

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
"ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ  
ΚΕΦΙΡ"



ΜΑΡΙΑ Κ. ΣΥΡΟΚΟΥ  
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΧ ΔΡΟΣΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ**  
**ΚΕΦΙΡ"**

**ΜΑΡΙΑ Κ. ΣΥΡΟΚΟΥ**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΧ ΔΡΟΣΙΝΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2018**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ  
ΚΕΦΙΡ"**

**ΜΑΡΙΑ Κ. ΣΥΡΟΚΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΧ ΔΡΟΣΙΝΟΣ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΠΑΝΑΓΟΥ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΑΚΤΥΠΗΣ**

## Περίληψη

Το ρόφημα ζαχαρούχου κεφίρ παράγεται με ζύμωση διαλύματος ακατέργαστης ζάχαρης με κόκκους κεφίρ, με τους τελευταίους να αποτελούν μια συμβιωτική σχέση διαφορετικών μικροοργανισμών, κυρίως οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών και περιστασιακά βακτηρίων οξικού οξέος, προσκολλημένων σε ένα ελαστικό πλέγμα πολυσακχαρίτη, γνωστό ως κεφίράν. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά δείγματα κόκκων κεφίρ, μήλου, βύσσινου και νερού με ζάχαρη και δαμάσκηνα, τα οποία αποτελούσαν μικροβιακή συλλογή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, που αποτελούν το μικροοικοσύστημα του κεφίρ καθώς και η μελέτη των τεχνολογικών ιδιοτήτων, που σχετίζονται με την παραγωγή του, όπως η δυνατότητα πρωτεόλυσης, λιπόλυσης, το δυναμικό οξίνισης και η αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τέλος πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του ροφήματος κεφίρ σύμφωνα με παραδοσιακή μέθοδο, από τα στελέχη εκείνα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών, με τις καλύτερες ιδιότητες, κάτι που συνοδεύτηκε από πρότυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών επιτεύχθηκε με τη χρήση κλασικών τεχνικών (culture-dependent) και τεχνικών που δεν περιλαμβάνουν την καλλιέργεια τους (culture-independent). Στην πρώτη περίπτωση επιλέχθηκε η PCR-RAPD και η αλληλούχηση του DNA, ως πρότυπα μικροβιακής ταυτοποίησης, με τα είδη των ζυμών να ταυτοποιούνται ως *S. cerevisiae* και *K. marxianus* και αυτά των βακτηρίων ως *Lb. rhamnosus* και *B. amyloliquefaciens*. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε η PCR-DGGE, με άμεση εκχύλιση του RNA των ζυμών και των βακτηρίων, τόσο για την ανίχνευση μη καλλιεργήσιμων στελεχών όσο και για την επιβεβαίωση της παρουσίας των στελεχών εκείνων, που ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχησης, επιβεβαιώνοντας την παρουσία των *S. cerevisiae* και *K. marxianus* σε επίπεδο ζυμών, ενώ ηλεκτροφορητική κινητικότητα δεν παρουσιάστηκε σε επίπεδο βακτηρίων. Αναφορικά με τις ιδιότητες του ροφήματος κεφίρ, η πρωτεολυτική δραστηριότητα αξιολογήθηκε με δύο προσεγγίσεις, πρώτα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, όπου 13 στελέχη θετικά στη δοκιμή πρωτεολυτικής δράσης (9 ζύμες και 5 βακτήρια) ελέγχθηκαν και με δεύτερη μέθοδο, αυτή της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θειικό

νάτριο, χωρίς ωστόσο να επιβεβαιώνεται το παραπάνω πρωτεϊνικό προφίλ, συνιστώντας μερική καζεϊνολυτική δράση των στελεχών αυτών. Με τη χρήση δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε και ο έλεγχος της λιπολυτικής δράσης, με τα αποτελέσματα να είναι σε πλήρη συμφωνία μεταξύ τους και χαρακτηρίζοντας λιπολυτικά 40 και 45 στελέχη βακτηρίων και ζυμών, αντίστοιχα. Υψηλές τιμές οξίνισης εμφάνισαν τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus*, ενώ κανένα στέλεχος ούτε σε επίπεδο ζυμών ούτε σε αυτό των βακτηρίων δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria monocytogenes*. Όσο αφορά στην οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ που παρασκευάστηκαν, θετικά εκτιμήθηκαν εκείνα που παρήχθησαν από ενοφθαλμισμό πλήρους γάλακτος με τη μονοκαλλιέργεια LQC 2014 και τη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167, ενώ η απαρίθμηση των μικροβιακών αποικιών των ροφημάτων έδειξε την ύπαρξη των βακτηρίων κατά  $10^9$  και αυτή των ζυμών κατά  $10^8$  CFU/mL, αντίστοιχα, τόσο σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας όσο και συγκαλλιέργειας των δύο παραπάνω.

Λέξεις κλειδί: κεφίρ, ρόφημα, βακτήρια, ζύμες, πρωτεόλυση, λιπόλυση, αντιμικροβιακή δράση, οργανοληπτική αξιολόγηση.

## Abstract

Sugary kefir beverage is produced by fermenting a raw sugar solution with kefir grains, the latter consisting of a symbiotic consortium of different microorganisms, mainly lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, and occasionally acetic acid bacteria embedded into a resilient polysaccharide-protein matrix, named kefiran. Three different samples of kefir grains, apple, cherry, and water enriched with sugar and plums, were used in this study. The aim of this study was to identify the microorganisms constituting the microecosystem of traditional kefir as well as to study the technological properties associated with its production, such as proteolytic, lipolytic capability, acidification potential and antimicrobial activity against pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes*. Finally, the kefir beverage was produced according to a traditional method, from bacterial and yeast strains equipped with the most appropriate properties, which was accompanied by an organoleptic evaluation model. The microbial identification was achieved by using both culture-dependent and -independent techniques. In the first case, PCR-RAPD and DNA sequencing were selected as microbial identification models, with yeast species having been identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* and those of bacteria as *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus amyloliquefaciens*. As far as the culture-independent approach was concerned, PCR-DGGE was used, based on direct extraction of yeast and bacterial RNA, not only for the detection of non-cultivable strains, but also for confirming the presence of those species identified by sequencing. At yeast level, the presence of *S. cerevisiae* and *K. marxianus* was confirmed, whereas regarding the bacterial one, no electrophoretic mobility was performed. As for the properties of the microorganisms isolated, proteolytic activity was evaluated based on two approaches. Firstly, the method of Agar Well Diffusion Assay was performed, where 13 strains (9 yeasts and 5 lactic acid bacteria) exhibited proteolytic activity and were further tested by the second one, that of Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), suggesting a partial caseinolytic activity by these strains. The assessment of lipolytic activity was performed by a combined method of agar well diffusion assay and subsequent test of lipase secretion capability. As a result 40 bacterial and 45 yeast strains, accordingly, were characterized as lipolytic. LAB strains performed high acidification capability, while no antimicrobial activity was screened. As for the sensory evaluation of the

kefir beverages domestically produced, those produced by full fat milk inoculation with monoculture of *Lb rhamnosus* (strain LQC 2014) and co-culture of *Lb. rhamnosus* and *S. cerevisiae* (LQC strains 2014-10167) were positively evaluated and highly appreciated.

Key words: kefir, beverage, bacteria, yeasts, proteolytic, lipolytic and antimicrobial activity, sensory evaluation.

# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract .....	6
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Γενικά Στοιχεία .....	10
1.1.1 Κόκκοι κεφίρ γάλακτος.....	10
1.1.2 Κόκκοι ζαχαρούχου κεφίρ.....	12
1.2 Η ιστορία του κεφίρ.....	13
1.2.1 Λαϊκή παράδοση.....	13
1.2.2 Ιστορικά στοιχεία .....	14
1.3 Σύσταση των κόκκων κεφίρ .....	15
1.3.1 Μικροβιακή σύσταση.....	15
1.3.2 Χημική σύσταση.....	23
1.3.3 Κεφιράν .....	24
1.4 Μεταβολισμός των σακχάρων.....	26
1.4.1 Γαλακτική ζύμωση .....	26
1.4.2 Αλκοολική ζύμωση .....	28
1.5 Ιδιότητες των μικροοργανισμών του κεφίρ.....	30
1.5.1 Πρωτεόλυση .....	30
1.5.2 Λιπόλυση.....	33
1.5.3 Το κεφίρ ως πολύπλοκο προβιοτικό.....	34
1.6 Διατροφική αξία .....	39
1.7 Διαδικασία παραγωγής κεφίρ .....	40
1.7.1 Παραδοσιακή μέθοδος παρασκευής ροφήματος κεφίρ .....	40
1.7.2 Βιομηχανική μέθοδος παρασκευής ροφήματος κεφίρ.....	41
1.7.3 Βιομηχανική μέθοδος παρασκευής ζαχαρούχου ροφήματος κεφίρ .....	42
1.8 Μέθοδοι μελέτης των μικροοργανισμών.....	43
1.8.1 Κλασικές Μέθοδοι.....	44
1.8.2 Μη κλασικές μέθοδοι .....	47
Σκοπός.....	52
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	53
2.1 Δείγματα κόκκων κεφίρ .....	53
2.2 Πειραματική Διαδικασία .....	53

2.2.1	Κλασικές Μέθοδοι.....	53
2.2.2	Μη κλασικές Μέθοδοι.....	62
2.2.3	Ιδιότητες της μεταβολικής δραστηριότητας του κεφίρ .....	66
2.2.4	Οικιακή παρασκευή ροφήματος κεφίρ .....	71
2.2.5	Οργανοληπτική αξιολόγηση του ροφήματος κεφίρ .....	72
3.	Αποτελέσματα .....	73
3.1	Κλασικές Μέθοδοι.....	73
3.1.1	Μικροβιακή Απαρίθμηση.....	73
3.1.3	Ταυτοποίηση.....	73
3.2	Μη κλασικές Μέθοδοι.....	80
3.3	Ιδιότητες της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών του κεφίρ.....	82
3.3.1	Πρωτεόλυση .....	82
3.3.2	Λιπόλυση.....	84
3.3.3	Οξίνιση .....	89
3.3.4	Αντιμικροβιακή δράση έναντι της <i>Listeria monocytogenes</i> .....	91
3.4	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ροφήματος κεφίρ.....	91
3.5	Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	96
4.	Συζήτηση .....	128
4.1	Κλασικές Μέθοδοι.....	128
4.1.1	Ανάλυση με PCR-RAPD.....	128
4.2	Μη κλασικές Μέθοδοι.....	136
4.2.1	Ανάλυση με PCR-DGGE .....	136
4.3	Ιδιότητες της μεταβολικής δραστηριότητας του κεφίρ .....	138
4.3.1	Πρωτεόλυση .....	138
4.3.2	Λιπόλυση.....	143
4.3.3	Αντιμικροβιακή δράση έναντι της <i>Listeria monocytogenes</i> .....	146
4.4	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ροφήματος κεφίρ.....	147
5.	Βιβλιογραφία.....	149
	Παράρτημα Ι.....	166
	Παράρτημα ΙΙ .....	169

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γενικά Στοιχεία

Το κεφίρ είναι ένα παραδοσιακό ζυμούμενο ρόφημα γάλακτος που προέρχεται από τις περιοχές του Καυκάσου και της Ανατολίας. Ο όρος προέρχεται από τη λέξη kef, που σημαίνει «ευχάριστη γεύση» στα τουρκικά, ενώ είναι ευρέως γνωστό ως kefir, kephir, kefer, kiaphur, knaron, keri ή kirpi. Πρόκειται για το πλέον δημοφιλές προϊόν ζύμωσης του γάλακτος στη Ρωσία, με την ετήσια παραγωγή να ξεπερνά τους 10<sup>6</sup>τόνους, ενώ παράγεται σε μικρότερες αλλά διαρκώς αυξανόμενες ποσότητες σε Γερμανία, Φινλανδία, Τσεχία, Πολωνία, και Σουηδία (Koroleva, 1988).

Το ρόφημα κεφίρ αντιπροσωπεύει ένα αυτο-ανθρακούχο γαλακτοκομικό προϊόν με ελαφρώς όξινη γεύση, άρωμα μαγιάς, κρεμώδη υφή και χαμηλό ποσοστό αλκοόλης (Farnworth, 2005, Vardjan, 2013). Παρασκευάζεται είτε από κόκκους κεφίρ είτε από μητρικές καλλιέργειες που απομονώνονται από κόκκους κεφίρ (εικόνα 1).

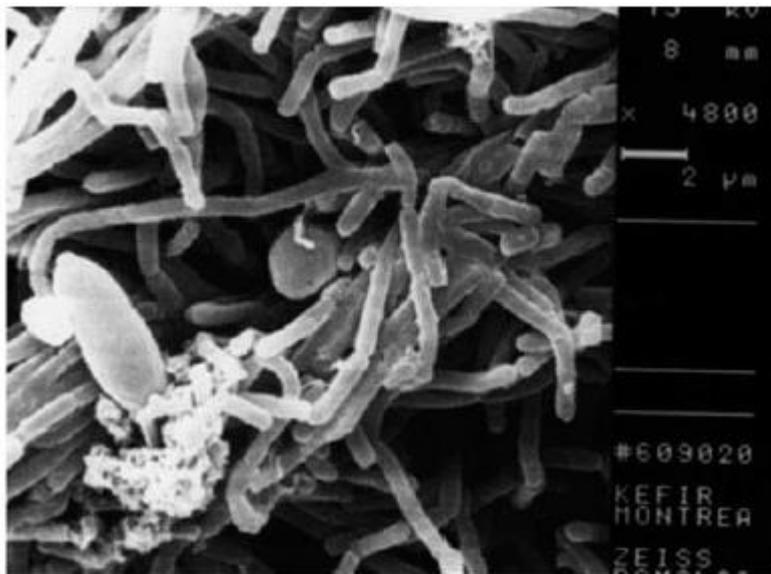
### 1.1.1 Κόκκοι κεφίρ γάλακτος

Οι κόκκοι κεφίρ γάλακτος είναι μικροί, σκληροί, ζελατινώδεις, ακανόνιστου μεγέθους, κιτρινωποί-λευκοί με διάμετρο από 3 έως 35 mm κι έχουν εμφάνιση μικροσκοπικών κουνουπιδιών. Η εικόνα 2 αποτελεί μια ηλεκτρονική μικρογραφία των κόκκων κεφίρ. Συντίθενται από ένα μικροβιακό συμβιωτικό μίγμα οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $10^8$  CFU/g), ζυμών ( $10^6$ - $10^7$  CFU/g) και βακτηρίων οξικού οξέος ( $10^5$  CFU/g), προσκολλημένων σε ένα ελαστικό πλέγμα πολυσακχαρίτη που ονομάζεται κεφίραν (Garrote και συν., 2010, Chen και συν., 2015, Prado και συν., 2015). Η βέλτιστη θερμοκρασία συντήρησης των κόκκων είναι αυτή των  $-20^{\circ}\text{C}$ , ενώ έχει διαπιστωθεί ότι οι κόκκοι που συντηρούνται στους  $4^{\circ}\text{C}$  χάνουν την ικανότητα παραγωγής κάποιων απαραίτητων συστατικών για τη σύνθεση του πλέγματός τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ελάχιστα το βάρος τους. Συντήρηση των κόκκων σ' αυτή τη θερμοκρασία προκαλεί επίσης ελάττωση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών, όταν οι κόκκοι προστίθενται στο γάλα (Garrote και συν., 1997).

Τυπικά το ρόφημα κεφίρ παρασκευάζεται με τον πολλαπλασιασμό των κόκκων κεφίρ σε γάλα στους  $20$ - $25^{\circ}\text{C}$ , όπου σημειώνεται αύξηση της βιομάζας τους κατά  $5$ - $7\%$  μετά από  $24$  h (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990, Kalamaki & Angelidis, 2016).



Εικόνα 1: Τυπική εμφάνιση κόκκων κεφίρ (Ahmed και συν., 2013).



Εικόνα 2: Ηλεκτρονική μικρογραφία κόκκων κεφίρ (Ahmed και συν., 2013).

Οι FAO / WHO, (2001) πρότειναν έναν ορισμό για το κεφίρ, με βάση τη μικροβιακή σύνθεση και των δύο κόκκων κεφίρ (της εναρκτήριας καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κεφίρ) και του τελικού προϊόντος κεφίρ, που αποτυπώνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Περιγραφή του κεφίρ βάσει Codex Alimentarius.

**Εναρκτήρια καλλιέργεια**

Η εναρκτήρια καλλιέργεια έχει απομονωθεί από κόκκους κεφίρ, *Lactobacillus kefir*, είδη του γένους *Leuconostoc*, *Lactococcus* και *Acetobacter*, που αναπτύσσονται δημιουργώντας ισχυρούς δεσμούς μεταξύ τους.

Οι κόκκοι κεφίρ αποτελούνται τόσο από ζύμες, ικανές να καταβολίζουν λακτόζη (*Kluyveromyces marxianus*) όσο και από εκείνες, που δεν καταβολίζουν λακτόζη (*Saccharomyces unisporus*,

*Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces exiguus*).

#### Σύσταση

Πρωτεΐνη γάλακτος	(% w/w)	Ελάχιστο 2.7
Λίπος γάλακτος	(% m/m)	< 10
Τιτλοδοτούμενη οξύτητα, που εκφράζεται ως % περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ	(% m/m)	Ελάχιστο 0.6
Αιθανόλη	(% vol./ w)	Δεν έχει δηλωθεί
Σύνολο μικροοργανισμών που αποτελούν την αρχική καλλιέργεια (cfu/g συνολικά)		Ελάχιστο 10 <sup>7</sup>
Ζύμες	(cfu/g)	Ελάχιστο 10 <sup>4</sup>

### 1.1.2 Κόκκοι ζαχαρούχου κεφίρ

Ωστόσο, υπάρχει ένα άλλο ρόφημα, που παρασκευάζεται από ζάχαρη και νερό, με προσθήκη σύκων και λεμονιού, των οποίων η ζύμωση προκαλείται από κόκκους διαφορετικού τύπου, οι οποίοι είναι διαφανείς, κολλώδεις και λιγότερο ανθεκτικοί. Στους κόκκους αυτούς έχουν αποδοθεί διάφορα ονόματα όπως οι μέλισσες της Καλιφόρνιας, οι κόκκοι Tibis ή το σύμπλεγμα Tibi (Fiorda και συν., 2017).

Οι κόκκοι Tibis είναι γνωστό ότι προέρχονται από έναν μεξικανικό κάκτο (*Opuntia*) του οποίου αφαιρέθηκαν τα φύλλα. Ωστόσο, η αβεβαιότητα παραμένει για την προέλευση των άλλων κόκκων. Οι κόκκοι κεφίρ έχουν συνδεθεί με το φυτό τζίντζερ, που έφεραν οι Άγγλοι στρατιώτες από τον πόλεμο της Κριμαίας το 1855. Στη Γαλλία, ο Vayssier 1978, ήταν ο πρώτος που ονόμασε τους κόκκους αυτούς, "κόκκοι ζαχαρούχου κεφίρ" προκειμένου να τους διαφοροποιήσει από εκείνους του ζυμούμενου γάλακτος.

Οι κόκκοι ζαχαρούχου κεφίρ ή κεφίρ νερού, όπως αποκαλούνται, είναι παρόμοιοι με τους κόκκους κεφίρ γάλακτος όσον αφορά στη δομή τους, τους συναφείς μικροοργανισμούς και τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, αν και χωρίς τη χαρακτηριστική εμφάνιση του κουνουπιδιού. Ωστόσο, η σύνθεση και η συχνότητα των μικροβιακών ειδών και η συγκέντρωση των τελικών βιοπροϊόντων ποικίλλουν ανάλογα με τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας για τη ζύμωση των κόκκων.

Το ζαχαρούχο κεφίρ ή κεφίρ νερού, συνιστά ένα οικιακό ρόφημα που έχει υποστεί ζύμωση και βασίζεται σε ένα διάλυμα σακχαρόζης με ή χωρίς εκχυλίσματα φρούτων,

ενώ ο πολλαπλασιασμός των κόκκων, στηρίζεται στην ημερήσια μεταφορά τους σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα επιτραπέζιου νερού-ζάχαρης (60 g/ λίτρο).

## **1.2 Η ιστορία του κεφίρ**

### **1.2.1 Λαϊκή παράδοση**

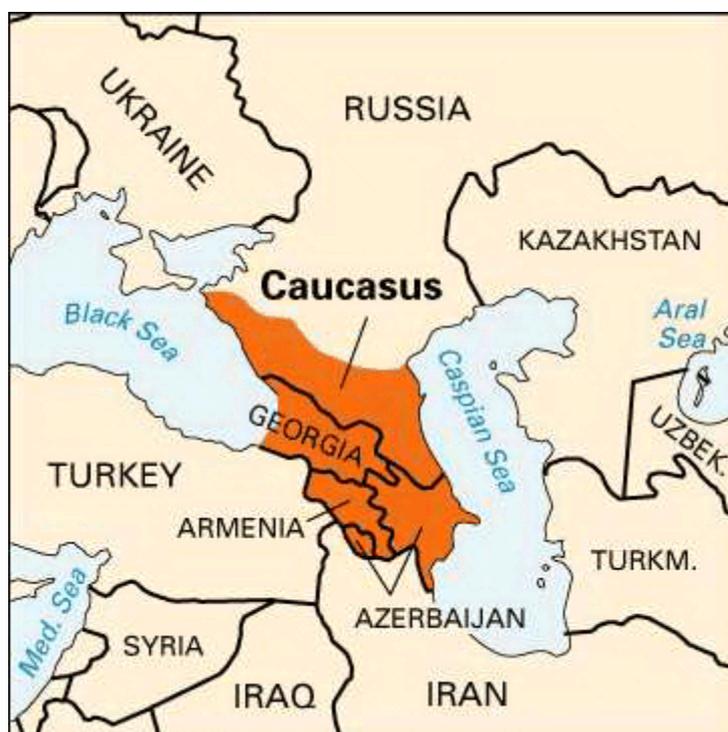
Σύμφωνα με τη μυθολογία, ο Μωάμεθ ήταν αυτός που έδωσε τη συνταγή παρασκευής του ροφήματος κεφίρ στους ισλαμιστές, υπό τον όρο να μην διαρρεύσει στους αλλόθρησκους πληθυσμούς, γιατί τότε θα έχανε τη δύναμη για την οποία χαρακτηριζόταν. Ουσιαστικά οι γηγενείς λαοί του Καυκάσου και της Ανατολίας αυτό που έκαναν, ήταν μετά τη συλλογή του αγελαδινού ή κατσικίσιου γάλακτος, να το μεταφέρουν σε δερμάτινους ασκούς και δρύινα βαρέλια. Κάτι τέτοιο είχε σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μιας σειράς αναταράξεων, στη συνέχεια τη ζύμωση μέσα στους περιέκτες και τέλος το σχηματισμό μικρών αδιάλυτων κόκκων στο νερό, οι οποίοι έμειναν γνωστοί ως "κόκκοι κεφίρ" ή "δώρο των Θεών". Το μυστικό αυτό πέρασε από γενιά σε γενιά και το γάλα κεφίρ μεταφερόταν όχι μόνο σε δερμάτινους σάκους αλλά και σε πήλινα αγγεία καθώς και σε ξύλινους κουβάδες από βελανιδιά. Παράξενες ιστορίες είχαν εξαπλωθεί γύρω από το ασυνήθιστο ρόφημα με τις μαγικές ιδιότητες, με τον ίδιο το Μάρκο Πόλο να κάνει αναφορά για το κεφίρ στα ταξίδια του στην Ανατολή.

Η λαϊκή παράδοση επίσης αναφέρει ότι Ρώσοι γιατροί, στις αρχές του 1900, πεπεισμένοι για τις θεραπευτικές ιδιότητες του κεφίρ, προσέγγισαν τα αδέρφια Blandon, τα οποία διατηρούσαν γαλακτοβιομηχανίες στην πόλη Kislovodsk, έτσι ώστε να παρασκευάσουν γάλα από κόκκους κεφίρ. Προκειμένου να προμηθευτούν τους κόκκους κεφίρ, τα αδέρφια έστειλαν μια ευπαρουσίαστη υπάλληλό τους, την Irina Sakharova, στην αυλή του τοπικού ηγεμόνα Bek-Mirza Barchorov, για να τον γοητεύσει και να της παραχωρήσει ένα μέρος των κόκκων. Ωστόσο ο ηγεμόνας φοβούμενος για τις επιπτώσεις που θα είχε η παραβίαση του θρησκευτικού νόμου, δεν παραχώρησε τους κόκκους κεφίρ, κάτι το οποίο οδήγησε στην επιστροφή της Irina στη βάση της. Στο δρόμο της επιστροφής ο ηγεμόνας, ο οποίος είχε γοητευτεί από την Irina, διέταξε την απαγωγή της, ωστόσο σύντομα ήρθε ενώπιον του Τσάρου, ο οποίος έκρινε ότι έπρεπε να παραχωρήσει μια υπέρογκη ποσότητα κόκκων κεφίρ στην Irina, για τις προσβολές που είχε δεχτεί. Το Σεπτέμβρη του 1908, τα αδέρφια

Blandon είχαν στα χέρια τους, τους κόκκους κεφίρ κι έτσι ξεκίνησε η παραγωγή και η διάθεσή τους στη Μόσχα.

### 1.2.2 Ιστορικά στοιχεία

Μια πιο αποδεκτή θεώρηση της ιστορίας υποστηρίζει ότι το ζυμούμενο γαλακτοκομικό αυτό ρόφημα ανακαλύφθηκε πιθανότατα πριν από περισσότερα από χίλια χρόνια, από τους βοσκούς των Καυκάσιων Όρων, οι οποίοι κατά λάθος ζύμωναν το γάλα μέσα στους δερμάτινους σάκους τους. Το φρέσκο γάλα μετατράπηκε σε ένα αναβράζον ρόφημα, το οποίο αργότερα συνδέθηκε με πολλά οφέλη για την υγεία.



Εικόνα 3: Χάρτης με τη γεωγραφική τοποθεσία του Καυκάσου (<http://www.yourkefirsource.com/kefir/#more-1703>).

Παρακάτω παρουσιάζεται η εικόνα ενός κοριτσιού στην πόλη Karachayevsk ή Karachay στη Ρωσία, που καλωσορίζει τους επισκέπτες με ένα φλιτζάνι κεφίρ. Το Karachay είναι στην πραγματικότητα μια περιοχή του Καυκάσου κοντά στο όρος Elbrus, όπου προέκυψε κεφίρ.



Εικόνα 4: Κορίτσι στην πόλη Karachay, που καλωσορίζει τους επισκέπτες (<http://www.yourkefirsource.com/kefir/#more-1703>).

### 1.3 Σύσταση των κόκκων κεφίρ

#### 1.3.1 Μικροβιακή σύσταση

Ο μικροβιακός πληθυσμός, που έχει ταυτοποιηθεί σε κόκκους κεφίρ, αποτελεί ένα παράδειγμα συμβιωτικής σχέσης, με τους γαλακτοβάκιλλους να αποτελούν το 65-80% (Wouters και συν., 2002, Arslan, 2015), και τους λακτόκοκκους και τις ζύμες να αποτελούν το υπόλοιπο. Μάλιστα η σύνθεση του πληθυσμού μπορεί να διαφέρει, τόσο λόγω προέλευσης των κόκκων, όσο και λόγω διαφορετικής κάθε φορά μεθόδου καλλιέργειας του υποστρώματος (Wang και συν., 2004, Arslan, 2015).

Ο Sarkar (2008), διαπίστωσε ότι η κατανομή των μικροοργανισμών στους κόκκους κεφίρ δεν είναι ομοιόμορφη. Σε σχετική μελέτη που έκανε, ανέφερε την επικράτηση ραβδόμορφων οξυγαλακτικών βακτηρίων στο εξωτερικό τμήμα του κόκκου, σε συνδυασμό με την παρουσία ζυμών στον πυρήνα, την ισορροπία βακτηρίων και ζυμών στην ενδιάμεση ζώνη μαζί με μια προοδευτική αλλαγή ανάλογα με την απόσταση από τον πυρήνα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τα προϊόντα του μεταβολισμού τους. Ομοζυμωτικά ονομάζονται τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία μέσω της γλυκόλυσης παράγουν 2 μόρια γαλακτικού οξέος για κάθε μόριο μονοσακχαρίτη, ενώ ετεροζυμωτικά ονομάζονται τα βακτήρια, τα οποία μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών παράγουν γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO<sub>2</sub>.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα μικροοργανισμών των κόκκων κεφίρ με αυτά του γένους *Lactobacillus* να κυριαρχούν στην ολική μικροχλωρίδα. Μερικά είδη LAB που έχουν απομονωθεί κατά καιρούς συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Αναφορικά με τις ζύμες, που βρίσκονται σε κόκκους κεφίρ, ταξινομούνται σε αυτές που καταβολίζουν τη λακτόζη και σε αυτές που δεν είναι ικανές να καταβολίζουν τη λακτόζη. Μάλιστα έχει αναγνωριστεί ότι παίζουν καταλυτικό ρόλο στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου παρέχουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως αμινοξέα και βιταμίνες, αλλάζουν το pH, εκκρίνουν αιθανόλη και παράγουν CO<sub>2</sub>. Αντιπροσωπεύουν το 5-10 % του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού των κόκκων. Μάλιστα παρά το γεγονός ότι οι ζύμες των κόκκων κεφίρ δημιουργούν ένα περιβάλλον φιλικό ως προς την ανάπτυξη βακτηρίων κεφίρ, παράγοντας μεταβολίτες που συμβάλλουν στη γεύση και την αίσθηση στο στόμα, είναι λιγότερο καλά μελετημένες από τα βακτήρια (Clementi και συν., 1989, Kwak και συν., 1996, Simona και συν., 2002, Farnworth, 2005). Ορισμένες από τις ζύμες που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε κόκκους κεφίρ συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Οι Prado και συν., (2015) ανέφεραν την αριθμητική επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (10<sup>8</sup> CFU/ g) έναντι των ζυμών (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/ g) και των οξικών βακτηρίων (10<sup>5</sup> CFU/ g) σε κόκκους κεφίρ, λαμβάνονταν υπόψη ότι οι συνθήκες ζύμωσης μπορεί να επηρεάσουν την υπάρχουσα κατάσταση.

**Πίνακας 2: Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν σε ζαχαρούχο κεφίρ & κεφίρ γάλακτος (Fiorda και συν., 2017).**

Κατηγορία Μικροοργανισμού	Γένος	Ζαχαρούχο Κεφίρ	Κεφίρ Γάλακτος	Αναφορές
Βακτήρια	<i>Acetobacter</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> .	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. aceti</i> , <i>A. rasens</i> .	Magalhães και συν., 2010, Gulitz και συν., 2011, 2013, Garofalo και συν., 2015, Laureys και συν., 2016.
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lb. diolivorans</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. harbinensis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. hordeii</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. lactis</i> ,	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. otakiensis</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> ,	Moinas και συν., 1980, Garrote και συν., 2001, Simona και συν., 2002, Witthuhn και συν., 2005, Chen και συν., 2008, Magalhães και συν., 2010, Sabir και συν., 2010, Gulitz και συν., 2011, Kesmen & Kacmaz, 2011, Gulitz και συν., 2013, Garofalo και συν., 2015; Zanirati και συν., 2015, Fiorda

		<i>Lb. mali</i> , <i>Lb. nagelli</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. parafarraginis</i> , <i>Lb. perolens</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. satsumensis</i> .	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. sunkii</i> .	και συν., 2016, Laureys και συν., 2016.
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. citreum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> .	Garrote και συν., 2001, Magalhães και συν., 2010, Sabir και συν., 2010, Waldherr και συν., 2010, Gulitz και συν., 2011, Kesmen & Kacmaz, 2011, Gulitz και συν., 2013, Fiorda και συν., 2016.
	<i>Lactococcus</i>	<i>nd.</i>	<i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> .	Yüksekdağ και συν., 2004, Sabir και συν., 2010, Kesmen & Kacmaz, 2011, Magalhães και συν., 2011, Garofalo και συν., 2015.
	<i>Pediococcus</i>	<i>nd.</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. pentosaceus</i> .	Sabir και συν., 2010.
	<i>Streptococcus</i>	<i>nd.</i>	<i>S. durans</i> , <i>S. thermophilus</i> .	Simova και συν., 2002, Yüksekdağ και συν., 2004, Chen και συν., 2008, Kesmen & Kacmaz, 2011, Garofalo και συν., 2015.
	Άλλα είδη	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Kitaharaea</i> , <i>Bifidobacterium psychrophilum</i> .	<i>nd.</i>	Gulitz και συν., 2013, Zanirati και συν., 2015, Fiorda και συν., 2016.
Ζύμες	<i>Candida</i>	<i>nd.</i>	<i>C. inconspicua</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lambica</i> , <i>C. maris</i> , <i>C. humilis</i> .	Simova και συν., 2002, Witthuhn και συν., 2005, Garofalo και συν., 2015.
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. turicensis</i> .	Simova και συν., 2002, Wang και συν., 2008, Magalhães και συν., 2010, Puerari και συν., 2012, Gulitz και συν., 2013, Garofalo και συν., 2015, Fiorda και συν., 2016, Laureys και συν., 2016.
	<i>Pichia</i>	<i>P. membranifaciens</i> , <i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. fermentans</i> .	Wang και συν., 2008, Fiorda και συν., 2016.
	<i>Lanchancea</i>	<i>L. fermentati</i> , <i>L. meyericii</i> .	<i>L. meyericii</i> .	Magalhães και συν., 2010, 2011, Gulitz και συν., 2011, Fiorda και συν., 2016.
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i> ,	<i>K. lactis</i> .	Garrote και συν., 2001,

		<i>K. marxianus.</i>		Wang και συν., 2008, Magalhães και συν., 2010, 2011, Puerari και συν., 2012.
	<i>Kazachstania</i>	<i>K. aerobia,</i> <i>K. unispora.</i>	<i>K. unispora,</i> <i>K. servazzii,</i> <i>K. aerobia,</i> <i>K. solicola.</i>	Magalhães και συν., 2010, Puerari και συν., 2012, Garofalo και συν., 2015.
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. valbyensis,</i> <i>H. uvarum.</i>	<i>H. guillermondi.</i>	Gulitz και συν., 2011, Garofalo και συν., 2015, Fiorda και συν., 2016.
	Άλλα είδη	<i>Zygorulasporea florentina,</i> <i>Issatchenkia orientalis,</i> <i>Zygosaccharomyces fermentati,</i> <i>Dekkera bruxellensis.</i>	<i>Cryptococcus humicolus,</i> <i>Geotrichum candidium,</i> <i>Zygosaccharomyces fermentati.</i>	Witthuhn και συν., 2005, Gulitz και συν., 2011, Fiorda και συν., 2016, Laureys και συν., 2016.

### 1.3.1.1 Ιδιότητες κυτταρικών επιφανειών οξυγαλακτικών βακτηρίων & ζυμών

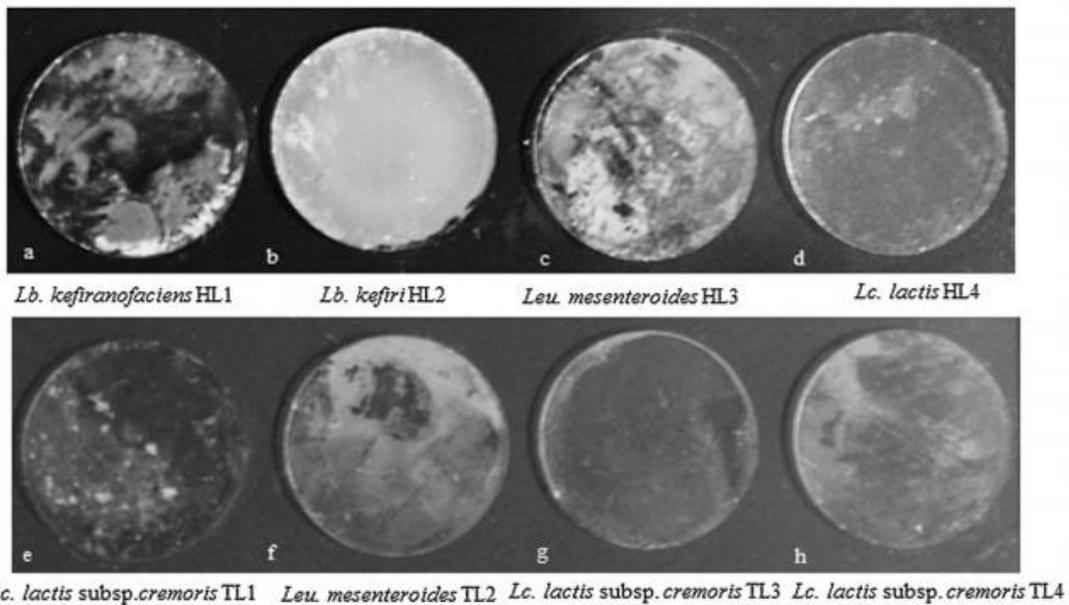
Οι Tang και συν., (2009) έδειξαν ότι η υδροφοβικότητα και το φορτίο είναι οι μόνες μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και επιφάνειας, ενώ αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τον προσδιορισμό της δυνατότητας προσκόλλησης των βακτηρίων σε μια επιφάνεια. Προηγούμενες μελέτες πάνω στη φυσικοχημεία των επιφανειών μικροβιακών κυττάρων έδειξαν ότι ενώ η υδρόφιλη επιφάνεια συνδέεται με την παρουσία πολυσακχαριτών, η παρουσία πρωτεϊνικού υλικού στην κυτταρική επιφάνεια έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη υδροφοβικότητα,. Παρόμοιες έρευνες έδειξαν ότι η αύξηση της υδροφοβικότητας και η εξασφάλιση ενός αρνητικού επιφανειακού φορτίου, θα μπορούσε να αποτρέψει τη μικροβιακή προσκόλληση στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ σύμφωνα με τους Vacheethasane και συν., (1998) η υδροφοβικότητα και το φορτίο δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην προσκόλληση. Η ανάλυση υδροφοβικότητας των κυτταρικών επιφανειών 8 στελεχών LAB (*Lb. kefiranofaciens* HL1, *Lb. kefir* HL2, *Lc. mesenteroides* HL3 και *Lc. lactis* HL4, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TL1, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TL2, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TL3 και *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TL4) έδειξε ότι τα περισσότερα ήταν υδρόφιλα με αρνητικό φορτίο στην κυτταρική τους επιφάνεια (Wang και συν., 2012). Εξαίρεση αποτέλεσαν τα στελέχη *Lb. kefiranofaciens* HL1 και *Lb. kefir* HL2, τα οποία χαρακτηρίζονταν από υψηλή υδροφοβικότητα κι εμφάνισαν θετικό φορτίο κυτταρικής επιφάνειας σε pH 4.2, αλλά αρνητικό φορτίο σε pH 6.2. Όσο αφορά στις

ζύμες στο κεφίρ (*K. marxianus* HY1, *S. turicensis* HY2 και *P. fermentans* HY3, *K. marxianus* TY1, *S. unisporus* TY2 και *P. fermentans* TY3), τα τρία πρώτα στελέχη ζυμών μαζί με αυτό του *P. fermentans* TY3 ήταν υδρόφοβα, ενώ τα στελέχη εκείνα των *K. marxianus* HY1 και *K. marxianus* TY1 συνοδεύονταν από αρνητικό φορτίο στην κυτταρική τους επιφάνεια.

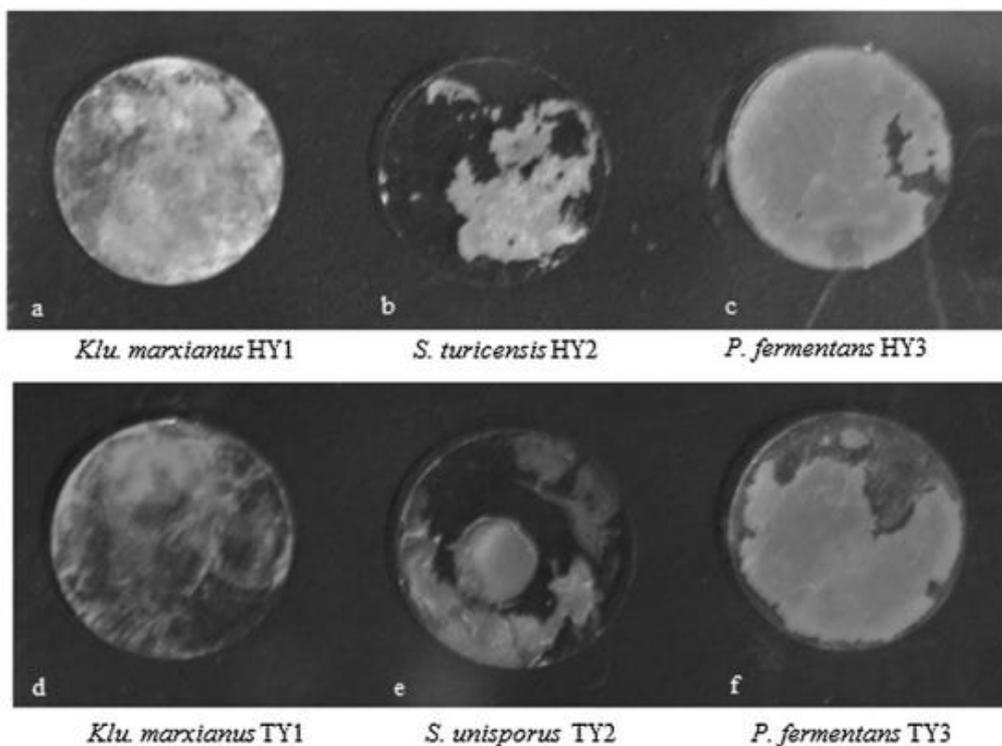
Οι Wang και συν., (2012) έδειξαν ότι η αυτο-συσσωμάτωση μαζί με την υδροφοβικότητα των στελεχών LAB φαίνεται να σχετίζεται με την προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αυτο-συσσωμάτωση των LAB αυξανόταν με την αύξηση του χρόνου επώασης. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ιδιότητες αυτοσυσσωμάτωσης των στελεχών αυτών σχετίζονται με τις ικανότητες συσσωμάτωσής τους. Από τα στελέχη LAB, ο *Lb. kefiranofaciens* HL1 παρουσίασε την ταχύτερη και μεγαλύτερη ικανότητα αυτο-συσσωμάτωσης, ακολουθούμενη από τον *Lb. kefiri* HL2, ενώ από τα στελέχη των ζυμών σημαντική ικανότητα αυτο-συσσωμάτωσης εμφάνισε ο *S. turicensis* HY2.

### **1.3.1.2 Σχηματισμός βιοϋμενίων από οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες**

Οι διαδικασίες που διέπουν το σχηματισμό βιοϋμενίων περιλαμβάνουν τη δημιουργία μιας επιφάνειας για προσκόλληση, την προσάρτηση των κυττάρων σε αυτή την επιφάνεια, τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους και την ανάπτυξη μιας σύνθετης δομής (Simoes και συν., 2010). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τα LAB μπορεί να βοηθήσει τα κύτταρα να αντισταθούν στο περιβαλλοντικό στρες, όπως τα υψηλότερα επίπεδα οξικού οξέος και αιθανόλης (Kubota και συν., 2008). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τον *Lb. kefiri* HL2 στον πυθμένα του τοιχώματος σε ζωμό MRS ήταν σημαντικά υψηλότερος από αυτόν των άλλων LAB. Η μορφολογία και η δομή των μεμονωμένων βιοϋμενίων των ζυμών έδειξε ότι οι δύο ζύμες κεφίρ σχήματος ράβδου, ο *K. marxianus* HY1 και ο *S. turicensis* HY2, σχημάτισαν ένα λεπτό βιοϋμένιο πάνω στο γυάλινο κάλυμμα, με τον *S. turicensis* HY2 να απομακρύνεται πιο εύκολα από το γυάλινο κάλυμμα μετά το πλύσιμο. Ο *P. fermentans* HY3 και ο *P. fermentans* TY3, ζύμες ωοειδούς σχήματος, έδειξαν υψηλή κυτταρική πυκνότητα ικανή να προσκολλάται στην επιφάνεια της υάλου.



Εικόνα 5: Επιφάνεια βιοϋμενίων των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Wang και συν., 2012).

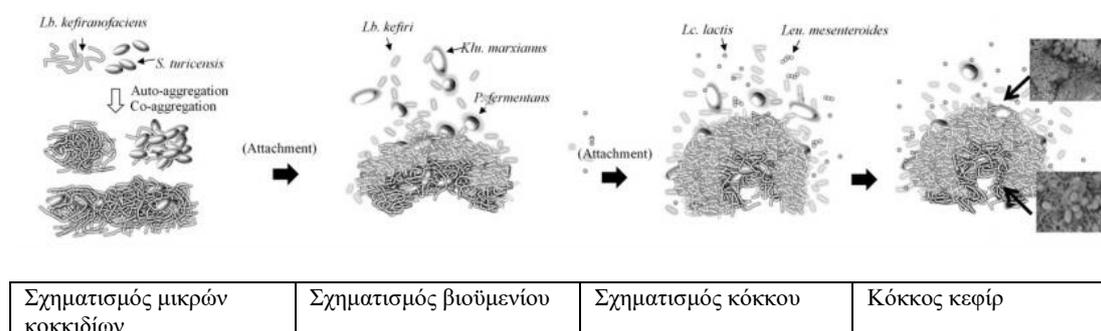


Εικόνα 6: Επιφάνεια βιοϋμενίων των ζυμών (Wang και συν., 2012).

### 1.3.1.3 Μηχανισμός σχηματισμού κόκκων κεφίρ

Σε μια απόπειρα αποκωδικοποίησης του μηχανισμού σχηματισμού των κόκκων κεφίρ οι Wang και συν., (2012) παρέθεσαν τον παρακάτω υποθετικό μηχανισμό. Αρχικά, ο *Lb. kefiranofaciens* HL1 και ο *S. turicensis* HY2 αρχίζουν να αυτο-συσσωματώνονται

σε μικρά κοκκίδια, με τη συσσωμάτωση να ενισχύεται όταν μειώνεται το pH. Παράλληλα οι *Lb. kefir* HL2, *K. marxianus* HY1 και *P. fermentans* HY3, που αποτελούν παραγωγούς βιοϋμενίων, προσκολλώνται στην επιφάνεια αυτών των συγκεκριμένων κοκκιδίων, σχηματίζοντας thin βιοϋμένια. Μετά το σχηματισμό βιοϋμενίων, οι ζύμες στο κεφίρ και ο *Lb. kefir* HL2 συνεχίζουν να συσσωματώνεται με τα στελέχη των κοκκιδίων και σχηματίζοντας βιοϋμένια, δίνουν μια τρισδιάστατη μικροαποικία. Καθώς αυξάνεται η πυκνότητα των κυττάρων λόγω της αύξησης των ζυμών και των LAB στο κεφίρ, τα κύτταρα και τα συστατικά του γάλακτος που υπάρχουν στην υγρή φάση συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των κοκκιδίων κι έτσι σχηματίζονται οι κόκκοι του κεφίρ. Οι γαλακτοβάκιλλοι βραχείας αλύσου, *Lb. kefir* HL2 καταλαμβάνουν την επιφάνεια, ενώ γαλακτοβάκιλλοι μακράς αλύσου, *Lb. kefiranofaciens* HL1, βρίσκονται συγκεντρωμένοι στο κέντρο των κόκκων κεφίρ. Δημιουργείται με τον τρόπο αυτό μια συμβιωτική σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών που υπάρχουν στους κόκκους κεφίρ, όπου τα βακτήρια και οι ζύμες επιβιώνουν και μοιράζονται τα βιοπροϊόντα τους ως πηγές ενέργειας και παράγοντες μικροβιακής ανάπτυξης (Arslan, 2015).



Εικόνα 7: Μηχανισμός σχηματισμού κόκκων κεφίρ (Wang και συν., 2012).

### 1.3.1.4 Περαιτέρω αλληλεπιδράσεις ζυμών-βακτηρίων

Η επικρατέστερη άποψη σχετικά με τη συμβίωση βακτηρίων-ζυμών είναι ότι ανταγωνίζονται μεταξύ τους ως προς την λήψη θρεπτικών συστατικών, που θα συμβάλλουν στην επιβίωσή τους, όπως βιταμίνες, αμινοξέα, ανόργανα άλατα κλπ. Είναι γνωστό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ, μέσω του ομοζυμωτικού καταβολισμού της, ενώ μέσω του ετεροζυμωτικού καταβολισμού της γλυκόζης παράγεται γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και αιθανόλη, προϊόντα που μπορεί να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης των ζυμών. Τα δύο οξέα διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, με απλή διάχυση, υπό τη μορφή

αδιάστατων ιόντων και για τιμές pH μεγαλύτερες του ισοηλεκτρικού τους σημείου, τα δύο οξέα δίστανται. Το οξικό οξύ διαχέεται πιο εύκολα για αυτό θεωρείται πιο κρίσιμο κι έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Έχει αποδειχθεί σε πειραματικό επίπεδο η συνεργιστική δράση της αιθανόλης με το γαλακτικό και το οξικό οξύ, μέσω της διευκόλυνσης της μεταφοράς τους δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης, και η ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης των οργανικών ενώσεων που έχουν παραχθεί από τα βακτήρια αυτά (Narendranath και συν., 1997). Σε επίπεδο ζυμών η αιθανόλη διευκολύνει την παθητική μεταφορά των οργανικών οξέων, ενισχύοντας τις αρχικές ταχύτητες πρόσληψής τους, ωστόσο στην περίπτωση της ενεργητικής διάχυσης, η οποία επιτελείται από μεταφορείς πρωτεϊνικής σύστασης, η αιθανόλη αναστέλλει τη μεταφορά των οργανικών οξέων με μη ανταγωνιστικό τρόπο. Παρόλα αυτά οι Casal και συν., (1998) έδειξαν ότι σε κύτταρα του *S. cerevisiae*, που αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης, η απουσία λειτουργικού φορέα για το οξικό οξύ σε συνδυασμό με τη σχετικά υψηλή διαπερατότητα της μεμβράνης του πλάσματος ως προς το αδιάστατο οξύ, συνέστησαν τη θετική δράση της αιθανόλης στην κυτταρική μεταφορά των οργανικών οξέων. Μετά τη διάσταση των οξέων στο εσωτερικό του κυττάρου, παρατηρείται συσσώρευση πρωτονίων και ανιόντων, η οποία ευνοείται επίσης από την αιθανόλη. Σε αυτές τις συνθήκες αφενός παρεμποδίζεται η ζύμωση, μέσω της μείωσης της ενεργότητας της φωσφοφρουκτοκινάσης, της ενολάσης και της εξοκινάσης κι αφετέρου καταναλώνεται ATP προκειμένου να μεταφερθούν τα πρωτόνια εκτός του κυττάρου από την κυτταροπλασματική ATPάση (Imai & Ohno, 1995).

Έχει παρατηρηθεί επίσης μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων απουσία ζυμώνσε σχέση με αυτόν που παρατηρείται όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται παρουσία ζυμών. Κάτι τέτοιο αποδίδεται στο γεγονός ότι τα βακτήρια επωφελούνται από θρεπτικά συστατικά που εκκρίνονται από τις ζύμες κατά την ανάπτυξή τους. Πιο αναλυτικά οι ζύμες παράγουν ριβοφλαβίνη και φολικό οξύ, τα οποία καταναλώνονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια για τη σύνθεση διαφόρων πολυσακχαριτών των κόκκων (Marshall & Cole, 1983).

Επιπλέον οι βιταμίνες καθώς και τα αμινοξέα που απελευθερώνονται κατά την αυτόλυση των κυττάρων των ζυμών, αποτελούν θρεπτικό υλικό για τα βακτήρια, ενώ τα ίδια δεν χρησιμοποιούν τα αμινοξέα της καζεΐνης του γάλακτος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η *Yarrowia lipolytica* και η *Candida catenulata*, οι οποίες

κατά την ανάπτυξή τους στο γάλα ή στο τυρόγαλα παράγουν ελεύθερα αμινοξέα, όπως λευκίνη, φαινυλαλανίνη, λυσίνη, αργινίνη, γλουταμινικό οξύ και βαλίνη. Τα αμινοξέα αυτά μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα μεταβολισμού για τα οξυγαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, μεταξύ των οποίων και ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα. Άλλο παράδειγμα αποτελεί αυτό της μικτής καλλιέργειας του *Saccharomyces florentinus* και του *Lb. hilgardii*, όπου ο *Leroi* (1993a) διαπίστωσε ότι ο πρώτος παράγει ενώσεις, που αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη του δεύτερου. Μάλιστα, η ζύμη προκαλεί αύξηση στην παραγωγή γαλακτικού οξέος από το βακτήριο κατά 60%, ενώ το βακτήριο περιορίζει την ανάπτυξη της ζύμης και την αλκοολική ζύμωση κατά 65%.

### 1.3.2 Χημική σύσταση

Η σύσταση του κεφίρ είναι μεταβλητή κι όχι ευκρινώς ορισμένη. Εξαρτάται από το είδος και την περιεκτικότητα σε λιπαρά του γάλακτος, τη σύνθεση των κόκκων ή των καλλιεργειών καθώς και από την τεχνολογική διαδικασία του κεφίρ. Η χημική σύσταση του κεφίρ αποτυπώνεται στον πίνακα 3. Το pH του κυμαίνεται από 4,2 έως 4,6 (Otlés & Cagindi, 2003). Τα κύρια προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κεφίρ είναι το γαλακτικό οξύ, το CO<sub>2</sub> και η αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα το L (+) - γαλακτικό οξύ αποτελεί το πλέον άφθονο οργανικό οξύ μετά τη ζύμωση και προέρχεται από το 25% περίπου της αρχικής λακτόζης. Οι ποσότητες της αιθανόλης και του CO<sub>2</sub> που παράγονται κατά τη ζύμωση του κεφίρ, εξαρτώνται από τις συνθήκες παραγωγής (Farnworth, 2005).

Ωστόσο το ιδιαίτερο αυτό άρωμα και γεύση που διαθέτει τα οφείλει στο γενικότερο μίγμα γαλακτικού οξέος, ακετοΐνης, αιθανόλης και διαφόρων οργανικών οξέων όπως, το πυροσταφυλικό οξύ, το ιππουρικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ (Guzel-Seydim και συν., 2000). Το διακετύλιο και η ακεταλδεΐδη που αποτελούν αρωματικές ενώσεις, είναι επίσης παρούσες στο κεφίρ. Το διακετύλιο παράγεται από τον *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* και *Leuconostoc* sp (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990, Otlés & Cagindi, 2003). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα κύρια προϊόντα είναι το γαλακτικό οξύ, το CO<sub>2</sub> και η αιθανόλη (Otlés & Cagindi, 2003).

**Πίνακας 3: Χημική σύσταση του κεφίρ (Ottles & Cagindi, 2003).**

<b>Συστατικά</b>	<b>100g</b>	<b>Συστατικά</b>	<b>100 g</b>
Ενέργεια (kcal)	65	Μεταλλικά στοιχεία (g)	
Λίπος (%)	3.5	Ασβέστιο	0.12
Πρωτεΐνη (%)	3.3	Φωσφόρος	0.10
Λακτόζη (%)	4.0	Μαγνήσιο	12
Νερό (%)	87.5	Κάλιο	0.15
		Νάτριο	0.05
Milk acid (g)	0.8	Χλώριο	0.10
Αιθυλική αλκοόλη (g)	0.9		
Γαλακτικό οξύ (g)	1	Ιχνοστοιχεία	
Χοληστερόλη (mg)	13	Σίδηρος (mg)	0.05
Φωσφατάσες (mg)	40	Χαλκός (μg)	12
		Μολυβδαίνιο (μg)	5.5
Απαραίτητα αμινοξέα (g)		Μαγγάνιο (μg)	5
Τρυπτοφάνη	0.05	Ψευδάργυρος (mg)	0.36
Φαινυλαλανίνη & Τυροσίνη	0.35		
Λευκίνη	0.34	Αρωματικές ενώσεις	
Ισολευκίνη	0.21	Ακεταλδεΐδη	
Θρεονίνη	0.17	Διακετύλιο	
Μεθειονίνη & Κυστεΐνη	0.12	Ακετοΐνη	
Λυσίνη	0.27		
Βαλίνη	0.22		
Βιταμίνες (mg)			
A	0.06		
Καροτίνη	0.02		
B1	0.04		
B2	0.17		
B6	0.05		
B12	0.5		
Νιασίνη	0.09		
C	1		
D	0.08		
E	0.11		

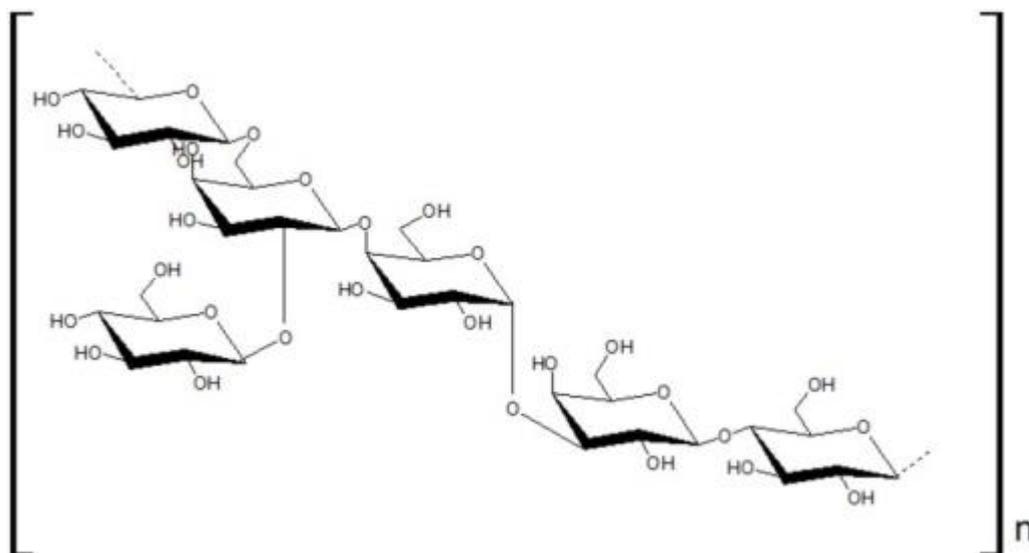
### 1.3.3 Κεφιλάν

Πολλοί μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, έχουν την ικανότητα να συνθέτουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι διακρίνονται σε διαλυτούς ή αδιάλυτους. Οι πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα τροφίμων είναι η ξανθάνη, η δεξτράνη, η γελλάνη αλλά και οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια (Prado και συν., 2015). Πιο αναλυτικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc* παράγουν εξωπολυσακχαρίτες διαφόρων δομών και συνθέσεων (Farnworth, 2005), οι οποίοι προμηθεύουν με προστατευτικές και προσαρμοστικές ιδιότητες τους βακτηριακούς παραγωγούς τους, δεδομένου ότι τις περισσότερες φορές είναι χαλαρά προσκολλημένοι στην κυτταρική μεμβράνη, κι επομένως

χάνονται εύκολα στο περιβάλλον τους (Jolly και συν., 2002). Σχετικά με τα προϊόντα τροφίμων, οι εξωπολυσακχαρίτες συχνά συμβάλλουν στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και στα χαρακτηριστικά σταθερότητας.

Ένας μοναδικός πολυσακχαρίτης, το κεφιράν, έχει βρεθεί σε κόκκους κεφίρ και πιο συγκεκριμένα οι Wang και συν., (2010) έδειξαν ότι το κεφιράν παράγεται από τον *Lb. kefiranofaciens*. Οι κόκκοι μάλιστα είναι δυνατόν να περιέχουν κι άλλους εξωπολυσακχαρίτες. Το κύριο πλεονέκτημα του κεφιράν σε σύγκριση με άλλους πολυσακχαρίτες μικροβιακής προέλευσης, όπως η ξανθάνη (*Xanthomonas campestris*), είναι ότι παράγεται από οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή (GRAS).

Το κεφιράν περιέχει D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη σε αναλογία 1:1, που αποτυπώνεται στην εικόνα 8. Η προτεινόμενη δομή είναι μια διακλαδισμένη επαναλαμβανόμενη μονάδα εξα- ή επτασακχαριτών που αυτοσυντίθεται από μια κανονική μονάδα πεντασακχαρίτη, στην οποία ένα ή δύο κατάλοιπα σακχάρου συνδέονται τυχαία (Farnworth, 2005).



**Εικόνα 8:** Δομή του κεφιράν (Prado και συν., 2015).

Το κεφιράν διαλύεται αργά σε κρύο νερό και γρήγορα σε ζεστό νερό και σχηματίζει ένα ιξώδες διάλυμα σε συγκέντρωση 2%. Το καρβοξυμεθυλ-κεφιράν έχει ιξώδες, το οποίο είναι 14 φορές μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του κεφιράν, παρόλα αυτά εξακολουθεί να είναι πολύ χαμηλότερο από εκείνο άλλων πηκτικών παραγόντων, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, περιορίζοντας έτσι τις πρακτικές χρήσεις του κεφιράν και του καρβοξυμεθυλ-κεφιράν (Mukai και συν., 1990).

Από την αρχική απομόνωσή του, έχει αναφερθεί ότι το κεφίρ μπορεί να παραχθεί από μια ποικιλία βακτηρίων, απομονωόμενων από κόκκους κεφίρ που έχουν ληφθεί από διάφορες πηγές (Mitsue και συν., 1999, Santos και συν., 2003). Βακτήρια που παράγουν εξωπολυσακχαρίτες βρίσκονται συχνά στο γάλα ή σε γαλακτοκομικά προϊόντα, παρόλο που μελέτες έχουν δείξει ότι η μέγιστη παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη μπορεί να συμβεί σε χημικά καθορισμένα μέσα (που περιέχουν πηγή υδατανθράκων, μεταλλικά άλατα, αμινοξέα/ πεπτίδια, βιταμίνες και νουκλεϊκά οξέα) (Dupont και συν., 2000).

## **1.4 Μεταβολισμός των σακχάρων**

Το κεφίρ αποτελεί προϊόν διπλής ζύμωσης, γαλακτικής και αλκοολικής, με τη ζύμωση αυτή να πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς που αναφέρονται στον πίνακα 2.

Ο μεταβολισμός των σακχάρων τόσο από τα οξυγαλακτικά βακτήρια όσο και από τις ζύμες εμφανίζει αρκετές ομοιότητες αλλά και διαφορές. Οι δύο τρόποι μεταβολισμού περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

### **1.4.1 Γαλακτική ζύμωση**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται για την οξίνιση του γάλακτος, μετατρέπουν τη λακτόζη σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης καταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ. Ωστόσο τυχόν αλλαγή των εξωτερικών συνθηκών μπορεί να επηρεάσει την πορεία μεταβολισμού των βακτηρίων αυτών, δίνοντας διαφορετικά μεταβολικά προϊόντα. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται για τη ζύμωση των σακχάρων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι δύο:

- το ομοζυμωτικό μονοπάτι, που αφορά στον καταβολισμό των σακχάρων μέσω της γλυκολυτικής πορείας
- το ετεροζυμωτικό μονοπάτι, που αφορά στην πορεία των φωσφορικών πεντοζών

Στο γένος *Leuconostoc*, για παράδειγμα, η μεταφορά των εξοζών και συγκεκριμένα της λακτόζης, μέσα στο κύτταρο γίνεται συνήθως από την περμεάση της λακτόζης.

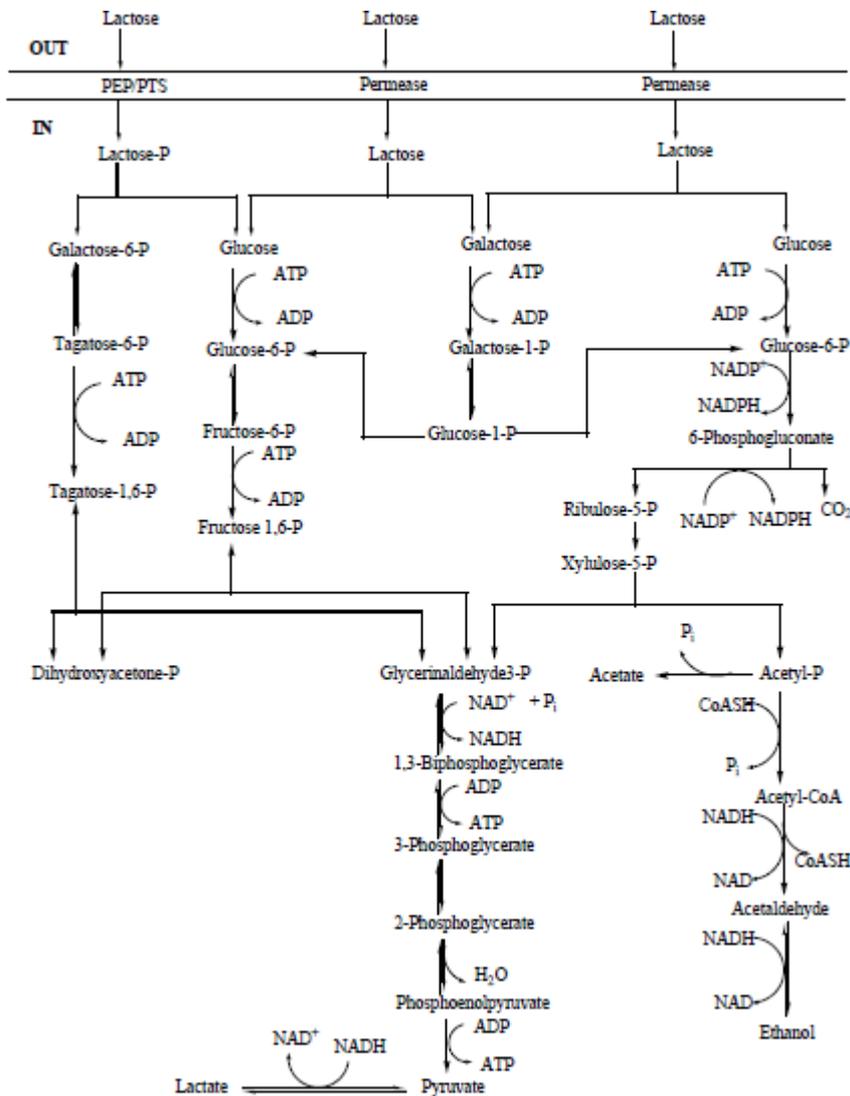
Στη συνέχεια η β-γαλακτοζιδάση είναι αυτή που καταλύει τη μετατροπή της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτικό οξύ, στο εσωτερικό του κυττάρου. Στο σημείο αυτό, τα μεταβολικά μονοπάτια είναι εκείνα που κρίνουν την πορεία των σακχάρων. Στην περίπτωση των ομοζυμωτικών βακτηρίων η διάσπαση της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω της γλυκολυτικής πορείας, όπου παράγονται 2 mole ATP ανά mole γλυκόζης. Αναφορικά με τη γαλακτόζη, είτε απομακρύνεται από το εσωτερικό του κυττάρου, είτε μετατρέπεται μέσω της γαλακτοκινάσης σε 1-φωσφορική γαλακτόζη και μέσω περαιτέρω αντιδράσεων σε 6-φωσφορική γλυκόζη, όπου και εισάγεται στη γλυκόλυση.

Στην περίπτωση των ετεροζυμωτικών βακτηρίων ακολουθείται ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών. Συγκεκριμένα η γλυκόζη μετατρέπεται μέσω των αντιδράσεων των φωσφορικών πεντοζών σε 5-φωσφορική ριβουλόζη και στη συνέχεια σε 5-φωσφορική ξυλουλόζη, που διασπάται σε 1 μόριο C3 κι 1 μόριο C2. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη μεταβολίζεται προς πυροσταφυλικό κι έπειτα προς γαλακτικό οξύ, ενώ το ακέτυλο φωσφορικό μετατρέπεται σε ακέτυλο CoA και τέλος σε αιθανόλη (ή οξικό οξύ). Η ενεργειακή απόδοση είναι 2 ATP, εκ των οποίων το 1 καταναλώνεται για τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης.

Οι βιοχημικές διαφορές ομοζυμωτικής και ετεροζυμωτικής γαλακτικής ζύμωσης αφορούν στην ενεργειακή κατάσταση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των ομοζυμωτικών βακτηρίων, από τον καταβολισμό του σακχάρου παράγονται 2 mole γαλακτικού οξέος και 2 mole ATP ανά mole γλυκόζης. Ενώ στην περίπτωση των ετεροζυμωτικών βακτηρίων από 1 mole σακχάρου παράγονται ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, οξικού οξέος κι 1 mole ATP. Επομένως στην ετεροζυμωτική ζύμωση παράγεται η μισή ποσότητα ATP σε σχέση με την ομοζυμωτική.

Ενώ στο γένος *Leuconostoc*, όπως προαναφέρθηκε η μεταφορά της λακτόζης στο εσωτερικό του κυττάρου γίνεται μέσω της περμεάσης της λακτόζης, και στη συνέχεια η β-γαλακτοζιδάση καταλύει τη μετατροπή της σε γλυκόζη και γαλακτικό οξύ σε πολλά είδη του γένους *Lactobacillus*, η μεταφορά της λακτόζης πραγματοποιείται από διαφορετικό ενζυμικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα το σύστημα που καταλύει τη μεταφορά της λακτόζης είναι αυτό της φωσφοτρανσφεράσης του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος (PEP/ PTS; phosphoenolpyruvate/phosphotransferase system), ενώ συνοδεύεται από ταυτόχρονη φωσφορυλίωση. Με

τον τρόπο αυτό η λακτόζη που έχει φωσφορυλιωθεί διασπάται μέσω της φωσφο-β-γαλακτοζιδάσης σε γλυκόζη και 6-φωσφορική γαλακτόζη. Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από μια εξοκινάση και μεταβολίζεται μέσω της γλυκόλυσης, ενώ η 6-φωσφορική γαλακτόζη ακολουθεί το μονοπάτι του συστήματος φωσφοτρανσφοράσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος- γαλακτόζης.



Σχήμα 1: Ο καταβολισμός της γλυκόζης (Τσακαλίδου, 2017).

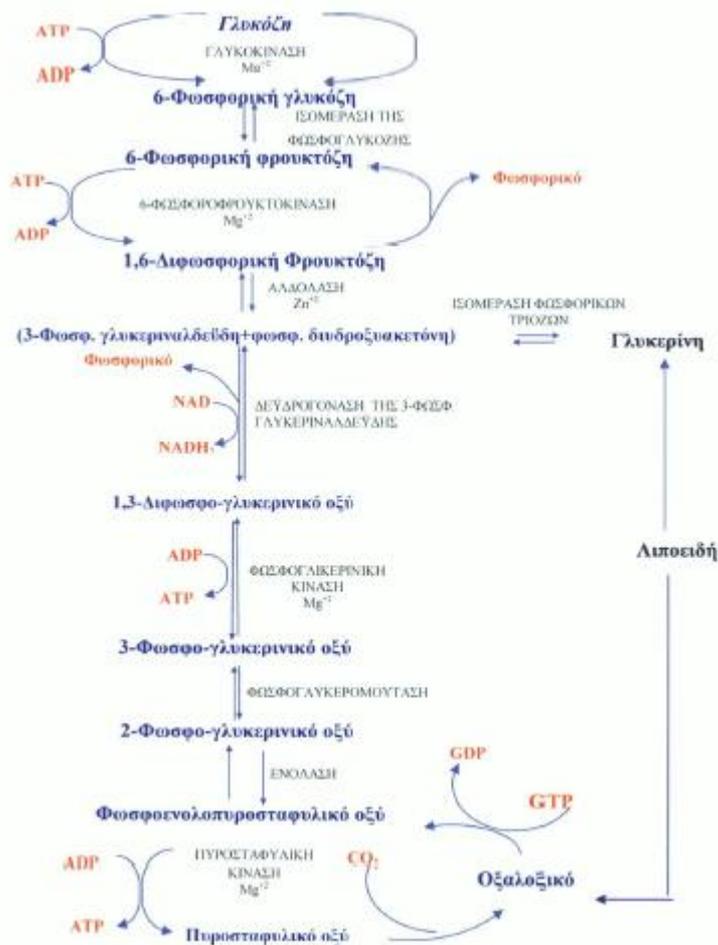
#### 1.4.2 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται μέσω της γλυκολυτικής πορείας, του μεταβολισμού δηλαδή της γλυκόζης που είναι ο κύριος υδατάνθρακας τον οποίο χρησιμοποιούν οι ζωντανοί οργανισμοί ως πηγή ενέργειας. Τόσο η γλυκόλυση όσο και η αλκοολική ζύμωση είναι αναερόβιες διεργασίες.

Η συνηθισμένη πορεία μεταβολισμού της γλυκόζης στους περισσότερους οργανισμούς, είναι η μετατροπή της αρχικά σε πυροσταφυλικό οξύ κι έπειτα, στην περίπτωση των ζυμών και μερικών άλλων μικροοργανισμών, η περαιτέρω μετατροπή του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη (σχήμα 2). Το πρώτο βήμα είναι η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, η οποία καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού, που χρειάζεται ως συνένζυμο την πυροφωσφορική θειαμίνη. Το επόμενο βήμα είναι η αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη από το NADH, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση. Το καθαρό αποτέλεσμα αυτής της αναερόβιας πορείας είναι:



Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται εκτός από αιθανόλη και άλλες πτητικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα των αλκοολούχων ποτών. Πρόκειται για προϊόντα μεταβολισμού των ζυμών και το είδος των ενώσεων αυτών εξαρτάται ως ένα βαθμό από το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται, τη σύσταση της πρώτης ύλης που ζυμώνεται, καθώς και τις συνθήκες της ζύμωσης (τιμή pH, θερμοκρασία κτλ.) (Hansson και συν., 2001).



Σχήμα 2: Γλυκολυτική πορεία (Stryer, 1995).

## 1.5 Ιδιότητες των μικροοργανισμών του κεφίρ

### 1.5.1 Πρωτεόλυση

Πρόκειται για μια βασική διεργασία που πραγματοποιείται τόσο στο γάλα όσο και σε προϊόντα γάλακτος, λόγω των αλλαγών που επιφέρει στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Απαρτίζεται από δύο στάδια, με το πρώτο να αφορά στην υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε μικρότερες πρωτεΐνες, πεπτόνες, πεπτίδια και τέλος αμινοξέα και το δεύτερο στην επιμέρους διάσπαση των αμινοξέων σε αζωτούχα ή μη συστατικά, κυρίως λιπαρά οξέα και  $\text{NH}_3$ .

Παρά το γεγονός ότι την κύρια πρωτεολυτική δράση την ασκεί η ρεννίνη, στη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη θα δοθεί έμφαση στο πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι διατροφικά απαραίτητα και έχουν σύνθετες ανάγκες σε αμινοξέα. Ωστόσο η συγκέντρωση των ελεύθερων

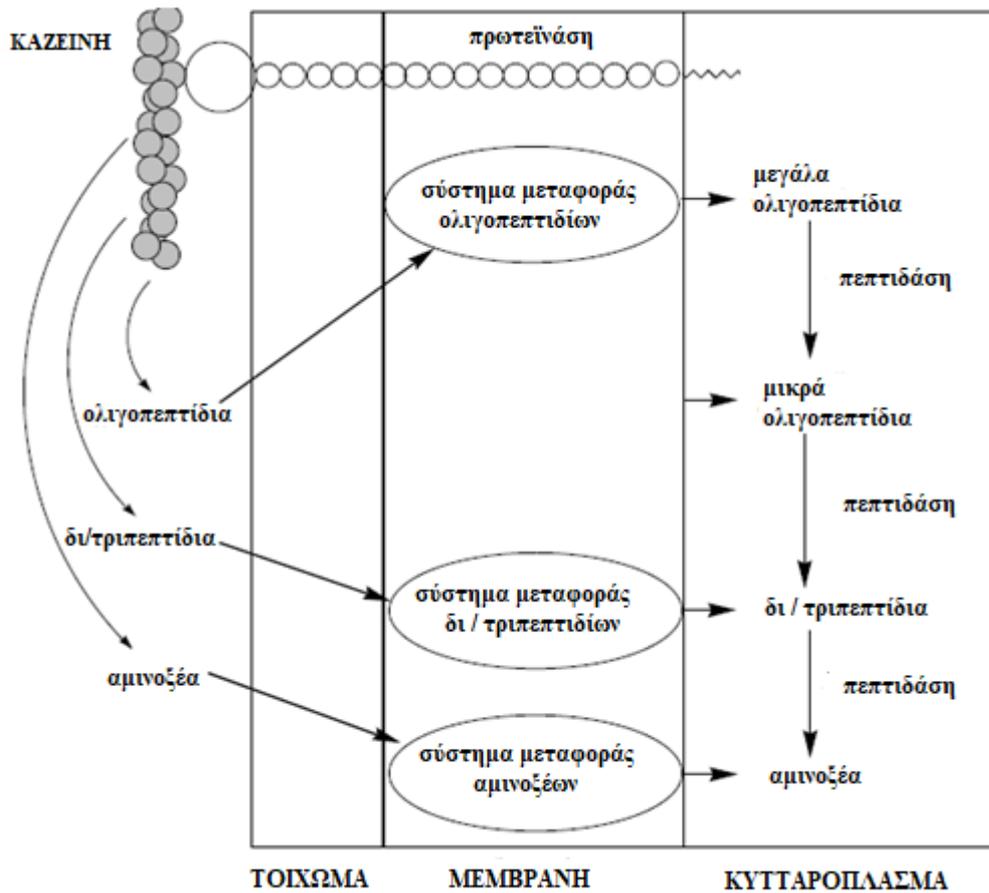
αμινοξέων στο γάλα είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις ανάγκες ενός μεγάλου αριθμού οξυγαλακτικών βακτηρίων. Έτσι οι γαλακτόκοκκοι διαθέτουν ένα σύστημα πρωτεόλυσης, που περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση πρωτεϊνών, με όχι τόσο σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση και πεπτιδασών, με πιο καταλυτικό ρόλο στην πρωτεόλυση.

Οι πρωτεϊνάσες του κυτταρικού τοιχώματος ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεϊνών σερίνης και διακρίνονται στην πρωτεϊνάση P<sub>I</sub>, που υδρολύει μόνο β καζεΐνη και στην πρωτεϊνάση P<sub>III</sub> που υδρολύει α και β καζεΐνη. Από τη δράση των πρωτεϊνών προκύπτουν διαφορετικά προϊόντα υδρόλυσης, τα οποία μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω συγκεκριμένων βιοχημικών μονοπατιών και τα οποία αποτυπώνονται στο σχήμα 3. Το πρώτο βιοχημικό μονοπάτι αφορά στη μεταφορά ολιγοπεπτιδίων, αποτελούμενων από 4 έως 35 αμινοξέα. Το δεύτερο βιοχημικό μονοπάτι περιλαμβάνει τη μεταφορά δι- και τρι-πεπτιδίων, ενώ εξαρτάται από τη βαθμίδωση ενέργειας που δημιουργείται λόγω συγκέντρωσης H<sup>+</sup>. Το τρίτο μονοπάτι αφορά στη μεταφορά αμινοξέων κι ανάλογα με το αμινοξύ σημειώνεται ενεργειακή εξάρτηση, είτε από τη βαθμίδωση που δημιουργείται λόγω συγκέντρωσης H<sup>+</sup>, είτε από κατανάλωση ATP, είτε λειτουργεί ως αντιμεταφορέας.

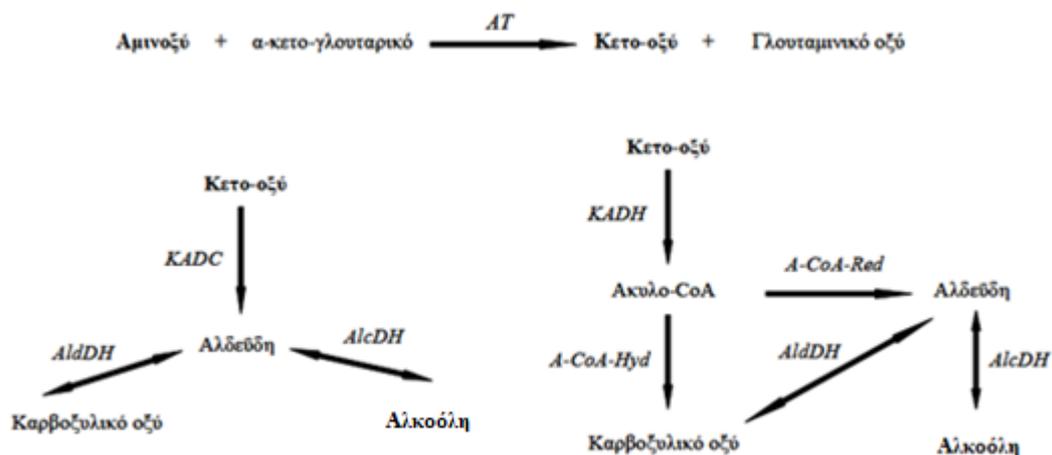
Οι πεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες διακρίνονται σε ενδοκυτταρικές κι εξωκυτταρικές, οδηγούν μέσω της διάσπασης των πρωτεϊνών στο σχηματισμό πεπτιδίων μικρής αλύσου κι αμινοξέων. Ο ρόλος των εξωπεπτιδασών φαίνεται να είναι πολύ πιο ενεργός, δεδομένου ότι σχηματίζεται μια δομή γέλης μέσα στην οποία είναι ενσωματωμένα τα βακτηριακά κύτταρα, σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση διαλυτών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον. Υπάρχει επομένως πιθανότητα οι ενδοπεπτιδάσες να μην έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν το υπόστρωμα (Collins και συν., 2003).

Τα υδατοδιαλυτά συστατικά (άλατα, αμινοξέα, πεπτίδια) συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα και τη γεύση του γάλακτος. Μάλιστα έχει γίνει ιδιαίτερη μελέτη γύρω από τα διακλαδισμένα, θειούχα και αρωματικά αμινοξέα κυρίως του *Lactococcus lactis* κι άλλων μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Όπως αποτυπώνεται και στο σχήμα 4, μια αντίδραση τρανσαμίνωσης, παρουσία ενός α-κετο-οξέος σηματοδοτεί την έναρξη του καταβολισμού των αμινοξέων στα βακτήρια. Ωστόσο, ορισμένες φορές, παρεμποδίζεται στα εν λόγω βακτήρια ο καταβολισμός των αμινοξέων, από την παρουσία α-κετο-οξέων. Έχουν βρεθεί όμως στελέχη, τα οποία καταβολίζουν τα

αντίστοιχα αμινοξέα προς ενώσεις, πολύ χαρακτηριστικές για τα διάφορα προϊόντα γάλακτος χάρη στην ενεργότητα δεϋδρογενάσης του γλουταμινικού οξέος που διαθέτουν.



Σχήμα 3: Το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Τσακαλίδου, 2017).



Σχήμα 4: Καταβολισμός των αμινοξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Τσακαλίδου, 2017).

## 1.5.2 Λιπόλυση

Η λιπόλυση του γάλακτος αποτελεί μια επίσης σημαντική διεργασία, με καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, των γαλακτοκομικών προϊόντων. Πρόκειται για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων του γάλακτος, δεδομένου ότι τα τριγλυκερίδια απαντώνται κατά 98% στο γάλα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μονο- δι-γλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης.

Το λίπος συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της γεύσης του τελικού προϊόντος, γιατί κρατάει εν διαλύσει τα αρωματικά συστατικά του. Πιο αναλυτικά τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου ( $C_{4:0}$ - $C_{10:0}$ ) και μεσαίας αλύσου ( $C_{12:0}$ - $C_{16:0}$ ) είναι υπεύθυνα για τις γευστικές ιδιότητες, ενώ για εκείνα της μεγαλύτερης αλύσου ( $>C_{18:0}$ ) δεν έχει επιβεβαιωθεί αντίστοιχη δραστηριότητα. Η πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα οδηγεί σε τυριά με ταγγή γεύση, όπου στην περίπτωση αυτή το βουτυρικό οξύ κυριαρχεί με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μακρύτερης αλύσου να ακολουθούν λαυρικό, παλμιτικό, μυριστικό, καπρινικό, ολεϊκό.

Οι παράγοντες εκείνοι, που σχετίζονται με τη λιπόλυση, είναι:

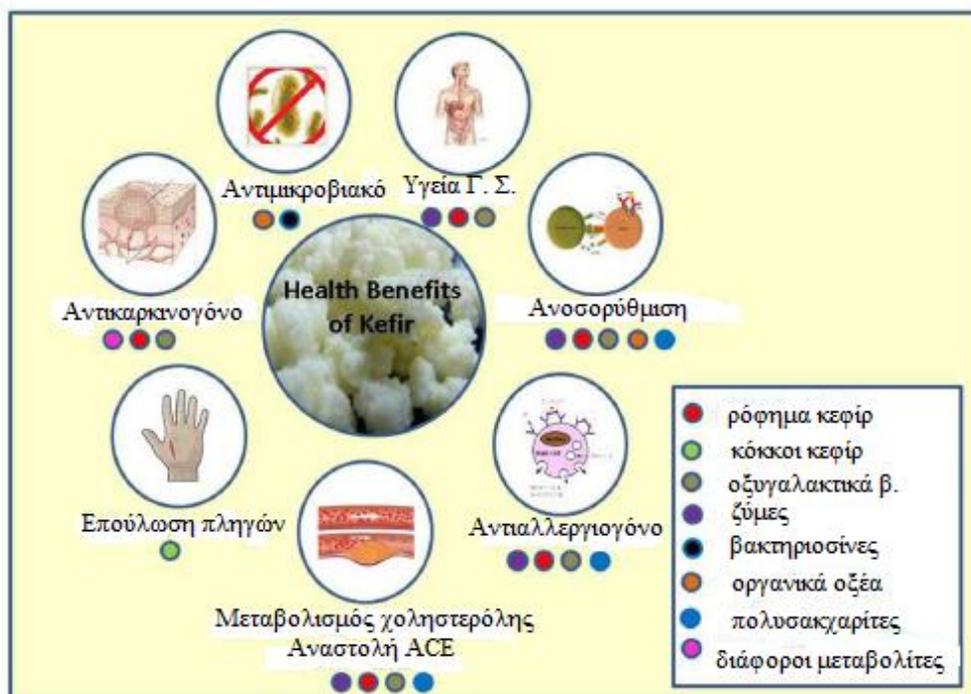
- Η ενδογενής λιπάση του γάλακτος, η λιποπρωτεΐνη λιπάση (LPL). Είναι υπεύθυνη για την αυθόρμητη λιπόλυση στο γάλα και συγκεκριμένα υδρολύει τριγλυκερίδια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, διγλυκερίδια και φωσφολιπίδια. Δεδομένου ότι η μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου είναι προσδεδεμένη στα καζεϊνικά μικκύλια, τα λιποσφαίρια του γάλακτος δεν είναι τόσο ευάλωτα στην προσβολή από την LPL. Ωστόσο κατά τη διάρκεια της ψύξης, επάγεται η μεταφορά του ενζύμου από τα καζεϊνικά μικκύλια στα λιποσφαίρια, προάγοντας τη λιπόλυση. Η LPL αδρανοποιείται στους  $73\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ sec}$ , πράγμα που σημαίνει ότι κατά την παστερίωση απομένουν ελάχιστες ποσότητες του ενζύμου, που δεν επηρεάζουν τη λιπόλυση.
- Εξωγενείς λιπάσες, όπως η προγαστρική λιπάση. Προστίθεται είτε ως καθαρή μορφή είτε ως συστατικό της πτυιάς, προκειμένου να επιτυγχάνεται ο έλεγχος του μεγέθους της λιπόλυσης και κατ' επέκταση των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος.
- Οξυγαλακτικά βακτήρια. Αν και η λιπολυτική τους δράση τους είναι περιορισμένη, σε μεγαλύτερους αριθμούς, που μπορεί να απομονωθούν σε

ορισμένο γαλακτοκομικό προϊόν, έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων. Κάτι τέτοιο αποδίδεται στη συντονισμένη δράση των ενδοκυτταρικών λιπασών και εστερασών των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

### **1.5.3 Το κεφίρ ως πολύπλοκο προβιοτικό**

Τα λειτουργικά τρόφιμα αποκτούν όλο και μεγαλύτερο μερίδιο στη διεθνή αγορά, απασχολώντας τόσο τους καταναλωτές όσο και την επιστημονική κοινότητα. Κι αυτό γιατί ορισμένες τροφές με βιοενεργά συστατικά, όπως στην περίπτωση του κεφίρ, που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, έχουν τη δυνατότητα να παρεμβαίνουν σε μία σειρά βιολογικών δραστηριοτήτων με θετικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων.

Υποκατηγορία των λειτουργικών τροφίμων αποτελούν τα προβιοτικά τρόφιμα, τα οποία αποτελούν πιθανώς πηγές πολλών βιοδραστικών συστατικών, που μπορεί να είναι είτε οι ίδιοι μικροοργανισμοί (ζωντανοί ή νεκροί), είτε μεταβολίτες τους που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοσινών), είτε και προϊόντα διάσπασης των επιμέρους θρεπτικών συστατικών της αρχικής ύλης που ζυμώνεται, όπως πεπτίδια και οργανικά οξέα. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες από τις επιδράσεις του κεφίρ στην υγεία και τη γενικότερη ευρωστία των ανθρώπων.



Εικόνα 9: Οφέλη του κεφίρ στην υγεία (Bourrie και συν., 2016).

### 1.5.3.1 Αντιμικροβιακή δράση

Έχουν καταγραφεί μια σειρά από δεδομένα, που δείχνουν ότι τόσο το κεφίρ όσο και τα στελέχη εκείνα που σχετίζονται με το κεφίρ, διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριακών και αντιμυκητιακών ιδιοτήτων (πίνακας 4). Συγκεκριμένα το ρόφημα κεφίρ έχει εξεταστεί για τη δράση του εναντίον διαφόρων παθογόνων βακτηρίων και ζυμών κι έχει βρεθεί αντιμικροβιακή δραστηριότητα όμοια με αυτή της αμπικιλίνης, της αζιθρομυκίνης, κεφτριαξόνης, αμοξικιλίνης και κετοκοναζόλης (Cevikbas και συν., 1994, Yüksekdağ και συν., 2004, Rodrigues και συν., 2005, Huseini και συν., 2012).

Ερευνητικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την πληθώρα αντιμικροβιακών ενώσεων, που παράγονται από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια στο κεφίρ, συμπεριλαμβανομένων των οργανικών οξέων (γαλακτικό & οξικό οξύ), CO<sub>2</sub>, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, της αιθανόλης, του διακετυλίου και ορισμένων πεπτιδίων (βακτηριοσίνες). Τα παραπάνω εκτός των άλλων συμβάλλουν και στη θεραπεία και την πρόληψη γαστρεντερικών διαταραχών και κολπικών μολύνσεων (Messens & De Vuyst, 2002, Jamuna & Jeevaratnam, 2004).

Οι Garrote και συν., (2000) εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου αγελαδινού γάλακτος, που είχε ζυμωθεί με κόκκους κεφίρ έναντι Gram<sup>+</sup> και Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, συμπεραίνοντας ότι τα Gram<sup>+</sup> μπορούν να ανασταλούν σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα Gram<sup>-</sup>. Μάλιστα συμπλήρωση του αγελαδινού γάλακτος με γαλακτικό ή μίξη γαλακτικού με οξικό έδειξε ανασταλτική δράση έναντι του *E. coli*, καταλήγοντας στην παρουσία βακτηριοστατικών ιδιοτήτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κεφίρ.

Εκτός από τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του ροφήματος κεφίρ σαν σύνολο, έχουν καταγραφεί και συγκεκριμένα μικρόβια, τα οποία ασκούν από μόνα τους αντιμικροβιακή δράση. Οι *Leu. mesenteroides* και *Lb. plantarum*, που απομονώθηκαν από κόκκους κεφίρ, έχει αποδειχθεί ότι παράγουν αμφοτέρως αντιμικροβιακές ενώσεις που υπάρχουν στο κεφίρ. Και οι δύο αναστέλλουν Gram<sup>+</sup> και Gram<sup>-</sup> βακτήρια, έχουν μοριακό βάρος περίπου 1000 kDa και είναι σταθερά στη θερμότητα, αν και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες μειώνονται μετά την έκθεση σε πρωτεολυτικά ένζυμα. Επίσης ο *Lb. acidophilus*, ο *Lb. kefiranofaciens* και ο *S. thermophiles* βρέθηκε ότι έχουν ανασταλτική ισχύ έναντι μιας σειράς παθογόνων βακτηρίων όπως τα *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* (Santos και συν., 2003, Yüksesdağ και συν., 2004, Golowczyc και συν., 2008).

**Πίνακας 4: Κατηγοριοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών εναντίον των οποίων έχει αναπτύξει το κεφίρ αντιμικροβιακή δράση (Bourgie και συν., 2016).**

<b>Κατηγορία μικροοργανισμού</b>	<b>Αναφορές</b>
<b>Βακτήρια</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ryan και συν., 1996, Yüksesdağ και συν., 2004, Rodrigues και συν., 2005, Miao και συν., 2014, Leite και συν., 2015, Zanirati και συν., 2015.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ryan και συν., 1996, Yüksesdağ και συν., 2004, Rodrigues και συν., 2005, Huseini και συν., 2012, Zanirati και συν., 2015.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Santos και συν., 2003, Rodrigues και συν., 2005, Golowczyc και συν., 2008, Zanirati και συν., 2015.
<i>Escherichia coli</i>	Ryan και συν., 1996, Santos και συν., 2003, Yüksesdağ και συν., 2004, Rodrigues και συν., 2005, Golowczyc και συν., 2008, Leite και συν., 2015, Zanirati και συν., 2015.
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Santos και συν., 2003, Miao και συν., 2014.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ryan και συν., 1996, Santos και συν., 2003, Rodrigues και συν., 2005, Likotrafiti και συν., 2015; Leite και συν., 2015; Zanirati και συν.,

	2015.
<i>Bacillus subtilis</i>	Ryan και συν., 1996.
<i>Salmonella enteric</i>	Golowczyc και συν., 2008, Miao και συν., 2014, Leite και συν., 2015.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ryan και συν., 1996, Zaniratikaisυν., 2015.
<i>Shigella flexneri</i>	Santos και συν., 2003.
<i>Clostridium difficile</i>	Rea και συν., 2007.
<i>Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris</i>	Cevikbas και συν., 1994.
<i>Streptococcus pyogenes, Staphylococcus salivarius</i>	Rodrigues και συν., 2005.
<i>Bacillus cereus, Clostridium sporogenes, C. tyrobutyricum, Enterococcus faecium, Listeria innocua, Salmonella Typhi</i>	Ryan και συν., 1996.
<i>Salmonella Gallinarum, Shigella sonnei</i>	Golowczyc και συν., 2008 .
<i>Bacillus thuringiensis, Shigella dysenteriae</i>	Miao και συν., 2014 .
<b>Ζύμες</b>	
<i>Candida albicans</i>	Rodrigues και συν., 2005.
<i>Yersinia entocolitica</i>	Santos και συν., 2003.
<i>Aspergillus flavus, A. niger, Rhizopus nigricans, Penicillium glaucum</i>	Miao και συν., 2014.
<i>Staphylococcus epidermidis, Candida stellatoidea, C. tropicalis, C. krusei, S. cerevisiae, Rhodotorula glutinis, Torulopsis glabrata</i>	Cevikbas και συν., 1994.

### 1.5.3.2 Ενδείκνυται για ενήλικους με δυσανεξία στη λακτόζη

Πολλοί ενήλικοι δεν είναι ικανοί να μεταβολίσουν το σάκχαρο του γάλακτος, τη λακτόζη και υποφέρουν από γαστρεντερικές διαταραχές. Δυσανεξία της λακτόζης ή υπολακτασία, προκαλείται από ανεπάρκεια του ενζύμου λακτάση ή β-γαλακτοζιδάση, το οποίο διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Πιστεύεται ωστόσο ότι το μέρος εκείνο του πληθυσμού που δε μπορεί να μεταβολίσει τη λακτόζη, είναι σε θέση να ανεχθεί το γιαούρτι, δεδομένου ότι ο αριθμός των ζωντανών βακτηρίων του διατηρείται υψηλός. Οι De Vrese και συν., (2001) έδειξε ότι χάρη στο ρυθμιστικό αποτέλεσμα του γιαουρτιού, τα βακτηριακά του κύτταρα παραμένουν βιώσιμα, τα τοιχώματά τους διατηρούνται άθικτα κι έτσι η β-γαλακτοζιδάση μπορεί να περάσει προστατευμένη στη γαστρεντερική οδό.

Οι De Vrese και συν., (1992) μελέτησαν τις συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος χοίρων σε μια μερίδα των οποίων είχε χορηγηθεί κεφίρ από φρέσκους κόκκους, ενώ σε κάποιους άλλους είχε χορηγηθεί κεφίρ από θερμαινόμενους κόκκους. Το αποτέλεσμα ήταν ότι στην πρώτη περίπτωση, οι συγκεντρώσεις και η δραστηριότητα

της β-γαλακτοζιδάσης ήταν υψηλότερες και κατ επέκταση και η παραγόμενη γαλακτόζη απορροφούνταν πολύ καλύτερα.

### **1.5.3.3 Διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος**

Η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορεί να αποτελέσει έναν μηχανισμό, με τον οποίο ασκούν τα προβιοτικά βακτήρια τις ευεργετικές τους δράσεις. Οι Thoreux & Schmucker (2001), χρησιμοποίησαν πειραματικά αρουραίους ηλικίας 6 & 26 μηνών, στους οποίους είχε χορηγηθεί προηγουμένως κεφίρ, από κόκκους, και βρήκαν ενισχυμένη ανοσοαπόκριση του βλεννογόνου στα νεαρά ζώα, που φάνηκε από την υψηλότερη απόκριση της τοξίνης κατά της χολέρας (CT) IgA σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η συνολική τους εκτίμηση ήταν ότι το κεφίρ ασκεί μία πρόσθετη επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου, πιθανότατα παραγόμενη από συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων.

Οι εξωπολυσακχαρίτες που απαντώνται στους κόκκους κεφίρ, φαίνεται να είναι σε θέση να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι Murofushi και συν., (1983, 1986) εκχύλισαν κεφιράνη από κόκκους κεφίρ, παράγοντας ένα υδατοδιαλυτό κλάσμα πολυσακχαρίτη, με το οποίο τροφοδότησαν ποντίκια. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν μειωμένη ανάπτυξη όγκων, η οποία συνδέθηκε με μια απόκριση που προκαλείται από κύτταρα.

### **1.5.3.4 Αναστολή της ανάπτυξης των όγκων**

Οι επιδράσεις του αγελαδινού γάλακτος και του γάλακτος σόγιας που είχαν ζυμωθεί με κόκκους κεφίρ αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας των Liu και συν., (2002), οι οποίοι ουσιαστικά μελέτησαν τη δράση τους στην ανάπτυξη όγκων σε ποντίκια. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ανάπτυξης όγκων για 30 ημέρες και τα αποτελέσματα έδειξαν πως τόσο το κεφίρ από γάλα αγελάδας (~ 64,8%) όσο και το κεφίρ από γάλα σόγιας (~ 70,9%) ανέστειλαν σημαντικά την ανάπτυξη όγκων. Αντίθετα τα ποντίκια εκείνα, στα οποία είχε χορηγηθεί γάλα σόγιας που δεν είχε ζυμωθεί προηγουμένως με κόκκους κεφίρ, δεν παρουσίασαν μειωμένους όγκους μέχρι και την 30η ημέρα. Οι Liu και συν., (2002) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για τη συγκεκριμένη επίδραση κατά των όγκων ευθύνονται είτε οι ίδιοι οι

μικροοργανισμοί είτε τυχόν πολυσακχαρίτες, που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τη μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ.

Τη θετική επίδραση ενός υδατοδιαλυτού πολυσακχαρίτη, στην αναστολή όγκων ανέφεραν οι Shiomí και συν., (1982). Πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, που απομονώθηκε από κόκκους κεφίρ και ο οποίος ήταν σε θέση να αναστείλει την ανάπτυξη του καρκινώματος Ehrlich ή του σαρκώματος 180, είτε είχε χορηγηθεί στοματικά είτε ενδοπεριτοναϊκά (Shiomí και συν., 1982, Murofushi και συν., 1983). Έχει επίσης αποδειχτεί η ικανότητά του να φθάνει στον σπλήνα και τον θύμο των ποντικών ενώ πιο πρόσφατα, ένα κλάσμα του υδατοδιαλυτού πολυσακχαρίτη αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την πνευμονική μετάσταση του καρκινώματος στον πνεύμονα Lewis, είτε ο πολυσακχαρίτης χορηγήθηκε στοματικά πριν είτε μετά τη μεταμόσχευση όγκου.

#### **1.5.3.5 Επούλωση πληγών**

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του κεφίρ μπορούν να οδηγήσουν στη χρήση του σε μη παραδοσιακές εφαρμογές. Πράγματι, όταν αρουραίοι, εμβολιασμένοι με *S. aureus* έφεραν ανοικτές πληγές υποβλήθηκαν σε αγωγή με ένα τζελ από κόκκους κεφίρ, διαπιστώθηκε ότι τα τραύματα επουλώθηκαν με πολύ ταχύτερο ρυθμό από ό,τι συνέβη σε αρουραίους, που δεν έλαβαν αγωγή ή σε αντίστοιχους που έλαβαν φαρμακευτικό σκεύασμα (Rodrigues και συν., 2005). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τους Atalan και συν., (2003) σε μοντέλα κουνελιών με μολυσμένες ανοικτές πληγές. Αυτοί οι μειωμένοι χρόνοι επούλωσης είναι πιθανό να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η ικανότητα του κεφίρ να αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών και μυκητιακών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε καθαρότερο τραύμα, έναν ρόλο που φάνηκε να τον κατέχει η καζεΐνη (Atalan και συν., 2003, Huseini και συν., 2012). Ένας άλλος πιθανός παράγοντας είναι η ικανότητα να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα για να ενισχυθεί η διαδικασία επούλωσης.

### **1.6 Διατροφική αξία**

Εκτός από τα ωφέλιμα βακτήρια και τις ζύμες, το κεφίρ είναι πλούσιο σε βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία και τα απαραίτητα αμινοξέα για την καλύτερη λειτουργία

ορισμένων δραστηριοτήτων του οργανισμού. Αποτελεί καλή πηγή βιοτίνης, μιας Β βιταμίνης, που βοηθά στην καλύτερη απορρόφηση άλλων Β βιταμινών όπως φολικού οξέος, παντοθενικού οξέος και Β12. Οι Liutkevicius & Sarkinas (2004) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το κεφίρ περιέχει τις βιταμίνες Β5, Β2 και Β1 σε περίπου 3, <5 και <10 mg/kg αντίστοιχα. Επιπλέον διαθέτει τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, που ασκεί χαλαρωτική επίδραση στο νευρικό σύστημα του οργανισμού αλλά και τα μεταλλικά στοιχεία P, Ca, Mg με το πρώτο να συμβάλλει στη διάσπαση υδατανθράκων, λίπους και πρωτεϊνών και κατ' επέκταση στην κυτταρική ανάπτυξη και τα τελευταία να έχουν καταλυτικό ρόλο στη διατήρηση ενός υγιούς νευρικού συστήματος (Ottles & Cagindi, 2003). Οι Yükksekdağ και συν., (2004) έδειξαν ότι οι περισσότεροι από τους λακτόκοκκους που απαντώνται στο κεφίρ χαρακτηρίζονται από αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα με αποτέλεσμα την ενισχυμένη παραγωγή αμμωνίας και των αμινοξέων αλανίνης, σερίνης, λυσίνης και θρεονίνης. Το κεφίρ είναι μια καλή επιλογή για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, για εκείνους δηλαδή που δεν μπορούν να αφομοιώσουν σημαντικές ποσότητες λακτόζης, το κυρίαρχο σάκχαρο στο γάλα. Η περιεκτικότητα σε λακτόζη μειώνεται σε κεφίρ ενώ η αντίστοιχη της β-γαλακτοσιδάσης αυξάνεται κατά τη ζύμωση (Ottles & Cagindi, 2003).

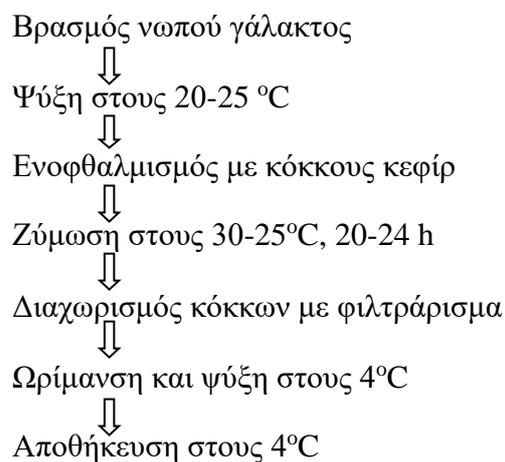
## **1.7 Διαδικασία παραγωγής κεφίρ**

Υπάρχουν διάφορες διαδικασίες παραγωγής ροφήματος κεφίρ, με πλέον χρησιμοποιούμενες αυτές της παραδοσιακής-οικιακής μεθόδου και της βιομηχανικής μεθόδου. Κεφίρ μπορεί να παραχθεί από οποιοδήποτε τύπο γάλακτος, αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο, καρύδας, ρυζιού, σόγιας. Επίσης το γάλα μπορεί να είναι παστεριωμένο ή απαστερίωτο, πλήρες ή χαμηλό σε λιπαρά.

### **1.7.1 Παραδοσιακή μέθοδος παρασκευής ροφήματος κεφίρ**

Η παραδοσιακή μέθοδος παραγωγής ροφήματος κεφίρ πραγματοποιείται με απευθείας προσθήκη των κόκκων κεφίρ. Το νωπό γάλα βράζεται και ψύχεται στους 20-25 °C, ενώ στη συνέχεια γίνεται ενοφθαλμισμός του 2-10% των κόκκων κεφίρ. Ακολουθεί διάστημα ζύμωσης, 18-20 h στους 20-25 °C, οι κόκκοι διαχωρίζονται από το γάλα με τούλι ή σουρωτήρι, στεγνώνονται σε θερμοκρασία δωματίου και

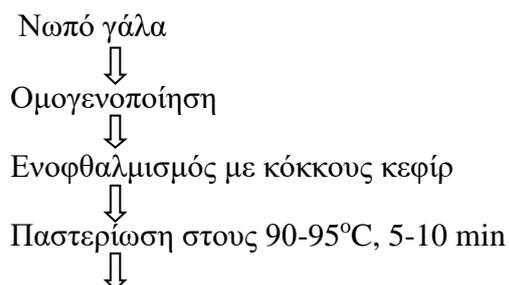
αποθηκεύονται σε χαμηλή θερμοκρασία μέχρι την επόμενη χρήση τους. Το κεφίρ αποθηκεύεται για ένα διάστημα στους 4°C και είναι έτοιμο για κατανάλωση (Otlés & Cagindi, 2003). Η αναλυτική παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής του κεφίρ, αποτυπώνεται στο σχήμα 5.



**Σχήμα 5:** Διαδικασία παραδοσιακής μεθόδου παρασκευής ροφήματος κεφίρ (Otlés & Cagindi, 2003).

### 1.7.2 Βιομηχανική μέθοδος παρασκευής ροφήματος κεφίρ

Στη βιομηχανική μέθοδο του κεφίρ, χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι αλλά στηρίζονται στην ίδια αρχή. Το πρώτο βήμα είναι η ομογενοποίηση του γάλακτος μέχρι 8% ξηρά ουσία και θερμική επεξεργασία στους 90-95 °C για 5-10 min. Ακολουθεί ψύξη στους 18-24 °C και ενοφθαλμισμός με το 2-8% καλλιέργειας κεφίρ (καλλιέργεια εκκίνησης σε δεξαμενές). Ο χρόνος ζύμωσης διαφοροποιείται στις 18-24 h . Το πήγμα διαχωρίζεται και μοιράζεται σε δοχεία. Μετά από ωρίμανση στους 12-14°C ή στους 3-10 °C για 24 h , το κεφίρ αποθηκεύεται στους 4°C (Koroleva, 1988, Otlés & Cagindi, 2003). Η αναλυτική βιομηχανική διαδικασία παραγωγής του κεφίρ, αποτυπώνεται στο σχήμα 6.

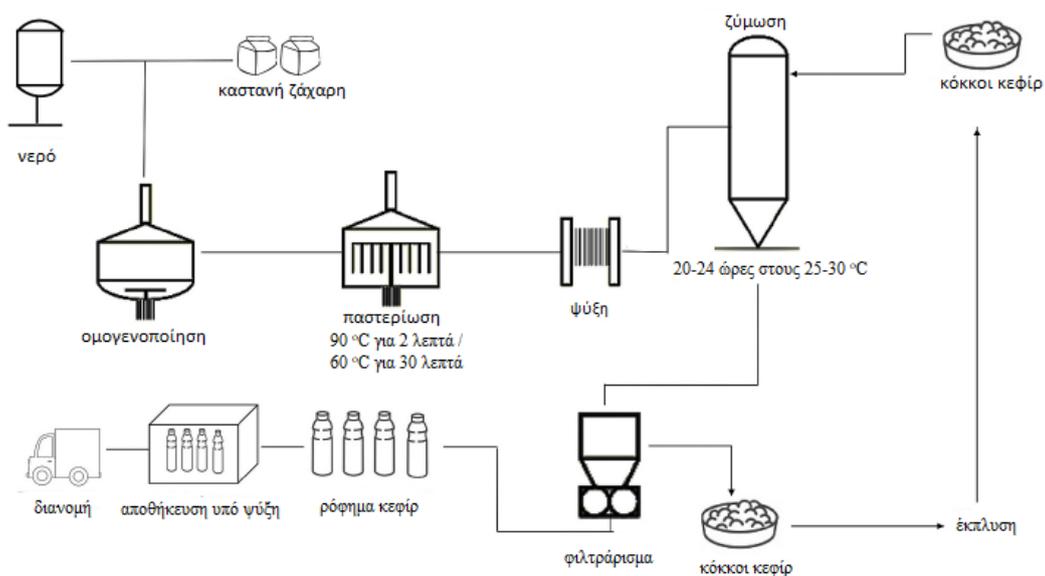


Ψύξη στους 18-24°C,  
 ↓  
 Ενοφθαλμισμός με εναρκτήριοιες καλλιέργειες (2-8%)  
 ↓  
 Επάσση στους 18-24°C, 18-24 h  
 ↓  
 Διαχωρισμός του πηγματος  
 ↓  
 Κατανομή σε περιέκτες

**Σχήμα 6:** Διαδικασία βιομηχανικής μεθόδου παρασκευής ροφήματος κεφίρ (Otlés & Cagindi, 2003).

### 1.7.3 Βιομηχανική μέθοδος παρασκευής ζαχαρούχου ροφήματος κεφίρ

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, οι κόκκοι κεφίρ (10% w / v) προστίθενται απευθείας στο παστεριωμένο και ψυγμένο υπόστρωμα και επιάζονται για περίπου 24 h στους 25-30 °C. Μετά τη ζύμωση, οι κόκκοι διαχωρίζονται από το μέσο με διήθηση/φιλτράρισμα μέσω αποστειρωμένου κόσκινου, πλένονται, ξηραίνονται σε θερμοκρασία δωματίου και διατηρούνται σε δεξαμενή ψύξης μέχρι τον επόμενο εμβολιασμό (Guzel-Seydim και συν., 2000, Otlés & Cagindi, 2003). Οι Guzel-Seydim και συν., (2000) αναφέρουν ότι μετά τη ζύμωση στους 25-30 °C για ένα διάστημα 20-24 ωρών, το προϊόν μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες ψύξης έως 20 ημέρες.



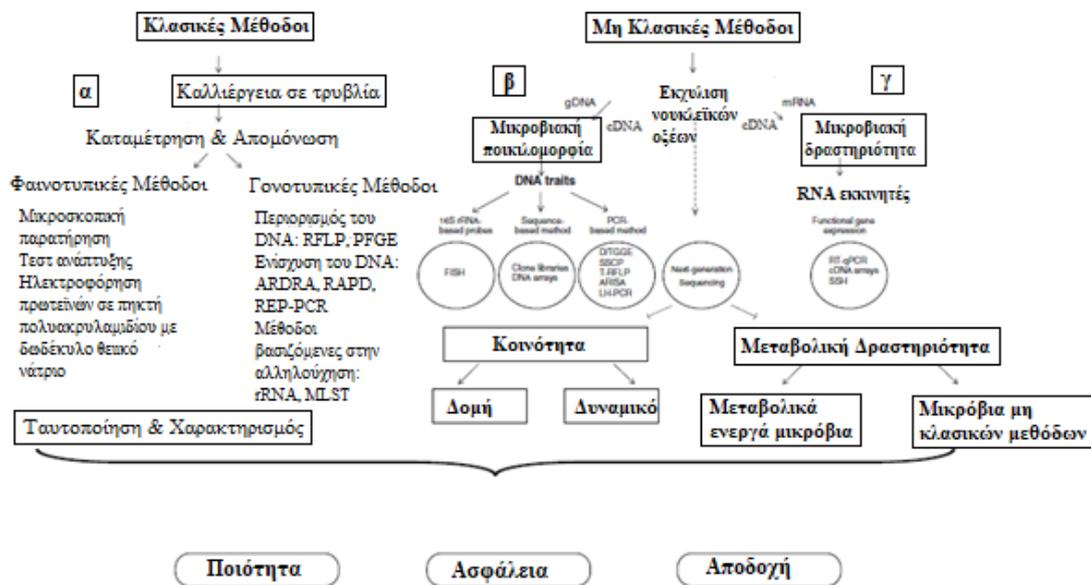
**Εικόνα 10:** Διάγραμμα ροής παρασκευής ζαχαρούχου ροφήματος κεφίρ (Fiorda και συν., 2017).

## 1.8 Μέθοδοι μελέτης των μικροοργανισμών

Ο τρόπος με τον οποίο προσεγγίζεται η μελέτη των μικροοργανισμών σε επίπεδο μοριακής βιολογίας έχει αδιαμφισβήτητα αλλάξει, προσφέροντας στην επιστημονική κοινότητα αξιόπιστες και αποτελεσματικές μεθόδους για ανίχνευση, ταυτοποίηση και τυποποίηση των μικροοργανισμών αυτών. Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μπορούν να επωφεληθούν και από τις τεχνικές που εξαρτώνται από την καλλιέργεια τους αλλά και από εκείνες που είναι ανεξάρτητες της καλλιέργειας τους. Η τυποποίηση αποτελεί μια ανάλυση που πραγματοποιείται σε απομονωμένα στελέχη και συνεπώς, είναι αυστηρά συσχετιζόμενη με μεθόδους που εξαρτώνται από την καλλιέργεια τους.

Οι μελέτες που επικεντρώνονται στις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας (Σχήμα 7α), πετυχαίνουν μερική αναγνώριση και τον έλεγχο των μικροοργανισμών στο εκάστοτε προϊόν. Από την άλλη μεριά οι μελέτες με τη χρήση μη παραδοσιακών μεθόδων (Σχήμα 7β), στοχεύουν σε μόρια τα οποία είναι εγγενή στους μικροοργανισμούς. Ο συνδυασμός και των δύο προσεγγίσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τη συνεισφορά μεμονωμένων μικροοργανισμών, που απαντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα (εξαρτώμενες από την καλλιέργεια) και για τον προσδιορισμό της ποικιλομορφίας και της κυριαρχίας των μικροβιακών πληθυσμών ή ειδών (ανεξάρτητες από την καλλιέργεια) καθώς και τη μικροβιακή τους δράση.

## Μικροοικοσύστημα Γαλακτοκομικών Προϊόντων



Σχήμα 7: Διάγραμμα ροής των εξαρτημένων & ανεξάρτητων από την καλλιέργεια μεθόδων (Ndoye και συν., 2011).

### 1.8.1 Κλασικές Μέθοδοι

Οι μέθοδοι εκείνες, που εξαρτώνται από την καλλιέργεια, έχουν οριστεί ως αυτές που συνίστανται σε απομόνωση και καλλιέργεια των στελεχών πριν από την ταυτοποίησή τους, σύμφωνα είτε με φαινοτυπικά είτε με γονοτυπικά χαρακτηριστικά (Ercolini και συν., 2001). Ωστόσο οι προσεγγίσεις αυτές συνοδεύονται από μία σειρά μειονεκτημάτων. Ένα από τα εμπόδια αυτά είναι η ανεπάρκειά τους ως προς την αξιόπιστη αναγνώριση πολλών βακτηριακών ειδών και την παρακολούθηση της ανάπτυξης και της δυναμικής συγκεκριμένων ειδών ή / και στελεχών σε σύνθετα βακτηριακά συστήματα. Κάτι τέτοιο απορρέει από το γεγονός ότι μόνο ένα μικρό κλάσμα μικροοργανισμών μπορεί να ανακτηθεί σε μέσα καλλιέργειας με ημι-τυχαιοποιημένους τρόπους διαλογής αποικιών με αποτέλεσμα τα προϊόντα απομόνωσης να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική ταξινομική απογραφή των μικροοργανισμών με ενεργή έκφραση γονιδίων στα διάφορα προϊόντα γάλακτος. Επιπλέον, οι τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια χαρακτηρίζονται εντατικοποιημένες, χρονοβόρες και δεν δίνουν πάντα σαφή αποτελέσματα, εξαιτίας των μεγάλων περιόδων καλλιέργειας με αποτέλεσμα ορισμένα είδη είτε να μην

μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro* είτε συχνά να εξαντλούνται από τα αριθμητικά πιο άφθονα μικροβιακά είδη (Ndoye και συν.,2011).

### **1.8.1.1 Ταυτοποίηση**

Αρκετά συχνά η ταυτοποίηση βακτηρίων και η ανάθεση ονόματος στους μικροοργανισμούς εκείνους, που έχουν απομονωθεί, αποτελεί ένα αρκετά δύσκολο εγχείρημα, ιδιαίτερα στην περίπτωση των παθογόνων βακτηρίων. Κάτι τέτοιο οδήγησε στην αυτοματοποίηση πολλών τεχνικών, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη στατιστικής και βιοπληροφορικής στη μικροβιολογία, επιφέροντας την τροποποίηση των συμβατικών διαδικασιών στα εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων και την ανάπτυξη μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης, ειδικά εκείνων που βασίζονται στην PCR.

### **1.8.1.2 Μέθοδοι υβριδισμού DNA-DNA**

Ένα ευρύ δυναμικό αναγνώρισης είναι διαθέσιμο χάρη στη χρήση ανιχνευτών DNA για γονίδια που κωδικοποιούν rRNA. Δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες αλληλουχίες rDNA γίνονται όλο και περισσότερο διαθέσιμες, έχουν βρεθεί ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα, τα οποία είναι ειδικά για διαφορετικά μικροβιακά είδη, με τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά να επισημαίνονται και να χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές σε πειράματα υβριδισμού, με DNA άγνωστων προϊόντων απομόνωσης. Η εισαγωγή μη ραδιενεργών μεθόδων επισημάνσης (π.χ. εκείνων που βασίζονται σε χημειοφωταύγεια) έχει διευκολύνει σημαντικά την εφαρμογή ανιχνευτών στη μικροβιολογία τροφίμων (Giraffa & Carminati, 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσέγγιση με υβριδισμό αποικίας με τη χρήση ειδικών για την ομάδα ανιχνευτών. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι επιτρέπει την ειδική διαφοροποίηση και ποσοτικοποίηση του πληθυσμού-στόχου χωρίς την ανάγκη απομόνωσης και υποκαλλιέργειας των αποικιών. Στον υβριδισμό αποικιών, τα βακτήρια τοποθετούνται σε μεμβράνες που έχουν στρωθεί σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και αφήνονται να σχηματίσουν αποικίες. Μετά τη λύση των αποικιών, ο υβριδισμός με έναν σημασμένο ανιχνευτή θα δείξει ποια και πόσες από τις αποικίες περιέχουν την αλληλουχία στόχο. Η πιο πρόσφατη ανάπτυξη υβριδισμού αποικιών είναι η επί τόπου ανίχνευση και ταυτοποίηση (ή ISH και η παραλλαγή της FISH) ολόκληρων κυττάρων με φθορίζοντα σημασμένα νουκλεοτίδια.

Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός ήταν μια δημοφιλής τεχνική στα ερευνητικά εργαστήρια της δεκαετίας του '90. Βασίζεται στην ταυτοποίηση κυττάρων που

περιέχουν ειδικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Οι олиγομερείς ανιχνευτές συζευγμένοι με φθορίζοντα μόρια υβριδοποιούνται στο στοχευόμενο DNA ή RNA τους και ο φθορισμός ανιχνεύεται με μικροσκοπική παρατήρηση (Bottari και συν., 2006).

Οι τεχνικές υβριδισμού δεν εφαρμόζονται ιδιαίτερα στο εργαστηριακό περιβάλλον επειδή τα πρωτόκολλα είναι γενικά χρονοβόρα, δαπανηρά και δυσκίνητα. Η εσφαλμένη ταυτοποίηση, λόγω της παρουσίας πανομοιότυπων αλληλουχιών στόχων ανιχνευτών σε φυλογενετικά διαφορετικούς οργανισμούς, αποτελεί ένα ακόμη εμπόδιο, το οποίο ωστόσο έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εμπορικών συσκευασιών για συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες (π.χ. παθογόνα είδη που σχετίζονται με τα τρόφιμα), συμβάλλοντας σε σημαντική μείωση του κόστους για τα εργαστήρια που εκτελούν τέτοιες δοκιμές. Επίσης, η έλλειψη δυνατότητας πολλαπλών υβριδισμών για ταυτόχρονες ταυτοποιήσεις για περισσότερα του ενός είδους, αποτελεί ένα ακόμη μειονέκτημα. Μια άλλη πρόσφατη βελτίωση ήταν η εισαγωγή της «έννοιας πολλαπλών ανιχνευτών», η οποία βασίζεται στην παραδοχή ότι το πρόβλημα της εσφαλμένης ταυτοποίησης μπορεί να μειωθεί με την ταυτόχρονη εφαρμογή πολλαπλών ανιχνευτών που στοχεύουν ανεξάρτητες θέσεις (Behr, και συν., 2000).

### **1.8.1.3 Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR**

#### **1.8.1.3.1 Random amplification of polymorphic DNA (PCR-RAPD)**

Το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA είναι μια τεχνική βασισμένη σε PCR, ικανή να διακρίνει μικροοργανισμούς βασιζόμενη σε γενετική παραλλαγή. Η RAPD περιλαμβάνει τη χρήση μικρών συνθετικών εκκινητών τυχαίας αλληλουχίας σε μια αντίδραση PCR, με αποτέλεσμα την ενίσχυση πολλών διακριτών προϊόντων DNA. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμεύουν ως εμπρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές και είναι συνήθως ικανοί να ενισχύουν ταυτόχρονα θραύσματα από 1 έως 10 γονιδιωματικές θέσεις. Τα ενισχυμένα θραύσματα, συνήθως με εύρος μεγέθους 0,5-5 kb, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται από την παρουσία ή απουσία ζωνών ειδικών μεγεθών. Αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές τυποποίησης, που εφαρμόζονται στα γαλακτοκομικά συστήματα σαν εργαλείο για το χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών που απομονώνονται από γαλακτοκομικά προϊόντα.

#### **1.8.1.4 Αλληλούχηση του DNA**

Το χρυσό πρότυπο για τη μικροβιακή ταυτοποίηση είναι αυτό της αλληλούχησης του DNA. Η αλληλούχηση του DNA γενικά ξεκινά με PCR ενίσχυση του DNA που κατευθύνεται σε συγκεκριμένες γενετικές περιοχές, ακολουθούν αντιδράσεις αλληλούχησης, οι οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν με χρήση αλληλουχιών DNA. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, ένα λέιζερ αργού διεγείρει αυτά τα επισημασμένα με φθορισμό προϊόντα και ανιχνεύονται αυτόματα. Τα δεδομένα που προκύπτουν αποθηκεύονται σε ψηφιακή μορφή για μεταγενέστερη επεξεργασία με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού.

Έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα ταυτοποίησης τα οποία στηρίζονται στην ακολουθία για την ανάλυση γονιδίων του οπερονίου rRNA (Giraffa & Carminati, 2008). Σχετικά με το οπερόνιο rRNA, το γονίδιο 16S rRNA ενισχύεται συνήθως για βακτηριακή ταυτοποίηση, ενώ το γονίδιο 26S rRNA χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση ευκαρυωτικών (μικρο-) οργανισμών. Μόλις προσδιοριστεί ολόκληρη η αλληλουχία γονιδίων, συγκρίνεται με αλληλουχίες από γνωστούς μικροοργανισμούς με τη βοήθεια εξειδικευμένων προγραμμάτων λογισμικού ή / και εργαλείων on-line. Συνηθίζεται η χρήση αλγορίθμων για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου (δενδρόγραμμα) που καθορίζει το κατά πόσο ταιριάζουν οι αλληλουχίες και, κατά συνέπεια, πόσο στενά συνδέονται οι μικροοργανισμοί.

Ενώ λοιπόν ο υβριδισμός DNA-DNA είναι η ανώτερη μέθοδος για την ταυτοποίηση του βακτηριακού είδους, η αλληλούχηση του 16S rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των ειδών Στελέχη με ομοιότητες αλληλουχιών 16S rRNA < 97 % ανήκουν σε διαφορετικά είδη, ενώ εκείνα με ομοιότητες αλληλουχίας > 97 % δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα το ίδιο είδος (Briczinski & Roberts, 2007).

#### **1.8.2 Μη κλασικές μέθοδοι**

Σε αντίθεση με τις τεχνικές που εξαρτώνται από την καλλιέργεια, οι μέθοδοι ανεξάρτητες της καλλιέργειας είναι αυτές, που δεν απαιτούν την απομόνωση των μικροοργανισμών σε ορισμένο μέσο, προκειμένου να εξασφαλίσουν την αναγνώριση και την παρακολούθηση ενός μικροσυστήματος σε επίπεδο είδους.

Ο Ercolini (2001) ανέλυσε τον πολύτιμο ρόλο των συγκεκριμένων προσεγγίσεων στη μελέτη της βιοποικιλότητας και την αναγνώριση των μικροβιακών ειδών. Εν συντομία, αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην άμεση εκχύλιση ολικού DNA ή RNA του

γαλακτοκομικού προϊόντος. Στη συνέχεια, το DNA ή το cDNA (μετά από αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA) ενισχύεται με PCR και τα προκύπτοντα δείγματα κλωνοποιούνται και αλληλουχίζονται για να κατασκευαστεί βιβλιοθήκη για αναγνώριση ειδών. Τα θραύσματα μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το σχηματισμό διακριτών περιοχών θερμικής (TGGE) ή χημικής (DGGE) μετουσίωσης ή το σχηματισμό διαφορετικών διαμορφώσεων μονόκλωνου DNA (SCCP), ωστόσο το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης θα είναι πάντοτε ένα αποτύπωμα. Το δακτυλικό αποτύπωμα θα αποτελείται από μια σειρά ζωνών που αντιστοιχούν σε όσο το δυνατόν περισσότερα μικροβιακά είδη και θα αντιπροσωπεύουν τη μικροβιολογική ταυτότητα του γάλακτος, των εκκινητών και των ενδιάμεσων προϊόντων. Η τελική ταυτοποίηση κάθε είδους μπορεί στη συνέχεια να ληφθεί με τον καθαρισμό και την αλληλούχηση κάθε ζώνης και σε σύγκριση με τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων.

#### **1.8.2.1 Μικροβιακή ποικιλομορφία**

Δεδομένου ότι τόσο οι πρωτογενείς, όσο και οι δευτερογενείς αλλά και οι τυχαίοι μικροβιακοί πληθυσμοί συμβάλλουν στη διαμόρφωση της ποιότητας του γαλακτοκομικού προϊόντος, η εφαρμογή των μεθόδων εκείνων, που είναι ανεξάρτητες της καλλιέργειας απασχολεί ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα (Ndoye και συν., 2011). Πιο αναλυτικά μέσα από τη χρήση των τεχνικών αυτών είναι εφικτή:

- η άμεση ταυτοποίηση των μελών μιας μικροβιακής κοινότητας και η εκτίμηση της αφθονίας τους
- η αξιόπιστη αποτύπωση σύνθετων βακτηριακών κοινοτήτων
- η ανάλυση της ποικιλομορφίας και της δυναμικής της κυρίαρχης μικροβιακής κοινότητας
- η σύγκριση χωρικών και χρονικών αλλαγών στη δομή της βακτηριακής κοινότητας
- η ακριβής ποσοτικοποίηση των ειδών-στόχων

#### **1.8.2.2 Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR**

Η ποιοτική ανάλυση της μικροβιακής σύστασης των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας μεθόδους που βασίζονται στην PCR, όπως η PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE), PCR-Thermal

Gradient Gel Electrophoresis (PCR-TGGE), Single-Strand Conformation Polymorphism PCR (SSCP-PCR), (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism -T-RFLP) κ.α.

#### **1.8.2.2.1 PCR-DGGE/ TGGE**

Η DGGE και η TGGE είναι οι δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μικροβιακής αποτύπωσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση κυρίαρχων μικροβιακών πληθυσμών και τον προσδιορισμό της ποικιλομορφίας και της δομής μικροβιακών κοινοτήτων, χωρίς γνώση εκ των προτέρων της σύστασης. Οι περιορισμοί αυτής της μεθόδου είναι παρόμοιοι με εκείνους άλλων μεθόδων που βασίζονται στην PCR, συμπεριλαμβανομένης της ασυνεπούς κυτταρικής λύσης και της εκχύλισης του DNA, της αναποτελεσματικότητας ενίσχυσης και της εξειδίκευσης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό του πληθυσμού (Briczinski & Roberts, 2007).

Και οι δύο μέθοδοι αποτελούνται από έναν ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων PCR σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, τυπικά με εκκινητές που στοχεύουν σε μεταβλητές περιοχές του 16S rDNA. Ο διαχωρισμός αυτός συνοδεύεται από μία βαθμίδωση από χημικά (ουρία και φορμαμίδιο στην DGGE) και φυσικά αποδιατακτικά (θερμοκρασία στην TGGE). Καθώς τα αμπλικόνια κινούνται μέσω της πηκτής, τα προϊόντα του δίκλωνου μορίου DNA αρχίζουν να τήκονται σε ένα συγκεκριμένο σημείο μετουσίωσης, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαμόρφωση του προϊόντος και να επιβραδύνεται η μετακίνηση, επιτυγχάνοντας μια μερική μετουσίωση της διπλής έλικας του DNA (Muyzer και συν., 1993). Για να αποφευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των προϊόντων του δίκλωνου μορίου DNA σε μονούς κλώνους, ένας από τους εκκινητές της PCR διαθέτει στο 5' άκρο, έναν "σφιγκτήρα GC" 30-50 βάσεων και δεδομένου ότι συμπεριφορά τήξης των προϊόντων της PCR εξαρτάται από την αλληλουχία, καθίσταται εφικτή η διάκριση των προϊόντων εκείνων των οποίων οι αλληλουχίες διαφέρουν κατά ένα μόνο ζεύγος βάσεων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δύο αμπλικόνια με την ίδια % περιεκτικότητα σε G + C μπορεί να εμφανίζουν τις ίδιες αποστάσεις μετακίνησης, παρά τις διαφορετικές αλληλουχίες DNA. Η PCR-T/ DGGE παράγει ένα αποτύπωμα μοναδικό στο βακτηριακό πληθυσμό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει τις αλλαγές σε μια χρονική περίοδο ή μετά από μια αλλαγή στη διατροφή ή κάποια άλλη παρέμβαση. Μολονότι οι PCR-T/ DGGE δεν αποτελούν ποσοτικές μεθόδους,

παράγουν ένα μοναδικό αποτύπωμα, το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση των προσωρινών αλλαγών, που συμβαίνουν σε ένα βακτηριακό πληθυσμό κατά την παραγωγή και την αποθήκευση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Για να ταυτοποιηθούν μεμονωμένα τμήματα σε ένα δείγμα, οι ζώνες που προκύπτουν, είτε συγκρίνονται με τη μετακίνηση των στελεχών αναφοράς είτε μπορεί να αποκοπούν και να αλληλουχηθούν.

### **1.8.2.2.3 qPCR/ RT-qPCR**

Δύο διαφορετικές εφαρμογές για την παρακολούθηση ειδικών μελών της μικροβιακής κοινότητας είναι η ποσοτική PCR (qPCR) και η ποσοτική PCR ανάστροφης μεταγραφής (RT-qPCR). Η τεχνική qPCR χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στις μελέτες DNA, ενώ η RT-qPCR είναι αφιερωμένη στη μελέτη ειδικών εκφρασμένων γονιδίων (mRNA) (Ndoye, 2011). Η τεχνολογία qPCR, με βάση την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός φθορίζοντα δείκτη είτε ενός ειδικού ανιχνευτή είτε ενός παράγοντα δέσμευσης DNA όπως η χρωστική SYBR green, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποτελεσματική ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση βακτηρίων σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων ή προϊόντων. Η qPCR έχει αρκετά πρόσθετα πλεονεκτήματα όπως η ταχύτητα και η αναπαραγωγικότητα και δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες δείγματος.

Ο Wittwer και συν., (2001) έχουν δηλώσει ότι υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για την qPCR με την πρώτη να περιλαμβάνει τη χρήση χρωστικών πρόσδεσης στο DNA όπως η SYBR GreenI, οι οποίες είναι εύκολο να σχεδιαστούν και να βελτιστοποιηθούν στις δοκιμασίες και είναι οικονομικά αποδοτικές. Όταν είναι ελεύθερη σε διάλυμα, η SYBR GreenI εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό, αλλά όταν συνδέεται σε δίκλωνο DNA, ο φθορισμός αυξάνεται πάνω από 1000 φορές. Γενικότερα όσο περισσότερο δίκλωνο DNA υπάρχει, τόσο περισσότερες θέσεις πρόσδεσης υπάρχουν για τη χρωστική, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση του DNA. Αυτή η ιδιότητα της χρωστικής παρέχει τον μηχανισμό που υποστηρίζει την εφαρμογή της για την παρακολούθηση της συσσώρευσης του προϊόντος PCR. Καθώς ο στόχος ενισχύεται, η αυξανόμενη συγκέντρωση του δίκλωνου DNA στο διάλυμα μπορεί να μετρηθεί άμεσα με την αύξηση του σήματος φθορισμού.

Απουσία ειδικής αλληλουχίας στόχου στην αντίδραση, ο φθορίζων ανιχνευτής δεν υβριδοποιείται και επομένως φθορισμός δεν υφίσταται. Όταν ο ανιχνευτής υβριδοποιηθεί με την επιθυμητή αλληλουχία στόχου, η χρωστική αναφοράς ενεργοποιείται και ανιχνεύεται ο φθορισμός. Το επίπεδο φθορισμού που ανιχνεύεται σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα ενισχυμένου στόχου σε κάθε κύκλο PCR.

## Σκοπός

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά δείγματα κόκκων κεφίρ, μήλου, βύσσινου και νερού με ζάχαρη και δαμάσκηνα. Σκοπός αυτής της εργασίας τέθηκε η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, που αποτελούν το μικροοικοσύστημα του παραδοσιακού κεφίρ, η μελέτη των τεχνολογικών ιδιοτήτων που σχετίζονται με την παραγωγή του, όπως η δυνατότητα πρωτεόλυσης, λιπόλυσης, το δυναμικό οξίνισης και η αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τέλος πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του ροφήματος κεφίρ σύμφωνα με παραδοσιακή μέθοδο, από τα στελέχη εκείνα των βακτηρίων και των ζυμών, με τις καλύτερες ιδιότητες, κάτι που συνοδεύτηκε από πρότυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης.

## **2. Υλικά & Μέθοδοι**

### **2.1 Δείγματα κόκκων κεφίρ**

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά δείγματα κόκκων κεφίρ, μήλου, βύσσινου και νερού. Πιο αναλυτικά οι κόκκοι κεφίρ μήλου και βύσσινου, παρασκευάστηκαν από χυμό μήλου και βύσσινου αντίστοιχα, με προσθήκη 5% κόκκων κεφίρ, ενώ οι κόκκοι νερού προέκυψαν κατόπιν προσθήκης ζάχαρης, δαμάσκηνων και κόκκων κεφίρ σε νερό. Η μετάβαση από τους κόκκους κεφίρ γάλακτος σε κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ έγινε με σταδιακή αντικατάσταση του γάλακτος με διάλυμα ζαχαρούχου νερού με δαμάσκηνα, συγκέντρωσης 20%-100%.

### **2.2 Πειραματική Διαδικασία**

#### **2.2.1 Κλασικές Μέθοδοι**

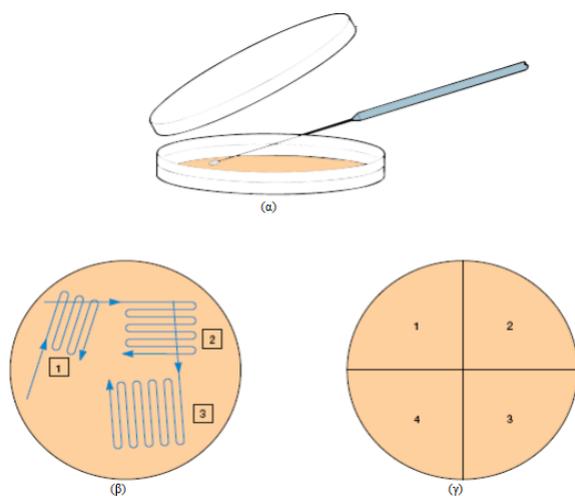
##### **2.2.1.1 Μικροβιακή Απαρίθμηση**

Αρχικό στάδιο της μικροβιακής απαρίθμησης αποτελεί η πορεία των διαδοχικών αραιώσεων, προκειμένου να επιτευχθεί η καταμέτρηση περισσότερο ευδιάκριτων και λιγότερο πυκνών αποικιών σε μεγαλύτερες αραιώσεις. Βάσει της διαδικασίας των διαδοχικών αραιώσεων μεταφέρθηκε 1 mL από τα τρία δείγματα κεφίρ σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 mL Ringer στον καθένα. Για την καταμέτρηση των ζυμών μεταφέρθηκαν 100  $\mu$ L, μέσω της μεθόδου της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία (spread plating) με Rose-Bengal Chloramphenicol (RBC, LABM, Lancashire, UK) agar, ενώ για εκείνη των βακτηρίων ακολουθήθηκε η μέθοδος της ενσωμάτωσης σε τρυβλία (pour plating) με de Mann Rogosa Sharpe (MRS, LABM) agar. Τέλος πραγματοποιήθηκε επίστρωση με MRS agar, έτσι ώστε να περιοριστεί το οξυγόνο και να επιτευχθούν όσο το δυνατόν περισσότερο αναερόβιες συνθήκες. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για τα βακτήρια και στους 25 °C για τις ζύμες, για διάστημα 24-48 ωρών και 2-5 ημερών αντίστοιχα. Με το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση των μικροβιακών αποικιών.

##### **2.2.1.2 Έλεγχος καθαρότητας μικροβιακών στελεχών**

Ο έλεγχος της καθαρότητας για τα διάφορα στελέχη ζυμών, πραγματοποιήθηκε σε αποικίες από τρυβλία με Brain Heart Infusion (BHI, LABM) agar ύστερα από τον

γραμμικό ενοφθαλμισμό τους (streaking) και επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία 25 °C για 5 ημέρες.



**Εικόνα 11: Τεχνική της γραμμικής εξάπλωσης τρυβλίων με μικροβιολογικό κρίκο (streaking).**

Για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar και επώαση στους 30 °C για 24-48 h . Παρασκευάστηκαν επιχρίσματα των μικροοργανισμών από τις καθαρές καλλιέργειες και χρώση κατά Gram και ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των μικροοργανισμών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός τόσο των βακτηρίων όσο και των ζυμών σε θρεπτικό ζωμό (nutrient broth), κι ακολούθησε σε κάθε περίπτωση, επώαση στους 30 και 25 °C για 24-48 h για τα βακτήρια και χρονικό διάστημα 5 ημερών, για τις ζύμες. Τέλος μεταφέρθηκε ποσότητα (1.5 mL) σε Eppendorf παρουσία γλυκερόλης, σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου και αποθήκευση στους -20°C.

### 2.2.1.3 Χρώση Gram

Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ταξινομικούς παράγοντες των μικροοργανισμών. Κι αυτό γιατί, ανάλογα με την αντίδραση που παρουσιάζουν τα βακτήρια στη χρώση Gram, διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: α) τα Gram- θετικά και β) τα Gram-αρνητικά βακτήρια, με τη διαφοροποίηση αυτή να οφείλεται στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος στις δυο ομάδες βακτηρίων.

Για την προετοιμασία του παρασκευάσματος:

- Τοποθετήθηκε μία σταγόνα απεσταγμένου νερού σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα.

- Αποστειρώθηκε ο μικροβιολογικός κρίκος κρατώντας τον πάνω από τον λύχνο Bunsen σε γωνία 60°.
- Αφέθηκε να κρυώσει για μερικά sec και παραλήφθηκε ορισμένη ποσότητα κυττάρων από το τρυβλίο.
- Αναμείχθηκαν τα κύτταρα με το νερό στην αντικειμενοφόρο πλάκα και εξαπλώθηκαν γύρω από μία μικρή περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας.
- Προσηλώθηκε το παρασκεύασμα με την βοήθεια του λύχνου Bunsen έτσι ώστε να επιτευχθεί αδρανοποίηση των ενζυμικών συστημάτων και σκλήρυνση των κυτταρικών δομών.
- Για τη χρώση των κυττάρων:
- Το προσηλωμένο παρασκεύασμα βάφτηκε με τη χρωστική του κρυσταλλικού ιώδες για 30 sec.
- Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με dH<sub>2</sub>O.
- Η αντικειμενοφόρος πλάκα καλύφθηκε με το διάλυμα ιωδίου και αφέθηκε να δράσει για 30sec.
- Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με dH<sub>2</sub>O.
- Αποχρωματίστηκε με 95% αλκοόλη.
- Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με dH<sub>2</sub>O.
- Μεταφέρθηκε η χρωστική σαφρανίνη για 20-30 sec.
- Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με dH<sub>2</sub>O.
- Το παρασκεύασμα στέγνωσε με τη βοήθεια του λύχνου Bunsen.
- Εξέταση του παρασκευάσματος στο μικροσκόπιο.

#### **2.2.1.4 Ανανέωση των μικροοργανισμών**

Για τον έλεγχο της καθαρότητας οι μικροοργανισμοί ανακαλλιεργούνταν (ανανέωση) δις. Στην περίπτωση τόσο των βακτηρίων όσο και των ζυμών, η ανανέωση έγινε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS & BHI broth αντίστοιχα). Πιο αναλυτικά ποσότητα ενφθαλμίσματος, ca. 1% του συνολικού όγκου, μεταφέρθηκε σε περιέκτες τ. Falcon<sup>®</sup>, με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS & BHI κι ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 48-72 h για τα βακτήρια και στους 25 °C για 18-24 h για τις ζύμες.

#### **2.2.1.5 Εκχύλιση του DNA**

Προκειμένου να γίνει η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια σε περιέκτες τ. Falcon<sup>®</sup> με BHI & MRS broth. Η ανανέωση πραγματοποιήθηκε όπως

περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.4. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 min, στους 4 °C, και έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα Ringer. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκείμενου και συλλογή του ιζήματος.

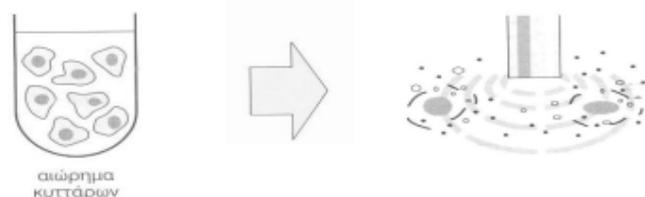
### *Λύση βακτηριακών κυττάρων*

Το πρώτο βήμα στην εκχύλιση του DNA αποτελεί η λύση των κυττάρων. Τα βακτηριακά κύτταρα περιέχουν στο εσωτερικό τους εκτός από τις πρωτεΐνες και μία σειρά από βιολογικά μακρομόρια (π.χ. νουκλεϊκά οξέα). Τα παραπάνω συστατικά διαχέονται στο διάλυμα, αφού προηγηθεί λύση των κυττάρων, κάτι που επιτυγχάνεται μέσα από τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Υπάρχουν δύο τεχνικές διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος, οι μηχανικές και οι μη μηχανικές. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η αποδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με τη μηχανική μέθοδο των υπερήχων (50 W x 2.5 min για την περίπτωση των βακτηρίων & 50 W x 5 min για την περίπτωση των ζυμών) προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν την έκβαση της πειραματικής διαδικασίας.

Η συσκευή υπερήχων αποτελείται από δύο κύριες μονάδες:

- Τη συσκευή που παράγει τα υπερηχητικά κύματα
- Έναν μεταδότη που μεταφέρει τα υπερηχητικά κύματα στο διάλυμα των κυττάρων

Τα βακτηριακά κύτταρα δέχονται όχι μόνο την ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων, που προκαλεί τη λύση τους, αλλά και τη δόνηση του μεταδότη, την οποία έχει προκαλέσει η ενέργεια των κυμάτων, η οποία επίσης συντελεί στη λύση των κυττάρων, κάτι που αποτυπώνεται στην εικόνα 12.



**Εικόνα 12: Μηχανική λύση κυττάρων με υπερήχους.**

Το μειονέκτημα στην περίπτωση των υπερήχων είναι ότι αυξάνει η θερμοκρασία του αιωρήματος και αυτή η αύξηση μπορεί να αλλοιώσει ή και να καταστρέψει επιθυμητές ουσίες προς μελέτη (π.χ. μετουσίωση πρωτεϊνών ή ευαίσθητων ενζύμων). Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρήση παγόλουτρου, μέσα στο οποίο τοποθετείται το στατό με τα κυτταρικά αιωρήματα και παραμένει σε όλη τη διάρκεια που εφαρμόζονται οι υπέρηχοι. Συμπληρωματικά για την αντιμετώπιση της αύξησης της θερμοκρασίας, η εφαρμογή των υπερήχων είναι διαλείπουσα.

### ***Απομόνωση του DNA***

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA αλλά και αυτού των ζυμών πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία:

- Αιώρηση βιομάζας σε 1 mL διαλύματος 1M sorbitol 0,1 M EDTA, pH 7,5.
- Υπέρηχοι ή προσθήκη 25 mg/ mL λυσοζύμης και επώαση στους 37°C/ 2 h .
- Φυγοκέντρηση και διάλυση ιζήματος σε 0.5 mL διαλύματος 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4.
- Προσθήκη 50  $\mu$ L 10% SDS και επώαση στους 65°C/ 30 min.
- Προσθήκη 0,2 mL οξικό κάλιο 5M και μεταφορά σε πάγο για 30 min.
- Φυγοκέντρηση, ενώ παράλληλα γίνεται προσθήκη 0,5 mL ισοπροπανόλης σε καθαρό Eppendorf.
- Μεταφορά υπερκείμενου στα καθαρά Eppendorf με την ισοπροπανόλη κ παραμονή σε  $T_{\text{δωματίου}}$  για 5 min.
- Φυγοκέντρηση κι επαναιώρηση σε 0,5 mL 70 % EtOH (x 2).
- Φυγοκέντρηση κι αιώρηση σε 50  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O.

### **2.2.1.6 Ποιοτικός έλεγχος του DNA**

Η ποσοτικοποίηση και ο ποιοτικός έλεγχος του DNA περιλαμβάνει τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 και 280 nm (εικόνα 14). Τα 260 nm είναι το μήκος κύματος που απορροφά το DNA. Απορρόφηση  $A_{260} = 1.0$  αντιστοιχεί σε 50  $\mu$ g/ mL DNA. Έπειτα λαμβάνεται η απορρόφηση στα 280 nm. Όταν ο λόγος  $A_{260}/ A_{280}$  είναι μεταξύ 1.8 και 2.0, το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικώς καθαρό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση. Από την άλλη όταν ο λόγος  $A_{260}/ A_{280}$  είναι μικρότερος του 1.8, τότε είναι πιθανή η ύπαρξη πρωτεϊνών ή άλλων ενώσεων που απορροφούν στα 280 nm, ενώ για λόγο  $A_{260}/ A_{280}$  μεγαλύτερο του 2.0, πιθανολογείται η ύπαρξη υπολειμμάτων χλωροφορμίου/ φαινόλης, αντιδραστηρίων που

χρησιμοποιούνται σε ορισμένα πρωτόκολλα απομόνωσης DNA. Και στις δύο περιπτώσεις συνίσταται η κατακρήμνιση με αιθανόλη ή ισοπροπανόλη για την απομάκρυνση επιμολύνσεων.



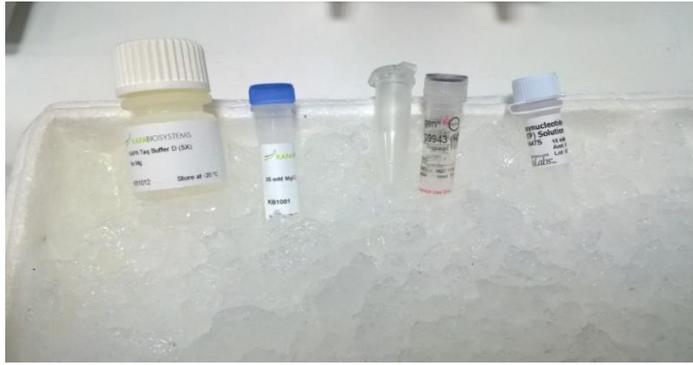
**Εικόνα 13: Τεχνικές ποσοτικοποίησης & ποιοτικού ελέγχου του DNA.**

#### **2.2.1.7 Ομαδοποίηση των στελεχών PCR-RAPD**

Η ομαδοποίηση των απομονωθέντων στελεχών πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση RAPD-PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητή το UBC155, τόσο στην περίπτωση των βακτηρίων και όσο και σε αυτή των ζυμών. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για τελικό όγκο 20  $\mu$ L, περιλαμβάνοντας 0.2 mM dNTPs (Peqlab, Erlangen, Germany), 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1.5  $\mu$ M εκκινητή UBC155 (5'-CTG GCG GCT G-3') και 2 UTAq πολυμεράση (Biotools, Madrid, Spain).

Οι συνθήκες θερμοκυκλοφορίας είναι οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 2 min.
- 10 κύκλοι των (95 °C για 1 λεπτό, 45 °C για 1 λεπτό μείωση στους 1 °C για κάθε κύκλο αντίδρασης μέχρι την θερμοκρασία των 36°C, 72 °C για 2 min).
- 30 κύκλοι των (95 °C για 1 λεπτό, 35°C για 1 λεπτό, 72 °C για 2 min).
- 72 °C για 10 min.



**Εικόνα 14: Θεμελιώδη στοιχεία της αντίδρασης PCR-RAPD.**

### **2.2.1.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης**

Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1,5% αгарόζη σε 1.0 x TAE) στα 100 V για 1.5 h, ενώ έχει προηγηθεί ενυδάτωση του διαλύματος και θέρμανση μέχρι πλήρους διαύγασης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για 1/ 2 h και φωτογράφιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του GelDocsystem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Η μετατροπή, η κανονικοποίηση και η επιπλέον ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκαν με το Bionumerics software (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) με συντελεστή Pearson και ανάλυση συμπλέγματος UPGMA.

### **2.2.1.9 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)**

Η αλληλούχηση του DNA χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μικροβιακής ταυτοποίησης. Η αλληλούχηση ξεκίνησε με δύο αντιδράσεις PCR τόσο για τα βακτήρια όσο και για τις ζύμες εκείνες, που επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά δείγματα από τα διαφορετικά πρότυπα στα δένδρογράμματα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, ποσοτικοποίηση, καθαρισμός των προϊόντων της PCR και ξανά ποσοτικοποίηση προτού σταλούν για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους.

#### **2.2.1.9.1 Αντίδραση PCR-RAPD**

Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση της 16S περιοχής του ριβοσωμικού DNA & της 26S περιοχής του rDNA των βακτηρίων και των ζυμών, αντίστοιχα. Η πρώτη αντίδραση της PCR στην περίπτωση των βακτηρίων υπολογίστηκε για τελικό όγκο 20  $\mu$ L, περιλαμβάνοντας 0.2 mM dNTPs (Peqlab,

Erlangen, Germany), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM P1V1 (5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3'), 0.2 μM P4V3 (5'-ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3') και 1U Taq πολυμεράση (Biotools, Madrid, Spain). Οι συνθήκες αντίδρασης PCR (thermocycling) είναι οι ακόλουθες:

- αρχική μετουσίωση στους 94°C για 5 min.
- 35 κύκλοι των (94 °C για 1 λεπτό, 42 °C για 1 λεπτό, 72 °C για 2 min).
- 72 °C για 10 min.

Στην άλλη περίπτωση πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση για την ενίσχυση της 26S περιοχής του ριβοσωμικού DNA των ζυμών, η οποία έτρεξε για τελικό όγκο 20 μL, περιλαμβάνοντας 0.2 mM dNTPs (Peqlab, Erlangen, Germany), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG AAG-3'), 0.2 μM NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), και 1 U Taq πολυμεράση (Biotools, Madrid, Spain). Οι συνθήκες αντίδρασης PCR (thermocycling) είναι οι ακόλουθες:

- αρχική μετουσίωση στους 94 °C για 5 min.
- 36 κύκλοι των (94 °C για 1 λεπτό, 52 °C για 1 λεπτό, 72 °C για 2 min).
- 72 °C για 5 min.

#### **2.2.1.9.2 Ηλεκτροφόρηση**

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5 % αγαρόζη σε 1.0 x TAE) στα 100 V για 1/ 2 h, ενώ έχει προηγηθεί ενυδάτωση του διαλύματος και θέρμανση μέχρι πλήρους διαύγασης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για 30 min και φωτογράφιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του GelDocsystem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### **2.2.1.9.3 Ποσοτικοποίηση & Καθαρισμός των PCR προϊόντων**

Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός & ποσοτικός έλεγχος με τη χρήση φωτόμετρου σε τυχαία δείγματα, τοποθετώντας 3 μL H<sub>2</sub>O ως διαλύτη και 3 μL δείγματος. Ο έλεγχος περιλαμβάνει τόσο τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 και 280 nm, όσο και αυτήν της συγκέντρωσης, που βρέθηκε περίπου στα 600 nm.

Η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων έγινε με το PCR cleanup/ Gelextraction, της MACHEREY-NAGEL. Το πρωτόκολλο καθαρισμού που ακολουθήθηκε είναι:

### 1. Τροποποίηση της κατάστασης πρόσδεσης του DNA

Προσαρμόστηκε ο όγκος του δείγματος στα 100  $\mu\text{L}$  και πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του δείγματος με διπλάσιο όγκο διαλύματος πρόσδεσης (200  $\mu\text{L}$ ), με προσεκτική ανάδευση και μεταφορά σε Eppendorf.

### 2. Πρόσδεση του DNA

Τοποθετήθηκε το NucleoSpin® Gel και η στήλη καθαρισμού της PCR (PCR Clean-up Column) σε Eppendorf (collection tube) των 2 mL, όπου μεταφέρθηκαν 700  $\mu\text{L}$  δείγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 rpm. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε η πρόσδεση των επιθυμητών αλληλουχιών πάνω στη στήλη καθαρισμού. Απομακρύνθηκε το έκλουσμα και επανατοποθετήθηκαν οι στήλες στα Eppendorf.

### 3. Έκπλυση της μεμβράνης από σίλικα

Προστέθηκαν 700  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα πλύσης στη στήλη καθαρισμού κι ακολούθησε φυγοκέντρηση για 60 sec στα 11.000 rpm. Απομάκρυνση του εκλούσματος, επανατοποθέτηση των στηλών στα Eppendorf και επαναφυγοκέντρηση για 60 sec στις 11.000 rpm.

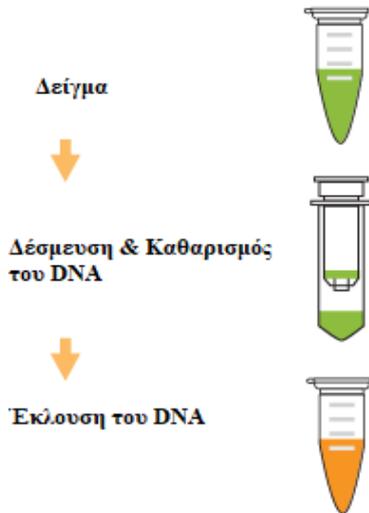
### 4. Ξήρανση της μεμβράνης

Ακολούθησε απομάκρυνση του εκλούσματος και εκ νέου μεταφορά των δειγμάτων για φυγοκέντρηση για 60 sec στα 11.000 rpm. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, καθώς είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης μέσα στη στήλη.

### 5. Έκλουση του DNA

Εκ νέου τοποθέτηση των στηλών καθαρισμού σε αποστειρωμένα Eppendorf των 1,5 mL, με προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκλουσης (elution buffer). Ακολούθησε παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 rpm για ανάκτηση του καθαρισμένου DNA από τα Eppendorf.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων ακολούθησε η διαδικασία της φωτομέτρησης των δειγμάτων DNA, με διαλύτη το νερό. Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος ανάλογα με τις τιμές φωτομέτρησης και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση.



Εικόνα 15: Διαδικασία καθαρισμού προϊόντων PCR.

## 2.2.2 Μη κλασικές Μέθοδοι

### 2.2.2.1 Απομόνωση συνολικού RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου NucleoZOL σε 4 δείγματα βιομάζας (μήλου, βύσσινου, νερού, γάλακτος), τα οποία συντηρούνταν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , κατόπιν προσθήκης  $100\text{ }\mu\text{L}$  RNA later. Η διαδικασία απομόνωσης βασίστηκε στο ακόλουθο πρωτόκολλο.

#### *Ομογενοποίηση*

Πραγματοποιήθηκε προσθήκη  $500\text{ }\mu\text{L}$  NucleoZOL σε ποσότητα ίση με  $200\text{ }\mu\text{L}$  για καθένα από τα 4 υγρά δείγματα RNA (μήλο-βύσσινο-νερό-γάλακτος), και λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων για  $10\text{ min}$ .

#### *Κατακρήμνιση των επιμολυντών*

Προστέθηκαν  $200\text{ }\mu\text{L}$  RNAase free water για κάθε  $500\text{ }\mu\text{L}$  NucleoZOL και πραγματοποιήθηκε ανάδευση (vortex) για  $15\text{ s}$ . Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για  $5\text{ min}$  και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για  $15\text{ min}$  στα  $12.000\text{ rpm}$ , σε θερμοκρασία δωματίου. Αναφορικά με το ίζημα των δειγμάτων, στο οποίο βρίσκονταν εν διαλύσει DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, ακολουθήθηκε η πορεία για την απομόνωση του DNA, (βλ. παράγραφο 2.4.1.4). Το υπερκείμενο από την άλλη, στο οποίο βρισκόταν διαλυτοποιημένο το RNA, μεταφέρθηκε (σε ποσότητα ίση με  $500\text{ }\mu\text{L}$ ) σε Eppendorf, με  $500\text{ }\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης το καθένα. Στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για  $10\text{ min}$  κι ακολούθως

τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 10 min. Τέλος πραγματοποιήθηκε απόχυση του υπερκλειμένου.

#### *Εκπλυση του RNA*

Μεταφέρθηκαν 500  $\mu\text{L}$  EtOH (75%) σε Eppendorf το ίζημα κι έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση στα 8.000 rpm για 3 min. Ακολούθησε απόχυση της EtOH και εκ νέου μεταφορά EtOH προς επανάληψη του βήματος έκλυσης του RNA.

#### *Ανασύσταση του RNA*

Προστέθηκαν περίπου 30  $\mu\text{L}$  RNase-free water για να επιτευχθεί συγκέντρωση ίση με 1-2  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$ . Τέλος τα 4 δείγματα επανααιωρήθηκαν (vortex), σε θερμοκρασία δωματίου, για 3 min.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος στα δείγματα DNA & RNA (βλ. παράγραφο 2.2.1.6).

#### **2.2.2.2 Σύνθεση του cDNA**

Η αντίστροφη μεταγραφή βελτιστοποιημένη για RT-PCR σε πραγματικό χρόνο καταλύεται από το αντιδραστήριο KitPrimeScript<sup>TM</sup>RT. Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιεί την PrimeScript<sup>TM</sup>RTase, η οποία διαθέτει εξαιρετική δυνατότητα επέκτασης και κάνει γρήγορη και αποτελεσματική σύνθεση προτύπου cDNA για Real Time PCR. Τα συστατικά του Kit είναι τα ακόλουθα:

- 5 X PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer (for Real Time) 400  $\mu\text{L}$
- PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 100  $\mu\text{L}$
- Oligo dT Primer 50  $\mu\text{M}$  100  $\mu\text{L}$
- Random 6 mers 100  $\mu\text{M}$  100  $\mu\text{L}$
- RNase Free dH<sub>2</sub>O 1mL
- EASY Dilution Buffer (for Real Time PCR) 1mL

Η αντίστροφη μεταγραφή στηρίζεται στην παρακάτω διαδικασία. Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάζεται σε χαμηλή θερμοκρασία και προετοιμάζεται μια ελαφρώς μεγαλύτερη ποσότητα κύριου μίγματος από ότι απαιτείται, προκειμένου να αντισταθμιστούν οι τυχόν απώλειες με πιπέτα. Μετά τη διανομή υποπολλαπλασίων αυτού του μίγματος σε μικροσωληνίσκους (microtubes), ειδικούς για την αντίδραση, προστίθεται το δείγμα RNA.

Για μία αντίδραση:

Αντιδραστήριο	Ποσό	Τελική Συγκέντρωση
5 × PrimeScript™ Buffer	2 μL	1 ×
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 μL	-
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μL	50 pmol
συνολικό RNA	-	-
RNase Free dH <sub>2</sub> O	-	-
Συνολικά	10 μL	-

Το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

- 37 °C, 15 min (Αντίστροφη μεταγραφή)
- 85°C, 5 sec (Αδρανοποίηση ανάστροφης μεταγραφάσης με θερμική επεξεργασία)
- 4 °C

### 2.2.2.3 Ταυτοποίηση με PCR (DGGE)

Ακολούθησε αντίδραση PCR (DGGE) τόσο για τα βακτήρια όσο και για τις ζύμες. Πιο αναλυτικά στην περίπτωση των ζυμών πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR των 250 νουκλεοτιδίων του 5' άκρου του 26S-rRNAγονιδίου, σε τελικό όγκο 25 μL, περιλαμβάνοντας 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Biotools), 0.3 μM εκκινητή NL1 (5'-GCC ATA TCA AGC GGA GGA AAA G-3') με ένα GC σφιγκτήρα (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG-3') προσκολλημένο στο 5' άκρο, 0.3 μM του εκκινητή LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') και 2U Taq πολυμεράση (Biotools). Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR-DGGE ήταν οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3 min
- 40 κύκλοι των (94 °C για 30 sec, 52 °C για 30 sec, 72 °C για 2 min)
- 72 °C για 10 min

Αναφορικά με τα βακτήρια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR της V6-V8 περιοχής του 16S-rRNA γονιδίου, σε τελικό όγκο 25 μL, περιλαμβάνοντας 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>,

0.25 mM dNTPs (Biotools), 0.2  $\mu$ M εκκινητή U968 (5'-GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC) με ένα GC σφιγκτήρα (clamp) (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG-3') προσκολλημένο στο 5' άκρο, 0.2  $\mu$ M του εκκινητή L1401 (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3') και 2U Taq πολυμεράση (Biotools). Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR-DGGE ήταν οι ακόλουθες:

- αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 5 min
- 30 κύκλοι των (94 °C για 1 λεπτό, 42°C για 45 sec, 72 °C για 3 min)
- 72 °C για 10 min

#### 2.2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή διαβαθμισμένης αποδιατακτικής σύστασης

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων (Dcode Universal Mutation Detection System) της Biorad, με πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (w/v), που περιέχει ουρία-φορμαμίδιο (Applichem, Darmstadt, Germany) σαν αποδιατακτικό παράγοντα με μια βαθμίδωση συγκέντρωσης από 30-50% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTAH<sub>2</sub>O, pH 8.5).

**Πίνακας 4: Διαλύματα υψηλής & χαμηλής συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση πηκτής διαβαθμισμένης αποδιατακτικής συγκέντρωσης**

Διάλυμα Συγκέντρωσης 0%	Διάλυμα Συγκέντρωσης 100%
20 mL Ακρυλαμίδη/Δις (40%)	20 mL Ακρυλαμίδη/ Δις (40%)
2 mL TAE 50x	40 mL Φορμαμίδιο
H <sub>2</sub> O ca. 100mL	2 mL TAE 50x
-	42 g Ουρία
-	H <sub>2</sub> O ca. 100mL

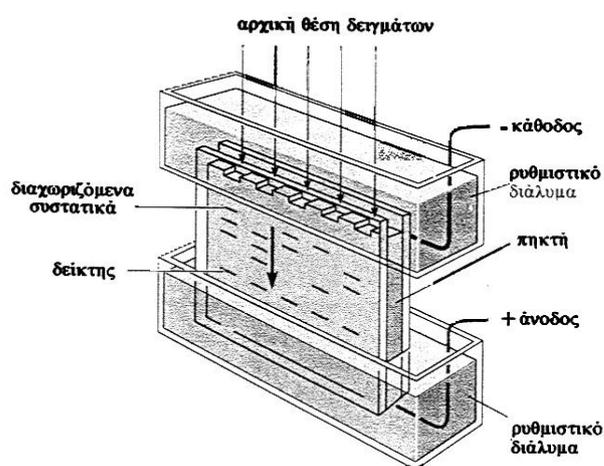
Παρασκευάστηκαν 2 πηκτές διαβαθμισμένης αποδιατακτικής σύστασης (30 % & 50%, Χαμηλής & Υψηλής Συγκέντρωσης, αντίστοιχα).

Πηκτή	50 % Υψηλή	30 % Χαμηλή
0% Χαμηλή	7.5 ml	11.5 ml



βακτήρια και τις ζύμες στους 30 και 25 °C, αντίστοιχα, για 5 ημέρες. Μετά την επώαση, τα τρυβλία με το άγαρ υποβλήθηκαν σε χρώση με 0.05 % (w/v) Coomassie Blue Brilliant Blue<sup>R</sup> (Sigma, ChemicalCo., St. Louis, MO.) για 60 min. Μετά από αποχρωματισμό με έκπλυση με απιονισμένο νερό, η παρουσία μιας διαηγούς ζώνης που περιβάλλει τις ενοφθαλμισμένες οπές, ήταν αυτή που υποδείκνυε πρωτεολυτική δραστηριότητα.

### **Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο**



**Εικόνα 16:** Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη για την επιβεβαίωση πρωτεολυτικής δραστηριότητας μέσω ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο, αρχικά παρασκευάστηκε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα πρωτεόλυσης, το οποίο μεταφέρθηκε για αποστείρωση, με σύσταση:

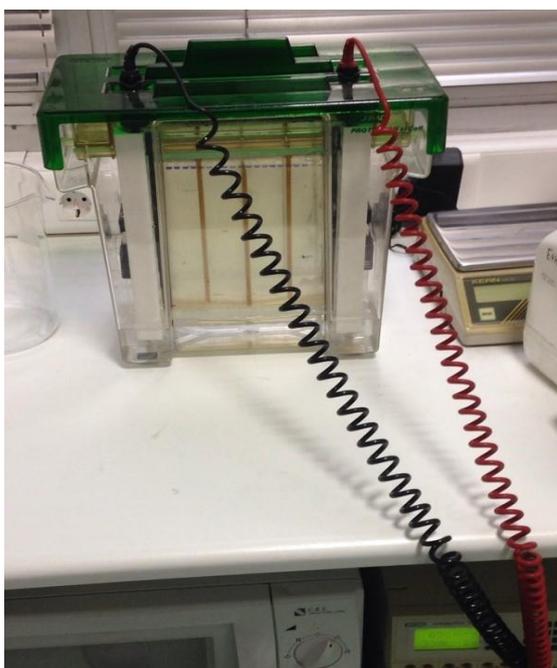
- Τριπτόνη                      0.5 %
- Εκχύλισμα ζύμης            0.25 %
- Γλυκόζη                        0.1 %
- Καζεΐνη                        1%
- pH 6,9

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανανέωση (βλ. παράγραφο 2.2.1.4) στο μίγμα πρωτεόλυσης που παρασκευάστηκε προηγουμένως, των βακτηρίων και των ζυμών

εκείνων, που εμφάνισαν πρωτεολυτική δράση στα τρυβλία. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων, απορρίπτοντας το ίζημα και κρατώντας το υπερκείμενο, που περιείχε τις πρωτεΐνες και μεταφορά στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να χρησιμοποιηθούν στην κάθετη ηλεκτροφόρηση.

Η προετοιμασία για την κάθετη ηλεκτροφόρηση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Paramithiotis και συν., 2000. Συνοπτικά αυτό περιελάμβανε την παρασκευή των πηκτών διαχωρισμού (12%, 0.375 M Tris, pH 8.8) και επιστοίβαξης (4%, 0.125 MTris, pH 6.8), και των stock διαλυμάτων.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκίνησε με ρύθμιση της έντασης του ρεύματος στα 30 mA. Αμέσως μόλις το ορατό μέτωπο της ηλεκτροφόρησης μετατοπίστηκε από την πηκτή επιστοίβαξης σε εκείνη του διαχωρισμού, αυξήθηκε η ένταση του ρεύματος στα 100 mA και διατηρήθηκε σταθερή μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή διαχωρισμού εμβαπτίστηκε σε διάλυμα καθήλωσης (με σύσταση: 50 % μεθανόλη & 3% φωσφορικό οξύ) για 1 h. Πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις της πηκτής με απιονισμένο νερό και μεταφέρθηκε σε ανακινούμενη τράπεζα για 15 min. Τέλος η πηκτή εμβαπτίστηκε σε χρωστική G-250 για 24 h κι έπειτα έλαβαν χώρα επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απιονισμένο νερό, ανά 2 h, προκειμένου να επιτευχθεί αποχρωματισμός έως μια επιθυμητή ένταση χρώματος.



Εικόνα 17: Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.

### 2.2.3.2 Λιπόλυση

#### *Μέθοδος Διάχυσης σε Στερεό Θρεπτικό Υπόστρωμα*

Η εκτίμηση της λιπολυτικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το κεφίρ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay) σύμφωνα με Paramithiotis και συν., (2010). Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση των βακτηρίων και των ζυμών, (βλ. παράγραφο 2.2.1.4). Παράλληλα παρασκευάστηκε ένα θρεπτικό υπόστρωμα αγαρόζης, για τα τρυβλία λιπόλυσης, με σύσταση:

- nutrient agar
- τριβουτυρίνη            1%
- DMSO                      0.25%
- pH 6.8

Μετά την αποστείρωση και τη σταθεροποίηση του θρεπτικού υλικού σε τρυβλία διαστάσεων 15 x 15 (cm<sup>2</sup>), δημιουργήθηκαν οπές με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur. Στη συνέχεια ποσότητα υπερκειμένουελεύθερων κυττάρων, βακτηρίων και ζυμών, αντίστοιχα, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη χρήση πιπέτας, σε τρυβλία πρωτεόλυσης κι ακολούθησε επώαση για 10 ημέρες στους 30 και 25 °C, αντίστοιχα.

#### *Τιτλοδοτική Μέθοδος*

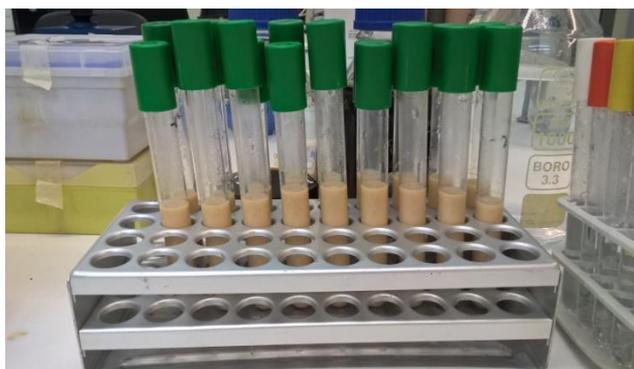
Σύμφωνα με τη 2η μέθοδο, η δραστικότητα λιπάσης μετρήθηκε με τιτλομετρική ανάλυση σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Kamzolova (2005) με τροποποιήσεις. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση (βλ. παράγραφο 2.2.1.4) των βακτηρίων και των ζυμών εκείνων, που εμφάνισαν λιπολυτική δράση σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το υπόστρωμα για τη λιπόλυση με:

- λεκιθίνη                    0,5 %
- τριβουτυρίνη            1%
- meat extract              3g/L
- peptone                    5g/L

Το θρεπτικό αυτό υλικό της λιπόλυσης μοιράστηκε σε κωνικές των 100 ml, ακολούθησε ενοφθαλμισμός των λιπολυτικών υποστρωμάτων με τα αντίστοιχα μικροβιακά στελέχη, με ποσότητες ενοφθαλμίματος ίσες με 1 % και μεταφορά σε θάλαμο επώασης στους 30 °C για 7 ημέρες. Παρασκευάστηκε και τυφλό διάλυμα, το οποίο επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στη διαφορά της τιτλοδοτούμενης λιπολυτικής δράσης των διαφόρων δειγμάτων από αυτήν του τυφλού. Η δραστηριότητα λιπάσης καθορίστηκε μέσω της ογκομετρικής ανάλυσης των λιπαρών οξέων που ελευθερώθηκαν με την προσθήκη 50 mM NaOH (μέχρι τελικό pH=9). Το ποσό του ενζύμου, που καταλύει την απελευθέρωση 1μmol λιπαρών οξέων ανά mL στους 30 °C, αποτελεί τη μονάδα δραστηριότητας λιπάσης.

### 2.2.3.3 Οξίνιση

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για δυνατότητα οξίνισης των βακτηριακών στελεχών του κεφίρ σε άπαχο γάλα (skimmed milk). Πιο αναλυτικά, αφού προηγήθηκε ανανέωση των βακτηριακών στελεχών σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS, (βλ. παράγραφο 2.2.1.4), ενοφθαλμίστηκε ποσότητα, ίση με το 1 %, σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL άπαχου γάλακτος στον καθένα. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C, για 24 h και στη συνέχεια μετρήθηκε το pH.



Εικόνα 18: Έλεγχος οξίνισης των βακτηριακών στελεχών σε άπαχο γάλα.

### 2.2.3.4 Αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria monocytogenes*

Επιλέχθηκαν 10 στελέχη *Listeria monocytogenes* (LQC 15203, 15146, 15200, 15171, 15197, 15162, 15142, 15176, 15132, 15175), ενοφθαλμίστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI κι ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 24 h. Παράλληλα

πραγματοποιήθηκε ανανέωση των βακτηριακών στελεχών σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS, (βλ. παράγραφο 2.2.1.4). Μετά το πέρας του διαστήματος επώασης, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός στερεού θρεπτικού υποστρώματος BHI με τα 10 στελέχη της *L. monocytogenes*. Το ενοφθαλμισμένο BHI Αγαρ μεταφέρθηκε σε τρυβλία 15 x 15 (cm<sup>2</sup>), και μετά τη στερεοποίησή του διανοίχθηκαν 10 οπές ανά τρυβίο. Σε ίδιο χρόνοαφού φυγοκεντρήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη, μεταφέρθηκε ποσότητα υπερκειμένου στις οπές των τρυβλίων κι ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 24-48 h .

#### **2.2.4 Οικιακή παρασκευή ροφήματος κεφίρ**

Τμήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η οικιακή παρασκευή ροφήματος κεφίρ, από τους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από τους κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ.

Η παρασκευή ξεκίνησε σε εργαστηριακό επίπεδο, με τη μεταφορά ποσότητας εμβολίου, ίσης με το 1% του συνολικού όγκου, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS για τα βακτήρια και BHI για τις ζύμες) κι επώαση στους 30 °C για 24 h. Ακολούθησε έλεγχος καθαρότητας των αποικιών, εκ νέου ενοφθαλμισμός και επώαση στις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μετά το πέρας του προβλεπόμενου διαστήματος επώασης έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων (3.500 rpm, 15 min, 4 °C). Πραγματοποιήθηκε απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη από 0.5 mL διαλύματος Ringer, σε κάθε περιέκτης τ. Falcon®, ανάδευση (vortex) και μεταφορά του περιεχομένου σε αποστειρωμένα Eppendorf. Ακολούθησε ακόμη μία φυγοκέντρηση (12.000 rpm, 15 min, 4 °C) με προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου.

Προς αποφυγή επιμολύνσεων η παρασκευή του ροφήματος κεφίρ συνεχίστηκε σε οικιακό επίπεδο, με μεταφορά του περιεχομένου των Eppendorf σε γυάλινο δοχείο με ήδη παστεριωμένο γάλα. Πιο αναλυτικά ποσότητα εμβολίου μονοκαλλιέργειας ζυμών ή βακτηρίων, ή και συγκαλλιέργεια των δύο παραπάνω, που προέκυπτε με τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, μεταφερόταν κάθε φορά σε 500 mL παστεριωμένου γάλακτος, σε θερμοκρασία 20-25 °C. Το ενοφθαλμισμένο γάλα παρέμενε για 24-48 h στους 25 °C, σε σκιερό μέρος έως ότου ολοκληρωνόταν η ζύμωση (Irigoyen και συν., 2005, Cais-Sokolińska και συν., 2016). Μετά το πέρας του προβλεπόμενου διαστήματος επώασης, ακολουθούσε διαχωρισμός του γάλακτος από τους κόκκους

του μέσω φιλτραρίσματος και διατήρηση του προϊόντος κεφίρ σε θερμοκρασία ψύξης, 4 °C, για 18-24 h. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μέτρηση pH, οξύτητας και μικροβιακή απαρίθμηση των δειγμάτων. Η μέτρηση της οξύτητας πραγματοποιήθηκε με ογκομέτρηση με διάλυμα NaOH (N/10).

### **2.2.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση του ροφήματος κεφίρ**

Μετά την οικιακή παρασκευή των προϊόντων κεφίρ, και τον ποιοτικό έλεγχο των αντίστοιχων δειγμάτων ακολουθούσε η οργανοληπτική αξιολόγησή τους, από ένα πάνελ δοκιμαστών που κάθε φορά ήταν αποτέλεσμα της διαθεσιμότητας και της προθυμίας των ατόμων αυτών να συμμετάσχουν στη μελέτη. Όπως αναγράφεται και στο αντίστοιχο έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου που επισυνάπτεται στη συνέχεια, η εκτίμηση των δειγμάτων έγινε ως προς 4 βασικές συνιστώσες, την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση και την υφή, ενώ στο τέλος ο κάθε δοκιμαστής καλούνταν να προβεί και σε μια γενικότερη αξιολόγηση του δείγματος. Όλες οι παραπάνω εκτιμήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια αυξανόμενη κλίμακα από το 0 έως το 10, με την τιμή 0 να αντιπροσωπεύει το "ανεπαίσθητο" και το 10 το "περισσότερο αισθητό".

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Κλασικές Μέθοδοι

##### 3.1.1 Μικροβιακή Απαρίθμηση

Πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση του πληθυσμού τόσο των βακτηρίων όσο και των ζυμών, τα οποία απομονώθηκαν από τους κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ μέσω της μεθόδου της ενσωμάτωσης του δείγματος με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και μέσω της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία (spread plating) με RBC agar, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης παρατίθενται στον πίνακα 5, LOG (CFU/g).

**Πίνακας 5: Μικροβιακή απαρίθμηση των αποικιών βακτηρίων και ζυμών που απομονώθηκαν από κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ, LOG (CFU/g).**

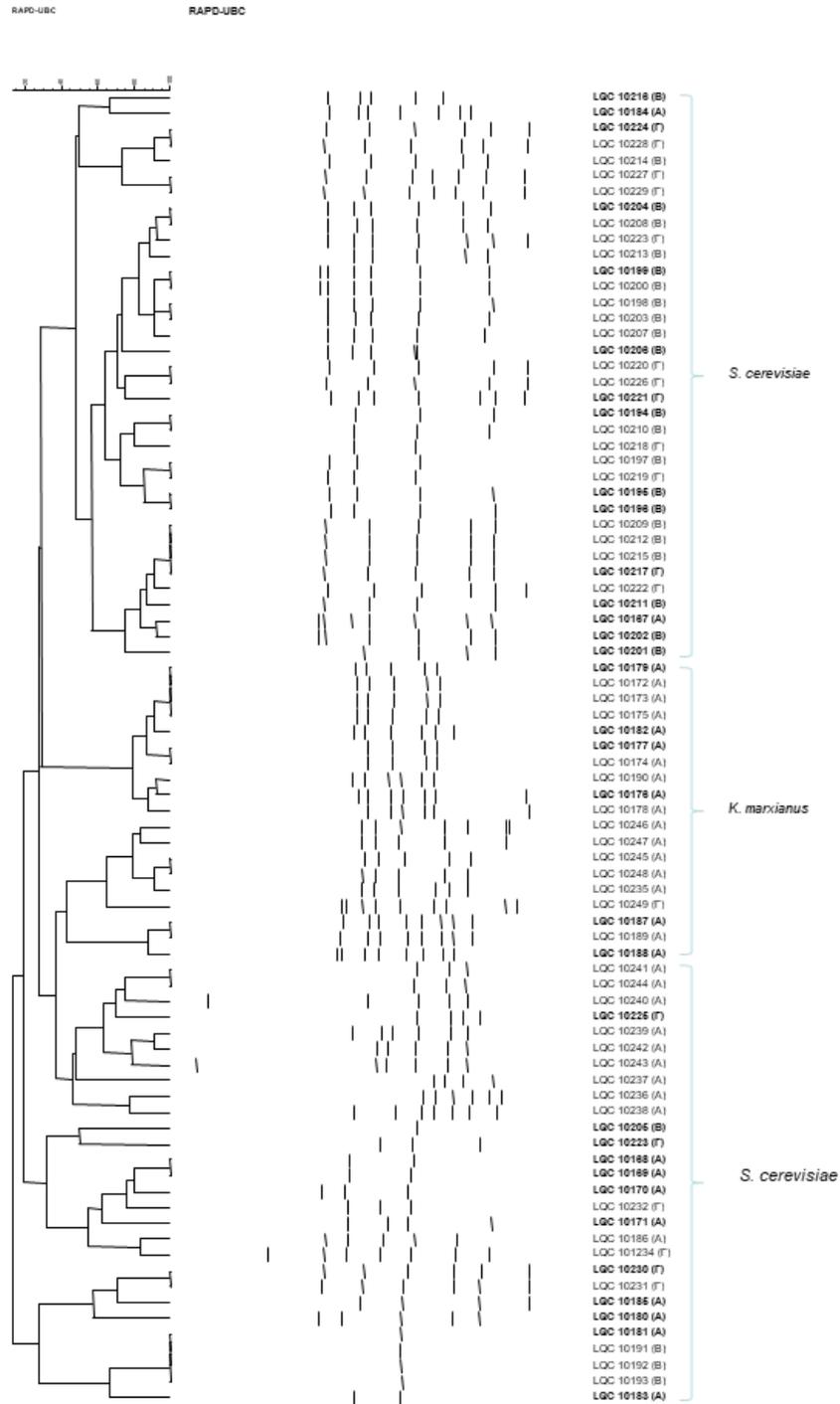
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΕΦΙΡ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	ΖΥΜΕΣ
ΝΕΡΟ	4.32	6.28
ΜΗΛΟ	4.85	6.58
ΒΥΣΣΙΝΟ	4.34	6.41

Ακολούθησε ποιοτικός & ποσοτικός έλεγχος του DNA των στελεχών βακτηρίων και των ζυμών, που απομονώθηκαν από τους κόκκους κεφίρ παρατίθενται στν πίνακα 15, Παράρτημα I.

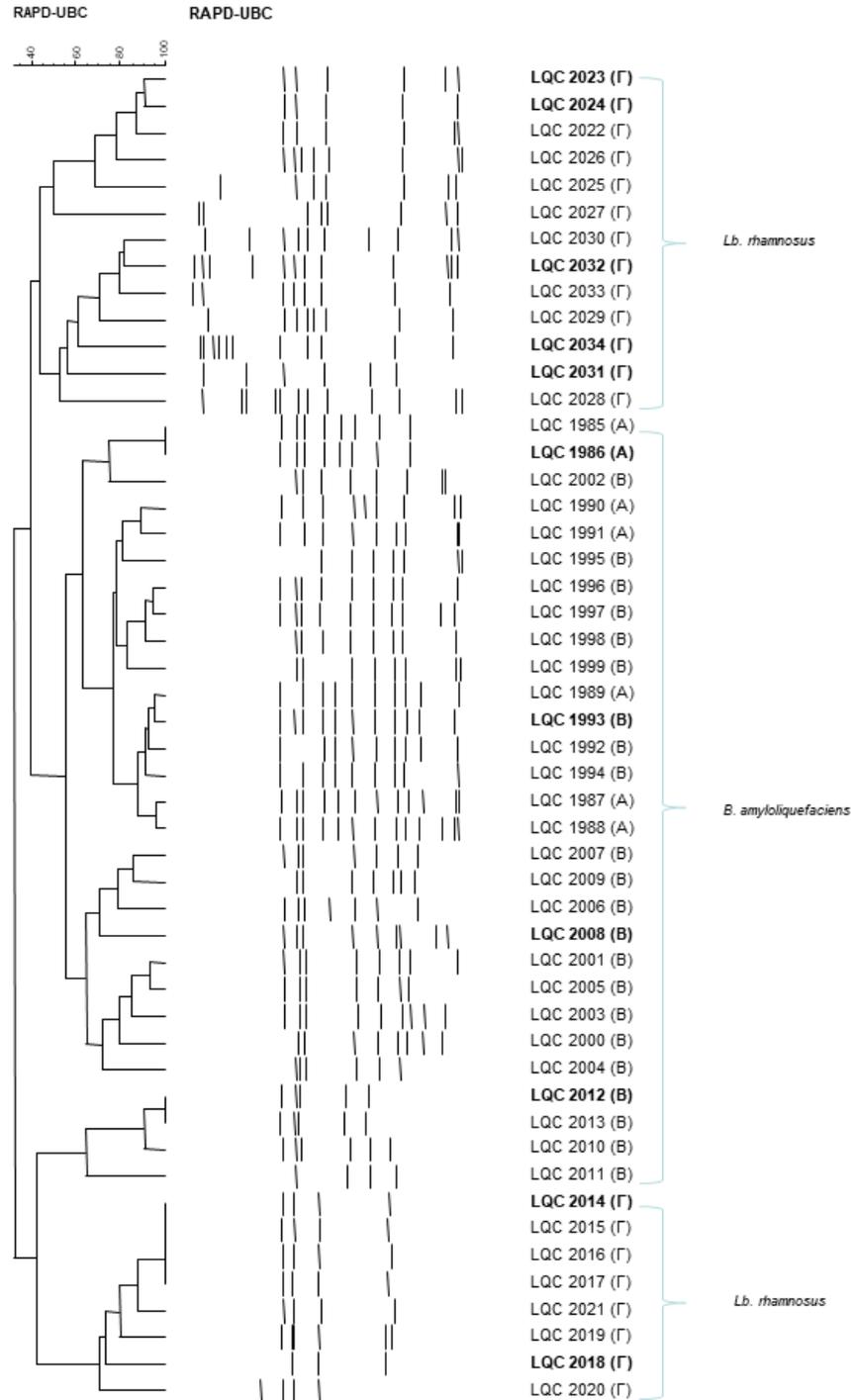
##### 3.1.3 Ταυτοποίηση

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση ομάδων της PCR-RAPD των στελεχών των ζυμών και των βακτηρίων, με εκκινητή το UBC155. Συνολικά απομονώθηκαν 83 στελέχη ζυμών και 50 στελέχη βακτηρίων αντίστοιχα, τα οποία διαχωρίστηκαν σε επιμέρους ομάδες. Ένα με τρία αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε μικροβιακή ομάδα υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση της περιοχής V1-V3 του γονιδίου του 16S-rRNA στην περίπτωση των βακτηρίων και της D1/ D2 περιοχής του γονιδίου του 26S-rRNA σε εκείνη των ζυμών, τα αποτελέσματα των οποίων αποτυπώνονται στον πίνακα 6. Η ομαδοποίηση των στελεχών αποτυπώνεται στις εικόνες 21 & 22, όπου η απόσταση

καταδεικνύεται από το συντελεστή συσχέτισης ( $r^2$ ) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση UPGMA. Τα στελέχη των ζυμών ταυτοποιήθηκαν ως *S. cerevisiae* και *K. marxianus*, ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν την ταυτοποίησή τους ως *Lb. rhamnosus* και *Bacillus amyloliquefaciens*.



**Εικόνα 19:** Ομαδοποίηση των στελεχών με RAPD-PCR (UBC155 ως εκκινητής). Η απόσταση καταδεικνύεται από το μέσο συντελεστή συσχέτισης ( $r^2$ ) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση UPGMA. Τα είδη των ζυμών ταυτοποιήθηκαν, κατόπιν αλληλούχησης του γονιδίου του 26S-rRNA, ως *S.cerevisiae* & *K. marxianus*.



**Εικόνα 20:** Ομαδοποίηση των στελεχών με RAPD-PCR (UBC155 ως εκκινήτης). Η απόσταση καταδεικνύεται από το μέσο συντελεστή συσχέτισης ( $r\%$ ) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση UPGMA. Τα είδη των βακτηρίων ταυτοποιήθηκαν, κατόπιν αλληλούχησης του γονιδίου του 16S-rRNA, ως *Lb. rhamnosus* & *B. amyloliquefaciens*.

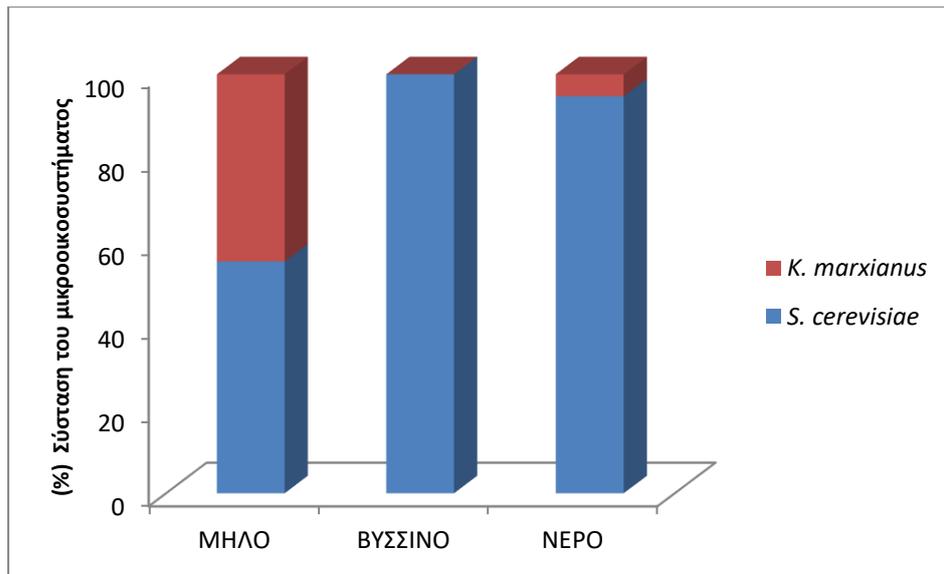
Πιο αναλυτικά στην εικόνα 21 αποτυπώνεται η ομαδοποίηση των ζυμών που απομονώθηκαν από το κεφίρ. Η πρώτη ομάδα δημιουργήθηκε με βάση το κυρίαρχο είδος που είναι αυτό του *S. cerevisiae*, ενώ τα στελέχη που περιλαμβάνονται ανήκουν

και στις τρεις πηγές προέλευσης του κεφίρ (μήλο, βύσσινο, νερό). Η δεύτερη ομάδα αφορά στα στελέχη των ζυμών που απομονώθηκαν κυρίως από κεφίρ μήλου, τα οποία ανήκουν στο είδος *K. marxianus*, ενώ παρατηρείται κι ένα ακόμη στέλεχος του είδους *K. marxianus* που απομονώθηκε από κεφίρ βύσσινου. Η τελευταία ομάδα αναφορικά με τις ζύμες, περιλαμβάνει στελέχη και από τις τρεις πηγές προέλευσης, τα οποία ανήκουν και πάλι στο είδος *S. cerevisiae*, με τα περισσότερα να έχουν ως πηγή προέλευσης το κεφίρ μήλου.

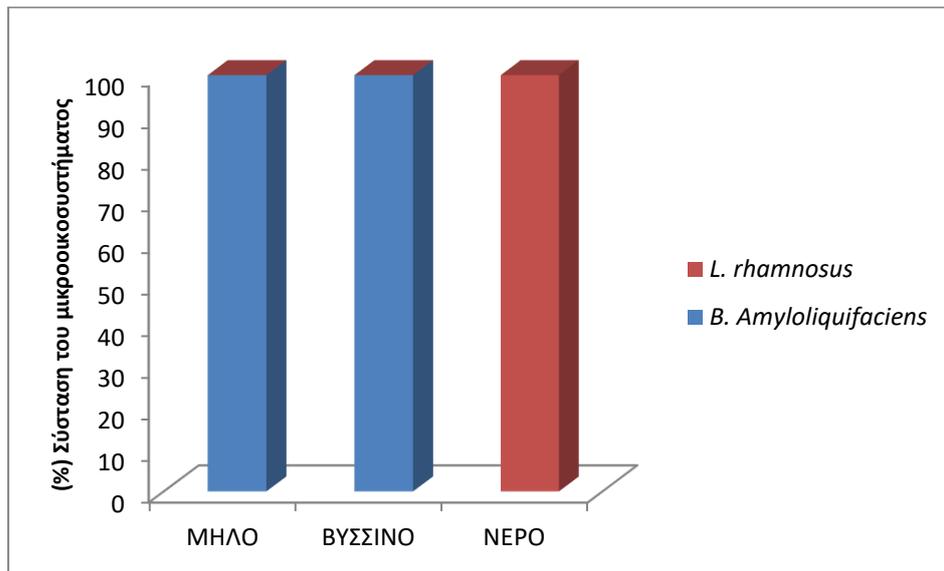
Στην περίπτωση των βακτηρίων, δημιουργήθηκαν και πάλι τρεις ομάδες, με βάση το είδος που ταυτοποιήθηκε (εικόνα 22). Στην πρώτη ομάδα τα στελέχη των βακτηρίων ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus* και η πηγή προέλευσής τους είναι αποκλειστικά το κεφίρ νερού. Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται στελέχη με πηγή προέλευσης το κεφίρ μήλου και βύσσινου, που ανήκουν στο είδος το *B. amyloliquefaciens* ενώ η τελευταία ομάδα δημιουργήθηκε με βάση το ταυτοποιούμενο είδος, που είναι και πάλι είναι αυτό του *Lb. rhamnosus*, με τα στελέχη των βακτηρίων να έχουν απομονωθεί από κεφίρ με πηγή προέλευσης το νερό.

Στα παρακάτω σχήματα (9 & 10), αποτυπώνεται η % σύσταση του μικροοικοσυστήματος του κεφίρ, ξεχωριστά για την περίπτωση των ζυμών και των βακτηρίων. Αναφορικά με τις ζύμες, και από τα τρία δείγματα κεφίρ, απομονώθηκαν συνολικά 83 στελέχη, από τα οποία τα 38 απαντώνται στο κεφίρ μήλου, τα 26 στο κεφίρ βύσσινου και τα 19 στο κεφίρ νερού. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, το κεφίρ μήλου χαρακτηρίζεται από σχετικά ίσες αναλογίες σε *K. marxianus* και *S. cerevisiae* σε ποσοστά 44.7 και 55.3 % αντίστοιχα, με τη διαφοροποίηση αυτή να αμβλύνεται στα δείγματα βύσσινου και νερού. Πιο αναλυτικά, στο κεφίρ νερού έχουμε επικράτηση του είδους *S. cerevisiae*, έναντι του *K. marxianus*, με % σύσταση 94.7 και 5.3 αντίστοιχα, ενώ στο κεφίρ βύσσινου παρατηρείται 100% επικράτηση του *S. cerevisiae*.

Στην περίπτωση των βακτηρίων και από τα τρία δείγματα κεφίρ απομονώθηκαν συνολικά 50 στελέχη, 7 στο κεφίρ μήλου, 22 στο κεφίρ βύσσινου και 22 στο κεφίρ νερού. Τόσο στο κεφίρ μήλου όσο και στο κεφίρ βύσσινου παρατηρείται 100% σύσταση σε *B. amyloliquefaciens*, ενώ στο κεφίρ νερού έχουμε 100% επικράτηση του *Lb. rhamnosus*.



Σχήμα 8: % Σύσταση του μικροοικουστήματος των κόκκων κεφίρ, με πηγή προέλευσης το μήλο, βύσσινο, νερό, σε επίπεδο ζυμών.

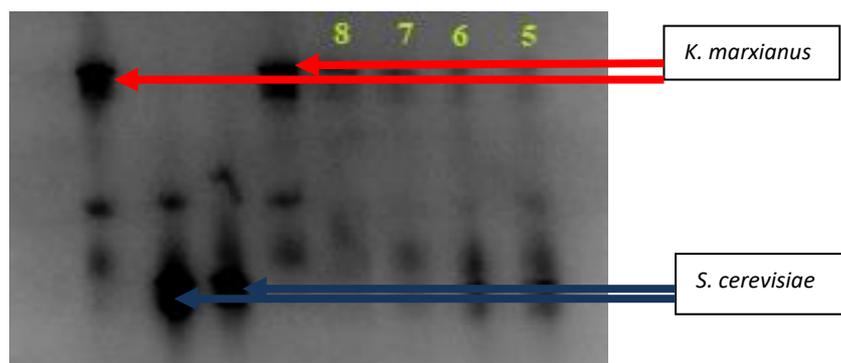


Σχήμα 9: % Σύσταση του μικροοικουστήματος των κόκκων κεφίρ, με πηγή προέλευσης το μήλο, βύσσινο, νερό, σε επίπεδο βακτηρίων.

**Πίνακας 6: Φυλογενετική θέση επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων και ζυμών, που βασίστηκε στην αλληλούχηση της V1-V3 περιοχής του γονιδίου του 16S-rRNA και της D1/D2 περιοχής του 26S-rRNA, αντίστοιχα.**

	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΛΗΣΙΕΣΤΕΡΗ ΣΧΕΣΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ (%)
<b>ZYMEΣ</b>	LQC 10194	<i>S. cerevisiae</i>	MG017543.1	99
	LQC 10195	<i>S. cerevisiae</i>	MG017587.1	99
	LQC 10196	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	99
	LQC 10199	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	99
	LQC 10201	<i>S. cerevisiae</i>	MG017587.1	99
	LQC 10202	<i>S. cerevisiae</i>	MG017588.1	99
	LQC 10204	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	99
	LQC 10205	<i>S. cerevisiae</i>	JQ964228.1	100
	LQC 10206	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	100
	LQC 10211	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100
	LQC 10216	<i>S. cerevisiae</i>	KR069090.1	100
	LQC 10167	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	100
	LQC 10168	<i>S. cerevisiae</i>	JQ964228.1	99
	LQC 10170	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100
	LQC 10171	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100
	LQC 10176	<i>S. cerevisiae</i>	KJ660850.1	99
	LQC 10177	<i>K. marxianus</i>	KJ491106.1	99
	LQC 10179	<i>K. marxianus</i>	KJ491106.1	99
	LQC 10180	<i>K. marxianus</i>	KJ491106.1	100
	LQC 10181	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100
	LQC 10182	<i>K. marxianus</i>	MH244202.1	100
	LQC 10183	<i>S. cerevisiae</i>	KJ660848.1	100
	LQC 10184	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	100
	LQC 10185	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	99
	LQC 10187	<i>K. marxianus</i>	KJ491106.1	99
	LQC 10188	<i>K. marxianus</i>	FJ896141.1	100
	LQC 10217	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	100
	LQC 10221	<i>S. cerevisiae</i>	MG017572.1	99
LQC 10224	<i>S. cerevisiae</i>	MG017587.1	100	
LQC 10225	<i>S. cerevisiae</i>	MG017585.1	99	
LQC 10230	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100	
LQC 10233	<i>S. cerevisiae</i>	MF406146.1	100	
<b>ΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>	LQC 1986	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KY392912.1	99
	LQC 1993	<i>B. amyloliquefaciens</i>	MH045777.1	98
	LQC 2012	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KY072769.1	99
	LQC 2014	<i>Lb. rhamnosus</i>	CP020464.1	99
	LQC 2018	<i>Lb. rhamnosus</i>	HQ774719.1	100
	LQC 2023	<i>Lb. rhamnosus</i>	CP020464.1	99
	LQC 2024	<i>Lb. rhamnosus</i>	CP020464.1	99
	LQC 2031	<i>Lb. rhamnosus</i>	LC333198.1	99
	LQC 2032	<i>Lb. rhamnosus</i>	LC333198.1	99
	LQC 2034	<i>Lb. rhamnosus</i>	LC333198.1	99
	LQC 2008	<i>B. amyloliquefaciens</i>	MF953984.1	99

### 3.2 Μη κλασικές Μέθοδοι



Εικόνα 21: PCR-DGGE προφίλ των δειγμάτων κεφίρ με βάση τα ενισχυμένα τμήματα της D1/D2 περιοχής του 26S rRNA γονιδίου.

Η PCR-DGGE, που αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο μικροβιακής αποτύπωσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα, επιλέχθηκε τόσο για την ανίχνευση μη καλλιεργήσιμων στελεχών όσο και για την επιβεβαίωση της παρουσίας των στελεχών εκείνων, που ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχησης. Ωστόσο οι πολλαπλές μπάντες της PCR-DGGE, υπονομεύουν τις εκτιμήσεις της ποικιλομορφίας με βάση τον αριθμό των ζωνών της DGGE, οπότε συνίσταται η χρήση της ως εργαλείο συγκριτικής ανάλυση της δομής του μικροοικοσυστήματος και όχι ως μέσο ποσοτικοποίησης της  $\alpha$ -ποικιλομορφίας, για λόγους που θα αναλυθούν πιο κάτω.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, το RNA 4 δειγμάτων μήλου-βύσσινου-νερού-γάλακτος (το δείγμα γάλακτος ήταν εκείνο από τα οποία προήλθαν τα 3 άλλα δείγματα) μετατράπηκε σε cDNA, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα και στη συνέχεια ακολούθησαν 2 αντιδράσεις PCR-DGGE, για τα βακτήρια και τις ζύμες αντίστοιχα. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε νανοφωτόμετρο, όπου η συγκέντρωση των προϊόντων PCR των ζυμών μετρήθηκε μεγαλύτερη των 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ενώ η αντίστοιχη των βακτηρίων μικρότερη των 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Ακολούθησε επιβεβαίωση της επιτυχίας της PCR (στην περίπτωση των ζυμών) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5 %, ωστόσο στην περίπτωση των βακτηρίων, δεν παρουσιάστηκε ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Αναφορικά με τις ζύμες επιλέχθηκαν 4 πρότυπα στελέχη ζυμών, κατόπιν ταυτοποίησης με αλληλούχηση, 2 στελέχη του είδους *S. cerevisiae* και δύο του είδους *K. marxianus*. Τα δακτυλικά αποτυπώματα της DGGE έδειξαν την παρουσία 5 συνολικά ζωνών, 2 για τον *S. cerevisiae* και 3 για τον *K. marxianus*, με τις 2 από αυτές να βρίσκονται στην ίδια θέση. Θεωρητικά ενώ αναμενόταν η παρουσία μιας ζώνης για κάθε είδος

που είχε ταυτοποιηθεί προηγουμένως, παρατηρήθηκαν περισσότερες της μίας ζώνης, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σφάλματα, κι επομένως να δημιουργείται μια περαιτέρω ανάγκη για ανάλυση και τεκμηρίωση των σφαλμάτων αυτών, μια διαδικασία, που συνοδεύεται από διάφορες θεωρίες εξήγησης (Neilson και συν., 2014):

1. Πολλαπλές ζώνες μπορούν να παραχθούν ως προϊόντα μιας PCR αντίδρασης από την ενίσχυση μίας μόνο αλληλουχίας. Πρόκειται για πανομοιότυπες ζώνες με διαφορετικά μοτίβα μετανάστευσης, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις του ίδιου αμπλικονίου και όταν εκτίθενται στο μέσο μετουσίωσης, την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσιάζουν διαφορετική δυναμική μετουσίωσης.
2. Προφίλ πολλαπλών ζωνών δύναται να προκύψουν από πολλαπλά ετερογενή αντίγραφα του 16S rDNA μέσα σε ένα μοναδικό οργανισμό αλλά μπορεί κανείς να υποστηρίξει ότι αυτά τα αντίγραφα έχουν διαφορετικές αλληλουχίες και ως εκ τούτου θα πρέπει λογικά να μεταναστεύσουν ως ξεχωριστές ζώνες.
3. Οι επιπρόσθετες ζώνες χαρακτηρίζονται ως ετερόδιπλες ζώνες. Πρόκειται για "φανταστικές ζώνες" που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια των τελικών κύκλων PCR, όταν η συγκέντρωση του αμπλικονίου είναι υψηλότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση του εκκινητή. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι ζώνες μπορούν να ελαχιστοποιηθούν αν δεν εξαλειφθούν με μείωση του αριθμού των κύκλων της PCR ή με μείωση της συγκέντρωσης του αρχικού προτύπου.

Σύμφωνα με τα δακτυλικά αποτυπώματα της ηλεκτροφόρησης της DGGE, και στα 4 δείγματα παρατηρείται η πρώτη και ίσως πιο χαρακτηριστική ζώνη του *K. marxianus*, με πιο έντονη την παρουσία της στα δείγματα 7 & 8, που αντιστοιχούν στο κεφίρ νερού και γάλακτος. Στα δείγματα 5 & 6 (κεφίρ μήλου και βύσσινου), εντοπίζεται στο κάτω μέρος μία ζώνη, στο ίδιο ύψος με εκείνη του *S. cerevisiae*. Λιγότερο έντονα παρατηρείται πάλι στα δείγματα 5 & 6 (κεφίρ μήλου και βύσσινου), η παρουσία μιας ζώνης που θα μπορούσε να αντιστοιχεί τόσο στον *S. cerevisiae* όσο και στον *K. marxianus*, επιβεβαιώνοντας την ταυτοποίηση και των δύο αυτών ειδών, που προηγήθηκε μέσω αλληλούχησης.

### 3.3 Ιδιότητες της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών του κεφίρ

Τα δείγματα κεφίρ ελέγχθηκαν τόσο για πρωτεολυτικές, όσο και για λιπολυτικές ιδιότητες, για δυνατότητα οξίνισης αλλά και για τυχόν δράση κατά του παθογόνου μικροβίου *Listeria monocytogenes*, και τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρατίθενται στη συνέχεια.

#### 3.3.1 Πρωτεόλυση

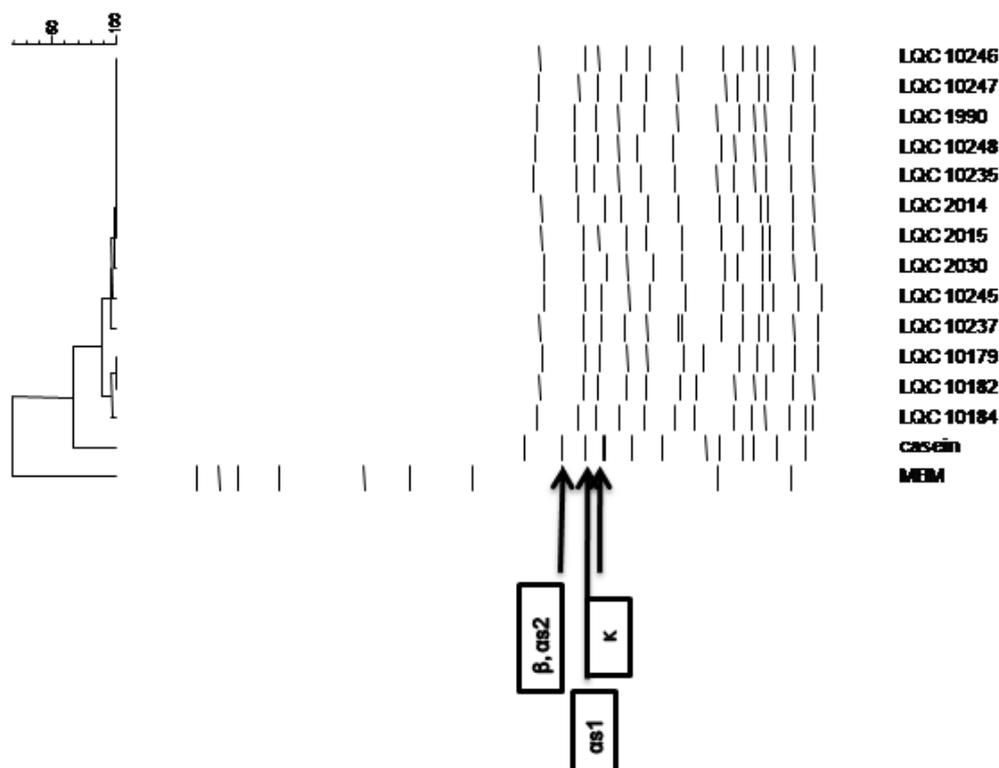
##### *Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα*

Η πρώτη εκτίμηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των διαφόρων στελεχών ζυμών και βακτηρίων στα δείγματα κεφίρ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay). Από τα 50 στελέχη βακτηρίων πρωτεολυτική δράση έδειξαν 4 στελέχη, εκ των οποίων τα 3 ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus* (LQC 2014, 2015, 2030 ) και το 1 σε εκείνο του *B. amyloliquefaciens* (LQC 1990). Στην περίπτωση των ζυμών από την άλλη, από τα 83 στελέχη, 9 έδειξαν πρωτεολυτική δράση, εκ των οποίων τα 3 ανήκουν στον *S. cerevisiae* (LQC 10184, 10235, 10237) και τα 6 στον *K. marxianus* ( LQC 10179, 10182, 10245, 10246, 10247, 10248). Η πρωτεολυτική δράση των διαφόρων στελεχών διακρίνεται με τη δημιουργία μιας ζώνης διαύγασης γύρω από την οπή, στην οποία έχει μεταφερθεί η αντίστοιχη ποσότητα εμβολίου ικών βακτηρίων και ζυμών (εικόνα 24).



**Εικόνα 22:** Παρουσία πρωτεολυτικής δράσης στελεχών των βακτηρίων, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, με δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές του πρωτεολυτικού υποστρώματος.

### Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο



Σχήμα 10: Αποτελέσματα καζεϊνολυτικής δράσης των μικροβιακών στελεχών, που μελετήθηκαν με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο.

Όπως περιγράφηκε και στην ενότητα των Υλικών-Μεθόδων, οι μικροοργανισμοί των κόκκων κεφίρ που παρουσίασαν πρωτεολυτική δράση σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay), υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θεικό νάτριο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω ιδιότητά τους.

Εκ πρώτης όψεως παρατηρεί κανείς ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί πλήρης υδρόλυση των καζεϊνών και στα 13 στελέχη ζυμών- βακτηρίων (4 βακτήρια & 9 ζύμες), κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μεθόδου διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

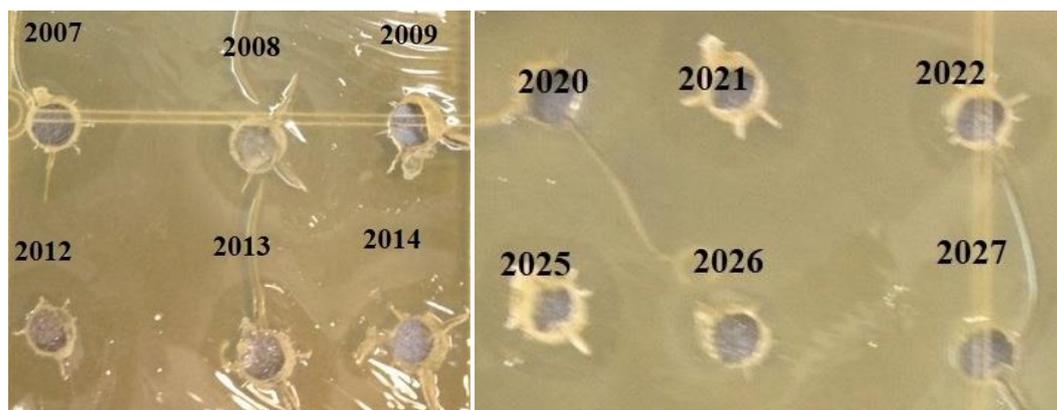
Στο σχήμα 10 επισημαίνονται οι 3 μπάντες που ανήκουν στα 4 καζεϊνικά κλάσματα, αs1, αs2, β & κ, με μοριακά βάρη 23, 25, 24 και 19 kDa αντίστοιχα, με τις καζεΐνες αs1 και αs2 να αποτυπώνονται σε μία μπάντα, πιθανώς λόγω μη επαρκούς χρόνου ηλεκτροφόρησης. Οι επιπλέον μπάντες που παρατηρούνται οφείλονται είτε σε μερική

υδρόλυση των καζεϊνών ( $\alpha s1$ ,  $\alpha s2$ ,  $\beta$  και  $\kappa$ ) είτε στα υπόλοιπα πεπτίδια του υποστρώματος πρωτεόλυσης που μπορεί να προέρχονται από την τρυπτόνη ή το εκχύλισμα της ζύμης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σε όλα τα στελέχη παρατηρήθηκε μειωμένη υδρόλυση των καζεϊνών, πράγμα που φαίνεται από τη ελαφριά μετατόπιση των ζωνών, σε σχέση με την αρχική τους θέση. Τα δείγματα LQC 10246 μέχρι 10237 παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, κάτι που συμβαίνει και στα δείγματα LQC 10179, 10182 και 10167, με τη διαφορά ότι στο LQC 10167 διακρίνεται μια διπλή μπάντα με μοριακό βάρος μικρότερου πρωτεϊνικού κλάσματος, πιθανώς λόγω μερικής υδρόλυσης πρωτεϊνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

### 3.3.2 Λιπόλυση

#### *Μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα*

Η εκτίμηση της λιπολυτικής δραστηριότητας των στελεχών, που απομονώθηκαν από κόκκους κεφίρ, πραγματοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση της πρωτεόλυσης με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay). Πιο αναλυτικά από τα 50 στελέχη βακτηρίων, λιπολυτική δράση ανέπτυξαν 40, εκ των οποίων τα 7 στελέχη ανήκουν στο είδος του *B. amyloliquefaciens*, ενώ τα υπόλοιπα σε αυτό του *Lb. rhamnosus*. Στην περίπτωση των ζυμών, από τα 83 στελέχη, δυνατότητα λιπόλυσης έδειξαν 45, εκ των οποίων τα 29 ανήκουν στο είδος του *S. cerevisiae* και τα υπόλοιπα 16 σε αυτό του *K. marxianus*. Η ανίχνευση λιπολυτικής δράσης των διαφόρων στελεχών των κόκκων κεφίρ, στηρίχτηκε στην παρουσία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές, στις οποίες είχε μεταφερθεί οι αντίστοιχες ποσότητες βακτηρίων και ζυμών (εικόνες 24 & 25). Αναλυτικά τα στελέχη που εμφάνισαν λιπολυτική δράση, παρουσιάζονται στον πίνακα 16, Παράρτημα Ι.



**Εικόνες 23, 25:** Παρουσία λιπολυτικής δράσης στελεχών των βακτηρίων, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, με δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές του λιπολυτικού υποστρώματος.

### *Τιτλοδοτική Μέθοδος*

Τα στελέχη των βακτηρίων και των ζυμών εκείνων, που εμφάνισαν λιπολυτική δράση σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Agar Well Diffusion Assay), ελέγχθηκαν και με δεύτερη μέθοδο για την ιδιότητα λιπόλυσης που διαθέτουν, όπως περιγράφηκε αναλυτικά και στην ενότητα των Υλικών & Μεθόδων. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίχθηκε στην ογκομετρική ανάλυση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με NaOH και το ποσό του ενζύμου, που κατέλυσε την απελευθέρωση 1 μmol λιπαρών οξέων ανά mL στους 30°C, αποτέλεσε τη μονάδα δραστηριότητας λιπάσης.

Τα αποτελέσματα της ογκομέτρησης των στελεχών των ζυμών και των βακτηρίων συνοψίζονται στα διαγράμματα 1 & 2, όπου τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής συμφωνούν με τη προηγούμενη, που επιλέχθηκε για την εκτίμηση της λιπολυτικής δράσης του μικροοικοσυστήματος των κόκκων κεφίρ. Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 1 αποτυπώνεται η λιπολυτική δράση των στελεχών των ζυμών, τα οποία είναι κατηγοριοποιημένα ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους (κεφίρ μήλο, βύσσινο, νερό). Μεγάλη δυνατότητα λιπόλυσης φάνηκε να διαθέτουν τόσο τα στελέχη των ζυμών που απομονώθηκαν από κεφίρ μήλου, όσο και τα στελέχη εκείνα που απομονώθηκαν από κεφίρ βύσσινο, τα οποία παρά το γεγονός ότι είναι αριθμητικά λιγότερα, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα παραγωγής λιπολυτικών ενζύμων.

Σχετικά με τη δυνατότητα λιπόλυσης, που ανέπτυξαν τα στελέχη των ζυμών, τα οποία απομονώθηκαν από κεφίρ μήλου, την υψηλότερη λιπολυτική δράση παρουσίασαν τα

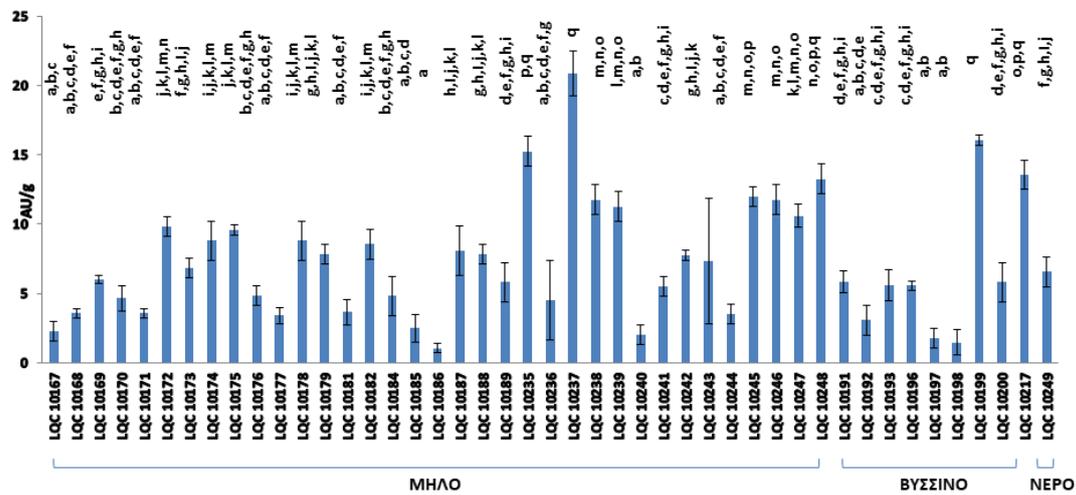
LQC 10237, 10235 & 10248 με τιμές 20.85, 15.25 & 13.25 AU/ g, ενώ τα στελέχη LQC 10186, 10240, 10167 & 10185 ήταν εκείνα με τις χαμηλότερες τιμές παραγωγής ενζύμου, 1.05, 2.00, 2.30 & 2.50 AU/ g αντίστοιχα (διάγραμμα 1). Οι πειραματικές τιμές των στελεχών των ζυμών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, ANOVA, προκειμένου να ανιχνευτεί αν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της λιπολυτικής δράσης των στελεχών αυτών. Πιο συγκεκριμένα ορίζοντας ως επίπεδο σημαντικότητας το 5%, προέκυψαν ομαδοποιήσεις των διαφόρων στελεχών με κριτήριο τη στατιστικώς σημαντική διαφορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέσες τιμές της λιπολυτικής δράσης των στελεχών εκείνων, που ανήκουν σε κάθε ομάδα, δεν χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Έτσι τα στελέχη που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τις χαμηλές τιμές λιπολυτικής ικανότητας, δηλαδή τα LQC 10186, 10240, 10167 & 10185, διακρίνονται από στατιστικώς μη σημαντικές διαφορές των μέσων τιμών της λιπολυτικής δράσης, που τα χαρακτηρίζει, για αυτό και ταξινομούνται σε μία ομάδα. Το ίδιο ισχύει και για τα στελέχη εκείνα με τις αντίστοιχες υψηλές τιμές, LQC 10237, 10235 & 10248. Τα ίδια στελέχη μπορούν να ταξινομηθούν σε περισσότερες των μία ομάδων, ανάλογα με την τυπική απόκλιση που τα διέπει, προκύπτοντας επιμέρους κατηγοριοποιήσεις.

Από τα 9 στελέχη κεφίρ με πηγή προέλευσης το βύσσινο, τα οποία χαρακτηρίστηκαν με λιπολυτική δράση, τα LQC 10199 & LQC 10217 ήταν εκείνα με τα υψηλότερα επίπεδα παραγωγής ενζύμου, με 16.05 & 13.55 AU/ g αντίστοιχα, ενώ τα στελέχη LQC 10192 & LQC 10197 παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές λιπολυτικής δράσης, 3.05 & 1.8 AU/ g, αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι για επίπεδο σημαντικότητας 5%, τα στελέχη LQC 10191, 10193, 10196 & 10200 δεν διακρίνονται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ παράλληλα μέσω της δοκιμασίας της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) ταξινομούνται και στην ίδια ομάδα. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για τα στελέχη LQC 10192, 10197 & 10198, που ταξινομούνται κι αυτά με τη σειρά τους σε μια άλλη ομάδα, τα στελέχη της οποίας χαρακτηρίζονται από στατιστικώς μη σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά συγκριτικά με την προηγούμενη ομάδα σημειώνεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P < 0.05$ ). Τέλος τα στελέχη με τις δύο υψηλότερες τιμές λιπολυτικής δράσης, LQC 10199 & 10217, διακρίνονται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές

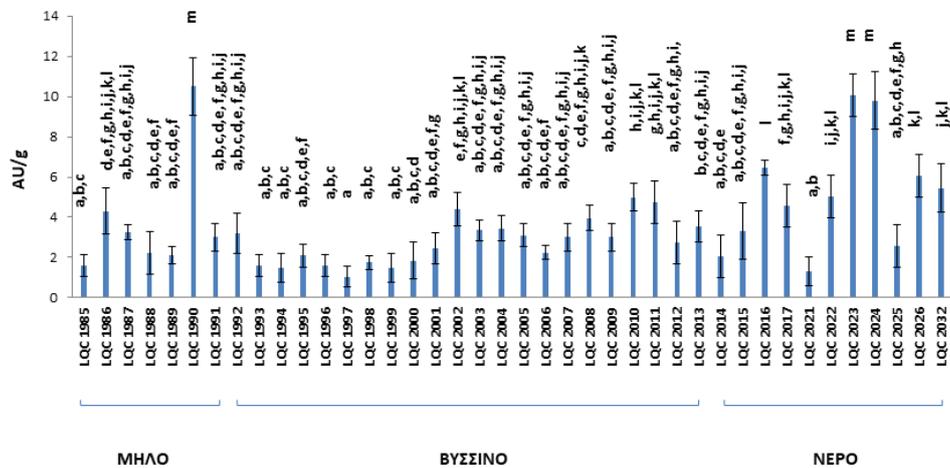
τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, που απομονώθηκαν από το κεφίρ βύσσινου.

Στο διάγραμμα 2 αποτυπώνεται η λιπολυτική δράση των στελεχών των βακτηρίων, με την υψηλότερη λιπολυτική δράση να την εμφανίζουν στελέχη όπως το LQC 1990, με πηγή προέλευσης το κεφίρ μήλου και δυνατότητα λιπόλυσης 10.50 AU/ g κι άλλα όπως τα LQC 2023 & 2024, με 10.05 & 9.80 AU/ g, που έχουν απομονωθεί από κεφίρ νερού. Συγκεκριμένα στα στελέχη που προέρχονται από το κεφίρ μήλου, η δυνατότητα λιπόλυσης κυμαίνεται από 1.60 μέχρι 10.50 AU/ g, ενώ σε εκείνα που προέρχονται από το κεφίρ νερού η λιπολυτική δράση κυμαίνεται από 1.30 έως 10.05 AU/ g. Τέλος τα στελέχη με πηγή απομόνωσης το βύσσινο, αν και αριθμητικά περισσότερα, εμφάνισαν μικρότερη δυνατότητα παραγωγής λιπολυτικών ενζύμων και κατ' επέκταση μειωμένη λιπολυτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα, με τη λιπολυτική δράση να κυμαίνεται από 1.05 μέχρι 5 AU/ g.

Και τα αποτελέσματα της λιπολυτικής δράσης των βακτηρίων υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία, όπου για επίπεδο σημαντικότητας το 5%, προέκυψαν και πάλι ομαδοποιήσεις των διαφόρων στελεχών των βακτηρίων. Έτσι τα τρία στελέχη με τη μεγαλύτερη δυνατότητα λιπόλυσης, τα LQC 1990, 2023 & 2024 δεν χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές των μέσων τιμών της λιπολυτικής δράσης μεταξύ τους για αυτό και ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (m). Από την άλλη, τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι το LQC 1997, με τη μικρότερη ικανότητα παραγωγής ενζύμου ταξινομείται μόνο του σε μία ομάδα (a).

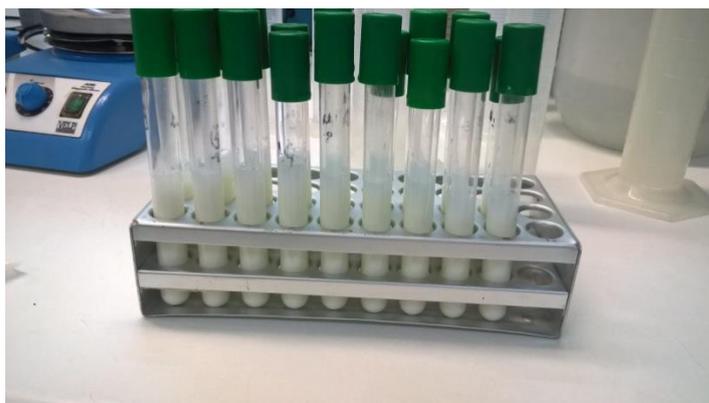


Διάγραμμα 1: Ποσοτικοποίηση της λιπολυτικής δράσης των στελεχών των ζυμών (AU/ g) και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την πηγή προέλευσης των κόκκων κεφίρ (μήλο, βύσσινο, νερό). Επεξεργασία των λιπολυτικών αποτελεσμάτων με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, ANOVA και επιμέρους ταξινόμηση των στελεχών των ζυμών σε ομάδες (a-q), με κριτήριο το επίπεδο σημαντικότητας ( $P < 0.05$ ).



Διάγραμμα 2: Ποσοτικοποίηση της λιπολυτικής δράσης των στελεχών των βακτηρίων (AU/ g) και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την πηγή προέλευσης των κόκκων κεφίρ (μήλο, βύσσινο, νερό). Επεξεργασία των λιπολυτικών αποτελεσμάτων με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, ANOVA και επιμέρους ταξινόμηση των στελεχών των ζυμών σε ομάδες (a-m), με κριτήριο το επίπεδο σημαντικότητας ( $P < 0.05$ ).

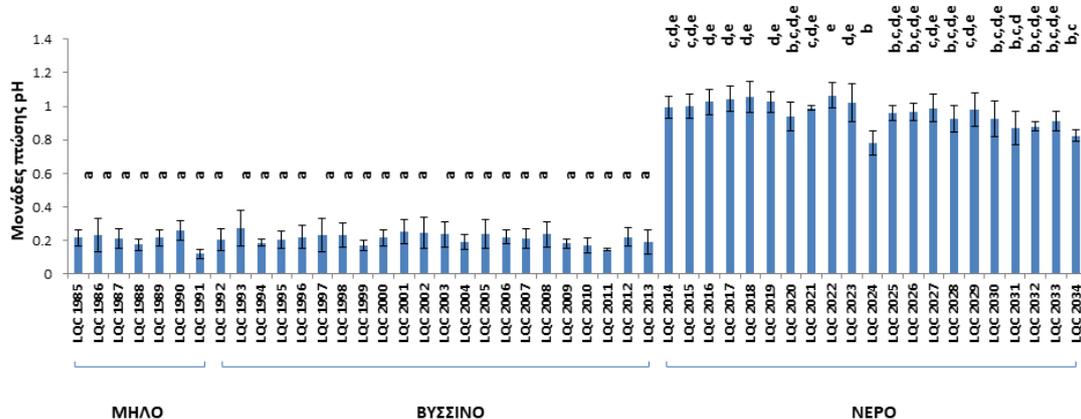
### 3.3.3 Οξίνιση



Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τους κόκκους κεφίρ, αφού ενοφθαλμίστηκαν σε άπαχο γάλα, ελέγχθηκαν για δυνατότητα οξίνισης και τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα 3. Είναι φανερό ότι τα στελέχη που εμφάνισαν την υψηλότερη δυνατότητα οξίνισης, είναι εκείνα του *Lb. rhamnosus*, που απομονώθηκαν από το κεφίρ νερού, με τις τιμές μείωσης του pH να κυμαίνονται από

0.78 μέχρι 1.07. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα στελέχη LQC 2018 & 2022 με τιμές μείωσης του pH 1.06 & 1.07 αντίστοιχα. Από την άλλη τα στελέχη του *B. amyloliquefaciens* με πηγή προέλευσης το κεφίρ μήλου και βύσσινου, συνοδεύτηκαν από αισθητά μικρότερη επίδραση στη μείωση του pH, με τις αντίστοιχες τιμές να κυμαίνονται από 0.12 μέχρι 0.28. Τη μικρότερη δυνατότητα οξίνισης φάνηκε να την παρουσιάζει ο LQC 1991, που απομονώθηκε από το κεφίρ μήλου με τιμή 0.12 και ο LQC 2011, από το κεφίρ βύσσινου, με τιμή 0.15.

Και τα συγκεκριμένα πειραματικά αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA, προκειμένου να ανιχνευτεί αν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της οξίνισης των στελεχών αυτών. Ορίζοντας ως επίπεδο σημαντικότητας το 5%, προέκυψαν ομαδοποιήσεις των διαφόρων στελεχών. Δεδομένης αυτής της παραδοχής, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από το κεφίρ μήλου και βύσσινου και τα οποία ανήκουν στο είδος του *B. amyloliquefaciens*, δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, γι αυτό και ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα (a). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές φάνηκε να υπάρχουν στις τιμές πτώσης του pH των στελεχών που απομονώθηκαν από το κεφίρ νερού και τα οποία ανήκουν στον *Lb. rhamnosus*, κάτι που οδήγησε στην ταξινόμηση τους σε περισσότερες ομάδες.



**Διάγραμμα 3:** Ποσοτικοποίηση της δυνατότητας οξίνισης των στελεχών των βακτηρίων, μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την πηγή προέλευσης των κόκκων κεφίρ (μήλο, βύσσινο, νερό). Επεξεργασία των αποτελεσμάτων της οξίνισης με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, ANOVA και επιμέρους ταξινόμηση των στελεχών των ζυμών σε ομάδες (a-e), με κριτήριο το επίπεδο σημαντικότητας ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.4 Αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria monocytogenes*

Όλα τα στελέχη δοκιμάστηκαν για παρεμπόδιση της ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes*, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν έδειξαν παρουσία παρεμποδιστικής δράσης.

## 3.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ροφήματος κεφίρ

Η παρασκευή του ροφήματος κεφίρ διεξήχθη με τρόπο, που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4, στην ενότητα των Υλικών & Μεθόδων, και χρησιμοποιήθηκαν τόσο μονοκαλλιέργειες βακτηρίων ή ζυμών όσο και συγκαλλιέργειες αυτών. Στον πίνακα 8 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων pH, οξύτητας και απαρίθμησης μικροβιακών αποικιών, που πραγματοποιούνταν κάθε φορά μετά το πέρας του προβλεπόμενου διαστήματος επώασης του κεφίρ, 24-48 h στους 25 °C. Η χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA αποτυπώνει τη διακύμανση του pH,

της οξύτητας και των μικροβιακών αποικιών σε δύο συνιστώσες: μία συνιστώσα μεταξύ των ομάδων και μία συνιστώσα εντός των ομάδων.

Στην περίπτωση της επίδρασης του pH στα διάφορα μικροβιακά στελέχη, ο συντελεστής F, βρέθηκε ίσος με 275.065, και αποτελεί το λόγο της εκτίμησης του pH μεταξύ των ομάδων προς την εκτίμηση εντός των ομάδων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ANOVA έδειξαν ότι η τιμή P της δοκιμής F είναι μικρότερη από 0.05, σημειώνοντας μια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του μέσου pH από ένα επίπεδο μικροβιακού στελέχους σε ένα άλλο. Όπως αποτυπώνεται και στον πίνακα 8, έχουν αναγνωρισθεί 10 ομοιογενείς ομάδες με τα στελέχη, που απαρτίζουν καθεμία από τις ομάδες αυτές, να μην χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται επί του παρόντος για τη διάκριση μεταξύ των μέσων είναι η διαδικασία της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς, Least Significant Difference (LSD) του Fisher.

Τις χαμηλότερες τιμές pH στην περίπτωση των βακτηρίων παρουσίασαν τα στελέχη LQC 2014 & 2030 (3.90 & 4.03, αντίστοιχα), τα οποία ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus* και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας αυτή των LQC 2014-10167 (3.93). Από την πλευρά των ζυμών, τα στελέχη LQC 10246 & 10235 ήταν εκείνα με τη μεγαλύτερη πτώση pH (5.20 & 4.88), που ανήκουν στο είδος του *K. marxianus* & *S. cerevisiae* αντίστοιχα.

Μία χαρακτηριστική ομαδοποίηση αφορά στη μονοκαλλιέργεια του στελέχους LQC 2014 με τη συγκαλλιέργεια των στελεχών LQC 2014-10167, ενώ μια άλλη περιλαμβάνει τη μονοκαλλιέργεια του LQC 2000 με τις συγκαλλιέργειες LQC 2000-10246 & LQC 2000-10237, και μία ακόμη εμπερικλείει τη μονοκαλλιέργεια του στελέχους LQC 1990 με τη συγκαλλιέργεια των στελεχών LQC 1990-10167, καταδεικνύοντας σε επίπεδο συγκαλλιέργειας την ισχυρότερη επίδραση στο pH, που ασκούν τα βακτήρια συγκριτικά με τις ζύμες. Συγκεκριμένα σημειώνεται μια φανερή διαφοροποίηση στο pH των ζυμών σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειάς τους με τα βακτήρια, συγκριτικά με τα βακτήρια τα οποία δεν διαφοροποιούνται λογαριθμικώς μεταξύ των δύο παραπάνω επιπέδων (μονοκαλλιέργειας & συγκαλλιέργειας).

Ένα άλλο κριτήριο ομαδοποίησης αποτελεί και η προέλευση των μικροοργανισμών, με τα στελέχη των βακτηρίων LQC 1990 & LQC 2000, που ανήκουν στο είδος του *B. amyloliquefaciens* να ταξινομούνται σε μια ομάδα ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει στην περίπτωση του LQC 2030 και της συγκαλλιέργειας των LQC 2014-10167, όπου και η μονοκαλλιέργεια και η αντίστοιχη συγκαλλιέργεια ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus*. Το κριτήριο ωστόσο αυτό, δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση των ζυμών, όπου καθεμία ακολουθεί διαφορετική ταξινόμηση, παρά το γεγονός ότι προέρχονται από ίδια είδη.

Τέλος παρατηρούνται φαινόμενα κατά τα οποία το ίδιο στέλεχος μπορεί να ανήκει σε περισσότερες της μίας ομάδας, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας LQC 2014-10167 που ομαδοποιείται και με τη μονοκαλλιέργεια του στελέχους LQC 2014 και με αυτή του στελέχους LQC 2030. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι το κριτήριο που έχει τεθεί δεν ταξινομεί σωστά το συγκεκριμένο στέλεχος, υποπίπτοντας στο σφάλμα τύπου II, οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με την αποδοχή της μηδενικής υπόθεσης, ότι δηλαδή δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των στελεχών που εξετάζονται.

Σχετικά με την περίπτωση της επίδρασης της οξύτητας στα διάφορα μικροβιακά στελέχη, το κύριο προϊόν καταβολισμού των βακτηρίων, είτε ακολουθείται το ομοζυμωτικό είτε το ετεροζυμωτικό μονοπάτι, είναι το γαλακτικό οξύ, για το λόγο αυτό και η οξύτητα εκφράζεται ως η % παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ήταν αναμενόμενο τα στελέχη των βακτηρίων να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές pH και κατ' επέκταση περισσότερη κατανάλωση NaOH για την εξουδετέρωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται τόσο σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας των βακτηρίων όσο και σε επίπεδο συγκαλλιέργειάς τους με διάφορα στελέχη ζυμών. Συγκεκριμένα οι τιμές της οξύτητας φάνηκαν να συμβαδίζουν με τις τιμές του pH, τόσο σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας όσο και συγκαλλιέργειας των μικροβιακών στελεχών. Τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων τα LQC 2014 & LQC 2030 αλλά και η συγκαλλιέργεια αυτών με στελέχη ζυμών, ήταν εκείνα με τις υψηλότερες τιμές παραγωγής γαλακτικού οξέος.

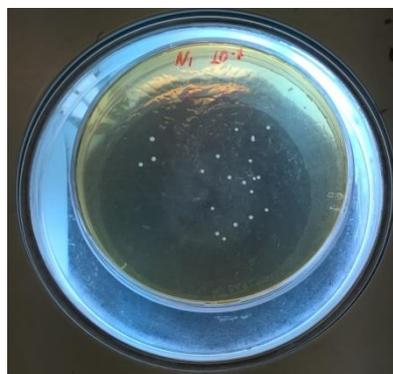
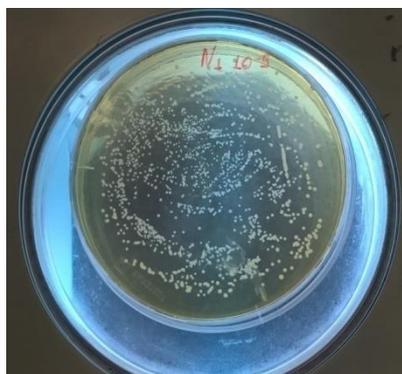
Και εδώ παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέσης οξύτητας από ένα επίπεδο μικροβιακού στελέχους σε ένα άλλο. Επίσης αναγνωρίστηκαν 6 ομοιογενείς ομάδες με τα στελέχη, που απαρτίζουν καθεμία από

τις ομάδες αυτές, να μην χαρακτηρίζονται από στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Εμφανής είναι η επίδραση των βακτηρίων σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, κάτι που αποτυπώνεται στην ομαδοποίηση του LQC 2030 και του LQC 2014 με τις συγκαλλιέργειες των LQC 2030-10167 και LQC 2014-10167 αντίστοιχα, όπως και στην περίπτωση της μονοκαλλιέργειας του στελέχους LQC 1990 με τη συγκαλλιέργεια των LQC 1990-10167. Από την άλλη δεν παρατηρήθηκε ομαδοποίηση της μονοκαλλιέργειας ζυμών με συγκαλλιέργεια αυτών με βακτήρια.

Σε επίπεδο είδους τα στελέχη των LQC 2014 & LQC 2030, που ανήκουν στον *Lb. rhamnosus* συμπεριλήφθηκαν στην ίδια ομάδα, όπως και τα στελέχη των LQC 1990 & 2000, που προέρχονται από το είδος του *B. amyloliquefaciens*. Παρόμοια ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση των ζυμών για τα στελέχη LQC 10237 & LQC 10167, που ανήκουν στο είδος του *S. cerevisiae*. Όπως και στην περίπτωση της επίδρασης του pH στα μικροβιακά στελέχη έτσι κι εδώ παρατηρούνται σημεία, όπου ένα στέλεχος ανήκει σε περισσότερες της μιας ομάδας το οποίο αποδίδεται στους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Τέλος σχετικά με τη μικροβιακή απαρίθμηση τόσο σε επίπεδο ζυμών όσο και σε επίπεδο βακτηρίων, η τιμή P της δοκιμής F βρέθηκε μεγαλύτερη από 0.05, δείχνοντας ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του μέσου όρου της απαρίθμησης ζυμών και βακτηρίων σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας αλλά και σε συγκαλλιέργειας των παραπάνω. Συγκεκριμένα οι μονοκαλλιέργειες ζυμών και βακτηρίων κυμαίνονταν από 7.95-8.26 CFU/ mL και 9.12-9.32 CFU/ mL αντίστοιχα, με τις τιμές αυτές να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα σε επίπεδο συγκαλλιέργειας.



Εικόνες 26, 27: Φωτογραφική απεικόνιση των μικροβιακών αποικιών του στελέχους LQC 2014, μετά απο μεταφορά ποσότητας εμβολίου  $0.5 \text{ mL} \cdot 10^{-7}$  &  $10^{-5}$ , σε 500 mL παστεριωμένου γάλακτος αντίστοιχα, ζύμωση και παραμονή σε ψυκτικές συνθήκες για το προβλεπόμενο χρονικό διάστημα.

Πίνακας 7: Αποτύπωση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων pH, οξύτητας και απαρίθμησης μικροβιακών αποικιών (\*).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		pH	Οξύτητα (% παραγωγή γαλακτικού οξέος)	Πληθυσμός βακτηρίων (CFU/mL)	Πληθυσμός ζυμών (CFU/mL)
ΒΑΚΤΗΡΙΑ	LQC 2014	3.90 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.06 <sup>f</sup>	9.19 ± 0.29 <sup>a</sup>	
	LQC 2030	4.03 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.22 ± 0.05 <sup>f</sup>	9.12 ± 0.29 <sup>a</sup>	
	LQC 1990	4.38 ± 0.03 <sup>d,e</sup>	0.95 ± 0.05 <sup>d,e</sup>	9.25 ± 0.53 <sup>a</sup>	
	LQC 2000	4.38 ± 0.02 <sup>d,e</sup>	0.89 ± 0.05 <sup>d</sup>	9.32 ± 0.49 <sup>a</sup>	
ΖΥΜΕΣ	LQC 10179	5.42 ± 0.05 <sup>h</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>c</sup>		8.26 ± 0.40 <sup>a</sup>
	LQC 10237	5.41 ± 0.02 <sup>h</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>a</sup>		8.03 ± 0.21 <sup>a</sup>
	LQC 10167	5.68 ± 0.03 <sup>i</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>a,b</sup>		7.95 ± 0.13 <sup>a</sup>
	LQC 10246	5.20 ± 0.02 <sup>g</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>b,c</sup>		8.14 ± 0.32 <sup>a</sup>
	LQC 10235	4.88 ± 0.04 <sup>f</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>c</sup>		8.07 ± 0.29 <sup>a</sup>
ΣΥΓΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	LQC 2014- 10167	3.93 ± 0.06 <sup>a,b</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>f</sup>	9.01 ± 0.36 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.25 <sup>a</sup>
	LQC 2030- 10167	4.14 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.21 ± 0.04 <sup>f</sup>	9.23 ± 0.39 <sup>a</sup>	8.12 ± 0.15 <sup>a</sup>
	LQC 1990- 10167	4.47 ± 0.03 <sup>e</sup>	0.91 ± 0.05 <sup>d</sup>	9.20 ± 0.42 <sup>a</sup>	7.87 ± 0.16 <sup>a</sup>
	LQC 2000- 10167	4.55 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.95 ± 0.05 <sup>d,e</sup>	9.35 ± 0.55 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.25 <sup>a</sup>
	LQC 2000- 10237	4.36 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.96 ± 0.04 <sup>d,e</sup>	9.20 ± 0.42 <sup>a</sup>	7.96 ± 0.30 <sup>a</sup>
	LQC 2000- 10246	4.30 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.06 ± 0.03 <sup>e</sup>	9.27 ± 0.23 <sup>a</sup>	8.09 ± 0.26 <sup>a</sup>

\*Κάθε φορά πραγματοποιούνταν ενοφθαλμισμός ποσότητας εμβολίου 10<sup>7</sup> cfu/ mL, σε 500 mL παστεριωμένου γάλακτος, τόσο σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας βακτηρίων και ζυμών όσο και σε εκείνο

της συγκαλλιέργειας. Οι παρακάτω μετρήσεις πραγματοποιούνταν μετά το πέρας του προβλεπόμενου διαστήματος επώασης του κεφίρ, 24-48 h στους 25 °C και παραμονής σε ψυκτικές συνθήκες και για 18-24 h. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων με το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA, αποτυπώνει τη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των παραμέτρων των διαφόρων στελεχών των βακτηρίων και των ζυμών, που εξετάζονται και προβλέπει την ταξινόμησή τους σε ομάδες (a-i), με βάση το επίπεδο σημαντικότητας ( $P < 0.05$ ) που έχει οριστεί.

### 3.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση



Μετά την παρασκευή του ροφήματος κεφίρ και την εκτίμηση των παραμέτρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, pH, οξύτητα και μικροβιακή απαρίθμηση, ακολούθησε η οργανοληπτική αξιολόγηση του ροφήματος (επισυνάπτεται το αντίστοιχο έντυπο στο Παράρτημα II). Συνολικά τα δείγματα κεφίρ που παρασκευάστηκαν και κατ' επέκταση αξιολογήθηκαν ήταν 15, 4 μονοκαλλιέργειες βακτηρίων, LQC 2014, 2030, 1990 & 2000, 5 μονοκαλλιέργειες ζυμών, LQC 10179, 10237, 10167, 10246 & 10235 και 6 συγκαλλιέργειες των δύο παραπάνω, LQC 2014-10167, 2030-10167, 1990-10167, 2000-10167, 2000-10237 & 2000-10246.

Όπως αναγράφεται και στο αντίστοιχο έντυπο, το ρόφημα κεφίρ αξιολογήθηκε ως προς 4 παραμέτρους, την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση και την υφή του, ενώ στο τέλος πραγματοποιήθηκε και μια συνολική αξιολόγηση κάθε δείγματος. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των δειγμάτων, είτε προέρχονται από μονοκαλλιέργεια στελέχους ζυμών ή βακτηρίων, είτε από συγκαλλιέργεια των δύο παραπάνω, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση της στατιστικής μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, ANOVA. Και εδώ, ο λόγος της χρήσης αυτού του προγράμματος ήταν η ανίχνευση τυχόν στατιστικώς σημαντικών διαφορών στις μέσες

τιμές των διαφόρων παραμέτρων, ως προς τις οποίες εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα ορίζοντας ως επίπεδο σημαντικότητας,  $P < 0.05$ , προέκυψαν ομαδοποιήσεις των διαφόρων στελεχών με κριτήριο τη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στα Διαγράμματα (4-10) και στους Πίνακες (8-14), αποτυπώνονται στα μεν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των δειγμάτων ως προς τις διάφορες παραμέτρους, ενώ στους δε, πραγματοποιείται ομαδοποίηση των μονοκαλλιιεργειών και των συγκαλλιιεργειών βακτηρίων και ζυμών, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί. Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των δειγμάτων και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

### *1. Αξιολόγηση ως προς την εμφάνιση*

Πιο αναλυτικά τα δείγματα κεφίρ αξιολογήθηκαν ως προς την εμφάνισή τους και συγκεκριμένα ως προς την ένταση του χρώματος και το διαχωρισμό των 2 φάσεων. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 4 και Πίνακα 8 για την περίπτωση των ροφημάτων κεφίρ, που ενοφθαλμίστηκαν με μονοκαλλιιεργειες βακτηρίων και ζυμών, και στο Διάγραμμα 5 και Πίνακα 9 για την αντίστοιχη των συγκαλλιιεργειών. Ως προς το χρώμα, που κυμαινόταν από λευκό (μικρότερη ένταση) έως κιτρινωπό (μεγαλύτερη ένταση), το LQC 2014 από τα βακτήρια και το LQC 10167 από τις ζύμες, ήταν εκείνα με τις μεγαλύτερες μέσες τιμές του χαρακτηριστικού αυτού, ενώ τα LQC 2030 & LQC 10237, 10235 επέδειξαν λιγότερο έντονους χρωματισμούς, που φάνηκε από τις χαμηλότερες μέσες τιμές των στελεχών αυτών στα δείγματα κεφίρ. Σε επίπεδο συγκαλλιιεργειας, τα στελέχη LQC 1990-10167 & LQC 2030-10167 αξιολογήθηκαν με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη αντίστοιχα μέση τιμή της έντασης του χρώματος. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε την παρουσία δύο ομάδων (a,b), για  $P < 0.05$ . Τόσο σε επίπεδο μονοκαλλιιεργειας όσο και σε επίπεδο συγκαλλιιεργειας, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των χρωμάτων των στελεχών των μικροβιακών ομάδων. Η μοναδική διαφοροποίηση που προέκυψε ήταν η ταξινόμηση των στελεχών LQC 2030, 2030-10167 & 2000-10246 στην ομάδα a και των στελεχών LQC 10167, 10246, στην ομάδα b.

Σχετικά με το διαχωρισμό των φάσεων, το στέλεχος των βακτηρίων που παρουσίασε τη μεγαλύτερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού, και κατ' επέκταση το μεγαλύτερο διαχωρισμό, ήταν το LQC 2000 και τα LQC 10179 & 10167 από τις

ζύμες, ενώ το LQC 2014 ήταν εκείνο που μαζί με τη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167 χαρακτηρίστηκαν ως τα πλέον μονοφασικά δείγματα. Με τη στατιστική επεξεργασία, ταυτοποιήθηκε η παρουσία 4 ομοιογενών ομάδων (a,b,c,d), και φάνηκε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων προέκυψαν 4 διαφορετικές ομαδοποιήσεις των στελεχών αυτών, με τα LQC 2030 & 1990 να ταξινομούνται στην ομάδα b, το LQC 2014 στην a και το LQC 2000 στις c,d. Σε επίπεδο ζυμών, δε σημειώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, παρατηρήθηκαν δύο στατιστικώς σημαντικές διαφορές, η μία μεταξύ της συγκαλλιέργειας των LQC 2000-10167 & των 2030-10167 και η δεύτερη μεταξύ των LQC 2014-10167 με όλες τις υπόλοιπες συγκαλλιέργειες ( $P < 0.05$ ).

## *2. Αξιολόγηση ως προς το άρωμα*

Η δεύτερη παράμετρος ως προς την οποία αξιολογήθηκαν τα δείγματα κεφίρ ήταν το άρωμα, το οποίο διακρίθηκε σε τέσσερις ευχάριστες οσμές όπως φρουτώδες, όξινο, γλυκό, κρεμώδες και 3 δυσάρεστες όπως μουχλιασμένο, μαγειρεμένο και οσμή ζωοτροφής. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 4 και Πίνακα 8, για τις μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών, και στο Διάγραμμα 5 και Πίνακα 9 για τις συγκαλλιέργειες των δύο παραπάνω.

Σχετικά με το φρουτώδες άρωμα, τα στελέχη εκείνα που ξεχώρισαν για την ιδιαίτερα αισθητή φρουτώδη οσμή ήταν το LQC 2000 από τα βακτήρια και το LQC 10237 από τις ζύμες. Εκείνα από την άλλη, στα οποία παρατηρήθηκε λιγότερο έντονα το χαρακτηριστικό το LQC 1990 από τα βακτήρια και το LQC 10167, από τις ζύμες. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10237 & LQC 2030-10167 ξεχώρισαν ως τα δείγματα με την περισσότερο φρουτώδη γεύση, ενώ τα LQC 2000-10167 ως εκείνο με τη λιγότερη. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας, έδειξαν την κατηγοριοποίηση των βακτηριακών στελεχών σε 6 ομάδες. Στην περίπτωση των βακτηρίων τα στελέχη LQC 1990, 2014 & 2030 ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα (a), ωστόσο το LQC 2000 διαφοροποιήθηκε από τα παραπάνω (ομάδα f). Στις ζύμες τα LQC 10167 & 10179 ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα (a) και τα LQC 10235 & 10237 στις d,e,f. Προκύπτει λοιπόν ότι τα στελέχη της ίδιας ομάδας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέρουν ωστόσο βάσει επιπέδου σημαντικότητας, από ορισμένα στελέχη διαφορετικών ομάδων. Όσο αφορά στις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων με τις ζύμες, στατιστικώς σημαντική διαφορά

παρατηρείται μεταξύ των LQC 2030-10167, 2000-10237 και των LQC 2000-10167, 2014-10167 ( $P < 0.05$ ).

Αναφορικά με την όξινη οσμή, το LQC 2000 από τα βακτήρια και τα LQC 10179, 10237 από τις ζύμες, ήταν οι μονοκαλλιέργειες με το περισσότερο όξινο άρωμα, ενώ τα LQC 1990 & 10235 εκείνα με το πιο ανεπαίσθητο. Στις συγκαλλιέργειες από την άλλη τα LQC 2014-10167 ήταν εκείνα με το περισσότερο αισθητά όξινο άρωμα, σε αντίθεση με τη συγκαλλιέργεια των στελεχών LQC 2000-10167, όπου παρατηρήθηκε το αντίθετο. Από τη στατιστική επεξεργασία φάνηκε ότι τα στελέχη LQC 2014, 2000 & 2030 δεν διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς σε αντίθεση με το LQC 1990, το οποίο ταξινομείται σε διαφορετική ομάδα. Στις ζύμες, τα στελέχη LQC 10235 & 10167 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (b,c), ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για τα LQC 10237 & 10179 (ομάδα e), με τις δύο ομάδες να διαφοροποιούνται στατιστικά. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα στελέχη LQC 2014-10167, 1990-10167, 2000-10237 & 2000-10246, αν και δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφοροποιούνται από τα LQC 2000-10167 ( $P < 0.05$ ).

Ένας άλλος παράγοντας που λήφθηκε υπόψη είναι αυτός της γλυκιάς οσμής, όπου αναφορικά με τις μονοκαλλιέργειες, το LQC 1990 από τα βακτήρια και τα LQC 10167 & 10235 από τις ζύμες, ήταν εκείνα με πιο έντονο το χαρακτηριστικό αυτό. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα LQC 2014 & 2030 καθώς και το LQC 10179, χαρακτηρίστηκαν ως εκείνα με τη λιγότερο γλυκιά οσμή. Σχετικά με τη συγκαλλιέργεια των βακτηρίων με τις ζύμες, τα LQC 1990-10167 & LQC 2000-10167, εμφάνισαν το πιο έντονο άρωμα, ενώ το LQC 2030-10167 ήταν εκείνη η συγκαλλιέργεια με λιγότερο αισθητό το χαρακτηριστικό αυτό. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι αναφορικά με τα βακτήρια, τα στελέχη LQC 2014 & 2030, για  $P > 0.05$ , ανήκουν στην ίδια ομάδα, αλλά διαφέρουν από τα LQC 2000 & 1990, που ταξινομούνται σε διαφορετική. Όσο αφορά στις ζύμες, τα LQC 10179 & 10237 (ομάδα a) παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν συγκρίνονται με τα LQC 10246, 10235 & 10167 (ομάδα c,d). Τέλος στην περίπτωση των συγκαλλιεργειών, δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, βάσει του επιπέδου σημαντικότητας, που έχει οριστεί.

Απαραίτητη συνιστώσα είναι αυτή της κρεμώδους οσμής, όπου σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας το στέλεχος LQC 2014 και το LQC 2014-10167 σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, ήταν εκείνα με τις υψηλότερες τιμές. Οι ζύμες δεν

χαρακτηρίστηκαν από τόσο υψηλές τιμές κρεμώδους αρώματος, ωστόσο το LQC 10235, ήταν εκείνο που ξεχώρισε από τις υπόλοιπες για τη θετική του κρεμώδη οσμή. Από την άλλη τα στελέχη LQC 1990, 10167 & 2000-10246, από τα, τις ζύμες και τη συγκαλλιέργεια των δύο παραπάνω, εκτιμήθηκαν ως εκείνα, με τα λιγότερο αισθητά κρεμώδη αρώματα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά του LQC 2014 (ομάδα d) με τα τρία άλλα βακτήρια LQC 2030, 1990 & 2000, τα οποία ωστόσο μεταξύ τους δε διαφέρουν στατιστικά (ομάδα a,b,c). Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε για το LQC 10235 σε σχέση με τα LQC 10167, 10179 & 101246, ( $P < 0.05$ ) ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, με το LQC 2014-10167 να διαφέρει στατιστικά από τις συγκαλλιέργειες των LQC 2030-10167, 2000-10167, 2000-10237 & 2000-10246.

Τα δείγματα του ροφήματος κεφίρ αξιολογήθηκαν και ως προς την παρουσία τριών δυσάρεστων οσμών, μούχλας, μαγειρεμένου αρώματος και ζωοτροφής. Αναφορικά με τη μούχλα, τα LQC 2000 από τα βακτήρια και τα LQC 10237 & 10235 από τις ζύμες χαρακτηρίστηκαν ως τα δείγματα εκείνα, στα οποία η οσμή αυτή ήταν περισσότερο έντονη, ενώ στα LQC 2014 & 10167 η συγκεκριμένη οσμή ήταν σχεδόν ανεπαίσθητη. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, η οσμή μούχλας ήταν περισσότερο αισθητή στα LQC 2000-10237 & 2000-10246, ενώ σχεδόν απύσχα στη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων τα LQC 1990 & 2030, που βάσει επιπέδου σημαντικότητας ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (b), διαφέρουν από τα LQC 2014 & 2000, τα οποία ταξινομούνται στις ομάδες a & c, d, e αντίστοιχα. Στην περίπτωση των ζυμών το LQC 10167 διαφέρει στατιστικά από τις υπόλοιπες μονοκαλλιέργειες ζυμών, ( $P < 0.05$ ). Στις συγκαλλιέργειες, εμφανής είναι η διαφορά των LQC 2014-10167 από τις υπόλοιπες.

Σχετικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων ροφήματος κεφίρ ως προς την παρουσία μαγειρεμένης οσμής, τα LQC 2030 και LQC 10179 & 10237 από τα βακτήρια και τις ζύμες αντίστοιχα, ήταν εκείνα με την πιο έντονη οσμή, ενώ στα LQC 2014 & 10167 η δυσάρεστη αυτή οσμή ήταν σχεδόν ανεπαίσθητη. Από τις συγκαλλιέργειες, οι LQC 2000-10237 & 2014-10167, χαρακτηρίστηκαν ως εκείνες με την εντονότερη και πιο ανεπαίσθητη μαγειρεμένη οσμή αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε την απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των LQC 2030, 1990 & 2000 στην περίπτωση των βακτηρίων, αλλά και τη στατιστική τους διαφοροποίηση από το

LQC 2014 ( $P < 0.05$ ). Στην περίπτωση των ζυμών τα LQC 10179 & 10237, που σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές μαγειρευμένης οσμής, δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και για τα LQC 10167 & 10246 (ομάδα a,b), τα οποία ωστόσο διαφοροποιούνται στατιστικά από όλα τα υπόλοιπα στελέχη των ζυμών. Τέλος, εκτός από τη στατιστική διαφοροποίηση των LQC 2014-10167 σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκαλλιέργειες, και η αντίστοιχη των LQC 1990-10167 φαίνεται να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις συγκαλλιέργειες των LQC 2000-10237 & 2000-10167.

Η τελευταία δυσάρεστη οσμή ως προς την οποία αξιολογήθηκαν τα δείγματα ήταν αυτή της ζωοτροφής. Από την πλευρά των βακτηρίων το LQC 2000 ήταν εκείνο με την υψηλότερη τιμή και το LQC 2014, εκείνο με τη χαμηλότερη, ενώ στην περίπτωση των ζυμών τα LQC 10246 & 10167 ήταν εκείνα με την εντονότερη και πιο ανεπαίσθητη τιμή της συγκεκριμένης οσμής. Αναφορικά με τις συγκαλλιέργειες, τα LQC 2000-10237 σημείωσαν την υψηλότερη τιμή οσμής ζωοτροφής, ενώ η συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167 τη χαμηλότερη. Η επεξεργασία με το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων, μολονότι τα LQC 2030, 1990 & 2000 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέρουν στατιστικά από το LQC 2014 ( $P < 0.05$ ). Στην περίπτωση των ζυμών παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των LQC 10179 & 10246, βάσει του ορισμένου επιπέδου σημαντικότητας, αλλά και ανάμεσα το LQC 10167 με όλα τα υπόλοιπα στελέχη ζυμών. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειες παρατηρούνται αρκετές στατιστικές διαφορές, με πρώτη αυτή του LQC 2014-10167 με τις υπόλοιπες συγκαλλιέργειες, επόμενη αυτή των LQC 2030-10167 με τις συγκαλλιέργειες των 1990-10167 & 2000-10237 και τέλος αυτή των LQC 2000-10246 & 2000-10167 με τα LQC 2000-10237.

### *3. Αξιολόγηση ως προς τη γεύση*

Η τρίτη παράμετρος που διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στην αξιολόγηση των δειγμάτων ροφήματος κεφίρ είναι αυτή τη γεύσης. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα εκτιμήθηκαν ως προς την παρουσία όξινης, φρουτώδους, γλυκιάς, αλμυρής, πικρής, κρεμώδους, μαγειρευμένης γεύσης, καθώς και γεύσης που παραπέμπει σε σκόρδο/κρεμμύδι, σε έλλειψη φρεσκάδας, σε βύνη, σε ταγγή, σε οξειδωμένη γεύση αλλά και σε εκείνη που παραπέμπει σε ζωοτροφή. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης αποτυπώνονται στα Διάγραμμα 6 και Πίνακες 10 & 12

για την περίπτωση των ροφημάτων κεφίρ, που προέκυψαν από ενοφθαλμισμό μονοκαλλιεργειών βακτηρίων και ζυμών, και στο Διάγραμμα 7 και Πίνακα 11 & 13 που αφορούν στις συγκαλλιέργειες.

Αξιολογώντας τα δείγματα ως προς την όξινη τους γεύση, από την πλευρά των βακτηρίων, τα LQC 2000 & 2014 εκτιμήθηκαν ως εκείνα με την εντονότερα όξινη γεύση ενώ το LQC 1990 ως εκείνο με τη λιγότερο δυνατή. Όσο αφορά στις ζύμες, τα LQC 10237 & 10179 σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ το LQC 10246 αξιολογήθηκε ως εκείνο με τη λιγότερο αισθητή όξινη γεύση. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10237 & 2000-10246 ήταν εκείνα με τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων τα LQC 2000 & 2014 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν στατιστικά με τα LQC 1990 & 2030. Αναφορικά με τις ζύμες στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των LQC 10167 & 10237, καθώς και μεταξύ του LQC 10246 κι όλων των υπόλοιπων στελεχών των ζυμών. Τέλος αναφορικά με τη συγκαλλιέργεια των βακτηρίων με τις ζύμες, τα LQC 2000-10246, 1990-10167 & 2000-10167 δεν χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, γι αυτό και ταξινομούνται στην ομάδα b, τα οποία διαφέρουν στατιστικώς από τα LQC 2014-10167 & 2000-10237, που ταξινομούνται στην ομάδα e.

Η εκτίμηση των δειγμάτων ως προς τη φρουτώδη γεύση έκρινε το στέλεχος LQC 2000 ως το πλέον φρουτώδες, από τα βακτήρια σε αντίθεση με το LQC 2014, όπου το χαρακτηριστικό αυτό φάνηκε λιγότερο αναπτυγμένο. Από την πλευρά των ζυμών το LQC 10237 & 10246 ήταν εκείνα με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση των συγκαλλιεργειών την υψηλότερη τιμή φρουτώδους γεύσης την εμφάνισαν τα LQC 2014-10167 και τη χαμηλότερη τα LQC 2000-10246. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι τα LQC 2000 & 2030, που χαρακτηρίστηκαν ως τα περισσότερο φρουτώδη, παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ τους όσο και με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη, LQC 2014 & 1990, που ταξινομούνται στην ίδια ομάδα. Στην περίπτωση των ζυμών, η επεξεργασία με την ANOVA έδειξε ότι τα LQC 10246, 10179 & 10167 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (a), διαφέρουν ωστόσο από τα LQC 10235 & 10237, που ταξινομούνται στην ομάδα c.

Με κριτήριο τη γλυκιά γεύση, τα LQC 2000 & 2030 από τα βακτήρια και τα LQC 10167 & 10179 από τις ζύμες, χαρακτηρίστηκαν ως εκείνα με την υψηλότερη και χαμηλότερη γλυκύτητα αντίστοιχα. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας περισσότερο αισθητή ήταν η γλυκιά γεύση για τα LQC 2000-10167 και λιγότερο για τα LQC 2030-10167. Κατόπιν στατιστικής επεξεργασίας, τα LQC 2014, 2030 & 1990, δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, ωστόσο τα δύο πρώτα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με το LQC 2000, ( $P < 0.05$ ). Κάτι παρόμοιο ισχύει και με τις ζύμες όπου τα LQC 10179, 10246 & 10237 δε διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, αλλά παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το LQC 10167, όπως ανάλογη διαφοροποίηση παρατηρείται και μεταξύ των LQC 10179 & 10246 με το LQC 10235. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2030-10167 ταξινομείται στην ίδια ομάδα με το LQC 1990-10167 (a), ωστόσο παρουσιάζει στατιστικώς διαφορά σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες συγκαλλιέργειες.

Με κριτήριο την αλμυρή γεύση, τα LQC 1990 & 2014, από τα βακτήρια και τα LQC 10237 & 10179 από τις ζύμες, χαρακτηρίστηκαν ως εκείνα με τις υψηλότερες και αντίστοιχα χαμηλότερες τιμές αλμυρής γεύσης. Αναφορικά με τη συγκαλλιέργεια των βακτηρίων και των ζυμών, τα LQC 2000-10167 & 1990-10167 αξιολογήθηκαν ως τα περισσότερο και λιγότερο αλμυρά, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι από τα βακτήρια, τα LQC 1990, 2000 & 2030 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, διαφέρουν ωστόσο από το LQC 2014, ( $P < 0.05$ ). Σε επίπεδο ζυμών τα LQC 10237, 10235 & 10167 ανήκουν στην ίδια ταξινομική ομάδα (f). Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για τα LQC 10179 & 10246, που ανήκουν στην ομάδα (a,b), ωστόσο το LQC 10179 διαφέρει και από τα LQC 10167, 10235, 10237. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2014-10167 & 2000-10237, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, παρόλα αυτά παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με τη συγκαλλιέργεια των LQC 1990-10167, ενώ διαφοροποίηση με βάση το επίπεδο σημαντικότητας παρατηρείται και μεταξύ της συγκαλλιέργειας των LQC 2000-10167 και των υπολοίπων.

Αξιολογώντας τα δείγματα ως προς την πικρή γεύση, τα LQC 1990 & 2030 από τα βακτήρια χαρακτηρίστηκαν ως εκείνα στα οποία η γεύση αυτή ήταν πιο έντονη, ενώ το LQC 2014 σημείωσε τις χαμηλότερες τιμές. Από τις ζύμες, τα LQC 10237 & 10179, συγκέντρωσαν την υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή ως προς την ένταση της πικρής γεύσης. Αναφορικά με τις συγκαλλιέργειες, αυτή των LQC 2000-10167

χαρακτηρίστηκε ως περισσότερο πικρή ενώ η συγκαλλιέργεια των LQC 2000-10246, ως η λιγότερο. Η στατιστική επεξεργασία κατηγοριοποίησε από τα βακτήρια, το LQC 1990, 2030 & 2000 στην ίδια ομάδα, ενώ το LQC 2014 σε διαφορετική ( $P < 0.05$ ). Στις ζύμες το LQC 10179 ταξινομείται στην ίδια ομάδα με το LQC 10167, διαφέρει όμως στατιστικά από τα LQC 10237, 10246 & 10235. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10246, 2014-10167, 1990-10167 & 2030-10167, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, παρουσιάζουν όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά με τα LQC 2000-10237 & 2000-10167, ( $P < 5\%$ ).

Με κριτήριο τη γαλακτώδη γεύση, τα LQC 2014 & 2000 από τα βακτήρια και τα LQC 10235 & 10167 από τις ζύμες, ήταν εκείνα με την περισσότερο και λιγότερο γαλακτώδη γεύση. Στις συγκαλλιέργειες, αυτές των LQC 2014-10167 & 2030-10167, σημείωσαν την υψηλότερη και χαμηλότερη τιμή. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι μεταξύ των στελεχών των βακτηρίων τα LQC 2030 & 1990, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, διαφέρουν ωστόσο από τα LQC 2000 & 2014. Και στην περίπτωση των ζυμών τα LQC 10167, 10246 & 10179 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, (a), διαφέρουν όμως με τα στελέχη LQC 10237 & 10235. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2030-10167, 1990-10167, 2000-10246 & 2000-10237 δεν χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέρουν ωστόσο από τα LQC 2014-10167 & 2000-10167.

Κρίνοντας τα δείγματα του ροφήματος κεφίρ με βάση τη μαγειρεμένη γεύση, τα LQC 2030 & 2014 από τα βακτήρια και LQC 10246 & 10167 από τις ζύμες, ήταν εκείνα με τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές όσο αφορά στο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2000-10167 & 2014-10167 ήταν οι συγκαλλιέργειες αυτές, στις οποίες η μαγειρεμένη γεύση ήταν περισσότερο έντονη και ανεπαίσθητη αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι για  $P < 5\%$ , τα LQC 2014 & 2000, δεν διέφεραν σημαντικά στατιστικώς, σε σύγκριση όμως των δύο παραπάνω με τα LQC 2030 & 1999, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στην περίπτωση των ζυμών, τα LQC 10235 & 10237 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για τα LQC 10179 & 10246. Ωστόσο στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνεται μεταξύ του LQC 10235 και των LQC 10179 & 10246. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2030-10167, 1990-10167, 2000-10167 & 2000-10237 δεν διαφέρουν μεταξύ τους, διαφοροποιούνται ωστόσο στατιστικώς από τα LQC 2000-10246 & 2014-10167.

Με κριτήριο τη δυσάρεστη γεύση σκόρδου στα δείγματα που δοκιμάστηκαν, τα LQC 2030 & 2014 από τις μονοκαλλιέργειες των βακτηρίων και τα LQC 10237 & 10167 από τις μονοκαλλιέργειες των ζυμών, ήταν εκείνα που ξεχώρισαν για την περισσότερο και λιγότερο έντονη γεύση σκόρδου αντίστοιχα. Στις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων με τις ζύμες, τα LQC 1990-10167 & 2014-10167 αξιολογήθηκαν ως εκείνα με την περισσότερο και λιγότερο αισθητή γεύση σκόρδου αντίστοιχα. Με τη χρήση της ANOVA φάνηκε ότι σε επίπεδο βακτηρίων τα LQC 1990, 2000 & 2030 ενώ δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, διαφοροποιούνται στατιστικά από το LQC 2014. Στην περίπτωση των ζυμών τα LQC 10167 & 10179, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (a). Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τα LQC 10246 & 10237, τα οποία επίσης δεν διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς μεταξύ τους. Ωστόσο τα δύο ζεύγη στελεχών σημειώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους,  $P < 5\%$ . Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10167 & 2000-10237 δεν συνοδεύονται από στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (ομάδα b,c), ενώ κάτι ανάλογο συμβαίνει και για τα LQC 2030-10167 & 2000-10246 (ομάδα e). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκαλλιέργειες των LQC 2014-10167 & 2000-10246, διαφοροποιούνται στατιστικά τόσο μεταξύ τους όσο και με τις υπόλοιπες.

Αξιολογώντας τα δείγματα ως προς την έλλειψη φρεσκάδας που μπορεί να διακρίνει ορισμένα από αυτά, τα LQC 2030 & 10237, από τα βακτήρια και τις ζύμες αντίστοιχα, χαρακτηρίστηκαν ως εκείνα στα οποία η έλλειψη φρεσκάδας ήταν πιο έντονη. Αντίθετα στα LQC 2014 & 10167, το χαρακτηριστικό αυτό ήταν σχεδόν ανεπαίσθητο. Αναφορικά με τις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων και των ζυμών, στα LQC 2000-10246 ήταν περισσότερο αισθητή η έλλειψη φρεσκάδας, ενώ στα LQC 2014-10167 ήταν σχεδόν μηδαμινή. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι τα LQC 2030, 1990 & 2000 δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, αλλά διαφοροποιούνται από το LQC 2014 ( $P < 0.05$ ). Σε επίπεδο ζυμών τα LQC 10246 & 10179 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (b), ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και με τα LQC 10246, 10235 & 10237 (ομάδα c), ενώ το LQC 10179 διαφέρει στατιστικά από τα δύο τελευταία. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10237 & 1990-10167 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των LQC 2000-10167 & 2000-10246. Οι δύο αυτές ομάδες ωστόσο διαφοροποιούνται μεταξύ τους λόγω στατιστικώς σημαντικής διαφοράς, ( $P < 0.05$ ).

Με κριτήριο τη γεύση βύνης, στην περίπτωση των βακτηρίων, τα LQC 1990 & 2014 αξιολογήθηκαν ως εκείνα με την περισσότερο αισθητή και λιγότερο αισθητή γεύση βύνης, ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και στην περίπτωση των ζυμών, με τα LQC 10235 & 10167 να σημειώνουν την υψηλότερη και χαμηλότερη τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Στις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων και των ζυμών, τα LQC 1990-10167 & 2014-10167 εκτιμήθηκαν ως εκείνα με την περισσότερο έντονη και σχεδόν ανεπαίσθητη γεύση βύνης, αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων, τα LQC 2014 & 2000, όπως και τα LQC 1990 & 2030 ταξινομούνται σε δύο διαφορετικές ομάδες α και δ αντίστοιχα, ( $P < 0.05$ ). Παρόλα αυτά, τα στελέχη που απαρτίζουν την κάθε ομάδα χαρακτηρίζονται από στατιστικώς μη σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Σε επίπεδο ζυμών συμβαίνει κάτι ανάλογο, με τα LQC 10167, 10237 & 10179 να ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (α), λόγω μη σημαντικής στατιστικής διαφοράς και τα LQC 10246 & 10235 σε μια άλλη ομάδα (c,d). Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2030-10167 & 2000-10167 κατηγοριοποιούνται στην ίδια ομάδα, αλλά και τα LQC 2000-10237, 2000-10246 & 1990-10167, με τη σειρά τους ταξινομούνται σε μια διαφορετική, με τις δύο αυτές ομάδες να διαφέρουν.

Με κριτήριο την ταγγή γεύση, στην περίπτωση των βακτηρίων, τα LQC 2030 & 2014 σημείωσαν τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές ταγγής γεύσης, ενώ στην περίπτωση των ζυμών περισσότερο και λιγότερο ταγγισμένα φάνηκαν τα LQC 10235 & 10167 αντίστοιχα. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2000-10246 & 2014-10167 ήταν εκείνα που χαρακτηρίστηκαν ως περισσότερο και λιγότερα ταγγισμένα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι όσο αφορά στα βακτήρια, με εξαίρεση τα LQC 1990 & 2000, τα οποία ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, τα LQC 2014 & 2030 διαφέρουν στατιστικώς ( $P < 0.05$ ). Στην περίπτωση των ζυμών τα LQC 10246, 10179 & 10237 δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, διαφέρουν όμως από το LQC 10167, για  $P < 0.05$ . Τέλος σε ό,τι αφορά στις συγκαλλιέργειες, τα LQC 2000-10246 & 2000-10167 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (g), όπως και τα LQC 2030-10167 & 1990-10167 (ομάδα b), με τις ομάδες αυτές να παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Με κριτήριο την τυχόν οξειδωμένη γεύση των προς αξιολόγηση δειγμάτων, από τα βακτήρια, τα LQC 1990 & 2014, αποτέλεσαν τα στελέχη εκείνα με την περισσότερο και τη λιγότερο οξειδωμένη γεύση, ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και για τις ζύμες, με

τα LQC 10246 & 10167, να θεωρούνται τα περισσότερο και λιγότερο οξειδωμένα. Στις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων και των ζυμών, τα LQC 2000-10167 & 2014-10167 συνοδεύτηκαν από τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές οξειδωμένης γεύσης, αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι σε επίπεδο βακτηρίων, τα LQC 2030, 1990 & 2000 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από το LQC 2014. Αναφορικά με τις ζύμες, τα LQC 10235, 10237 & 10246 που ταξινομούνται στην ομάδα, διαφέρουν από τα LQC 10167 & 10179. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2000-10237, 2000-10246, 1990-10167 & 2030-10167 ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα (b), διαφέρουν ωστόσο στατιστικά και από τη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167 (ομάδα a) και από τη συγκαλλιέργεια των LQC 2000-10167 (ομάδα e).

Με κριτήριο τη γεύση που παραπέμπει σε ζωοτροφή, τα LQC 2000 & 2014 από τα βακτήρια αξιολογήθηκαν ως εκείνα με το περισσότερο και λιγότερο αισθητό το χαρακτηριστικό αυτό. Αντίστοιχα στην περίπτωση των ζυμών, τα LQC 10246 & 10167 ήταν εκείνα με τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές της γεύσης που παραπέμπει σε ζωοτροφή, ενώ κάτι ανάλογο συνέβη και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας για τα LQC 2000-10246 & 2014-10167. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι σε επίπεδο βακτηρίων, μολονότι τα LQC 2030 & 1990 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέρουν από τα LQC 2000 & 2014 που και τα ίδια με τη σειρά τους ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες (e & a, αντίστοιχα). Σε επίπεδο ζυμών, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζουν τα LQC 10179 & 10246, καθώς και το στέλεχος LQC 10167 συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα στελέχη, ( $P < 0.05$ ). Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2030-10167, 1990-10167, 2000-10167 & 2000-10237 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα, ωστόσο παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ της συγκαλλιέργειας των LQC 2030-10167 και των LQC 2000-10246 όσο και μεταξύ της συγκαλλιέργειας των LQC 2014-10167 με τα υπόλοιπα στελέχη.

#### *4. Αξιολόγηση ως προς την υφή*

Η αξιολόγηση των δειγμάτων ροφήματος κεφίρ ως προς την υφή, πραγματοποιήθηκε με βάση 7 συνιστώσες, την αίσθηση τσιμπήματος, την πυκνότητα, την κρεμώδη υφή, την ομαλότητα, την κάλυψη του στόματος, τη λιπαρή αίσθηση και την κολλώδη αίσθηση. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εκτίμησης αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 8 και Πίνακα 12 για τις μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών που

ενοφθαλμίστηκαν σε 500 mL παστεριωμένου γάλακτος, και στο Διάγραμμα 9 και Πίνακα 13 για τις αντίστοιχες των συγκαλλιέργειών.

Ως προς την αίσθηση τσιμπήματος, τα LQC 2030 & 2000 από τα βακτήρια και τα LQC 10237 & 10246 από τις ζύμες, αποτέλεσαν τα στελέχη εκείνα με τη μεγαλύτερη και μικρότερη μέση τιμή της αίσθησης τσιμπήματος. Κάτι αντίστοιχο συνέβη και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, με τα LQC 2030-10167 & 2000-10167, να συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη και μικρότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων, τα στελέχη LQC 2014 & 2030 ταξινομούνται στην ομάδα d, ενώ κάτι ανάλογο συμβαίνει και με τα στελέχη LQC 1990 & 2000, που ταξινομούνται στις ομάδες a, b, c. Παρόλα αυτά οι παραπάνω ομάδες χαρακτηρίζονται από στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ). Στις ζύμες, τα στελέχη LQC 10179, 10167 & 10235 ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα (b), διαφοροποιήθηκαν όμως από το LQC 10237 (ομάδα e). Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα στελέχη LQC 2014-10167, 2030-10167, 1990-10167, 2000-10246 & 2000-10237 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέρουν όμως από τη συγκαλλιέργεια των LQC 2000-10167 ( $P < 0.05$ ).

Με κριτήριο την πυκνότητα των δειγμάτων, στην περίπτωση των βακτηρίων, τα LQC 2014 & 2030 και στην άλλη περίπτωση των ζυμών, τα LQC 10235 & 10179 ήταν εκείνα που αξιολογήθηκαν με την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2014-10167 & 2000-10167, σημείωσαν τη μεγαλύτερη και αντίστοιχα τη μικρότερη μέση τιμή της πυκνότητας. Η στατιστική επεξεργασία επισήμανε τη διαφορά του LQC 2014 με τα υπόλοιπα στελέχη των βακτηρίων, αλλά και τη διαφορά του LQC 2030 με το LQC 1990, ( $P < 0.05$ ). Σχετικά με τις ζύμες, φάνηκε ότι δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, γι αυτό και ταξινομούνται σε κοινή ομάδα (a). Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2000-10167, 2030-10167, 2000-10237, 1990-10167 & 2000-10246, δεν διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους, διαφοροποιούνται όμως από τα LQC 2014-10167.

Η αξιολόγηση των δειγμάτων με βάση την κρεμώδη υφή, έδειξε ότι τα LQC 2014 & 1990, από τα βακτήρια, και τα LQC 10167 & 10246 από τις ζύμες αποτέλεσαν εκείνα με την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Ανάλογο φαινόμενο παρουσιάστηκε και στις συγκαλλιέργειες των βακτηρίων με τις ζύμες, όπου τα LQC 2014-10167 & 2000-101246, συγκέντρωσαν τη μεγαλύτερη και

μικρότερη μέση τιμή της κρεμώδους υφής. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε την ομαδοποίηση των LQC 2030 & 2000 και τη διαφοροποίησή τους από τα στελέχη LQC 1990 & 2014, τα οποία με τη σειρά τους ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες (c, d). Σε επίπεδο ζυμών στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των LQC 10237, 10179 & 10167, με τα δύο πρώτα να ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (a). Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα στελέχη LQC 2030-10167, 1990-10167, 2000-10167, 2000-10237 & 2000-10246 δεν διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά διαφοροποιούνται στατιστικώς από τη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167.

Με κριτήριο την ομαλότητα του δείγματος, μετά την είσοδό του στο στόμα, τα LQC 2014 & 1990, από τα βακτήρια και τα LQC 10167 & 10246, από τις ζύμες, συγκέντρωσαν την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη μέση τιμή της αίσθησης ομαλότητας την παρουσίασαν τα LQC 2014-10167 & 2030-10167, αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων τα LQC 1990 & 2030, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (a), διαφέρουν ωστόσο και από το LQC 2000 και από το LQC 2014, ( $P < 0.05$ ). Στην περίπτωση των ζυμών, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των LQC 10246 & 10167. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας τα LQC 2030-10167, 2000-10246 & 1990-10167 ταξινομούνται στην ίδια ομάδα (a,b,c), διαφέρουν όμως τόσο από τη συγκαλλιέργεια των LQC 2000-10237 όσο και από εκείνη των 2014-10167 (ομάδες d & f, αντίστοιχα).

Με κριτήριο την κάλυψη του στόματος που επέφεραν τα προς αξιολόγηση δείγματα, τα LQC 2014 & 2000, από τα βακτήρια και τα LQC 10246 & 10237, από τις ζύμες, παρουσίασαν την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού. Κάτι ανάλογο συνέβη και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, με τα LQC 2014-10167 & 1990-10167 να συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη και μικρότερη τιμή αντίστοιχα. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι ενώ όλα τα στελέχη των βακτηρίων, συγκαταλέγονται στην ίδια ομάδα (a), εξαίρεση ωστόσο αποτέλεσε το LQC 2014, που ταξινομήθηκε στην ομάδα b. Στην περίπτωση των ζυμών, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, μόνο η συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167 διαφοροποιείται σε σχέση με τα υπόλοιπα.

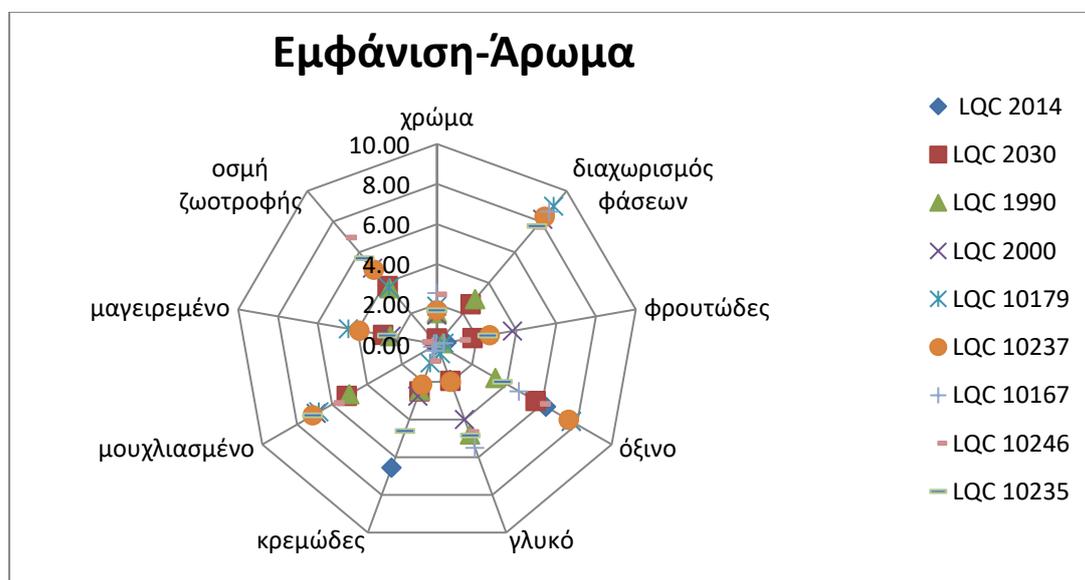
Με γνώμονα τη λιπαρή αίσθηση των δειγμάτων στο στόμα, τα LQC 2030 & 2000 από τα βακτήρια, και τα LQC 10246 & 10237, από τις ζύμες παρουσίασαν την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Κάτι ανάλογο συνέβη και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας με τα LQC 2014-10167 & 1990-10167, να συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη και μικρότερη μέση τιμή της λιπαρής αίσθησης κάθε δείγματος. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των LQC 2000 & 2030 (ομάδες, a,b,c,d & f αντίστοιχα). Στην περίπτωση των ζυμών, δε σημειώνεται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τόσο τα LQC 1990-10167 & 2000-10246 που ταξινομούνται στην ομάδα a, b, όσο και τα LQC 2000-10237 & 2014-10167 που ανήκουν στην e, f, ενώ δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σαν μέλη της ίδιας ομάδας, διαφοροποιούνται σημαντικά σαν στελέχη διαφορετικών ομάδων.

Με κριτήριο την κολλώδη υφή, τα LQC 2014 & 2000 από τα βακτήρια και τα LQC 10246 & 10237, από τις ζύμες εμφάνισαν την υψηλότερη και χαμηλότερη μέση τιμή του χαρακτηριστικού αυτού. Σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, συνέβη κάτι ανάλογο, με τα LQC 2014-10167 & LQC 1990-10167 να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη και μικρότερη μέση τιμή κολλώδους υφής. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας έδειξαν ότι στην περίπτωση τόσο των βακτηρίων όσο και των ζυμών, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των στελεχών κάθε μικροβιακής κοινότητας. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, ενώ τα στελέχη LQC 2030-10167, 1990-10167, 2000-10167, 2000-10237 & 2000-10246 δεν διαφοροποιούνται στατιστικά και ταξινομούνται στην ομάδα a, εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167, που ταξινομείται στην ομάδα b.

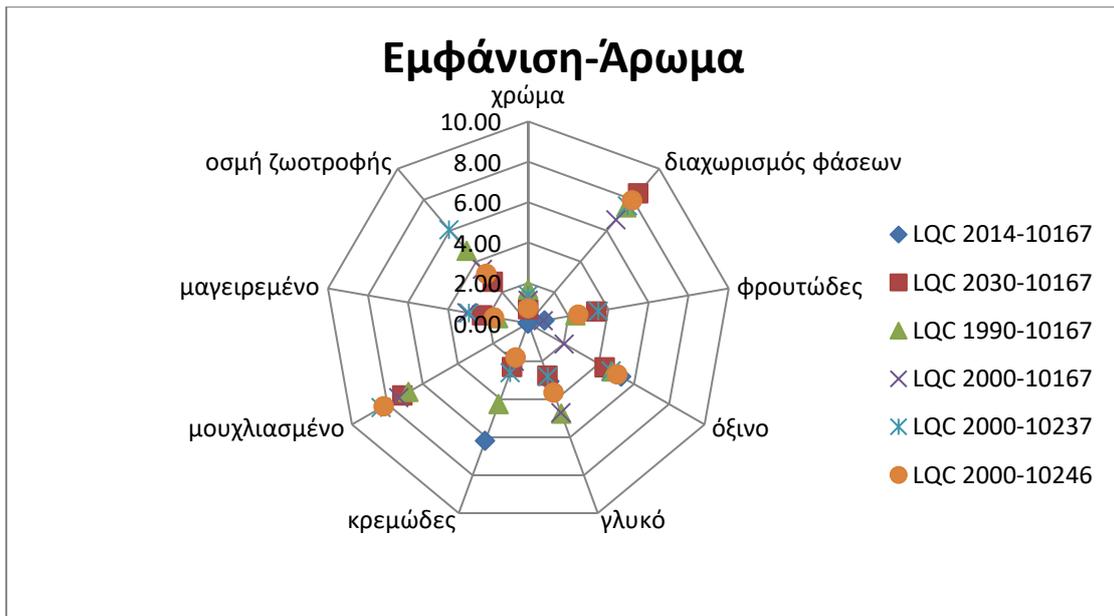
##### *5. Συνολική αξιολόγηση*

Στο τέλος του εντύπου αξιολόγησης, πραγματοποιούνταν κάθε φορά και μια συνολικότερη εκτίμηση του εκάστοτε δείγματος, με τα αποτελέσματα να αποτυπώνονται και στον Πίνακα 14 καθώς και στο αντίστοιχο Διάγραμμα 10. Όπως συνέβη και προηγουμένως έτσι κι εδώ, οι υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές, αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές της γενικότερης αξιολόγησης των δειγμάτων. Πιο αναλυτικά τα στελέχη των δειγμάτων ροφήματος κεφίρ, που συγκέντρωσαν τις θετικότερες εντυπώσεις ήταν η μονοκαλλιέργεια του LQC 2014, με μέση τιμή 7.46,

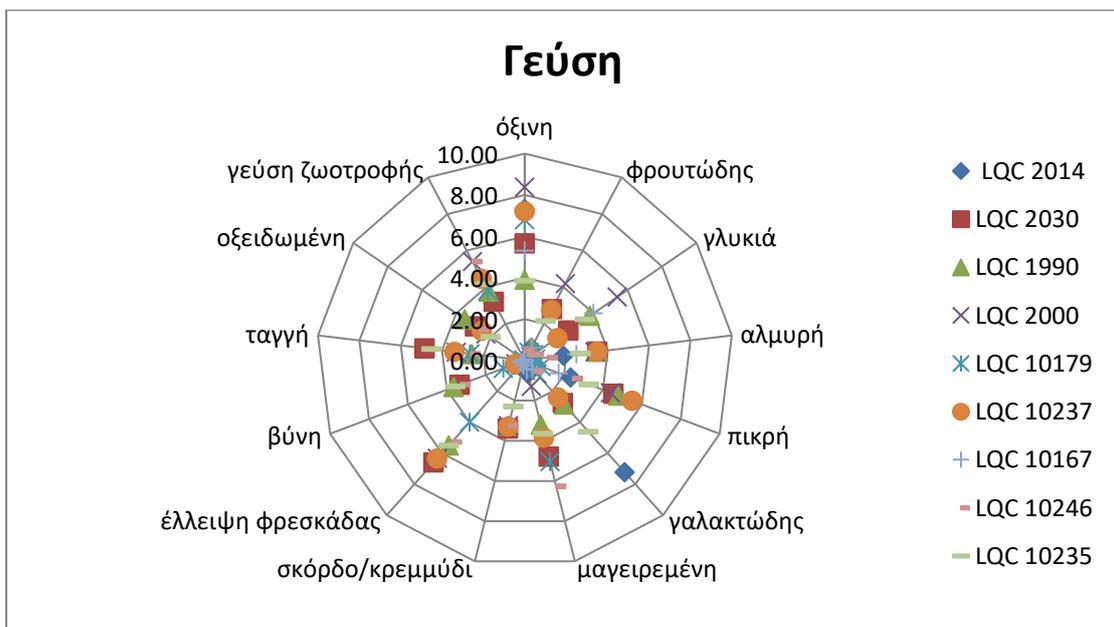
από τα βακτήρια και η συγκαλλιέργεια των LQC 2014-10167, με μέση τιμή 8.18. Ενώ το LQC 1990 από τα βακτήρια και σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, αυτή των LQC 2000-10237 εκτιμήθηκαν ως τα λιγότερο αποδεκτά στελέχη, από τις αντίστοιχες μικροβιακές κοινότητες. Τέλος αναφορικά με τις ζύμες, η περισσότερο αποδεκτή, ήταν εκείνη της μονοκαλλιέργειας LQC 10167, με μέση τιμή μόλις 2.78, ενώ το LQC 10246, με μέση τιμή 0.58, χαρακτηρίστηκε ως το λιγότερο αποδεκτό στέλεχος ζυμών. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι στην περίπτωση των βακτηρίων, τα LQC 2000 & 1990, ταξινομούνται στην ίδια ομάδα ( $P > 0.05$ ), αλλά εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά και με το LQC 2014 αλλά και με το LQC 2030, τα οποία με τη σειρά τους διαφοροποιούνται στατιστικώς (ομάδες d & c, αντίστοιχα). Σε επίπεδο ζυμών η στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ του στελέχους LQC 10167 και των LQC 10246 & 10237, με τα δύο τελευταία να ταξινομούνται στην ίδια ομάδα a. Τέλος σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, τα LQC 2000-10237 & 2000-10246, ταξινομούνται στην ομάδα a ( $P > 0.05$ ) και τα LQC 2030-10167 & 2000-10167, ανήκουν στην ομάδα c, πράγμα που φανερώνει ότι σαν μέλη της ίδιας ομάδας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ως στελέχη διαφορετικών ομάδων, διαφοροποιούνται στατιστικώς, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί.



**Διάγραμμα 4:** Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς την εμφάνιση, που διαχωρίζεται στο χρώμα και το διαχωρισμό των φάσεων, αλλά και το άρωμα, που αξιολογείται ως φρουτώδες, όξινο, γλυκό, κρεμώδες, μουχλιασμένο, μαγειρεμένο και εκείνο που παραπέμπει ζωοτροφή. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.

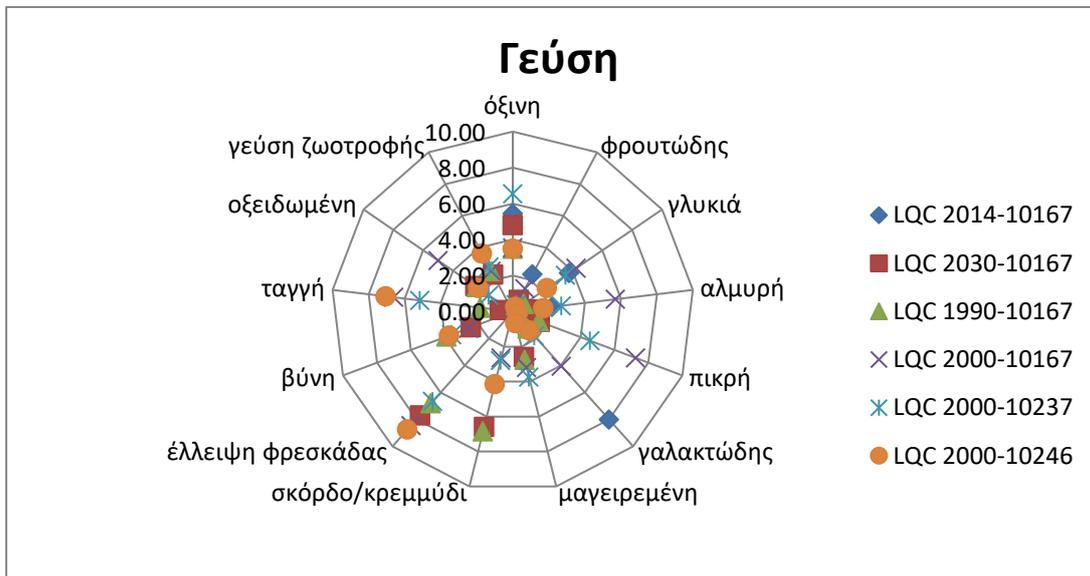


**Διάγραμμα 5:** Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς την εμφάνιση, που διαχωρίζεται στο χρώμα και το διαχωρισμό των φάσεων, αλλά και το άρωμα, που αξιολογείται ως φρουτώδες, όξινο, γλυκό, κρεμώδες, μουχλιασμένο, μαγειρεμένο και εκείνο που παραπέμπει ζωοτροφή. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.

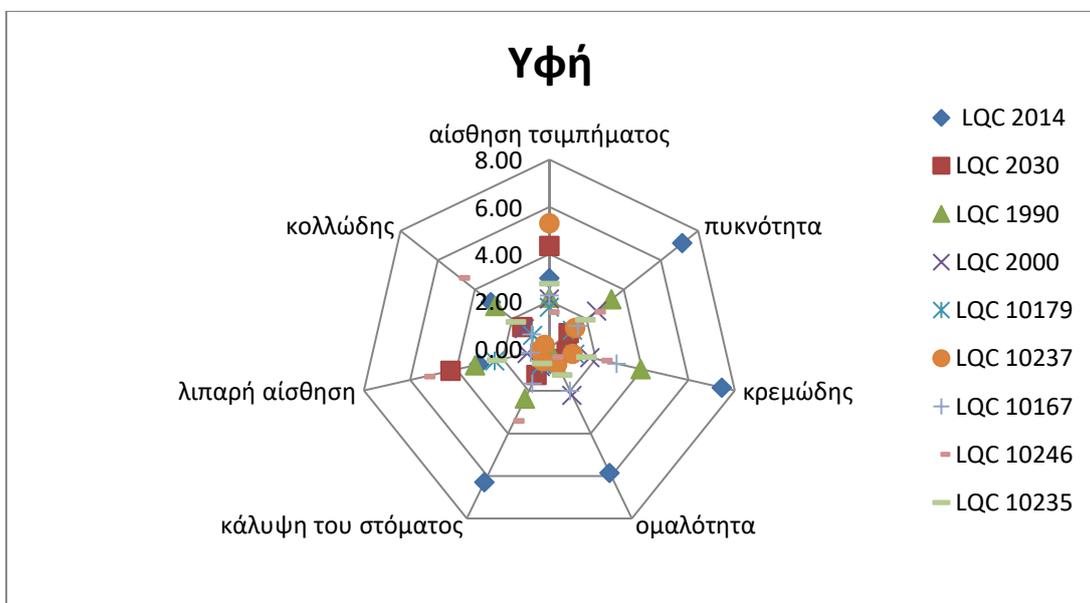


**Διάγραμμα 6:** Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση, που διαχωρίζεται σε όξινη, φρουτώδης, γλυκιά, αλμυρή, πικρή, γαλακτώδης, μαγειρεμένη, εκείνη που παραπέμπει σε σκόρδο/κρεμμύδι, έλλειψη φρεσκάδας, βύνη, ταγγή,

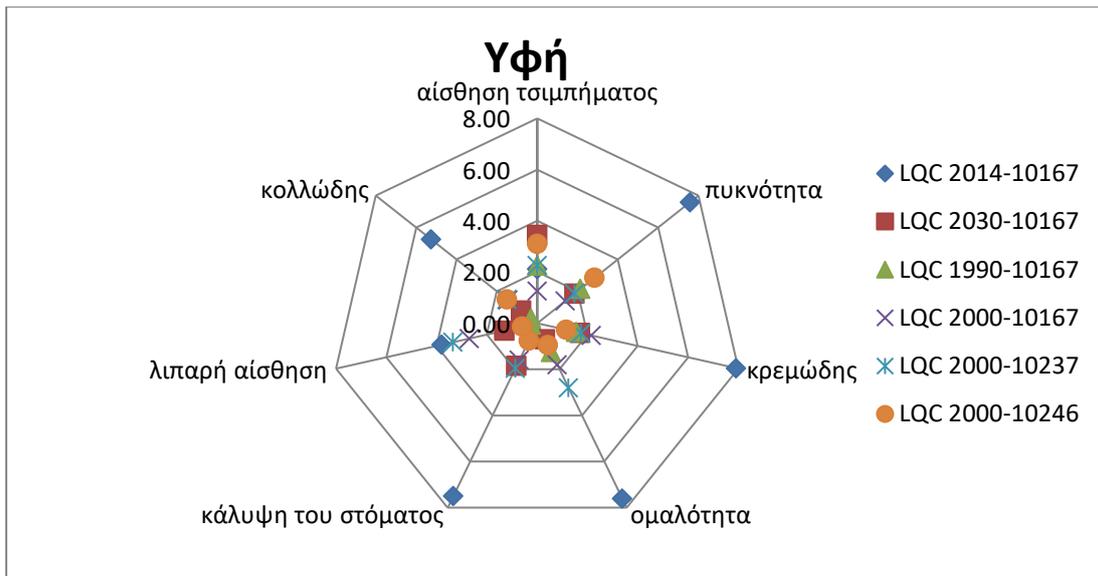
οξειδωμένη αλλά και γεύση ζωοτροφής. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.



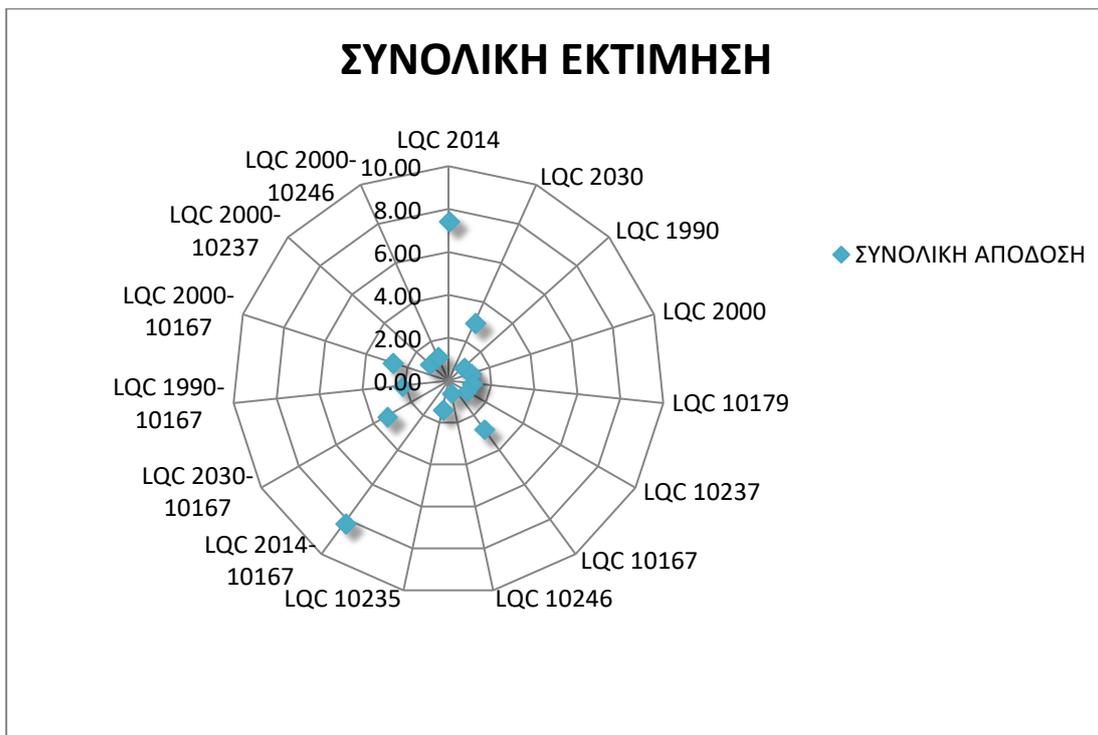
Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση, που διαχωρίζεται σε όξινη, φρουτώδης, γλυκιά, αλμυρή, πικρή, γαλακτώδης, μαγειρεμένη, εκείνη που παραπέμπει σε σκόρδο/κρεμμύδι, έλλειψη φρεσκάδας, βύνη, ταγγή, οξειδωμένη αλλά και γεύση ζωοτροφής. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.



Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς την υφή, που αξιολογούνται ως προς την αίσθηση τσιμπήματος, την πυκνότητα, το κρεμώδες, την κάλυψη του στόματος, τη λιπαρή αίσθηση και το κολλώδες. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.



**Διάγραμμα 9:** Αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ ως προς την υφή σε επίπεδο συγκαλλιέργειας, που αξιολογούνται ως προς την αίσθηση τσιμπήματος, την πυκνότητα, το κρεμώδες, την κάλυψη του στόματος, τη λιπαρή αίσθηση και το κολλώδες. Το ρόφημα κεφίρ αποτελεί προϊόν ενοφθαλμισμού παστεριωμένου γάλακτος με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.



**Διάγραμμα 10:** Αποτυπώνεται η συνολική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ, τα οποία έχουν προκύψει με ενοφθαλμισμό παστεριωμένου γάλακτος με μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών.

**Πίνακας 8: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς την εμφάνιση και το άρωμα, τα οποία εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΕΜΦΑΝΙΣΗ		ΑΡΩΜΑ						
		ΧΡΩΜΑ	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΦΑΣΕΩΝ	ΦΡΟΥΤΩΔΕΣ	ΘΞΙΝΟ	ΓΛΥΚΟ	ΚΡΕΜΩΔΕΣ	ΜΟΥΧΧΙΑΣΜΕΝΟ	ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΟ	ΟΣΜΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ	LQC 2014	1.62 ± 1.06 <sup>a,b</sup>	0.21 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.53 <sup>a</sup>	6.25 ± 2.06 <sup>d,e</sup>	1.89 ± 1.94 <sup>a,b</sup>	6.55 ± 2.47 <sup>d</sup>	0.09 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.25 <sup>a,b</sup>	0.12 ± 0.19 <sup>a</sup>
	LQC 2030	0.30 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.71 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.57 <sup>a,b,c,d,e</sup>	5.65 ± 0.64 <sup>b,c,d,e</sup>	1.95 ± 0.49 <sup>a,b</sup>	2.50 ± 0.28 <sup>a,b,c</sup>	5.15 ± 0.35 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.57 <sup>d,e,f</sup>	3.80 ± 0.42 <sup>b,c,d</sup>
	LQC 1990	1.55 ± 0.49 <sup>a,b</sup>	2.95 ± 0.64 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.55 <sup>a,b</sup>	4.80 ± 0.42 <sup>c,f</sup>	2.45 ± 0.49 <sup>a,b,c</sup>	5.00 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.35 <sup>d,e</sup>	3.65 ± 0.64 <sup>b,c,d</sup>
	LQC 2000	1.45 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	8.15 ± 0.78 <sup>c,d</sup>	3.80 ± 0.99 <sup>f</sup>	7.70 ± 1.41 <sup>e</sup>	4.00 ± 0.85 <sup>b,c,f</sup>	2.75 ± 0.92 <sup>a,b,c</sup>	6.90 ± 0.57 <sup>c,d,e</sup>	2.30 ± 0.28 <sup>d,e</sup>	4.95 ± 0.64 <sup>d,e</sup>
ΖΥΜΕΣ	LQC 10179	1.90 ± 0.57 <sup>a,b</sup>	9.00 ± 0.28 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.35 <sup>a</sup>	7.70 ± 0.42 <sup>e</sup>	0.50 ± 0.57 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.71 <sup>a</sup>	7.75 ± 0.49 <sup>c,d</sup>	4.45 ± 0.49 <sup>g</sup>	3.70 ± 0.85 <sup>b,c,d</sup>
	LQC 10237	1.70 ± 0.28 <sup>a,b</sup>	8.30 ± 0.42 <sup>d</sup>	2.65 ± 0.49 <sup>d,e,f</sup>	7.55 ± 0.64 <sup>e</sup>	2.00 ± 0.71 <sup>a,b</sup>	2.15 ± 0.64 <sup>a,b,c</sup>	7.10 ± 0.57 <sup>c,d,e,f</sup>	3.90 ± 0.42 <sup>f,g</sup>	4.85 ± 0.35 <sup>d,e</sup>
	LQC 10167	2.55 ± 0.64 <sup>b</sup>	8.65 ± 0.64 <sup>d</sup>	8.65 ± 0.64 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.28 <sup>b,c,d</sup>	5.50 ± 0.57 <sup>f</sup>	0.35 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.05 ± 0.07 <sup>a</sup>
	LQC 10246	2.50 ± 0.57 <sup>b</sup>	7.65 ± 0.78 <sup>c,d</sup>	1.20 ± 0.42 <sup>a,b,c,d</sup>	5.95 ± 0.49 <sup>c,d,e</sup>	4.65 ± 0.64 <sup>c,f</sup>	0.90 ± 0.42 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.35 <sup>b,c</sup>	0.70 ± 0.28 <sup>a,b,c</sup>	6.95 ± 0.64 <sup>f</sup>
	LQC 10235	1.70 ± 0.28 <sup>a,b</sup>	7.70 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	2.55 ± 0.64 <sup>d,e,f</sup>	3.75 ± 0.49 <sup>a,b,c</sup>	4.85 ± 0.35 <sup>c,f</sup>	4.60 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	7.10 ± 0.57 <sup>c,d,e,f</sup>	2.50 ± 0.57 <sup>d,e,f</sup>	5.60 ± 0.42 <sup>e,f</sup>

\*Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ( $P < 0.05$ ). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των μονοκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

**Πίνακας 9: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς την εμφάνιση και το άρωμα, τα οποία εμβολιάστηκαν με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΕΜΦΑΝΙΣΗ		ΑΡΩΜΑ						
		ΧΡΩΜΑ	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΦΑΣΕΩΝ	ΦΡΟΥΤΩΔΕΣ	ΟΞΙΝΟ	ΓΛΥΚΟ	ΚΡΕΜΩΔΕΣ	ΜΟΥΧΛΙΑΣΜΕΝΟ	ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΟ	ΟΣΜΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ
ΣΥΓΚΕΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	LQC 2014-10167	0.96 ± 0.67 <sup>a,b</sup>	0.04 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.81 0.92 <sup>a,b,c</sup>	5.27 ± 0.79 <sup>b,c,d,e</sup>	3.06 ± 1.30 <sup>b,c</sup>	6.19 ± 1.75 <sup>d</sup>	0.01 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.04 <sup>a</sup>
	LQC 2030-10167	0.70 ± 0.28 <sup>a</sup>	8.40 ± 0.42 <sup>d</sup>	3.40 ± 0.42 <sup>e,f</sup>	4.35 ± 0.21 <sup>a,b,c,d</sup>	2.75 ± 0.49 <sup>a,b,c</sup>	2.30 ± 0.28 <sup>a,b,c</sup>	7.15 ± 0.49 <sup>c,d,e,f</sup>	2.30 ± 0.28 <sup>d,e</sup>	2.70 ± 0.28 <sup>b</sup>
	LQC 1990-10167	1.70 ± 0.57 <sup>a,b</sup>	7.50 ± 0.57 <sup>c,d</sup>	2.35 ± 0.35 <sup>b,c,d,e,f</sup>	4.75 ± 0.21 <sup>b,c,d</sup>	4.75 ± 0.78 <sup>c,f</sup>	4.25 ± 0.49 <sup>b,c,d</sup>	6.80 ± 0.42 <sup>c,d,e</sup>	1.50 ± 0.85 <sup>b,c,d</sup>	4.70 ± 0.57 <sup>c,d,e</sup>
	LQC 2000-10167	1.15 ± 0.49 <sup>a,b</sup>	6.70 ± 0.57 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.35 <sup>a,b</sup>	2.05 ± 0.78 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.28 <sup>c,f</sup>	2.00 ± 0.14 <sup>a,b,c</sup>	7.35 ± 0.64 <sup>d,e,f</sup>	3.05 ± 0.78 <sup>e,f,g</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>b,c,d</sup>
	LQC 2000-10237	1.40 ± 0.71 <sup>a,b</sup>	7.60 ± 0.28 <sup>c,d</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>f</sup>	4.70 ± 0.28 <sup>b,c,d</sup>	2.80 ± 0.42 <sup>a,b,c</sup>	2.60 ± 0.42 <sup>a,b,c</sup>	8.35 ± 0.78 <sup>f</sup>	2.95 ± 0.64 <sup>e,f</sup>	6.05 ± 0.92 <sup>e,f</sup>
	LQC 2000-10246	1.75 ± 0.49 <sup>a</sup>	7.95 ± 0.49 <sup>c,d</sup>	2.50 ± 0.57 <sup>c,d,e,f</sup>	5.05 ± 0.78 <sup>b,c,d</sup>	3.65 ± 0.71 <sup>b,c,f</sup>	1.80 ± 0.42 <sup>a,b</sup>	8.20 ± 0.57 <sup>e,f</sup>	1.70 ± 0.42 <sup>c,d,e</sup>	3.20 ± 0.42 <sup>b,c</sup>

\* Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί (P<0.05). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των συγκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.



Πίνακας 10: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση, τα οποία εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΓΕΥΣΗ								
		ΟΞΙΝΗ	ΦΡΟΥΤΩΔΗΣ	ΓΛΥΚΙΑ	ΑΑΜΥΡΗ	ΠΙΚΡΗ	ΓΑΛΑΚΤΩΔΗΣ	ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΗ	ΣΚΟΡΔΟ/ ΚΡΕΜΜΥΔΙ	ΕΛΛΕΙΨΗ ΦΡΕΣΚΑΔΑΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ	LQC 2014	7.33 ± 0.70 <sup>f,g</sup>	0.69 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.96 <sup>d,e,f</sup>	1.88 ± 1.17 <sup>b,c,d,e</sup>	2.35 ± 0.78 <sup>c,d</sup>	7.23 ± 0.94 <sup>f</sup>	0.58 ± 0.55 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.42 <sup>a</sup>
	LQC 2030	5.65 ± 0.35 <sup>d,e</sup>	2.80 ± 0.42 <sup>c</sup>	2.55 ± 0.21 <sup>d,e,f</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>f</sup>	4.55 ± 0.35 <sup>e,f</sup>	2.75 ± 0.07 <sup>c,d</sup>	4.80 ± 0.42 <sup>d,e</sup>	3.40 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	6.60 ± 0.28 <sup>c,d,e</sup>
	LQC 1990	3.90 ± 0.28 <sup>b,c</sup>	0.70 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.42 <sup>e,f,g,h</sup>	3.55 ± 0.49 <sup>f</sup>	4.80 ± 0.42 <sup>f</sup>	2.85 ± 0.35 <sup>c,d</sup>	3.20 ± 0.71 <sup>c</sup>	3.25 ± 0.49 <sup>c,d</sup>	5.50 ± 0.57 <sup>c,d</sup>
	LQC 2000	8.37 ± 0.37 <sup>g</sup>	4.20 ± 0.42 <sup>d</sup>	5.40 ± 0.28 <sup>h</sup>	3.40 ± 0.42 <sup>e,f</sup>	4.40 ± 0.42 <sup>e,f</sup>	0.88 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.28 <sup>a,b</sup>	3.25 ± 0.21 <sup>c,d</sup>	6.33 ± 0.32 <sup>c,d</sup>
ΖΥΜΕΣ	LQC 10179	6.80 ± 0.42 <sup>e,f</sup>	0.44 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	0.53 ± 0.09 <sup>a,b</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.69 ± 0.16 <sup>a</sup>	5.05 ± 0.78 <sup>e,f</sup>	0.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.71 <sup>b,c</sup>
	LQC 10237	7.20 ± 0.42 <sup>f,g</sup>	2.75 ± 0.49 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.14 <sup>b,c,d</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>f</sup>	5.50 ± 0.57 <sup>f</sup>	2.40 ± 0.42 <sup>b,c</sup>	3.85 ± 0.35 <sup>c,d,e</sup>	3.30 ± 0.28 <sup>c,d</sup>	6.35 ± 0.49 <sup>c,d,e</sup>
	LQC 10167	5.30 ± 0.14 <sup>c,d,e</sup>	0.70 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.07 <sup>f,g,h</sup>	2.50 ± 0.28 <sup>c,d,e,f</sup>	1.75 ± 0.18 <sup>b,c</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.04 <sup>a</sup>

	<b>LQC 10246</b>	0.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	1.11 ± 0.20 <sup>a,b,c,d</sup>	2.47 ± 0.11 <sup>c,d</sup>	0.69 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.28 ± 0.25 <sup>f</sup>	3.25 ± 0.21 <sup>c,d</sup>	5.28 ± 0.25 <sup>c,d</sup>
	<b>LQC 10235</b>	3.85 ± 0.35 <sup>b,c</sup>	2.15 ± 0.35 <sup>b,c</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>d,e,f,g</sup>	2.70 ± 0.28 <sup>d,e,f</sup>	3.30 ± 0.28 <sup>d,e</sup>	4.60 ± 0.28 <sup>e</sup>	3.65 ± 0.35 <sup>c,d</sup>	2.30 ± 0.28 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.57 <sup>c,d</sup>

\* Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί (P<0.05). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των συγκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.



Πίνακας 11: : Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση, τα οποία εμβολιάστηκαν με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΓΕΥΣΗ								
		ΟΞΙΝΗ	ΦΡΟΥΤΩΔΗΣ	ΓΛΥΚΙΑ	ΑΛΜΥΡΗ	ΠΙΚΡΗ	ΓΑΛΑΚΤΩΔΗΣ	ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΗ	ΣΚΟΡΔΟ/ ΚΡΕΜΜΥΔΙ	ΕΛΛΕΙΨΗ ΦΡΕΣΚΑΔΑΣ
ΣΥΓΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ	LQC 2014-10167	5.44 ± 0.96 <sup>d,e</sup>	2.34 ± 0.95 <sup>b,c</sup>	3.78 ± 1.51 <sup>e,f,g,h</sup>	2.18 ± 1.07 <sup>c,d,e,f</sup>	0.82 ± 0.42 <sup>a,b</sup>	8.00 ± 1.02 <sup>f</sup>	0.28 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.15 <sup>a</sup>
	LQC 2030-10167	4.80 ± 0.42 <sup>b,c,d</sup>	0.75 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.14 <sup>a,b,c</sup>	1.60 ± 0.42 <sup>a,b,c</sup>	0.60 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.42 <sup>b,c</sup>	6.60 ± 0.42 <sup>e</sup>	6.70 ± 0.42 <sup>e,f</sup>
	LQC 1990-10167	3.50 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.21 <sup>a,b,c</sup>	0.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.49 <sup>a,b,c</sup>	1.25 ± 0.49 <sup>a,b</sup>	2.75 ± 0.49 <sup>c</sup>	6.85 ± 0.49 <sup>e</sup>	6.80 ± 0.42 <sup>d,e</sup>
	LQC 2000-10167	3.55 ± 0.64 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.35 <sup>a,b</sup>	.25 ± 0.35 <sup>g,h</sup>	5.70 ± 0.57 <sup>g</sup>	7.25 ± 0.49 <sup>g</sup>	.05 ± 0.07 <sup>d,e</sup>	3.20 ± 0.28 <sup>c</sup>	2.65 ± 0.35 <sup>b,c</sup>	8.45 ± 0.64 <sup>f</sup>
	LQC 2000-10237	6.55 ± 0.64 <sup>e,f</sup>	0.45 ± 0.64 <sup>a</sup>	3.55 ± 0.64 <sup>d,e,f,g</sup>	2.70 ± 0.28 <sup>d,e,f</sup>	4.55 ± 0.78 <sup>e,f</sup>	1.80 ± 0.42 <sup>a,b,c</sup>	3.75 ± 0.49 <sup>c,d,e</sup>	2.80 ± 0.42 <sup>b,c</sup>	6.65 ± 0.64 <sup>d,e</sup>
	LQC 2000-10246	3.50 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.42 <sup>c,d,e</sup>	1.70 ± 0.28 <sup>a,b,c,d</sup>	0.30 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.14 <sup>a,b</sup>	0.65 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.15 ± 0.21 <sup>b</sup>	8.75 ± 0.35 <sup>f</sup>

\*Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί (P<0.05). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των συγκαλλιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

**Πίνακας 12: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση και την υφή, τα οποία εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΓΕΥΣΗ				ΥΦΗ						
		ΒΥΝΗ	ΤΑΓΓΗ	ΟΞΕΙΛΩΜΕΝΗ	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	ΛΙΣΘΗΣΗ ΤΣΙΜΠΗΜΑΤΟΣ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ	ΚΡΕΜΩΔΗΣ	ΟΜΑΛΟΤΗΤΑ	ΚΑΛΥΨΗ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	ΛΙΠΑΡΗ ΛΙΣΘΗΣΗ	ΚΟΛΛΩΔΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ	LQC 2014	0.09 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.11	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.98 ± 0.98 <b>b,c,d</b>	7.16 ± 0.92 <sup>d</sup>	7.44 ± 0.83 <sup>d</sup>	5.85 ± 1.20 <sup>e</sup>	6.29 ± 0.94 <sup>b</sup>	1.02 ± 1.37 <b>b,c,d,e,f</b>	3.15 ± 1.45 <sup>a,b</sup>
	LQC 2030	3.35 ± 0.35 <b>b,c,d</b>	4.85 ± 0.35 <sup>f</sup>	2.90 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	3.20 ± 0.42 <b>b,c,d</b>	4.35 ± 0.49 <sup>d,e</sup>	1.05 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.28 <sup>a,b</sup>	1.25 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.25 ± 0.21 <sup>f</sup>	1.45 ± 0.21 <sup>a</sup>
	LQC 1990	3.65 ± 0.64 <sup>d</sup>	2.55 ± 0.49 <sup>c,d</sup>	3.50 ± 0.57 <sup>d</sup>	3.75 ± 0.49 <sup>c,d</sup>	2.15 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	3.35 ± 0.35 <sup>c</sup>	3.95 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.14 <b>c,d,e,f</b>	2.90 ± 0.28 <sup>a,b</sup>
	LQC 2000	0.45 ± 0.49 <sup>a,d</sup>	3.30 ± 0.28 <sup>d</sup>	2.25 ± 0.21 <sup>b,c,d</sup>	5.40 ± 0.28 <sup>e</sup>	2.10 ± 0.28 <b>a,b,c</b>	2.55 ± 0.21 <b>a,b,c</b>	1.75 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	2.20 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	0.85 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.21 <b>a,b,c,d</b>	1.35 ± 0.21 <sup>a</sup>
ΖΥΜΙΕΣ	LQC 10179	1.10 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.35 <sup>c,d</sup>	0.05 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.42 <sup>c,d</sup>	1.75 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	1.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	0.75 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.35 <b>a,b,c,d,e,f</b>	0.90 ± 0.28 <sup>a</sup>
	LQC 10237	0.50 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.40 ± 0.42 <sup>d,e</sup>	2.50 ± 0.57 <sup>b,c,d</sup>	4.45 ± 0.49 <sup>d,e</sup>	5.30 ± 0.28 <sup>e</sup>	1.40 ± 0.42 <b>a,b</b>	1.00 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	0.60 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.14 <b>a,b</b>	0.25 ± 0.21 <sup>a</sup>

<b>LQC 10167</b>	$0.20 \pm 0.07^{\mathbf{a}}$	$0.00 \pm 0.00^{\mathbf{a}}$	$0.05 \pm 0.04^{\mathbf{a}}$	$0.05 \pm 0.04^{\mathbf{a}}$	$2.25 \pm 0.21$ <b>a,b,c</b>	$1.55 \pm 0.21$ <b>a,b</b>	$2.90 \pm 0.28^{\mathbf{b,c}}$	$2.00 \pm 0.14$ <b>b,c,d</b>	$1.65 \pm 0.49^{\mathbf{a}}$	$0.80 \pm 0.28$ <b>a,b,c,d</b>	$0.95 \pm 0.21^{\mathbf{a}}$
<b>LQC 10246</b>	$3.30 \pm 0.28^{\mathbf{b,c,d}}$	$2.60 \pm 0.28^{\mathbf{c,d}}$	$2.65 \pm 0.64$ <b>b,c,d</b>	$5.40 \pm 0.42^{\mathbf{e}}$	$1.55 \pm 0.21^{\mathbf{a}}$	$2.50 \pm 0.28$ <b>a,b</b>	$2.30 \pm 0.28^{\mathbf{a}}$	$0.40 \pm 0.42^{\mathbf{a}}$	$3.40 \pm 0.42^{\mathbf{a}}$	$5.35 \pm 0.35$ <b>a,b,c,d,e,f</b>	$4.80 \pm 0.42^{\mathbf{a,b}}$
<b>LQC 10235</b>	$3.55 \pm 0.49^{\mathbf{c,d}}$	$4.50 \pm 0.42^{\mathbf{e,f}}$	$2.00 \pm 0.57^{\mathbf{b,c}}$	$4.15 \pm 0.49^{\mathbf{d,e}}$	$2.75 \pm 0.35^{\mathbf{b,c}}$	$1.95 \pm 0.21$ <b>a,b,c</b>	$1.60 \pm 0.28^{\mathbf{a,b}}$	$1.25 \pm 0.21$ <b>a,b,c</b>	$0.70 \pm 0.28^{\mathbf{a}}$	$2.25 \pm 0.21$ <b>a,b,c,d,e,f</b>	$1.80 \pm 0.42^{\mathbf{a}}$

\*Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ( $P < 0.05$ ). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των μονοκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

**Πίνακας 13: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ροφημάτων κεφίρ ως προς τη γεύση και την υφή, τα οποία εμβολιάστηκαν με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών (\*).**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΓΕΥΣΗ				ΥΦΗ						
		ΒΥΝΗ	ΤΑΓΓΗ	ΟΞΕΙΑΩΜΕΝΗ	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	ΛΙΣΘΗΣΗ ΤΣΙΜΠΗΜΑΤΟΣ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ	ΚΡΕΜΩΔΗΣ	ΟΜΑΛΟΤΗΤΑ	ΚΑΛΥΨΗ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	ΛΙΠΑΡΗ ΛΙΣΘΗΣΗ	ΚΟΛΛΩΔΗΣ
ΣΥΓΚΕΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	LQC 2014-10167	0.17 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.49 <b>a,b,c</b>	7.58 ± 0.86 <sup>d</sup>	7.91 ± 0.83 <sup>d</sup>	7.60 ± 1.10 <sup>f</sup>	7.49 ± 1.17 <sup>b</sup>	3.80 ± 1.58 <b>e,f</b>	5.26 ± 2.61 <sup>b</sup>
	LQC 2030-10167	2.45 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.42 <sup>a,b</sup>	2.50 ± 0.57 <b>b,c,d</b>	2.33 ± 0.58 <sup>b</sup>	3.45 ± 0.35 <sup>c,d</sup>	1.85 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	1.70 ± 0.28 <sup>a,b</sup>	0.70 ± 0.28 <b>a,b,c</b>	1.85 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.28 <b>a,b,c,d,e</b>	0.80 ± 0.28 <sup>a</sup>
	LQC 1990-10167	3.90 ± 0.28 <sup>d</sup>	1.80 ± 0.42 <sup>b,c</sup>	2.40 ± 0.14 <sup>b,c</sup>	2.54 ± 0.56 <b>b,c</b>	2.25 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	2.15 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	1.55 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	1.25 ± 0.21 <b>a,b,c</b>	0.50 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.14 <sup>a</sup>
	LQC 2000-10167	2.60 ± 0.28 <sup>b,c</sup>	6.60 ± 0.14 <sup>g</sup>	5.00 ± 0.71 <sup>e</sup>	2.55 ± 0.64 <b>b,c</b>	1.25 ± 0.49 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.42 <b>a,b</b>	2.15 ± 0.35 <sup>a,b</sup>	1.80 ± 0.42 <b>a,b,c,d</b>	1.60 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.28 <b>a,b,c,d,e,f</b>	1.45 ± 0.49 <sup>a</sup>
	LQC 2000-10237	3.60 ± 0.14 <sup>d</sup>	5.15 ± 0.64 <sup>f</sup>	1.60 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.80 ± 0.42 <b>b,c</b>	2.25 ± 0.49 <b>a,b,c</b>	1.85 ± 0.35 <b>a,b,c</b>	1.75 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	2.80 ± 0.28 <sup>d</sup>	1.95 ± 0.64 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.35 <b>d,e,f</b>	1.50 ± 0.28 <sup>a</sup>
	LQC 2000-10246	3.75 ± 0.35 <sup>d</sup>	7.05 ± 0.64 <sup>g</sup>	2.30 ± 0.28 <b>b,c,d</b>	3.65 ± 0.35 <b>c,d</b>	3.10 ± 0.57 <b>b,c,d</b>	2.85 ± 0.35 <b>b,c</b>	1.15 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.21 <b>a,b,c</b>	0.75 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.42 <b>a,b,c</b>	1.50 ± 0.28 <sup>a</sup>

\*Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα διάφορα στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ( $P < 0.05$ ). Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση των συγκαλλιιεργειών και η ιεράρχηση της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής των παραμέτρων ως προς τις οποίες εξετάζονται, αφορούν στη μέση τιμή των χαρακτηριστικών αυτών.

**Πίνακας 14:** Αποτυπώνονται τα αποτελέσματα της συνολικής αξιολόγησης των ροφημάτων κεφίρ, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν τόσο με μονοκαλλιέργειες όσο και με συγκαλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών. Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ANOVA, ταξινομούνται τα μικροβιακά στελέχη σε ομάδες, με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί ( $P < 0.05$ ).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ		ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
<b>ΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>	LQC 2014	$7.48 \pm 0.33$ <sup>d</sup>
	LQC 2030	$2.98 \pm 0.53$ <sup>c</sup>
	LQC 1990	$0.93 \pm 0.17$ <sup>a</sup>
	LQC 2000	$1.07 \pm 0.23$ <sup>a,b</sup>
<b>ΖΥΜΕΣ</b>	LQC 10179	$1.09 \pm 0.42$ <sup>a,b</sup>
	LQC 10237	$0.93 \pm 0.28$ <sup>a</sup>
	LQC 10167	$2.78 \pm 0.63$ <sup>c</sup>
	LQC 10246	$0.58 \pm 0.33$ <sup>a</sup>
	LQC 10235	$1.34 \pm 0.56$ <sup>a,b</sup>
<b>ΣΥΓΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b>	LQC 2014-10167	$8.18 \pm 0.32$ <sup>d</sup>
	LQC 2030-10167	$3.30 \pm 0.60$ <sup>c</sup>
	LQC 1990-10167	$2.18 \pm 0.23$ <sup>b,c</sup>
	LQC 2000-10167	$2.73 \pm 0.37$ <sup>c</sup>
	LQC 2000-10237	$1.18 \pm 0.23$ <sup>a,b</sup>
	LQC 2000-10246	$1.24 \pm 0.37$ <sup>a,b</sup>

## 4. Συζήτηση

### 4.1 Κλασικές Μέθοδοι

#### 4.1.1 Ανάλυση με PCR-RAPD

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την ταυτοποίηση του μικροοικοσυστήματος των κόκκων κεφίρ, ήταν η ανάλυση με PCR-RAPD, η ταξινόμηση των στελεχών σε ομάδες, ανάλογα με την προέλευσή τους και η επιλογή ορισμένων αντιπροσωπευτικών στελεχών για αλληλούχηση του γονιδίου του 16S-rRNA, στην περίπτωση των βακτηρίων και του 26S-rRNA σε αυτή των ζυμών. Η επιλογή των αντιπροσωπευτικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με βάση την παραδοχή ότι το ίδιο προφίλ παραπέμπει στο ίδιο είδος, ενώ ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο UBC 155, με στόχο της αποτύπωσης της ποικιλομορφίας σε επίπεδο είδους κι όχι υποείδους, όπως θα συνέβαινε αν είχε επιλεχτεί ο (GTG)<sub>5</sub> (Gevers και συν., 2001). Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των Αποτελεσμάτων, συνολικά απομονώθηκαν 133 στελέχη, εκ των οποίων τα 83 ανήκουν στις ζύμες και τα 50 στα βακτήρια και από τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν, επιλέχθηκαν 1-3 στελέχη για αλληλούχηση, ταυτοποιώντας τα βακτήρια στο είδος του *Lb. rhamnosus* & *B. amyloliquefaciens* και τις ζύμες σε αυτό του *S. cerevisiae* & *K. marxianus*.

Η παραπάνω προσέγγιση έχει προτιμηθεί από τους Gulitz και συν., (2011) σε μία προσπάθεια αποτύπωσης της μικροβιακής ποικιλομορφίας του κεφίρ νερού. Συγκεκριμένα, κατόπιν ανάλυσης με PCR-RAPD, με εκκινητή το M13V, απομονώθηκαν 453 βακτηριακά στελέχη, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίησή τους και στη συνέχεια ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος κάθε γονότυπου ταυτοποιήθηκε με συγκριτική αλληλούχηση του γονιδίου του 16S rDNA και του 26S rDNA για τα βακτήρια και τις ζύμες, αντίστοιχα. Οι Pateraki και συν., (2014), ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία απομονώνοντας 156 στελέχη άγριων ζυμών κατόπιν ανάλυσης με PCR-RAPD με εκκινητές τους M13 & UBC155, στα πλαίσια της μελέτης του δυναμικού τους, κατά την αυθόρμητη ζύμωση κόκκινου κρασιού, ενώ ακολούθησε αλληλούχηση 1-3 αντιπροσωπευτικών στελεχών, από κάθε ομάδα που προέκυψε. Παρόμοια προσέγγιση έχει ακολουθηθεί και από τους Carminatì και συν., (2004) που απομόνωσαν 43 στελέχη, από την επιφάνεια τυριών ωρίμανσης Gorgonzola από 24 φυτά, σε οκτώ σύνθετα προφίλ από RAPD χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους UBC155, HLWL85 και M13. Τέλος και οι Delgado da Silva και συν., (2001)

εφάρμοσαν παρεμφερή τεχνική με χρήση των UBC155 και HLWL85 ως εκκινητών, για μελέτη της βιοποικιλότητας 32 στελεχών που απομονώθηκαν από διαφορετικούς τύπους τυριών, ταυτοποιώντας 6 σύνθετα προφίλ.

Όπως αποτυπώθηκε και στην ενότητα των Αποτελεσμάτων και από τα τρία δείγματα κεφίρ, απομονώθηκαν συνολικά 83 στελέχη ζυμών, από τα οποία τα 38 απαντώνται στο κεφίρ μήλου, τα 26 στο κεφίρ βύσσινου και τα 19 στο κεφίρ νερού. Και στα τρία δείγματα κεφίρ, τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *K. marxianus* και *S. cerevisiae*, με ίσες περίπου αναλογίες των ειδών αυτών στο κεφίρ μήλου, 100 % σύσταση σε *S. cerevisiae*, στο κεφίρ βύσσινου και 94.7 και 5.3 % σύσταση σε *S. cerevisiae* και *K. marxianus*, αντίστοιχα. στο κεφίρ νερού.

Οι Fiorida και συν., (2017), σε μία ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη μικροχλωρίδα του ζαχαρούχου κεφίρ, αναφέρουν ότι οι κόκκοι του συγκεκριμένου τύπου κεφίρ, ναι μεν μοιάζουν αρκετά με εκείνους του κεφίρ γάλακτος, υπό το πρίσμα της δομής και των εμπλεκόμενων μικροοργανισμών ωστόσο η σύσταση των μικροβιακών ειδών και η συγκέντρωση των τελικών βιοπροϊόντων ποικίλουν, ανάλογα με τα αποθέματα C και ενέργειας. Οι Magalhães και συν., (2010) εφαρμόζοντας μια συνδυαστική προσέγγιση συμβατικής καλλιέργειας και γονοτυπικής ταυτοποίησης μαζί με μια ανεξάρτητη από την καλλιέργεια ανάλυση, με χρήση της PCR-DGGE, απομόνωσαν συνολικά 418 στελέχη ζαχαρούχου κεφίρ, από διαφορετικές περιοχές της Βραζιλίας, μεταξύ των οποίων, 289 ήταν βακτήρια και 129 ζύμες. Στην περίπτωση των ζυμών, οι *S. cerevisiae* (54.26 %) και *K. lactis* (20.15 %) ήταν τα πιο κοινά είδη που απομονώθηκαν, ενώ ακολουθούσαν οι *Kazachstania aerobia* (14.73 %) και *Lachancea meyersii* (10.85 %). Ο *K. lactis*, αποτελεί ζύμη που μεταβολίζει τη λακτόζη, και ταυτοποιήθηκε στο βραζιλιάνικο ρόφημα κεφίρ μαζί με ζύμες που δε μεταβολίζουν τη λακτόζη (*S. cerevisiae*, *L. meyersii* και *K. aerobia*). Ο *S. cerevisiae* ίσως το πλέον αναγνωρισμένο στέλεχος ζυμών σε κόκκους κεφίρ, με την παρουσία του να συμβάλλει στην ενίσχυση της οργανοληπτικής ποιότητας του ροφήματος κεφίρ, προάγοντας ένα ισχυρό και τυπικά ζυμούμενο άρωμα καθώς και ενισχύοντας την αναζωογονητική και πικάντικη γεύση του (Simona και συν., 2002). Η παρουσία του *S. cerevisiae* έχει ταυτοποιηθεί και σε κόκκους ταϊλανδέζικου ζαχαρούχου κεφίρ (Miguel και συν., 2011) καθώς σε αντίστοιχους βραζιλιάνικης προέλευσης (Sarrikha και συν., 2015).

Οι Miguel και συν., (2013) σε μία απόπειρα αξιολόγησης της δυνατότητας αντίστασης σε σάκχαρα/ αιθανόλη, ζυμών, που απομονώθηκαν από κεφίρ διαφόρων χωρών (Βραζιλία, Καναδάς και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής), ταυτοποίησαν τα είδη των *S. cerevisiae* και *K. marxianus* ως εκείνα με τους υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Συνολικά απομονώθηκαν 125 ζύμες, που ταυτοποιήθηκαν με φαινοτυπικές και γονοτυπικές τεχνικές ως *S. cerevisiae*, *Saccharomyces* sp, *Saccharomyces bayanus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *D. anomala*, *K. marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii*, *P. fermentans*, *P. anomala*, *Candida parapsilosis* και *Candida valdiviana*, ενώ η ποικιλομορφία των ζυμών προσδιορίστηκε και με χρήση της DGGE. Το γεγονός ότι τα απομονωθέντα στελέχη των *S. cerevisiae* και *K. marxianus* ήταν ικανά να αναπτυχθούν σε μέσα που περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων αποδεικνύει την ικανότητα των στελεχών αυτών που βρέθηκαν ανθεκτικά σε αιθανόλη να αντέχουν στο οσμωτικό στρες. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με την πρόταση του Osho (2005), ο οποίος δήλωσε ότι οι ζύμες με αντίσταση στην αιθανόλη τείνουν να είναι ανεκτικές σε σάκχαρα. Οι Ekunsanmi & Odunfa (1990) υποστήριξαν ότι ο συνδυασμός ανεκτικότητας σε σάκχαρα και σε αλκοόλες αποτελεί πλεονέκτημα όταν ένα είδος ζύμης εξετάζεται για βιομηχανική χρήση, ειδικά όταν παράγεται αιθανόλη.

Αναφορικά με την ταυτοποίηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας των κόκκων 3 διαφορετικών δειγμάτων κεφίρ νερού, οι Gulitz και συν., (2011) κατόπιν ανάλυσης με PCR-RAPD, απομόνωσαν 453 μικροβιακά στελέχη από "κεφίρ νερού" (water kefir), αλληλούχησαν αντιπροσωπευτικά κάποια από αυτά και προέκυψε η ταυτοποίησή τους ως *S. cerevisiae*, *L. fermentati*, *Hansenia osporavalbyensis* και *Z. florentina*, με την τελευταία να κυριαρχεί. Και τα τέσσερα είδη ζυμών, που προσδιορίστηκαν στα κεφίρ νερού, ήταν σε θέση να καταβολίσουν τη γλυκόζη και αυτό θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι όλα δείχνουν τον ίδιο υποκείμενο μεταβολισμό (Esteve-Zarzoso και συν., 2001, Kurtzman & Robnett, 2003). Ο *S. cerevisiae* είναι ικανός να μετατρέπει τη σακχαρόζη στους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη από το ένζυμο ινβερτάση, έτσι ώστε τα κύτταρα ζύμης να έχουν γλυκόζη ως ελεύθερο μεταβολίτη (Haq & Ali, 2007). Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι στα άλλα κεφίρ νερού η σύνθεση αυτών των δύο ζυμών είναι σχεδόν η ίδια και ότι ο *Z. Florentina* είναι το είδος ζύμης που κυριαρχεί.

Η απομόνωση και η μοριακή ταυτοποίηση των ζυμών στο ελληνικό κεφίρ, επιχειρήθηκε και από τους Kalamaki & Angelidis (2017), όπου η ανάλυση με ARDRA και η αλληλούχηση, έδειξαν την παρουσία 14 διαφορετικών ειδών ζυμών, που ανήκουν σε 10 γένη (*Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Galactomyces* spp., *Issatchenkia* spp., *Kazachstania* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Saccharomyces* spp., *Wickerhamomyces* spp., *Yarrowia* spp.). Η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών ταυτοποιήθηκε ως *S. cerevisiae*, ενώ η δεύτερη πιο άφθονη ζύμη ήταν αυτή του *K. marxianus*. Η παρουσία των δύο παραπάνω ειδών επιβεβαιώθηκε και από τους Simona και συν., (2002), όπου διερευνήθηκε η συνύπαρξη του *K. marxianus* με ζύμες που δεν μεταβολίζουν τη λακτόζη (*S. cerevisiae*, *C.a inconspicua* και *C. maris*). Η κυριαρχία των *S. cerevisiae* και *K. marxianus* δεν επιβεβαιώνεται μόνο στους κόκκους ελληνικού κεφίρ, αλλά και σε αυτούς της Βραζιλίας και του Θιβέτ (Leite και συν., 2012, Lu και συν., 2014).

Γενικότερα ο *S. cerevisiae* αντιπροσωπεύει μια ζύμη που δε μεταβολίζει τη λακτόζη και μπορεί να αναπτυχθεί στο γάλα μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης και της γαλακτόζης, οι οποίες παράγονται με τη σειρά τους από την υδρόλυση της λακτόζης μέσω διαφορετικών ζυμών και βακτηριακών ειδών των κόκκων κεφίρ. Σε επίπεδο ζαχαρώδους κεφίρ, η αυξημένη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη, πιθανώς να διεγείρει την ανάπτυξη των ειδών *Saccharomyces*, τα οποία είναι σε θέση να μετατρέπουν τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, μέσω της ινβερτάσης, έτσι ώστε τα κύτταρα των ζυμών να έχουν τη γλυκόζη ως ελεύθερο μεταβολίτη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος με τον οποίο ο *S. cerevisiae* επιδρά στον *Lb. kefiranofaciens* για την παρασκευή της κεφίρανης, όπου μετά από μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, οι δυνατότητες η ζύμη αυτή διεγείρει την ανάπτυξη και την παραγωγή κεφίρανης από τον *Lb. kefiranofaciens* συνοψίζονται ως εξής: (1) ο *S. cerevisiae* μειώνει τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, (2) ο *S. cerevisiae* απομακρύνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου χάρη στη δραστηριότητα καταλάσης, που διαθέτει (3) ο *S. cerevisiae* παράγει διεγέρτες για τον *Lb. kefiranofaciens* και (4) ο *S. cerevisiae* ενισχύει την παραγωγή καψικής κεφίρανης μέσω της φυσικής επαφής (Benjamas και συν., 2003).

Από την άλλη, ο *K. marxianus* μεταβολίζει τόσο τη λακτόζη όσο και τη γαλακτόζη και επομένως η ανάπτυξή του ευνοείται στο γάλα. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Lu και συν., (2014) σχετικά με τη δομή κόκκων κεφίρ από το Θιβέτ, έδειξαν ότι οι *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, και *Yarrowia lipolytica* αποτελούν τα τρία είδη ζυμών που

εμφανίζονται στην εξωτερική επιφάνεια των κόκκων αυτών, με τον *S. cerevisiae*, να είναι περισσότερο σταθερός στη μεταβολή του χρόνου σε σχέση με τους *K. marxianus*, και *Y. lipolytica*, που φάνηκαν πιο επιρρεπείς. Συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη μείωση με το πέρασμα του χρόνου την παρουσίαζε ο *K. marxianus*, ο οποίος αν και διαθέτει ευρύτερο φάσμα ανθρακικού υποστρώματος, ταυτόχρονα αυτό τον μετατρέπει σε κύριο ανταγωνιστή τόσο των βακτηρίων όσο και του *S. cerevisiae* αλλά και της *Y. lipolytica*. Έτσι (1) ο συναγωνισμός με τη *Y. lipolytica*, η οποία αν και δε μεταβολίζει τη λακτόζη, μεταβολίζει το λίπος, με τα λιπαρά οξέα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *K. marxianus* και (2) το γεγονός ότι οι *K. marxianus* και *Y. lipolytica*, εξαρτώνται από το O<sub>2</sub>, ενώ ο *S. cerevisiae*, όχι, αποτέλεσαν τους λόγους για τους οποίους ο *K. marxianus* μειώνεται με την πάροδο του χρόνου.

Σε επόμενο επίπεδο και από τους τρεις διαφορετικούς κόκκους κεφίρ, απομονώθηκαν συνολικά 50 βακτηριακά στελέχη, από τα οποία τα 7 και τα 22 που προέρχονταν από το κεφίρ μήλου και βύσσινου αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκαν ως *B. amyloliquefaciens*, ενώ τα 21 που απομονώθηκαν από το κεφίρ νερού ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. rhamnosus*.

Βιβλιογραφικά οι Sarrikha και συν., (2015) ταυτοποίησαν τα είδη του *Lb. rhamnosus* και του *Bacillus cereus* μέσω της PCR-DGGE σε ταϊλανδέζικα ζαχαρούχα κεφίρ. Οι Magalhães και συν., (2010), από την άλλη, ακολουθώντας μια συνδυαστική προσέγγιση, εξαρτημένης της καλλιέργειας αλλά και ανεξάρτητης της καλλιέργειας ανάλυσης, πέτυχαν κατόπιν απομόνωσης 289 βακτηρίων από ζαχαρούχο βραζιλιάνικο ρόφημα κεφίρ, την ταυτοποίησή τους ως *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc* και *Acetobacter*. Συγκεκριμένα ο *Lb. paracasei* (23,8%) αποτέλεσε το κύριο βακτηριακό προϊόν απομόνωσης που ταυτοποιήθηκε, ακολουθούμενος από τον *Acetobacter lovaniensis* (16,61%), τον *Lactobacillus parabuchneri* (11,71%), τον *Lactobacillus kefir* (10,03%), τον *Lactococcus lactis* (10,03%) και τον *Leuconostoc citreum* (5,54%).

Οι Gulitz και συν., (2011) σε μία προσπάθεια αποτύπωσης της μικροβιακής ποικιλομορφίας τριών δειγμάτων κόκκων κεφίρ διαφορετικής προέλευσης (I, II, III), απομόνωσαν 453 βακτηριακά στελέχη και κατόπιν ανάλυσης με PCR-RAPD και αλληλούχησης του γονιδίου του 16S-rDNA κατέληξαν στην ταυτοποίηση του *Lactobacillus* ως το κυρίαρχο είδος σε ποσοστά 82,1% και 72,1% στα δείγματα I & II, αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά τα πιο άφθονα είδη στα κεφίρ νερού I και II ήταν ο *Lb.*

*hordei* και *Lb. nagelii*, ενώ ακολουθούσε σε σημαντικά μικρότερους αριθμούς ο *Lb. casei*. Στο κεφίρ νερού III το πιο άφθονο είδος στο ήταν ο *Lc. mesenteroides* (28%) και *Lc. citreum* (24,3%), ενώ διαδεδομένα ήταν και οι *Acetobacter fabarum* και *Ac. orientalis*.

Στο κεφίρ νερού έχει μελετηθεί από τους Stadie και συν., (2013) η μεταβολική δραστηριότητα και η συμβιωτική σχέση των βακτηρίων και των ζυμών, με τις ζύμες να εκπροσωπούνται από τους *Z. Florentina* και *S. cerevisiae* και τα βακτήρια από τους *Lb. hordei* και *Lb. nagelii*. Η τροφική αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τις ζύμες μελετήθηκε σε μοντέλο συγκαλλιέργειας και στηρίχθηκε στην παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος από την πλευρά των πρώτων, βελτιστοποιώντας το περιβάλλον για τους *Z. Florentina* και *S. cerevisiae* καθώς και στην εύνοια των βακτηρίων μέσω της διάθεσης των βασικών θρεπτικών ουσιών, που παράγονται από τις ζύμες. Πιο συγκεκριμένα ο *Lb. hordei* επηρεάζεται θετικά από την απελευθέρωση αμινοξέων και της βιταμίνης B6 από την πλευρά των ζυμών, αλλά και ο *Lb. nagelii* ευνοείται σε επίπεδο ανάπτυξης με την παραγωγή αμινοξέων.

Σε άλλη μελέτη των Garofalo και συν., (2015) πάνω στα είδη ζυμών και βακτηρίων που απαντώνται στους κόκκους κεφίρ γάλακτος από διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας, επιλέχθηκε και πάλι συνδυαστική προσέγγιση η οποία περιελάμβανε ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, βιώσιμες μετρήσεις σε εκλεκτικά μέσα καλλιέργειας, PCR-DGGE και pyrosequencing. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κύριο βακτηριακό είδος ήταν αυτό του *Lb. kefiranofaciens* (98%), με το υπόλοιπο ποσοστό να αποδίδεται σε άλλα είδη βακτηρίων (*Lb. kefiri*, *Lactobacillus intestinalis*), καθώς και στα είδη των *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus* και *Acetobacter* να ακολουθούν. Μάλιστα, και οι *Lc. lactis*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter lovaniensis* και *Acetobacter orientalis* ταυτοποιήθηκαν ως μέρος της καλλιεργητικής κοινότητας. Όσο αφορά στις αναλύσεις με PCR-DGGE, τα κύρια βακτηριακά είδη που ανιχνεύθηκαν ήταν αυτά των *Lb. kefiranofaciens* και *Lb. kefiri*, με τον *Lb. kefiranofaciens* να ανήκει στην κατηγορία των ομοζυμωτικών βακτηρίων ενώ ο *Lb. kefiri* σε αυτή των ετεροζυμωτικών. Και τα δύο παραπάνω είδη εμπλέκονται στο μηχανισμό σχηματισμού κόκκων χάρη στην ισχυρή ικανότητα αυτο-συσσωμάτωσης του *Lb. kefiranofaciens* και στην υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων του *Lb. kefiri* (Wang και συν., 2012). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η έρευνα των Leite και

συν., (2012) πάνω στη μικροβιακή ποικιλομορφία κόκκων κεφίρ από τρεις διαφορετικές περιοχές της Βραζιλίας, με τους *Lb. kefiranofaciens* και *Lb. kefiri* να αποτελούν τα κυρίαρχα είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα κόκκων τόσο με PCR-DGGE όσο και με pyrosequencing.

Ο *Lb. rhamnosus* είναι ένα Gram<sup>+</sup> βακτήριο, μη σποριογόνο, προαιρετικά αναερόβιο ή μικροαερόφιλο και αρνητικό στο τεστ καταλάσης. Ανήκει στους μεσόφιλους οργανισμούς, αλλά σε εξάρτηση από το στέλεχος, οι καλλιέργειές του μπορεί να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 15 °C ή υψηλότερες από 40 °C. Η βέλτιστη αρχική τιμή pH για την ανάπτυξή του είναι στην περιοχή από 6,4 έως 4,5. Ο μεταβολισμός του *Lb. rhamnosus* είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικός και μετατρέπει τις εξόζες σε L (+) - γαλακτικό οξύ, σύμφωνα με το μεταβολικό μονοπάτι Embden-Meyerhof ενώ μέσω της αλδολάσης και της φωσφοκετολάσης, ζυμώνονται και οι πεντόζες. Ο *Lb. rhamnosus* δεν μπορεί να μετατρέψει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό με γρήγορο ρυθμό ώστε να συμβαδίζει με την ταχύτητα της γλυκόλυσης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του πυροσταφυλικού μέσα στο κύτταρο, δημιουργώντας μία τοξική κατάσταση, γι αυτό και το πυροσταφυλικό διασπάται σε διάφορους άλλους μεταβολίτες, όπως οξικό, διακετύλιο και ακετοΐνη (Jyoti και συν., 2003).

Ο *Lb. rhamnosus* έχει συνδεθεί με πολλαπλές λειτουργίες ως προς τη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας, όπως η διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος και η προστασία από την εισβολή παθογόνων μικροβίων (Kaewiad και συν., 2015). Η απομόνωση των προβιοτικών βακτηρίων από το μητρικό γάλα είναι μια ελκυστική προσέγγιση για την επιλογή προβιοτικών στελεχών, καθώς η παραγωγή τους ίνβινο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής ικανότητας και των μεταβολικών διαταραχών σε ενήλικες και γηράσκοντες. Οι Rajoka και συν., (2017) απομόνωσαν επτά στελέχη του *Lb. rhamnosus* από μητρικό γάλα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τις 16S rDNA ακολουθίες τους, ενώ αξιολογήθηκε και το προβιοτικό τους δυναμικό. Και τα επτά προϊόντα απομόνωσης έδειξαν ποσοστό επιβίωσης σε όξινες συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να επιβιώσει το κομμάτι που αφορά στο πέραςμα μέσω των πεπτικών συστημάτων, ενώ τα προϊόντα απομόνωσης SHA113 & SHA117 εμφάνισαν υψηλή υδροφοβικότητα και ισχυρή ικανότητα συσσωμάτωσης & αυτοσυσσωμάτωσης, κάτι που συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες (Dias και συν., 2013, Palaniswamy & Govindaswamy, 2016),

αλλά και εκείνα των SHA112, SHA116 και SHA117 παρουσίασαν δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, κάτι που επίσης έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά σε προηγούμενες μελέτες (Martín και συν., 2008).

Ο "*Bacillus amyloliquefaciens*" είναι υπεύθυνος για μεγάλο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής σε α-αμυλάση και πρωτεάση. Η στενή συγγενειά του με τον *Bacillus subtilis* τον έχει κατατάξει σε επίπεδο υποείδους ως "*B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*" ή έχει συμπεριληφθεί στον *B. subtilis* ως μια παραλλαγή που παράγει άφθονες ποσότητες εξοκυτταρικών ενζύμων. Έτσι, ο "*Bacillus amyloliquefaciens*" σχετίζεται στενά με τον *B. subtilis* και τα άλλα δύο είδη που συνθέτουν την ομάδα του *B. subtilis*, δηλαδή τους *Bacillus licheniformis* και *Bacillus pumilus*. Αυτοί οι οργανισμοί μοιράζονται πολλές κοινές ιδιότητες και έχουν βρεθεί ελάχιστα χαρακτηριστικά βάσει των οποίων μπορούν να διακριθούν, ωστόσο οι διαφορετικές μεταβολικές πορείες και τα διαφορετικά ένζυμα που εκκρίνονται, κρίνουν επιτακτική τη διαφοροποίησή τους, προς αποφυγή σύγχυσης.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε στελέχη του *B. amyloliquefaciens*, για εκτίμηση της παραγωγής ενώσεων που παραπέμπουν σε βακτηριοσίνες, την αξιολόγηση αντιμικροβιακής τους δράσης, και την εφαρμογή τους στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Μολονότι η πλειοψηφία των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες, κι έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα, σχετίζονται με οξυγαλακτικά βακτήρια (Rodríguez και συν., 2003), η ευαισθησία των τελευταίων σε πρωτεάσες, η χαμηλή τους διαλυτότητα πάνω από την τιμή pH 6 και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών, υποδηλώνουν την ανάγκη για εναλλακτική λύση σε Gram<sup>+</sup>, ως οργανισμούς-παραγωγούς (Bonnet και συν., 2006). Ο *Bacillus* αντιπροσωπεύει ένα εναλλακτικό είδος που έχει διερευνηθεί για την παραγωγή βακτηριοσινών, συμπεριλαμβανομένων των αντιμικροβιακών πεπτιδίων με αυξημένη ανεκτικότητα σε πρωτεάσες. Συγκεκριμένα οι Hanafy και συν., (2016) κατόπιν απομόνωσης 8 στελεχών βακτηρίων από κατσικίσιο γάλα, ενίσχυσης με PCR και αλληλούχησης του 16S-rRNA γονιδίου και ταυτοποίησή τους ως *B. amyloliquefaciens*, απέδειξαν την παρουσία αντιμικροβιακής δράσης των στελεχών αυτών έναντι των παθογόνων βακτηρίων, *Listeria monocytogenes* & *Escherichia coli* αλλά επιβεβαίωσαν και την παραγωγή ενός τύπου βακτηριοσίνης ή αντιμικροβιακής ένωσης, που παράγεται από τα στελέχη αυτά. Σε άλλη μελέτη οι Huy και συν., (2016) επικεντρώθηκαν στην εξέταση για παρουσία ινωδολυτικών ενζύμων σε παραδοσιακά βιετναμέζικα

ζυμούμενα προϊόντα πάστας σόγιας εφόσον προηγήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση των σχετικών βακτηρίων ως *B. amyloliquefaciens*, όπου από τα δεκαέξι δείγματα που συλλέχθηκαν, τα επτά έδωσαν θετικά αποτελέσματα στην ινωδολυτική ενζυμική δραστηριότητα, με ενδεχόμενη εφαρμογή τους στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων.

## 4.2 Μη κλασικές Μέθοδοι

### 4.2.1 Ανάλυση με PCR-DGGE

Πρόκειται για μια ηλεκτροφορητική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση του μικροοικοσυστήματος σε εύρος τροφίμων από γαλακτοκομικά προϊόντα (Rantsiou και συν., 2008, Alessandria και συν., 2010, Garofalo και συν., 2015, Ramezani και συν., 2017), λουκάνικα (Cocolin και συν., 2001, 2004, Rantsiou & Cocolin, 2006), έως και κρασί (Cocolin και συν., 2000). Ως ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μέθοδος βασίζεται στην άμεση εκχύλιση DNA ή / και RNA από το υπό εξέταση δείγμα και επιτρέπει το διαχωρισμό αμπλικονίων ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικών αλληλουχιών, οπότε αναμένεται οι διαχωριστικές μπάντες να αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη. Ωστόσο αρκετά συχνά έχει παρατηρηθεί ότι οι ζώνες που μεταναστεύουν σε διαφορετικές θέσεις εν τέλει αποδίδονται στο ίδιο είδος, κάτι που έχει ήδη περιγραφεί ως ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της PCR DGGE. Σύμφωνα με τον Ercolini (2004) ένα μόνο είδος με πολλαπλά αντίγραφα rRNA, μπορεί να παρουσιάσει ένα δακτυλικό αποτύπωμα DGGE, που χαρακτηρίζεται από πολλαπλές ζώνες, οι οποίες μεταναστεύουν σε διαφορετικές θέσεις στην πηκτή ακρυλαμίδιου, οδηγώντας έτσι σε πιθανή υπερεκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας που εντοπίστηκε από την DGGE, ενώ περαιτέρω εξήγηση δόθηκε και στην παράγραφο 3.2 της ενότητας των Αποτελεσμάτων.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη το RNA τόσο των ζυμών όσο και των βακτηρίων μετατράπηκε σε cDNA, ακολούθησε PCR (DGGE), ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε νανοφωτόμετρο, ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη 1.5 % και τέλος ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου των προϊόντων PCR τόσο των ζυμών όσο και των βακτηρίων. Ωστόσο ηλεκτροφορητική κινητικότητα παρουσίασαν μόνο τα προϊόντα PCR των ζυμών κι όχι αυτά των βακτηρίων, κάτι που υποδηλώνει απουσία DNA ή παρουσία του σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, με αποτέλεσμα να μην

μπορεί να εντοπιστεί τόσο μέσω αντίστροφης μεταγραφάσης όσο και από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπως και φάνηκε από τον ποσοτικό έλεγχο του στο νανοφωτόμετρο, με συγκέντρωση μικρότερη των 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Η παραπάνω εκδοχή έχει ισχύ, δεδομένου ότι η μικροβιακή καταμέτρηση των κόκκων κεφίρ, έδειξε σαφή επικράτηση των ζυμών έναντι των βακτηρίων (διαφορά 2 λογαρίθμων). Τα προβλήματα που δημιουργούνται κατά την ανάλυση με PCR-DGGE του γονιδίου του 16S rRNA έχουν αναφερθεί και από τους Rantsiou & Cocolin (2006), σημειώνοντας ότι ένα εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί είναι η ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση πληθυσμών χαμηλού αριθμού. Οι Cocolin και συν. (2001) έχουν παρατηρήσει ότι σε μικτούς πληθυσμούς, μεμονωμένα στελέχη θα μπορούσαν να αναγνωριστούν με PCR-DGGE της V1 περιοχής, για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^4$  cfu / g, κάτι που ενδεχομένως μπορεί να μην ανταποκρίνεται όταν εφαρμόζονται άλλοι εκκινητές στο στάδιο ενίσχυσης με PCR.

Η άμεση εκχύλιση του RNA από το υπό εξέταση δείγμα, δεν είναι τόσο διαδεδομένη όσο εκείνη του DNA, ωστόσο υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν τη συγκεκριμένη προσέγγιση (Randazzo και συν., 2002, Rantsiou & Cocolin, 2006, Rantsiou και συν., 2008, Alessandria και συν., 2010). Ουσιαστικά η εκχύλιση του DNA, προτιμάται περισσότερο συχνά συγκριτικά με την αντίστοιχη του RNA, γιατί το πρώτο προσφέρει μια εικόνα της ιστορικότητας του δείγματος, δεδομένου ότι μετά τη λύση των κυττάρων παραμένει ενεργό για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ το τελευταίο δίνει μία εκτίμηση της κατάστασης εκείνη τη στιγμή, ενώ δε συντηρείται μετά τη λύση των κυττάρων.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη, τα αποτελέσματα της ανάλυσης του μικροοικοσυστήματος των κόκκων κεφίρ σε επίπεδο ζυμών με την PCR-DGGE, δεν ήταν σε πλήρη συμφωνία με εκείνα της συμβατικής καλλιέργειας σε τρυβλία. Σε έρευνα των Alessandria και συν., (2010) για την εκτίμηση του μικροοικοσυστήματος στο τυρί Planalto de Bologna, παρατηρήθηκαν επίσης αποκλίσεις στα αποτελέσματα τόσο μεταξύ συμβατικών καλλιεργειών και ανεξάρτητων της καλλιέργειας όσο και μεταξύ των αναλύσεων DNA & RNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη η ανάλυση του RNA επιλέχθηκε για την παρακολούθηση της ενεργούς μικροχλωρίδας και την αξιολόγηση των διαφορών του από το DNA, που προσφέρει ένδειξη της βιοποικιλότητας σε ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα. Σε επίπεδο βακτηρίων, τα αποτελέσματα της άμεσης εκχύλισης DNA & RNA παρουσίασαν μόλις μερική

αντιστοίχιση, ενώ σε επίπεδο ζυμών σημειώθηκαν σημαντικότερες διαφορές, με το DNA να χαρακτηρίζεται από την παρουσία του *A. pullulans* σε όλα τα δείγματα ενώ στο RNA να κυριαρχεί ο *S. cerevisiae*. Σε μια επόμενη σύγκριση, οι αποκλίσεις που σημειώθηκαν μεταξύ των εξαρτημένων & ανεξάρτητων της καλλιέργειας μεθόδων, μπορεί να οφείλονται στο όριο ανίχνευσης της DGGE, με αποτέλεσμα είδη που εμφανίστηκαν στα τρυβλία να παρουσιάζουν ζώνες στην πηκτή της DGGE, αλλά και το αντίστροφο. Οι Rantsiou και συν., (2008) σε αντίστοιχη έρευνα πάνω στο μικροοικοσύστημα της φέτας, έδειξαν ότι η άμεση εκχύλιση DNA & RNA παρουσίασε παραπλήσια αποτελέσματα, κάτι το οποίο δε συνέβη και με τα αποτελέσματα της συμβατικής καλλιέργειας και της DGGE. Πιο αναλυτικά τα κύρια απομονωθέντα είδη LAB μέσω κλασικής καλλιέργειας ήταν οι *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis* και *Lb. fermentum*, ενώ τα είδη που ταυτοποιήθηκαν από την DGGE, ήταν οι *S. thermophilus*, *Lc. lactis*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Ενώ στην περίπτωση των ζυμών, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την PCR-DGGE συγκρίθηκαν πολύ καλά με εκείνα, που λαμβάνονται με τη συμβατική μικροβιολογική ανάλυση και τα κύρια είδη που βρέθηκαν ήταν οι *K. lactis*, *P. fermentans* και *C. zeylanoides*. Τέλος οι Magalhães και συν., (2010) κατά τη μελέτη ζαχαρούχου κεφίρ Βραζιλίας ανέφεραν και εκείνοι αποκλίσεις στα αποτελέσματα μεταξύ ανεξάρτητων και εξαρτημένων από την καλλιέργεια μεθόδων, με τα δακτυλικά αποτυπώματα της DGGE να μην εμφανίζουν ζώνες που αντιστοιχούν σε μερικά από τα είδη που απομονώθηκαν με συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας αλλά και το αντίστροφο.

### **4.3 Ιδιότητες της μεταβολικής δραστηριότητας του κεφίρ**

#### **4.3.1 Πρωτεόλυση**

Το γάλα, που υπόκειται σε διαδικασίες ζύμωσης αποτελεί ένα πολύ δημοφιλές γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο καταναλώνεται σε ολόκληρο τον κόσμο. Η πρωτεόλυση που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, έχει επιβεβαιωθεί ότι αντιπροσωπεύει μαζί με τη λιπόλυση τους σημαντικότερους βιολογικούς μηχανισμούς με το ζωτικότερο ρόλο στον προσδιορισμό της υφής και της γεύσης του γάλακτος. Η γενική διαδικασία πρωτεόλυσης στο γάλα αρχίζει με την υδρόλυση των καζεϊνών από πρωτεϊνάσες που προέρχονται από βακτήρια πυτιάς και.

Αυτό παράγει μια σειρά πεπτιδίων ενδιάμεσου μεγέθους, τα οποία περαιτέρω υδρολύονται από πεπτιδάσες σε ελεύθερα αμινοξέα. Μια ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να παρασκευαστεί με τη δράση διαφορετικών στελεχών ζύμωσης που απελευθερώνουν διαφορετικές πρωτεάσες και πεπτιδάσες. Αυτά τα ένζυμα αποικοδομούν τις καζεΐνες σε διαφορετικά πεπτίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, αξιολογήθηκε η πρωτεολυτική δράση τόσο των ζυμών όσο και των βακτηρίων, που απομονώθηκαν από κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ (μήλο-βύσσινο) και κεφίρ νερού με δύο προσεγγίσεις, πρώτα με τη μέθοδο διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θειικό νάτριο. Τα αποτελέσματα της πρώτης μεθόδου έδειξαν ότι από τα 50 βακτηριακά στελέχη πρωτεολυτική δράση παρουσίασαν 4, εκ των οποίων τα 3 ανήκουν στο είδος του *Lb. rhamnosus* (LQC 2014, LQC 2015, LQC 2030) και το 1 σε εκείνο του *B. amyloliquefaciens* (LQC 1990). Βιβλιογραφικά η πρωτεολυτική δράση του *B. amyloliquefaciens* έχει υποστηριχτεί και στο παρελθόν (Wang και συν., 2016, Chaudhuri και συν., 2017). Στην περίπτωση των ζυμών, από τα 83 στελέχη, 9 εμφάνισαν πρωτεολυτική δράση, εκ των οποίων τα 3 ανήκουν στον *S. cerevisiae* (LQC 10184, LQC 10235, LQC 10237) και τα 6 στον *K. marxianus*. Τα στελέχη αυτά υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλο-θειικό νάτριο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρωτεολυτική ιδιότητά τους. Πιο αναλυτικά με την 1η μέθοδο φάνηκε ξεκάθαρα η δημιουργία μιας ζώνης διάγασης γύρω από τις οπές, στις οποίες έχει μεταφερθεί η αντίστοιχη ποσότητα υπερκειμένου ανάπτυξης βακτηρίων και ζυμών. Αντίθετα με τη 2η μέθοδο, δεν φάνηκε να πραγματοποιείται πλήρης υδρόλυση των καζεϊνών, καθώς οι πρωτεϊνικές ζώνες που αντιστοιχούν στις as1, as2, κ και β καζεΐνες (με βάση το μοριακό βάρος) είναι παρούσες τόσο στο ανεμβολίαστο δείγμα (τυφλό) όσο και στα δείγματα που έχουν υποστεί ενοφθαλμισμό με στελέχη που παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα (σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο). Διαφορά στην πρωτεολυτική δράση των μικροοργανισμών, που απομονώθηκαν από κόκκους κεφίρ, με τη χρήση δύο μεθόδων, παρατήρησαν και οι Dallas και συν., (2015). Στη μελέτη αυτή ακολουθήθηκε πεπτιδομική ανάλυση (peptidomics) βασιζόμενη σε φασματομετρία μάζας και ηλεκτροφόρηση πηκτής, συγκρίνοντας πεπτίδια σε γάλα που έχει επεξεργαστεί θερμικά αλλά και με κόκκους κεφίρ, με τα πεπτίδια μη επωασμένου νοπού γάλακτος

και θερμικά επεξεργασμένου που έχει επωαστεί χωρίς την παρουσία κόκκων. Έτσι ενώ παρουσιάστηκε σαφής πρωτεολυτική δράση σε επίπεδο ανάλυσης peptidomics, αυτο δεν επιβεβαιώθηκε από την εικόνα της πηκτής ηλεκτροφόρησης το οποίο δεν παρουσίασε καμία διαφορά στο πρωτεϊνικό προφίλ μεταξύ των δειγμάτων γάλακτος με και χωρίς την παρουσία κόκκων κεφίρ. Η ανάλυση με peptidomics έδειξε σαφή διάκριση των δειγμάτων κεφίρ με τα αντίστοιχα τυφλά, με τα δεύτερα να συνοδεύονται από στατιστικά λιγότερα πεπτίδια λόγω της δράσης των εξωκυτταρικών πρωτεασών. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι, η πρωτεολυτική δράση των στελεχών αυτών ομολογουμένως να αποτυπωνόταν καλύτερα στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, για μεγαλύτερα διαστήματα επώασης.

Το πρωτεολυτικό σύστημα των βακτηρίων είναι ουσιώδες για την ανάπτυξή τους στο γάλα και συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη γεύσης σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπου αυτοί οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριοι καλλιέργειες. Πλήθος βακτηρίων όπως ο *Lb. rhamnosus* (Varmanen και συν., 1998, 2000a, Christensson και συν., 2002), *Lb. lactis* (Mierau και συν., 1993, Tynkkynen και συν., 1993, Nardi και συν., 1997, Matos και συν., 1998), *Lb. helveticus* (Chen & Steele, 1998, Sridhar και συν., 2005), *Lb. delbrueckii* (Klein και συν., 1995, 1997) έχουν μελετηθεί. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο σύστημα, ικανό να μετατρέπει την καζεΐνη του γάλακτος, η οποία είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη της υφής και της γεύσης (Kunji, και συν., 1996) σε ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια. Πιο αναλυτικά το πρωτεολυτικό σύστημα των LAB αποτελείται από πρωτεάσες οι οποίες αρχικά διασπούν την πρωτεΐνη του γάλακτος σε πεπτίδια, πεπτιδάσες οι οποίες διασπούν τα πεπτίδια, που σχηματίζονται, σε μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα και συστήματα μεταφοράς που εμπλέκονται στην κυτταρική πρόσληψη μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων.

Μετά από τα βακτήρια οι ζύμες αποτελούν την κυριότερη γαλακτοκομική μικροχλωρίδα. Ενώ προηγουμένως, θεωρούνταν ότι οι ζύμες μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση, ανεπιθύμητη οσμή και ελαττώματα, με περαιτέρω έρευνα, διαπιστώθηκε ότι ορισμένες ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητικοί εκκινητές για να αλλάξουν τη δομή των γαλακτοκομικών προϊόντων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της ωρίμανσης (De Freitas και συν., 2009). Οι ζύμες διαθέτουν πρωτεολυτικά ένζυμα και μπορούν να παράγουν πρόδρομες αρωματικές ουσίες που επηρεάζουν τη γεύση, την υφή, την ποιότητα και τη δομή των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Σε επίπεδο ζυμών, οι *Y. lipolytica* και *K. lactis* έχουν χαρακτηριστεί ως τα πλέον πρωτεολυτικά και λιπολυτικά είδη, καθώς εμφανίζουν ισχυρή εξωκυτταρική πρωτεολυτική δραστηριότητα σε άγαρ αποβουτυρωμένου γάλακτος, ενώ η *Y. lipolytica* παρουσιάζει και έντονη λιπολυτική δράση (Atanassova και συν., 2016). Η εκτίμηση των ιδιοτήτων αυτών δεν είναι τόσο διαδεδομένη στον *S. cerevisiae*, με αρκετές μελέτες να υποστηρίζουν την απουσία εξωκυτταρικού πρωτεολυτικού δυναμικού στα διάφορα στελέχη του (Strauss και συν., 2001, Gardini και συν., 2006, Atanassova και συν., 2016). Ωστόσο σε άλλη έρευνα οι Seredyński και συν., (2016) σε μια προσπάθεια εκτίμησης της πρωτεολυτικής δράσης του *S. cerevisiae*, απομόνωσαν τα στελέχη W303a και BY4742, τα οποία χαρακτηρίστηκαν από έναν μόνο τύπο εκκριτικής πρωτεάσης και διαφορετικές πρωτεάσες ποικίλων καταλυτικών τύπων, αντίστοιχα, σε πλήρη εξάρτηση από την παρουσία και τον τύπο του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Στην πραγματικότητα τα κύτταρα του *S. cerevisiae* παράγουν αρκετές καλά χαρακτηρισμένες κενοτοπικές, κυτοσολικές ή προσδεδεμένες σε μεμβράνες πρωτεάσες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών σερίνης που σχετίζονται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, μεταλλοπρωτεάσες με ρυθμιστικές ιδιότητες, πρωτεάσες κυστεΐνης και ασπαρτικές πρωτεάσες που απαιτούνται για την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Όσο αφορά στις εξωκυτταρικές πρωτεάσες, ορισμένες από αυτές αναγνωρίστηκαν ως κενοτοπικά ένζυμα, υποδηλώνοντας ότι η εξωτερική πρωτεολυτική δραστηριότητα μπορεί να μην σχετίζεται με τη σκόπιμη έκκριση συγκεκριμένων ενζύμων, αλλά μάλλον με τον αποκλίνοντα εντοπισμό ενδοκυτταρικών πρωτεασών (Seredyński και συν., 2016). Τέλος εκτίμηση της πρωτεολυτικής δράσης του *S. cerevisiae* πραγματοποιήθηκε και από τους Chaves-Lopez και συν., (2011), σε ζυμούμενα λουκάνικα, παρά το ασυνήθιστο του υποστρώματος, δηλαδή την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπος, αλλά και τη χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι σε ένα πρότυπο σύστημα, οι πρωτεΐνες των μυοϊνιδίων και σε μικρότερο βαθμό οι σαρκοπλασμικές πρωτεΐνες είναι επιρρεπείς σε αποικοδόμηση από τις πρωτεάσες στελεχών του *S. cerevisiae*, απομονωμένων από ιταλικό σαλάμι.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στην παρούσα ερευνητική μελέτη, τα στελέχη του είδους *S. cerevisiae*, που εμφάνισαν πρωτεολυτική δραστηριότητα, προέρχονται από τους κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ. Η υψηλή περιεκτικότητα σε σακχαρόζη των ζαχαρούχων υποστρωμάτων, έχει βρεθεί ότι διεγείρει την ανάπτυξη του είδους *S. cerevisiae*, το

οποίο μέσω του ενζύμου, ινβερτάση που διαθέτει, διασπά τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Το ένζυμο αυτό ονομάστηκε ινβερτάση, επειδή η υδρόλυση της σακχαρόζης προκαλεί μια αναστροφή της οπτικής περιστροφής στο ζαχαρούχο διάλυμα, από θετική σε αρνητική. Έτσι στον *S. cerevisiae*, η κατανάλωση σακχαρόζης αρχίζει με την υδρόλυση της από την ινβερτάση στον περιπλασματικό χώρο (εκτός των κυττάρων, μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης) και στη συνέχεια, οι μονοσακχαρίτες εισέρχονται στα κύτταρα με διευκολυνόμενη διάχυση και καθίστανται διαθέσιμοι για την ενδοκυτταρική φωσφορλίωση τους με γλυκο- και εξοκινάσες, που αντιστοιχεί στο πρώτο ενζυματικό στάδιο στην κλασική γλυκολυτική οδό Embden Meyerh of-Parnas (Marques και συν., 2016).

Ο *K. marxianus* από την άλλη, ο οποίος απαντάται τα τελευταία χρόνια σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Lagneau και συν., 1996, Corbo και συν., 2001, Hamme και συν., 2009), σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Gadaga και συν., 2001, Simona και συν., 2002), αποτελεί μία ζύμη που μεταβολίζει τη λακτόζη και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των λειτουργικών και αισθητήριων χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων. Το πρωτεολυτικό του σύστημα, σε επίπεδο γενετικής και βιοχημείας, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, παρά την ενδεχόμενη βιομηχανική του σημασία. Ωστόσο οι Ramírez-Zavala και συν., (2004), ανέφεραν ότι πρόκειται για ένα πρωτεολυτικό σύστημα που συμμετέχει στις κύριες φυσιολογικές διεργασίες, όπως τη χρήση εξωγενών πρωτεϊνών ως θρεπτικών ουσιών, την εξάλειψη μη λειτουργικών πρωτεϊνών, τη διατήρηση των ομάδων αμινοξέων και στην μεταμεταφραστική ρύθμιση. Δεδομένου ότι το κύριο σύστημα αποικοδόμησης στα ευκαρυωτικά είναι μέσω της οδού πρωτεασώματος ουβικουϊτίνης, η οποία παράγει μικρά πεπτίδια, τα τελευταία αποικοδομούνται σε αμινοξέα με τρι-, δι-, καρβοξυ- και αμινοπεπτιδασών. Σε έρευνα των παραπάνω απομονώθηκε μία αμινοπεπτιδάση λυσίνης από τη ζύμη, *K. marxianus*, και επισημάνθηκε η έντονη αναστολή της από τη βεστατίνη, την ο-φαινανθρολίνη και, σε μικρότερο βαθμό, από το EDTA, αποδεικνύοντας ότι αποτελεί μια μεταλλοπρωτεάση, που δρα κατά προτίμηση σε αλκαλικά κατάλοιπα.

Σε άλλη μελέτη των Hamme και συν., (2009) αποδείχτηκε ότι η συγκαλλιέργεια του *K. marxianus* με τον *Lb. rhamnosus*, ενίσχυσε την πρωτεολυτική δράση των δύο παραπάνω, παρουσιάζοντας πιο αποτελεσματική υδρόλυση των πρωτεϊνών του ορού

γάλακτος (α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη) σε επίπεδο μικτής καλλιέργειας σε σχέση με εκείνη της μονοκαλλιέργειας, ενώ παρήγαγαν και πεπτίδια με ανασταλτική δραστηριότητα (ACE).

#### 4.3.2 Λιπόλυση

Μια άλλη ιδιότητα της μεταβολικής δραστηριότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων, ως προς την οποία ελέγχθηκαν τα διάφορα στελέχη των κόκκων κεφίρ, που απομονώθηκαν, είναι αυτή της λιπόλυσης. Πρόκειται για μια βιοχημική διεργασία με ζωτική σημασία για τη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος ιδιαίτερα στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Buffa και συν., 2001, Collins και συν., 2003, Hernández και συν., 2009, Galίου και συν., 2013, Ozturkoglu-Budak και συν., 2016, Karami, 2017, Vélez και συν., 2017). Η ιδιότητα αυτή έχει μελετηθεί αν και σε μικρότερη έκταση και σε άλλα πεδία της παραγωγής τροφίμων όπως αυτό του κρέατος (Jin και συν., 2010, Sánchez και συν., 2011, Huang και συν., 2014, Chen και συν., 2017) του κρασιού (Herrero και συν., 1996, Davis και συν., 1998) αλλά και του ελαιολάδου (Marquina και συν., 1992, Ciafardini και συν., 2006 a, b, Psani & Kotzekidou, 2006, Hernández και συν., 2006, Zullo & Ciafardini, 2008, Rodríguez-Gómez και συν., 2010).

Η λιπόλυση στα γαλακτοκομικά προϊόντα οφείλεται στην παρουσία λιπολυτικών ενζύμων, υδρολάσες, που διασπούν τον εστερικό δεσμό μεταξύ λιπαρού οξέος και πυρήνα γλυκερόλης του τριακυλογλυκεριδίου, παράγοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και μονο- και διακυλογλυκερίδια (Deeth & Touch, 2000). Τα λιπολυτικά αυτά ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν σε εστεράσες ή λιπάσες, οι οποίες διακρίνονται σύμφωνα με τρία βασικά χαρακτηριστικά:

- το μήκος της αλυσίδας του υδρολυμένου ακυλεστέρα
- τη φυσικοχημική φύση του υποστρώματος
- την ενζυμική κινητική

Οι εστεράσες υδρολύουν αλυσίδες ακυλεστέρα μεταξύ 2 και 8 ατόμων C κατά μήκος, ενώ οι λιπάσες υδρολύουν αλυσίδες ακυλεστέρων 10 ή περισσότερων ατόμων C. Οι εστεράσες υδρολύουν διαλυτά υποστρώματα σε υδατικά διαλύματα, ενώ οι λιπάσες υδρολύουν γαλακτωματοποιημένα υποστρώματα. Οι εστεράσες ακολουθούν κλασική κινητική τύπου Michaelis-Menten, ενώ οι λιπάσες, αφού ενεργοποιούνται μόνο

παρουσία υδρόφοβης/ υδρόφιλης διεπιφάνειας, εμφανίζουν διεπιφανειακή κινητική τύπου Michaelis-Menten.

Όπως αναφέρθηκε, η υδρόλυση των λιπιδίων έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων, και ιδιαίτερα εκείνα της βραχείας και μέσης αλυσίδας μπορούν, να συμβάλλουν άμεσα στην γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων και επίσης να χρησιμεύσουν ως πρόδρομα μόρια για μία σειρά καταβολικών αντιδράσεων, που οδηγούν στην παραγωγή ενώσεων γεύσης και αρώματος, όπως μεθυλοκετόνες, λακτόνες, εστέρες, αλκάνια και δευτεροταγείς αλκοόλες.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η εκτίμηση της λιπολυτικής δραστηριότητας των διαφόρων στελεχών, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.3.2 της ενότητας των Αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε με δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν εκείνη της διάχυσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, όπου από τα 50 στελέχη βακτηρίων, λιπολυτική δράση ανέπτυξαν 40, εκ των οποίων 7 στελέχη ανήκουν στο είδος του *B. amyloliquefaciens* και τα υπόλοιπα 33 σε αυτό του *Lb. rhamnosus*. Ενώ στην περίπτωση των ζυμών, από τα 83 στελέχη, δυνατότητα λιπόλυσης έδειξαν 45, εκ των οποίων τα 29 ανήκουν στο είδος του *S. cerevisiae* και τα 16 στον *K. marxianus*. Τα στελέχη αυτά ελέγχθηκαν για λιπολυτική δράση και με δεύτερη μέθοδο, σύμφωνα με τους Kamzolova και συν., (2005), με τη διαφοροποίηση ότι για πηγή άνθρακα και γαλακτωματοποιητή στη θέση του ελαιολάδου/ ηλιελαίου και της πολυβινυλαλκοόλης, χρησιμοποιήθηκε η τριβουτυρίνη (1%) και η λεκιθίνη (0.5%), αντίστοιχα, ενώ σαν τελικό σημείο επιλέχθηκαν τα Units/ mL. Τα αποτελέσματα της εκτίμησης της λιπολυτικής δράσης των παραπάνω στελεχών και με τις 2 προσεγγίσεις, ήταν σε πλήρη συμφωνία μεταξύ τους.

Αν και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών, δηλαδή η δραστηριότητα λιπάσης εκφραζόμενη ως Units/ mL έδειξε ότι σε επίπεδο ζυμών, πλέον λιπολυτικά ήταν τα στελέχη 10237, 10235 & 10199 με τιμές 20.85, 15.25 & 16.05 AU/ g και σε επίπεδο βακτηρίων υψηλότερη λιπολυτική δράση επέδειξαν τα στελέχη LQC 1990, 2023 & 2024 με τιμές 10.50, 10.05 & 9.80 AU/ g, το μέγεθος της λιπολυτικής δράσης των στελεχών αυτών δε συγκρίνεται με εκείνο, που επέδειξε η *Y. lipolytica*, με την ίδια μέθοδο. Πιο αναλυτικά τα περισσότερα λιπολυτικά στελέχη της *Y. lipolytica* σημείωσαν τιμές κυμαίνονταν από 2760-1200 U/ mL, και τα λιγότερα λιπολυτικά σε εύρος 264-120 U/ mL, δείχνοντας ότι εκείνα που εκτιμήθηκαν στη μελέτη μας ως

ιδιαίτερα λιπολυτικά, σε σύγκριση με άλλα είδη, θεωρούνται μάλλον ασθενή, γεγονός που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά.

Σε επίπεδο βακτηρίων, οι Ozturkoglu-Budak και συν., (2016) έδειξαν ότι από τα βακτηριακά στελέχη, που απομονώθηκαν από τυρί πρόβειου γάλακτος, λιπολυτική δράση εμφάνισαν σε spirit blue lipase agar plates, οι *B. stratosphericus*, *B. antiquum*, *P. glacincola* και *P. proteolytica*, με τη δημιουργία ζώνης διαύγασης γύρω από τις οπές, ενώ τα είδη *Lb. paraplantarum*, *Lb. brevis* & *Lb. coryniformis*, παρουσίασαν από ασθενή έως καθόλου λιπολυτική δράση. Γενικότερα τα είδη *Lactococcus* και *Lactobacillus* spp. θεωρούνται ασθενώς λιπολυτικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Flavobacterium* (Collins και συν., 2003). Ωστόσο, λόγω της παρουσίας τους σε τυριά σε μεγάλους αριθμούς σε μια εκτεταμένη περίοδο ωρίμανσης, θεωρείται πιθανό ότι τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση σημαντικών επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Οι Collins και συν., (2003) επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή επισημαίνοντας ότι τα βακτήρια διαθέτουν εστερολυτικά / λιπολυτικά ένζυμα ικανά να υδρολύουν ένα εύρος εστέρων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, δι- και μονογλυκερίδια. Τις εστερολυτικές/ λιπολυτικές ιδιότητες των βακτηρίων ανέφεραν σε έρευνά τους και οι Katz και συν., (2002), τονίζοντας την εξειδίκευση των λιπασών ως προς το υπόστρωμα και την άμεση εξάρτησή τους τόσο από το στέλεχος όσο και από το είδος. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρουσία λιπολυτικής δράσης εμφάνισαν και στελέχη που απομονώθηκαν από παστουρμά και ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus*, παρουσιάζοντας θετικά αποτελέσματα σε άγαρ τριβουτυρίνης και μέσο ανάπτυξης με τη μέθοδο προσδιορισμού "agar block" (Dincer & Kivanc, 2018). Τέλος το γένος *Bacillus* είναι γνωστό για την παραγωγή εξωκυτταρικών πρωτεασών και λιπασών σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Montanhini και συν., 2013) αλλά και οι Loperena και συν., (2012) σε βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ανταρκτικά περιβάλλοντα, επιβεβαίωσαν ότι τα είδη *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* και *Bacillus* συνοδεύονταν από υψηλή δραστηριότητα λιπάσης.

Από την άλλη σε επίπεδο ζυμών, έχει αποδειχτεί αρκετές φορές η ισχυρή πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση της *Y. Lipolytica* (Ferreira & Viljoen, 2003, Kamzolova και συν., 2005, Gardini και συν., 2006, , Atanassova και συν., 2015, Ozturkoglu-Budak και συν., 2016). Ενώ τόσο ο *S. cerevisiae* όσο και ο *K. marxianus* έχουν χαρακτηριστεί ως τα πλέον ασθενή λιπολυτικά είδη (Rodríguez-Gómez και

συν., 2010). Οι Hernández και συν., (2006) έδειξαν ότι στελέχη *S. cerevisiae* & *K. marxianus* που απομονώθηκαν από επιτραπέζιες πράσινες ελιές ήταν σε θέση να αποικοδομήσουν την τριβουτυρίνη (δραστικότητα εστεράσης), αλλά η δοκιμή σε ελαιόλαδο έδειξε πολύ λιγότερες περιπτώσεις ενεργότητας λιπάσης, κάτι που σημαίνει ότι ο πληθυσμός των ζυμών μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της περιεκτικότητας σε ελεύθερα λιπαρά οξέα κατά τη διάρκεια της φάσης ζύμωσης της επεξεργασίας πράσινης ελιάς. Οι Ciafardini και συν., (2006b) απομόνωσαν ένα στέλεχος *S. cerevisiae* (που αναφέρεται ως 1525) από εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, με σημαντική δραστικότητα λιπάσης.

Οι Cardoso και συν., (2015), σε απομονωμένα στελέχη παραδοσιακού τυριού Βραζιλίας, έδειξαν ότι εκείνα των *K. marxianus*, 83F και 60P, συνοδεύτηκαν από δραστικότητα λιπόλυσης και β-γαλακτοζιδάσης αντίστοιχα, με τον *K. marxianus* 83F να εμφανίζει την υψηλότερη δραστικότητα λιπάσης ( $0.06 \pm 0,04$  U/ mL) στους 20 ° C σε pH 6,0. Η χαμηλή λιπολυτική αλλά και καζεϊνολυτική δράση των στελεχών του *K. marxianus*, που απομονώθηκαν από το τυρί Pecorino di Farindola, αναφέρθηκαν και από τους Tofalo και συν., (2014), ωστόσο η υψηλή βιοποικιλότητα σε γενετικά και φαινοτυπικά επίπεδα δυνητικά προσφέρει πολλές ευκαιρίες για νέες και προηγμένες γνώσεις σε επίπεδο ειδών.

#### **4.3.3 Αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria monocytogenes***

Η αντιμικροβιακή δράση που επιδεικνύει τόσο το κεφίρ σαν ρόφημα όσο και τα στελέχη εκείνα, που σχετίζονται με αυτό, έχουν περιγραφεί εκτενώς στην παράγραφο 1.5.3.1 της Εισαγωγής. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην παρουσία βακτηριοστατικής δράσης που συνοδεύει το συγκεκριμένο ρόφημα, και της ανασταλτικής δραστηριότητας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Garrote και συν., 2000). Στην πραγματικότητα πολλοί Gram<sup>+</sup> και Gram<sup>-</sup> μικροοργανισμοί έχει βρεθεί ότι παράγουν βακτηριοσίνες με εκείνες που συντίθενται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, να αποτελούν πεδίο εντατικής έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που συνδέονται με τη διατήρηση των τροφίμων και τα οφέλη που προκύπτουν από αυτό, και δευτερευόντως λόγω του ευρύτερου ανασταλτικού φάσματος. Συγκεκριμένα οι βακτηριοσίνες αποτελούν πεπτίδια ή πρωτεΐνες που ασκούν αντιμικροβιακή δράση εναντίον μιας σειράς μικροοργανισμών. Η παραγωγή τους μπορεί να σχετίζεται με τον ανταγωνισμό μέσα σε μια συγκεκριμένη οικολογική

θέση, καθώς το στέλεχος του παραγωγού, το οποίο είναι το ίδιο άνοσο της δράσης του, αποκτά ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα. Με βάση τη δομή τους καθώς και τις βιοχημικές τους ιδιότητες, οι βακτηριοσίνες χωρίζονται σε τρεις ομάδες: τα λαντιβιοτικά, τα μη-λαντιβιοτικά και τα μη-λαντιβιοτικά θερμικά ασταθή μεγάλα μόρια.

Αν και στην παρούσα ερευνητική μελέτη τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους κόκκους κεφίρ δεν επέδειξαν ανασταλτική δράση έναντι της *L. monocytogenes*, παρόλα αυτά στελέχη βακτηρίων έχουν συνδεθεί βιβλιογραφικά με την παραπάνω ιδιότητα. Οι Vermeiren και συν., (2006) μελέτησαν δύο βακτήρια, ένα μη βακτηριοσινογόνο στέλεχος του *Lb. sakei subsp. carnosus* 10A και ένα στέλεχος του *Lb. sakei* που παράγει λακτοσίνη S 148 για τη χρησιμότητά τους ως προστατευτική καλλιέργεια στη βιοδιατήρηση των προϊόντων μαγειρεμένου κρέατος χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο μαγειρεμένου ζαμπόν εμβολιασμένου με ένα κοκτέιλ τριών διαφορετικών στελεχών *L. monocytogenes*. Η εφαρμογή του μη βακτηριοσινογόνου στελέχους στα  $10^6$  cfu / g ήταν ικανή να περιορίσει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε  $<1 \log_{10}$  cfu / g κατά τη διάρκεια 27 ημερών στους 7 °C, ενώ ένα επίπεδο εφαρμογής  $10^5$  cfu / g απέτυχε να αποτρέψει την αύξηση του παθογόνου σε αποδεκτά επίπεδα. Η μείωση της θερμοκρασίας σε 4 °C ή η αλλαγή από τη συσκευασία κενού σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας δεν επηρέασε την ικανότητα του στελέχους να κυριαρχεί.

#### **4.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ροφήματος κεφίρ**

Τόσο σε επίπεδο κόκκων ζαχαρούχου κεφίρ, όσο και σε επίπεδο ροφήματος, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των μικροβιακών αποικιών των ζυμών και των βακτηρίων, που απομονώθηκαν. Πιο αναλυτικά στην αρχή της πειραματικής πορείας, αφού ζυγίστηκε 1g κόκκων ζαχαρούχου κεφίρ, και από τις τρεις πηγές προέλευσης (μήλο, βύσσινο, νερό) ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών με διαδικασίες που περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα των Υλικών & Μεθόδων, με τις ζύμες να κυμαίνονται από 6.28-6.58 και τα βακτήρια από 4.32-4.85 (CFU/g), αντίστοιχα. Μικροβιακή απαρίθμηση πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση ροφήματος ζαχαρούχου κεφίρ, αφού είχε προηγηθεί η ζύμωσή του και η παραμονή σε ψυκτικές συνθήκες 4 °C για 24 h . Τα αποτελέσματα της μικροβιακής καταμέτρησης έδειξαν

την αύξηση των αποικιών και στις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών, με τις ζύμες να κυμαίνονται από 7.95-8.26 και 7.6-8.12 CFU/ mL σε επίπεδο μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας με τα βακτήρια, και τα τελευταία να παρουσιάζουν τιμές από 9.12-9.32 και 9.20-9.35 CFU/ mL, στην περίπτωση μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας αντίστοιχα.

Βιβλιογραφικά τα επίπεδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών είθισται να κυμαίνονται από  $10^8$ - $10^9$  και  $10^6$ - $10^7$  CFU/ g, αντίστοιχα, με τα πρώτα να υπερτερούν σε σχέση με τα δεύτερα (Gulitz και συν., 2011, Stadie και συν., 2013, Garofalo και συν., 2015, Prado και συν., 2015, Kalamaki & Angelidis, 2017). Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, συμβαίνει το αντίθετο, με φανερή επικράτηση των ζυμών έναντι των βακτηρίων στους κόκκους κεφίρ, κάτι που υποστηρίζεται εν μέρει από τους Witthum (2004) που αναφέρουν ότι τα βακτήρια απαντώνται κατά  $6.4 \cdot 10^4$ - $8.5 \cdot 10^8$  CFU/ mL και οι ζύμες κατά  $1.5 \cdot 10^5$ - $3.7 \cdot 10^8$  CFU/ mL. Τέλος η μικροβιακή καταμέτρηση σε ρόφημα κεφίρ δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη βιβλιογραφικά, ωστόσο οι Magalhães και συν., (2010) σε έρευνά τους μελέτησαν την παραπάνω περίπτωση, αναφέροντας ότι οι μικροβιακές αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμαίνονται από 6.82-8.32 και των ζυμών από  $< 6$ -7.31 CFU/mL, σε ρόφημα κεφίρ αντίστοιχα. Δεδομένου ότι η μικροβιακή κατάσταση σε επίπεδο κόκκων είναι της τάξης των  $10^8$ - $10^9$  και  $10^6$ - $10^7$  CFU/ g σε βακτήρια και ζύμες, επιβεβαιώθηκε από τους ίδιους η ύπαρξη συνεργιστικής δράσης μεταξύ των δύο μικροβιακών ομάδων, με τις ζύμες να ευνοούνται από την οξίνιση του περιβάλλοντος λόγω της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ η ανάπτυξη των τελευταίων διεγείρεται από την παρουσία των ζυμών, οι οποίες παράγουν παράγοντες ανάπτυξης, όπως βιταμίνες και διαλυτές ενώσεις αζώτου.

## 5. Βιβλιογραφία

1. Alessandria V, P Dolci, K Rantsiou, D Pattono, A Dalmasso, T Civera and L Cocolin. 2010. Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 2211-2221.
2. Arslan S. 2015. A review: Chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA J Food* 13: 340–345.
3. Atalan G, I Demirkan, H Yaman and M. Cina. 2003. Effect of topical kefir application on open wound healing on in vivo study. *Kafkas Univ Vet Fak Dderg* 9: 43–47.
4. Atanassova MR, C Fernández-Otero, P Rodríguez-Alonso, IC Fernández-No, JI Garabal and JA Centeno. 2016. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol* 53: 172-181.
5. Behr T, C Koob, M Schedl, A Mehlen, H Meier, D Knopp, E Frahm, U Obst, KH Schleifer, R Niessner and W Ludwig. 2000. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol* 23: 563–572.
6. Bonnet M, MM Rafi, ML Chikindas and TJ Montville. 2006. Bio-energetic mechanism for nisin resistance, induced by the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 72 : 2556–2663.
7. Bottari B, D Ercolini, M Gatti and E Neviani. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 485–494.
8. Briczinski EP & RF Roberts. 2007. Characterizing probiotic microorganisms. In: *Functional Dairy Products*. Ed.: Saarela M pp. 359-384. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
9. Buffa M, B Guamis, M Pavia and AJ Trujillo. 2001. Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure treated goats' milk. *Int Dairy J* 11: 175–179.
10. Cardoso VM, BM Borelli, CA Lara, MA Soares, C Pataro, EC Bodevan and CA Rosa. 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Res Int* 69 : 331–340.

11. Carminati D, A Perrone, G Giraffa, E Neviani and G Mucchetti. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. *Food Microbiol* 21: 801–807.
12. Casal M , H Cardoso and C Leao 1998. Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 64(2): 665-668.
13. Cevikbas A, E Yemni, FW Ezzedenn, T Yardimici, U Cevikbas and SJ Stohs. 1994. Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother Res* 8: 78-82.
14. Chaudhuri M, S Biswas<sup>1</sup>, A Pal and AK Paul. 2017. Proteolytic Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* UEF01 Endophytic to Carnivorous Plant *Utricularia exoleta* R. *Br Biotechnol J Int* 17 3: 1-11.
15. Chaves-López C, A Paparella, R Tofalo and G Suzzi. 2011. Proteolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with Italian dry-fermented sausages in a model system. *Int J Food Microbiol* 150: 50–58.
16. Cheirsilp B, H Shimizu and S Shioya. 2003. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 100: 43-53.
17. Chen HC, SY Wang and M.J Chen. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol* 25: 492–501.
18. Chen Q, B Kong, Q Han, X Xia and L Xu. 2017. The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development. *LWT Food Sci Technol* 77: 389-396.
19. Chen YS & JL Steele. 1998. Genetic characterization and physiological role of endopeptidase O from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Appl Environ Microbiol* 64: 3411–3415.
20. Chen Z, J Shi, X Yang, B Nan, Y Liu, and Z Wang. 2015. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int Dairy J* 43: 15–21.
21. Christensson C, H Bratt, LJ Collins, T Coolbear, R Holland, MW Lubbers, PW O’Toole and JR Reid. 2002. Cloning and expression of an oligopeptidase,

- PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20). *Appl Environ Microbiol* 68: 254–262.
22. Ciafardini G, BA Zullo and A Iride. 2006a. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiol* 23: 60 - 67.
  23. Ciafardini G, BA Zullo, G Cioccia and A Iride. 2006b. Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int J Food Microbiol* 107: 27-32.
  24. Clementi F, M Gobbetti and J Rossi. 1989. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. *Milchwissenschaft* 44: 70-74.
  25. Cocolin L, LF Bisson and DA Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 189 (1): 81-87.
  26. Cocolin L, M Manzano, C Cantoni and G Comi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* 67: 5113–5121.
  27. Collins YF, PLH McSweeneyb and MG Wilkinsonc. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int Dairy J* 13: 841-866.
  28. Corbo MR, R Lanciotti, M Albenzio and M Sinigaglia. 2001. Occurrence and characterization of yeast isolated from milk and dairy products of Apulia region. *Int J Food Microbiol* 69: 147–152.
  29. Davis CR, D Wibowo, GH Fleet and TH Lee. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am J Enol Vitic* 39: 137–142.
  30. De Freitas I., N Pinon, JL Maubois, S Lortal and A Thierry. 2009. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int J Food Microbiol* 129: 37-42.
  31. De Vrese M, A Stegelmann, B Richter, S Fenselau, C Laue and J Schrezenmeir. 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73: 421-429.
  32. Deeth HC & V Touch. 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Aust J Dairy Technol* 55: 153–168.

33. Delgado da Silva MC, MT Destro, E Hofer and A Tibana. 2001. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. *Int J Food Microbiol* 63: 275–2.
34. Dias FS, WF Duarte & RF Schwan. 2013. Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *J Biosci* 29: 1678-1686.
35. Dicks LMT, FD Mellett, and LC Hoffman. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Sci* 66: 703–708.
36. Dinçer E & M Kıvanç. 2018. Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Turkish pastirma. *Anadolu Univ J Sci Technol C – Life Sci Biotech* 7 (1).
37. Dupont I, D Roy and G Lapointe. 2000. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24: 251-255.
38. Ekunsanmi TJ & SA Odunfa. 1990. Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeasts strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *J Appl Bact* 69: 672-675.
39. El Galiou O, S Zantar, M Bakkali and A Laglaoui. 2013. Lipolysis and Proteolysis During the Ripening of Fresh Moroccan Goats' Milk Cheese. *World J Dairy Food Sci* 8 (2): 201-206.
40. Ercolini D, G Moschetti, G Blaiotta and S Coppola. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst Appl Microbiol* 24: 610–617.
41. Ercolini D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* 56: 297-314.
42. Espinoza-Gómez H & SW Lin. 2001. Development of ultrafiltration membranes from acrylonitrile co-polymers. *Polym Bull* 47: 297-304.

43. Esteve-Zarzoso B, MJ Peris-Toran, D Ramon and A Quero. 2001. Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 85–92.
44. Farnworth ER. 2005. Kefir—A complex probiotic. *Food Sci Tech Bull Funct Foods* 2: 1–17.
45. Ferreira AD & BC Viljoen. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int Journal Food Microbiol* 86: 131– 140.
46. Fiorda FA, GV De Melo Pereira, V Thomaz-Soccol, AP Medeiros, SK Rakshit and CR Soccol. 2016. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT - Food Sci Technol* 86: 690-607.
47. Fiorda FA, GV de Melo Pereira, V Thomaz-Soccol, SK Rakshit, MGB Pagnoncelli, LP de Souza Vandenberghe and CR Soccol. 2017. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiol* 66: 86- 95.
48. Gadaga TH, AN Mutukumira and JA Narvhus. 2001. Growth characteristics of *Candida kefyr* and two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *Int J Food Microbiol* 70: 11–19.
49. Galli A, E Fiori, L Franzetti, MA Pagani and G Ottogalli. 1995. Microbiological and chemical composition of sugar kefir grains. *Ann Microbiol Enzymol* 45: 85-95.
50. Gardini F, R Tofalo, N Belletti, L Iucci, G Suzzi, S Torriani, ME Guerzoni and R Lanciotti. 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese *Food Microbiol* 23: 641–648.
51. Garofalo C, A Osimani, V Milanovi\_c, L Aquilanti, F De Filippis, G Stellato, S Di Mauro, B Turchetti, P Buzzini, D Ercolini and F Clementi. 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.* 49: 123-133.
52. Garrote GL, AG Abraham and GL De Antoni. 1997. Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT – Food Sci Technol* 30: 77–84.
53. Garrote GL, AG Abraham and GL De Antoni. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *J Food Prot* 63: 364–369.

54. Garrote GL, AG Abraham and GL De Antoni. 2001. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *J Dairy Res* 68: 639–652.
55. Garrote GL, L Delfederico, R Bibiloni, AG Abraham, PF Perez, L Semorile and GL De Antoni. 2004. *Lactobacilli* isolated from kefir grains: evidence of the presence of Slayer proteins. *J Dairy Res* 71: 222-230.
56. Gevers D, G Huys and J Swings. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 205: 31–36.
57. Giraffa G & D Carminati. 2008. Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications. In: *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Ed.: Cocolin L & D Ercolini pp. 1-30. Springer Science & Business Media. New York, USA.
58. Golowczyc MA, MJ Gugliada, A Hollmann, L Delfederico, GL Garrote and AG Abraham. 2008. Characterization of homofermentative *Lactobacilli* isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *J Dairy Res* 75: 211–217.
59. Gulitz A, J Stadie, M Wenning, MA Ehrmann and RF Vogel. 2011. The microbial diversity of water kefir. *Int J Food Microbiol* 151: 284-288.
60. Gulitz A, J Stadie, MA Ehrmann, W Ludwig and RF Vogel. 2013. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J Appl Microbiol* 114: 1082-1091.
61. Guzel-Seydim ZB, AC Seydim, AK Greene and AB Bodine. 2000. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *J Food Compos Anal* 13: 35–43.
62. Hamme V, F Sannier, JM Piot, S Didelot and S Bordenave-Juchereau. 2009. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. *J Dairy Res* 76: 152–157.
63. Hanafy AM, AA Al Mutairi, RM Al Reedy and SM Al-Garni. 2016. Phylogenetic affiliations of *Bacillus amyloliquefaciens* isolates produced by a bacteriocin-like substance in goat milk. *JTUSCI* 10: 631–641.
64. Hansson A, L Andersson, A Leufven and K Pefirson. 2001. Effect of Changes in pH on the Release of Flavour Compounds from a Soft Drink-related Model System. *Food Chem* 74: 429-435.

65. Haq IU & S Ali. 2007. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch cultures. Pak J Bot 39: 907-912.
66. Hernández A, A Martín, E Aranda, F Pérez Nevado and MG Córdoba. 2006. Identification and characterization of yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Food Microbiol 24: 346-351.
67. Hernández I, LJR Barrón, M Virto, FJ Pirez-Elortondo, C Flanagan, U Rozas, AI Nájera, M Albisu, MS Vicente and M de Renobales. 2009. Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. Food Chem 116: 158–166.
68. Herrero M, B Mayo, B González and JE Suárez. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. J Appl Bacteriol 81: 565–570.
69. Huang Y, H Li, T Huang, F Li and J Sun. 2014. Lipolysis and lipid oxidation during processing of Chinese traditional smoke-cured bacon. Food Chemistry 149: 31–39.
70. Huseini HF, G Rahimzadeh, MR Fazeli, M Mehrazma and M Salehi. 2012. Evaluation of wound healing activities of kefir products. Burns 38: 719–723.
71. Huy DNA, PA Hao and PV Hung. 2016. Screening and identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional Vietnamese soybean-fermented products for high fibrinolytic enzyme production. Int Food Res J 23(1): 326-331.
72. Imai T & T Ohno. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 61(10): 3604-3608.
73. Jamuna M & K Jeevaratnam. 2004. Isolation and characterization of *Lactobacilli* from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocin. J Gen Appl Microbiol 50: 79-90.
74. Jin G, J Zhang, X Yu, Y Zhang, Y Lei and J Wang. 2010. Lipolysis and lipid oxidation in bacon during curing and drying–ripening Food Chem 123: 465–471.
75. Jolly L, SJF Vincent, P Duboc and JR Neeser. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 82: 367-374.

76. Jyoti BD, AK Suresh and KV Venkatesh. 2003. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World J Microbiol Biotechnol* 19: 509–514.
77. Kaewiad K, S Kaewnopparat and N Kaewnopparat. 2015. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK54 isolated from new born baby with *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. *Adv Mater Res* 1060: 215-218.
78. Kalamaki M & A Angelidis. 2017. Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. *Int J Dairy Technol* 70.
79. Kamzolova SV, IG Morgunov, A Aurich, OA Perevoznikova, NV Shishkanova, U Stottmeister and TV Finogenova. 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol Biotechnol* 43(2): 113-122.
80. Karami M. 2017. Enhancing the lipolysis of feta-type cheese made from ultrafiltered cow's milk. *LWT Food Sci Technol* 80: 386-393.
81. Katz MR, S Medina, Gonzalez and G Oliver. 2002. Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe's Milk and Cheese. *J Food Protection* 65 (12): 1997–2001.
82. Kesmen Z & N Kacmaz. 2011. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *J Food Sci* 76: 276-283.
83. Klein J, A Dick, J Schick, H Matern, B Henrich and R Plapp. 1995. Molecular cloning and DNA sequence analysis of pepL, a leucyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. *Eur J Biochem* 228: 570–578.
84. Klein JR, J Schick, B Henrich and R Plapp. 1997. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 pepG gene encodes a novel cysteine aminopeptidase. *Microbiol* 143: 527–537.
85. Koroleva NS. 1988. Technology of kefir and kumys. *Bull Int Dairy Fed* 227: 96-100.
86. Koroleva NS. 1991. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: *Therapeutic properties of fermented milks*. Ed.: RK Robinson. pp. 159-179. Elsevier. Applied Sciences Publishers. London, UK.

87. Kubota H, S Senda, N Nomura, H Tokuda and H Uchiyama. 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng* 106: 381-386.
88. Kunji ER, I Mierau, A Hagting, B Poolman and WN Konings. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (2–4): 187–221. Fernández.
89. Kurtzman CP & CJ Robnett. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigen sequence analyses. *FEMS Yeast Res* 3: 417–432.
90. Kwak HS, SK Park and DS Kim. 1996. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *J Dairy Sci* 79: 937-942.
91. Lagneau PE, K Lebtahi and D Swinne. 1996. Isolation of yeast from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 135: 99–102.
92. Laureys D, M Cnockaert, L De Vuyst, and P Vandamme. 2016. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 1281-1286.
93. Leite A, M Miguel, R Peixoto, P Ruas-Madiedo, V Paschoalin and B Mayo. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J Dairy Sci* 98: 3622–3632.
94. Leite AMO, B Mayo, CTCC Rachid, RS Peixoto, JT Silva, VMF Paschoalin and S Delgado. 2012. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequence analysis. *Food Microbiol* 31: 215–221.
95. Libudzisz Z & Piatkiewicz A. 1990. Kefir production in Poland. *Dairy Ind Int* 55: 31–33.
96. Liu JR, MJ Chen and CW Lin. 2002. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *J Food Sci* 67: 104-108.
97. Liutkevicius A & A Sarkinas. 2004. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. *Vet Zootech*, 25, 64–70.
98. Loperena L, V Soria, H Varela, S Lupo, A Bergalli, M Guigou, A Pellegrino, A Bernardo, A Calvinõ, F Rivas and S Batista. 2012. Extracellular enzymes

- produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 2249–2256.
99. Lu M, X Wang, G Sun, B Qin, J Xiao, S Yan, Y Pan and Y Wang. 2014. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLoS ONE* 9 :101387.
  100. Magalhães KT, GV De Melo Pereira, CR Campos, G Dragone and RF Schwan. 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Braz J Microbiol* 42: 693-702.
  101. Magalhães, KT, GV De Melo Pereira, DR Dias and RF Schwan. 2010. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microbiol Biotechnol* 33: 1-10.
  102. Marques WL, V Raghavendran, BU Stambuk and AK Gombert. 2016. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Res* 16, No. 1.
  103. Marquina D, C Peres, FV Caldas, JF Marques, JM Peinado and Spencer-Martins. 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett Appl Microbiol* 14: 283–297.
  104. Marshall VM & WM Cole. 1983. Methods for Making Kefir and Fermented Milks Based on Kefir. *J Dairy Res* 52: 451-456.
  105. Martín R, N Soberon, M Vanechoutte, FV Camino and JE Suarez. 2008. Characterization of indigenous vaginal *lactobacilli* from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol* 11: 261-266.
  106. Martín-Sánchez AM, C Chaves-López, E Sendra, E Sayas, J Fenández-López and JÁ Pérez-Álvarez. 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Sci* 89: 35–44.
  107. Matos J, M Nardi, H Kumura and V Monnet. 1998. Genetic characterization of pepP, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Appl Environ Microbiol* 64: 4591–4595.
  108. Messens W & L De Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-a review. *Int J Food Microbiol* 72: 31-43.

109. Miao J, H Guo, Y Ou, G Liu, X Fang and Z Liao. 2014. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control* 42: 48–53.
110. Mierau I, P Tan, A Haandrikman, B Mayo, J Kok, W Konings and G Venema. 1993. Cloning and sequencing of the gene for a lactococcal endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *J Bacteriol* 175: 2087–2096.
111. Miguel MGCP, PG Cardoso, KT Magalhães and RF Schwan. 2011. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 1875-1884.
112. Miguel MGCP, PG Cardoso, KT Magalhães-Guedes and RF Schwan. 2013. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. *Braz J Microbiol* 44(1): 113-118.
113. Mitsue T, K Tachibana and Y Fujio. 1999. Efficient kefir production by a mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and yeast strains. *Seibutsu-kogaku* 77: 99-103.
114. Moinas M, M Horisberger and H Bauer. 1980. The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch Microbiol*. 128: 157-161.
115. Montanhini MTM, RN Montanhini, JPN Pinto, and LS Bersot. 2013. Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. *Int Food Res J* 20(3): 1417-1420.
116. Mukai T, T Toba, T Itoh, T Nimura and S Adachi. 1990. Carboxymethyl kefir: preparation and viscometric properties. *J Food Sci* 55: 1483-1484.
117. Murofushi M, J Mizuguchi, K Aibara and T Matuhasi. 1986. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacol* 12: 29-35.
118. Murofushi M, M Shiomi and K Aibara. 1983. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Jpn J Med Sci Biol* 36: 49-53.

119. Muyzer G, EC de Waal and AG Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700.
120. Nardi M, P Renault and F Monnet. 1997. Duplication of the pepF gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 179: 4164–4171.
121. Narendranath NV, SH Hynes, KC THOMAS and WM Ingeldew. 1997. Effects of *Lactobacilli* on Yeast Catalyzed Ethanol Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 63(11): 4158-4163.
122. Ndoye B, EA Rasolofo, G LaPointe and D Roy. 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Sci Technol* 91: 495–524.
123. Neilson JW, FL Jordana and RM Maiera. 2013. Analysis of Artifacts Suggests DGGE Should Not Be Used For Quantitative Diversity Analysis. *J Microbiol Methods* 92(3): 256–263.
124. Osho A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *Afr J Biotechnol* 4: 660-662.
125. Otes S & O Cagindi. 2003. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J Nutr* 2: 54–59.
126. Ozturkoglu-Budak S, A Wiebenga, PA Bron and RP de Vries. 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int J Food Microbiol* 237: 17–27.
127. Palaniswamy SK & V Govindaswamy. 2016. In-vitro probiotic characteristics assessment of feruloyl esterase and glutamate decarboxylase producing *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented millet porridge (kambu koozh). *LWT Food Sci Technol* 68: 208-216.
128. Paramithiotis S, S Tsasiotou and EH Drosinos. 2010. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur Food Res Technol* 231: 883–890.
129. Pateraki S, S Paramithiotis, AI Doulgeraki, S Kallithraka, Y Kotseridis & EH Drosinos. 2014. Effect of sulfur dioxide addition in wild yeast population dynamics and polyphenolic composition during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko 239: 1067-1075.

130. Pidoux M. 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the ginger beer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol* 5: 223-238.
131. Prado MR, ML Blandon, LPS Vandenberghe, CC Rodrigues, R Guillermo, VT Thomaz-Soccol, CR Soccol. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol* 6: 1-12.
132. Psani M & P Kotzekidou. 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 1329 - 1336.
133. Puerari C, KT Magalhães and RF Schwan. 2012. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Res Int* 48: 634-640.
134. Rajoka MSR, HM Mehwish, M Siddiq, Z Haobin, J Zhu, L Yan, D Shao, X Xu and J Shi. 2017. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk *LWT Food Sci Technol* 84: 271-280.
135. Ramezani M, SM Hosseini, I Ferrocino, MA Amoozegar and L Cocolin. 2017. Molecular investigation of bacterial communities during the manufacturing and ripening of semi-hard Iranian Liqvan cheese *Food Microbiol* 66: 64-71.
136. Ramírez-Zavala B, Y Mercado-Flores, C Hernández-Rodríguez and L Villa-Tanaca. 2004. Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol Lett* 235: 369–375.
137. Randazzo CL, S Torriani, ADL Akkermans, WM de Vos and EE Vaughan, 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 68: 1882–1892.
138. Rantsiou K & L Cocolin. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *Int J Food Microbiol* 108: 255–267.

139. Rantsiou K, R Urso, P Dolci, G Comi and L Cocolin. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int J Food Microbiol* 126: 36-42.
140. Rea MC, E Clayton, PM O'Connor, F Shanahan, B Kiely, RP Ross. 2007. Antimicrobial activity of lacticin<sub>3,147</sub> against clinical *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol* 56: 940-946.
141. Rodrigues KL, LR Gaudino Caputo, JC Tavares Carvalho, J Evangelista and JM Schneedorf. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents* 25: 404-408.
142. Rodriguez E, MI Martinez, N Horn and HM Dodd. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 80: 101-116.
143. Rodríguez- Gómez F, FN Arroyo-López, A López-López, J Bautista-Gallego and A Garrido-Fernández. 2010. Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiol* 27: 604 -612.
144. Ruas-Madiedo P, J Hugenholtz and P Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J* 12: 163-171.
145. Ryan MP, MC Rea, C Hill and RP Ross. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl Environ Microbiol* 62: 612-619.
146. Sabir F, Y Beyatli, C Cokmus and DO Darilmaz. 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J Food Sci* 75: 568-573.
147. Santos A, M San Mauro, A Sánchez, JM Torres and D Marquina. 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Syst Appl Microbiol*. 26: 434-437.
148. Sarkar S. 2008. Biotechnological innovations in kefir production: A review. *Br Food J* 110: 283-295.
149. Seredyński R, D Wolna, M Kędzior and J Gutowicz. 2017. Different patterns of extracellular proteolytic activity in W303a and BY4742 *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Basic Microbiol*. 57: 34-40.

150. Shiomi M, K Sasaki, M Murofushi and K Aibara. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn J Med Sci Biol* 35: 75-80.
151. Simoes M, LC Simoes, MJ Vieira 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Sci Technol* 43: 573-583.
152. Simova E, D Beshkova, A Angelov, Ts Hristozova, G Frengova and Z Spasov. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 1-6.
153. Sridhar VR, JE Hughes, DL Welker, JR Broadbent and JL Steele. 2005. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl Environ Microbiol* 71: 3025–3032.
154. Stadie J, A Gulitz, MA. Ehrmann and RF. Vogel. 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir *Food Microbiol* 35: 92-98.
155. Strauss M, N Jolly, M Lambrechts and P Van Rensburg. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J Appl Microbiol* 91(1): 182–190.
156. Tang H, T Cao, X Liang, A Wang, SO Salley, J McAllister, KY Ng. 2009. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res* 88A: 454-463.
157. Tofalo R, G Fasoli, M Schirone, G Perpetuini, A Pepe, A Corsetti, et al. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *Int J Food Microbiol* 187: 41–49.
158. Tynkkynen S, G Buist, E Kunji, J Kok, B Poolman, G Venema and A Haandrikman 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 175: 7523–7532.
159. Vacheethasane K, JS Temenoff, JM Higashi, A Gary, JM Anderson, R Bayston and RE Marchant, 1998. Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* 42: 425-432.

160. Vardjan T, PM Lorbeg, I Rogelj and AČ Majhenič. 2013. Characterization and stability of *Lactobacilli* and yeast microbiota in kefir grains. *J Dairy Sci* 96: 2729–2736.
161. Varmanen P, K Savijoki, S Åvall, A Palva and S Tynkkynen. 2000a. Xprolyl dipeptidyl aminopeptidase gene (pepX) is part of the glnRA operon in *Lactobacillus rhamnosus*. *J Bacteriol* 182: 146–154.
162. Varmanen P, T Rantanen, A Palva and S Tynkkynen. 1998. Cloning and characterization of a prolinase gene (pepR) from *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1831–1836.
163. Vélez MA, ER Hynes, CA Meinardi, VI Wolf and MC Perotti. 2017. Cheese milk low homogenization enhanced early lipolysis and volatiles compounds production in hard cooked cheeses. *Food Res Int* 96: 215–225.
164. Vermeiren L, F Devlieghere, I Vandekinderen and J Debevere. 2006. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiol* 23: 511–518.
165. Waldherr FW, VM Doll, D Meissner, RF Vogel. 2010. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol* 27: 672-678.
166. Wang SY, HC Chen, JR Liu, YC Lin and MJ Chen. 2008. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. *J Dairy Sci* 91: 3798–3805.
167. Wang SY, KN Chen, YM Lo, ML Chiang, HC Chen and JR Liu. 2012. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiol* 32: 274–285.
168. Wang YF, GC Huo and LB Liu. 2004. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from kefir grains. *China Dairy Ind* 32: 17–19.
169. Wang YP, C Li, P Liu, A Zaheer, P Xiao and X Bai. 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr Polym* 82: 895–903.
170. Witthuhn RC, T Schoeman and TJ Britz. 2004. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *Int J Dairy Technol* 57: 33–37.

171. Witthuhn RC, T Schoeman and TJ Britz. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *Int Dairy J* 15: 383-389.
172. Wittwer CT, MG Herrmann, CN Gundry and Elenitoba- KSJ Johnson. 2001. Realtime multiplex PCR assays. *Methods* 25: 430–442.
173. Wouters JTM, EHE Ayad, J Hugenholtz and G Smit. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int Dairy J* 12: 91–109.
174. Yüksekdağ ZN, Y Beyath and B Aslim. 2004a. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung/ Food* 48: 218-220.
175. Yüksekdağ ZN, Y Beyatli and B Aslim 2004b. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensm Wiss Technol* 37: 663-667.
176. Zanirati SBF, JrM Abatemarco, SHC Sandes, JR Nicoli, AC Nunes, E Neumann. 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32: 70-76.
177. Zullo BA & G Ciafardini. 2008. Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiol* 25: 970 - 977.

# Παράρτημα Ι

**Πίνακας 15: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης & ποιοτικού ελέγχου του DNA των βακτηρίων και των ζυμών, που απομονώθηκαν από τους κόκκους ζαχαρούχου κεφίρ.**

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	A260/280	A260	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μL)	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	A260/280	A260	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μL)
LQC 1985	2.161	1.226	612	LQC 10201	2.200	0.354	178
LQC 1986	2.172	1.211	606	LQC 10202	2.162	0.243	119
LQC 1987	2.103	1.557	776	LQC 10203	2.500	0.249	123
LQC 1988	1.753	1.465	731	LQC 10204	2.246	0.254	128
LQC 1989	2.142	1.431	716	LQC 10205	2.222	0.258	130
LQC 1990	2.148	1.511	755	LQC 10206	2.208	0.381	191
LQC 1991	2.145	1.491	746	LQC 10207	2.183	0.309	155
LQC 1992	2.098	1.517	758	LQC 10208	2.144	0.225	112
LQC 1993	2.137	1.494	749	LQC 10209	2.241	0.120	60,5
LQC 1994	2.092	1.570	785	LQC 10210	2.217	0.301	204
LQC 1995	2.144	1.537	768	LQC 10212	2.250	0.125	63
LQC 1996	2.149	1.346	672	LQC 10213	2.248	0.252	127
LQC 1997	2.169	1.221	611	LQC 10214	2.223	0.249	125
LQC 1998	2.141	1.364	682	LQC 10215	2.195	0.189	95,5
LQC 1999	2.045	1.509	754	LQC 10216	2.176	0.509	254
LQC 2000	2.157	1.164	583	LQC 10218	2.196	0.731	364
LQC 2001	2.108	1.556	778	LQC 10219	1.996	0.446	223
LQC 2002	2.165	0.695	348	LQC 10220	2.232	0.346	173
LQC 2003	2.198	1.019	511	LQC 10221	2.204	0.605	302
LQC 2004	2.151	1.454	727	LQC 10222	2.226	0.393	197
LQC 2005	2.105	1.548	774	LQC 10223	2.190	0.414	207
LQC 2006	2.145	1.393	697	LQC 10224	2.242	0.408	204
LQC 2007	2.163	1.301	650	LQC 10225	2.210	0.365	365
LQC 2008	2.129	1.558	778	LQC 10226	2.207	0.256	128
LQC 2009	2.161	1.260	630	LQC 10227	2.223	0.348	174
LQC 2010	2.160	0.929	464	LQC 10228	2.221	0.473	237
LQC 2011	2.140	1.579	788	LQC 10229	2.205	0.452	226
LQC 2012	2.125	1.462	731	LQC 10230	2.201	0.371	186
LQC 2013	2.162	1.364	682	LQC 10231	2.211	0.756	378
LQC 2014	2.128	1.383	689	LQC 10232	2.182	0.288	144
LQC 2015	2.074	1.531	755	LQC 10233	2.196	0.494	247
LQC 2016	2.060	1.548	768	LQC 10234	2.225	0.484	242
LQC 2017	2.145	1.323	658	LQC 10235	1.177	0.796	392
LQC 2018	2.106	1.339	668	LQC 10236	2.162	1.402	700
LQC 2019	2.088	1.482	738	LQC 10237	2.186	1.350	650
LQC 2020	2.079	1.416	700	LQC 10238	2.115	1.489	745
LQC 2021	2.139	1.571	784	LQC 10239	2.176	1.314	656

LQC 2022	2.052	1.505	751	LQC 10240	2.144	1.474	736
LQC 2023	2.089	1.526	762	LQC 10241	2.170	1.250	625
LQC 2024	2.100	1.530	764	LQC 10242	2.059	1.357	679
LQC 2025	2.110	1.496	746	LQC 10243	2.081	1.337	668
LQC 2026	2.123	1.287	641	LQC 10244	2.175	1.332	667
LQC 2027	2.066	1.442	715	LQC 10245	2.136	1.232	614
LQC 2028	2.050	1.459	725	LQC 10246	2.171	1.381	690
LQC 2029	2.145	1.068	532	LQC 10247	2.156	1.023	511
LQC 2030	2.064	1.529	760	LQC 10248	2.182	0.720	610
LQC 2031	2.112	1.097	547	LQC 10249	2.147	1.272	634
LQC 2032	2.107	1.404	700				
LQC 2033	2.061	1.393	692				
LQC 2034	2.073	1.371	681				
LQC 10167	2.220	0.535	268				
LQC 10168	2.208	0.477	239				
LQC 10169	1.796	0.540	264				
LQC 10170	2.201	0.373	186				
LQC 10171	2.215	0.515	258				
LQC 10172	2.201	0.427	214				
LQC 10173	2.232	0.712	356				
LQC 10174	2.215	0.432	216				
LQC 10175	2.211	0.732	366				
LQC 10176	2.190	0.450	255				
LQC 10177	2.207	0.790	394				
LQC 10178	2.267	0.600	320				
LQC 10179	2.115	0.330	165				
LQC 10180	2.124	0.600	300				
LQC 10181	2.146	0.279	143				
LQC 10182	2.130	0.329	164				
LQC 10183	2.164	0.237	119				
LQC 10184	2.077	0.250	120				
LQC 10185	2.167	0.295	150				
LQC 10186	2.137	0.284	146				
LQC 10187	2.163	0.265	133				
LQC 10188	2.183	0.178	89,5				
LQC 10189	2.125	0.264	139				
LQC 10190	2.204	0.214	108				
LQC 10191	2.211	0.313	157				
LQC 10192	2.159	0.270	136				
LQC 10193	2.177	0.269	135				
LQC 10194	2.206	0.364	182				
LQC 10195	2.216	0.428	215				
LQC 10196	2.228	0.282	142				
LQC 10197	2.210	0.368	185				

LQC 10198	2.213	0.361	182			
LQC 10199	2.216	0.459	231			
LQC 10200	2.215	0.525	263			

Πίνακας 16: Λιπολυτικά στελέχη 1ης & 2ης μεθόδου\*.

	Βακτήρια			Ζύμες		
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>K. marxianus</i>
<b>ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ</b>	1985	1992	2009	10167	10217	10172
	1986	1993	2010	10168	10235	10173
	1986	1994	2011	10169	10236	10174
	1987	1995	2012	10170	10237	10175
	1988	1996	2013	10171	10238	10176
	1989	1997	2014	10181	10239	10177
	1990	1998	2015	10184	10240	10178
	1991	1999	2016	10185	10241	10179
		2000	2017	10186	10243	10182
		2001	2021	10191	10244	10187
		2002	2022	10192	10249	10188
		2003	2023	10193		10189
		2004	2024	10196		10245
		2005	2025	10197		10246
		2006	2026	10198		10247
		2007	2032	10199		10248
		2008		10200		

\*Τα στελέχη ζυμών και βακτηρίων ανήκουν στην Τράπεζα LQC.



### 3. ΓΕΥΣΗ (αδύναμη → έντονη/δυνατή)

- ΟΞΙΝΗ/ΣΤΥΦΗ \_\_\_\_\_→

Το όξινο γάλα προσδίδει στην άκρη της γλώσσας ένα ξεφλούδισμα ή τσούξιμο, ενώ αφήνει τόσο τη γλώσσα, όσο και το στόμα, με μια γενική αίσθηση «καθαριότητας» ή μια αυξημένη ικανότητα γεύσης.

- ΦΡΟΥΤΩΔΗΣ \_\_\_\_\_→

Ανιχνεύεται γρήγορα και εύκολα από την γεύση της, η οποία μπορεί να μοιάζει με ξινή ή το ξίδι (που έχει υποστεί ζύμωση) ή τον ανανά, τα μήλα ή άλλα φρούτα (φρουτώδες).

- ΓΛΥΚΙΑ \_\_\_\_\_→
- ΑΛΜΥΡΗ \_\_\_\_\_→
- ΠΙΚΡΗ \_\_\_\_\_→

Εντοπίζεται καλύτερα στη βάση της γλώσσας (πίσω από το στόμα), και αυτή η αίσθηση γεύσης τείνει να παραμείνει για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα.

- ΚΡΕΜΩΔΗΣ/  
ΓΑΛΑΚΤΩΔΗΣ \_\_\_\_\_→
- ΜΑΓΕΙΡΕΜΕΝΗ \_\_\_\_\_→
- ΣΚΟΡΔΟ/  
ΚΡΕΜΜΥΔΙ \_\_\_\_\_→

Οι ελαττωματικές γεύσεις στο γάλα, "σκόρδο" και "κρεμμύδι" αναγνωρίζονται από τη χαρακτηριστική πικάντικη οσμή και μια κάπως επίμονη επίγευση. Συχνά, μια τέτοια γεύση συνοδεύεται από μια πικρή επίγευση.

- ΕΛΛΕΙΨΗ  
ΦΡΕΣΚΑΔΑΣ \_\_\_\_\_→

Το γάλα με αυτή τη γεύση δείχνει μια απώλεια εκείνων των λεπτών, ευχάριστων ιδιοτήτων γεύσης που συνήθως σημειώνονται σε άριστο ή υψηλής ποιότητας γάλα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια αντιληπτή ελαφριά γεύση «chalky», που ίσως θυμίζει ανασυσταμένο ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά, είναι ένας τρόπος να περιγραφεί αυτή τη γεύση.

- ΒΥΝΗ \_\_\_\_\_→

Μια γεύση βύνης στο γάλα είναι συνήθως είτε καθορισμένης είτε έντονης έντασης, και είναι αρκετά ενδεικτική της βύνης. Είναι συχνά πρόδρομος του όξινου ή ξινού γάλακτος.

- ΤΑΓΓΗ \_\_\_\_\_→

Η αντιληπτή αίσθηση πρέπει να υποδηλώνει πικρή και ενδεχομένως ακάθαρτη γεύση. Όταν το δείγμα απομακρύνεται από το στόμα, η πικρία (ή τάγγιση) τείνουν να εξασθενίζουν μόνο σταδιακά, και μπορεί να εμφανιστεί στυπτικότητα ή τραχύτητα της εσωτερικής επιφάνειας στο στόμα.

- ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ \_\_\_\_\_ →  
(ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑ)

Η οξειδωμένη γεύση χαρακτηρίζεται από (1) μια «γρήγορη» αντίδραση γεύσης όταν το δείγμα τοποθετείται στο στόμα και (2) σχετικά σύντομο χρόνο προσαρμογής.

- ΓΕΥΣΗ \_\_\_\_\_ →  
ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ

Ορισμένες ζωοτροφές, προσδίδουν αρωματικές ιδιότητες στο γάλα εάν τροφοδοτούνται σε αγελάδες εντός ενός κρίσιμου χρονικού πλαισίου, πριν από το άρμεγμα.

#### 4. ΥΦΗ & ΑΙΣΘΗΣΗ ΣΤΟ ΣΤΟΜΑ (ανεπαίσθητη → αισθητή)

- ΑΙΣΘΗΣΗ \_\_\_\_\_ →  
ΤΣΙΜΠΗΜΑΤΟΣ

Παρόμοια με αυτή που προκαλείται από το ανθρακούχο μεταλλικό νερό.

- ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ \_\_\_\_\_ →  
("density")

Το πάχος των δειγμάτων στο στόμα.

- ΚΡΕΜΩΔΗΣ \_\_\_\_\_ →

Κρεμώδης - βελούδινη / μαλακή αίσθηση στο στόμα (όχι λιπαρή / λιπαρή).

- ΟΜΑΛΟΤΗΤΑ \_\_\_\_\_ →  
("smoothness")

Η έκταση, στην οποία τα δείγματα έχουν μια ομοιόμορφη συνέπεια (απουσία οποιουδήποτε κόκκου).

- ΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ \_\_\_\_\_ →  
ΣΤΟΜΑΤΟΣ

Αίσθηση λεπτού στρώματος που καλύπτει την στοματική κοιλότητα.

- ΛΙΠΑΡΗ \_\_\_\_\_ →  
ΑΙΣΘΗΣΗ

Λιπαρή αίσθηση στο στόμα που παρατηρήθηκε μετά την κατάποση.

- ΚΟΛΛΩΔΗΣ \_\_\_\_\_ →

## **5. ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**



### **ΣΧΟΛΙΑ/ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

--