012 αφίχθησαν στην Ελλάδα 15,5 εκατομμύρια τουρίστες έναντι 16,4 εκατομμυρίων το 2011, σημειώνοντας μείωση 5,5% (ΕΛΣΤΑΤ).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί, η μέση μηνιαία δαπάνη ανά νοικοκυριό για τυροκομικά προϊόντα (μαλακά, σκληρά τυριά και τυριά με μειωμένα λιπαρά) διαμορφώθηκε σε €29,38 το 2011, από €28,56 το 2010 (ποσοστό 8,63% επί του συνόλου των ειδών διατροφής), καλύπτοντας το 8,78% των συνολικών μηνιαίων δαπανών για είδη διατροφής (€334,51), αυξημένη κατά 2,9% σε σύγκριση με το 2010 (ΕΛΣΤΑΤ).

Ακόμη, το 2011 η υψηλότερη (μέση μηνιαία) δαπάνη αφορά μαλακό τυρί (€16,4) ενώ ακολουθούν οι δαπάνες για σκληρό τυρί (€11,96). Όσον αφορά τις δαπάνες για τυροκομικά προϊόντα βάση γεωγραφικής περιοχής, η μεγαλύτερη δαπάνη καταγράφεται στα νοικοκυριά των αστικών περιοχών (€30,49), η οποία είναι το 8,8% του συνόλου των μηνιαίων δαπανών τους για είδη διατροφής, η οποία παρουσιάζει αυξανόμενη τάση συγκριτικά με το 2010 κατά 4,6%. Χαμηλότερη, μηνιαία δαπάνη για τυροκομικά προϊόντα εμφανίζουν τα νοικοκυριά των αγροτικών περιοχών (€24,54), γεγονός που δεν προκαλεί έκπληξη αφού αποδίδεται κυρίως

στην ιδιοκατανάλωση των προϊόντων από αρκετά νοικοκυριά αυτών των περιοχών. Τέλος, παρατηρείται αύξηση της ζήτησης των τυροκομικών προϊόντων όσο αυξάνεται το διαθέσιμο εισόδημα των καταναλωτών.

Πίνακας 1.4 Μέσος όρος μηνιαίων δαπανών των νοικοκυριών για τυροκομικά προϊόντα (2004/2005, 2008-2011)

Έτος	Μηνιαία Δαπάνη σε €		% συμμετοχή* των τυροκομικών
	Τυροκομικά προϊόντα	Είδη διατροφής	
2004/2005	24,24	288,96	8.39%
2008	28,38	326,71	8.69%
2009	28,92	335,38	8.62%
2010	28,56	330,81	8.63%
2011	29,38	334,51	8.78%

Ποσά: σε €

*: συμμετοχή επί του συνόλου των δαπανών σε είδη διατροφής

Πηγή: ΕΛΣΤΑΤ 2012 (Ερευνες Οικογενειακών Προϋπολογισμών)

1.5.2. Η προσφορά του κλάδου

Ο κλάδος χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό των επιχειρήσεων. Υπάρχει έντονος ανταγωνισμός κυρίως μεταξύ των μεγάλων βιομηχανικών εταιρειών. Παρατηρώντας τον Πίνακα 1.3, στον κλάδο δραστηριοποιείται και ένας μεγάλος αριθμός μικρομεσαίων παραγωγικών επιχειρήσεων, καλύπτοντας κυρίως τις ανάγκες των τοπικών αγορών, όπως επίσης και ένας σημαντικός αριθμός μικρών οικογενειακών τυροκομείων, τα οποία απευθύνονται αποκλειστικά σε τοπικό επίπεδο.

Στον κλάδο δραστηριοποιούνται και εισαγωγικές εταιρείες με επώνυμα κυρίως προϊόντα από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ακόμη αξίζει να αναφερθεί ότι το 2006 το Μητρώο Επιχειρήσεων της ΕΛΣΤΑΤ είχε καταγεγραμμένες 739 επιχειρήσεις (γαλακτοκομεία και τυροκομεία) με συνολικό κύκλο εργασιών 1.638,8 εκατομμύρια, ενώ το 2008 ήταν καταχωρημένες συνολικά 796 επιχειρήσεις πραγματοποιώντας συνολικό κύκλο εργασιών €1.844,3 εκατομμύρια.

Πίνακας 1.5 Κατανομή των επιχειρήσεων παραγωγής τυροκομικών προϊόντων στην Ελλάδα με βάση την ετήσια παραγωγή τους (2006, 2009)

Ετήσια Παραγωγή	2006	2009
λιγότερο από 100 τόνους	342	340
101 - 1.000 τόνους	233	229
1.001 - 4.000 τόνους	24	29
4.001 - 10.000 τόνους	2	4
10.001 - 15.000 τόνους	3	1
15.001 - 20.000 τόνους	3	2
πάνω από 20.000 τόνους	0	0
Σύνολο	604	605

Πηγή: Eurostat 2010

1.5.3. Πρωτογενής παραγωγή γάλακτος

Συνολικά για την τριετία 2010 - 2012 παρατηρείται μείωση της πρωτογενούς παραγωγής γάλακτος, η οποία προέρχεται κυρίως από τη μείωση του κατσικίσιου γάλακτος, μικρότερη μείωση σημείωσε το πρόβειο γάλα, ενώ το αγελαδινό αυξήθηκε ελαφρώς. Το μεγαλύτερο μέρος της εγχώριας παραγωγής καλύπτεται από το αγελαδινό.

Σύμφωνα με στοιχεία του ΕΛΟΓΑΚ (Ελληνικός Οργανισμός Γάλακτος και Κρέατος), οι τιμές του αγελαδινού γάλακτος διαμορφώθηκαν κατά μέσο όρο σε €0,4551 το 2012, αυξημένες κατά 5,2% σε σχέση με το 2011, ενώ μειωμένες κατά 1,7% ήταν οι τιμές στο πρόβειο γάλα το 2012/11, όπως και οι τιμές του κατσικίσιου γάλατος (μείωση 1,7%). Ενώ με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία μόνο για το αγελαδινό γάλα για το 5μηνο του 2013, παρατηρείται μείωση των τιμών (κατά 4%) σε σχέση με το αντίστοιχο διάστημα του 2012 (ΕΛΣΤΑΤ).

Οι παραγωγοί αγελαδινού γάλακτος κατά το γαλακτοκομικό έτος 2011/2012, σύμφωνα με στοιχεία του ΕΛΟΓΑΚ ήταν 3.932, οι περισσότεροι εκ των οποίων είναι μικρού μεγέθους, με το 92% αυτών να έχει ετήσια παραγωγή μικρότερη των 500 τόνων. Ο μεγαλύτερος αριθμός παραγωγών αγελαδινού γάλακτος βρίσκεται στην περιφέρεια της Κεντρικής Μακεδονίας (1.353 παραγωγοί), στον νομό Θεσσαλονίκης και αντιπροσωπεύει το 47,7% της συνολικής παραγωγής και ακολουθεί η περιφέρεια της Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (629 παραγωγοί) με 17,2% και η περιφέρεια της Δυτικής Μακεδονίας (628 παραγωγοί) με 14,7%.

Όσον αφορά τους παραγωγούς πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος, κατά το 2012 υπήρχαν 45.324 αιγοπροβατοτρόφοι. Ο μεγαλύτερος αριθμός αυτών βρίσκεται στην περιφέρεια της Δυτικής Ελλάδος (20,1%) και ακολουθούν οι περιφέρειες της Ηπείρου (14,9%), της Θεσσαλίας (12,71%) και της Κεντρικής Μακεδονίας (12,03%).

Από τον Πίνακα 1.4 που ακολουθεί, φαίνεται ότι παρουσιάζονται αυξομειώσεις στις μέσες τιμές πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος κατά την τελευταία δεκαετία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 2012 η μέση τιμή πρόβειου γάλακτος διαμορφώθηκε στα €0,9321 έναντι €0,9484 το 2011 (-1,7%). Αντίστοιχα, η μέση τιμή κατσικίσιου γάλακτος διαμορφώθηκε στα €0,5536 από €0,5629 το 2011 μειωμένη κατά το ίδιο ποσοστό.

Πίνακας 1.6 Μέση τιμή Γάλακτος (από τους παραγωγούς, 2011-2012)

	Αγελαδινό	Πρόβειο	Κατσικίσιο
M.O. 2011 (€)	0,4326	0,9484	0,5629
M.O. 2012 (€)	0,4551	0,9321	0,5536
M.O. 5μηνου 2012 (€)	0,4630	M.Δ.	M.Δ.
M.O. 5μηνου 2013 (€)	0,4443	M.Δ.	M.Δ.

M.Δ. : Μη Διαθέσιμα Στοιχεία

Μέση Τιμή: €/Kg

Πηγή: ΕΛΟΓΑΚ 2013

Πίνακας 1.7 Πωλήσεις επιχειρήσεων παραγωγής τυροκομικών προϊόντων (2007-2012)

Έτος	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Σύνολο	1,393.789.345	1,566.518.596	1,505.628.092	1,527.635.810	1,568.298.651	1,340.023.207

1.5.4. Η αγορά των τυροκομικών προϊόντων

Παρότι παρατηρείται αύξηση της βιομηχανοποίησης του κλάδου, η συμμετοχή των γεωργικών εκμεταλλεύσεων στη συνολική εγχώρια παραγωγή τυροκομικών κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα συγκριτικά με τις υπόλοιπες χώρες της ΕΕ, βάσει των στοιχείων της Eurostat.

Το μεγαλύτερο μερίδιο στη συνολική παραγωγή τυροκομικών προϊόντων κατέχει η κατηγορία των μαλακών τυριών, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων αποτελεί η Φέτα. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό συμμετοχής των μαλακών τυριών στο σύνολο της παραγόμενης ποσότητας από τις βιομηχανικές επιχειρήσεις διαμορφώθηκε σε 61% το 2012.

Πίνακας 1.8 Παραγωγή τυριών (ανά κατηγορία) από τις βιομηχανικές επιχειρήσεις (2007-2013)

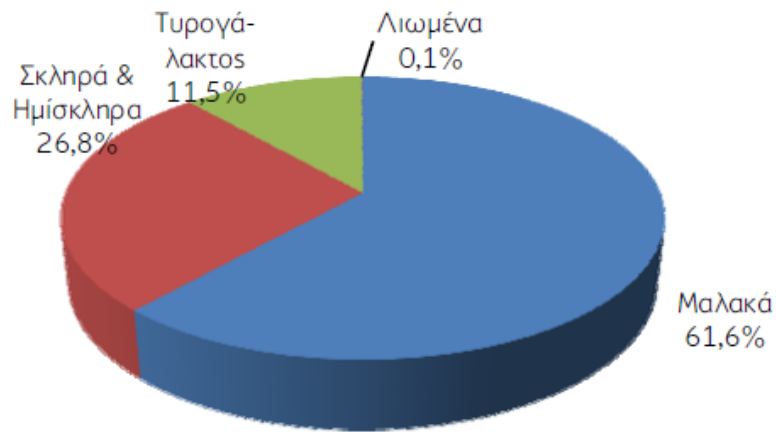
Τύπος Τυριού	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013*
Μαλακά Τυριά	130815	126.073	124.766	120.393	117.689	118.984	117100
Σκληρά & Ημίσκληρα	34635	33.623	43.803	59.361	46.498	53.411	51000
Τυριά Τυρογάλακτος	22.597	26.195	26.475	27.943	24.534	22.508	21765
Λιωμένα Τυριά	468	297	249	186	153	143	135
Σύνολο	188.515	186.189	195.294	207.883	188.874	195.046	19000

Ποσότητα: τόνοι

*Εκτιμήσεις Αγοράς – ICAP 2013

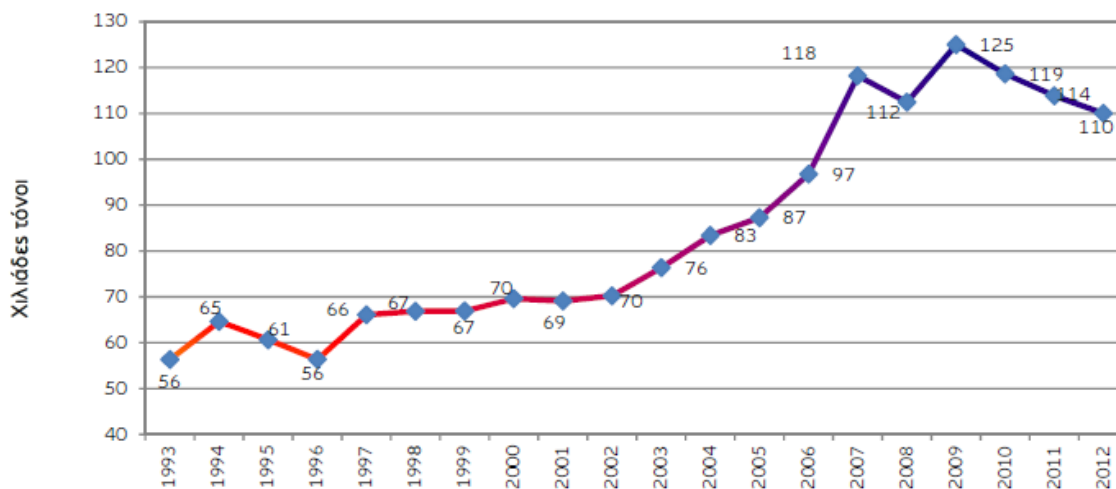
Πηγή: ΕΛΟΓΑΚ 2013

Όσον αφορά μόνο την παραγωγή των τυροκομικών προϊόντων ΠΟΠ, από τις βιομηχανικές επιχειρήσεις, η Φέτα καλύπτει διαχρονικά το συντριπτικό ποσοστό της εγχώριας παραγωγής τυροκομικών προϊόντων. Ειδικότερα το 2012 κάλυψε το 90,3% της παραγωγής τυροκομικών προϊόντων ΠΟΠ και το 44,2% της συνολικής παραγωγής τυροκομικών προϊόντων από τις βιομηχανίες. Δεύτερο σε παραγωγή έρχεται το Κασέρι το οποίο κάλυψε το 2012 το 2,7% της παραγωγής τυριών ΠΟΠ και το 1,3% της συνολικής παραγωγής τυριών (από βιομηχανίες). Ακολουθεί, στα ίδια σχεδόν επίπεδα η Κεφαλογραβιέρα.



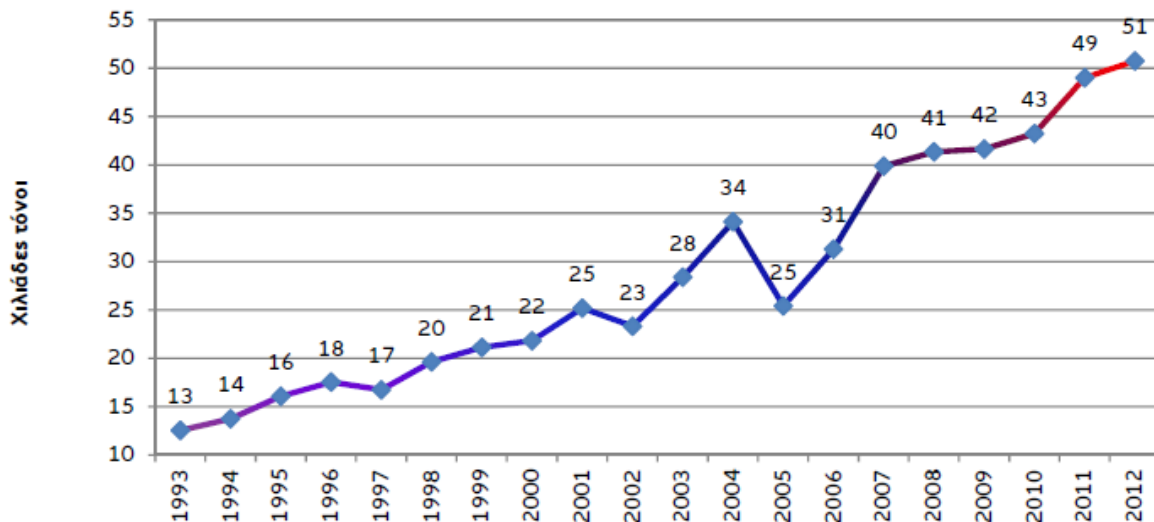
Σχήμα 1.3 Διάρθρωση της εγχώριας βιομηχανικής παραγωγής τυριών ανά κατηγορία προϊόντων 2013

Όσον αφορά τις εισαγωγές τυροκομικών προϊόντων παρουσίασαν, σε γενικές γραμμές, συνεχή ανοδική πορεία τα προηγούμενα έτη. Το σημαντικότερο μέρος των εισαγόμενων ημισκληρων τυριών αφορούν τα τυριά τύπου Edam, Tilsit, Butterkase, Danho, Fontal, Fontina, Fynbo, Havarti, Maribo, Samsoe και Gouda.



Σχήμα 1.4 Εξέλιξη των εισαγωγών τυροκομικών προϊόντων (σε ποσότητα, 1993-2012)

Οι εξαγωγές τυροκομικών προϊόντων εμφανίζουν διαχρονική άνοδο τα τελευταία έτη. Συγκεκριμένα, το 2012 οι συνολικά εξαγόμενες ποσότητες ανήλθαν σε 50,7 χιλ. τόνους παρουσιάζοντας ετήσια αύξηση 3,5%. Η Φέτα και ο Τελεμές είναι τα κύρια τυριά που εξαγονται. Τέλος, η συνολική εγχώρια κατανάλωση παρουσίασε αύξηση την περίοδο 2004-2010.



Σχήμα 1.5 Εξέλιξη των εξαγωγών τυροκομικών προϊόντων (σε ποσότητα, 1993-2012)

2. Γενικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

Η Φέτα είναι ένα μαλακό λευκό τυρί που ωριμάζει σε άλμη. Άλλα χαρακτηριστικά τυριά άλμης είναι ο Τελεμές, το Χαλούμι Κύπρου και το Αιγυπτιακό Domiati. Τα τυριά αυτά είναι τα αρχαιότερα στον κόσμο και η έναρξη παρασκευής τους τοποθετείται στην Μεσόγειο και τα Βαλκάνια (Scott, 1986). Η Φέτα είναι τυρί που τυγχάνει παγκόσμιας αποδοχής, παρασκευάζεται με συγκεκριμένη τεχνολογία από πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και αίγειου γάλακτος, με το ποσοστό του δεύτερου να μην ξεπερνά το 30% (General Chemical State Laboratories, 1988). Οι περιοχές παραγωγής που μπορούν, σύμφωνα με την υπάρχουσα νομοθεσία, να βάζουν την ετικέτα και να παράγουν Φέτα είναι η Ηπειρωτική Ελλάδα η Μακεδονία, η Θράκη, η Ήπειρος, η Θεσσαλία, η Στερεά Ελλάδα και η Πελοπόννησος και από την νησιωτική χώρα μονάχα η νήσος Λέσβος (Μυτιλήνη) (Εφημ. Κυβερνήσεως, ΦΕΚ 8/11.01.1994).

Στην Ελληνική αγορά, η Φέτα καλύπτει το 80% περίπου της κατανάλωσης των μαλακών τυριών. Είναι εμπορεύσιμη με τη μορφή δύο ποιοτικών παραλλαγών, τη μαλακή Φέτα (πιο «γλυκιά» εξαιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητας της σε υγρασία και λιγότερο αλμυρή, ελαφρώς υπόξινη, με πλούσιο άρωμα και λίγο πικάντικη γεύση) και τη σκληρή Φέτα (λίγο πιπεράτη, περισσότερο αλμυρή, με πολύ τονισμένη γεύση και άρωμα) (Κυριακόπουλος, 1995).

Η Φέτα διαθέτει αλμυρή, ελαφρώς όξινη γεύση και ευχάριστες οργανοληπτικές ιδιότητες. Οπές αερίου δεν θα πρέπει να υπάρχουν αλλά μερικές μικρές μηχανικές οπές είναι επιθυμητές (Sarantinopoulos et al., 2002). Παραδοσιακά, το τυρί Φέτα παρασκευάζεται από νωπό γάλα σε μικρές οικογενειακές φάρμες με στοιχειώδη εξοπλισμό. Η πήξη του γάλακτος γίνεται με παραδοσιακή πυτιά, μέσα σε 50 λεπτά έως 1 ώρα. Μερικές φορές, οι παραγωγοί κάνουν χρήση θερμικής επεξεργασίας, ηπιότερης της High Temperature/Short Time (HTST), θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος και προσθέτουν γιαούρτι για τις εναρκτήριες καλλιέργειες (Moatsou et al., 2002).

Πιο συγκεκριμένα, η τεχνολογία παρασκευής του τυριού περιλαμβάνει στράγγιση με βαρύτητα, επιφανειακό ξηρό αλάτισμα και το πρώτο στάδιο ωρίμανσης κατά το οποίο η Φέτα συσκευάζεται προσωρινά στους 14-18 °C για δύο εβδομάδες ή μέχρι το pH να φτάσει το 4.4-4.6 και η υγρασία να είναι μικρότερη από 56 g/100 g. Στη συνέχεια ακολουθεί το δεύτερο στάδιο ωρίμανσης, το τυρί μεταφέρεται σε βαρέλια ή κονσέρβες με άλμη (7-8%), σε ψυκτικούς θαλάμους, όπου ωριμάζει, σύμφωνα με τα Ελληνικά πρότυπα για τουλάχιστον για δύο μήνες (Codex Alimentarius, 1998). Η περίοδος προ-ωρίμανσης αποτελεί ουσιαστικό στάδιο για το σχηματισμό των τελικών φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τυριού.

Επιπροσθέτως, το τυρί μπορεί να αποθηκευτεί για περιόδους μεγαλύτερες του ενός χρόνου σε θερμοκρασία 2°C. Η φέτα διατηρείται σε άλμη χαμηλής πυκνότητας και συσκευάζεται ερμητικά σε ξύλινα βαρέλια καθαρού βάρους 50-60 kg, τα τυροτεμάχια έχουν σχήμα τριγωνικό και βάρος ~3 kg ή σε λευκοσιδηρά δοχεία καθαρού βάρους 16-18 kg, τα τυροτεμάχια έχουν σχήμα κύβου και βάρος ~1kg.

Το όνομα Φέτα κατοχυρώθηκε ως ΠΟΠ με τον κανονισμό 1892/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής με βάση τις εξής προδιαγραφές (Anifantakis & Moatsou, 2006):

1. Το τυρί Φέτα είναι μαλακό τυρί, χωρίς επιδερμίδα, λευκού χρώματος και ελαφρώς όξινης γεύσης. Χαρακτηριστικό της δομής του είναι η παρουσία λίγων μηχανικών σχισμών.
2. Παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγματά του με αίγαιο γάλα, το οποίο δεν υπερβαίνει το 30% της ολικής ποσότητας του γάλακτος τυροκόμησης. Το γάλα

της τυροκόμησης πρέπει να παράγεται αποκλειστικά στις γεωγραφικές περιοχές της Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και Λέσβου.

3. Απαγορεύεται η χρήση συμπυκνωμένου γάλακτος και η προσθήκη σκόνης γάλακτος, συμπυκνώματος πρωτεϊνών και καζεϊνικών αλάτων στο γάλα της τυροκόμησης καθώς επίσης και η χρήση χρωστικών και συντηρητικών.
4. Η μέγιστη υγρασία πρέπει να είναι 56g/100g και το ελάχιστο λίπος επί ξηρού 43 g/100 g.
5. Η περίοδος ωρίμανσης πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 60 ημέρες.

2.1 Χημικές και μικροβιολογικές ιδιότητες της Φέτας

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

- Υγρασία 52.9%
- Λιπαρά 26.17%
- Ολική πρωτεΐνη 16.71%
- Λακτόζη 0.17%
- Χλωριούχο νάτριο 2.94%
- pH 4.41

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

Κατά τη διάρκεια των πρώτων δέκα ημερών ωρίμασης, οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα έχουν τον ταχύτερο ρυθμό. Στη διάρκεια των πρώτων ημερών, η υγρασία του τυριού μειώνεται και αποκτά τιμές μικρότερες του 56% που είναι το ανώτερο όριο για μία ώριμη φέτα, σύμφωνα με το Γενικό Χημείο του Κράτους (1988), ενώ το 50% περίπου της λακτόζης

μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και άλλα συστατικά. Ακόμη, το ποσοστό της λιποπεριεκτικότητας του τυριού αυξάνει επειδή μειώνεται η υγρασία (Ανυφαντάκης, 1998).

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, ένα μέρος τους αποικοδομείται σε μικρότερα, υδατοδιαλυτά αζωτούχα συστατικά, που είναι μερικώς ανταλλάξιμα μεταξύ του τυριού και της άλμης στην οποία ωριμάζει. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αποδίδεται στην πυτιά που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού, στη μικροχλωρίδα που εμφανίζεται στην επιφάνεια του κατά την στράγγιση και το αλάτισμα και στις ενδογενείς πρωτεΐνες του γάλακτος (Ανυφαντάκης, 1998).

Επιπλέον, τα ελεύθερα αμινοξέα είναι συστατικά με μεγάλη σπουδαιότητα για το άρωμα της Φέτας. Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών συνεχώς αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμασης (Alichanidis et al., 1981; Voudouris et al., 1986).

2.2 Στάδια παραγωγής Φέτας

Προκειμένου να παραχθεί μία Φέτα καλής ποιότητας, η οξύτητα του γάλακτος πρέπει να είναι μικρότερη από 0,23 g / 100 ml γαλακτικού οξέος και το pH \geq 6,5. Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος αναλόγως όμως την εποχή ποικίλει μεταξύ 6,5 - 8 g / 100 g, οπότε κρίνεται σκόπιμη η προσαρμογή της στα επιθυμητά επίπεδα. Τέλος, ως καταλληλότερη αναλογία καζεΐνης / λίπους ορίζεται το 0,72.

Αρχικά, προετοιμάζεται το γάλα της τυροκόμησης, δηλαδή, το γάλα διηθείται και τυποποιείται ως προς το λίπος. Ακολουθεί παστερίωση (θερμοκρασία 72-73 °C για 15 sec ή θερμοκρασία 68 °C για 15 min). Σε ορισμένα παραδοσιακά τυροκομεία χρησιμοποιείται μη παστεριωμένο γάλα που θερμαίνεται μέχρι να φτάσει τους 32-35 °C (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Το αιγοπρόβειο γάλα περιέχει ικανοποιητικές ποσότητες ασβεστίου, παστεριώνοντας το όμως μια ποσότητα αυτού συνήθως αδιαλυτοποιείται και κατακρημνίζεται (Κυριακόπουλος, 1995). Επομένως, μπορεί να κριθεί απαραίτητη η προσθήκη CaCl₂ (μέχρι 0,2 g / kg γάλακτος), πριν την προσθήκη της πυτιάς, για τη διασφάλιση καλύτερης πήξης και τη δημιουργία συνεκτικού πήγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το τυρί Φέτα μπορεί να παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα. Σε αυτή την περίπτωση η οξύτητα φτάνει στα επιθυμητά επίπεδα λόγω της δράσης της φυσικής μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος. Επομένως, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μίας παραδοσιακά παρασκευασμένης Φέτας αφού δεν είναι γνωστό ποιοί μικροοργανισμοί συμμετείχαν στην τυροκόμηση. Ακόμη, τα τυριά που παρασκευάζονται με τη χρήση νωπού γάλακτος είναι πηγή μικροοργανισμών με νέες ιδιότητες (Bozoudi et al., 2015).

Την τελευταία δεκαετία, έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια στην ταυτοποίηση “άγριων” λακτόκοκκων, ιδιαιτέρως από παραδοσιακά τυριά ΠΟΠ (Bozoudi et al., 2015). Ενώ, υπάρχει αντίστοιχο ενδιαφέρον και για τους γαλακτοβάκιλλους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την χαμηλή πρωτεολυτική και πηκτική δραστηριότητα τους κατά τη διάρκεια της παραγωγής τυριών.

Στο πλαίσιο αυτό, το εργαστήριο Γαλακτοκομίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, το 1986, υπό την εποπτεία και καθοδήγηση του καθηγητή Γεώργιου Καλαντζόπουλου, ξεκίνησε την συστηματική απομόνωση και ταυτοποίηση της Ελληνικής άγριας μικροχλωρίδας παραδοσιακών ζυμούμενων προϊόντων, όπως το τυρί, το γιαούρτι, το προζύμι και το κρασί. Το εγχείρημα αυτό συνεχίστηκε και μετέπειτα χάρις την αξιέπαινη δουλειά των μελών του εργαστηρίου, δημιουργώντας έτσι την πρώτη ανοιχτή συλλογή μικροοργανισμών στην Ελλάδα, με το ακρωνύμιο ACA-DC, συμπεριλαμβανομένων των γνωστών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων, προπιονικών βακτηρίων και στελέχη ζυμών. Μέχρι σήμερα, η συλλογή περιλαμβάνει 1.000 μικροοργανισμούς, βακτηρία και ζύμες, τα οποία αντιπροσωπεύουν 119 είδη και 44 γένη, ενώ πολλά στελέχη είναι επί του παρόντος στην διαδικασία της ταυτοποίησης.

Σκοπός της συλλογής είναι η συστηματική μελέτη και διατήρηση της μικροβιακής ποικιλότητας των Ελληνικών παραδοσιακών τροφίμων, ενώ δίνεται έμφαση στην ταξινόμηση και τη φυσιολογία των στελεχών, όπως επίσης και στις προβιοτικές και τεχνολογικές ιδιότητες. Ο ιδιαίτερος χαρακτήρας και τα έντονα και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των Ελληνικών ζυμούμενων παραδοσιακών προϊόντων οφείλεται στην άγρια

μικροχλωρίδα τους. Αυτοί οι άγριοι μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες.

Σήμερα η κατάσταση έχει αλλάξει και το μεγαλύτερο μέρος του τυριού Φέτα παράγεται από παστεριωμένο γάλα σε καλά οργανωμένα τυροκομεία. Με την εφαρμογή της παστερίωσης, οι αριθμοί της επιθυμητής αυτής μικροχλωρίδας μειώνονται αισθητά με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δράσουν ικανοποιητικά. Σε αυτές τις περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης εμπορικές καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Επιπροσθέτως, κάποια μικρά τυροκομεία χρησιμοποιούν γιαούρτι ως εναρκτήρια καλλιέργεια, με μικροοργανισμούς *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* σε αναλογία 1:1 και σε ποσότητα ~0,3 ml / 100ml. Ο σκοπός της προσθήκης καλλιέργειας είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος και επομένως η αύξηση της οξύτητας, σε ορισμένο ρυθμό, στο γάλα, στο τυρόπηγμα, αλλά και στο φρέσκο τυρί μέχρι να στραγγίσει. Τα είδη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες, η αναλογία στην οποία προστίθενται, ο χρόνος που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό μέχρι την προσθήκη της πυτιάς και η θερμοκρασία του γάλακτος της τυροκόμησης είναι παράμετροι που επηρεάζουν το ρυθμό οξύνισης του πήγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Η τυπικότητα των τυριών από νωπό γάλα είναι συνδεδεμένη με την μη εναρκτήρια καλλιέργεια, των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (NSLAB- Non Starter Lactic Acid Bacteria) που προέρχονται από το νωπό γάλα (Bozoudi et al., 2015). Η κυρίαρχη φυσική μικροχλωρίδα αποτελείται από τις εναρκτήριες καλλιέργειες, οι οποίες αντικαθιστούνται σταδιακά από ανθεκτικούς στο αλάτι γαλακτοβάκιλλους και εντερόκοκκους, κυρίως *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus durans* (Tzanetaki et al., 1995). Ακόμη, η παρουσία εντεροκόκκων σε υψηλούς αριθμούς είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό, όχι μόνο στην περίπτωση του τυριού Φέτα, αλλά και σε άλλα τυριά, όπως για παράδειγμα, στα τυριά Manchego, Μοτσαρέλα, Κεφαλοτύρι και Comte (Bozoudi et al., 2015).

Η πυτιά που χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις παρασκευάζεται με τη χρήση ολόκληρου του ήνυστρου μη απογαλακτισμένων αρνιών και κατσικιών, συμπεριλαμβανομένων των ζωικών ιστών και του πηγμένου γάλακτος από ζώα που

τρέφονται αποκλειστικά με γάλα. Σε μεγάλα τυροκομεία, η παραδοσιακή εγχώρια τυτιά έχει αντικατασταθεί μερικώς ή πλήρως από την εμπορική τυτιά. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται μείγμα των δύο τύπων τυτιάς σε αναλογία 1:3 (παραδοσιακή / εμπορική). Έχει παρατηρηθεί πως η παραδοσιακή φέτα που παρασκευάζεται με εγχώρια τυτιά, χαρακτηρίζεται από ευχάριστο άρωμα και πιπεράτη γεύση που μπορεί να αποδοθεί στη λιπολυτική δράση των προγαστρικών εστερασών (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Περίπου 50 λεπτά μετά την προσθήκη της τυτιάς και αφού έχει ολοκληρωθεί η πήξη του γάλακτος, το πήγμα διαιρείται σε κύβους και αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 10 λεπτά ώστε να αποβάλει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα τυρογάλακτος, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).

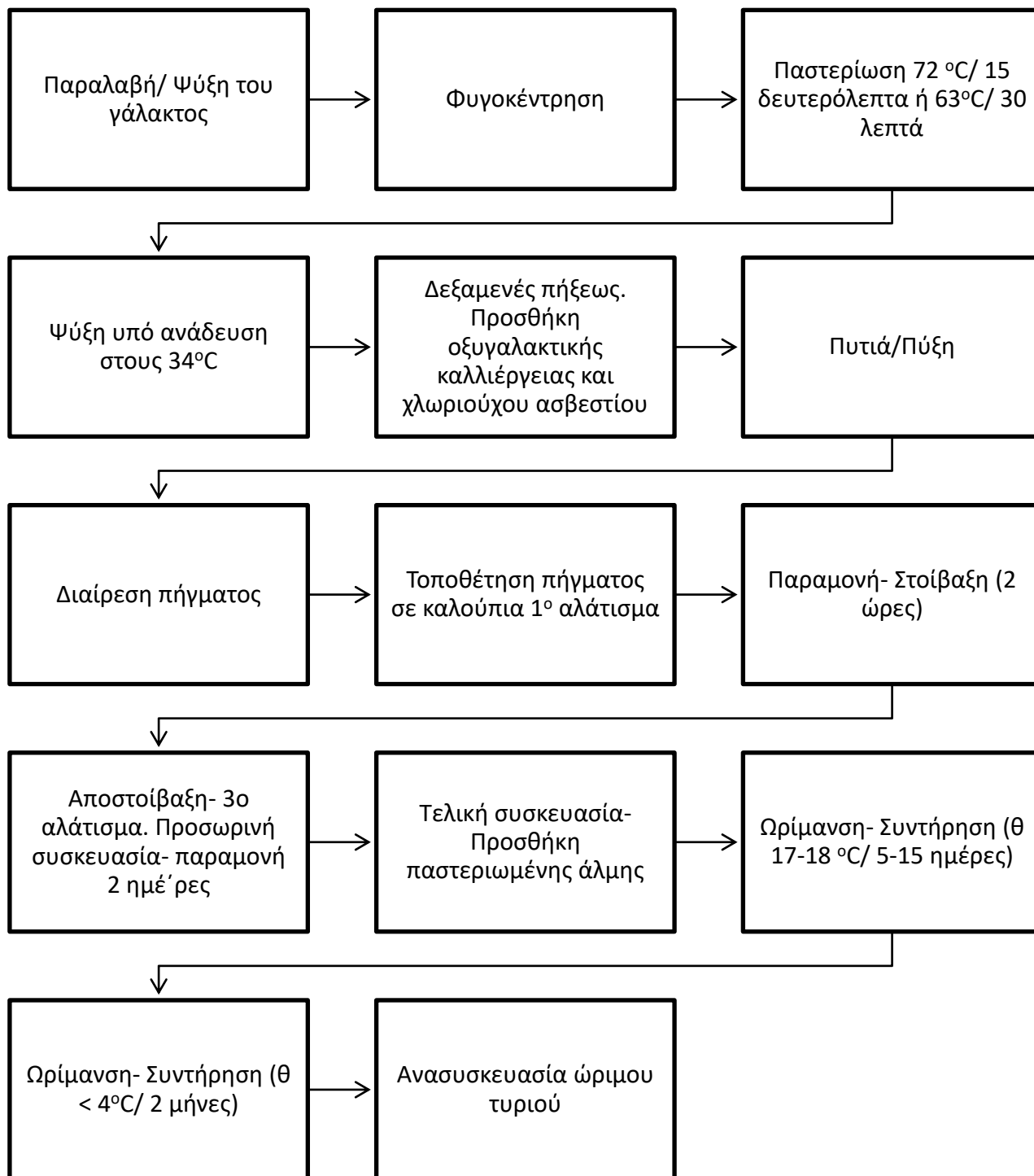
Μετά την ανάπαυση του τυροπήγματος, το τελευταίο μεταφέρεται προσεκτικά σε καλούπια, τα οποία φέρουν μεγάλο αριθμό οπών, προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική στράγγιση του πήγματος. Τα καλούπια γεμίζονται σταδιακά, αφού η βαθμιαία και σε στρώσεις μεταφορά του πήγματος στα καλούπια ευνοεί τη στράγγιση και το σχηματισμό μικρών μηχανικών ανοιγμάτων, σχήματος αμυγδάλου, στη μάζα του τυριού, χαρακτηριστικό γνώρισμα της δομής της Φέτας. Μετά από 2-3 ώρες, τα καλούπια αναστρέφονται στην τυροτράπεζα και αφήνονται για άλλες 2-3 ώρες σε θερμοκρασία 14-18 °C για να ολοκληρωθεί η στράγγιση (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Αφού ολοκληρωθεί η συναίρεση του πήγματος, το τελευταίο εξάγεται από τα καλούπια και τεμαχίζεται σε κομμάτια, τα οποία και αλατίζονται. Για το αλάτισμα χρησιμοποιείται καθαρό χοντρόκοκκο αλάτι, το οποίο διαλύεται αργά. Εάν γινόταν χρήση λεπτόκοκκου αλατιού, αυτό θα διαλυόταν γρήγορα και το τυρί που θα προέκυπτε θα είχε πολύ σκληρή επιφάνεια και θα καθυστερούσε η αποβολή του ορού (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Την επόμενη ημέρα, τα τεμάχια αναποδογυρίζονται και αλατίζονται. Το pH του τυριού στο στάδιο αυτό πρέπει να είναι γύρω στο 5 (Κυριακόπουλος, 1995) και η τελική συγκέντρωση του αλατιού στην τυρομάζα πρέπει να είναι ~3g/100g (Anifantakis & Moatsou, 2006). Μετά το αλάτισμα, τα τυροτεμάχια αφήνονται στην τυροτράπεζα και αναποδογυρίζονται κάθε 24 h μέχρι η επιφάνειά τους να γίνει «γλοιώδης», χαρακτηριστικό

που οφείλεται στην ανάπτυξη βακτηρίων και ζυμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στην ωρίμανση του τυριού και επομένως στην ανάπτυξη των ειδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Μετά από 4-5 ημέρες, και εφ' όσον η τιμή του pH είναι μικρότερη του 4,6 και η υγρασία λιγότερη από 56 g / 100g, τα τυροτεμάχια καθαρίζονται προσεκτικά με τη χρήση νερού ή άλμης και συσκευάζονται σε στρώσεις σε ξύλινα βαρέλια χωρητικότητας περίπου 50 kg, έτσι ώστε να μην υπάρχουν κενά μεταξύ τους. Τα βαρέλια σφραγίζονται και μεταφέρονται σε θαλάμους με υψηλή σχετική υγρασία (ΣΥ), όπου παραμένουν για 10 περίπου ημέρες ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανση στους 16-18 °C. Κατά διαστήματα πραγματοποιείται κύλιση των βαρελιών και συμπλήρωση με άλμη 5%. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους με θερμοκρασία 3 - 4 °C και υψηλή ΣΥ (95 - 100%), όπου παραμένουν για 2 μήνες από την ημερομηνία παρασκευής, οπότε και ολοκληρώνεται η ωρίμανσή τους. Αν το pH είναι χαμηλότερο από 4,4 - 4,6, το τυρί αποκτά όξινη γεύση, παρατηρείται απώλεια υγρασίας και το τυρί θρυμματίζεται κατά τον τεμαχισμό ενώ σε υψηλότερο pH η διάρκεια συντήρησης μειώνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).



Σχήμα 2.1: Στάδια παραγωγής Φέτας (ΕΦΕΤ, 2011)

3. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε τους μικροοργανισμούς στην εμπειρική παρασκευή διαφόρων ζυμούμενων τροφίμων για πολλές χιλιάδες χρόνια. Παρά το γεγονός ότι δεν γνώριζε από την αρχή την ύπαρξή τους, γνώριζε πολύ καλά το αποτέλεσμα της δράσης τους. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η κατάσταση αυτή άλλαξε.

Το 1873, δέκα χρόνια μετά τη μελέτη της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος από τον Louis Pasteur, απομονώθηκε η πρώτη καθαρή καλλιέργεια οξυγαλακτικού βακτηρίου, *Bacterium lactis* (σήμερα γνωστό ως *Lactococcus lactis*) από τον Joseph Lister. Έκτοτε, ξεκίνησε μια προσπάθεια απομόνωσης και μελέτης διάφορων μικροοργανισμών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή τροφίμων ζύμωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτηρίων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία, με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen, 2002).

Η ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζει υψηλή ποικιλομορφία και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γενών και ειδών, τα οποία απαντώνται σε πολλά οικοσυστήματα, όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα, την αναπνευστική, εντερική και γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων, τα νερά των υπονόμων και τα αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά.

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών, τα οποία διαθέτουν ορισμένες κοινές φυσιολογικές ιδιότητες. Ο Orla-Jensen (1942) όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους οργανισμούς (ραβδία ή κόκκους) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Για τις σύγχρονες προσεγγίσεις, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη φυλογενετικές αναλύσεις και μοριακές τεχνικές, αυτός ο ορισμός θεωρείται μονοσήμαντος. Παρ' όλα αυτά παραμένει γενικά αποδεκτός (Axelsson, 2004; Stiles & Holzapfel, 1997).

Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι ζυμώνουν τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, μέσω ομο- ή ετερο- ζυμωτικής οδού (Salminen and non Wright, 1998). Μορφολογικά εμφανίζονται

ως ράβδια ή κόκκοι, μόνα τους ή σε συσσωματώματα. Έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30- 40 °C, είναι ανθεκτικά στα οξέα (ορισμένα είδη αναπτύσσονται ακόμη και σε pH 3.5) και έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης στην όξινη περιοχή (5-7). Στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999).

Επιπροσθέτως, τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν διαθέτουν πορφυρίνες και κυτοχρώματα, άρα δεν διαθέτουν τη ικανότητα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και κατά συνέπεια παράγουν ενέργεια μόνο με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος (Law, 1997). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο και μπορούν να αναπτυχθούν είτε παρουσία είτε απουσία του. Κατά συνέπεια είναι μικροαερόφιλα βακτήρια. Τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια παίρνουν ενέργεια μόνο από τον μεταβολισμό σακχάρων και κατά συνέπεια περιορίζονται σε ενδαιτήματα όπου υπάρχουν σάκχαρα. Συνήθως διαθέτουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες ενώ οι σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις τους περιλαμβάνουν αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες (Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Στην πλειοψηφία τους δεν είναι ικανά για κίνηση, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις βακίλλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια.

Αναλόγως για το εάν πρόκειται για ομοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά βακτήρια προκύπτουν διαφορετικά προϊόντα μεταβολισμού. Τα οξυγαλακτικά που ανήκουν στην υποομάδα των ομοζυμωτικών, παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ, ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν γαλακτικό οξύ, αιθανόλη ή οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα .

3.2 Ταξινόμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η εξέλιξη των μοριακών μεθόδων και ο συνεχής εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες 16S rDNA γονιδίων προκάλεσαν μεγάλες αλλαγές στη συστηματική των βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Πρόκειται για μία μεγάλη ομάδα βακτηρίων που περιλαμβάνει έξι οικογένειες και περίπου 40 γένη, γεγονός που απεικονίζει και τη μεγάλη ποικιλομορφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, έχουν περιγραφεί 7 γένη για την οικογένεια *Aerococcaceae*, 16 γένη για την οικογένεια *Carnobacteriaceae*, 7 γένη για την οικογένεια *Enterococcaceae*, 3 γένη για την οικογένεια

Lactobacillaceae, 4 γένη για την οικογένεια *Leuconostocaceae* και 3 γένη για την οικογένεια *Streptococcaceae*.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Το γένος *Bifidobacterium*, αν και φυλογενετικά ανήκει στο φύλο *Actinobacteria*, εξετάζεται συνήθως με τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της στενής του συγγένειας με αυτά όσον αφορά τις φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες αλλά και γιατί απαντάται στα ίδια οικοσυστήματα, όπως για παράδειγμα το γαστρεντερικό σύστημα (Vandamme et al., 1996).

Η συνεχής απομόνωση νέων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως επίσης και διαφοροποίηση που αυτά παρουσιάζουν, κάνουν απαραίτητη την εφαρμογή πολυφασικών ταξινομικών προσεγγίσεων.

Πίνακας 3.1 Κυριότερες οικογένειες οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν ταυτοποιηθεί και η μορφολογία τους. Επισημαίνονται τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες (SLAB) και δευτερεύουσες εναρκτήριες καλλιέργειες (NSLAB)

Οικογένειες	Γένη	Μορφολογία	Βασικότερα απομονωμένα από τυριά
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i> (Ab.)	Κόκκοι ή Κοκοβάκκιλοι	
	<i>Aerococcus</i> (Ac.)	Κόκκοι (μονά, διάδες, τετράδες)	
	<i>Facklamia</i> (F.)	Κόκκοι (διάδες, αλυσίδες)	
	<i>Ignavigranum</i> (Ig.)		
	<i>Globicatella</i> (Glo.)	Κόκκοι (μονά, διάδες, αλυσίδες, ομάδες)	
	<i>Eremococcus</i> (Erc.)		
	<i>Dolosicoccus</i> (Dc.)		
	<i>Carnobacterium</i> (C.)	Βάκιλλοι (μονά, ζεύγη, αλυσίδες)	
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Marinilactibacillus</i> (M.)	Βάκιλλοι (μονά, ζεύγη)	
	<i>Trichococcus</i> (Tr.)	Κόκκοι σφαιρικοί προς οβάλ (μονά, ζεύγη, αλυσίδες),	
	<i>Alkalibacterium</i> (Alk.)		
	<i>Allofustis</i> (Af.)		
	<i>Alloiococcus</i> (Al.)		
	<i>Atopobacter</i> (Ap.)		
	<i>Atopococcus</i> (Ac.)		
	<i>Bavariiococcus</i> (Bav.)	Κόκκοι / Βάκιλλοι	
	<i>Desemzia</i> (D.)		
	<i>Dolosigranulum</i> (Dg.)		
	<i>Granulicatella</i> (Gra.)		
	<i>Isobaculum</i> (Is.)		
<i>Lacticigenum</i> (Lg.)			
<i>Enterococcus</i> (Ent.)	Κόκκοι (ζεύγη ή αλυσίδες)	SLAB	
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Tetragenococcus</i> (Tet.)	Κόκκοι σφαιρικοί προς οβάλ (μονά, ζεύγη, αλυσίδες, τετράδες)	
	<i>Vagococcus</i> (V.)	Κόκκοι (μονά, ζεύγη ή αλυσίδες)	
	<i>Atopobacter</i> (Ap.)		
	<i>Catelicoccus</i> (Cat.)		
	<i>Melissococcus</i> (Me.)		
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Pilibacter</i> (Pi.)	Κόκκοι / Βάκιλλοι	
	<i>Lactobacillus</i> (Lb.)	Κοκοβάκκιλοι προς μακρείς Βάκιλλοι (μονά, ζεύγη και αλυσίδες)	NSLAB/ SLAB
	<i>Paralactobacillus</i> (Pl.)	Κόκκοι	

	<i>Pediococcus(Ped.)</i>	Κόκκοι (μονά, ζεύγη, αλυσίδες, τετράδες)	NSLAB
	<i>Fructobacillus(Fru.)</i>	Βάκιλλοι (μονά, ζεύγη)	
	<i>Leuconostoc(Leuc.)</i>	Κόκκοι (ζεύγη ή αλυσίδες)	SLAB
<i>Leuconostoccaceae</i>	<i>Oenococcus(O.)</i>	Κόκκοι ελλειψοειδείς προς σφαιρικοί (ζεύγη ή αλυσίδες)	
	<i>Weissella(W.)</i>	Μικροί Βάκιλλοι (ζεύγη και μικρές αλυσίδες)	
	<i>Lactococcus(Lc.)</i>	Κόκκοι (ζεύγη ή αλυσίδες)	SLAB
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactovum(Lv.)</i>	Κόκκοι	
	<i>Streptococcus(Str.)</i>	Κόκκοι (μονά, διάδες, αλυσίδες, ομάδες)	SLAB

SLAB: Starter lactic acid bacteria, NSLAB: Non starter lactic acid bacteria

3.3 Μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων

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

Ως εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια ορίζονται αυτά που παράγουν οξύ ικανό να μειώσει το pH του γάλακτος κάτω από το 5,3 μέσα σε 6 ώρες στους 30 - 37 °C και τα οποία κατά την παρασκευή των τυριών αναπτύσσονται σε πληθυσμούς της τάξης των 10^8 - 10^9 cfu/g μέσα σε λίγες ώρες. Οι εναρκτήριες καλλιέργειες είτε προστίθενται κατά την έναρξη της τυροκόμησης είτε μπορεί να αποτελούν χλωρίδα του γάλακτος, όπως συμβαίνει σε πολλά τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα. Για την παραγωγή των τυριών χρησιμοποιούνται είτε μεσόφιλες είτε θεرمόφιλες εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων, ανάλογα με τον τύπο του τυριού που παρασκευάζεται. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα οξυγαλακτικά βακτήρια ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες είναι μέλη των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Enterococcus* (Beresford et al., 2001).

Ως μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) χαρακτηρίζονται οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και πεδιόκοκκοι που αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας των περισσότερων τυριών κατά την ωρίμανση.

Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το τυρί το 1912 (Cogan et al., 1997). Δεν συνιστούν μέρος της φυσιολογικής εναρκτήριας χλωρίδας, δεν αναπτύσσονται καλά στο γάλα (Cogan et al., 1997) και δε διαθέτουν υψηλή ικανότητα οξύνισης του γάλακτος. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπληρωματικές καλλιέργειες (adjuncts).

Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι λακτοβάκιλλοι και πεδιόκοκκοι αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού των NSLAB στα περισσότερα τυριά κατά τη διαδικασία της ωρίμασης (Manolopoulou et al., 2003, Beresford and Williams, 2004, Casey et al., 2006, Gobbetti et al., 2007). Τέτοια στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Beresford et al., 2001). Ειδικότερα στο τυρί Φέτα, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε αλάτι επιβιώνουν είδη όπως, ο *Lactobacillus paraplantarum*, ο *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, ο *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*. Καταλήγοντας, ο πληθυσμός τους ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του τυριού, την διαδικασία παρασκευής, όπως επίσης και τη διάρκεια ωρίμασης του τυριού (Casey et al., 2006).

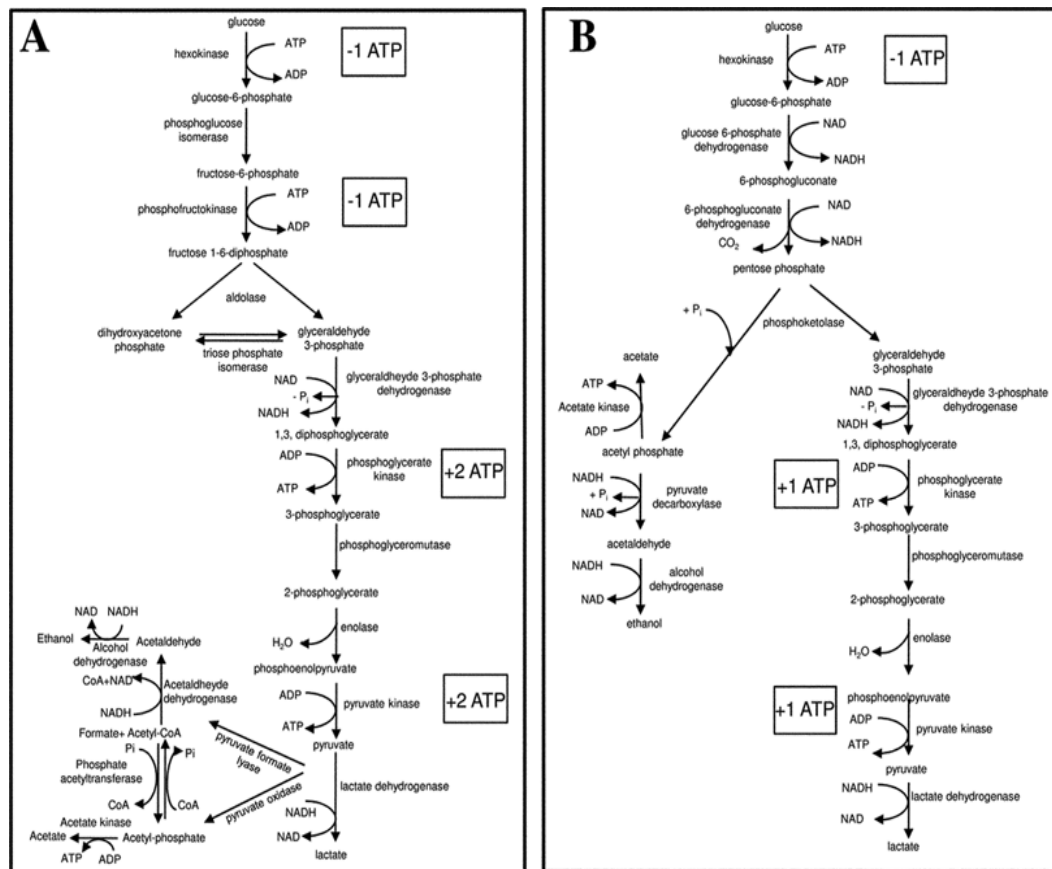
3.4 Μεταβολισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι απαιτητικοί οργανισμοί και χρειάζονται υδατάνθρακες, αμινοξέα, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία προκειμένου να αναπτυχθούν. Επιπλέον, ορισμένα οξυγαλακτικά απαιτούν ειδικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο ορός του γάλακτος. Όταν βρίσκονται στο γάλα χρησιμοποιούν τη λακτόζη και το λίπος ως πηγή άνθρακα και τις πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου (McSweeney and Sousa, 2000).

Τα οξυγαλακτικά αποικοδομούν υδατάνθρακες μέσω διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών. Το ATP που παράγεται μέσω της φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος, χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των διαλυμένων ουσιών κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και για βιοσυνθετικούς σκοπούς. Τρεις είναι οι κύριες οδοί που μπορούν να συσχετιστούν με την παραγωγή αρωματικών ενέσεων στο τυρί, η διάσπαση της λακτόζης (γλυκόλυση), του λίπους (λιπόλυση) και της καζεΐνης (πρωτεόλυση) (Bockelmann et al., 2001; Bockelmann et al., 1997; Molimard et al., 1996).

3.4.1 Μεταβολισμός σακχάρων

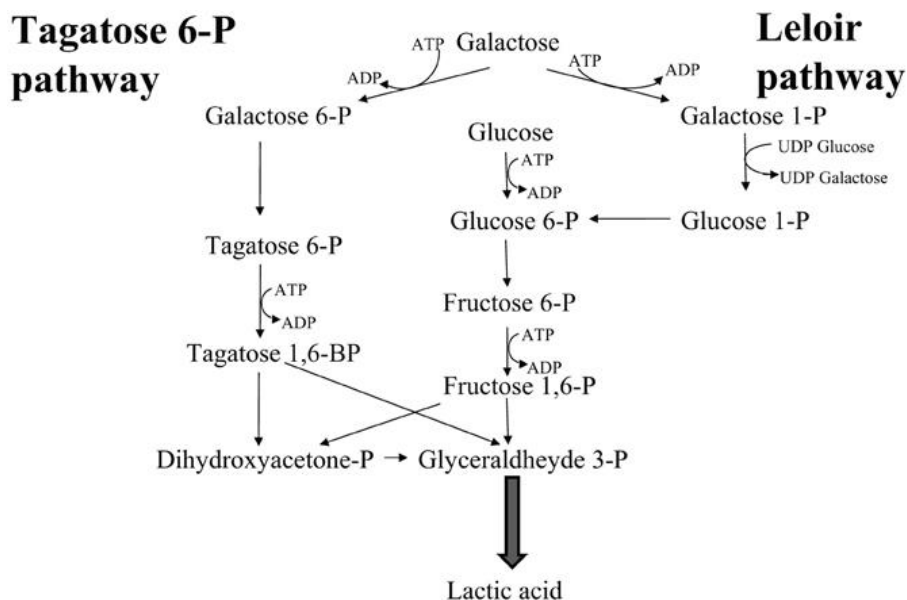
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν τους υδατάνθρακες με την φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος, με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Δύο είναι τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια στα οξυγαλακτικά βακτήρια: το ομοζυμωτικό μονοπάτι (γλυκόλυση ή μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) και το ετεροζυμωτικό μονοπάτι (μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών). Η μεταφορά και φωσφορυλίωση της γλυκόζης λαμβάνει χώρα με μεταφορά του ελεύθερου σακχάρου και φωσφορυλίωσή του από μια ATP - εξαρτώμενη γλυκοκινάση. Κάποια είδη χρησιμοποιούν το σύστημα της φωσφοτρανσφεράσης (Phosphotransferase system, PTS) που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (Phosphoenolpyruvate, PEP) (σύστημα PEP-PTS) με το PEP να είναι ο δότης της φωσφορικής ομάδας (Postma et al., 1993).



Σχήμα 3.1: Μεταβολικά μονοπάτια της γλυκόζης: (A) Ομοζυμωτικό μονοπάτι (γλυκόλυση), (B) Ετεροζυμωτικό μονοπάτι (μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών) (Pessione et al., 2010).

Το γλυκολυτικό μονοπάτι (ομοζυμωτικό) (Σχήμα 3.1(A)) χρησιμοποιείται από όλα τα μέλη των οικογενειών *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactococcaceae*, *Pediococcaceae*, *Tetragenococcaceae* και *Vagococcaceae* εκτός από μία ομάδα του γένους *Lactobacillus* (Axelsoon, 1993). Στη μεταβολική αυτή οδό, η γλυκόζη μέσω της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και τελικά παράγονται 2 μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης μέσω φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος. Στη συνέχεια, υπό συνθήκες περίσσειας σακχάρου και περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς γαλακτικό οξύ μέσω της NAD⁺-εξαρτώμενης γαλακτικής αφυδρογονάσης, ενώ ταυτόχρονα το NADH αναγεννιέται στην οξειδωμένη του μορφή. Το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ.

Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (Σχήμα 3.1(B)). Το μονοπάτι αυτό χαρακτηρίζεται από τα αρχικά στάδια οξείδωσης της γλυκόζης, το σχηματισμό του 6-φωσφο-γλυκονικού οξέος και τη αποκαρβοξυλίωση αυτού. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια στερούνται της αλδολάσης της 1,6-δισ-φωσφορικής φρουκτόζης και της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών που αποτελούν σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Η παραγόμενη 6-φωσφορική πεντόζη διασπάται από τη φωσφοκετολάση προς 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη στη συνέχεια εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ είτε ανάγεται προς αιθανόλη, μέσω του ακετυλο-CoA και της ακεταλδεΐδης, είτε αποφωσφορυλιώνεται προς οξικό οξύ και ATP, είτε ενώνεται με ένα μόριο CoA, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς ακεταλδεΐδη που με τη σειρά της ανάγεται σε αιθανόλη έτσι ώστε να αναγεννηθεί το NAD στην οξειδωμένη του μορφή (Law, 1997). Συνοψίζοντας, ο μεταβολισμός που οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτικού οξέος αλλά και σημαντικών ποσοτήτων άλλων τελικών προϊόντων (CO₂, οξικό οξύ ή αιθανόλη) χαρακτηρίζεται ως ετεροζυμωτικό μονοπάτι.



Σχήμα 3.2: Μεταβολισμός γαλακτόζης (Pessione et al., 2012)

Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια η κύρια πηγή άνθρακα στο γάλα είναι η λακτόζη και η ζύμωσή της αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο δισακχαρίτη. Η λακτόζη εισέρχεται στο κύτταρο με δύο βασικούς μηχανισμούς. Στον πρώτο, η είσοδος της λακτόζης πραγματοποιείται μέσω της περμεάσης της λακτόζης και στη συνέχεια υδρολύεται από την ενδοκυτταρική β-γαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και γαλακτόζη (Fox et al., 1990). Στο δεύτερο, η λακτόζη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορική λακτόζη μέσω ενός συστήματος PEP-PTS (phosphoenol pyruvate-phospho transferase system) και στη συνέχεια διασπάται από τη β-φωσφογαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και 6-φωσφορική γαλακτόζη. Το σύστημα PEP-PTS της λακτόζης καθώς και η β-φωσφογαλακτοζιδάση σε γενικές γραμμές επάγονται ή καταστέλλονται από την παρουσία της λακτόζης (Kandler, 1983).

Το σύστημα PEP-PTS είναι πολυπλοκότερο από το σύστημα μεταφοράς μέσω της περμεάσης της λακτόζης, αφού για να λειτουργήσει απαιτεί την παρουσία ιόντων Mg^{2+} και τέσσερις πρωτεΐνες. Δύο από αυτές, το ένζυμο II και το ένζυμο III, βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση όσον αφορά το σάκχαρο-υπόστρωμα. Οι δυο άλλες, το ένζυμο I και μια χαμηλού μοριακού βάρους θερμοανθεκτική πρωτεΐνη (HPr), είναι διαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και απαντώνται σε όλα τα συστήματα PEP-PTS (Postma et al., 1993).

Ανεξάρτητα από το σύστημα μεταφοράς, η γλυκόζη στη συνέχεια θα οξειδωθεί προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού, η γαλακτόζη θα μεταβολισθεί μέσω της οδού Leloir ή μέσω του μονοπατιού της ταγκατόζης (Σχήμα 3.2) (Marilley & Casey, 2004). Παρόλα αυτά, επισημαίνεται ότι κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. οι θερμόφιλοι *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* και *Lb. acidophilus*) δεν είναι ικανά να μεταβολίσουν τη γαλακτόζη, την οποία εκκρίνουν προς το εξωτερικό του κυττάρου.

3.4.2. Πρωτεόλυση και λιπόλυση

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι πιο απαιτητικοί σε αμινοξέα από τους κόκκους. Οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων αμινοξέων είναι πολύ χαμηλές στο γάλα, έτσι ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια γαλακτοκομικής προέλευσης έχουν πρωτεολυτικές ιδιότητες και αποκτούν αμινοξέα από την καζεΐνη του γάλακτος.

Η αξιοποίηση της καζεΐνης από τα LAB πραγματοποιείται από μια εξωκυτταρική πρωτεΐνάση του κυτταρικού φακέλου που αποικοδομεί την πρωτεΐνη σε αμινοξέα, δι-και τρι-πεπτιδια και ολιγοπεπτιδια. Τα πεπτιδια αποτελούν υπόστρωμα δράσης ενδοκυτταρικών πεπτιδασών (Savijoki et al., 2006). Ωστόσο, ορισμένα στελέχη στερούνται πρωτεΐνασών και εξαρτώνται από άλλα στελέχη για την παραγωγή αμινοξέων και πεπτιδίων. Η μεταφορά των παραγόμενων πεπτιδίων λαμβάνει χώρα εντός του κυττάρου μέσω του συστήματος Opp, πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένων μεταφορέων ATP- πρόσδεσης (Doeven et al., 2005). Τέλος, οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που αναφέρθηκαν παραπάνω διασπούν τα πεπτιδια σε μικρότερα πεπτιδια και αμινοξέα, τα οποία στη συνέχεια αποικοδομούνται με την δράση των αμινοπεπτιδασών (Law, 1997). Η πρωτεόλυση έχει επίσης βιομηχανική σημασία λόγω της συμβολής της στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (Meyer and Sprahni, 1998; Sridhar et al., 2005).

Τόσο τα προϊόντα της υδρόλυσης όσο και το λίπος αυτό καθαυτό είναι υπεύθυνα για τη γεύση στο τυρί. Η λιπόλυση είναι σημαντική για την ανάπτυξη της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ιδιαίτερα στην ωρίμανση του τυριού. Αρκετά οξυγαλακτικά βακτήρια του περιβάλλοντος του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων των *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *L. casei*, *L. plantarum* και *L. rhamnosus*, έχουν αναφερθεί ότι έχουν λιπολυτική δράση (Centeno et al., 1999; Di Cagno et al., 2006; Abeijõn

Mukdsi et al., 2009). Η λιπόλυση στο τυρί συνήθως πραγματοποιείται μέσω των συστημάτων εστεράσης / λιπάσης που διαθέτουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και συνεισφέρουν την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων τα οποία με τη σειρά τους συνεισφέρουν στα αρώματα του τυριού (Liu et al., 2004).

3.5 Αντιμικροβιακό δυναμικό οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στα ζυμούμενα τρόφιμα, όπως η Φέτα, εκτός του ότι συμβάλλουν στην δημιουργία του τελικού προϊόντος, παίζουν σημαντικό ρόλο στην συντήρηση, αλλά και στην υγιεινή των τροφίμων παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των παθογόνων και άλλων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Η δράση τους αυτή οφείλεται στην σύνθεση ενός αριθμού μεταβολιτών, οι οποίοι είναι γνωστοί για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες έναντι διαφόρων ανεπιθύμητων αλλοιωγόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι μεταβολίτες αυτοί ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Μεταβολικά προϊόντα του οξυγόνου και τελικά προϊόντα του καταβολισμού, όπως είναι τα οργανικά οξέα (γαλακτικό, προπιονικό, μυρμηγκικό κ.α.), το διοξείδιο του άνθρακα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οι ελεύθερες ρίζες, το διακετύλιο, η ακεταλδεύδη, το σύστημα της υπεροξειδάσης, η αιθανόλη και τέλος τα D- ισομερή διαφόρων αμινοξέων.
- Αντιμικροβιακές ουσίες, όπως μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής, για παράδειγμα, κυκλικά διπεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση που δρουν συνεργιστικά με το γαλακτικό και το οξικό οξύ ή ουσίες παραγόμενες από τον *Lb. plantarum*, μοριακού βάρους <700Da, δραστικές έναντι του *Pantoea agglomerans* και του *Fusarium avenaceum* (Daeschel 1989) και μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες.

Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία, το γαλακτικό και το οξικό οξύ είναι τα κύρια παραγόμενα οργανικά οξέα από τα γαλακτικά βακτήρια και αποτελούν τους πιο βασικούς και αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ένας τρόπος παρεμπόδισης της μικροβιακής ανάπτυξης των οργανικών οξέων είναι η μείωση της τιμής του pH και η παρουσία της αδιάστατης μορφής τους (Adams and Hall 1988, Adams 1990). Ακόμη, η

συσσώρευση CO₂, δημιουργεί αναερόβιο περιβάλλον και αποτελεί το ίδιο ένα αντιμικροβιακό παράγοντα (Dixon & Kell 1989).

Η παραγωγή υπεροξειδάσης από οξυγαλακτικά βακτήρια έχει επίσης αντιμικροβιακή δράση. Διαπιστώθηκε, ότι οι γαλακτοβάκιλλοι παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα υπεροξειδάσης από τα άλλα γένη. Η δράση της υπεροξειδάσης συμπληρώνεται από την παρουσία ελεύθερων ριζών (O και OH) του οξυγόνου (Condon 1987, Piard & Desmazeaud 1991). Τόσο το H₂O₂ όσο και οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν ειδικές περιοχές του βακτηριακού DNA (π.χ. την μεθυλική ομάδα της θυμίνης, τα μόρια της γουανίνης) και προκαλούν αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές βλάβες, όπως απελευθέρωση νουκλεοτιδίων ή απόσπαση ολόκληρων τεμαχίων DNA (Ananthaswamy & Eisenstark 1977, Byczkowski & Gessner 1988).

Στην κατηγορία αντιμικροβιακών ουσιών μικρού μοριακού βάρους, μη πρωτεϊνικής φύσεως ανήκουν ουσίες που παράγονται από ορισμένα στελέχη και χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Για παράδειγμα, μια τέτοια ουσία παράγεται από στέλεχος του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, με μοριακό βάρος γύρω στα 700 Da, η οποία είναι δραστική έναντι του *Pseudomonas tragi*, του *Achromobacter Hquefaciens* και του *Streptococcus aureus*, με άριστο pH δράσης 4.0 (Abdel-Bar & Harris 1984, Abdel-Bar et al. 1987).

3.5.1 Βακτηριοσίνες

Η σημασία των βακτηριοσινών προκύπτει από το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης τους και την πιθανότητα εφαρμογής τους ως φυσικών συντηρητικών τροφίμων με σκοπό την αντικατάσταση ή μείωση κάποιων χημικών αντίστοιχων ενώσεων (Barnby-Smith, 1992). Είναι όμως προφανές, ότι η προσθήκη σε ένα τρόφιμο επιβλαβών βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες, όπως για παράδειγμα, τα *E. coli* (Hardy, 1975) και *Staphylococcus epidermidis* (Homer et al., 1989), με στόχο την in situ παραγωγή τους αντενδείκνυται, ενώ η άμεση προσθήκη των κολισινών ή της επιδερμίνης μπορεί μόνο να επιτραπεί μετά από συστηματική έρευνα για τον χαρακτηρισμό και τον έλεγχο της τοξικότητας τους (Roller, 1991).

Αντίθετα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν θεωρούνται επικίνδυνα και ως εκ τούτου, οι βακτηριοσίνες τους (ουσίες GRAS: Generally Regarded As Safe) μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα ενός τροφίμου, χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς, με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά (Bhunia et al. 1990, Barnby-Smith 1992). Επομένως, οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ερευνητικό επίπεδο (Klaenhammer, 1988; Schillinger, 1990; Hillier & Davidson, 1991; Juven et al. 1991; Marugg, 1991; Roller, 1991; Stiles & Hastings, 1991; Barnby-Smith, 1992). Στην Ευρώπη, η μόνη βακτηριοσίνη που επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό (E234) σε τρόφιμα, είναι η νισίνη που παράγεται από το είδος *Lactococcus lactis ssp. lactis*. Είναι η πιο μελετημένη βακτηριοσίνη και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό πάνω από 50 χρόνια, με την εμπορική ονομασία “nisaplin”.

Ως βακτηριοσίνες ορίζονται μία ορισμένη κατηγορία φυσικών αντιμικροβιακών μεταβολιτών που έχουν πρωτεϊνική δομή και εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση ως προς περιορισμένο αριθμό βακτηριακών γενών και ειδών, συνήθως ταξινομικά συγγενών με το παραγωγό στέλεχος. Οι βακτηριοσίνες είναι ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως και συντίθενται ριβοσωμικά από βακτήρια (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988). Η έκκριση τους γίνεται μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων (ABC-μεταφορείς) ή μονοπατιών. Το κύτταρο που τις παράγει προστατεύεται από τις δικές του βακτηριοσίνες, μέσω πρωτεΐνης ανοσίας. Η πρωτεΐνη ανοσία κωδικοποιείται με το γονίδιο, το οποίο συνδέεται με το γονίδιο της βακτηριοσίνης. Οι βακτηριοσίνες κατηγοριοποιούνται σε τρεις κλάσεις με βάση την αρχική δομή τους. Η πρώτη κλάση περιλαμβάνει τροποποιημένα πεπτίδια που ονομάζονται λαντιβιοτικά, η δεύτερη κλάση περιλαμβάνει μη τροποποιημένα πεπτίδια και η τρίτη κλάση βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους (Hechard & Sahl 2002).

1. Κλάση I – Λαντιβιοτικά

Οι αντιμικροβιακές ενώσεις που περιέχουν πεπτίδια με λανθειονίνη. Πρόκειται για αμινοξέα με θειοαιθερικούς δεσμούς, τα οποία είναι σταθερά στις πρωτεάσες και αναγνωρίζονται μετά από υδρόλυση ως λανθειονίνη (προερχόμενη από δι-δεϋδρο-αλανίνη και κυστεΐνη) και ως 3-μεθυλο-λανθειονίνη (προερχόμενη από δι-δεϋδρο-βουτυρίνη και κυστεΐνη). Ονομάζονται εν συντομία λαντιβιοτικά (Hechard & Sahl

2002), Τα οποία είναι μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια (< 3.5 KDa). Διακρίνονται σε τύπου A και τύπου B. Τα τύπου A είναι γραμμικά μόρια ενώ τα τύπου B σφαιρικά. Τα τύπου A διακρίνονται περαιτέρω σε A I και A II. Τα τύπου A I είναι γραμμικά πεπτίδια ενώ τα τύπου A II χαρακτηρίζονται από γραμμικό αμινοτελικό άκρο και σφαιρικό καρβοξυτελικό άκρο (Chatterjee et al., 2005).

Η σύνθεση του λαντιβιοτικού γίνεται στα ριβοσώματα, ως πρόδρομο πεπτίδιο ενωμένο με ειδική πρωτεΐνη-οδηγό. Το προ-πεπτίδιο υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και κατόπιν απελευθερώνεται από την πρωτεΐνη-οδηγό με τη δράση μιας πρωτεάσης τύπου σερίνης. Το ώριμο πλέον λαντιβιοτικό μεταφέρεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης με ειδικό μεταφορέα (ABC μεταφορέας) ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται η ανοσία του κυττάρου έναντι του λαντιβιοτικού. Τα ώριμα λαντιβιοτικά ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση εξωκυτταρικά (Patton et al., 2005).

- Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών A I

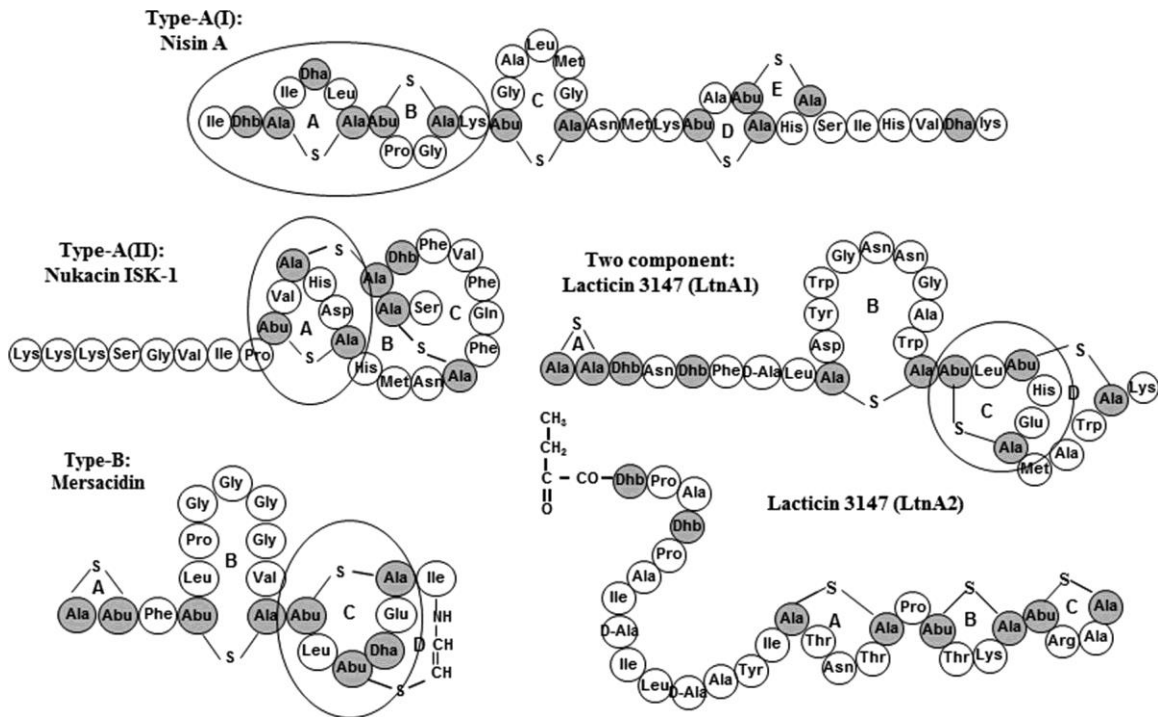
Τα λαντιβιοτικά παράγονται και δρουν κυρίως κατά Gram θετικών βακτηρίων. Η περιορισμένη αυτή τους δράση αιτιολογείται από την ύπαρξη της εξωτερικής λιποπολυσακχαριτικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Επιπλέον, τα λαντιβιοτικά παρουσιάζουν υψηλή ειδική ενεργότητα, αλλά περιορισμένο αντιμικροβιακό φάσμα. Κάθε τύπος λαντιβιοτικού λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο. Τα τύπου A I λαντιβιοτικά διαφέρουν ως την αντιμικροβιακή τους δράση. Παρεμβαίνουν στην ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, την εκβλάστηση των σπόρων των μικροβίων και τέλος, προάγουν αυτόλυση των κυττάρων (Yang et al., 2014).

Η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης καταλύεται με το σχηματισμό πόρων. Σε λιπόφιλο περιβάλλον, οι βακτηριοσίνες, λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους, συνδέονται ηλεκτροστατικά με την κυτταρική μεμβράνη και με αυτόν τον τρόπο εισέρχονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, διαρρηγνύοντάς την και προκαλώντας έτσι την έξοδο μεταβολιτών και τη διαταραχή της ομοιόστασης (Sahl, 1991). Οι πόροι που σχηματίζονται είναι μικρής διάρκειας και απαιτούν μικρομοριακές συγκεντρώσεις λαντιβιοτικού. Στην περίπτωση σχηματισμού πόρων μεγαλύτερης διάρκειας, τα λαντιβιοτικά τύπου A I

χρησιμοποιούν ως μόρια πρόσδεσης στα βακτηριακά κύτταρα τα λιπίδια II, της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για το σχηματισμό πόρων. Η νισίνη αποτελεί χαρακτηριστικό εκπρόσωπο του τύπου A I (Bauer et al., 2004).

Όσον αφορά την αναστολή βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, αυτή επιτυγχάνεται με τη μετατόπιση των λιπιδίων II. Τα λιπίδια II απαντώνται στα διαφραγμάτια ανάπτυξης και στα ελικοειδή νημάτια κατά μήκος των αξόνων των ραβδόμορφων βακτηρίων (Islam et al., 2012). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα και παρεμποδίζουν τη χρησιμοποίηση του λιπιδίου II κατά τη βιοσύνθεση των συμπλεγμάτων του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτέλεσμα είναι η δυσμορφία και ο μη σχηματισμός κυτταρικού τοιχώματος.

Μια επιπρόσθετη δράση είναι η αναστολή της εκβλάστησης σπορίων που οφείλεται στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των σπορίων που εκβλαστάνουν. Τα τύπου A I λαντιβιοτικά προάγουν ακόμα και την αυτόλυση των κυττάρων. Συνδέονται με τα τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα, ενεργοποιούν τα ένζυμα αυτόλυσης και προκαλούν ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος στα διαφραγμάτια μεταξύ των διαιρούμενων κυττάρων (septum) (Bierbaum & Sahl, 1985).



Σχήμα 3.3: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα διαφορετικών τύπων λαντιβιοτικών. Τα σκιασμένα υπολείμματα υποδεικνύουν τα ασυνήθιστα αμινοξέα, που προέρχονται έπειτα από μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Τα διαφορετικά «δαχτυλίδια» των επιμέρους λαντιβιοτικών αναγράφονται με κεφαλαία γράμματα. Τα υπολείμματα εντός των μεγάλων κύκλων λειτουργούν συμπλεκόμενα με το λιπίδιο II (Islam et al., 2012).

- Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών A II

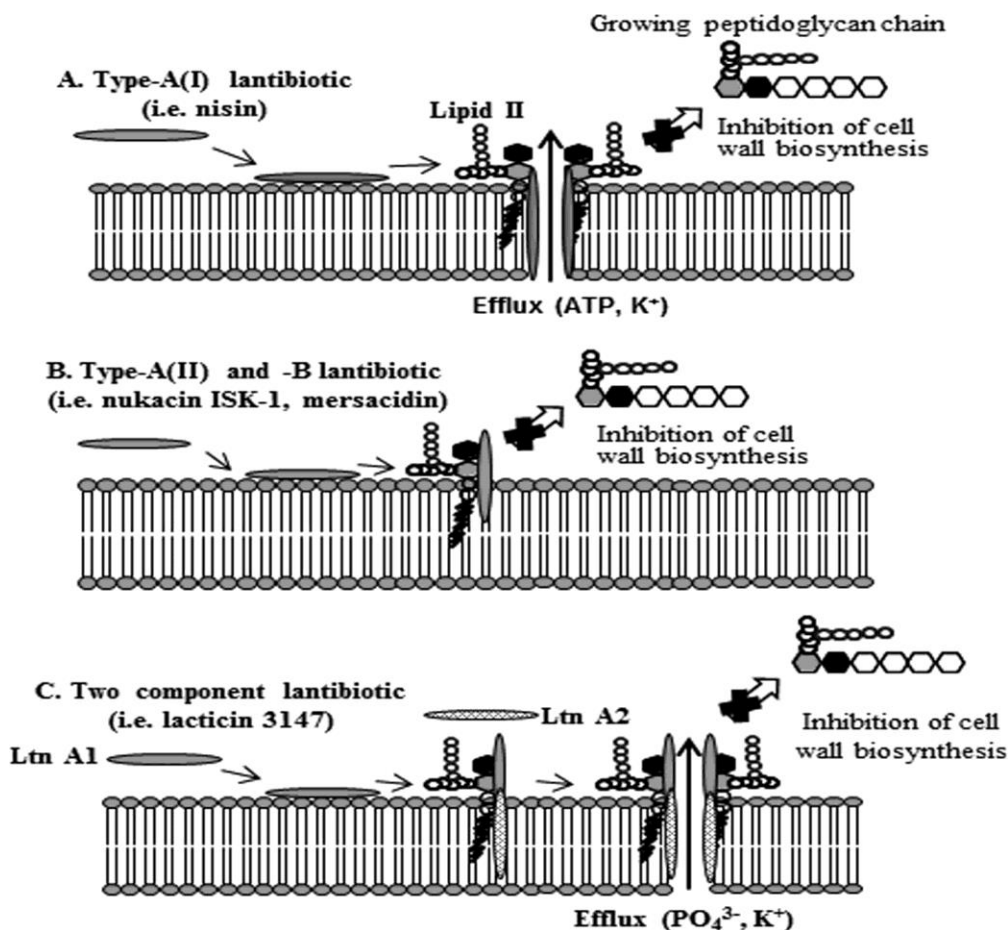
Τα λαντιβιοτικά τύπου AII δημιουργούν σύμπλοκα μαζί με το λιπίδιο II. Η δράση τους βασίζεται στο σχηματισμό πόρων που μπορεί να είναι ασταθείς και προκαλούν διαταραχές στο δυναμικό της μεμβράνης και απώλεια μεταβολιτών. Επιπλέον δύναται να διαμορφωθούν σταθεροί πόροι με τη χρήση λιπιδίου II, που συνεπάγεται τη λύση των κυττάρων. Τέλος τα τύπου AII αναστέλλουν τις αντιδράσεις βιοσύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος με τη χρήση του λιπιδίου I και II. Οι μηχανισμοί είναι όμοιοι με εκείνους των λαντιβιοτικών τύπου AI.

- Τρόπος δράσης λαντιβιοτικών B

Τα λαντιβιοτικά του τύπου αυτού λειτουργούν με δυο τρόπους.

Ο πρώτος περιλαμβάνει την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος μέσω του λιπιδίου II, στην οποία όμως δεν σχηματίζονται πόροι. Η συμμετοχή του λιπιδίου II είναι απαραίτητη για τη συγκεκριμένη διαδικασία.

Η δεύτερη διαδικασία περιλαμβάνει την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και της φωσφολιπάσης A2. Τα λαντιβιοτικά συνδέονται στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και αναστέλλουν τη φωσφολιπάση A2. Παρεμβαίνουν με αυτό τον τρόπο και στη βιοσύνθεση προσταγλαδινών και λευκοτριενιών (Chatterjee et al. 2005; Asaduzamman & Sonomoto, 2009; Bierbaum & Sahl, 2009; Ross et al., 2011).



Σχήμα 3.4: Προτεινόμενο μοντέλο για το μηχανισμό δράσης των διαφόρων κατηγοριών των λαντιβιοτικών. (Α) Τύπος-A (I) λαντιβιοτικά (πχ νισίνη): Αρχικά αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη και στη συνέχεια συνδέονται με λιπίδια II, σταθεροποιείται έτσι το σύμπλεγμα και δημιουργείται πόρος στη θέση-στόχο. Την ίδια στιγμή, με τη χρήση του λιπιδίου II προκαλείται αναστολή της βιοσύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος. (Β) Τύπος -A (II) (πχ nukacin ISK-1) και -B (πχ μερσασιδίνη) λαντιβιοτικά αλληλεπιδρούν με το λιπίδιο II, με αποτέλεσμα την αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. (Γ) Λαντιβιοτικά δύο συστατικών (πχ λακτισίνη 3147) που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη με το πεπτιδίο A1, το οποίο συνδέεται με το λιπίδιο II. Αυτό προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή του πεπτιδίου A1, οπότε δημιουργείται μία θέση σύνδεσης υψηλής συνάφειας για το πεπτιδίο A2, η οποία ακολουθείται από τον σχηματισμό πόρων. Επίσης, αναστέλλουν τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Islam et al., 2012).

2. Κλάση II - Μη Τροποποιημένες Βακτηριοσίνες

Τα μη τροποποιημένα πεπτίδια μήκους 20 - 60 αμινοξέων με κατιονικό και υδροφόβο χαρακτήρα απαρτίζουν την κλάση II των βακτηριοσινών. Διαιρούνται ανάλογα με τη δομή τους σε τρεις υποκατηγορίες (IIa, IIb, IIc). Η υποκλάση IIa περιλαμβάνει πεπτίδια που εκδηλώνουν όλα ανασταλτική δράση έναντι του γένους *Listeria*. Η υποκλάση IIb αποτελείται από βακτηριοσίνες με δυο διακριτά πεπτίδια, χωρίς τυποποιημένη δομή που εμφανίζουν μόνο από κοινού συμπληρωματική δράση. Η υποκλάση IIc περιλαμβάνει τα πεπτίδια που δεν ταξινομούνται στις δύο προηγούμενες κατηγορίες, χωρίς να υπάρχει κάποιο δεδομένο μοτίβο για τη δομή τους (Hechard & Sahl, 2002).

- Τρόπος δράσης βακτηριοσινών κλάσης II

Οι βακτηριοσίνες της κλάσης II προκαλούν γενικώς διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και έξοδο μορίων από τα ευαίσθητα κύτταρα. Ευαίσθητα είναι κυρίως Gram θετικά βακτήρια με χαμηλό ποσοστό γουανίνης+κυτοσίνης, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτήρια του γένους *Clostridium*. Η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων περιορίζεται σε είδη ή στελέχη συγγενή με τα βακτήρια που τα παράγουν (Hechard & Sahl, 2002; Stoyanova et al., 2012).

Ο τρόπος δράσης των βακτηριοσινών κλάσης I και II ποικίλει και συγκεκριμένα πεπτίδια καθορίζουν και διαφορετικό τρόπο δράσης της κάθε κλάσης και της κάθε κατηγορίας. Κάθε τρόπος δράσης είναι αποτελεσματικός έναντι διαφορετικών μηχανισμών άμυνας των μικροβίων, επομένως η εξειδίκευση των βακτηριοσινών είναι απαραίτητη.

3. Κλάση III – Βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους

Οι βακτηριοσίνες της κλάσης III χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους. Δεν υπάρχουν πολλές διαθέσιμες πληροφορίες για τη δομή και τη δραστηριότητά τους. Υπάρχουν μόνο ενδείξεις ότι ελέγχουν την ίδια τους τη βιοσύνθεση και ότι ρυθμίζουν κυτταρικά συστήματα επικοινωνίας.

Το μεγαλύτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον μεταξύ των βακτηριοσινών των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζουν τα λαντιβιοτικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι

είναι μικρά πεπτίδια που διαχέονται πιο εύκολα σε σχέση με μία μικρομοριακή πρωτεΐνη. Είναι ανθεκτικές στη θέρμανση, είναι σταθερές σε μεγάλο εύρος pH και μπορούν να δράσουν σε όξινο περιβάλλον. Ακόμη είναι κατά κανόνα θετικά φορτισμένα πεπτίδια με υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο ($pI > 8.5$) και έλκονται από τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες των βακτηρίων. Παρουσιάζουν μέγιστο βαθμό δράσης σε pH 5.0-6.0, τις τιμές pH που συναντούνται τα περισσότερα τρόφιμα και τέλος παρεμποδίζουν περισσότερα είδη παθογόνων μικροοργανισμών από τις άλλες κατηγορίες (Abee et al., 1995).

3.6 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή μικροβιολογία έχουν αποκαλύψει ότι ο μικροβιακός κόσμος εκτείνεται πολύ πέρα από αυτό που μπορεί να αποκαλυφθεί με τις συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε όλη τη φύση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί έχουν προσαρμοστεί και μπορούν να επιβιώνουν ακόμα και στα πιο δυσμενή περιβάλλοντα (Coughlan et al., 2015). Όσον αφορά τον τρόπο διαβίωσης, τα βακτήρια είτε ζουν ελεύθερα, είτε ζουν συμβιωτικά με τον ξενιστή ή τέλος ζουν ως παθογόνα σε ευκαρυωτικούς ξενιστές ή άλλους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Παρά την εκτεταμένη προσπάθεια για την μελέτη των μικροβίων, δεν είναι γνωστές οι μεταβολικές δραστηριότητες της πλειοψηφίας αυτών (Wu et al., 2009).

Ο κόσμος μας κυριαρχείται από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Ο συνολικός αριθμός των μικροβιακών κυττάρων στη Γη εκτιμάται ότι είναι 10^{30} (Turnbaugh et al., 2008). Στο ανθρώπινο σώμα μόνο, υπάρχουν μέχρι και 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί, το οποίο ισοδυναμεί περίπου με δέκα φορές τον αριθμό των δικών μας ανθρώπινων κυττάρων (Savage, 1997). Υπάρχουν εκατομμύρια προκαρυωτικά είδη που δεν έχουν καλλιεργηθεί. Σύμφωνα με μελέτες, μόνο το 0,001 - 0,1% του συνόλου των μικροβίων στο θαλάσσιο νερό, το 0,25% στο γλυκό νερό, το 0,25% στα ιζήματα και τέλος το 0,3% του εδάφους είναι καλλιεργήσιμο *in vitro* (Amann et al., 1995).

Η πρώτη άμεση κλωνοποίηση μικροβιακού DNA από ένα οικοσύστημα προτάθηκε από τον Lane (Lane et al., 1985), ενώ ο όρος μεταγονιδιωματική ανάλυση επινοήθηκε για πρώτη φορά το 1998 από τον Handelsman, για τη μελέτη των γονιδιωμάτων από όλους τους μικροοργανισμούς ενός συγκεκριμένου οικοσυστήματος, σε αντίθεση με την κλασική

μικροβιολογική ανάλυση όπου μελετάται το γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού που απομονώνεται από το περιβάλλον και μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro* (Handelsman et al., 1998). Η μεταγονιδιωματική ανάλυση είναι ίσως η μεγαλύτερη επανάσταση, από την εφεύρεση του μικροσκοπίου και έπειτα στην κατανόηση του κόσμου των μικροοργανισμών, αφού κατέστη δυνατή η μελέτη όλων των μικροοργανισμών, ανεξάρτητα από το αν μπορούν να καλλιεργηθούν ή όχι, μέσα από την ανάλυση του γενετικού υλικού που λαμβάνεται απευθείας από ένα περιβαλλοντικό δείγμα, παρέχοντας γνώση για τα είδη που υπάρχουν και επιτρέποντας την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με την λειτουργικότητα και των μεταβολισμό των μικροβιακών κοινοτήτων στο φυσικό τους περιβάλλον (Langille et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνολογίες αλληλούχησης υψηλής απόδοσης επέτρεψαν την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των μικροβιακών κοινοτήτων. Μεταξύ αυτών, η μεταγονιδιωματική ανάλυση είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της ποικιλομορφίας πολύπλοκων οικοσυστημάτων, όπως το έδαφος, τα τρόφιμα ή το νερό. Όπως επίσης και για την εξερεύνηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των κυρίαρχων πληθυσμών τους (Sjöling et al., 2008). Παρόλα αυτά, η συμβολή της κλασικής μικροβιολογίας είναι πολύ σημαντική καθώς περιλαμβάνει την απόκτηση καθαρής καλλιέργειας των μικροοργανισμών που απομονώνονται και ταυτοποιούνται. Ωστόσο, εκτιμάται ότι οι συμβατικές εργαστηριακές τεχνικές παρέχουν πληροφορία που αντιστοιχεί περίπου στο 1% της βακτηριακής ποικιλότητας που απαντάται σε ένα δεδομένο περιβαλλοντικό δείγμα (Torsvik et al., 1990). Επομένως, οι δύο τεχνικές δεν είναι αντιφατικές ή αποκλειόμενες.

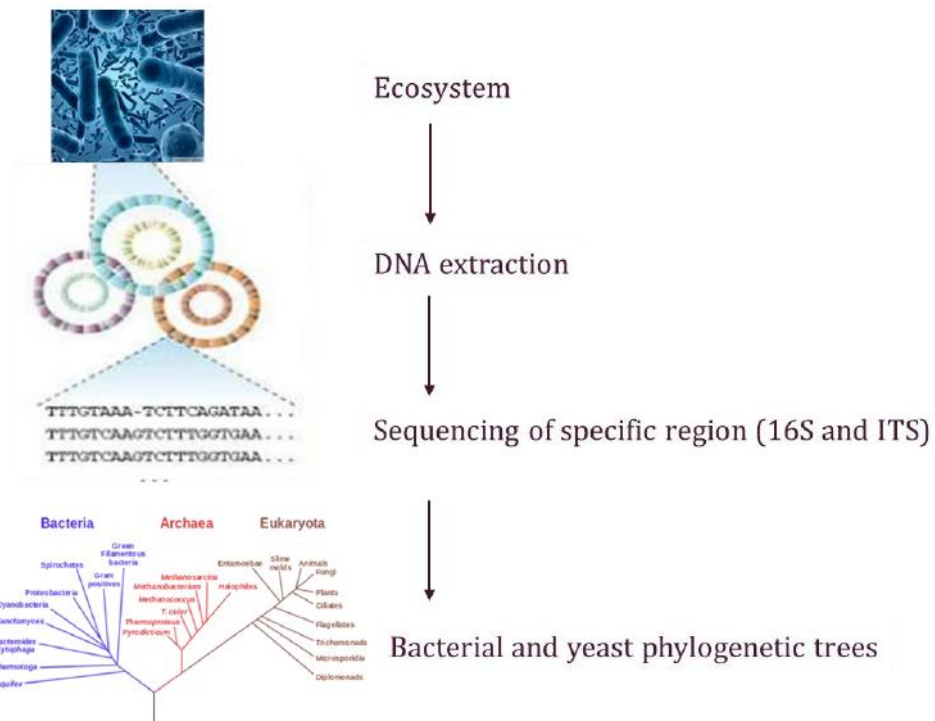
Η μικροχλωρίδα των τυριών προέρχεται από μία πληθώρα πηγών, όπως το γάλα, τον μαστό του θηλαστικού, το ανθρώπινο δέρμα, το αλάτι, τον περιβαλλοντικό αέρα, τα σκεύη και τα ράφια αποθήκευσης. Παρόλο που οι πηγές έχουν εντοπιστεί, το μικροβιακό τους φορτίο παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητο και μη χαρακτηρισμένο (Didienne et al., 2012). Ακόμη, η μικροχλωρίδα των τυριών και των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη πηγή γενετικών χαρακτηριστικών και μεταβολικών μονοπατιών, με πιθανά οφέλη για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων. Επιπλέον, γνωρίζοντας το γονιδίωμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που συμμετέχουν στη ζύμωση ενός προϊόντος, μπορούμε να κατανοήσουμε τους γενετικούς παράγοντες που καθορίζουν την προσαρμογή

τους στο περιβάλλον του γαλακτοκομείου, όπως επίσης και την συμβολή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών (Schröder et al., 2011).

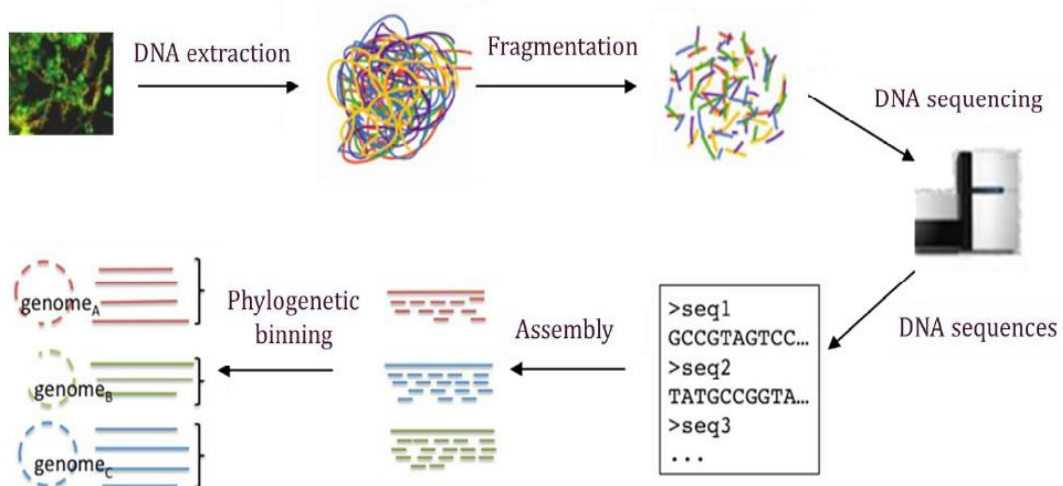
Η shotgun αλληλούχηση του ολικού DNA παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τον μεταβολισμό και τις λειτουργίες που εκτελούνται από την μικροβιακή κοινότητα, ενώ μπορούν με αυτό τον τρόπο να εντοπιστούν νέα γονίδια και οπερόνια (Abubucker et al., 2012; Wolfe et al., 2014). Προκειμένου να αναλυθούν και να επεξεργαστούν τα δεδομένα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης ενός μικροβιακού οικοσυστήματος είναι απαραίτητη η χρήση βάσεων δεδομένων αναφοράς. Οι εν λόγω βάσεις δεδομένων αποτελούνται από αλληλουχίες μικροοργανισμών γνωστής προέλευσης.

Το μήκος των αλληλουχιών που λαμβάνονται από τις χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες αλληλούχησης είναι μικρό και δεν επιτρέπει ακριβή συγκριτική ανάλυση με γονιδιώματα μακρινών προγόνων, απαιτώντας την ύπαρξη φυλογενετικά κοντινών γονιδιωμάτων αναφοράς που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς του οικοσυστήματος που μελετάται. Προς το παρόν οι διεθνείς βάσεις γονιδιωμάτων περιλαμβάνουν κυρίως μικροοργανισμούς μοντέλα και παθογόνα με αποτέλεσμα μεγάλο ποσοστό των αλληλουχιών μιας μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (εώς και 90%) να μην μπορεί να ταυτοποιηθεί λόγω της έλλειψης του μικρού αριθμού αλληλουχιών αναφοράς. Στις μέρες μας, είναι πλέον εφικτή, η αλληλούχηση αρκετών εκατοντάδων γονιδιωμάτων. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή εξακολουθεί να παραμένει δαπανηρή, κυρίως λόγω του κόστους κατασκευής μεμονωμένων βιβλιοθηκών για κάθε γονιδίωμα που αλληλουχείται (Almeida et al., 2014).

Ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων μελετών στηρίζονται στην αλληλούχηση συντηρημένων περιοχών-στόχων, όπως το γονίδιο 16S rDNA για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, με σκοπό τη φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων (Kullen et al., 2000; Ercolini et al., 2013) (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού ροής για τη φυλογενετική ανάλυση των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος με τη χρήση της μεταγονιδιωμικής ανάλυσης.



Σχήμα 3.7: Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού ροής για τη μερική αλληλούχηση του συνόλου των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος.

Σήμερα, χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων, βιοκαυσίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, εξειδικευμένα βακτηριακά στελέχη. Επιπλέον, είναι γνωστοί περισσότεροι από 10000 βιοδραστικοί μεταβολίτες, που παράγονται από ακτινομύκητες, οι περισσότεροι από τους οποίους προέρχονται από το γένος *Streptomyces*. Οι μεταβολίτες

αυτοί έχουν θεραπευτικές ιδιότητες κατά του καρκίνου, του HIV, διαφόρων φλεγμονών και πολλών άλλων ανθρώπινων ασθενειών (Bérdy, 2005). Τα βακτήρια είναι πιθανότατα το μέλλον για την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών για την καταπολέμηση της ολοένα αυξανόμενης επικράτησης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων (Wright, 2012).

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση είναι το μέλλον της επιστήμης, το εργαλείο για την ανίχνευση παθογόνων, την απόκτηση των μικροβιακών προφίλ και των γενετικών δεδομένων, τη σύνδεση του φαινοτύπου με τον γονότυπο. Η συμβολή της είναι χρήσιμη σε πολλούς τομείς όπως σε αυτόν της μικροβιολογίας τροφίμων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ειδών και στελεχών σε ζυμώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τροφίμων. Ακόμη, θα καθορίσει την τύχη των εναρκτήριων καλλιεργειών στην παραγωγή και την ζύμωση των τυριών, την πρόβλεψη διάρκειας ζωής του προϊόντος κλπ. (Ercolini, 2013). Στην πραγματικότητα, η μικροβιολογία των περισσότερων τροφίμων σύντομα θα επανεξεταστεί με τη χρήση μίας ή περισσότερων από τις νέες τεχνικές της μεταγονιδιωματικής (Diaz- Sanchez et al., 2013).

3.7 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συνολική μικροχλωρίδα δύο παραδοσιακών τυριών Φέτας, που παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη εναρκτήριων καλλιεργείων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τα πιο σημαντικά βακτήρια για τις ζυμώσεις των τροφίμων. Στα μικρά τυροκομεία οι παραγωγοί εκμεταλλεύονται την παρουσία της άγριας μικροχλωρίδας του γάλακτος για την παρασκευή των τυριών. Τα τυριά αυτά χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα έντονα και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποτελώντας ταυτόχρονα πηγή ανεξερεύνητων μικροοργανισμών. Αυτοί οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση με κλασσικές μικροβιολογικές αλλά και σύγχρονες μοριακές μεθόδους της μικροχλωρίδας δειγμάτων Ελληνικής παραδοσιακής Φέτας, που παρασκευάστηκαν χωρίς τη χρήση εναρκτήριων καλλιεργείων. Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα παραδοσιακής Φέτας και συγκεκριμένα από το Αγρίνιο και την Κόρινθο και προσδιορίστηκε η μικροβιακή χλωρίδα, τόσο με την κλασσική μικροβιολογική ανάλυση όσο και με τη μέθοδο της μεταγονιδιωματικής. Ακόμη, μελετήθηκε το αντιμικροβιακό δυναμικό των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν. Τέλος, πρόκειται για την πρώτη μεταγονιδιωματική ανάλυση σε τυρί Φέτα.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Προέλευση στελεχών

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν δύο Φέτες, παραδοσιακά παρασκευασμένες, χωρίς την χρήση εναρκτήριων καλλιέργειών από το Αγρίνιο και την Κόρινθο. Στον Πίνακα 4.1 παρατίθενται τα στοιχεία για τα δύο τυριά από τα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4.1. Περιγραφή και στοιχεία δειγμάτων Φέτας

	Φέτα Αγρινίου	Φέτα Κορίνθου
Χρόνος Ωρίμασης	13 μήνες	7 μήνες
Εναρκτήριες καλλιέργειες	Όχι	Όχι
pH	4.88	5.19
Γάλα	Θερμισμένο	Θερμισμένο στους 32 °C
Πυτιά	Εμπορική	Παραδοσιακή

4.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, 10 g δείγματος τυριού αναμείχθηκαν με 90 ml αποστειρωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer (IDF Standard No 122C, 1996) και ομοιογενοποιήθηκαν για 1 min σε συσκευή Stomacher 400 (Seward-Laboratory Blender, BA 7021, London SE1 1PP, UK). Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer (IDF Standard No 122C, 1996). Οι κατάλληλες ανά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό σειράς τρυβλίων, για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν στις κατάλληλες συνθήκες. Τα υλικά και οι συνθήκες επώασης ανά κατηγορία μικροοργανισμού περιγράφονται στον Πίνακα 4.2. Για την καταμέτρηση, επιλέχτηκαν τα τρυβλία που περιείχαν από 30 έως 300 αποικίες.

Πίνακας 4.2. Υλικά και οι συνθήκες επώασης ανά κατηγορία μικροοργανισμού

Ομάδες μ.ο.	Μέσο	Θερμοκρασία	Χρόνος (μέρες)	Συνθήκες	Τεχνική	Παρατηρήσεις
Thermophilic lactobacilli	MRS (Biokar, France)	42 °C	2 d	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	Ρύθμιση pH στο 5.4, με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος
Mesophilic cocci	M17 (Biokar, France)	22 °C	2 d	Αερόβιες	Επιφανειακή εξάπλωση	-
Thermophilic cocci	M17 (Biokar, France)	42 °C	2 d	Αερόβιες	Επιφανειακή εξάπλωση	-
NSLAB	Rogosa (Biokar, France)	30 °C	5 d	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	Ρύθμιση pH στο 5.5, προετοιμασία την ημέρα της ανάλυσης, βράσιμο 1', δεν αποστειρώνεται
Enterococci	KAA (Merck, Germany)	37 °C	1 d	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Επιφανειακή εξάπλωση	-
Total plate count	PCA (Biokar, France)	30 °C	4 d	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση	-
Yeasts	YGC (Merck, Germany)	25 °C	5 d	Αερόβιες	Επιφανειακή εξάπλωση	Προσθήκη αντιβιοτικού (chloramphenicol 0.1% w/v), σε περίπτωση που δεν το έχει ήδη, η εταιρία Merck το περιλαμβάνει
Propionic acid bacteria	Pal Propiobac (Standa, France)	30 °C	6 d	Αναερόβιες (Gas Pack)	Ενσωμάτωση	Προσθήκη Πενικιλίνης
Micrococci	MSA (LabM, UK)	30 °C	2 d	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	-
Coliforms	VRBA (LabM, UK)	37 °C	1 d	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	Προετοιμασία την ημέρα της ανάλυσης, βράσιμο 1', δεν αποστειρώνεται

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική εξέταση όλων των αποικιών με στερεοσκόπιο. Από κάθε επιλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των θερμόφιλων βάκιλλων, μεσόφιλων και θερμόφιλων κόκκων, εντερόκοκων, NSLAB, προπιονικών βακτηρίων και ζυμών, επιλέχθηκαν αποικίες (περίπου δέκα), με βάση τη διαφορετικότητα της μορφολογίας τους (σχήμα, μέγεθος, χρώμα και υφή). Οι αποικίες που απομονώθηκαν αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά φιαλίδια στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 20 % v/v γλυκερόλη.

4.3 Καθαρισμός στελεχών

Όλες οι καλλιέργειες που απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, υποβλήθηκαν σε ανανέωση και καθαρισμό. Τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν αρχικά σε 5 ml κατάλληλου υγρού θρεπτικού υποστρώματος για την κάθε καλλιέργεια (βλέπε Πίνακα 4.2). Εξαιρέση αποτελούν τα NSLAB, τα οποία εμβολιάστηκαν σε MRS και τα προπιονικά βακτήρια για τα οποία επιλέχθηκε το θρεπτικό μέσο RCM (Biokar, France). Οι υγρές καλλιέργειες, επώασθηκαν για 24 h στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τις ζύμες, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα μεσόφιλα και $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα θερμόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Στη συνέχεια, με τη χρήση αποστειρωμένου κρίκου πραγματοποιήθηκε εξάπλωση σε επιστρωμένα τρυβλία και επώαση αυτών για 48 h στις θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω ανάλογα με την καλλιέργεια. Στα δείγματα που δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη εντός 48 ωρών, η επώαση πραγματοποιήθηκε για επιπλέον 24 h, ή δοκιμάστηκε αλλαγή θρεπτικού μέσου ή ακόμη έγινε χρήση αναερόβιου περιέκτη (GasPack). Έπειτα, ακολούθησε μακροσκοπική παρατήρηση των αποικιών στο στερεοσκόπιο. Οι αποικίες, παρατηρήθηκαν πρώτα γενικά και μετά σε σύγκριση με τις γειτονικές αποικίες, όσον αφορά στο μέγεθός τους (μικρές, μεγάλες), το χρώμα (λευκές, κρεμ, κίτρινες), το σχήμα (στρογγυλές ή ακανόνιστης περιμέτρου), την ύπαρξη ή όχι πυρήνα και τη γενικότερη μορφολογία, δηλαδή στρογγυλές, λείες, γυαλιστερές, υπερυψωμένες ή θολές που διαχέονταν ή νηματοειδείς. Η διαδικασία του streaking επαναλήφθηκε όσες φορές ήταν απαραίτητο έτσι ώστε να υπάρχει μόνο ένα είδος αποικιών σε κάθε τρυβλίο.

Σε όλες τις απομονώσεις πραγματοποιήθηκε χρώση Gram, δοκιμή της καταλάσης και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

4.3.1. Χρώση Gram

Με έναν αποστειρωμένο κρίκο λήφθηκε τμήμα από την φρέσκια καλλιέργεια και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το παρασκεύασμα στερεώθηκε περνώντας την αντικειμενοφόρο πάνω από φλόγα. Στη συνέχεια, χρωματίστηκε με Crystal Violet (Merck, Germany) για 1 min. Το παρασκεύασμα ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό, προστέθηκε Lugol (Merck, Germany), αφέθηκε για 1 min και ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποχρωματισμός με αλκοόλη 95 % v/v και καλό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, το παρασκεύασμα χρωματίστηκε με διάλυμα σαφρανίνης (Merck, Germany) για 30 s. Η χρώση ολοκληρώθηκε με πλύσιμο της πλάκας με απιονισμένο νερό και στέγνωμα σε κλίβανο στους 52 °C.

Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων με ελαιοκαταδυτικό φακό αφού πρώτα είχε προστεθεί μία σταγόνα ελαίου. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια φαίνονται στο οπτικό πεδίο χρωματισμένα μπλε, ενώ τα αρνητικά κατά Gram φαίνονται κόκκινα.

4.3.2 Δοκιμή καταλάσης

Ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν το ένζυμο καταλάση, το οποίο διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Με αποστειρωμένο κρίκο λήφθηκε μικρή ποσότητα φρέσκιας καλλιέργειας και αναμίχθηκε με διάλυμα αραιού υπεροξειδίου του υδρογόνου (αραίωση 1:10 με απιονισμένο νερό) πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η παραγωγή φυσαλίδων οξυγόνου μέσα σε ένα λεπτό υποδήλωνε θετική δοκιμή, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η δοκιμή ήταν αρνητική.

4.3.3 Συντήρηση

Οι καθαρές πλέον καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια που περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο και γλυκερόλη (τελική συγκέντρωση 20 % v/v) στους -80 °C.

4.4 Απομόνωση DNA από βακτήρια

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Pitcher et al., (1989) μερικώς τροποποιημένο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στηρίζεται στη χρήση της θειοκυανιούχου γουανιδίνης, ενός πρωτεϊνικού αποδιατακτικού παράγοντα με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA.

Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης έχουν ως εξής:

- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος από φιαλίδιο αποθήκευσης των καθαρισμένων καλλιέργειών στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 % v/v). Επώαση καλλιέργειας για 18 h σε κατάλληλη θερμοκρασία.
- Συλλογή κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια σε μικροφιαλίδιο του 1,5 mL. Επιλέγεται η λογαριθμική φάση ανάπτυξης για τη συλλογή των κυττάρων για να αποφευχθεί η αποδόμηση του γενωμικού DNA από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που απελευθερώνονται μετά τη λύση των κυττάρων. Φυγοκέντρηση 10.000 rpm / 2 min.
- Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4. Θέρμανση στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 min, με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (10.000 rpm / 2min) και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Απομάκρυνση του εναπομείναντος υγρού με μία πιπέτα.
- Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 100 μL λυσοζύμης (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) διαλυμένη σε TE buffer (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH:8), 10 μL μουτανολυσίνης (5 U/ μL Sigma) και 20 μL RNAάσης (Sigma kit, GenElute). Τα δυο πρώτα ένζυμα συμβάλλουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και η RNAάση στην πέψη του υπολειμματικού RNA. Ακολουθεί επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 min με περιοδική ανάδευση των μικροφιαλιδίων ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποδόμησης του DNA, η μεταχείριση των δειγμάτων γίνεται με ήπιες κινήσεις.

- Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 0,5 mL αντιδραστηρίου GES (60 g Guanidium thiocyanate, 0.5 mol/L EDTA, 5 % v/v Sarcosyl) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.
- Στη συνέχεια προστίθενται 0,25 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 mol/L), ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10 min.
- Προστίθενται 0,5 mL χλωροφόρμιο και τα δείγματα αναδεύονται.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό ψύξη (13.000 rpm / 15 min / 4 °C). Μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρείται διαχωρισμός φάσεων στο δείγμα. Παρατηρούμε την υδατική φάση (πάνω) που περιέχει το DNA, τη μεσόφαση που αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, και την οργανική φάση (κάτω). Επανάληψη της φυγοκέντρησης στα δείγματα των οποίων οι φάσεις δεν διαχωρίστηκαν επαρκώς.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό μικροφιαλίδιο. Αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης.
- Προσθήκη 0,54 του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και ανάδευση μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA.
- Φυγοκέντρηση στις 7.000 rpm / 2 min και απόχυση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 0,7 mL παγωμένης αιθανόλης (70 % v/v) και ανάδευση για απομάκρυνση των αλάτων από το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 8000 rpm/ 1 min και απόχυση υπερκειμένου. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρηση, απόχυση και χρήση πιπέτας. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 2 - 3 min για να εξατμιστεί η εναπομείνουσα αιθανόλη προσέχοντας να μην στεγνώσει το ίζημα.
- Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 40 - 60 μ L διαλύματος TE, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος.
- Τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στους 37 °C για 24 h και έπειτα στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

4.4.1 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων που προέκυψαν έγινε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο μικροποσοτήτων Quawell Q5000 Read First (Quawell Technology Inc, San Jose, CA 95161 U.S.A.) το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Με τη χρήση του προγράμματος ND-1000.33.1 πραγματοποιήθηκε η προβολή δεδομένων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

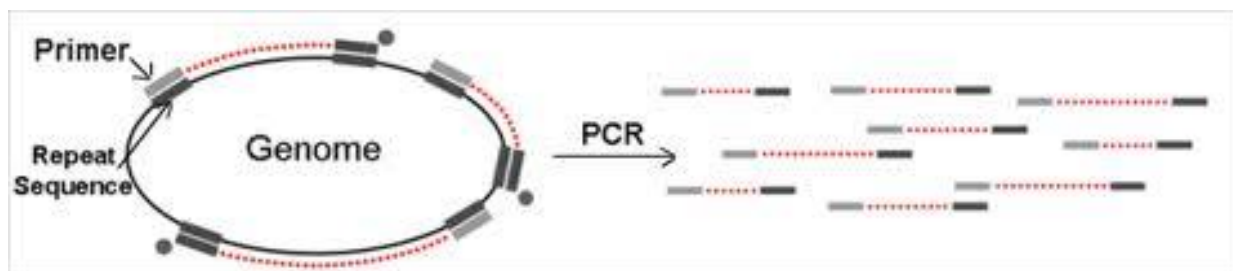
Η φωτομέτρηση για το DNA πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (Optical Density - O.D.) υπολογίσθηκε αυτόματα η συγκέντρωση. Παράλληλα, πραγματοποιείται μέτρηση του ίδιου δείγματος και στα 280 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες. Ο λόγος της O.D. 260 nm / O.D. 280 nm εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης. Όταν ο λόγος ισούται με 1.8 - 2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Όταν όμως είναι μικρότερος του 1.8 τότε είναι πιθανό να υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης στο δείγμα. Ακόμη, ο λόγος O.D.260 / O.D.230 εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος από σάκχαρα. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας από σάκχαρα, ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 2.2.

Στο τέλος της φωτομέτρησης, τα δείγματα αραιώθηκαν ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση ίση με 25 ng / μl σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη μέθοδο rep-PCR.

4.5 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR

Το προκαρυωτικό γονιδίωμα περιέχει διασκορπισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (dispersed repetitive sequences) και στους δυο κλώνους του χρωμοσωμικού καθώς και του πλασμιδιακού DNA. Η μέθοδος της rep-PCR βασίζεται στην ενίσχυση των διασκορπισμένων παλίνδρομων αλληλουχιών που υπάρχουν στο DNA. Ο όρος rep-PCR χρησιμοποιείται για να συμπεριλάβει τις μεθόδους, rep-PCR, ERIC-PCR και BOX-PCR που βασίζονται στη χρήση ομώνυμων εκκινήτων για την ενίσχυση τμημάτων των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που ανευρίσκονται στο γονιδίωμα. (Louws et al., 1999). Η διαδικασία της rep-PCR αναπαρίσταται στο Σχήμα 4.1.

Η οικογένεια των εκκινητών REP έχει μήκος μεταξύ 33 και 40 bp, και δίνει 500 έως 1000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, δίνουν ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα (προφίλ) το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τη διάκριση σε είδη, υποείδη και στελέχη. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό οξυγαλακτικών στελεχών και σε άλλες περιπτώσεις, μερικές από τις οποίες ήταν ο χαρακτηρισμός της οξυγαλακτικής χλωρίδας πράσινων συσκευασμένων ελιών Ελληνικής προέλευσης (Doulgeraki et. al., 2013).



Σχήμα 4.1: Ενίσχυση διασκορπισμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών με τη τεχνική Rep-PCR (<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/diversilab-healthcare>).

Για το rep-PCR, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Mohammed et al., 2009. Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf (Hamburg, Germany).

Τα rep-PCRs πραγματοποιήθηκαν με τον εκκινητή BOXAIR (Πίνακας 4.3) και το OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolands, UK). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν, με σταθερές ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση (Πίνακας 4.4). Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν οι εξής: 2 min στους 92 °C, 30 κύκλοι για 30 sec στους 92 °C, 2 min στους 40 °C, 3 min στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησαν 15 min στους 72 °C. Στον Πίνακα 4.4 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις.

Πίνακας 4.3 Αλληλουχία εκκινητή

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών 5' → 3'
BOXAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG

Πίνακας 4.4: Περιγραφή ποσότητας αντιδραστηρίων για την *rep*-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανα αντίδραση
2xReadyMix	12,5 μ l
DNA template	1 μ l (25 ng/ μ l)
BOXAIR (7.5 pmol/ μ l)	1 μ l
dd H ₂ O	10,5 μ l
Τελικός όγκος	25 μ l

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό φορτισμένων μορίων σε διάλυμα μέσω της διαφορετικής μετανάστευσής τους υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων του, κινείται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο αν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, είναι η πιο κλασσική μέθοδος που ακολουθείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης καθιστά δυνατό τον έλεγχο τόσο της απόδοσης της τεχνικής PCR, όσο και της πιθανότητας επιμόλυνσης (πρόσμιξη των δειγμάτων με ξένο DNA), μέσω των τυφλών» δειγμάτων (αρνητικοί μάρτυρες). Η απουσία φωτεινών ζωνών από τις θέσεις στις οποίες τοποθετήθηκαν τα «τυφλά», αποκλείει την πιθανότητα επιμόλυνσης και πιστοποιεί ένα επιτυχημένο πείραμα.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) (1× 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.2)
- Αγαρόζη της εταιρίας Sigma
- 1 kb DNA Ladder της εταιρίας Invitrogen
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg / ml (Sigma, Taufkirchen, Germany)

- Διάλυμα φόρτωσης (6×) (Loading Buffer) της εταιρίας NEB

Το DNA που απομονώθηκε αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 × TAE προστέθηκε 1.2 % w/v αγαρόζη
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
- Έπειτα προστέθηκαν 6 μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/mL
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, για το σχηματισμό της πηκτής
- Η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 × TAE. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγηθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer - 0.25 % w/v Bromophenol blue, 0.25 % w/v Xylene cyanol, 40 % w/v glycerol)
- Η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε στα 60 V για 140 min
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε φωτογράφιση σε ειδικό UV θάλαμο

Φωτογράφιση της πηκτής και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά με τη χρήση μιας συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία, High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP, Cambridge, UK). Τα τμήματα DNA που έχουν ενισχυθεί διακρίνονται ως φωτεινές ζώνες, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζει το βρωμιούχο αιθιδίο (το οποίο ενσωματώνεται στη διπλή έλικα του DNA) στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας είναι συνδεδεμένη με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος φωτογράφισης πηκτών Doc-IT (Ed. 2003, UVP, Inc.) έγινε εφικτή η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.

Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Bionumerics

Το πρόγραμμα Bionumerics 6 της εταιρίας Applied Maths, συγκρίνει τις ζώνες των αγνώστων στελεχών σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακών μαζών (1 kB). Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί την ανάλυση διασποράς σε μια διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά υπολογίζονται

όλες οι τιμές ομοιότητας κατά ζεύγη βάσει του συντελεστή ομοιότητας Pearson. Στη συνέχεια, ο πίνακας ομοιότητας μετατρέπεται σε δενδρόγραμμα με έναν αλγόριθμο ομαδοποίησης U.P.G.M.A. (unweighted pair-grouping). Κατά αυτόν τον τρόπο εξάγονται συμπεράσματα για την ομαδοποίηση των στελεχών.

Στη συνέχεια, βάση αυτής της ομαδοποίησης, επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη για ταυτοποίηση μέσω της ενίσχυσης και αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA, όπως περιγράφεται παρακάτω.

4.6 Ταυτοποίηση στελεχών με βάση την αλληλούχηση του 16S rDNA

Η μέθοδος της ταυτοποίησης των βακτηρίων βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (16S rDNA). Έχει αποδειχθεί ότι η αλληλουχία αυτή είναι από τις πιο συντηρημένες αλληλουχίες στο DNA, λόγω του καθολικού και πολύπλοκου ρόλου της στο κύτταρο και έχει υπερμεταβλητές περιοχές που μπορούν να παρέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες για κάθε είδος, χρήσιμες για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Οι φυλογενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν την ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA δίνουν σημαντικές ταξινομικές πληροφορίες, όμως εξαιτίας της καθολικής φύσης αυτού, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάκριση σε επίπεδο στελέχους, παρά μόνο σε επίπεδο γένους και είδους (Thollesson, 1999; Case et al., 2007).

Η ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Ntougias et al., 2006. Για το 16S rDNA PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 16S F (Forward) και 16S R (Reverse) (VBC-Biotech, Vienna, Austria) (Πίνακας 4.5) και έγινε χρήση της πολυμεράσης της εταιρίας Kappa Biosystems. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 2 min στους 94 °C, 30 κύκλοι με 30 sec στους 94 °C, 30 sec στους 56 °C, 1 min και 20 sec στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησε παραμονή για 5 min στους 72 °C. Στον Πίνακα 4.6 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 4.5 Αλληλουχίες εκκινητών 16sF και 16sR για την 16s PCR

16SF (νουκλεοδιτική αλληλουχία 5'-3')	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG
16SR ((νουκλεοδιτική αλληλουχία 3'-5')	CCTCTCAATCTAGAACCGAGTC

Πίνακας 4.6 Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής 16S rDNA

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανα αντίδραση
Kappa Taq ReadyMix	25 μ L
DNA template	200ng
Primer F (7.5 pmol / μ L)	1 μ L
Primer R (7.5 pmol / μ L)	1 μ L
ddH ₂ O	10,5 μ L
Τελικός όγκος	50 μ L

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Απαραίτητο βήμα πριν σταλούν τα δείγματα για αλληλούχηση είναι ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR, από υπολείμματα εκκινητών, ρυθμιστικών διαλυμάτων και δεοξυνουκλεοτιδίων. Η εκχύλιση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (Duren, Germany) βάσει του ακόλουθου πρωτοκόλλου:

- Προσθήκη όγκου 200 μ L προσδετικού παράγοντα NTI σε καθε 100 μ L του προϊόντος της PCR.
- Για την πρόσδεση του DNA, τοποθετήθηκε στήλη χαλαζία NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up σε μικροφιαλίδιο των 2 mL και φορτώθηκαν περίπου 700 μ L δείγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 12.000 rpm. Απορρίφθηκε

το υγρό που διαπέρασε τη στήλη και το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.

- Για την έκπλυση της στήλης προστέθηκαν 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer NT3), στο οποίο είχε προστεθεί εξαρχής αιθανόλη, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000 rpm και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
- Προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και να στεγνώσει η στήλη επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000 rpm.
- Για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, το μικροφιαλίδιο παρέμεινε για 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Για να γίνει η έκλυση του DNA, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο μικροφιαλίδιο του 1,5 mL, προστέθηκαν 20 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer NE), επώαστηκε για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 12.000 × rpm.
- Διατήρηση του καθαρού πλέον προϊόντος στους -20°C.
- Μέτρηση συγκέντρωσης DNA.

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε από την VBC-Biotech Service GmbH, Vienna, Austria.

Ταυτοποίηση στελεχών

Η ταυτοποίηση των εξεταζόμενων στελεχών σε επίπεδο είδους πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>), σύμφωνα με την ομοιότητα τους με γνωστές αλληλουχίες που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων. Τα αποτελέσματα ομοιότητας της αλληλουχίας του άγνωστου τμήματος προκύπτουν σύμφωνα με το ποσοστό ταύτισης της αλληλουχίας με τις καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων και το e-value.

4.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από το δείγμα της Φέτας πραγματοποιήθηκε με πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο της Γαλακτοκομίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται παρακάτω:

- Προσθήκη 0.5 g Φέτας σε μικροφιαλίδιο
- Προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου νερού και σύντομη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση υπό ψύξη 12.500 rpm / 10 min, στους 4 °C.
- Αφαίρεση του λίπους από την επιφάνεια και απόρριψη του υπερκειμένου
- Επανάληψη της διαδικασίας έτσι ώστε να αφαιρεθεί όσον το δυνατόν περισσότερο λίπος
- Προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου νερού και επώαση στους 65 °C για 10 min, με σκοπό την αποικοδόμηση μέρους των πρωτεϊνών. Φυγοκέντρηση 12.500 rpm / 10 min
- Αφαίρεση της άνω φάσης και απόρριψη του υπερκειμένου
- Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 600 μ L (50 mg / mL) λυσοζύμης (50 mg / ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) διαλυμένη σε 1.5 ml TE buffer (10 mmol / L Tris-HCl, 1 mmol / L EDTA, pH:8), 40 μ L μουτανολυσίνης (5 U / μ L) και 100 μ L RNAάσης A (10 mg / ml) (Sigma kit, GenElute). Τα ένζυμα συμβάλλουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και στην πέψη του υπολειμματικού RNA. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3 h με περιοδική ανάδευση των μικροφιαλιδίων. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποδόμησης του DNA, η μεταχείριση των δειγμάτων γίνεται με ήπιες κινήσεις
- Προσθήκη 20 μ l πρωτεϊνάσης K (25 mg/ml). Επώαση στους 55 °C για 1 h με περιοδική ανάδευση των μικροφιαλιδίων
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου GES (60 g mol / L Guanidium thiocyanate, 0.5 mol / L EDTA, 5 % v / v Sarcosyl) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min μέχρι να ομογενοποιηθεί το δείγμα και να διαλυθούν πλήρως τα σωματίδια της Φέτας

- Στη συνέχεια προστίθονται 250 μL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 mol / L), ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10 min
- Προστίθονται 500 μL χλωροφόρμιο και αναδεύονται τα δείγματα έντονα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό ψύξη (13.000 rpm / 15 min / 4 °C)
- Μεταφορά 1 mL υπερκείμενου σε καθαρό μικροφιαλίδιο
- Προσθήκη φαινόλης-χλωροφορμίου σε αναλογία δείγματος φαινόλη: χλωροφόρμιο:δείγμα 1: 0,5: 0,5 και ήπια ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm / 10 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο μικροφιαλίδιο
- Επανάληψη των δύο τελευταίων βημάτων
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο μικροφιαλίδιο και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου
- Φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm / 10 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο μικροφιαλίδιο
- Επανάληψη των δύο τελευταίων βημάτων
- Προσθήκη 0,1 του όγκου οξικό νάτριο pH 5.2 και 0,54 του όγκου ισοπροπανόλη
- Παραμονή των δειγμάτων για 12 h στους -20 °C για κατακρύμνηση του DNA
- Την επόμενη ημέρα γίνεται φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm / 10 min και απόχυση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 0,7 mL παγωμένης αιθανόλης (70% v/v) και ανάδευση για απομάκρυνση των αλάτων από το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό ψύξη 8.000 rpm / 5 min / 4 °C και απόχυση υπερκείμενου.
- Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρηση και απόχυση. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 2 - 3 min για να εξατμιστεί η εναπομένουσα αιθανόλη προσέχοντας πολύ να μην στεγνώσει το ίζημα
- Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 40 - 60 μL διαλύματος TE ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος
- Τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στους 37 °C για 24 h και έπειτα στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους

Η συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε από το οικοσύστημα των δειγμάτων Φέτας μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην παράγραφο 4.4.1.

Για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA βακτηρίων και ζυμών στο δείγμα μας πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 16S F και 16S R (VBC-Biotech, Vienna, Austria) και ενίσχυση της περιοχής ITS με εκκινητές τους ITS1 και ITS4 (VBC-Biotech, Vienna, Austria), αντίστοιχα. Η περιοχή ITS χρησιμοποιείται κατεξοχήν στην ταυτοποίηση των ζυμών (Korabecna et al., 2007) Στον Πίνακα 4.8 δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών ITS1 και ITS4.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf. Οι συνθήκες της αντίδρασης για το 16S rRNA-PCR αναφέρονται στο κεφάλαιο 4.6. Οι συνθήκες για το ITS rDNA-PCR ήταν οι ακόλουθες: 2 min στους 95 °C, 35 κύκλοι με 30 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55 °C, 1 min στους 72 °C και με το πέρας των 35 κύκλων, ακολούθησε παραμονή για 10 min στους 72 °C . Στον Πίνακα 4.9 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις που αφορούν το βακτηριακό DNA και στον Πίνακα 4.10 οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις που αφορούν το DNA των ζυμών.

Πίνακας 4.8 Αλληλουχίες εκκινητών ITS1 και ITS4για την ITS- PCR

ITS1 (F)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4 (R)	TCC TCC GTC TAT TGA TAT GC

Πίνακας 4.9 Ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR βακτηριακού DNA

Αντιδραστήριο	δείγμα 1	δείγμα 2	DNA <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	DNA <i>Yarrowia Lipolytica</i>	Blank
2xReadyMix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer For	1	1	1	1	1
Primer Rev	1	1	1	1	1
DNA	2,2	1,4	1,7	1,4	0
Dd water	8,3	9,1	8,8	9,1	10,5
Τελικός όγκος	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL

Πίνακας 4.10 Ποσότητες αντιδραστηρίων για PCR του DNA των ζυμών

Αντιδραστήριο	δείγμα 1	δείγμα 2	DNA <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	DNA <i>Yarrowia Lipolytica</i>	Blank
2xReadyMix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer For	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Primer Rev	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
DNA	2,2	1,4	1,7	1,4	0
Dd water	5,3	6,1	5,8	6,1	8
Τελικός όγκος	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης. Η διαδικασία περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.5.

Το DNA που εκχυλίστηκε από την Φέτα του Αγρινίου στάλθηκε για αλληλούχηση των γονιδίων 16S rDNA και των περιοχών ITS και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τον MG RAST server (Meyer et al., 2008).

4.8 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για 50 από τα στελέχη που απομονώθηκαν, τα οποία επιλέχθηκαν βάση της ομαδοποίησης που προέκυψε από το ger-PCR. Οι μικροοργανισμοί - στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 4.7.

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε τρυβλία (Well Diffusion Assay, WDA). Το στέλεχος που εξετάζεται σε κάθε περίπτωση ως προς την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του χαρακτηρίζεται ως μικροοργανισμός - στόχος και είναι εκείνο με το οποίο εμβολιάζεται το θρεπτικό υπόστρωμα στο τρυβλίο. Το στέλεχος του οποίου μελετάται η αντιμικροβιακή δράση και του οποίου το υπερκείμενο χρησιμοποιούμε, μετά από ανάπτυξη του σε υγρό θρεπτικό μέσο και φυγοκέντρηση, χαρακτηρίζεται ως «παραγωγό» στέλεχος.

Για τη λήψη του υπερκείμενου από τα παραγωγά στελέχη:

- Για τις ανανεώσεις των καλλιιεργειών των παραγωγών στελεχών, εμβολιάστηκε υγρό θρεπτικό μέσο MRS (1% v/v εμβόλιο) από φιαλίδιο αποθήκευσης των κυττάρων στους -80 °C. Επώαση καλλιέργειας για 24 h σε θερμοκρασία 30 °C για τα μεσόφιλα στελέχη και 45 °C για τα θερμόφιλα
- Πραγματοποιήθηκε δεύτερη ανανέωση σε δύο υγρά θρεπτικά μέσα, MRS και 10 % w/v ανασυσταμένο άπαχο γάλα που περιέχει 0.3 % w/v εκχύλισμα ζύμης. Επώαση καλλιέργειας για 24 h σε θερμοκρασία 30 °C για τα μεσόφιλα στελέχη και 45 °C για τα θερμόφιλα
- Οι καλλιέργειες αναδεύθηκαν έντονα και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 5.000 rpm για το διαχωρισμό του υπερκείμενου ελευθέρου κυττάρων
- Ρυθμίστηκε το pH του υγρού υπερκείμενου στην τιμή 6,5

Πριν από κάθε πείραμα οι μικροοργανισμοί - στόχοι ανανεώθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή τους (Πίνακας 4.7) και στη συνέχεια επώαστηκαν για 18 h. Οι μικροοργανισμοί - στόχοι ενσωματώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο με εμβόλιο (0.1%, v/v, από φρέσκια καλλιέργεια). Μετά τη στερεοποίηση του μέσου ανοίχθηκαν οπές με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur και προστέθηκαν 50 μL από το κάθε υγρό υπερκείμενο καλλιέργειας των παραγωγών των στελεχών.

Έπειτα, τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 h. Στην περίπτωση που υπάρχει παραγωγή βακτηριοσινών θα παρεμποδίζονταν η ανάπτυξη των ευαίσθητων στελεχών. Η ανάσχεση της ανάπτυξης εμφανίζεται ως διαυγής άλως γύρω από την οπή που είχε τοποθετηθεί το υγρό.

Πίνακας 4.7 Μικροοργανισμοί - στόχοι

	Στέλεχος	Μέσο ανάπτυξης	Θερμοκρασία	Ομάδα κινδύνου
Τροφογενή παθογόνα				
1	<i>Escherichia coli</i> CFA-I	BHI	37°C	2
2	<i>Escherichia coli</i> C1845	BHI	37°C	2
3	<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	BHI	37°C	2
4	<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	BHI	37°C	2
5	<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-89	BHI	37°C	2
6	<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-90	BHI	37°C	2
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	BHI/TSB	30°C	2
8	<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	BHI/TSB	30°C	2
9	<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	BHI/TSB	30°C	1
10	<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	BHI	30°C	1
11	<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	BHI	30°C	1
12	<i>Listeria welshimeri</i> 15008	BHI	30°C	1
Παθογόνα του γαστρεντερικού ή / και του αναπνευστικού συστήματος του ανθρώπου				
	<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG			
13	14694 ^T	BHI	37°C	2
14	<i>Streptococcus anginosus</i> LMG 14502 ^T	BHI	37°C	2
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG			
15	14545 ^T	BHI	37°C	2
16	<i>Streptococcus pyogenes</i> LMG 21599 ^T	BHI	37°C	2
Παθογόνα και ευκαιρικά παθογόνα της στοματικής κοιλότητας				
17	<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	BHI	37°C	1
18	<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	BHI	37°C	1
19	<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	BHI	37°C	2
20	<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	BHI	37°C	1
21	<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	BHI	37°C	1
22	<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	BHI	37°C	1
23	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	BHI	37°C	2
Παθογόνα στελέχη απομονωμένα από τραύματα				
24	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 11396	BHI	37°C	2
25	<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 8064	BHI	37°C	2
Οξυγαλακτικά στελέχη				
26	<i>Lactobacillus sakei</i> ACA-DC 2313	MRS	30°C	1
27	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 6890 ^T	M17	30°C	1
	<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC			
28	4	M17	37°C	1
Ζύμες				
29	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (WT)	YES	30°C	1

5. Αποτελέσματα- Συζήτηση

5.1 Γενικά

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες για την μικροχλωρίδα της Φέτας, η μεγάλη παραγωγή της στην Ελλάδα, τόσο σε βιομηχανικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο μικρών οικογενειακών επιχειρήσεων, υποστηρίζει την περαιτέρω μελέτη με σκοπό την ταυτοποίηση νέων μικροοργανισμών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη της αυτόχθονης μικροχλωρίδας της Φέτας, σε τυριά στα οποία δεν έχει γίνει χρήση εναρκτήριων καλλιιεργιών. Τα παραδοσιακά τυριά χαρακτηρίζονται από έντονα και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποτελώντας ταυτόχρονα πηγή ανεξερεύνητων μικροοργανισμών. Αυτοί οι «άγριοι» μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κλασική μικροβιολογική ανάλυση σε δύο τυριά Φέτες, από την περιοχή του Αγρινίου και της Κορίνθου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η πρώτη μεταγονιδιωματική μελέτη σε τυρί Φέτα, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στη συνέχεια. Το κοινό χαρακτηριστικό και των δύο τυριών ήταν η απουσία εναρκτήριων καλλιιεργιών κατά την παρασκευή τους. Διέφεραν στο είδος της πυτιάς, αφού χρησιμοποιήθηκε εμπορική πυτιά στην Φέτα Αγρινίου και παραδοσιακή στην Φέτα Κορίνθου. Τέλος, ο χρόνος ωρίμανσης ήταν 13 μήνες για την Φέτα Αγρινίου και 7 μήνες για την Φέτα Κορίνθου.

Το pH των τυριών ήταν 4.88 για την Φέτα Αγρινίου και 5.19 για την Φέτα της Κορίνθου. Το μέσο pH για την Φέτα είναι 4.41 (Βασταρδής, 1989), επομένως και στις δύο Φέτες το pH εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένο. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε τυρί Φέτα μέχρι 120 ημερών ωρίμανσης το pH είναι μικρότερο από 5 (εύρος 4,39 - 4,99) (Vaforoulou et al. 1989; Vaforoulou-Mastrojiannaki et al. 1990; Litoroulou-Tzanetaki et al. 1993). Ωστόσο, το pH της Φέτας Κορίνθου βρέθηκε σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα, πιθανότατα λόγω της συσσωρευμένης αμμωνίας που προκύπτει από τη συνεχή πρωτεόλυση των καζεϊνών. Αυτή η μικρή αύξηση του pH έχει καταγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες (Vaforoulou et al., 1989, Vaforoulou-Mastrojiannaki et al., 1990). Επιπλέον, η διαφορά αυτή

στο pH δε φαίνεται να επηρέασε τους μικροβιολογικούς πληθυσμούς, γεγονός που έχει καταγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες (Rantziou et al., 2008).

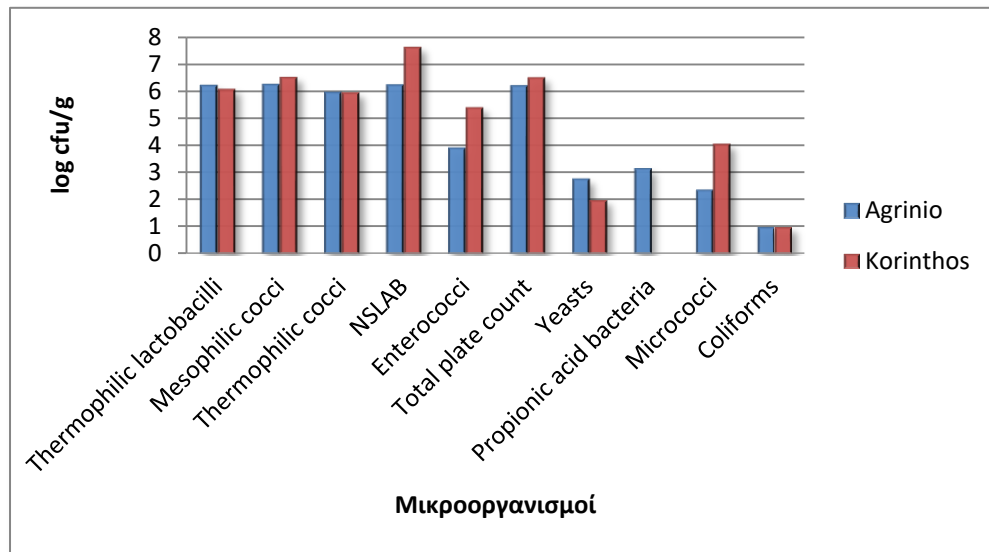
5.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μικροοργανισμών θεωρούνται επιλεκτικά, δεν αποκλείεται όμως η ανάπτυξη και άλλων μικροβιακών ομάδων. Επομένως, οι πληθυσμοί που προέκυψαν θεωρήθηκαν ως πληθυσμοί πιθανών οξυγαλακτικών βακτηρίων και στη συνέχεια ακολούθησε ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων με άλλες μοριακές μεθόδους.

Οι πληθυσμοί των μικροβιακών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα δύο δείγματα (Φέτα Αγρινίου και Φέτα Κορίνθου) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Οι μη εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες, οι μεσόφιλοι και θερμόφιλοι κόκκοι και οι θερμόφιλοι βάκιλλοι, αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και στα δύο δείγματα, ακολουθούμενα από τους εντερόκοκκους, τους μικρόκοκκους και τις ζύμες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των λευκών τυριών άλμης και ως εκ τούτου οι αλλαγές στην ωρίμανση των τυριών οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητά τους (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992).

Πίνακας 5.1 Μετρήσεις (log cfu / g) μικροβιακών ομάδων των Φετών Αγρινίου και Κορίνθου

Ομάδα μικροοργανισμών	Φέτα Αγρίνιο (log cfu/g)	Φέτα Κόρινθος (log cfu/g)
Thermophilic lactobacilli	6,22	6,11
Mesophilic cocci	6,26	6,55
Thermophilic cocci	5,97	5,98
NSLAB	6,24	7,66
Enterococci	3,92	5,43
Total plate count	6,21	6,54
Yeasts	2,78	2
Propionic acid bacteria	3,16	0
Micrococci	2,37	4,08
Coliforms	1	1



Σχημα 5.1 Μικροβιακή πληθυσμοί (log cfu / g) των Φετών Αγρινίου και Κορίνθου

Όλες οι απομονώσεις έγιναν σε υψηλές αραιώσεις (έως 10^{-8}) που σημαίνει ότι ο πληθυσμός των μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν ήταν μεγάλος και τα είδη αυτά κυριαρχούσαν στα δείγματα που εξετάστηκαν. Η παρουσία οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τόσο υψηλούς πληθυσμούς, της τάξης του $10^6 - 10^8$ cfu/g, σε Φέτα έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992; Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992).

Οι πληθυσμοί των διαφόρων ομάδων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν παρόμοιοι μεταξύ των δυο δειγμάτων σε ένα εύρος τιμών 5.97 - 7.66 log cfu/g. Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων παρατηρήθηκαν για τα NSLAB (6.24 - 7.66 log cfu/g). Η επικράτηση των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων και των NSLAB που παρατηρήθηκε στα δείγματα της Φέτας επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες έρευνες (Bintsis et al., 2000; Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 1992).

Αν και οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες μπορούν να απομονωθούν από το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του τυριού, οι περισσότεροι από αυτούς τους μικροοργανισμούς αδρανοποιούνται μετά την παστερίωση. Η παρουσία τους στο τυρί μπορεί πιθανώς να αποδοθεί σε επιμόλυνση μετά την παστερίωση, σε στελέχη που υπάρχουν στον εξοπλισμό της τυροκομίας, ή σε στελέχη που είναι θερμοάντοχα και επιβιώνουν από την παστερίωση (Fitzsimons et al., 1999). Αυτές οι ομάδες των μικροοργανισμών μπορεί να

επηρεάσουν την διαδικασία της ωρίμανσης μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, της μείωσης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δραστηριότητας (Steele, 1995).

Οι πληθυσμοί των μεσόφιλων λακτόκοκκων που καταγράφηκαν για την Φέτα Αγρινίου και Κορίνθου ήταν σε παρόμοια επίπεδα 6.26 και 6.55 log cfu / g αντίστοιχα, ενώ των θερμόφιλων λακτόκοκκων 5.97 και 5.98 log cfu / g. Οι θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι ήταν 6.22 και 6.11 log cfu / g για την Φέτα του Αγρινίου και της Κορίνθου, αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί αυτοί είναι σύμφωνοι και με προηγούμενη μελέτη (Manolopoulou et al., 2003; Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992).

Οι εντερόκοκκοι βρέθηκαν σε υψηλούς πληθυσμούς (3.92 και 5.43 log cfu / g), οι πληθυσμοί αυτοί συμφωνούν με μετρήσεις εντερόκοκκων που βρέθηκαν σε άλλες ποικιλίες τυριών, που παρασκευάζονται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα (Fernandez del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991; Tornadijo et al., 1995). Η παρουσία των εντερόκοκκων σε υψηλούς αριθμούς πιθανόν να οφείλεται στην ανοχή τους σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (Mundt, 1986; Garg and Mital, 1992).

Οι μικρόκοκκοι βρέθηκαν σε αξιοσημείωτους πληθυσμούς κυμαινόμενοι από 2.37 (Φέτα Αγρινίου) μέχρι 4.08 log cfu/g (Φέτα Κορίνθου). Επιπλέον, οι μικρόκοκκοι έχουν ανιχνευτεί σε πολλές ποικιλίες τυριών, ως δευτερογενής μικροχλωρίδα (Bhowmik and Marth, 1990), καθώς έχουν την ικανότητα επιβίωσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, πιθανώς λόγω της αντοχής τους στο αλάτι και το χαμηλό ποσοστό νερού. Έχει προταθεί ότι η πρωτεολυτική και λιπολυτική δραστηριότητα των μικρόκοκκων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ωρίμανσης (Bhowmik and Marth, 1990; Ortiz de Arocana et al., 1993).

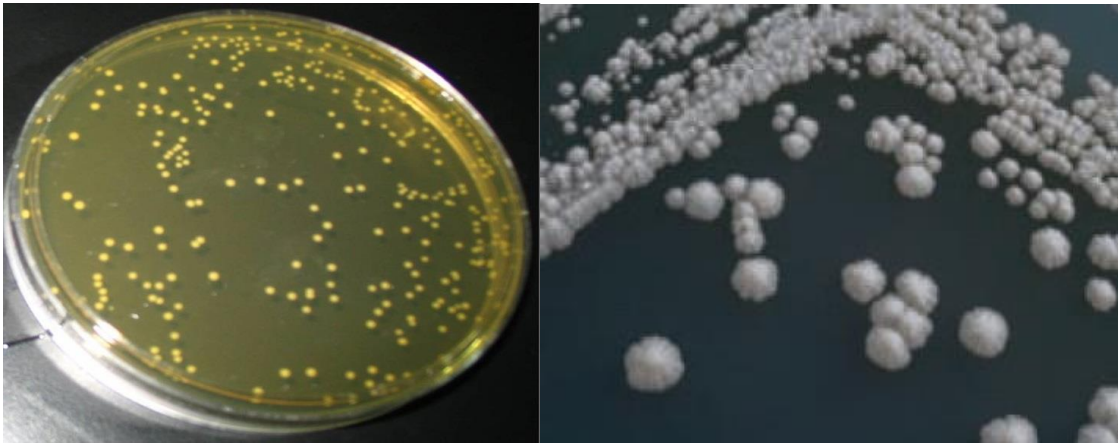
Οι ζύμες βρέθηκαν σε πληθυσμούς 2.78 (Φέτα Αγρινίου) και 2 log cfu/g (Φέτα Κορίνθου). Οι μετρήσεις αυτές βρέθηκαν να είναι διαφορετικές από αυτές που παρατηρήθηκαν σε άλλα τυριά (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992; Tornadijo et al., 1995). Οι ζύμες δεν αποτελούν μέρος των εναρκτήριων καλλιέργειών. Ωστόσο, παρατηρούνται σε σχετικά υψηλά νούμερα σε πολλά μαλακά και ημίσκληρα τυριά. Πιθανότατα προέρχονται από τις συσκευές και το περιβάλλον κατά τη διαδικασία της τυροκόμησης (Viljoen, 2001).

Επιπλέον, οι Welthagen και Viljoen (1998) έχουν προτείνει ότι μία σημαντική πηγή μόλυνσης των τυριών από ζύμες είναι ίσως η άλμη. Η παρουσία των ζυμών είναι στενά συνδεδεμένη με την αξιοποίηση του γαλακτικού οξέος, ενώ η συνεισφορά τους στην διαδικασία ωρίμανσης οφείλεται στην πρωτεολυτική και λιπολυτική τους δραστηριότητα (Macedo et al., 1995).

Εν αντιθέσει, τα κολοβακτηριοειδή που αποτελούν ένδειξη κακής υγιεινής, παρουσίασαν χαμηλές τιμές και στα δύο τυριά, η παρουσία των οποίων υποδηλώνει κακές συνθήκες αποθήκευσης και συντήρησης από τον παραγωγό (Manolopoulou et al., 2003). Η παρουσία προπιονικών βακτηρίων που καταμετρήθηκαν στην Φέτα Αγρίνιο αποτελεί ασυνήθιστο γεγονός ($3.16 \log \text{ cfu/g}$), καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλιέργεια ωρίμανσης στην παρασκευή τυριών ελβετικού τύπου (Dorner, 1939; Langsrud & Reinbold, 1973; Steffen et al., 1993) και η παρουσία τους δεν έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες που αφορούν τα τυριά άλμης.

Το κοινό χαρακτηριστικό των τυριών των οποίων μελετήθηκαν ήταν η μη προσθήκη εναρκτήριων καλλιεργείων. Επομένως, το μικροβιολογικό τους φορτίο προέρχεται εξ ολοκλήρου από τη φυσική μικροχλωρίδα του γάλακτος, τις επιμολύνσεις από το περιβάλλον στο οποίο παρασκευάστηκαν τα τυριά και τον εξοπλισμό (Zygouris, 1952). Παρόλο που η θερμική επεξεργασία του γάλακτος διαφέρει στα δύο δείγματα, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στο μικροβιολογικό φορτίο των δύο τυριών όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.1. Σύμφωνα με άλλες μελέτες (Vaforoulou et al., 1989; Kandarakis et al., 1998), ακόμη και αν το γάλα είναι επαρκώς παστεριωμένο, η αρχική μικροχλωρίδα του νωπού γάλακτος επηρεάζει σοβαρά την ωρίμανση και την ποιότητα του τυριού.

Ακολούθησε μακροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών με σκοπό την απομόνωση νέων στελεχών. Απομονώθηκαν μεμονωμένες αποικίες που διέφεραν μορφολογικά (βλέπε Εικόνα 5.1) συγκριτικά με τις υπόλοιπες αποικίες των τρυβλίων.

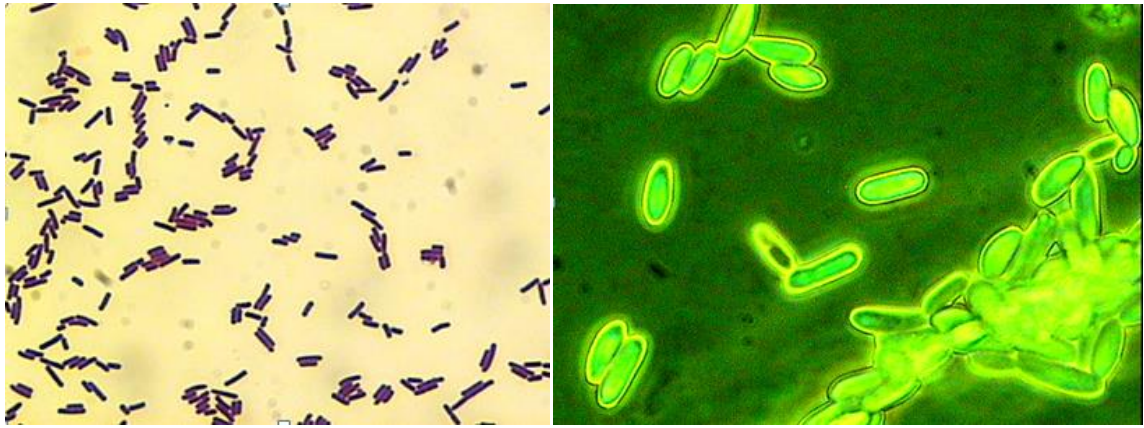


Εικόνα 5.1 Παράδειγμα αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων (αριστερά) και ζυμών (δεξιά)
(<http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/yeasts.html>;
<http://nutribitsforeinstein.blogspot.fr/>).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση κατά Gram και δοκιμή της καταλάσης και ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση. Όλα τα βακτήρια βρέθηκαν θετικά κατά gram και αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης. Μορφολογικά, τα κύτταρα των γαλακτοβάκιλλων ποικίλουν από επιμήκεις, λεπτοί και ενίοτε με κλίση βάκιλλοι μέχρι κοκκοβάκιλλοι, ανάλογα με την ηλικία της καλλιέργειας, τη σύσταση του θρεπτικού μέσου και την επίδραση του οξυγόνου. Κάποια είδη γαλακτοβάκιλλων όπως ο *Lactobacillus brevis* εμφανίζονται ως μίγματα ραβδίων μικρού και μεγάλου μήκους. Οι λακτόκοκκοι εμφανίζονται σε ζευγάρια, τετράδες ή μεμονωμένοι.

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση, τα 68 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν όλα ως βάκιλλοι. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι εκλεκτικά ακόμα και με την παρουσία αντιβιοτικών. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες (Rantziou et al., 2008).

Οι ζύμες χαρακτηρίζονται από οβάλ ή σφαιρικά βλαστοκύτταρα που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση 4 στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ζύμες (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2 Χαρακτηριστικές εικόνες βακίλων (αριστερά) και ζυμών (δεξιά) από τις αποικίες που απομονώθηκαν.

Επιλέχθηκαν και συλλέχθηκαν κατά προσέγγιση δέκα αποικίες από τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα των οξυγαλακτικών μικροβιακών ομάδων και 4 αποικίες από τις ζύμες. Συνολικά από τις δύο Φέτες απομονώθηκαν 68 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων και 4 αποικίες ζυμών (Πίνακας 5.2). Με αυτόν τον τρόπο λήφθηκαν απομονώσεις βακτηρίων που ήταν όλες θετικές κατά Gram και αρνητικές στη δοκιμή της καταλάσης. Από τις αποικίες που απομονώθηκαν, μία αποικία δεν αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της ανανέωσης και για το λόγο δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτη της. Στη συνέχεια, με στόχο την αποθήκευση μεμονωμένων αποικιών πραγματοποιήθηκε καθαρισμός. Προέκυψαν 103 αποικίες βακτηρίων και 5 αποικίες ζυμών.

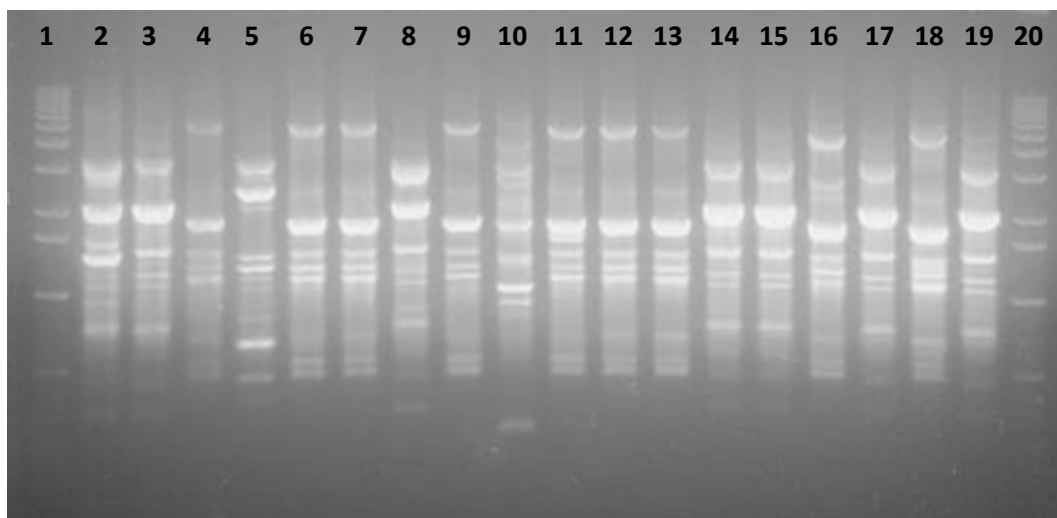
Πίνακας 5.2 Αριθμός αποικιών που απομονώθηκαν

Μικροβιολογική ομάδα	Φέτα Αγρινίου	Φέτα Κορίνθου	Θρεπτικά υποστρώματα
	Αριθμός αποικιών	Αριθμός αποικιών	
Thermophilic lactobacilli	5	6	MRS (Biokar, France)
Mesophilic cocci	5	5	M17 (Biokar, France)
Thermophilic cocci	5	5	M17 (Biokar, France)
NSLAB	6	6	Rogosa (Biokar, France)
Enterococci	5	5	KAA (Merck, Germany)
Total plate count	-	-	PCA (Biokar, France)
Yeasts	3	1	YGC (Merck, Germany)
Propionic acid bacteria	11	-	Pal Propiobac (Standa, France)
Micrococci	-	-	MSA (LabM, UK)
Coliforms	-	-	VRBA (LabM, UK)
Σύνολο ανά τυρί	40	28	
Σύνολο	68		

5.3 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR

Η rep-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση των βακτηριακών στελεχών, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο την ταυτοποίησή τους ευκολότερη, γρηγορότερη και πιο οικονομική. Η rep-PCR οδήγησε σε μια συνεκτική ομαδοποίηση. Όλες οι απομονώσεις που ανήκαν σε μια συστάδα (cluster) θα μπορούσε να θεωρηθούν ότι είτε ανήκουν στο ίδιο είδος είτε είναι κλώνοι του ίδιου στελέχους. Επειδή οι βιβλιογραφικές αναφορές για την ταξινομική ικανότητα της δεν ομονοούν επ'αυτού (Devers et al., 2001; Hurtado et al., 2011), στη παρούσα μελέτη θεωρήσαμε ότι η ταξινόμηση επιτεύχθηκε σε επίπεδο είδους και όχι σε επίπεδο στελέχους.

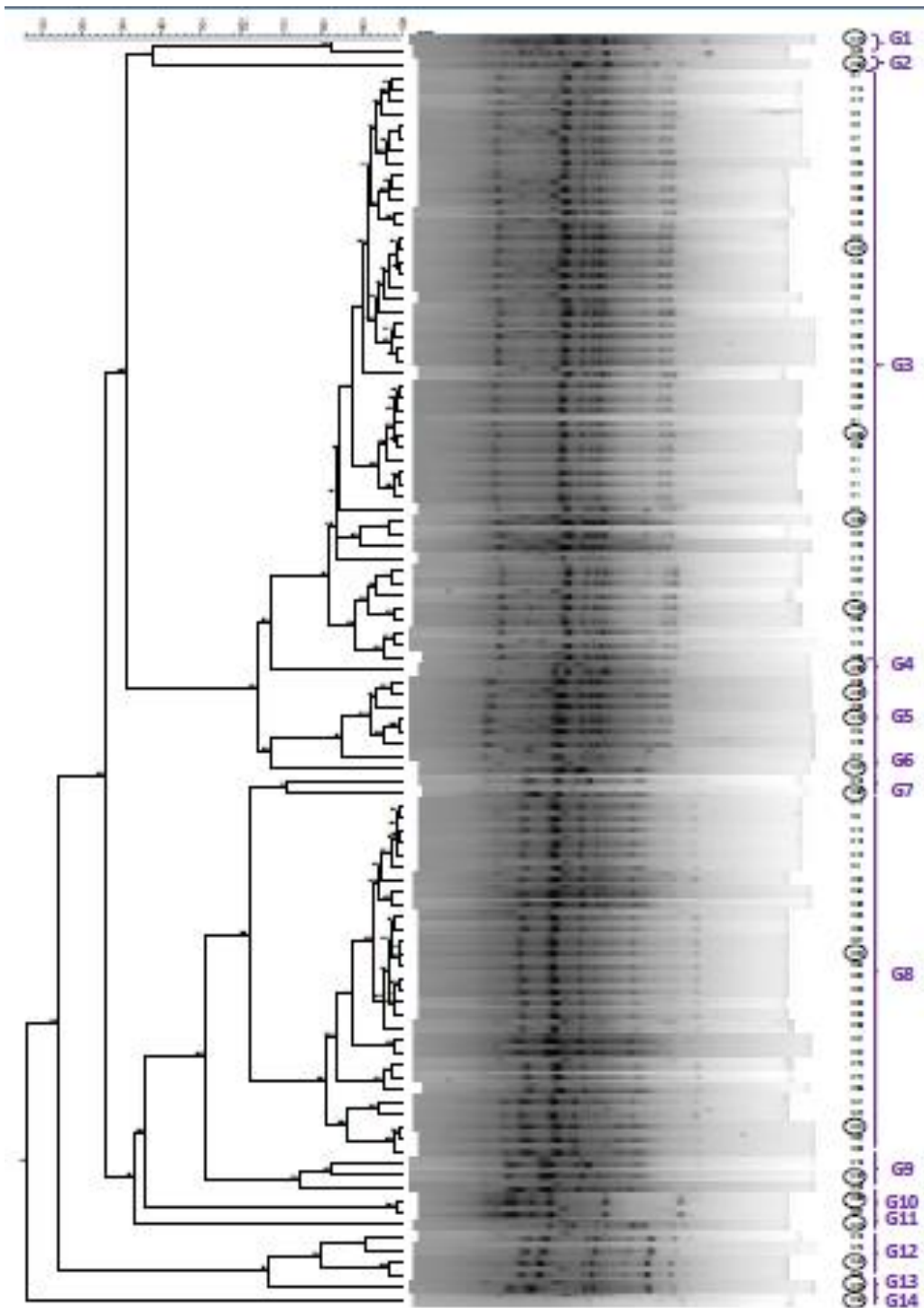
Χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, λήφθησαν αποτυπώματα για 103 στελέχη. Ενδεικτικά παρατίθεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης που προέκυψε από την ενίσχυση του DNA των οξυγαλακτικών στελεχών (Εικόνα 5.3). Λόγω της διαφορετικότητας των αποτυπομάτων των ζωνών μπόρεσε να πραγματοποιηθεί επιτυχής διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών στελεχών.



Εικόνα 5.3 Πηκτή αгарόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), 2. ATC2b, 3. KEN4, 4. ATC4a, 5. AEN4, 6. KEN5, 7. AEN5a, 8. AEN1, 9. AEN2a, 10. KNS3b, 11. KTC4, 12. ATB2b*, 13. ATB4b*, 14. KTB1a, 15. KTB4, 16. KTB1b, 17. KTC5b, 18. ATC4b, 19. KTC5a, 20. Marker

Οι 103 καλλιέργειες βακτηρίων διαχωρίστηκαν σε δεκατέσσερις μείζονες ομάδες , βάση του βακτηριακού τους προφίλ (Σχήμα 5.4). Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα

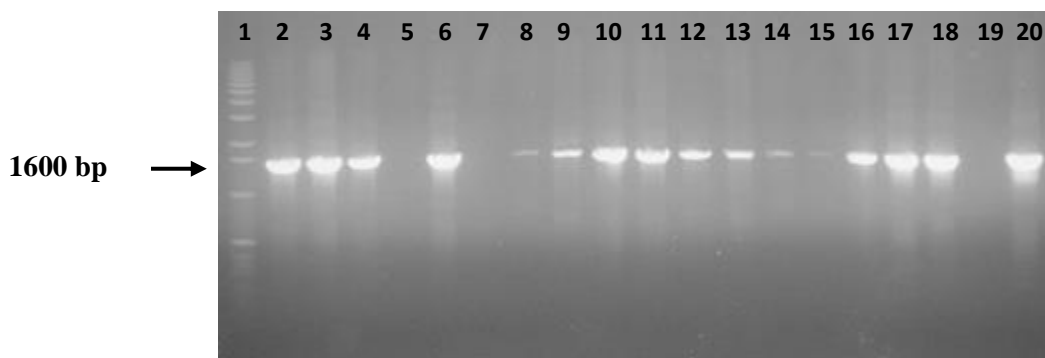
Bionumerics 6 και με τη βοήθεια του αλγορίθμου U.P.G.M.A. (unweighted pair-grouping) προέκυψε το δενδρόγραμμα που ακολουθεί. Στη συνέχεια, 19 αντιπροσωπευτικά στελέχη επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση.



Σχήμα 5.4 Ομαδοποίηση στελεχών με την μέθοδο *ger* – PCR σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Bionumerics. Με τις μωβ ανγκύλες απεικονίζονται οι ομάδες και με τους μαύρους κύκλους τα αντιπροσωπευτικά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν με το γονίδιο 16s rDNA.

5.4 Ταυτοποίηση στελεχών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως επιλέχθηκαν 19 στελέχη λαμβάνοντας υπόψη τόσο το ποσοστό ομοιότητας τους με τα υπόλοιπα στελέχη ανά ομάδα, όσο και τη διαφορετικότητα του προφίλ τους. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η Εικόνα 5.5 των προϊόντων PCR για το γονίδιο 16S rDNA. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτή αγαρόζης, είναι μια φωτεινή ζώνη. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα, εκτιμούμε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 1600 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 5.5 Πηκτή ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16s rDNA. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. KNS3b, 3. KNS1a, 4. ATB6c*, 5. ATC5, 6. ATC6, 7. ANS1, 8. Kb3b, 9. ATB3b, 10. Ab4b, 11. KTB6a, 12. KNS3a, 13. AEN4, 14. Kb1b, 15. Ab5b, 16. ATB3a, 17. PRO6, 18. PRO9, 19. Ab2b, 20. ATB4b*)

Μετά τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζης και την αλληλούχηση, πραγματοποιήθηκε στοίχιση (alignment) με τον αλγόριθμο blastn του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3 Αποτελέσματα της ομαδοποίησης όπως προέκυψε από το rep-PCR και της ταυτοποίησης όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του γονιδίου 16s rDNA 19 στελεχών. Με κόκκινο επισημαίνονται τα αντιπροσωπευτικά στελέχη που στάλθηκαν για αλληλούχηση.

Απομονώσεις	Ομάδα (rep-PCR)	Είδος (16s rDNA)
K-NS3 b	G01	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
K-EN2 b	G01	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
K-NS1 a	G010	<i>Lactobacillus heliongangensis</i>
K-NS5 a	G010	<i>Lactobacillus heliongangensis</i>
A-TB6c*	G011	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC5	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-TC6	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-EN2 b	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
K-NS3 a	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-EN4	G013	<i>Lactobacillus pentosus</i>
A-TB3a	G014	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO6	G02	<i>Lactobacillus curvatus</i>
A-TB1*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB2a*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB3a*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB3b*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB4a*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB5*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB6a*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB6b*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB1 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB1 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB2	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab2b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab1a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab2a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab4a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab4b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab5a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC1 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC1 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC1 c	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC4a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC4 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS1	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS2	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>

A-NS4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS5a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab5b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN5 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO4 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO4 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO5	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO7	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO8	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO10	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO11 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB3a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB3 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB5 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB6 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB6 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Kb3a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC5 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC6	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-NS6	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Kb3b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO9	G04	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB2b*	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB4b*	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN2 a	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN5 a	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC1b	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-EN5	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO11 b	G06	<i>Lactobacillus casei</i>
A-TC2a	G07	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb2 b	G07	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-NS6	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-EN1	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-PRO1	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-PRO2 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-PRO2 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB1 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB1 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB4a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb1b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB5 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb1a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>

Kb2 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb4a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb4 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb5 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb5 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TC1a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TC2	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TC5 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-NS4	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-NS5 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-NS1 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-NS2	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-EN1	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-EN2 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-EN3	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Ab1b	G09	<i>Lactobacillus casei</i>
K-TC3	G09	<i>Lactobacillus casei</i>
K-EN4	G09	<i>Lactobacillus casei</i>

A: Αγρίνιο, K: Κόρινθος

NS: Non Starter Lactic Acid Bacteria, EN: Enterococci, PRO: Propionic acid bacteria, TB: Thermophilic lactobacilli, b: Mesophilic lactobacilli, TC: Thermophilic cocci

* Χρήση κυκλοεξαμιδίου στο θρεπτικό μέσο MRS

Συγκεντρωτικά στον Πίνακα 5.4 παρουσιάζεται ο αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν ανά τυρί και ανά είδος. Πιο συγκεκριμένα, ο *Lactobacillus coryniformis* (*L. coryniformis*) και ο *Lactobacillus helionjiangensis* (*L. helionjiangensis*) απομονώθηκαν μόνο από την Φέτα της Κόρινθου, ενώ ο *Lactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) και ο *Lactobacillus pentosus* (*L. Pentosus*) μόνο από την Φέτα του Αγρινίου. Ο *Lactobacillus casei* (*L. casei*) απομονώθηκε και από τα δύο τυριά. Τέλος, ο *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) κυριαρχεί στην Φέτα του Αγρινίου και ο *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) στην Φέτα της Κορίνθου αντίστοιχα.

Η εικόνα της μικροχλωρίδας των δύο τυριών που λήφθηκε από την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA ήταν διαφορετική από εκείνη των κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών επιστροφής τρυβλίων και χρήσης επιλεκτικών θρεπτικών μέσων. Αρχικά, από την ανάλυση προέκυψε ότι όλοι οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν άνηκαν στην ομάδα των μεσόφιλων γαλακτοβάκιλλων, επιβεβαιώνοντας και την μικροσκοπική ανάλυση. Από το επιλεκτικό υπόστρωμα M17, μέσο που χρησιμοποιείται συνήθως για την απομόνωση κόκκων, όλες οι απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus* spp.. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε

και για τα επιλεκτικά υποστρώματα ΚΑΑ (επιλεκτικό υπόστρωμα εντερόκοκκων) και Ραίργριοβακ (επιλεκτικό υπόστρωμα προπινιοκών βακτηρίων). Ο περιορισμός αυτός, της επιλεκτικότητας των μέσων που χρησιμοποιούνται, έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Lynch et al., 1996; Rantziou et al., 2008).

Ανεξάρτητα από τη διαφορά στον χρόνο ωρίμασης, τις μικρές διαφορές στην εφαρμοζόμενη τεχνολογία για την παρασκευή του τυριού Φέτα και τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες του χώρου, η μικροχλωρίδα των δύο τυριών παρουσίασε παρόμοια χαρακτηριστικά. Προέκυψε πως η μεσόφιλη μικροχλωρίδα εκπροσωπούσαν κυρίως από τον *L. brevis*, τον *L. paracasei* και τον *L. plantarum*. Αυτό υποδηλώνει ότι όταν αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες, κυριαρχούν ανάμεσα στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο τυρί Φέτα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε εμπορικές Φέτες (Rantsiou et al., 2008; Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011).

Πίνακας 5.4 Στελέχη που απομονώθηκαν ανά τυρί και ανά είδος

Είδος (16s rDNA)	Φέτα Αγρινίου	Φέτα Κορίνθου
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	-	2
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	48	10
<i>Lactobacillus casei</i>	2	2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	6	25
<i>Lactobacillus heilongjiangensis</i>	-	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	-

Η κυριαρχία των γαλακτοβάκιλλων και η χαμηλή συχνότητα των λακτοκόκκων σε υψηλούς πληθυσμούς, στα ώριμα λευκά τυριά άλμης, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα βακτήρια αυτά είναι ευαίσθητα στην υψηλή αλατότητα (Michels et al., 1979) και σε pH <5,0 (Nannen and Hutkins, 1991) και κατά συνέπεια ο πληθυσμός τους μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμασης (Mansour and Alais, 1973). Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα σε σχέση με τους λακτοκόκκους να διατηρούν το κυτταροπλασματικό τους pH σε επίπεδα

υψηλότερα από το μέσο στο οποίο βρίσκονται και η ανάπτυξή τους ευνοείται σε υψηλή οξύτητα (Nannen and Hutkins, 1991).

Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην Φέτα είναι παρόμοια με αυτή στο τυρί Τελεμέ που παρασκευάζεται επίσης με πρόβειο γάλα, με τον *L. plantarum* να γίνεται το κυρίαρχο είδος με την πρόοδο της ωρίμανσης και τους λακτόκοκκους να απουσιάζουν έπειτα από τις 75 μέρες ωρίμανσης. Συμπερασματικά, δεδομένου ότι τα τυριά αυτά ήταν υψηλής ωρίμανσης δε προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι δεν κατέστη δυνατόν αν απομονωθούν λακτόκοκκοι (Tzanetakis and Litoroulou - Tzanetaki, 1992).

Κυρίαρχος μικροοργανισμός στη Φέτα Αγρινίου βρέθηκε να είναι ο *L. brevis*. Ο *L. brevis* φαίνεται να επικρατεί του *L. plantarum* στα προχωρημένα στάδια ωρίμανσης σύμφωνα και με τους Peterson and Marshall (1990). Ακόμη, σύμφωνα με μία προηγούμενη μελέτη (Rönkä et al., 2003), ο *L. brevis* δεν παράγει επαρκείς ποσότητες γαλακτικού οξέος έτσι ώστε να προκαλεί οξίνιση του γάλακτος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και επομένως δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί μόνος του για την παραγωγή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, τα εξεταζόμενα στελέχη του *L. brevis*, στην μελέτη εκείνη, παρέμειναν βιώσιμα στο γάλα για 21 ημέρες στους 4 °C .

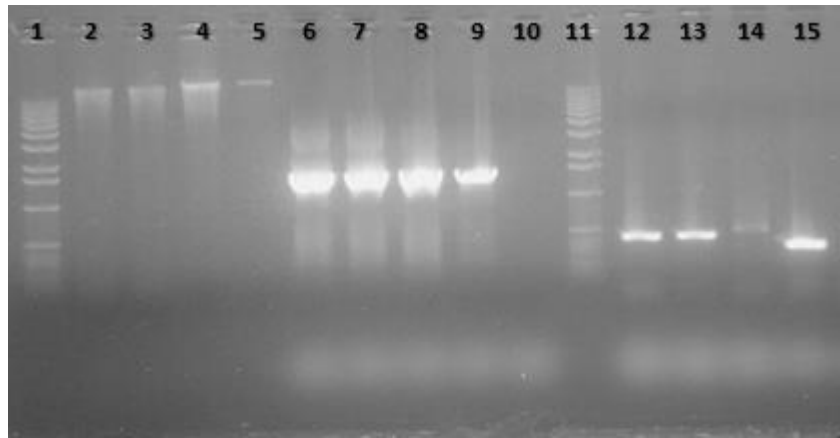
Ο *L. plantarum* είναι αλατοάντοχος (Litoroulou-Tzanetaki et al., 1993). Ακόμη, έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες να κυριαρχεί στα λευκά τυριά άλμης (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011; Pouillet et al., 1993; Manolopoulou et al., 2003). Ο *L. plantarum* πιθανόν συμμετέχει σημαντικά στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τυριών αυτών. Επιπροσθέτως, ο μικροοργανισμός αυτός παρουσιάζει εξωκυτταρική πρωτεολυτική και λιπολυτική ικανότητα και μπορεί να παράγει διακετύλιο. (Arizcun et al., 1997). Η ικανότητά του να παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες πιθανόν να επιταχύνει τη μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών και ειδικότερα των κολοβακτηριοειδών.

Ο *L. paracasei* έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες ως μη εναρκτήρια καλλιέργεια στη Φέτα (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011), είναι ετεροζυμωτικός, προκαλεί δηλαδή την παραγωγή αερίου κατά τη ζύμωση της λακτόζης, κάτι που μπορεί να προκαλέσει ελάττωμα στα λευκά τυριά άλμης (Karageorgis et al., 2006). Ωστόσο, κανένα από τα δύο τυριά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των στελεχών δεν είχε τέτοιο πρόβλημα, αλλά ήταν άριστης ποιότητας τόσο σε δομή όσο και σε γευστικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, ο *L. paracasei* μπορεί να διασπάσει καζεΐνες και διαθέτει πεπτιδολυτικά ένζυμα (Bintsis et al., 2003).

Ακόμη ο *L. curvatus*, *L. coryniformis*, *L. pentosus*, *L. casei* αναφέρονται σε ποικίλες μελέτες που αφορούν την μικροχλωρίδα της Φέτας (Rantsiou et al., 2006; Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011). Τέλος, το είδος *L. heliongjangensis* έχει απομονωθεί από κινέζικες πίκλες, σε μία κινέζικη επαρχία από την οποία πήρε και το όνομα του (Gu Et al., 2013; Zheng et al., 2015). Το είδος αυτό δεν έχει απομονωθεί ξανά από τυριά, πιθανόν οι παρόμοιες συνθήκες της Φέτας με τις πίκλες, όπως είναι το χαμηλό pH, ευνόησαν την ανάπτυξή του.

5.5 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Ακολούθησε η μεταγονιδιωματική ανάλυση του μικροβιακού οικοσυστήματος της Φέτας του Αγρινίου με σκοπό την ανίχνευση των βακτηρίων και των ζυμών (diversity assay). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA βακτηρίων και ζυμών στο ολικό DNA που απομονώθηκε από τη Φέτα Αγρίνιο πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Εικόνα 5.6). Όσον αφορά το ολικό DNA, παρατηρούμε ότι έχουμε σχετικά συμπαγείς μεγαλομοριακές ζώνες γεγονός που αποδεικνύει ότι το DNA ήταν μεγαλομοριακό και επομένως καλής ποιότητας. Ακόμη, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη DNA βακτηρίων και ζυμών, αφού με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών που ενισχύουν περιοχές του βακτηριακού DNA (16S rDNA gene) και του DNA των ζυμών (ITS DNA region) πήραμε τα αντίστοιχα προϊόντα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.6.

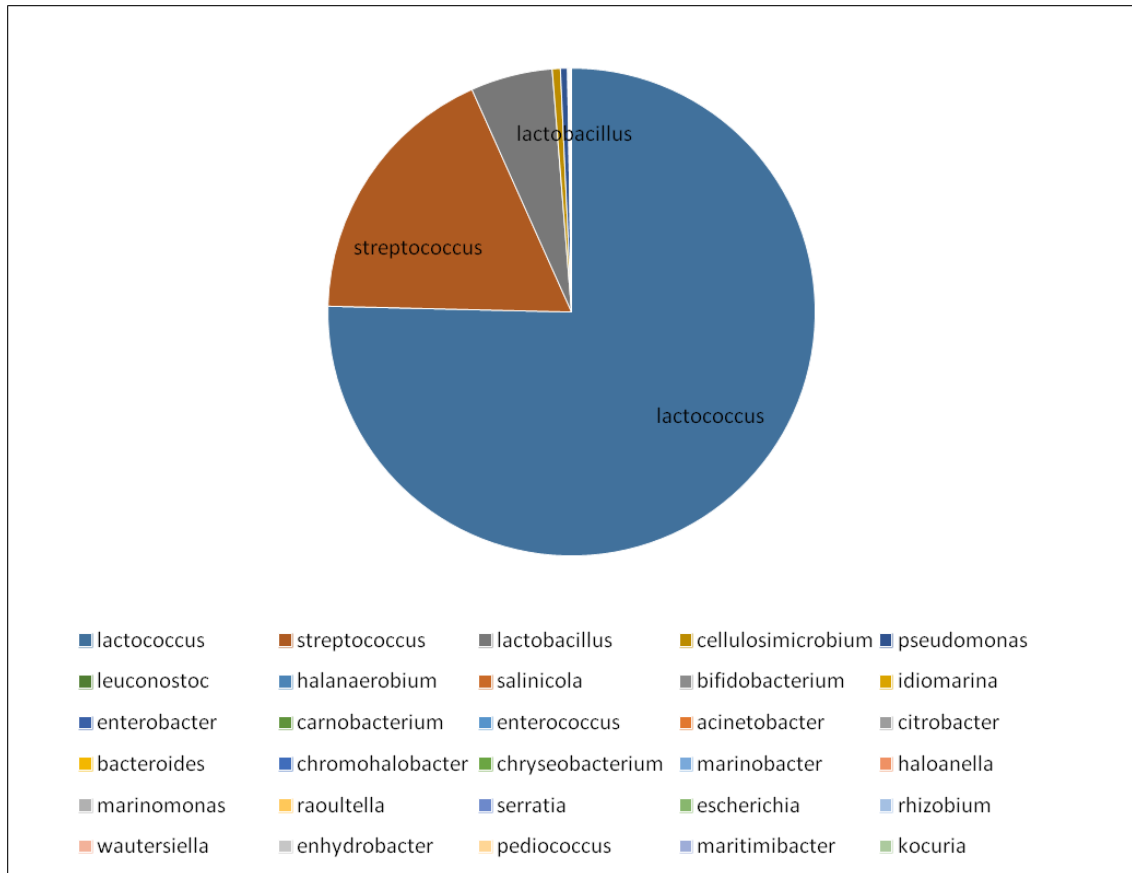


Εικόνα 5.6 Πηκτή ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα PCR του γενωμικού DNA που εκχυλίστηκε από τη Φέτα Αγρινίου. Η παρουσία του DNA των βακτηρίων και ζυμών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση των κατάλληλων εκκινήτων, 16S (F) και 16S (R) για τα βακτήρια και ITS1 και ITS2 για τις ζύμες. 1. Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), 2 & 3. - Γενωμικό DNA Φέτα Αγρινίου, 4. *Lactobacillus bulgaricus*- Μάρτυρας βακτηριακού γενωμικού DNA, 5. *Yarrowia lipolytica*- Μάρτυρας γενωμικού DNA ζυμών, 6 & 7. - 16S Φέτα Αγρινίου, 8. *Lactobacillus bulgaricus*- Μάρτυρας 16S, 9. *Yarrowia lipolytica*- Μάρτυρας 16S, 10. Κενό, 11. Marker, 12 & 13. – ITS Φέτα Αγρινίου, 14. *Lactobacillus bulgaricus* - ITS, 15. *Yarrowia lipolytica* – ITS

Έπειτα από την αλληλούχηση του DNA, ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τον MG RAST server (Meyer et al., 2008). Η μεταγονιδιωματική ανάλυση της Φέτας Αγρινίου έδειξε μεγάλη ποικιλία βακτηρίων. Αξίζει να σημειωθεί πως στην μεταγονιδιωματική ανάλυση, παίρνουμε πληροφορία απευθείας από το γονιδίωμα των μικροοργανισμών, επομένως δεν είναι γνωστό εάν τα κύτταρα των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν είναι ζωντανά ή νεκρά.

Στο Σχήμα 5.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα γένη των βακτηρίων της Φέτας Αγρινίου, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του MG RAST. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα, τα κυριότερα γένη ήταν οι λακτόκοκοι, οι στρεπτόκοκοι και οι γαλακτοβάκιλλοι. Υπήρχε μεγάλη ποικιλομορφία στα γένη που υπήρχαν στο δείγμα μας. Ακόμη, διαπιστώθηκε πως το κυρίαρχο γένος στο δείγμα ήταν οι λακτόκοκοι. Αντίθετα, με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση οι απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν άνηκαν μόνο σε ένα γένος, *Lactobacillus spp.* Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών, παίρνουμε πολύ διαφορετική εικόνα για την μικροχλωρίδα της Φέτας Αγρινίου. Αυτή η διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι με την

κλασική μικροβιολογική ανάλυση υπάρχει η δυνατότητα απομόνωσης μόνο των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro*.

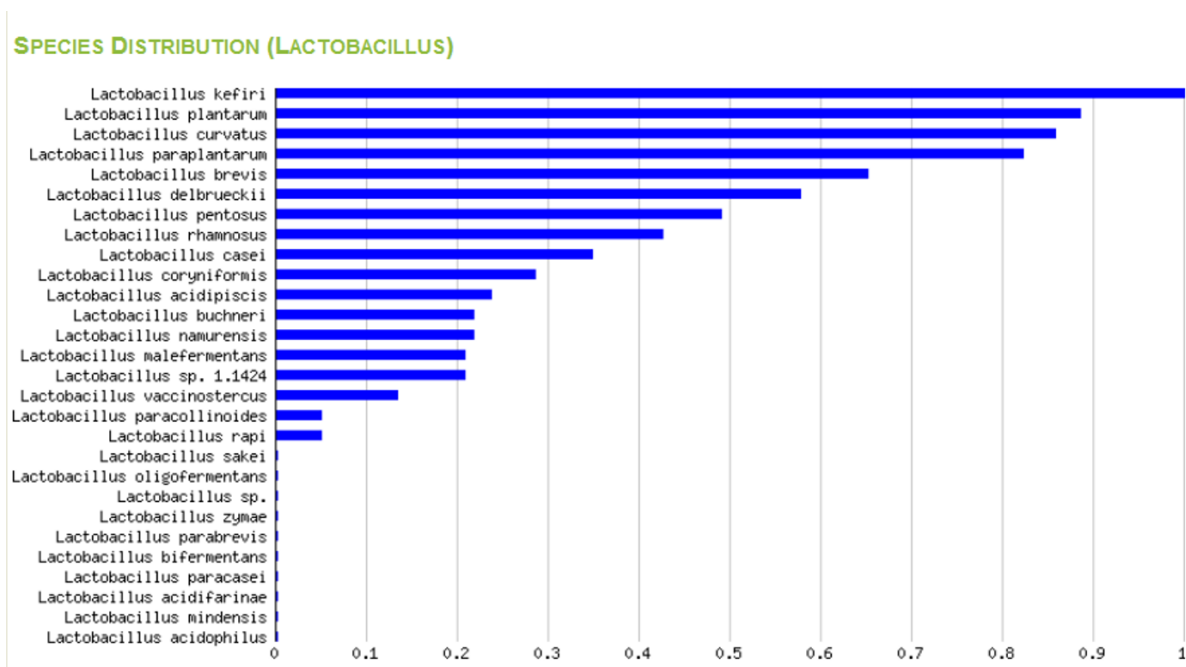


Σχήμα 5.2 Κυκλική Απεικόνιση με τα τα κυριότερα γένη βακτηρίων στη Φέτα Αγρινίου είδη των που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA

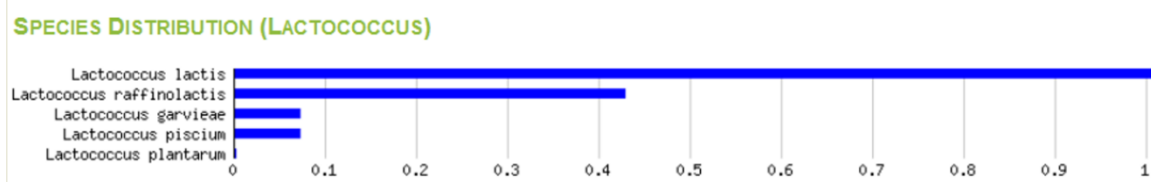
Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα σε φρέσκο τυρί Φέτα αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στο αλάτι. Όσο προχωρά η διαδικασία της ωρίμανσης η μικροχλωρίδα μεταβάλλεται. Οι μικροοργανισμοί *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*), *Lactococcus raffinolactis* (*L. raffinolactis*), *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Lactobacillus buchneri* (*L. buchneri*) και *L. brevis* αποτελούν την αρχική κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Επιπλέον, έχουν απομονωθεί σταφυλόκοκκοι, μικρόκοκκοι, πεδιόκοκκοι και εντερόκοκκοι, με κυρίαρχα τα είδη *Enterococcus Faecalis* (*E. Faecalis*), *Enterococcus Faecium* (*E. Faecium*), *Enterococcus Saccharolyticus* (*E. Saccharolyticus*) (Litoroulou-Tzanetaki et al., 2011). Τα προαναφερθέντα είδη ταυτοποιήθηκαν και με τη μέθοδο της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.

Στο τέλος της ωρίμασης, η μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από γαλακτοβάκιλλους, με τον *L. plantarum* να είναι το κυρίαρχο είδος. Ακόμη, σε μεγάλο ποσοστό έχουν απομονωθεί, *Lactobacillus paraplantarum* (*L. paraplantarum*), *L. paracasei*, *L. buchneri* και *L. brevis*. Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν αμινοπεπτιδάσες και πολύ μικρή λιπολυτική δραστηριότητα (Tzanetakis and Hatzikamari, 1994; Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992; Manolopoulou et al., 2003). Δεδομένου ότι η Φέτα Αγρινίου ήταν προχωρημένης ωρίμανσης δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση απομονώθηκαν μόνο γαλακτοβάκιλλοι.

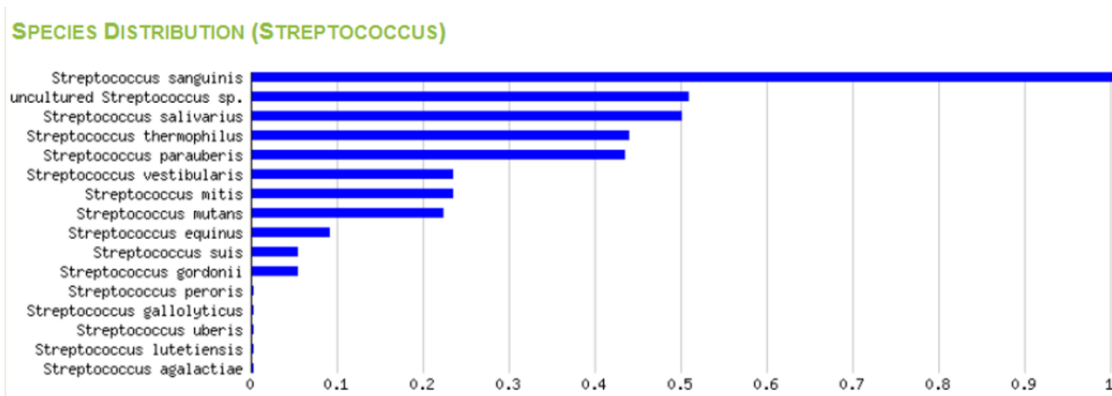
Στα Σχήματα 5.3, 5.4, 5.5 παρουσιάζονται τα είδη από τα 3 γένη που βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στη Φέτα Αγρινίου. Όσον αφορά τα κυριότερα είδη του γένους *Lactobacillus*, αυτά ήταν ο *Lactobacillus kefir* (*L. kefir*), ακολουθούμενος από τους *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. paraplantarum*, *L. brevis*.



Σχήμα 5.3 Κατανομή είδους *Lactobacillus* στη Φέτα Αγρινίου



Σχήμα 5.4 Κατανομή είδους *Lactococcus* στη Φέτα Αγρινίου



Σχήμα 5.5 Κατανομή είδους Streptococcus στη Φέτα Αργινίου

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης διαπιστώνουμε πως τα είδη *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. pentosus*, *L. plantarum* ταυτοποιήθηκαν και με τις δύο τεχνικές. Με την μεταγονιδιωματική ανάλυση βρέθηκαν πολλά περισσότερα είδη, ενώ το είδος *L. kefir* που βρέθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό, δεν κατέσκει δυνατό να απομονωθεί με τις κλασικές τεχνικές. Γεγονός που δεν προκαλεί έκπληξη αφού η μέθοδος της μεταγονιδιωματικής δεν μας επιτρέπει το διαχωρισμό νεκρών και ζωντανών κυττάρων καθώς απομονώνεται το συνολικό DNA από το οικοσύστημα.

Ο *L. kefir* είναι απαραίτητος για την παραγωγή του ξινού γάλακτος κεφίρ (Kandler, 1984). Δεν έχει απομονωθεί έως τώρα από τυριά Φέτα, αλλά από τυριά όπως η Ricotta (Baruzzi et al., 2000) και το Camembert (Henri-Dubernet et al., 2008). Η ύπαρξη των υπολοίπων ειδών σε τυριά Φέτα επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες (Pouillet et al., 1993; Manolopoulou et al., 2003; Rantsiou et al., 2006; Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011).

Ο *L. plantarum* έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα και το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, έχει απομονωθεί από ενσίρωμα, διάφορα λαχανικά τουρσί, προζύμι, κοπριά αγελάδων και τέλος από την ανθρώπινη στοματική κοιλότητα, τον εντερικό σωλήνα και τα κόπρανα (Kandler and Weiss, 1986). Ακόμη, ο *L. plantarum*, λόγω της μεταβολικής του δραστηριότητας είναι σημαντικός για τα ζυμούμενα τρόφιμα, όπως τα λαχανικά τουρσί (Fleming et al. 1985), τα αλλάντικα (Hugas et al., 1993), τις ζυμούμενες πράσινες ελιές (Ruiz-

Barba et al., 1991) και τα τυριά (Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992). Αναπτύσσεται σε υψηλούς αριθμούς και κυριαρχεί κατά τη διάρκεια της ωρίμασης λόγω της ικανότητάς του να χρησιμοποιεί μεταβολίτες πιο αποτελεσματικά από άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Thomas, 1987). Επιπλέον, έχει απομονωθεί σε μεγάλους αριθμούς από ελληνικά παραδοσιακά τυριά (Tzanetakis et al., 1987; Tzanetakis, 1990; Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 1992; Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992). Τέλος, ο *L. plantarum* παρουσιάζει λιπολυτική και πεπτιδολυτική δραστηριότητα (Xanthopoulos et al., 2000), μπορεί συνεπώς να συμβάλει στη μείωση του χρόνου ωρίμανσης και την ενίσχυση της γεύσης (Law and Kostad, 1983; Fox, 1989).

Ο *L. curvatus* έχει απομόνωθεί κυρίως από κρέατα και αλλαντικά (Castellano et al., 2000), αλλά και από ημίσκληρα τυριά (Kask et al., 2016) και τη Φέτα (Rantsiou et al., 2006). Αυτό το είδος σχετίζεται φυλογενετικά με τους *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*), *Lactobacillus fuchuensis* (*L. fuchuensis*) και *Lactobacillus graminis* (*L. graminis*), είδη που έχουν επίσης απομονωθεί από το κρέας (Ercolini et al., 2006). Ο *L. curvatus* έχει αντιμικροβιακές και πρωτεολυτικές δραστηριότητες (Casaburi et al., 2016).

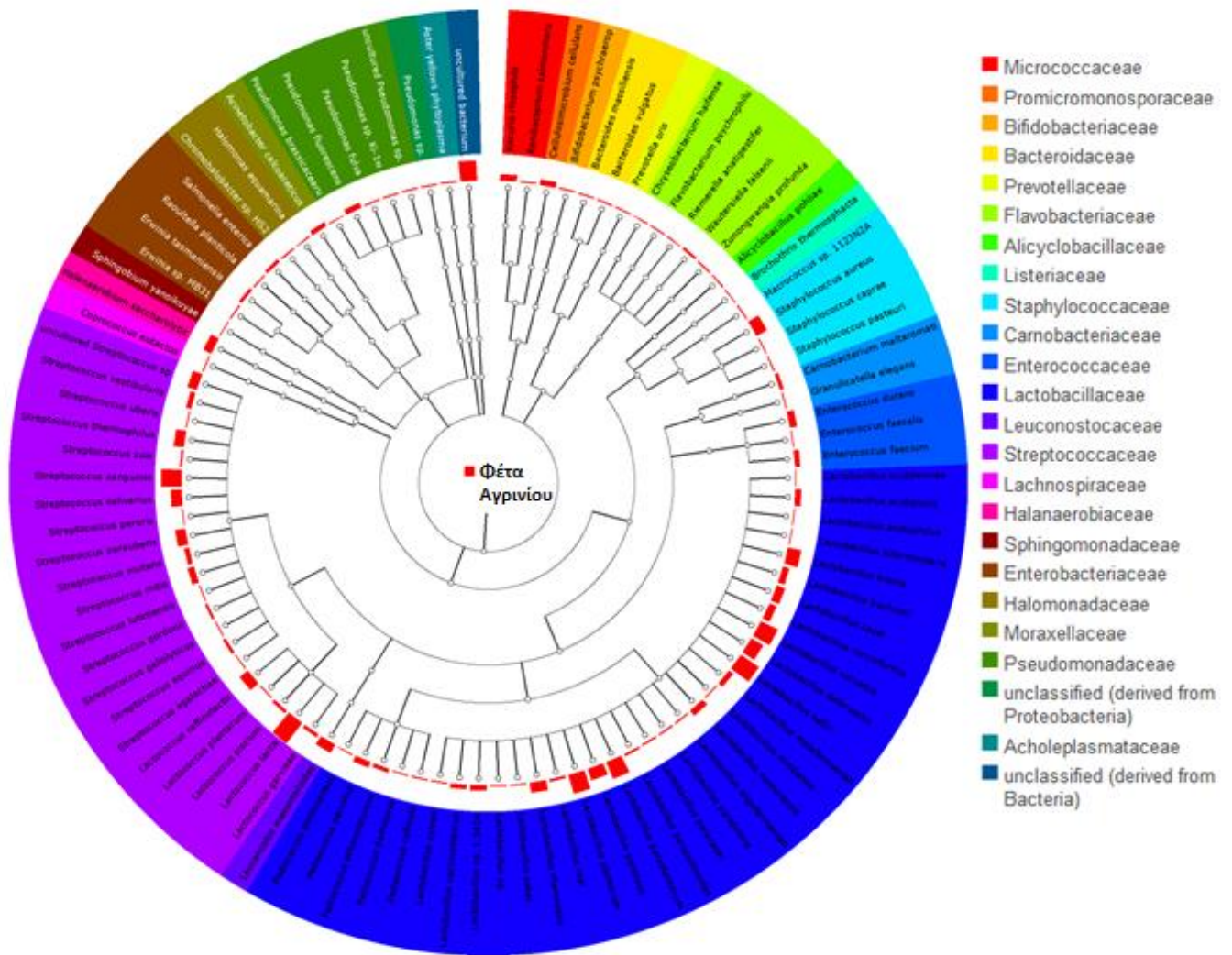
Ο *L. paraplantarum* απομονώθηκε αρχικά από την μύρα και τα ανθρώπινα κόπρανα (Curk et al., 1996). Εκτός από την σύνθεση του γαλακτικού οξέος, παράγει εξωπολυσακχαρίτες που προσφέρουν ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τυρί (Nikolic et al., 2012). Ακόμη, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες παράγει βακτηριοσίνες που δρουν ενάντια στη *Listeria Monocytogenes* (Kretli Winkelstroter et al., 2015).

Ο *L. brevis* κυριαρχεί στα τελευταία στάδια ωρίμασης της Φέτας (Litoroulou-Tzanetaki et al., 2011). Είναι ένα μικροαερόφιλο, υποχρεωτικά ετεροζυμωτικό οξυγαλακτικό βακτήριο που έχει απομονωθεί από πολλά ζυμούμενα τρόφιμα, όπως τα τυριά και τα αλλαντικά (Mante et al., 2003; Teixeira, 2014) καθώς και από την εντερική μικροχλωρίδα (Gu et al., 2008). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως τη μύρα μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση. Ως μέλος του γένους *Lactobacillus*, ο *L. brevis* δεν θεωρείται επικίνδυνος για τον άνθρωπο (GRAS), από τον FDA (2003). Ο μικροοργανισμός αυτός έχει χαρακτηριστεί σε αρκετές μελέτες ως προβιοτικός. Σε αυτές τις μελέτες, τα στελέχη βρέθηκαν να έχουν αρκετές ιδιότητες, όπως υψηλή ανθεκτικότητα στο χαμηλό pH και τα χολικά άλατα, η υψηλή προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και αντιμικροβιακή δράση εναντίων παθογόνων (Kishi et al., 1996; Rönkä et al., 2003; Yakabe et al., 2009).

Οι λακτόκοκκοι είναι μια σημαντική ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο για την παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. Πληθώρα «άγριων» στελεχών λακτόκοκκων έχουν απομονωθεί από τα παραδοσιακά τυριά Corroler et al., 1998; Gaya et al., 1999; Mannu et al., 2000; Sanchez et al., 2000; Mannu and Paba, 2002, Cogan et al., 1997; Desmasures et al., 1998; Delgado and Mayo, 2004). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες οι θερμόφιλοι και μεσόφιλοι κόκκοι πεθαίνουν στο τέλος της ωρίμασης, λόγω του χαμηλού pH και της υψηλής συγκέντρωσης άλατος (Bintsis and Papademas, 2002).

Οι παραπάνω αναφορές ενισχύουν τα αποτελέσματα της μελέτης μας αφού με την μικροβιολογική ανάλυση δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν λακτόκοκκοι, ενώ η μέταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε πως το κυρίαρχο είδος στη Φέτα Αγρινίου ήταν ο *L. lactis*, χωρίς να γνωρίζουμε όμως εάν τα κύτταρα αυτά ήταν ζωντανά ή νεκρά. Ο *L. lactis*, όπως επίσης και ο *Lactococcus garvieae* (*L. garvieae*) έχουν απομόνωθεί και από άλλα Ελληνικά τυριά όπως τη Γραβιέρα (Bozoudi et al., 2015). Όσον αφορά στο κυρίαρχο είδος, τον *L. lactis*, μπορεί να απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, αλλά έχει κυρίαρχο ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (Kelly et al., 2010).

Σχετικά με τους στρεπτόκοκκους, ο *Streptococcus thermophilus* μαζί με τον *Lactobacillus delbrueckii*, αποτελεί συχνά εναρκτήρια καλλιέργεια για την παρασκευή πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι, και έχει απομονωθεί από τυριά (Beresford et al., 2001). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ταυτοποιήθηκε ο *Streptococcus sanguinis*, αφού πρόκειται για βακτήριο της στοματικής κοιλότητας του ανθρώπου (Caufield et al., 2000). Η ύπαρξη του στο τυρί είναι ένδειξη ελλιπούς υγιεινής κατά τη διάρκεια παρασκευής του.



Σχήμα 5.6 Βακτηριακή κατανομή σε επίπεδο είδους, της Φέτας Αγρινίου, με την ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA. Η κατανομή δημιουργήθηκε από τον διακομιστή MG-RAST.

5.6 Αντιμικροβιακή δράση στελεχών

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας την μέθοδο well diffusion assay (WDA) μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δύο τυριά Φέτας. Τα υπερκείμενα των επιλεγμένων στελεχών από υπόστρωμα MRS και άπαχο γάλα που περιέχει 0.3 % w/v εκχύλισμα ζύμης, δοκιμάστηκαν έναντι 29 μικροοργανισμών - στόχων, τα οποία αναπτύχθηκαν σε κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (Πίνακας 4.7). Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 50 στελέχη βακτηρίων, για λόγους οικονομίας χρόνου (Πίνακας 5.5). Η επιλογή των συγκεκριμένων στελεχών έγινε με βάση το χαρακτηριστικό ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα που προέκυψε από την rep-PCR. Επιλέχθηκαν από κάθε ομάδα τα στελέχη εκείνα, τα οποία παρουσίαζαν την μικρότερη ομοιότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα όπως προέκυψε από την ομαδοποίηση του rep-PCR.

Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση, αφού πρώτα είχε ρυθμιστεί το pH του υπερκειμένου στην τιμή 6.5. Η παρεμποδιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι Gram- και Gram+ μικροοργανισμών μπορεί να οφείλεται σε ασθενή οργανικά οξέα, τα οποία παράγονται κατά τον μεταβολισμό των σακχάρων, όπως το γαλακτικό και οξικό οξύ και ιδιαίτερα η αδιάστατη μορφή αυτών (Alakomi et al., 2000; Wilson et al., 2005). Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης, η οποία δεν οφείλεται σε παραγόμενα οξέα, για αυτό έγινε και ρύθμιση του pH στην τιμή 6.5.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, από τα εξεταζόμενα παραγωγά στελέχη, μόνο ένα παρουσίασε ανάσχεση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών - στόχων που χρησιμοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ζώνη ανάσχεσης διαμέτρου 1 cm (διάμετρος οπής 5 mm) του υπερκειμένου καλλιέργειας MRS του στελέχους *L. casei* ATC2a έναντι του στελέχους *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) LMG 14545, ενώ δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα για το υπερκείμενο που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (υπερκείμενο MRS, pH 6.5). Πραγματοποιήθηκε επανάληψη του πειράματος ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα.

Η παραγωγή βακτηριοσινών από το είδος *L. casei* επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες (Muller and Radler, 1993; Lü et al., 2014). Ακόμη, ο *L. casei* έχει απομονωθεί ευρέως από ζυμούμενα τρόφιμα, κυρίως γαλακτοκομικά προϊόντα (Bernardeau

et al., 2008), ενώ αναγνωρίζεται γενικά ως προβιοτικό βακτήριο (Wang et al., 2013; Widuri & Suryani, 2013).

Ο *S. pneumoniae* ή πνευμονιόκοκκος είναι ένα Gram+, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Από τα τέλη του 19ου αιώνα που ανακαλύφθηκε έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών μελετών. Ο *S. pneumoniae* διαβιεί ασυμπτωματικά στο ρινοφάρυγγα υγιών φορέων. Ωστόσο, σε ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως ηλικιωμένοι, άτομα με καταβεβλημένο ανοσοποιητικό και στα παιδιά, το βακτήριο αυτό μπορεί να καταστεί παθογόνο, να εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές του αναπνευστικού και να προκαλέσει νόσο. Ο *S. pneumoniae* είναι η κύρια αιτία της πνευμονίας, μπορεί όμως να προκαλέσει και βρογχίτιδα, ρινίτιδα, οξεία παραρρινοκολπίτιδα, ωτίτιδα, επιπεφυκίτιδα, μηνιγγίτιδα, βακτηριαιμία, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα, περικαρδίτιδα και σηψαιμία σε ασθενείς με HIV (Alonso de Velasco et al., 1995).

Είναι γνωστό ότι η μικροχλωρίδα της ρινικής κοιλότητας ενεργοποιεί τον αμυντικό μηχανισμό του ξενιστή εναντίον εξωγενών παθογόνων. Ο μηχανισμοί αυτοί επάγουν την ανταγωνιστική δράση της συμβιωτικής μικροχλωρίδας κατά των παθογόνων. Η δράση της συμβιωτικής μικροχλωρίδας μπορεί να ενισχυθεί με την εισαγωγή γαλακτοβάκιλλων από τα τρόφιμα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει θεραπευτικά οφέλη με την πρόσληψη προβιοτικών, ιδιαίτερα για γαστρεντερικές διαταραχές (Glück and Gebbers, 2003).

Το γεγονός ότι ορισμένα οξύγαλακτικά βακτήρια ενεργοποιούν και ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Kato et al., 1983) συνιστά μια πολλά υποσχόμενη προοπτική σχετικά με τη χρήση τους ως ανοσορυθμιστές. Όταν τα οξύγαλακτικά βακτήρια πέπτονται, το ανοσοποιητικό σύστημα που σχετίζεται με το έντερο, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και την ρύθμιση του γενικού ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου (Matsuzaki and Chin, 2000). Η μελέτη του τρόπου δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος του γαστρεντερικού σωλήνα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η επίδραση των προβιοτικών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών της ρινικής μικροχλωρίδας μελετήθηκε και επιβεβαιώθηκε από τους Glück και Gebbers, το 2003.

Πίνακας 5.5 Στελέχη βακτηρίων, των οποίων το αντιμικροβιακό δυναμικό ερευνήθηκε έναντι 29 μικροοργανισμών - στόχων. Αναγράφεται η ομάδα και το είδος στα οποία ανήκουν. Με κόκκινο επισημαίνεται το στέλεχος το οποίο εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους *S. Pneumoniae* LMG 14545

Στελέχη	Ομάδα	Είδος (16s rDNA)
K-EN2 b	G01	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
K-NS3 b	G01	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
K-NS1 a	G010	<i>Lactobacillus helionjiangensis</i>
K-NS5 a	G010	<i>Lactobacillus helionjiangensis</i>
A-TB6c*	G011	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC5	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-TC6	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
K-NS3 a	G012	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A-EN4	G013	<i>Lactobacillus pentosus</i>
A-TB3a	G014	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN3	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO6	G02	<i>Lactobacillus curvatus</i>
A-TB1*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB1 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB3a*	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS1	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS2	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-NS4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TC1 c	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
Ab5b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-NS6a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB3 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TB5 a	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC4	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC5 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC6	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO7	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO4 b	G03	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO9	G04	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB2b*	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-TB4b*	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-EN2a	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-EN5	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
K-TC1b	G05	<i>Lactobacillus brevis</i>
A-PRO11 b	G06	<i>Lactobacillus casei</i>
A-TC2a	G07	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb2 b	G07	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb1b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Kb4 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-EN3	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>

K-NS4	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB1 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TB4	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TC1a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-TC5 a	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-PRO1	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
A-PRO2 b	G08	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K-EN4	G09	<i>Lactobacillus casei</i>
K-TC3	G09	<i>Lactobacillus casei</i>

A: Αγρίνιο, K: Κόρινθος

NS: Non Starter Lactic Acid Bacteria, EN: Enterococci, PRO: Propionic acid bacteria, TB: Thermophilic lactobacilli, b: Mesophilic lactobacilli, TC: Thermophilic cocci

* Χρήση κυκλοξαμιδίου στο θρεπτικό μέσο MRS

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η μικροχλωρίδα δύο παραδοσιακά παρασκευασμένων τυριών Φέτας, χωρίς τη χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε κλασική μικροβιολογική ανάλυση κατά την οποία κατέστη δυνατό να απομονωθούν μόνο γαλακτοβάκιλλοι, παρά την χρήση επιλεκτικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα σχετικά με τη μικροχλωρίδα της Φέτας ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Δεδομένου ότι οι δύο Φέτες που μελετήθηκαν ήταν προχωρημένης ωρίμανσης, είναι προφανές ότι τα βακτήρια αυτά είναι καλά προσαρμοσμένα στο περιβάλλον της Φέτας και μπορούν να συμβάλουν στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε αυτό τον τύπο τυριών.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η πρώτη μεταγονιδιωματική ανάλυση σε τυρί Φέτα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα της Φέτας Αγρινίου περιλαμβάνοντας όλες τις μεγάλες ομάδες αυτών. Ακόμη, η μεταγονιδιωματική μελέτη αποκάλυψε μεγάλη ποικιλομορφία στα είδη που ταυτοποιήθηκαν, κάτι το οποίο δεν φάνηκε με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Πιο συγκεκριμένα, έδειξε την παρουσία πολλών ειδών η πλειοψηφία των οποίων άνηκαν στα γένη *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Streptococci*. Μελλοντικά θα ήταν χρήσιμη η διερεύνηση της λειτουργικότητας και του μεταβολισμού των μικροοργανισμών αυτών, με πιθανά οφέλη για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων με βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Τέλος, μελετώντας το αντιμικροβιακό δυναμικό των οξυγαλακτικών στελεχών που απομονώθηκαν, το στέλεχος *L. lactis* A-TC2a παρουσίασε ανάσχεση της ανάπτυξης του παθογόνου στελέχους *S. Pneumoniae* LMG 14545. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον από την βιομηχανία τροφίμων για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών με την χρήση μικροοργανισμών «γενικά αναγνωρισμένων ως ασφαλείς» (GRAS), όπως είναι και τα προβιοτικά και την ελαχιστοποίηση της χρήσης χημικών πρόσθετων. Επιπλέον, η χρήση των αντιβιοτικών ή υπολείμματα αυτών στα τρόφιμα είναι παράνομη. Σε αντίθεση με τα χημικά συντηρητικά και τα αντιβιοτικά, οι βακτηριοσίνες, οι οποίες επίσης χαρακτηρίζονται ως «GRAS» αποτελούν μία ασφαλή λύση στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών.

7. Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

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

Abdel-Bar N., Harris N. D. and Rill R. L. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 52,411-415.

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

Abubucker S., Segata N., Goll J., Schubert A.M., Izard J., Cantarel B.L., Rodriguez- Mueller B., Zucker J., Thiagarajan M., Henrissat B., White O., Kelley ST., Methé B., Schloss P.D., Gevers D., Mitreva M., Huttenhower C., (2012). Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012, 8:e1002358.

Adams M. R. and Hall C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and cetic acids and their mixtures. *Intern. J. Food Sc. Techn.* 23, 287-2

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

Alichanidis E., Anifantakis E.M., Polychroniadou A., Nanou M., (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *J. Dairy Res.* 51: 141- 147.

Almeida M., Agnes H., Abraham A-L, Rasmussen S., Monnet C., Pons N., Delbès C., Loux V., Batto J-M, Leonard P., Kennedy S., Ehrlich S.D., Pop M., Montel M-C, Irlinger F. and Renault P., (2014). Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics* 2014 15:1101.

Alonso de Velasco E., Verheul A. F. M., Verhoeff J., Snippe H., (1995). *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. *Microbiological reviews*, Dec. 1995, Vol. 59, No. 4, p. 591–603.

- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D. J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 1997.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143–69.
- Anasthaswamy H. N., and Eigenstark A., (1977). Repair of hydrogen peroxide induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 130,187-191.
- Anifantakis E. M., (1991). *Greek Cheeses, a Tradition of Centuries*. National Dairy Committee of Greece, Athens, 27-42.
- Anifantakis E. M. & Moatsou G., (2006). Feta and Other Balkan Cheeses. In: *Brined cheeses*, (edr A. Y. Tamime), Blackwell Publishing Ltd, 43-76.
- Arizcun C., Barcina Y., Torre P., (1997). Identification of Lactic-Acid Bacteria isolated from Roncal and Idiazabal Cheeses. *Lait* 77:729-736.
- Asaduzzaman S. M., & Sonomoto K., (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(5), 475-487.
- Axelsson L.T., (1993). Lactic acid bacteria: Classification and physiology, in: *Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1, eds Seppo Salminen and Atte von Wright, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-63.
- Axelsson L.T., (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, third ed. Marcel Dekker, New York, pp. 1–66.
- Barnby-Smith F. M., (1992). Bacteriocins: their applications in food preservation. *Trends in Food Sci. Technol.*, 3, 133-137.
- Bauer R., Dicks L.M.T., (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 101 (2005) 201– 216.
- Bérdy J., (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* 2005, 58, 1–26.

- Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. & Cogan T. M., (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Beresford T. and Williams A., (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. In: Patrick F. Fox, Paul L.H., Mc Sweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, eds. *CHEESE. Chemistry, Physics and Microbiology*. (3rd edition) London: Elsevier Academic Press. pp 287- 317.
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Gueguen M., (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3) (2008), pp. 278–285
- Bhowmik, T., Marth, E.H., (1990). Esterases of *Micrococcus* species: identification and partial characterization. *J. Dairy Sci.* 73, 33– 40.
- Bhunja A. K., Johnson M. C and Ray, B., (1990). Antigenic properties of pediocin AcH. *J. Appi. Bacteriol.* 65, 261-268.
- Bierbaum G., Sahl H.-G., (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* 142, 249– 254.
- Bierbaum, G. & Sahl H. G., (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(1), 2-18.
- Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Davie. R. and Robinson R. K., 2000. Microbiology of brines used to mature feta cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 53, 106-112.
- Bockelmann W. and Hoppe Seyler T., (2001). The surface flora of bacterial smear ripened cheeses from cows and goats milk. *Int. Dairyj.*, 11: 307-314.
- Bockelmann W., Krusch U., Engel G., Klijn N., Smit G. and Heller KL., (1997). The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* 41: 208- 212.
- Bozoudi D., Kotzamanidis C., Hatzikamari M., Tzanetakis N., Menexes G., Litopoulou-Tzanetaki E., (2015). A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas, *International Journal of Food Microbiology* 200 (2015) 87–96.

- Casaburi A. , Di Martino V., Ferranti P., Picariello L., Villani F., (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control* 59 (2016) 31-45.
- Casey M. G., Hani J. P., Gruskovnjak J., Schaeren W. and Wechsler D., (2006). Characterization of the non- starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyere PDO cheese. *Lait* 86: 407- 414.
- Castellano P, Gonzalez C, Carduza F, Vignolo G., (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci.* 85:394 –401.
- Centeno J. A., Menendez S., Hermida M. & Rodriguez-Otero J. L., (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 97–111.
- Chatterjee C., Paul M., Xie L. & Van der Donk W. A., (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 633-684.
- Condon S., (1987). Responses of Lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 269-280.
- Cogan T. M., Barbosa M., Beuquier E., Bianchi- Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C. and Rodriguez E., (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 64, n. 3, p. 409-421.
- Cogan T. M., Beresford T.P., Steele J., Broadbent J., Shah N.P. and Ustunol Z., (2007). Invited Review: Advances in Starter Cultures and Cultured Foods. *J. Dairy Sci.* 90: 4005-4021.
- Coppola T.M., Parente J.E., Dumontet S., La Peccerella A., (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68, 295–310.
- Coughlan L.M., Cotter P.D., Hill C. and Alvarez- Ordóñez A., (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers Microbiology* 2015 Jun 30;6:672.
- Curk M-C, Hubert J-C, Bringel F., (1996). *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a New Species Related to *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (2): 595–598.

Daeschel M.A., (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 43, 164-166.

Davenport, R.R., (1980). Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms. In: Skinner, R.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R. (Eds.), *Biology and Activities of Yeasts*. Academic Press, London, UK, pp. 215–228.

Diaz-Sanchez S., Hanning I., Pendleton S. and D'Souza D., (2013). Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety. *Poult Sci.* 2013 Feb;92(2):562-72.

Didienne R., Defargues C., Callon C., Meylheuc T., Hulin S., Montel M-C., (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *Int J Food Microbiol.* 2012, 156: 91-101.

Dixon N. M. and Kell, D. B., (1989). A review. The inhibition by CO₂ of growth and metabolism of microorganisms. *J. of Appi. Bacteriol.*, 67, 109-136.

Dodd H. M., Horn N., and Gasson M. J., (1990). Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gener. Microbiol.*, 136, 555-556.

Doeven M.K., Kok J. and Poolman B., (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus Lactis* and other microorganism. *Mol Microbiol*, 57(3):640- 649.

Doulgeraki A., Nychas G, Panagou E., (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives, *LWT - Food Science and Technology* 50 (2013) 353–356.

Dorner, W., (1939). Recherches sur les bactéries propioniques. *Le Lait* 19, 897–918.

Gobbetti M., Fox P. F., Stepniak L., (1997). Isolation and characterization of a tributyrin esterase for *Lactobacillus plantarum*- 2739. *J. Dairy Sci.* 80: 3099- 3106.

Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F., (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4663–4671.

Ercolini D., (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: steps ahead in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl Environ Microbiol.* 2013 May; 79(10): 3148–3155.

Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T., (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3418– 3426.

Gevers D., Huys G., Swings J., (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205 (2001) 31-36.

Glück U. and Gebbers J-O, (2003). Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and β -hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr.* 2003 Feb;77(2):517-20.

Gu C.T., Li C.Y., Yang L.J., Chen S.L., Luo Z.L., (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama. *Anaerobe* 14 (2008) 313–317.

Gu C.T., Li C.Y., Yang L.J., Huo G.C., (2013). *Lactobacillus heilongjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4094–4099.

Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M., (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 1998; 5: R245–9.

Hansen E. B., (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.

Hardy K. G., (1975). Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* 39, 464-415.

Hécharde Y., & Sahl H. G., (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84(5), 545-557.

Hillier A. J. and Davidson B. E., (1991). Bacteriocins as food preservatives. *Food Research Quarterly* 51, 60-64.

Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. and Schillinger U., (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S- 373S.

Hurtado A., Othman N.B., Chammem N., Hamdi M., Ferrer S., Reguant C., Bordons A., Rozès N., (2011). Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiology* 28 (2011) 1514e1518.

Kandarakis I.G., Moschopoulou E.E., Moatsou G.A., Anifantakis E.M., (1998). Effect of starters on gross and microbiological composition and organoleptic characteristics of Graviera Kritis cheese. *Lait* 78, 557– 568.

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

Karageorgis S.B., Papageorgiou D.K., Fletouris D.J., Mantis A.I., Georgakis S.A., (2006). Isolation, identification and selection of mesophilic lactic acid bacteria from ripened traditional white brined cheeses.

Kaska S., Adamberg K., Orłowski A., Vogensen F.K., Møller P.L., Ardö Y., Paalme T., (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. Volume 36, Issues 9–10, 2003, Pages 1037–1046.

Kato I., Yokokura T., Mutai M., (1983). Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. *Microbiol Immunol* 1983;27:611–8.

Kelly W. J., Ward L. J. H. and Leahy S.C., (2010). Chromosomal Diversity in *Lactococcus lactis* and the Origin of Dairy Starter Cultures. *Genome Biol. Evol.* 2:729–744.

Kishi A., Uno K., Matsubara Y., Okuda C., Kishida T., (1996). Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, 15 (1996), pp. 408–412.

Klaenhammer T.R., (1988). Bacteriocins of Lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.

Korabecna M., (2007). "The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology." *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.*

Kullen M.J., Sanozky-Dawes R.B., Crowell D.C., Klaenhammer T.R., (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 2000, 89:511–516.

Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L. and Pace N.R., (1985). Rapid determination of 16S Ribosomal-Rna sequences for phylogenetic analyses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82,6955–6959.

Langille M.G., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J.A., (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat.Biotechnol.* 31, 2013, 814–821.

Langsrud T., Reinbold G. W., (1973). Flavor development and microbiology of Swiss cheese — a review III. Ripening and flavor production. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 593–609.

Law B. A., (1997). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Second edition. Blackie academic & professional. London, UK.

Law J., Haandrinkman A., (1997). Proteolytic- Enzymes of Lactic- Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* 7:1-11.

Litopoulou-Tzanetaki E., (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55, 111 – 113.

Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N., (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* 9:13-19.

Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. and Vafopoulou-Mastrojiannaki A., (1993). Effect of the type of lactic starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese.

Louws F.J., Rademaker J.L.W., De Bruijn F.J., (1999). The three DS of PCR- based genomic analysis of phytobacteria: Diversity detection, and disease diagnosis, *Annual Review of Phytopathology* 1999;37:81-125.

Lü X. , Hu P., Dang Y., Liu B., (2014). Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control* 43 (2014) 276e283.

Macedo, A.C., Malcata, F.X., Hogg, T.A., (1995). Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 1 –11.

MacMaoláin C., (2007). *EU Food Law: Protecting Consumers and Health in a Common Market*. First edition, Modern Studies in European Law.

Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., McSweeney P.L. H., Fox P. F., Lucey J. A., Jordan K. N., Cogan T. M., (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 3: 613- 634.

Mansour R., Alais C., (1973). Etude du salage et de l' affinage du fromage en saumure. III Aspect bacteriologique. *Lait* 53:137-145.

Marilley L. & Casey M. G., (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.

Marugg J.D., (1991). Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnology* 5, 305-312.

Matsuzaki T., Chin J., (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000;78:67–73.

McSweeney P.L.H., Sousa M.J., (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80: 293-324.

Meyer F., Paarmann D., D'Souza D., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J. & Edwards R.A., (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:386.

Meyer J. & Spahni A. (1998). Influence of X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyere cheese. *Milchwissenschaft* 53: 449–53.

Michels P.A.M., Michels J.P.J., Boonstra J., Konings W.N., (1979). Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiol. Lett.* 5:357-364.

Moatsou G., Massouras T., Kandarakis I., Anifantakis E., (2002). Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Lait* 82, 601–611.

Molimard P. and Spinnler H.E., (1996). Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169- 184.

Muller E. and F. Radler F., (1993). Caseicin, a Bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiol.* 38 (6), 441-446 (1993).

Nannen N.L., Hutkins R.W., (1991). Intracellular pH effects in Lactic - Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 74:741-746.

Nikolic M., López P., Strahinic I., Suárez A., Kojic M., Fernández-García M., Topisirovic L., Golic N., Ruas-Madiedo P., (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 158 (2012) 155–162.

Ordonez J.A., Barneto R., Ramos M., (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 33, 609– 612.

Ortiz de Apocana M.J., Selgas M.D., Ordonez J.A., (1993). Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Res. Int.* 26, 319–325.

Patton G. C. & Van der Donk W. A., (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current opinion in microbiology*, 8(5), 543-551.

Pavlidou S., Bozoudi D., Hatzikamari M., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., (2011). Differentiation of Lactococci from 2 Greek cheeses with protected designation of origin by phenotypic criteria and RAPD-PCR. *J. Food Sci.* 76, 175–183.

Pfeiler E. A., & Klaenhammer T.R., (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol*, 15, 546-53.

Piard J. C, Delorme F., Giraffa G., Commissaire J. and Desmazeaud M., (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk Dairy J.* 44, 143-158.

Piraino P., Zotta T., Ricciardia A., McSweeney P.L.H., Parente E. ,(2008). Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. *Int. Dairy J.* 18, 81–92.

Pitcher D. G., Saunders A. & Owe R. J., (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium Thiocyanate, *Letters in applied microbiology* 1989, 8, 151- 156.

Postma P. W., Lengeler J. W. & Jacobson G. R., (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), 543-594.

Pouillet B., Huertas M., Sanchez A., Caceres P., Larriba G., (1993). Main Lactic Acid Bacteria isolated during ripening of Casar-de-Caceres cheese. *J. Dairy Res.* 60:123-127.

Psoni L., Kotzamanidis C., Yiangou M., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., (2007). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 211–220.

Roller S., (1991). The biotechnological development of new food preservatives. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* 9, 183-206.

Rönkä E., Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M., Aarnikunnas J., Palva A., (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology* 83 (2003) 63 – 74.

Ross A. C. & Vederas J. C., (2011). Fundamental functionality: recent developments in understanding the structure–activity relationships of lantibiotic peptides. *The Journal of antibiotics*, 64(1), 27-34.

Sahl H-G., (1991). Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. In: Jung, G., Sahl H.-G., Jung G. (1991). *Nisin and Noval Lantibiotics*. ESCOM Science, Leiden, The Netherlands, pp. 347–358.

Salminen S. and von Wright A. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker Inc.

Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese, *International Journal of Food Microbiology* 76 (2002) 93– 105.

Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.

Schillinger U., (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. In *Biotechnology and Food Safety*, Edited by Bills D. D. and Kung, S. D. pp. 55-74. Butterworth-Heinemann, Boston.

Schröder J., Maus I., Trost E., Tauch A., (2011). Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics* 2011, 12:545.

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

Seiler H., Busse M., (1990). The yeasts of cheese brines. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 289–304.

Sjöling S., Cowan D., (2008). Metagenomics: microbial community genomes revealed. In *Psychrophiles from Biodivers to Biotechnol.* 2008:313–332.

Steele, J.L., (1995). Contribution of lactic acid bacteria to cheese ripening. In: Malin, E.L., Gibbs, M., Skinner, F.A. (Eds.), *Chemistry of Structure–Function Relationships in Cheese*. Academic Press, London, UK, pp. 65– 79.

Steffen C., Eberhard P., Bosset J. O., Rüeegg M., (1993). Swiss-type varieties. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, pp. 83–110.

Stiles M. E. and Hastings J. W., (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science and Technology* October Issue 247-251.

Stiles M.E. and Holzapfel W.H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.

- Stoyanova L. G., Ustyugova E. A., and Netrusov A. I., (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied biochemistry and microbiology*, 48(3), 229-243.
- Tannock G. W., (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 1, 53-64.
- Tagg J.R., Dajani A.S. and Wannamaker L.W., (1976). Bacteriocins of Gram- positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722- 756.
- Teixeira P., (2014). *Lactobacillus brevis*. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* 2014, Pages 418–424.
- Thollesson M., (1999). Phylogenetic analysis of *Euthyneura* (Gastropoda) by means of the 16S rDNA gene: use of a 'fast' gene for 'higher-level' phylogenies. *Proc. Royal. Soc. Lond. B* 266: pp.75-83.
- Tornadijo M.E., Fresno J.M., Bernardo A., Sarmiento M.R., Carballo J., (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait* 75, 551– 570.
- Torsvik V., Goksoyr J. and Daae F.L., (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56,782–787.
- Turnbaugh P.J., Gordon J.I., (2008). An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. *Cell*. 134, 708-713.
- Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., (1988). Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiol. Aliments Nutr.* 7:73-80.
- Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., (1995). The quality of white brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiol.* 12, 55–63.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Pp. 408-414. *Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium.*
- Van Hoorde K., Verstraete T., Vandamme P., Huys G., (2008). Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiol.* 25, 929–935.

- Viljoen B.C., (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 37–44.
- Wang Y.Z., Li Y.X., Xie J.M., Zhang Y., Wang J.L., Sun X.L., (2013). Protective effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang against endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury in rats via anti-oxidative and anti-inflammatory capacities. *International Immunopharmacology*, 15 (1) (2013), pp. 30–37.
- Widuri A. and Suryani L., (2013). Effect of probiotic *Lactobacillus casei* L. shirota strain in patients with allergic rhinitis symptoms *Allergy*, 68 (2013), p. 60.
- Wolfe B.E., Button J.E., Santarelli M., Dutton R.J., (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 2014 158:422–433.
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smit G., (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91–109.
- Wright G.D., (2012). Antibiotics: a new hope. *Chem. Biol.* 19, 3–10.
- Wu D. Hugenholtz P., Mavromatis K., Pukall R., Dalin E., Ivanova N.N., Kunin V., Goodwin L., Wu M., Tindall B.J., (2009). A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* 462, 1056–1060.
- Yakabe T., Moore E.L., Yokota S., Sui H., Nobuta Y., Fukao M., Palmer H., Yajima N., (2009). Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain. *Food Chem. Toxicol.*, 47 (2009), pp. 2450–2453.
- Yang S-C, Lin C-H, Sung CT and Fang J-Y, (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* 5:241.
- Zheng B., Jiang X., Cheng H., Xu Z., Li A. and Hu X., (2015). Complete genome sequence of *Lactobacillus heilongjiangensis* DSM 28069: Insight into its probiotic potential. *Journal of Biotechnology* 216 (2015) 65–66.
- Zygouris, M. P., (1952). *The dairy industry* (2nd ed.). Athens, Greece: Ministry of Agriculture

Ελληνική βιβλιογραφία

Ανυφαντάκης Ε. Μ., (1991). Η κατοχύρωση της Φέτας στην Ελλάδα και το εξωτερικό. Τρόφιμα και Ποτά (Σεπτέμβριος- Οκτώβριος) 1991: 114- 120.

Ανυφαντάκης Ε., (1998). Ελληνικά τυριά, Αθήνα: Εκδόσεις Κύτταρο.

Βουδούρης Ε., Δραϊνάς Κ., Ρούσσης Ι., Σαρρή Χ., (1986). Τελική αναφορά του προγράμματος "Μελέτη εξωκυτταρικών πρωτεολυτικών και λυπολυτικών ενζύμων από ψυχρότροφα βακτήρια και οι επιδράσεις τους στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Υπουργείο Έρευνας και Τεχνολογίας.

Δαγκαλίδης Α., (2014). Εξειδίκευση και Ανταγωνιστικότητα της Ελληνικής Γεωργίας, (1961-2011), κλαδική μελέτη, τράπεζα Πειραιώς

Ζυγούρης Ν., (1914). Οι Ελληνικοί Τύροι. Γεωργικόν και Δασικόν Δελτίον, τεύχος Δ', σελ 28, 1914.

Καραγεώργης Σ.Β., Παπαγεωργίου Δ.Κ., Φλετούρης Δ.Ι., Μάντης Α.Ι., Γεωργάκης Σ.Α., (2006). Απομόνωση, ταυτοποίηση και επιλογή μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων από ώριμα παραδοσιακά τυριά άλμης, Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος, τεύχος 1, 24.

Καραμήτρου- Μεντεσίδου Γ., (2007), Αρχαία διατροφή: ένα ταξίδι στην τέχνη της γαστρονομίας, έκδοση Αρχαιολογικού Μουσείου Αιανής, Αιανή.

Κυριακόπουλος Π. Ι., (1995). Η τυροκομία στην πράξη, Τρίαινα Εκδοτική, Αθήνα, 143-151.

Μπίντσης Θ., Παπαδήμας Φ., (2009). Τυρί, Εκδόσεις Ψύχαλος, Αθήνα, 85-106.

Παππας Α. και Καλατζόπουλος Γ., (2007) Η ιστορία της Ελληνικής Βιομηχανίας Γάλακτος, Αθήνα

Πετρίδου Ε., (2006). Τυρί και έθνος: Εθνικές διεκδικήσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση, κεφ. 3, σελ 140-158, Περιπέτειες της Εταιρότητας, Εκδόσεις Αλεξάνδρεια.

Νομοθεσίες

FDA, 2003. US Food and Drug Administration, Office of Regulatory Affairs: Compliance Policy Guides. Section 689.100 Direct-Fed Microbial Products (CPG 7126.41).

Γενικό Χημείο του Κράτους, 1988. ΦΕΚ, τεύχος Β, Νο 892, σελ 8400. Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα.

Εφημ. Κυβερνήσεως, τεύχος δεύτερο, αρ. φύλλου 8, ΦΕΚ 8/11.01.1994.

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.), Έκδοση της Διεύθυνσης Τροφίμων του Γενικού Χημείου του Κράτους (Γ.Χ.Κ.), 2009. Μέρος Α: Τρόφιμα και Ποτά. Άρθρο 83, Τυροκομικά προϊόντα.

Ιστοσελίδες

Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία <http://www.statistics.gr/el/statistics/agr>

ΕΛΟΓΑΚ:

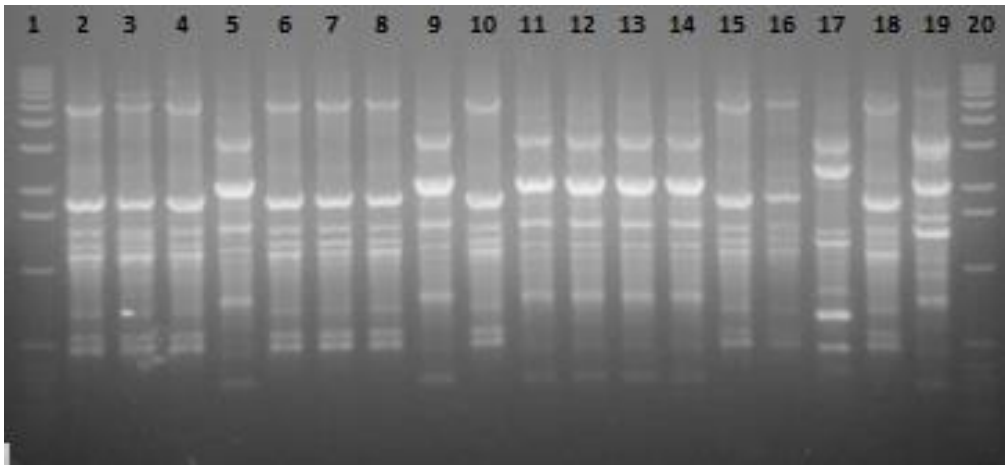
[http://www.elogak.gr/\(S\(hbjdgiq5kly1yyr4015ycxft\)\)/Elogak/anaforesAgeladino.aspx?pagenb=20854](http://www.elogak.gr/(S(hbjdgiq5kly1yyr4015ycxft))/Elogak/anaforesAgeladino.aspx?pagenb=20854)

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Δελτίο Τύπου, Βρυξέλλες 18/10/2012, http://europa.eu/rapid/press-release_IP-12-1116_en.htm

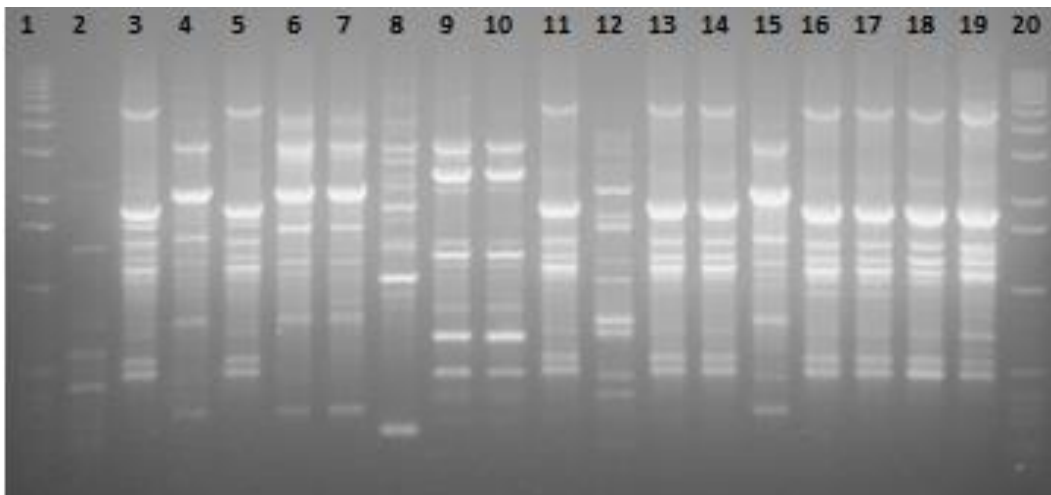
European Comision, Βρυξέλλες, 2008 http://europa.eu/rapid/press-release_IP-08-1489_el.htm

European Comision, Ceta <http://ec.europa.eu/trade/policy/in-focus/ceta/>

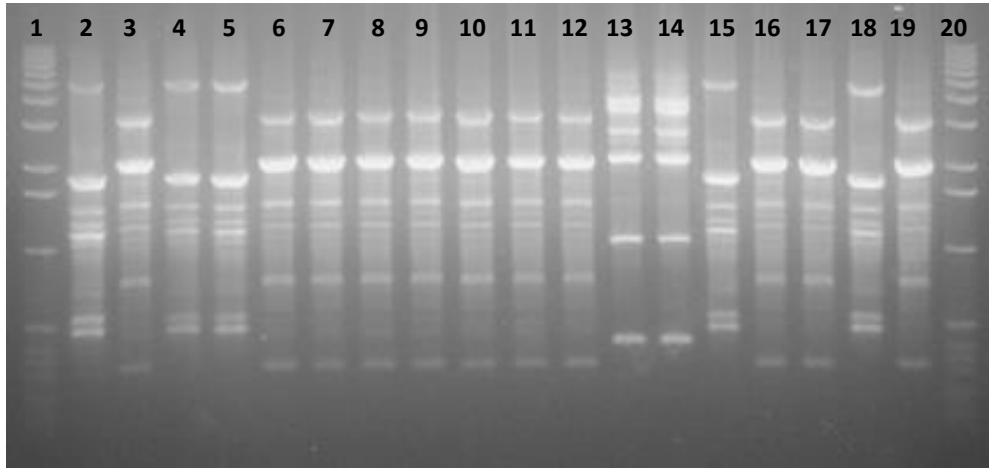
8. Παράρτημα



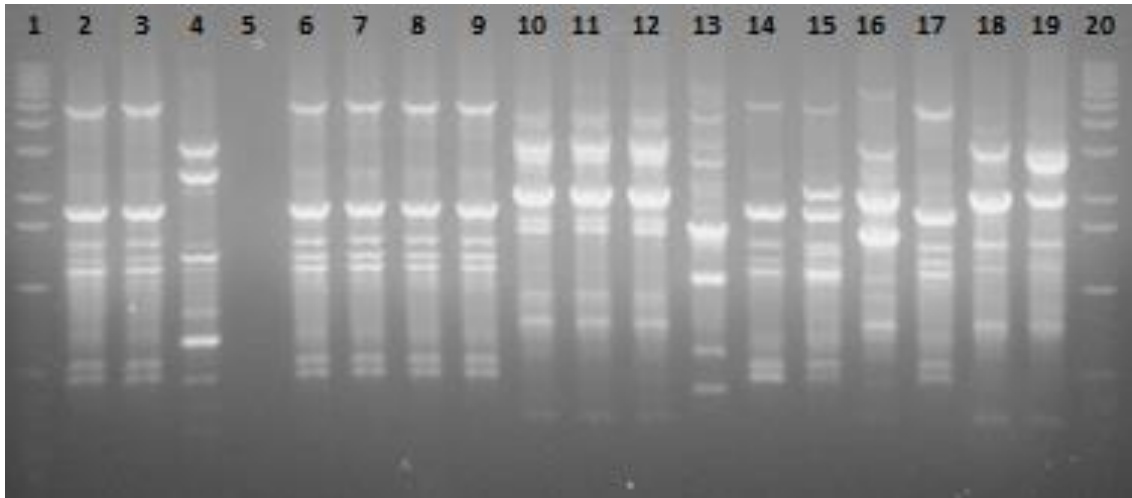
Εικόνα 7.1 Πηκτή αгарόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. Ab1a, 3. Ab2, 4. Ab3, 5. Kb1 6. Ab5, 7. Ab4a, 8. Kb5a, 9. Kb5b, 10. ATC1a, 11. Kb4a, 12. Kb4b, 13. Kb2a, 14. Kb2b, 15. Kb3a, 16. ATC3, 17. ATC6, 18. ATC1b, 19. ATC2a, 20. Marker



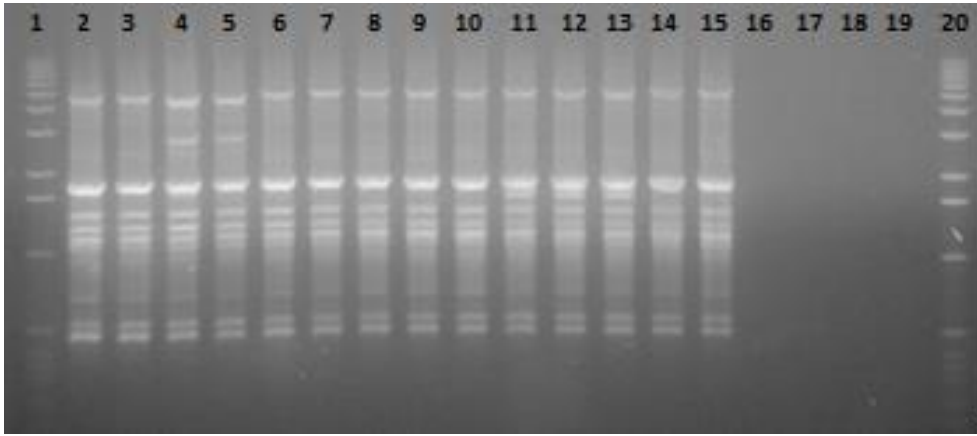
Εικόνα 7.2 Πηκτή αгарόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. ATB3a, 3. KTC1a, 4. KTC6, 5. AEN5b, 6. KEN2a, 7. KTC1b, 8. KEN2b, 9. KNS3a, 10. AEN2b, 11. ATB6γ*, 12. PRO9, 13. KTC5b, 14. ATC5, 15. KEN1, 16. ATB1*, 17. ATB2a*, 18. ATB3a*, 19. ATB3b*, 20. Marker.



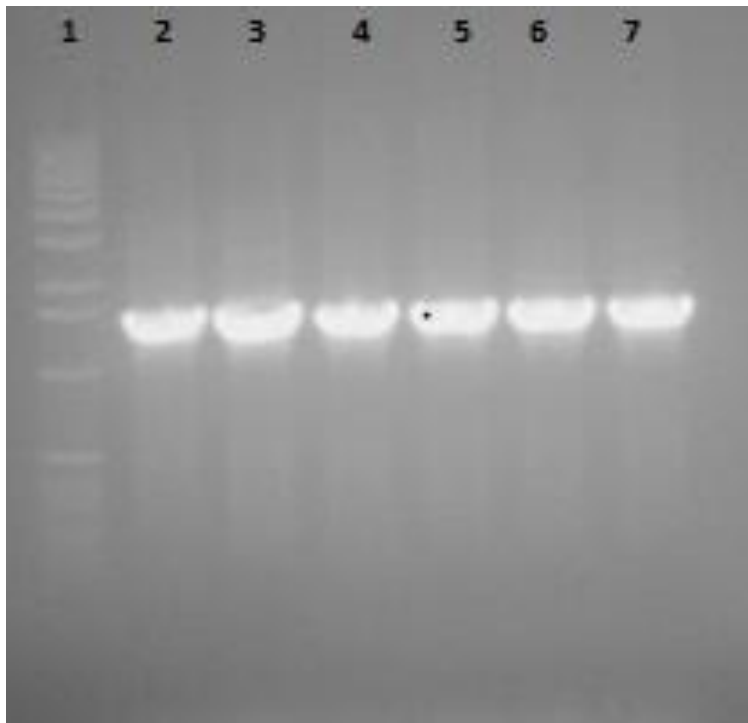
Εικόνα 7.3 Πηκτή αγαρόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. ATB4a*, 3. ANS3, 4. ATB6a*, 5. ATB6b*, 6. ANS6, 7. KTB5a, 8. KTB5b, 9. KTC2, 10. KNS6, 11. KEN3, 12. KTB4, 13. KNS5a, 14. KNS1a, 15. ATB5*, 16. ATB4, 17. Kb3b, 18. ATB2, 19. KNS2, 20. Marker



Εικόνα 7.3 Πηκτή αγαρόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. ANS1, 3. ATB3b, 4. KNS4, 5. , 6. KNS1b, 7. KNS5b, 8. ANS2, 9. ANS4, 10. PRO1, 11. PRO2a, 12. PRO2b, 13. PRO6, 14. ATC1c, 15. PRO11b, 16. ANS5, 17. AEN3, 18. KTC5a, 19. Kb1b, 20. Marker



Εικόνα 7.3 Πηκτή αγαρόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. PRO3, 3. PRO4a, 4. PRO4b, 5. PRO5, 6. PRO7, 7. PRO8, 8. PRO10, 9. PRO11a, 10. KTB3a, 11. KTB3b, 12. KTB6a, 13. KTB6b, 14. ATB1, 15. Ab2b, 16. -, 17. -, 18. -, 19. -, 20. Marker



Εικόνα 7.5 Πηκτή ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16s rDNA. 1. Marker (1 kb DNA Ladder Invitrogen), 2. KEN5, 3. PRO11b, 4. Kb2b, 5. PRO1, 6. KTC2, 7. KTC3