

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**  
**ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ"**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι και Κρητική Στάκα:**  
**Μελέτη φυσικοχημικών ιδιοτήτων και ταυτοποίηση άγριων**  
**στελεχών ζυμών**

**Σωτήριος Γ. Κορομηλάς**



**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**  
**Ε. ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ, 2018**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι και Κρητική Στάκα: Μελέτη  
φυσικοχημικών ιδιοτήτων και ταυτοποίηση άγριων στελεχών  
ζυμών

**Σωτήριος Γ. Κορομηλάς**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
Ε. ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ, 2019**

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι και Κρητική Στάκα: Μελέτη φυσικοχημικών ιδιοτήτων και ταυτοποίηση άγριων στελεχών ζυμών»

ΣΩΤΗΡΙΟΣ Γ. ΚΟΡΟΜΗΛΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ευθυμία Τσακαλίδου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Τσακαλίδου Ευθυμία**, Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *Επιβλέπουσα*.
- 2) **Δροσινός Ελευθέριος**, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *Μέλος*.
- 3) **Πανάγου Ευστάθιος**, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *Μέλος*.

*Αφιερωμένο στον παππού μου που αποτέλεσε πρότυπο στη ζωή μου και μέσα από  
αυτόν έμαθα να προσπαθώ συνεχώς να γίνομαι καλύτερος άνθρωπος.*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Με το πέρας της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και φτάνοντας στο τέλος του μεταπτυχιακού μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριζαν σε όλη την πορεία μου αυτά τα χρόνια.*

*Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που μου έδειξαν, τη συνεχή βοήθεια και ανοχή καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και στα νέα μέλη της οικογένειας, τις δυο ανιψιές μου Κατερίνα και Θεοδώρα, που μου δίνουν δύναμη να συνεχίσω να.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας αυτής, κα. Έφη Τσακαλίδου, για την στήριξη, κατανόηση και βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας τόσο στο πειραματικό κομμάτι όσο και στη συγγραφή της, καθώς και τις συνεχείς συμβουλές της όσον αφορά τον επαγγελματισμό, τους στόχους που πρέπει να θέτω και πώς αυτοί θα επιτευχθούν.*

*Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Μαρίνα Γεωργαλάκη, για την άψογη συνεργασία, την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε όσον αφορά το πειραματικό κομμάτι και την συγγραφή της εργασίας. Η βοήθεια της υπήρξε καθοριστική τόσο στο πρακτικό όσο και στο ψυχολογικό κομμάτι, καθώς επίσης και τις κες Ράνια Αναστασίου, Ευγενία Μανωλοπούλου και Γεωργία Ζουμποπούλου για το χρόνο που μου αφιέρωσαν και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.*

*Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ελευθέριο Δροσινό και τον κ. Ευστάθιο Πανάγου, οι οποίοι ήταν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την συνεργασία, την καθοδήγηση και το χρόνο τους, καθώς και όλους τους καθηγητές για*

*τις πολύτιμες γνώσεις που μας παρείχαν και τα εφόδια ώστε οι φοιτητές να σταθούν στο επαγγελματικό αλλά και στο ερευνητικό κομμάτι.*

*Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στους φίλους μου, τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν στις χαρές και τις λύπες. Μαζί τους δημιούργησα αναμνήσεις που θα μου μείνουν αξέχαστες και παρόλο ο καθένας μας χαράζει τη δική του πορεία πάντα θα είμαστε δίπλα ο ένας στον άλλο.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής μελέτης ήταν η εξέταση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των παραδοσιακών γιουρτιών και Κρητικής Στάκας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα γιουρτιού και 5 δείγματα Κρητικής Στάκας. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λίπος, υγρασία και τέφρα καθώς επίσης και ως προς τα οργανικά οξέα με τη μέθοδο HPLC. Τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων συμβάδιζαν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών όπως ήταν αναμενόμενο. Η HPLC έδειξε πως τα κύρια σάκχαρα και οργανικά οξέα ήταν η λακτόζη, η γαλακτόζη καθώς και το γαλακτικό οξύ. Οι πρωτεΐνες των γιαουρτιών κυμάνθηκαν γενικά σε υψηλότερα επίπεδα από αυτές της Κρητικής Στάκας.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση άγριων στελεχών ζυμών οι οποίες απομονώθηκαν από είδη Κρητικής Στάκας και γιαουρτιού. Μετά την ταυτοποίησή τους οι ζύμες εξετάστηκαν ως προς ορισμένες βιοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων. Οι ζύμες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ήταν οι *Geotrichum candidum*, *Galactomyces geotrichum*, *Pichia fermentans*, *Pichia fermentans*, *Candida zeylanoides*, *Dipodascus australiensis*, *Geotrichum candidum*, *Galactomyces candidum*, *Kazachstania barnettii* και *Pichia fermentans*. Όσον αφορά στις βιοχημικές ιδιότητες, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι ζύμες ήταν αρνητικές ως προς τη πρωτεολυτική και εστερολυτική δράση ενώ θετικές βρέθηκαν τρεις ζύμες στην παραγωγή λιπάσης και μία στο καταβολισμό του κιτρικού οξέος.

**Λέξεις Κλειδιά: Γιούρτι, Κρητική Στάκα, ζύμες, Βιοχημικές Ιδιότητες, PCR**

## ABSTRACT

The purpose of this postgraduate diplomatic study was to examine the physicochemical properties of traditional yogurts and Cretan Stakas. For this reason 5 samples of yogurts and 5 samples of Cretan Staka were used. The samples were tested for protein, fat, moisture and ash content, as well as for organic acids and sugars by the HPLC method. The results of physicochemical analyzes coincided with the results of other studies as expected. HPLC method showed that the main sugars and organic acids were lactose, galactose and lactic acid. The proteins of the yogurts generally ranged at higher levels than those of the Cretan Staka.

Additionally, the identification of wild yeast strains that have been isolated from Cretan Staka and yogurt samples was carried out. After their identification, the yeasts were examined for some biochemical properties they may influence the organoleptic characteristics of the products. The yeasts identified were *Geotrichum candidum*, *Galactomyces geotrichum*, *Pichia fermentans*, *Pichia fermentans*, *Candida zeylanoides*, *Dipodascus australiensis*, *Geotrichum candidum*, *Galactomyces candidum*, *Kazakhstania barnettii* and *Pichia fermentans*. Concerning the biochemical properties, the results showed that the yeasts were negative for proteolytic and esterilytic activity, while three yeasts were found positive for the production of lipase and one for the catabolism of citric acid.

**Keywords: Yogurt, Cretan Staka, Yeasts, Biochemical Properties, PCR**



## **Κατάλογος Πινάκων**

**Πίνακας 2.1** Δείγματα παραδοσιακών γιατιών

**Πίνακας 2.2** Δείγματα Κρητικής Στάκας

**Πίνακας 2.3** Πληροφορίες απομονωθέντων ζυμών

**Πίνακας 2.4** Αντιδραστήρια *ger*-PCR

**Πίνακας 2.5** Αντιδραστήρια ITS PCR

**Πίνακας 3.1** Πληροφορίες και χαρακτηριστικά των απομονωθέντων ζυμών

**Πίνακας 3.2** Αναλυτικά αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών ζυμών μετά την ενίσχυση της ITS περιοχής με τη χρήση του προγράμματος BLAST

**Πίνακα 3.3** Αναλυτικά αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων

**Πίνακας 3.4** Ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών ανά δείγμα

**Πίνακας 3.5** Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε δείγματα γιαούρτης και Στάκας

**Πίνακας 3.6** Αποτελέσματα υγρασίας δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

**Πίνακας 3.7** Αποτελέσματα υγρασίας δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

**Πίνακας 3.8** Αποτελέσματα λίπους δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

## Κατάλογος εικόνων

**Εικόνα 1.1** Παραδοσιακό πρόβειο γιαούρτι

**Εικόνα 1.2** Κρητική Στάκα

**Εικόνα 2.1** Εμβολιασμός σε υγρό θρεπτικό μέσο

**Εικόνα 2.2** Εμβολιασμός τρυβλίων

**Εικόνα 2.3** Διαδικασία χρώσης Gram

**Εικόνα 2.4** Μηχάνημα PCR

**Εικόνα 2.5** Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας

**Εικόνα 2.6** Τοποθέτηση καψών σε αποτεφρωτήρα

**Εικόνα 2.7** Βουτυρόμετρο Gerber – Van Gulik

**Εικόνα 3.1** Παρατήρηση ζυμών μικροσκοπικά με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού.

**Εικόνα 3.2** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της REP PCR

**Εικόνα 3.3** Δενδρόγραμμα της ανάλυσης κατά συστάδες των 14 στελεχών ζυμών, με βάση το ποσοστό ομοιότητας και τη χρήση του προγράμματος Bionumerics

**Εικόνα 3.4** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS PCR

**Εικόνα 3.5** Θετικό στέλεχος ΣΑ 169 *Geotrichum candidum* και *Galactomyces geotrihum* στην παραγωγή λιπάσης

## Κατάλογος Σχημάτων

**Σχήμα 1.1** Διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακού γιαουρτιού

**Σχήμα 1.2** Συγκρότημα παραγωγής του γιαουρτιού συμπαγούς ή στερεάς δομής (set yoghurt) (Bylund,1995)

**Σχήμα 1.3** Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαουρτιού συμπαγούς ή στερεάς δομής (Bylund,1995)

**Σχήμα 1.4** Διάγραμμα ροής παραγωγή αναδευμένου γιαουρτιού (Bylund,1995).

**Σχήμα 1.5** Διάγραμμα ροής παραγωγής ξινήs Κρέμαs

**Σχήμα 3.1** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 1

**Σχήμα 3.2** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 2

**Σχήμα 3.3** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 3

**Σχήμα 3.4** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 4

**Σχήμα 3.5** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 5

**Σχήμα 3.6** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 1

**Σχήμα 3.8** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 3

**Σχήμα 3.7** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 2

**Σχήμα 3.9** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 4

**Σχήμα 3.10** Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 5

## Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Ζυμωμένα Τρόφιμα.....	13
1.2 Γαλακτοκομικά προϊόντα.....	14
1.3 Γιαούρτη .....	15
1.3.1 Παραδοσιακή γιαούρτη.....	18
1.3.2 Στραγγισμένη γιαούρτη .....	20
1.3.3 Βιομηχανική γιαούρτη .....	21
1.4 Κρητική Στάκα.....	23
1.5 Οξυγαλακτικά Βακτήρια.....	26
1.6 Ζύμες.....	27
1.6.1 Ταξινόμηση ζυμομυκήτων και ταυτοποίηση ειδών .....	28
1.6.2 Μοριακή κατανόηση των ζυμών .....	28
1.6.3 Ο ρόλος των ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	29
1.6.4 Οι ζύμες στο γιαούρτι .....	32
1.6.5 Ζύμες σε κρέμα, βούτυρο και άλλα μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα ....	35
1.7 Σκοπός μελέτης.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1 Προέλευση δειγμάτων .....	37
2.2 Ενεργοποίηση ζυμών .....	39
2.3 Έλεγχος καθαρότητας ζυμών.....	40
2.4 Απομόνωση DNA .....	43
2.5 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο της rep-PCR .....	45
2.6 Ταυτοποίηση των ζυμών με ITS PCR .....	49
2.7 Βιοχημικές ιδιότητες των ζυμών .....	52
2.7.1 Πρωτεολυτική δραστηριότητα.....	52
2.7.2 Εστερολυτική δραστηριότητα.....	52

2.7.3 Παραγωγή λιπάσης .....	54
2.7.4 Ξυλανολυτική ενεργότητα .....	55
2.7.5 Πηκτινολυτική δράση .....	55
2.8 Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά δειγμάτων γιαούρτης και Κρητικής Στάκας .....	56
2.8.1 Ανάλυση HPLC δειγμάτων γιαούρτης και Κρητικής Στάκας .....	56
2.8.2 Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl.....	58
2.8.3 Προσδιορισμός οξύτητας και pH.....	58
2.8.4 Προσδιορισμός υγρασίας.....	59
2.8.5 Προσδιορισμός τέφρας .....	59
2.8.6 Προσδιορισμός λίπους.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	63
3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών.....	63
3.2 Μοριακή Ανάλυση δειγμάτων και ταυτοποίηση ζυμών .....	65
Πίνακα 3.3 Αναλυτικά αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων .....	71
3.2 Αποτελέσματα φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.....	73
3.2.1 Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC.....	72
3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldhal .....	81
3.2.3 Υγρασία .....	82
3.2.4 Τέφρα.....	83
3.2.5 Λίπος.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	86

# Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ζυμωμένα Τρόφιμα

Περίπου 5.000 διαφορετικά ζυμωμένα είδη διατροφής παρασκευάζονται και καταναλώνονται από δισεκατομμύρια ανθρώπων διαφορετικών εθνοτήτων παγκοσμίως. Στα είδη αυτά συγκαταλέγονται γαλακτοκομικά προϊόντα, αρτοσκευάσματα, σούπες, σάλτσες, τουρσιά, προϊόντα κρέατος και ιχθυρών, αλκοολούχα και μη αλκοολούχα ποτά. Οι ποικιλίες των ζυμωμένων τροφίμων και ποτών καθορίστηκαν από τη διαθεσιμότητα των πρώτων υλών, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ διαμόρφωσαν και τις γευστικές προτιμήσεις των κατοίκων κάθε περιοχής. Προοδευτικά, δημιουργήθηκε η πεποίθηση ότι τα ζυμωμένα τρόφιμα και ποτά όχι μόνο έχουν ιδιαίτερη θρεπτική αξία, αλλά και θεραπευτική, μια πεποίθηση που οδήγησε στην τόνωση της δημοτικότητας και της κατανάλωσής τους. Η ζύμωση ενσωματώθηκε ως καθημερινή διαδικασία κυρίως σε κοινωνίες μικρής κλίμακας, όπως οι επαρχιακές πόλεις και τα χωριά. Στη Μεσογειακή Ευρώπη αφορά το ψωμί της εβδομάδας και το κρασί της χρονιάς, στην Κεντρική Ευρώπη το ξινολάχανο και τα σαλάμια, στη Μέση Ανατολή το γιαούρτι και τον τραχανά, στην Κίνα το τόφου (πήγμα του «γάλακτος» της σόγιας) και τις διάφορες σάλτσες. Στις κοινωνίες αυτές, οι γνώσεις και οι δεξιότητες που σχετίζονται με τις μεθόδους ζύμωσης των οικείων τροφίμων και ποτών μεταλαμπαδεύτηκαν από γενιά σε γενιά (Dugan, F.M., 2009).

Τα περισσότερα ζυμωμένα τρόφιμα παρασκευάζονται μέσω αλκοολικής ή/και γαλακτικής ζύμωσης. Κατά την αλκοολική ζύμωση από τους υδατάνθρακες της πρώτης ύλης (σιτηρών, φρούτων, λαχανικών, καρπών, μελιού, γάλακτος) παράγεται αιθυλική αλκοόλη. Αυτή η μορφή ζύμωσης βρίσκει καθολική εφαρμογή σε όλο τον κόσμο. Η αλκοολική ζύμωση των σπόρων του σιταριού και του κριθαριού αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα για τον τρόπο, με τον οποίο ορισμένα τρόφιμα αναδεικνύονται σε βασικά είδη διατροφής εφόσον βελτιωθούν ως προς το περιεχόμενό τους σε θρεπτικά συστατικά (Dufour, J. et al., 2003). Από τη ζύμωση του κριθαριού, με τη βοήθεια μιας καλλιέργειας εκκίνησης (μαγιάς), παρασκευάζεται η μπίρα. Αλλά, και η παρασκευή ψωμιού βασίζεται στην αλκοολική ζύμωση των σιτηρών, όμως, στην περίπτωσή του, συντίθενται μόνο μικρές ποσότητες αιθυλικής

αλκοόλης. Εκτός της παραγωγής αιθανόλης, η ζύμωση προκαλεί και μια σειρά από επιθυμητές αλλαγές στη σύσταση της πρώτης ύλης. Στην περίπτωση του αλευριού, από μη απαραίτητα αμινοξέα συντίθενται ορισμένα απαραίτητα αμινοξέα, περιορίζεται η δράση των τανινών (εξασφαλίζοντας καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα των περιεχόμενων ιχνοστοιχείων, όπως του σιδήρου και του ψευδαργύρου), ενώ μειώνεται και το περιεχόμενο σε φυτικό οξύ, το οποίο παρεμποδίζει την απορρόφηση ασβεστίου. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως οι ίδιες ζύμες μπορεί να χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση διαφορετικών τροφίμων. Για παράδειγμα, στην Κύπρο, χρησιμοποιώντας το προζύμι που είχαν για να ζυμώνουν το ψωμί, οι νοικοκυρές έφτιαχναν και τη μούγκρα, ένα είδος τουρσιού από κουνουπίδι, καταφέρνοντας έτσι να το διατηρήσουν επί πολλούς μήνες.

## **1.2 Γαλακτοκομικά προϊόντα**

Το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση γενικά παρασκευάζεται από ένα τυποποιημένο μίγμα πλήρους ή μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος, συμπυκνωμένο αποβουτυρωμένο γάλα, κρέμα γάλακτος ή / και μη λιπαρό ξηρό γάλα. Το γιαούρτι προκύπτει μετά από πήξη αποκλειστικά και μόνο νωπού γάλακτος της αντίστοιχης προς την ονομασία φύσης και προέλευσης, με την επίδραση καλλιέργειας ζύμης που προκαλεί ειδική γι' αυτό ζύμωση. Το γιαούρτι θα πρέπει να περιέχει λίπος και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) σε ποσοστό ανώτερο κατά 10% τουλάχιστον (Κ.Τ.Π. 2010). Η ξινή κρέμα παρασκευάζεται από 18% λιπαρά συστατικά με τη συμπλήρωση μερικών μη λιπαρών στερεών γάλακτος για την βελτίωση της υφής. Πολλά τυριά παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα τυποποιημένο με αναλογία λίπους: στερεών άνευ λίπους. Τα πρότυπα ταυτότητας που θεσπίζονται από τις ρυθμιστικές αρχές κάθε χώρας εξασφαλίζουν στον καταναλωτή ένα συγκεκριμένο προϊόν.

Όλες οι γαλακτοκομικές πρώτες ύλες θα πρέπει να επιλέγονται για υψηλή βακτηριολογική και αισθητηριακή ποιότητα. Υπάρχει μια γενική διαδικασία για τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση με όλα τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν σύμφωνα με τη νομοθεσία κάθε χώρας.

### 1.3 Γιαούρτη

Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της γιαούρτης πρέπει να μην περιέχει αντιβιοτικά και άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (π.χ. απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του εξοπλισμού), τα οποία παρεμποδίζουν την κανονική ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης.

Η γιαούρτη προκύπτει από τη γαλακτική ζύμωση της λακτόζης από τα θερμοφιλά οξυγαλακτικά βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* που δρουν συνεργιστικά. Η λακτόζη ζυμώνεται παράγοντας γαλακτικό οξύ το οποίο μειώνει το pH. Όταν το pH φτάσει στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (pH 4,6) προκαλεί την όξινη πήξη και τη δημιουργία του πήγματος γιαούρτης (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Οι θερμοκρασίες συντήρησης του γιαουρτιού κυμαίνονται μεταξύ 2 και 5 °C. Για να περιοριστούν οι ενζυμικές αλλαγές στο ελάχιστο πρέπει να χρησιμοποιείται ως θερμοκρασία συντήρησης αυτή των 0 °C. Αν οι θερμοκρασίες είναι άνω των 5 °C επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών επιμόλυνσης που είναι κυρίως ζύμες και μύκητες.

Η διάρκεια συντηρήσεως της γιαούρτης μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 6 εβδομάδες και αυτό εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

1. Τη θερμοκρασία συντήρησης.
2. Τη τιμή του pH στο τέλος της επώασης
3. Τις επιμολύνσεις από ψυχρότροφους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα από ζύμες και μύκητες που περιορίζουν κατά πολύ τον χρόνο συντήρησης.
4. Τη μέθοδο παραγωγής και το είδος συσκευασίας. Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών δίνει ενδεικτικό χρόνο συντήρησης 15 ημερών.

Η παρασκευή γιαούρτης έχει τις ρίζες της στην Βαλκανική χερσόνησο και στην Μέση Ανατολή. Για τους κατοίκους των περιοχών αυτών η παραγωγή προϊόντων από την ζύμωση του γάλακτος ήταν γνωστή από παλιά ως φυσική-απλή



γιαούρτη χωρίς ζάχαρη. Η κατά κεφαλήν ετήσια κατανάλωση γιαούρτης και προϊόντων της είναι υψηλή σε όλες τις Βαλκανικές περιοχές και στη Βουλγαρία, ειδικότερα, η κατανάλωση γιαούρτης και προϊόντων της αντιστοιχεί σε 31.5 kg ανά άτομο το χρόνο. Μετά το 1950 η γιαούρτη και τα προϊόντα της έγιναν γνωστά και στα υπόλοιπα μέρη του κόσμου (Δυτική Ευρώπη, Αμερική, Ωκεανία) (Tamine and Robinson, 1999).

Οι κυριότεροι τύποι γιαούρτης που έχουν γίνει γνωστοί σε παγκόσμια κλίμακα είναι η συμπαγής (στερεή- συνεκτική- set type), η αναδευμένη (ημίρρευση –stirred type) καθώς επίσης και το στραγγιστό γιαούρτι.

Πολύ γνωστός τύπος γιαούρτης ιδιαίτερα στην Ελλάδα είναι το λεγόμενο “παραδοσιακό γιαούρτι” το οποίο παρασκευάζεται με την πήξη του γάλακτος με την προσθήκη μιας καλλιέργειας (συνήθως την ίδια τη γιαούρτη της προηγούμενης παρτίδας), η οποία περιέχει έναν συγκεκριμένο, εντυπωσιακά υψηλό αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία για να φτάσει η γιαούρτη στην τελική μορφή προς κατανάλωση θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προδιαγραφές:

- 1) να είναι συμπαγής, όχι πορώδης και η επιφάνεια της μάζας της, εκτός από τον υμένα, να παρουσιάζει την όψη αλάβαστρου.
- 2) η γιαούρτη που πωλείται σε δοχεία πρέπει να καλύπτεται πάντα με φύλλο αδιάβροχο χαρτί ή άλλα από τα επιτρεπόμενα είδη.
- 3) απαγορεύεται η πώληση γιαούρτης που έχει αντιληπτό ίζημα. Σε περίπτωση που κατά την εξέταση, διαπιστωθεί τέτοιο ίζημα, πρέπει με μικροσκοπική εξέταση να διευκρινιστεί αν αυτό οφείλεται σε ξένες ουσίες ως προς τη γιαούρτη.
- 4) απαγορεύεται η πώληση γιαούρτης που έχει υποστεί και κάποια άλλη ζύμωση, εκτός από την ειδική γι' αυτό.
- 5) απαγορεύεται η διάθεση στην κατανάλωση γιαούρτης, της οποίας οι οργανοληπτικές ιδιότητες δεν είναι κανονικές και ευχάριστες.

- 6) απαγορεύεται η προσφορά για πώληση και η διάθεση γενικά στην κατανάλωση, γιαούρτης χρωματισμένης με οποιαδήποτε χρωστική ή με κάποιο άλλο μέσο.
- 7) απαγορεύεται η διάθεση στην κατανάλωση γιαούρτης που περιέχει συντηρητικές ουσίες γενικά.
- 8) απαγορεύεται η παρασκευή και διάθεση στην κατανάλωση γιαούρτης που παρασκευάστηκε από διατηρημένο γάλα γενικά, με εξαίρεση το αποστειρωμένο γάλα και το γάλα κατάψυξης.
- 9) απαγορεύεται η διάθεση στην κατανάλωση γιαούρτης που περιέχει ζάχαρη.

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1977a) ως γιαούρτη χαρακτηρίζεται το "πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με γαλακτική ζύμωση του γάλακτος με τη δράση του *Lactobacillus bulgaricus* και του *Streptococcus thermophilus*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι στο τελικό προϊόν άφθονοι και ζωντανοί". Η παρουσία αυτών των γαλακτικών βακτηρίων στη γιαούρτη προστατεύει τον καταναλωτή από την πιθανή ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην υγεία του (Ζερφυρίδης, 2001)

Τα βασικότερα χαρακτηριστικά του τυποποιημένης γιαούρτης σύμφωνα με τον FAO/WHO, (1977a) είναι τα εξής:

- Χαμηλό pH (περίπου 4,5-4,7)
- Υψηλή οξύτητα (90-100 OD ή 0,7-1,2% εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ)
- Χαρακτηριστική γεύση και άρωμα τα οποία οφείλονται στη δράση των οξύγαλακτικών βακτηρίων (γαλακτικό οξύ, ακεταλδεΐδη και διακετύλιο)
- Χαρακτηριστικός τύπος πήγματος
- Παρουσία ζωντανών βακτηριακών κυττάρων σε πληθυσμούς άνω των  $10^7$  κυττάρων/γραμμάριο.

### 1.3.1 Παραδοσιακή γιαούρτη

Η ελληνική παραδοσιακή γιαούρτη με επιδερμίδα (πέτσα) παρασκευάζεται από βρασμένο πρόβειο γάλα, χωρίς προηγούμενη τυποποίηση και ομογενοποίηση. Μετά το βρασμό το γάλα διαμοιράζεται σε κυτία, όπου παραμένει χωρίς ανάδευση προκειμένου να δημιουργηθεί στην επιφάνεια του η χαρακτηριστική στοιβάδα λιποσφαιρίων (επιδερμίδα). Όταν η θερμοκρασία φθάσει τους 45 °C, ανασηκώνεται η επιδερμίδα ελαφρά και γίνεται εμβολιασμός με ορισμένη ποσότητα γιαούρτης που παρασκευάστηκε την προηγούμενη ημέρα ("μαγιά") και αποτελεί την καλλιέργεια εκκίνησης. Ακολουθεί η επώαση και η ψύξη (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

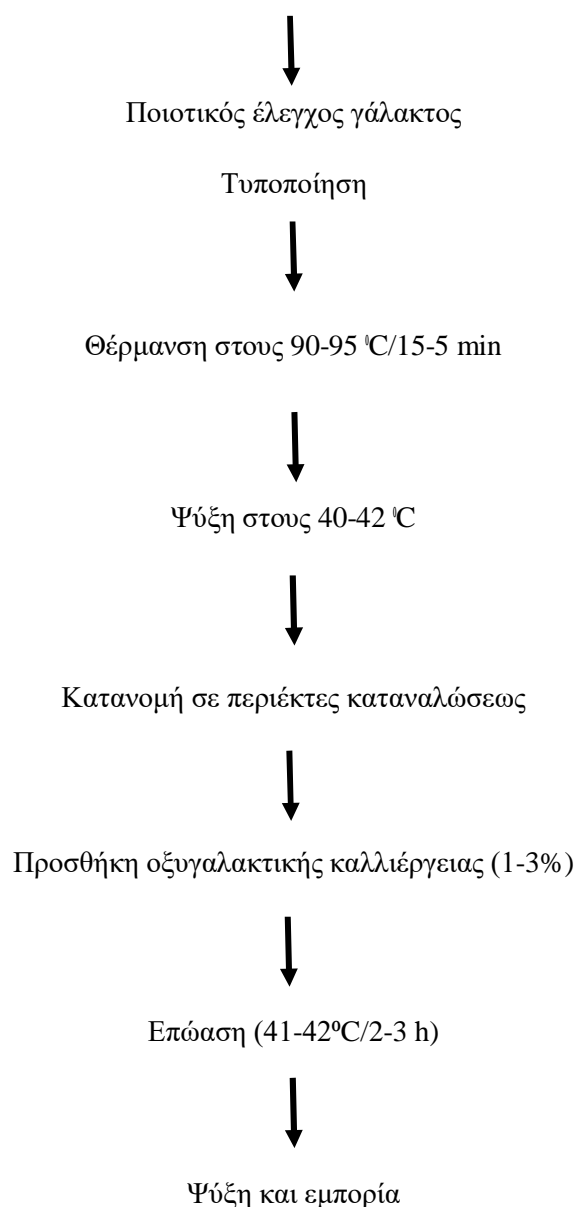


**Εικόνα 1.1** Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη

Η τεχνολογία παρασκευής παραδοσιακής γιαούρτης διαμορφώθηκε μέσα από την εμπειρία χλιετιών και είναι περίπου η ίδια στους περισσότερους λαούς. Η χρησιμοποίηση γιαούρτης της προηγούμενης ημέρας, ως μαγιά για την παρασκευή καινούργιας με συχνά ασταθή χαρακτηριστικά είναι μειονέκτημα. Από άποψη υγιεινής, εάν το γάλα θερμαίνεται επαρκώς, όπως απαιτείται, εξυγιαίνεται από τους επικίνδυνους για τη Δημόσια Υγεία μικροοργανισμούς, οι οποίοι προέρχονται από τα ζώα. Γενικά όμως οι συνθήκες παραγωγής υστερούν σε υγιεινή και υπάρχει κίνδυνος

επιμολύνσεων από τα σκεύη, το προσωπικό και το περιβάλλον.

Η Γαλακτοβιομηχανία έχει τηρήσει τη βασική τεχνολογία, αλλά έχει εκσυγχρονίσει τα στάδια παραγωγής (Σχήμα 1.1) με αυτοματοποίηση και βελτίωση των συνθηκών υγιεινής και εμφάνισης του προϊόντος.



**Σχήμα 1. 1** Διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακού γιαουρτιού

### 1.3.2 Στραγγισμένη γιαούρτη

Στραγγισμένη γιαούρτη χαρακτηρίζεται το προϊόν, το οποίο λαμβάνεται από πλήρης γιαούρτη, μετά από απομάκρυνση (αποστράγγιση) μέρους του νερού του με τα διαλυμένα σ' αυτό συστατικά. Αυτό πρέπει να περιέχει λίπος σε ποσοστό 8% τουλάχιστον, με εξαίρεση τη στραγγισμένη γιαούρτη αγελάδας, η οποία πρέπει να περιέχει λίπος σε ποσοστό 5% τουλάχιστον (Κ.Τ.Π., 2003). Πρόκειται για γιαούρτη με αυξημένη αναλογία στερεών συστατικών (23-25%). Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τον παραδοσιακό τρόπο της στράγγισης του πηγματος μέσα σε υφασμάτινους σάκκους είτε με σύγχρονη τεχνολογία όπως η φυγοκέντρωση του πηγματος ή η συμπύκνωση του γάλακτος με υπερδιήθηση πριν από την πήξη του (Μάντης, 2000).

α) Στραγγισμένη σακούλας: Το γάλα πήζει σε δεξαμενές, το πήγμα ψύχεται και τοποθετείται σε υφασμάτινους σάκκους (15-20 kg). Οι σάκκοι τοποθετούνται σε ανοξείδωτες λεκάνες, ο ένας πάνω στον άλλο για καλύτερη στράγγιση, η οποία διαρκεί από 8-16 ώρες και πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία 0-5 °C. Ο ορός που αποβάλλεται περιέχει κυρίως λακτόζη, άλατα και ελάχιστες αζωτούχες ενώσεις. Μετά την συμπλήρωση της στράγγισης, το περιεχόμενο των σάκκων αδειάζεται σε ειδικό ζυμωτήριο και εκεί γίνεται η μηχανική ζύμωση της γιαούρτης και η τυποποίησή της με προσθήκη, εάν απαιτείται, παστεριωμένης κρέμας ή παστεριωμένου ορού.

β) Στραγγισμένη με φυγοκέντρωση: Μετά την πήξη το πήγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση, σε ειδικού τύπου διαχωριστήρες, οπότε αποβάλλεται μέρος του ορού και έτσι επιτυγχάνεται η παραγωγή πηγματος με αυξημένη αναλογία στερεών.

γ) Συμπυκνωμένη με υπερδιήθηση: Το γάλα αποβουτυρώνεται και θερμαίνεται στους 90- 95 °C/10-5 min. Ψύχεται σε θερμοκρασία 47-50 °C και συμπυκνώνεται με σύστημα υπερδιηθήσεως (ultrafiltration) έως το μισό του αρχικού του όγκου.

Κατά την υπερδιήθηση χρησιμοποιούνται μεμβράνες οι οποίες κατακρατούν το λίπος και τις πρωτεΐνες, αλλά αφήνουν να διαφεύγει στο διήθημα η λακτόζη, τα άλατα και οι μη πρωτεϊνικές φύσεως αζωτούχες ουσίες.

Η συμπύκνωση του γάλακτος με την τεχνική της αντίστροφης ώσμωσης παρόλο που αυξάνει την απόδοση, δημιουργεί άλλα προβλήματα λόγω αυξημένου ποσοστού λακτόζης και αλάτων στο τελικό προϊόν, γι' αυτό και δεν χρησιμοποιείται για την παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού (Tamime και Robinson, 1999).

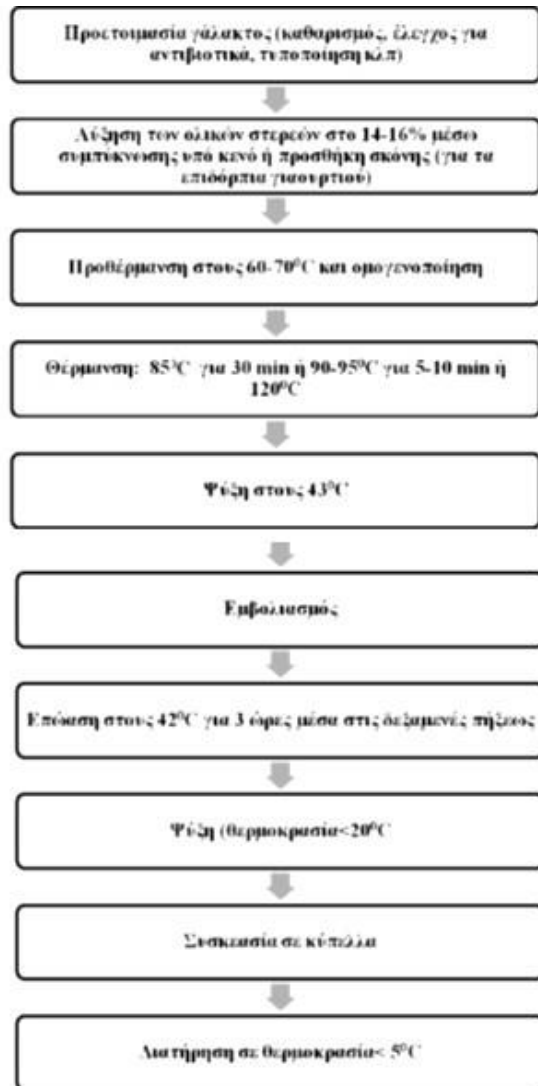
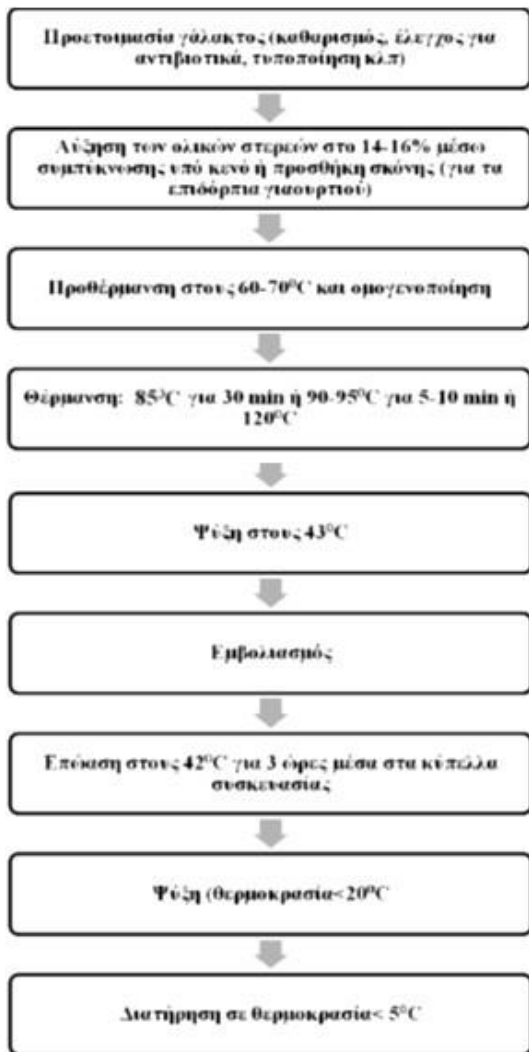
### 1.3.3 Βιομηχανική γιαούρτη

Υπάρχουν δυο τύποι βιομηχανικής γιαούρτης. Η πρώτη είναι η συμπαγής ή στερεάς δομής (set), και η δεύτερη είναι η αναδευμένη (stirred). Οι διαφορές των δύο τύπων έγκεινται κυρίως στη συνεκτικότητα και την τεχνολογία παρασκευής (Robinson et al., 2006).

Η συμπαγής γιαούρτη είναι ο τύπος γιαούρτης που έχει επικρατήσει στη χώρα μας και παράγεται είτε ως φυσική είτε συνοδευόμενη από φρούτα (επιδόρπιο γιαούρτης). Η ομογενοποίηση του γάλακτος δεν επιτρέπει το σχηματισμό υμενίου λιποσφαιρίων (πέτσα) στην επιφάνεια. Η συσκευασία γίνεται σε ερμητικώς κλειστά κύπελλα, όπου γίνεται και η επώαση. Αντίθετα η αναδευμένη γιαούρτη συσκευάζεται μετά την επώαση, αφού έχει ψυχθεί (Robinson et al., 2006).

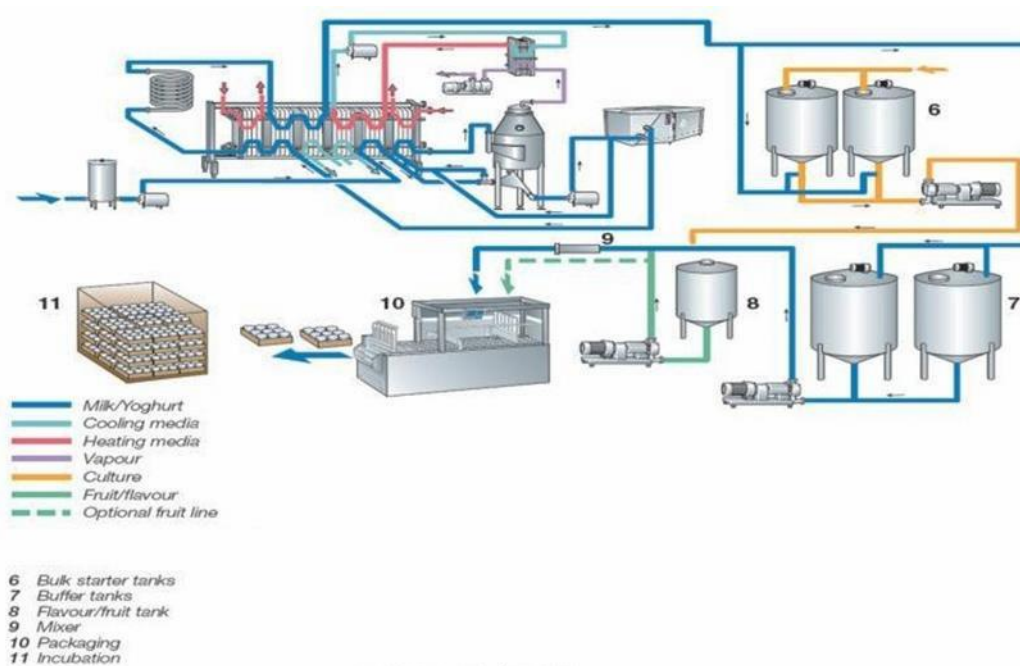
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα διαγράμματα ροής της συμπαγούς ή στερεάς δομής γιαούρτης και της αναδευμένης γιαούρτης αντίστοιχα.

Επιπλέον στο σχήμα εμφανίζονται και τα συγκροτήματα παραγωγής των δυο τύπων βιομηχανικού γιαουρτιού.



**Σχήμα 1.2** Συγκρότημα παραγωγής της γιαούρτης συμπαγούς ή στερεάς δομής (set yoghurt) (Bylund,1995)

**Σχήμα 1.3** Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαούρτης συμπαγούς ή στερεάς δομής (Bylund,1995)



Σχήμα 1.4 Διάγραμμα ροής παραγωγής αναδευμένης γιαούρτης (Bylund,1995).

## 1.4 Κρητική Στάκα

Η Κρητική Στάκα είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο κατατάσσεται στις ζυμωμένες ξινές κρέμες. Η τσίπα (κρέμα) του γάλακτος από το άρμεγμα αλατίζεται ελαφρά και φυλάσσεται. Όταν μαζευτεί ικανοποιητική ποσότητα ζεσταίνεται σε χαμηλή φωτιά για αρκετές μέρες και προστίθεται μικρή ποσότητα αλευριού, έτσι χωρίζουν οι πρωτεΐνες από το λίπος. Το λίπος μαζεύεται χωριστά και είναι το περίφημο στακοβούτυρο ενώ η άσπρη και πηκτή μάζα των πρωτεϊνών αποτελεί τη στάκα. Είναι γνωστό Κρητικό έδεσμα το οποίο μαγειρεύεται με αβγά, με μακαρόνια, πιλάφι ή και σε πίτες, ενώ καταναλώνεται και ωμό υπό μορφή τυροσαλάτας. Λόγω της έλλειψης βιβλιογραφικών αναφορών που αφορούν τη Στάκα, το συγκεκριμένο προϊόν αντιμετωπίστηκε ως ζυμωμένη ξινή κρέμα.





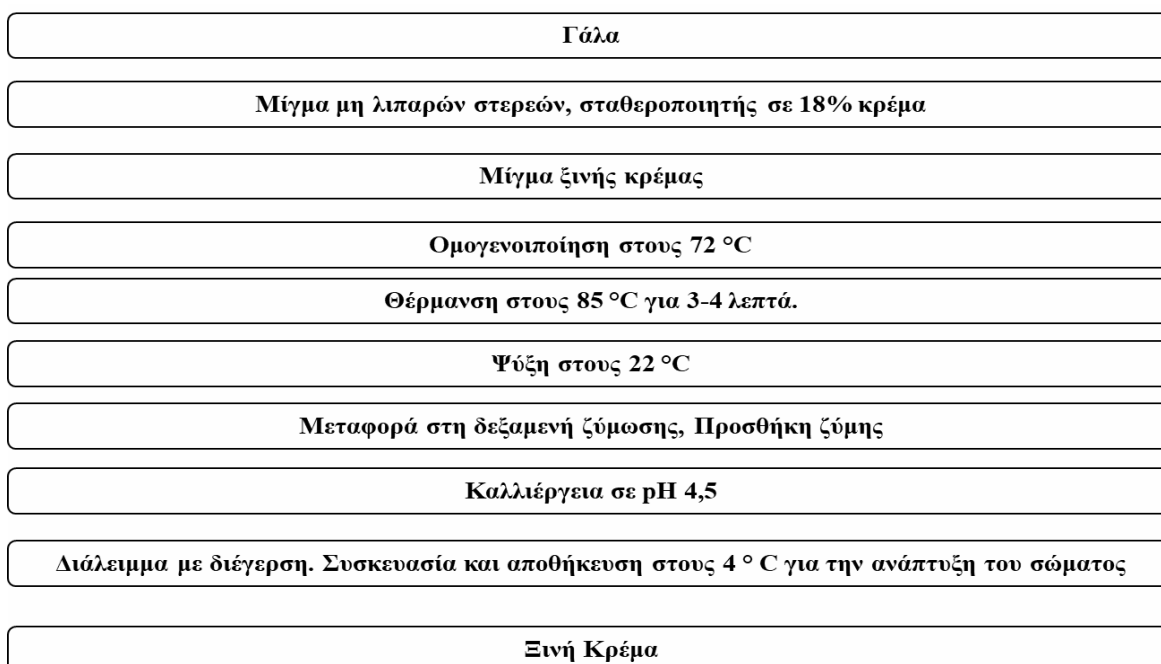
**Εικόνα 1.2** Κρητική Στάκα

Η ζυμωμένη κρέμα (ή ξινή κρέμα) παράγεται από την ωρίμανση παστεριωμένης κρέμας με περιεκτικότητα σε λίπος 18% με οξυγαλακτικά βακτήρια και βακτήρια που παράγουν άρωμα. Ο FDA έχει ορίσει την ξινή κρέμα γάλακτος στο τμήμα 131.160 (CFR, 2011): “Η ξινή κρέμα είναι αυτή που παράγεται από ξήρανση, από οξυγαλακτικά βακτήρια, από παστεριωμένη κρέμα”. Η περιεκτικότητα σε λίπος γάλακτος ξεκινά από 18%. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορεί να είναι χαμηλότερη όταν το τρόφιμο χαρακτηρίζεται από την προσθήκη θρεπτικών γλυκαντικών ή ογκωδών αρωματικών συστατικών, το βάρος του λίπους γάλακτος δεν είναι μικρότερο από 18 τοις εκατό του υπολοίπου, που προκύπτει αφαιρώντας το βάρος τέτοιων προαιρετικών συστατικών από το βάρος της τροφής, αλλά δεν μπορεί να πέσει κάτω από 14,4 %. Η ξινή κρέμα πρέπει να έχει τιτλοδοτημένη οξύτητα τουλάχιστον 0,5 %, εκφρασμένο σε γαλακτικό οξύ. Προαιρετικά συστατικά περιλαμβάνουν σταθεροποιητές για τη βελτίωση της υφής και την αποφυγή απώλειας ορού. Οι σταθεροποιητές συμβάλλουν στη διατήρηση του σώματος και βελτιώνει τη διάρκεια ζωής. Επιπλέον, το κιτρικό νάτριο μπορεί να προστεθεί ως πρόδρομος γεύσης σε ποσότητα μέχρι 0,1% w/v. Αλάτι, πυτιά, και αρωματικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων των γλυκαντικών και των προϊόντων φρούτων επιτρέπονται.

Τα ζυμωτικά βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ ώστε να δημιουργήσουν μία όξινη πηκτή και αρωματική γεύση βουτύρου (διακέτυλο). Ο εκκινητής για ζυμωμένη

κρέμα μπορεί να είναι ο *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και/ή *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Το άρωμα οφείλεται στους *Leuconostoc mesentoides* subsp. *cremoris* και/ή *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Οι γαλακτόκοκκοι χρησιμοποιούν την λακτόζη για να παράγουν έως και 0,8% γαλακτικό οξύ με μια ομογενοποιητική ομοζυμωτική οδό, ενώ οι παραγωγοί αρώματος είναι ετεροζυμωτικοί. Παράγουν D -γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO<sub>2</sub> από λακτόζη. Η τυπική γεύση της ξινής κρέμας αποδίδεται στο διακετύλιο, το οποίο παράγεται από κιτρικό άλας. Οι *Leuconostoc* ανάγουν την ακεταλδεΐδη σε αιθανόλη. Η ακεταλδεΐδη δίνει στη γιαούρτη τη χαρακτηριστική γεύση (γεύση πράσινου μήλου), ενώ αυτή η γεύση είναι ανεπιθύμητη στην ξινή κρέμα. Ορισμένα στελέχη λακτοκόκκων παράγουν εξωπολυσακχαρίτες που δημιουργούν ιξώδες. (Goddik, 2012)

Η ζυμωμένη κρέμα χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα σε ψημένες πατάτες και άλλα ζεστά πιάτα. Η υφή της ξινής κρέμα πρέπει να διατηρηθεί σε ζεστά πιάτα. Χρησιμοποιείται ως επικάλυψη στα λαχανικά, τις σαλάτες, τα ψάρια, τα κρέατα και τα φρούτα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γέμιση σε κέικ ή σε σούπες αντί του βουτυρογάλακτος ή της γλυκιάς κρέμας. Μπορεί να αφυδατωθεί με ξήρανση με ψεκασμό και να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό όπου χρειάζεται γεύση.



**Σχήμα 1.5** Διάγραμμα ροής παραγωγής ξινής Κρέμας

## 1.5 Οξυγαλακτικά Βακτήρια

Στο βουτυρόγαλα και την ξινή κρέμα το ιξώδες μπορεί να είναι αρκετά υψηλό από την ανάπτυξη γαλακτόκοκκων που έχουν εγκλεισθεί σε κάψουλες, που παράγουν λάσπη. Επιπροσθέτως, το διακετύλιο μπορεί να αναχθεί με διακέτυλο αναγωγή που παράγεται σε αυτά τα προϊόντα με λακτόκοκκους που αναπτύσσονται στους 7 °C (Hogarty & Frank, 1982), καταλήγοντας σε γεύση τύπου γιαουρτιού.

Τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια όπως οι λακτοβάκιλλοι όλοι? και ο *Leuconostoc* μπορούν να αναπτύξουν αρώματα και αέρια σε ωριμασμένα τυριά. Αυτά τα μικρόβια μεταβολίζουν τη λακτόζη και στη συνέχεια παράγουν γαλακτικό, οξικό, αιθανόλη και CO<sub>2</sub> σε περίπου ισομοριακές συγκεντρώσεις (Hutkins, 2001). Η ανάπτυξή τους ευνοείται από εκείνη των ομοζυμωτικών βακτηρίων καλλιέργειών εκκίνησης όταν η ωρίμανση γίνεται στους 15 °C αντί για τους 8 °C (Cromie, Giles, & Dulley, 1987). Όταν τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια αποτυγχάνουν να μεταβολίσουν όλα τα ζυμωμένα σάκχαρα σε ένα τυρί, τα βακτήρια που είναι συχνά παρόντα συμπληρώνουν τη ζύμωση, παράγοντας αέρια και αρώματα, εφόσον οι πληθυσμοί τους είναι 10<sup>6</sup> cfu/g (Johnson, 2001). Η υπολειμματική γαλακτόζη στο τυρί είναι ένα παράδειγμα ενός υποστρώματος το οποίο πολλά ετεροζυμωτικά βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν και να παράγουν αέρια. Επιπρόσθετα, οι προαιρετικοί λακτοβάκιλλοι μπορούν να μεταβολίσουν το κιτρικό και γαλακτικό οξύ και να παράγουν CO<sub>2</sub> (Fryer, Sharpe, & Reiter, 1970, Laleye, Simard, Lee, Holley, & Giroux, 1987). Ο καταβολισμός αμινοξέων στο τυρί από μη αρχική καλλιέργεια, φυσικώς απαντώμενα σε λακτοβάκιλλους, προπιονοβακτήρια και τον *Lactococcus lactis subsp. lactis* μπορεί να παράγει μικρές ποσότητες αερίου σε τυριά (Martley & Crow, 1993). Ρωγμές σε τυριά μπορεί να συμβούν όταν παράγεται περίσσεια αερίου από ορισμένα στελέχη *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus helveticus* που σχηματίζουν CO<sub>2</sub> και 4-αμινοβουτυρικό οξύ με την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμικού οξέος (Zoon & Allersma, 1996).

Ο μεταβολισμός της τυροσίνης από ορισμένους λακτοβάκιλλους προκαλεί αποχρωματισμό ροζ έως καφέ σε ωριμασμένα τυριά. Η αντίδραση αυτή εξαρτάται

από την παρουσία οξυγόνου στην επιφάνεια του τυριού (Shannon, Olson, & Deibel, 1977). Το ρακεμικό μείγμα των L (+) και D (-) - γαλακτικών οξέων που σχηματίζει ένα λευκό κρυσταλλικό υλικό σε επιφάνειες τυριών Cheddar και Colby παράγεται από τη συνδυασμένη ανάπτυξη των καλλιιεργειών εκκίνησης από λακτόκοκκους και των μη εναρκτηρίων καλλιιεργητών παραγωγών γαλακτικού οξέος. Τα τελευταία ρακεμοποιούν τη μορφή L (+) του οξέος στην μορφή L (-), τα οποία σχηματίζουν κρυστάλλους (Johnson, 2001).

## 1.6 Ζύμες

Παραδοσιακά, αλλά και από οικονομική άποψη, οι ζύμες είναι οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί που εκμεταλλεύεται ο άνθρωπος. Η χρήση ζυμομυκήτων εκτείνεται από την αρχή παραγωγής ψωμιού, ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, μπίρας, κρασιού και άλλων αλκοολούχων ποτών έως και σε άλλα προϊόντα, όπως αιθανόλη για καύσιμα, εκχυλίσματα ζύμης, χρωστικές, προβιοτικά και άλλες ειδικές ουσίες για τρόφιμα και ζωοτροφές, καθώς και βιοχημικά για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Ωστόσο, οι ζύμες παίζουν επίσης ρόλο ως οργανισμοί αλλοίωσης στα τρόφιμα και τα ποτά.

Αυτό το αρνητικό αποτέλεσμα συνδέεται με γνωστά φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ζυμών, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων τους και της αντίστασής τους έναντι των φυσικοχημικών δυσχερειών όσον αφορά τη διατήρηση των τροφίμων. Ως εκ τούτου, σε πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων και ποτών, πρέπει να δοθεί προσοχή στην ανεπιθύμητη μόλυνση ζύμης σε ολόκληρη τη παραγωγική διαδικασία από την πρώτη ύλη έως το τελικό προϊόν.

### 1.6.1 Ταξινόμηση ζυμομυκήτων και ταυτοποίηση ειδών

Ενώ η ταυτοποίηση νέων απομονώσεων ζυμομυκήτων κάποτε απαιτούσε την επίπονη ολοκλήρωση 80 έως 100 μορφολογικών, βιοχημικών και φυσιολογικών αναλύσεων, αυτό το έργο πλέον επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα με προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA. Οι αλληλουχίες DNA των γονιδίων που κωδικοποιούν την περιοχή D1/D2 της μεγάλης (26S) υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA είναι γνωστές για όλα τα είδη ζυμομυκήτων όπως επίσης και η αλληλουχία της ITS1-ITS2 περιοχής του rRNA, καθώς και άλλων γονιδίων. Αυτά τα φυλογενετικά δεδομένα αλληλουχίας οδήγησαν σε πλήρη αναθεώρηση της ταξινόμησης των ζυμών και στην περιγραφή πολλών νέων γενών και ειδών (Kurtzman & Fell, 2006). Αν και η αλληλούχηση των ριβοσωμικών γονιδίων είναι τώρα η αποδεκτή μέθοδος για την ταυτοποίηση της ζυμών, η ανάλυση πολυμορφισμού θραυσμάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism) της περιοχής ITS1-ITS2 είναι μια λιγότερο δαπανηρή και ταχύτερη εναλλακτική μέθοδος και οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν τα αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων έχουν καθοριστεί για τις ζύμες των τροφίμων (Fernandez-Espinar et al., 2006).

Οι μέθοδοι ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο έχουν περιγραφεί για ορισμένα είδη, όπως το *Saccharomyces cerevisiae*, το *Brettanomyces bruxellensis* και το *Zygosaccharomyces bailii* (Rawsthorne and Phister, 2006), και έχει αναφερθεί μια νέα κυτταρομετρική ανάλυση ανίχνευσης για διάφορες είδη του γένους *Candida* (Kurtzman & Fell, 2006).

### 1.6.2 Μοριακή κατανόηση των ζυμών

Καθώς οι ζύμες αναπτύσσονται σε τρόφιμα και ποτά, χρησιμοποιούν υποστρώματα άνθρακα και αζώτου και παράγουν μια τεράστια ποικιλία πτητικών και μη πτητικών μεταβολιτών που καθορίζουν τις ιδιότητες του προϊόντος και την ελκυστικότητά του προς τον καταναλωτή. Ορισμένες ζύμες παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεάσες, λιπάσες, αμυλάσες και πηκτινάσες που επίσης επηρεάζουν τη γεύση και την υφή του προϊόντος. Η βιοχημεία αυτών των αντιδράσεων και η σύνδεσή τους με

την ποιότητα του προϊόντος είναι γενικά γνωστές (Swiegers et al., 2005). Τώρα, οι γονιδιωματικές μελέτες που χρησιμοποιούν αλληλουχία, συστοιχία DNA και πρωτεωμικές αναλύσεις καθιστούν δυνατή τη σύνδεση αυτών των αποκρίσεων με την έκφραση και ρύθμιση των μεμονωμένων γονιδίων (Bond et al., 2006).

Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με ζυμομύκητες τροφίμων και ποτών, και αυτές έχουν δώσει ενδιαφέρουσες νέες ιδέες. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού και της μύρας, ο *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζει διαδοχική έκφραση και ρύθμιση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολισμό άνθρακα, αζώτου και θείου, καθώς και άλλα γονίδια που απαιτούνται για να ανεχθούν καταπονήσεις όπως υψηλή συγκέντρωση σακχάρου, χαμηλό pH, ανεπάρκεια αιθανόλης και θρεπτικών (Varela et al., 2005, Brejning et al., 2005). Οι γονιδιωματικές αναλύσεις δίνουν επίσης μοριακές εξηγήσεις για την αξιοσημείωτη αντοχή ορισμένων ζυμών στις ακραίες περιεκτικότητες σε αλάτι και ζάχαρη σε ορισμένα τρόφιμα (π.χ. *Debaryomyces hansenii* σε αλατούχα τυριά, *Zygosaccharomyces rouxii* σε σιρόπια ζάχαρης και συμπυκνώματα χυμού φρούτων) και σε συντηρητικά οργανικών οξέων σε άλλα τρόφιμα (π.χ. *Zygosaccharomyces bailii* σε σαλάτες και αναψυκτικά) (Peter, 2006).

### 1.6.3 Ο ρόλος των ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Οι ζύμες αποτελούν σημαντικό τμήμα της μικροχλωρίδας αρκετών γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς και άλλων τροφίμων και ποτών (Jakobsen and Narvhus, 1996). Αν και η χρήση τους για τον άνθρωπο ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι σχετικά περιορισμένη, οι ζύμες χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως προβιοτικά στις ζωοτροφές (Burnett and Neil, 1977). Για τη συγκεκριμένη εφαρμογή αξιοποιείται η βιομάζα ζύμης που περισσεύει από τις βιομηχανίες της ζυθοποιίας. Η προσθήκη ζυμών στην τροφή των ζώων έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη απόδοση και βελτιωμένη ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι ζύμες προστίθενται συνήθως στις τροφές των βοοειδών, των χοίρων καθώς και των πουλερικών (Lyons et al., 1993). Η ζύμη που έχει μελετηθεί περισσότερο για τις προβιοτικές της ιδιότητες είναι ο *Saccharomyces boulardii*. Ο *Saccharomyces*

*boulardii* είναι μη παθογόνος ζύμη που απομονώθηκε από το φρούτο Lychee στην Ινδοκίνα τη δεκαετία του 1950 και από τότε χρησιμοποιείται τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία της διάρροιας (Kollaritsch et al., 1993; Mc Farland and Bernasconi, 1993; Saint-Marc et al., 1995) και της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας (Klein et al., 1993). Άλλες ζύμες που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές ως προβιοτικά είναι οι *Candida pintolopesii*, *Candida saitoana* και *Saccharomyces cerevisiae* (Bovill et al., 2001; Leuschner et al., 2004).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι η μαγιά που καλλιεργείται περισσότερο από κάθε άλλη και αποτελεί εδώ και χιλιάδες χρόνια βασικό συστατικό της αρτοποιίας. Η μαγιά κυκλοφορεί στο εμπόριο ως πιεστή μαγιά ή σε ξηρή μορφή. Στην Ευρώπη, για την παραγωγή της μαγιάς χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη μελάσα και πραγματοποιείται αερόβια ζύμωση του *Saccharomyces cerevisiae*. Κατά την αρτοποιία, η μαγιά μετατρέπει τα σάκχαρα του αλεύρου σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα το οποίο παγιδεύεται στη μάζα του ψωμιού με αποτέλεσμα τη διόγκωσή του (Olsson and Nielsen, 2000; Gül et al., 2005; Bekatorou et al., 2006). Επιπλέον, η ζύμη συμβάλλει στην παραγωγή αρωματικών συστατικών, κυρίως καρβονυλικών ενώσεων λόγω του καταβολισμού των αμινοξέων, και αποτελεί ποιος? πλούσια πηγή πρωτεϊνών και βιταμινών (Jahan et al., 2007). Άλλες ζύμες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ψωμιού με σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών είναι οι *Kluyveromyces marxianus* (Plessas et al., 2008; Dimitrellou et al., 2009), *C. lusitaniae* (Williams and Luksas, 1981), *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis* (Kusachi, 1981). Η χρήση διαφορετικών ζυμών μπορεί επίσης να επιταχύνει την αρτοποιία (Fernandes et al., 1985).

Οι ζύμες στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλους μικροοργανισμούς με τρεις διαφορετικούς τρόπους: i) μπορεί να αναστείλουν ή να εξαλείψουν τους μικροοργανισμούς που είναι ανεπιθύμητοι επειδή προκαλούν ποιοτικά ελαττώματα ή διαθέτουν πιθανούς παθογόνους χαρακτήρες, ii) μπορούν να αναστείλουν την καλλιέργεια εκκίνησης, ή iii) μπορεί να συνεισφέρουν θετικά στη διαδικασία ζύμωσης ή ωρίμανσης υποστηρίζοντας τη λειτουργία της καλλιέργειας εκκίνησης.

Όσον αφορά την αναστολή ή την εξάλειψη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, έχει αναφερθεί, σε μελέτες με το *Debaryomyces hansenii* ότι αναστέλλει τη βλάστηση

του *Clostridium butyricum* και του *Clostridium tyrobutyricum*, ενδεχομένως εξαλείφοντας το γαλακτικό και οξικό οξύ στο τυρί (Deiana et al., 1984). Ο «παράγοντας δολοφόνος» (killer factor) (Young, 1987) έχει επίσης αποδειχθεί σε ζυμομύκητες που έχουν απομονωθεί από κάποια τυριά (Seiler, 1991) και με το ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα του (Polonelli & Morace, 1986, Brugier & Patte, 1975) μπορεί να επηρεάσει, ορισμένα βακτήρια και μούχλες συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών εκκίνησης. Όπως θα αναφερθεί αργότερα, η βιβλιογραφία δείχνει άλλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμομυκήτων και βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης της δέσμευσης παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια της ζύμης (Gedek, 1991). Αναφέρθηκε η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Mucor* στην επιφάνεια του Camembert από την κυρίαρχη χλωρίδα ζύμης (Siewert, 1986). Η παρεμπόδιση των μυκήτων *Penicillium roqueforti* και *Penicillium camemberti* από τις ζύμες δεν φαίνεται να έχει παρατηρηθεί. Εντούτοις, μπορεί να συμβεί και πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περιπτώσεις βραδείας ανάπτυξης των καλλιεργειών μυκήτων και εάν επιλέγονται ζυμομύκητες για χρήση ως αρχικές καλλιέργειες για τυριά.

Ο πιθανός ρόλος των θετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ζυμομυκήτων και των εναρκτήριων καλλιεργειών είναι καλά τεκμηριωμένος για τυριά που έχουν ωριμάσει επιφανειακά (Morris κ.ά., 1951, Hartley & Jezeski, 1954, Grieve et al., 1983, Noomen, 1983, Lenoir 1984, Siewert, 1986, Kaminarides & Anifantakis, 1989, Besancon et al., 1992, Hostin & Palo, 1992, Moreira da Silva et al., 1994). Η μικροβιακή διαδοχή στο επιφανειακό επίχρισμα ημι-μαλακών τυριών, όπως οι Limburger και Tilsit, είναι γνωστή, όπως ανασκοπείται από το Fleet (1990). Οι ζύμες, συχνά ο *Debaryomyces hansenii*, μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ, οδηγώντας σε αύξηση του pH και επιπροσθέτως εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες *Brevibacterium* απαραίτητους για την ωρίμανση αυτών των τυριών.

Οι ζύμες υποτίθεται ότι βοηθούν στην ανάπτυξη του *Penicillium roqueforti* με παραγωγή αερίου, οδηγώντας στο άνοιγμα του τυροπήγματος (Coghill, 1979) και έκκρισης θρεπτικών ουσιών.

Πολλοί ζυμομύκητες θα μπορούσαν να βοηθήσουν τις καλλιέργειες εκκίνησης σε τυριά με πρωτεολυτική δράση (Kalle et al., 1976 · Schmidt & Lenoir, 1980b · Grieve et al, 1983 · Siewert, 1986 · Besancon et al., 1992) al., 1976 · Alifax, 1979 · Schmidt & Lenoir, 1980b · Montet et al., 1985 · Muderhwa et al, 1985 · Besancon



et

al, 1992 · Siewert, 1986) και ενδεχομένως συμμετέχουν στην ωρίμανση και το σχηματισμό συστατικών αρώματος (Adda et al., 1982). Αυτές οι δραστηριότητες αναμένεται να ποικίλουν μεταξύ των απομονώσεων και ανάλογα με τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως αναφέρεται για την παραγωγή λιπασών από τον *P. roqueforti* (Petrovic κ.ά., 1990).

#### 1.6.4 Οι ζύμες στο γιαούρτι

Το γιαούρτι είναι ένα προϊόν γάλακτος που έχει υποστεί ζύμωση, το οποίο κατά παράδοση παρασκευάζεται επιτρέποντας στο γάλα να ξινίσει στους 40-45 °C. Η σύγχρονη παραγωγή γιαουρτιού είναι μια καλά ελεγχόμενη διαδικασία που χρησιμοποιεί συστατικά γάλακτος, σκόνης γάλακτος, ζάχαρης, φρούτων, γεύσεων, χρωστικών, γαλακτωματοποιητών και σταθεροποιητών και καθαρές καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων για τη διεξαγωγή της ζύμωσης.

Όταν παρασκευάζεται υπό συνθήκες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής, το γιαούρτι πρέπει να περιέχει λιγότερα από 10 κύτταρα ζυμομυκήτων/γραμμάριο (αλλά κατά προτίμηση λιγότερο από 1 cfu/gr) και, εάν ψύχεται στους 5 °C ή λιγότερο, δεν πρέπει να υπάρχει πιθανότητα αλλοίωσης από ζύμες (Davis 1970, 1975). Σε αυτές τις περιπτώσεις, αναμένεται διάρκεια ζωής 4 εβδομάδων και περιορίζεται από παράγοντες άλλους εκτός των ζυμομυκήτων. Το γιαούρτι που είναι μολυσμένο με ένα αρχικό φορτίο 100 ή περισσότερα κύτταρα ζυμομυκήτων/γραμμάριο πιθανώς θα χαλάσει καθώς πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα ζύμης. Η αλλοίωση γίνεται εμφανής όταν ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων φθάσει τα  $10^5$ - $10^6$  κύτταρα/γραμμάριο. Αρχικά, παρατηρείται ως διόγκωση της συσκευασίας γιαουρτιού λόγω της παραγωγής αερίου από την ζύμη. Τελικά, η συσκευασία ανοίγει και στο γιαούρτι τα προϊόντα των ζυμών προσδίδουν μία δυσάρεστη γεύση και οσμή (Suriyarachchi & Fleet 1981, Green & Ibe 1987). Περιστασιακά, παρατηρούνται αποικίες ζύμης στην κάτω επιφάνεια του καλύμματος της συσκευασίας.

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους τα γιαούρτια μολύνονται με ζύμες. Πρώτον, μπορεί να προέρχονται από μολυσμένα συστατικά όπως τα φρούτα,

τα καρύδια και το μέλι, τα οποία, προστίθενται στη βάση του γιαουρτιού που έχει υποστεί ζύμωση λίγο πριν τη συσκευασία. Δεύτερον, μπορούν να αναπτυχθούν ζυμομύκητες στις επιφάνειες του εξοπλισμού παραγωγής, όπως τα δοχεία ανάμειξης και οι μηχανές πλήρωσης, που δεν έχουν καθαριστεί και απολυμανθεί επαρκώς (Davis 1975, Suriyarachchi & Fleet 1981). Συνήθως, το γιαούρτι είναι απαλλαγμένο από ζυμομύκητες επειδή τα συστατικά ενδέχεται να έχουν ήδη αναμιχθεί και θερμανθεί περίπου στους 90 °C για 30 λεπτά. Η ανάπτυξη ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του μίγματος είναι πολύ απίθανη επειδή χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις εναρκτήριων καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων και επειδή η θερμοκρασία ζύμωσης 40-45 °C είναι περιοριστική για την ανάπτυξη των περισσότερων ειδών ζύμης. Η μόλυνση της καλλιέργειας εκκίνησης με τον *Kluyveromyces. marxianus*. μπορεί να δημιουργήσει έναν πιθανό κίνδυνο, καθώς αυτή η ζύμη μπορεί να αναπτυχθεί στη θερμοκρασία 40-45 °C και να ζυμώσει τη λακτόζη (Kreger-van-Rij 1984).

Δεν είναι ασυνήθιστο να βρεθούν πληθυσμοί ζυμομυκήτων της τάξης των  $10^3$  κυττάρων/ γραμμάριο ή περισσότερο σε δείγματα είτε απλών είτε γιαουρτιών φρούτων. Σε πολλές περιπτώσεις καταγράφηκαν  $10^6$ - $10^7$  cfu/gr (Van Uden & Carmo Sousa 1957, Green & Ibe 1987, Fleet & Mian 1987). Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για γιαούρτια λιανικής πώλησης στο Ηνωμένο Βασίλειο (Davis 1974, 1975) και στο Καναδά (Arnott et al., 1974) διαπίστωσαν ότι 20-30% των δειγμάτων είχαν αριθμό ζυμομυκήτων που υπερβαίνει τα  $10^3$  cfu/gr. Παρόμοιες έρευνες στην Πορτογαλία (van Uden & Carmo Sousa 1957), την Αυστραλία (Suriyarachchi & Fleet 1981, Fleet & Mian 1987) και τη Νιγηρία (Green & Ibe 1987) αποκάλυψαν πολύ υψηλότερη συχνότητα μόλυνσης που υπερβαίνει τα  $10^4$  cfu/gr. Οι μικρότεροι βαθμοί μόλυνσης αναφέρθηκαν για τα γιαούρτια στις ΗΠΑ (Kroger 1976, Hankin & Shields 1980) και τις Κάτω Χώρες (Hup & Stadhouders 1972). Τα γιαούρτια που αγοράστηκαν στην Ισπανία (Garcia & Fernandez 1984) και στη Σαουδική Αραβία (Salji et al., 1987) παρουσίασαν επίσης μόλυνση με ζύμες, αλλά δεν αναφέρθηκαν ποσοτικά στοιχεία.

Η ταυτοποίηση των ειδών ζύμης που βρέθηκαν στα γιαούρτια έχει πραγματοποιηθεί σε αρκετές μελέτες. Τα στελέχη που ζυμώνουν την λακτόζη, όπως ο *Torulopsis* spp. (Soulides 1956), *Candida pseudotropicalis* (van Uden & Carmo

Sousa 1957) και ο *Kluyveromyces. bulgaricus* (Dubois et al., 1980) φαίνεται να εμπλέκονται στην αλλοίωση των απλών γιαουρτιών. Τα είδη *Toremopsis candida*, *Torulopsis versatilis*, *Candida pelliculosa*, *Cattleya intermedia* και *Hansenula anomala* ήταν τα είδη που απομονώθηκαν συχνότερα από τα γιαούρτια στο Ηνωμένο Βασίλειο (Tillbury et al., 1974). Ο *Candida lusitaniae*, *Candida krusei* και ο *Kluyveromyces fragilis* ήταν το κύριο είδος που απομονώθηκε από 100 δείγματα γιαουρτιών που παράγονται στο Lagos της Νιγηρίας (Green & Ibe 1987). Σε μια έρευνα που περιελάμβανε 169 δείγματα γιαουρτιών στο Σίδνεϊ, τα είδη που απομονώθηκαν κατά φθίνουσα σειρά ήταν: *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* και *Candida diffluens* (Suriyarachchi & Fleet 1981, Fleet & Mian 1987). Καθένα από τα είδη ήταν ικανό να αποδείξει??? καλή ανάπτυξη (πληθυσμοί που υπερβαίνουν τα  $10^7$  κύτταρα / γραμμάριο) όταν εμβολιάστηκαν σε φρέσκα παρασκευασθέντα γιαούρτια και γιαούρτια με φρούτα και επώαστηκαν είτε στους 20 °C, 15 °C ή στους 5 °C. Στους 5 °C η καλύτερη ανάπτυξη παρουσιάστηκε από τους *Candida famata* και *Candida diffluens* που έφθασαν τα  $10^6$ - $10^7$  κύτταρα / γραμμάριο στις 9 ημέρες (Fleet & Mian 1987). Αυτοί οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση και η κυριαρχία συγκεκριμένων ειδών στα γιαούρτια σχετίζεται με την ικανότητα του είδους να:

- (1) αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (<10 °C) αποθήκευσης γιαουρτιού,
- (2) παράγουν λιπολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα για την υδρόλυση του λίπους και της πρωτεΐνης γάλακτος,
- (3) ζυμώνουν τη λακτόζη ή τη σακχαρόζη που είναι οι κύριοι υδατάνθρακες είτε απλών είτε αρωματισμένων γιαουρτιών αντίστοιχα, και
- (4) αφομοιώνουν τα γαλακτικά και κιτρικά οξέα τα οποία είναι τα κύρια οργανικά οξέα στο γιαούρτι.

Οι πιο διαδεδομένες ζύμες στα γιαούρτια, *Candida famata* και *Kluyveromyces marxianus*, ήταν θετικές για πολλές από αυτές τις ιδιότητες (Fleet & Mian 1987).

Ο έλεγχος της εμφάνισης και της ανάπτυξης των ζυμών στα γιαούρτια είναι απλός και υπακούει στις γενικές αρχές της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής. Τα

κρίσιμα σημεία για την παρακολούθηση είναι:

- i. η σωστή ανάμειξη και θέρμανση των συστατικών πριν από τη ζύμωση,
- ii. απουσία οξυγαλακτικών στην καλλιέργεια εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων
- iii. απουσία ζυμών (μη ανιχνεύσιμων σε 1,0 g) σε φρούτα και άλλα συστατικά που προστίθενται στη βάση ζυμωμένου γιαουρτιού
- iv. τακτικός, αποτελεσματικός καθαρισμός και εξυγίανση του εξοπλισμού επεξεργασίας, και
- v. ταχεία ψύξη του τελικού προϊόντος στους 5 °C και διατήρηση αυτής της θερμοκρασίας καθ' όλη τη διάρκεια του λιανικού εμπορίου (Davis 1975, Suriyarachchi & Fleet 1981).

Σε ορισμένες χώρες, η χρήση σορβικού ή βενζοϊκού οξέος ως συντηρητικών μπορεί να επιτρέπεται, αλλά αξίζει να σημειωθεί ότι δύο από τις κύριες ζύμες, *Candida famata* και *Kluyveromyces marxianus*, που βρίσκονται στα γιαούρτια, είναι ανθεκτικές σε αυτές τις ουσίες σε συγκεντρώσεις 500 mg / l (Fleet & Mian 1987).

### **1.6.5 Ζύμες σε κρέμα, βούτυρο και άλλα μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Ορισμένα άρθρα ανασκόπησης σχετικά με τη μικροβιολογία της κρέμας (Davis 1981) και το βούτυρο γενικά (Murphy 1981) κάνουν περιορισμένη αναφορά στις ζύμες ως δυνητικούς οργανισμούς αλλοίωσης. Παρ' όλα αυτά, ως ένα γενικό πρότυπο όσον αφορά τις ζύμες έχει γένει αποδεκτό αυτό πως υπάρχουν λιγότερα από 10 κύτταρα ζυμομυκήτων/g. Η αλλοίωση της κρέμας από τις ζύμες περιγράφεται καλά σε παλαιότερες όμως μελέτες, ειδικά εάν η κρέμα έχει υποστεί γλύκανση ή συστένωση. Συνήθως, η κρέμα γίνεται αφρώδης στην εμφάνιση και ζυμώδης στην οσμή από ζύμες οι οποίες είναι ικανές να ζυμώνουν την υπολειμματική λακτόζη στην κρέμα ή να υδρολύουν το λίπος, (Garrison 1959, Walker & Ayres 1970, Thomas 1970). Σε μια έρευνα με 21 δείγματα παστεριωμένης κρέμας που αγοράστηκαν στο Σίδνεϊ της Αυστραλίας, 48 % είχαν μετρήσεις ζυμομύκητα  $10^3$ - $10^4$  κύτταρα / ml και 14% εμφάνισαν μετρήσεις 104-105 κύτταρα/ml (Fleet & Mian 1987). Τα κύρια

απομονωθέντα είδη ήταν *Candida famata*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus diffluens*, *Cryp. laurentii* και *R. rubra*. Όπως αναμένεται, αυτά τα είδη παρουσίασαν καλή λιπολυτική δράση).

Λιπολυτικά είδη ζυμών, ειδικά αυτά της *Rhodotorula*, έχουν αναφερθεί ότι αναπτύσσονται στην επιφάνεια του βουτύρου (Walker & Ayres 1970; Thomas 1971), αλλά η επίπτωση αυτού του προβλήματος είναι πολύ χαμηλή. Ο Fleet & Mian (1987) δεν ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν καμία ζύμη σε 9 από 16 δείγματα βουτύρου που εξετάστηκαν. Τα εναπομείναντα δείγματα μετρήθηκαν και εμφάνισαν λιγότερο από  $10^3$  κύτταρα/g. Τα *Rhodotorula glutinis* και *R. rubra* ήταν τα κύρια είδη που υπήρχαν σε αυτά τα δείγματα.

## 1.7 Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής μελέτης ήταν η ταυτοποίηση άγριων στελεχών ζυμών οι οποίες απομονώθηκαν από δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας με στόχο τη διερεύνηση των βιοχημικών τους ιδιοτήτων καθώς και το ρόλο που διαδραματίζουν στα συγκεκριμένα είδη γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς για το προϊόν της Κρητικής Στάκας δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων Ελληνικής παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας, που είχε ως στόχο τη εξέταση της σύστασης των προϊόντων ως προς τα ποσοστά πρωτεΐνης, οργανικών οξέων και σακχάρων, υγρασίας, λίπους και τέφρας καθώς και του ελέγχου της ποιότητας τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Προέλευση δειγμάτων

Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αποτελούνταν από 5 διαφορετικά είδη παραδοσιακού γιαουρτιού και 5 είδη Κρητικής Στάκας από τις περιοχές των Χανίων και της Σητείας από τις οποίες οι Στάκες 1,2,3, και 5 ήταν εμπορικές, ενώ η Στάκα 4 ήταν σπιτική. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των παραδοσιακών γιαουρτιών και της Κρητικής Στάκας.

Πίνακας 2.1 Δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης

Όνομασία Δείγματος	Περιγραφή του Προϊόντος	Είδος Γάλακτος	Εναρκτήρια Καλλιέργεια
Παραδοσιακή Γιαούρτη 1	Παραδοσιακή γιαούρτη από πρόβειο και γίδινο γάλα με 6.7% λιπαρά	Πρόβειο γάλα πλήρες (min 90%) και γίδινο γάλα πλήρες (max 10%)	Οξυγαλακτική καλλιέργεια
Παραδοσιακή Γιαούρτη 2	Παραδοσιακή γιαούρτη από αγνό φρέσκο πρόβειο γάλα 100% Ελληνικό, με 6.6% λιπαρά, χωρίς συντηρητικά	Αγνό φρέσκο πρόβειο γάλα 100% Ελληνικό	Μαγιά γιαούρτης
Παραδοσιακή Γιαούρτη 3	Γιαούρτη, από 100% πρόβειο Ελληνικό γάλα, με 6.6% λιπαρά	100% Ελληνικό γάλα	Μαγιά γιαούρτης
Παραδοσιακή Γιαούρτη 4	Γιαούρτη παραδοσιακή από 100% φρέσκο Ελληνικό πρόβειο γάλα, με 6.6% λιπαρά	100% φρέσκο Ελληνικό γάλα	Δεν αναφέρεται
Παραδοσιακή Γιαούρτη 5	Γιαούρτη παραδοσιακή, από 100% φρέσκο Ελληνικό πρόβειο γάλα, με 6.6% Λιπαρά	Φρέσκο πρόβειο γάλα 100% Ελληνικό	Μαγιά γιαούρτης

**Πίνακας 2.2** Δείγματα Κρητικής Στάκας

<b>Ονομασία Δείγματος</b>	<b>Τόπος Προέλευσης</b>	<b>Είδος Γάλακτος</b>	<b>Ετικέτα</b>
<b>Στάκα 1</b>	Σφακιά, χανιά	Πρόβειο	500 γρ. Ανθόγαλο (Κρέμα Γάλακτος) Α ποιότητα. Παράγεται από πρόβειο γάλα. Ελάχιστο λίπος επί ξηρού 40%
<b>Στάκα 2</b>	Κεραμιά, Χανιά	Πρόβειο	Δεν αναφέρεται
<b>Στάκα 3</b>	Βαρύπετρο Κυδωνίας, Χανιά	Αιγοπρόβειο	Στάκα Ανθόγαλο Χανίων. Παράγεται από αιγοπρόβατα ελευθέρως βοσκής στα οροπέδια της Κρήτης Cretan Sheep & Goat Butter. Ελάχιστο λίπος επί ξηρού 55%, μέγιστη υγρασία 45%. Συστατικά: παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Περιέχει λακτόζη
<b>Στάκα 4</b>	Σπιτική Παλαιόκαστρο Σητείας	Αιγοπρόβειο	Δεν αναφέρεται
<b>Στάκα 5</b>	Χαμέζι Σητείας	Αιγοπρόβειο	Τυρί από κρέμα αιγοπρόβειου γάλακτος. Συστατικά Κρέμα γάλακτος αλεύρι ολικής άλεσης, αλάτι. Αλάτι 2%, λιπαρά 25%, καθαρό βάρος 270 γρ.

Όσον αφορά τις ζύμες, μελετήθηκαν 14 ζύμες οι οποίες απομονώθηκαν από δύο είδη Κρητικής Στάκας και ένα είδος γιαουρτιού σε προηγούμενες εργασίες των Σία Αλεξανδροπούλου (2017) και Κατερίνα Ζαρειφοπούλου (2017).

**Πίνακας 2.3** Στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν από δείγματα Κρητικής Στάκας (Σία Αλεξανδροπούλου, 2017) και παραδοσιακής γιούρτης (Κατερίνα Ζαρειφοπούλου, 2017)

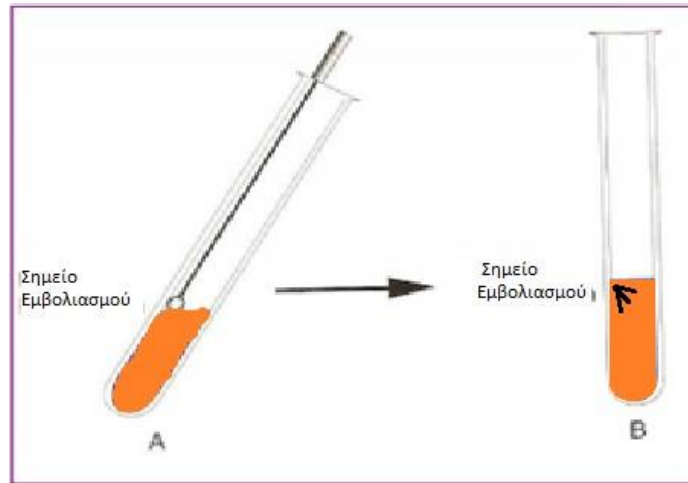
Α/Α	Αριθμός απομόνωσης	ACA-DC Αριθμός	Ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο (d)	Δείγμα	Συνθήκες απομόνωσης	Συνθήκες Ανάπτυξης			
1	ΣΑ39	5261	5	Στάκα 2	M17 30 °C	M17 30 °C			
2	ΣΑ88Α1	5262	2	Στάκα 2	PCA 7 °C	Nutrient Broth 21 °C			
3	ΣΑ91	5263	1	Στάκα 2	PCA 7 °C	Nutrient Broth 21 °C			
4	ΣΑ167	5265	1	Στάκα 3		YES 25 °C			
5	ΣΑ168	5266	2						
6	ΣΑ169	5267	1						
7	ΣΑ170	5268	1						
8	ΣΑ171	5269	1						
9	ΣΑ172	5270	2						
10	ΣΑ173	5271	2						
11	ΣΑ174	5272	2						
12	ΚΖ146	5273	1				Μπακού λας	YGC 25 °C	YES 30 °C
13	ΚΖ147	5274	1						
14	ΚΖ148	5275	1						

## 2.2 Ενεργοποίηση ζυμών

Οι ζύμες ήταν αποθηκευμένες στους -80 °C σε μικροφιαλίδια (vials) με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Growth (Biokar, France) με γλυκερόλη 20% v/v. Η γλυκερόλη λειτουργεί ωσμοπροστατευτικά αποτρέποντας τη λύση των κυττάρων και βοηθά στη διατήρηση της ζωτικότητάς τους.

Για την ενεργοποίηση και ανάπτυξη των ζυμών παρασκευάστηκε ένα υγρό θρεπτικό μέσο το YES Broth, στο οποίο εμβολιάστηκαν οι ζύμες, αφού αποψύχθηκαν, σε σωληνάκια που περιείχαν 5 ml από το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Οι ζύμες επώαστηκαν στους 25 °C για 48 ώρες ώστε να αναπτυχθούν επαρκώς.



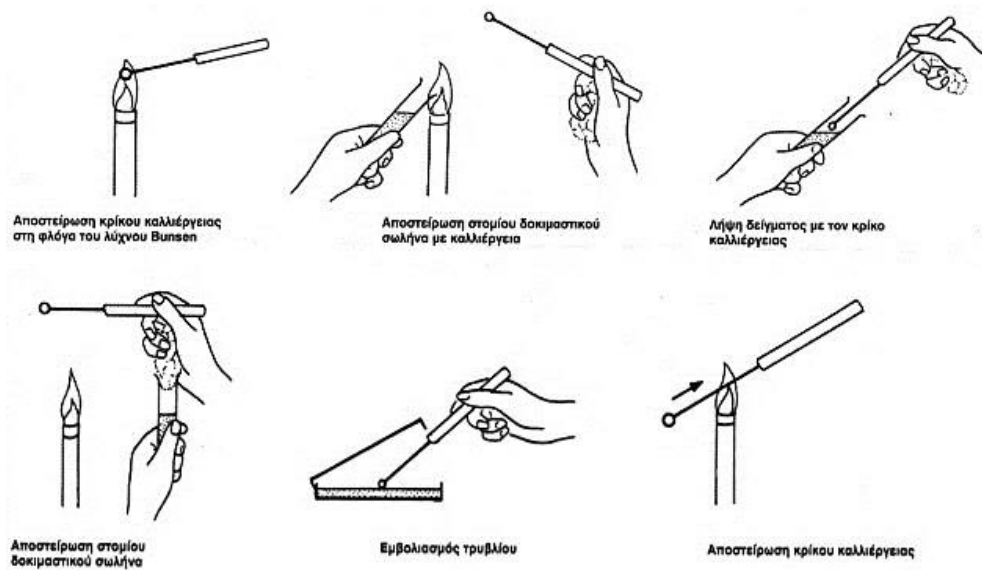


**Εικόνα 2.1** Εμβολιασμός σε υγρό θρεπτικό μέσο

### 2.3 Έλεγχος καθαρότητας ζυμών

Για τον έλεγχο καθαρότητας των απομονωμένων ζυμών παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenical agar).

Μετά την επώαση των ζυμών στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, ακολούθησε η εξάπλωση τους στο θρεπτικό υπόστρωμα YGC με τη μέθοδο επίστρωσης (streaking) και τη χρήση αποστειρωμένου κρίκου (Εικόνα 2.2). Τα τρυβλία μετά την εξάπλωση τοποθετήθηκαν στους 25 °C και επώαστηκαν για 48 ώρες.



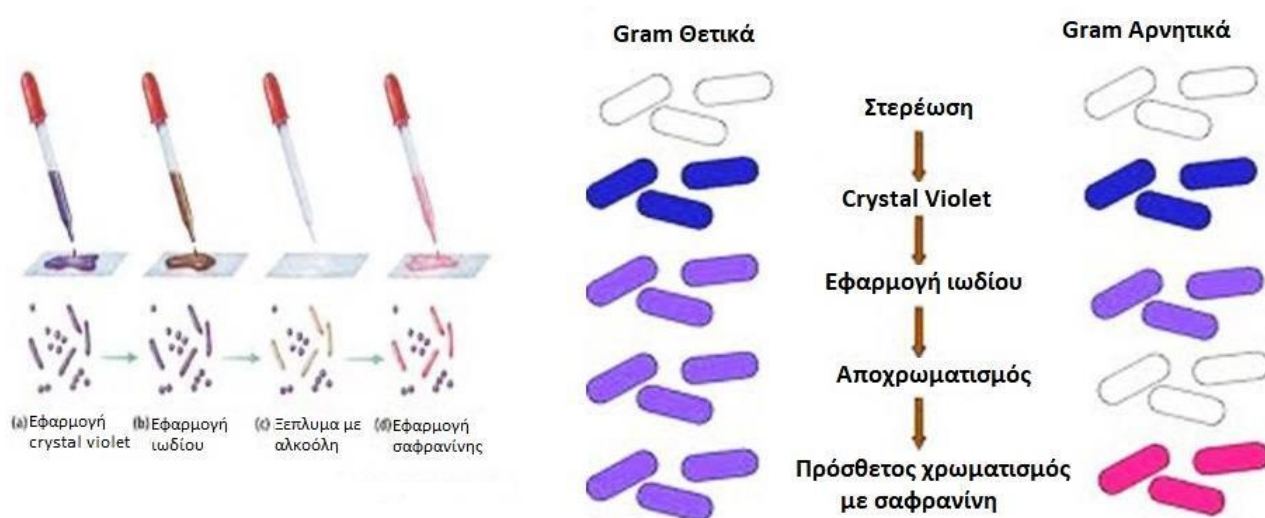
**Εικόνα 2.2** Εμβολιασμός τρυβλίων

Έπειτα οι αποικίες παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά και στερεοσκοπικά με σκοπό τη μελέτη του χρώματος και των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Τέλος, ακολούθησε χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση των ζυμών για την εξακρίβωση της καθαρότητάς τους, παρόλο που η χρώση αυτή χρησιμοποιείται για τα βακτήρια.

Η χρώση Gram, αναπτύχθηκε το 1884 από το Δανό βακτηριολόγο Hans Christian Gram και επιτρέπει την ταξινόμηση των προκαρυωτικών σε δύο μεγάλες ομάδες: Gram-θετικών και Gram-αρνητικών.

Η βάση της τεχνικής είναι το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) ή ιώδες της γεντιανής (gentian violet, κατά IUPAC ονομασία χλωριούχος εξαμεθυλοπαρarosανιλίνη (hexamethyl pararosaniline chloride)). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ικανότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων να συγκρατούν το κρυσταλλικό ιώδες κατά την επεξεργασία με διαλύτες. Τα Gram<sup>+</sup> βακτήρια έχουν τοίχωμα υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και χαμηλότερης σε λιπίδια. Το κυτταρικό τοίχωμα χρωματίζεται με την επίδραση του κρυσταλλικού ιώδους. Στη συνέχεια προστίθεται ιώδιο ως στερεωτικό, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες, με αποτέλεσμα τη στερέωση της χρώσης. Στη συνέχεια στο παρασκεύασμα προστίθεται ένας διαλύτης, αιθανόλη. Ο

διαλύτης απομακρύνει τη στιβάδα των λιπιδίων από τα Gram<sup>-</sup> βακτήρια, πράγμα που διευκολύνει τη διάχυση της αρχικής χρώσης στο περιβάλλον. Αντίθετα, ο διαλύτης αφυδατώνει το κυτταρικό τοίχωμα των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων, σφραγίζοντας και τους πόρους του καθώς αυτό συρρικνώνεται, εμποδίζοντας έτσι τη διάχυση της χρωστικής, οπότε τα βακτήρια παραμένουν κεχρωσμένα. Τέλος, στο παρασκεύασμα προστίθεται νέα χρωστική, σαφρανίνη για την μικροσκοπική εξέτασή τους.



**Εικόνα 2.3** Διαδικασία χρώσης Gram

Έπειτα από τη χρώση Gram οι αντικειμενοφόρες πλάκες οδηγήθηκαν στο μικροσκόπιο όπου και μελετήθηκαν. Ο φακός του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελαιοκαταδυτικός, οπότε για την παρατήρηση των στελεχών στις πλάκες προστέθηκε λάδι. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το Sigmascan Pro.

## 2.4 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA των ζυμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρωτοκόλλου των Korsahelis et al. (2009) μερικώς τροποποιημένο. Η διαδικασία της απομόνωσης DNA περιγράφεται παρακάτω:

1. Έγινε εμβολιασμός 100 ml από κάθε καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου και επώστηκαν στους 25 °C για 48 ώρες ώστε να προετοιμαστούν για την απομόνωση του DNA.
2. Μεταφορά 2 ml των καλλιεργειών από τους εμβολιασμένους δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρηση (12.000 rpm/ 20 ° C/ 10 min) και απόχυση του υπερκείμενου.
3. Εκ νέου εμβολιασμός δοκιμαστικούς σωλήνες, φυγοκέντρηση (12.000 rpm/ 4 ° C/ 10 min).
4. Απόχυση υπερκείμενου, χρήση 1 ml αποστειρωμένου νερού (water for injection) με σκοπό το την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρηση (12.000 rpm/ 4 °C/ 10 λεπτά).
5. Απόχυση υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 0,5 ml αποστειρωμένου νερού (water for injection).
6. Θέρμανση των tubes στους 65 ° C για 10 min με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών.
7. Φυγοκέντρηση (12.000 rpm/ 20 °C/ 10 min).
8. Απόχυση υπερκείμενου προσεκτικά και προσθήκη 0,5 ml διαλύματος σορβιτόλης, Na<sub>2</sub>EDTA (1 M σορβιτόλη, 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,5)
9. Προσθήκη λυτικάσης 200 U (20 μl 10000 U/ml) και τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων. Μετά από αυτό το βήμα ο χειρισμός των δειγμάτων θα πρέπει να ήπιος και προσεκτικός για αποφυγή αλλοίωσης του DNA.
10. Φυγοκέντρηση (12.000 rpm/ 20 ° C/ 5 min).
11. Απόχυση υπερκείμενου και προσθήκη 0,5 ml διαλύματος Tris–HCl / EDTA (50 mM Tris–HCl pH 7,4, 20 mM EDTA) και 50 μl 20% w/v SDS.
12. Θέρμανση των δειγμάτων στους 65 ° C για 30 min.
13. Προσθήκη 0,2 ml οξικού αμμωνίου (7,5 mol / lt) και τοποθέτηση των δειγμάτων

- στον πάγο για 1 ώρα.
14. Φυγοκέντρηση (13.000 rpm/ 4 °C/ 10 min) και μεταφορά του υπερκείμενου. (Επανάληψη αυτού του βήματος).
  15. Προσθήκη 750 ml 100% παγωμένης ισοπροπανόλης και τοποθέτηση στον πάγο για 5 min.
  16. Φυγοκέντρηση (13.000 rpm/ 4 ° C/ 20 min) και απόχυση υπερκείμενου.
  17. Ξέπλυμα με τη χρήση 700 μl παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση (8.000 rpm/ 4 ° C/ 2 min). (Επανάληψη αυτού του βήματος).
  18. Αφαίρεση αιθανόλης και τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 ° C για 4-5 min ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη και τα tubes να είναι στεγνά.
  19. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 40 μl TE pH 8,0
  20. Φύλαξη στους 4 ° C.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητάς του. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) και το πρόγραμμα Q5000 V6.0.6. Ανοίγοντας το πρόγραμμα επιλέγεται η αντίστοιχη επιλογή για τη μέτρηση του DNA, Nucleic Acid. Αρχικά γίνεται καθαρισμός του τριχοειδούς και κατόπιν μηδενισμός της συσκευής με τη χρήση υπερκάθαρου νερού. Στη συνέχεια, κατόπιν ήπιας ανάδευσης τοποθετήθηκε 1 μl DNA δείγματος στην ειδική βάση όταν ο βραχίονας είναι ανοικτός. Έπειτα ο βραχίονας κλείνει και το δείγμα σχηματίζει μία στήλη όπου με χρήση ακτινοβολίας οπτικών ινών, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος. Με το πέρας κάθε μέτρησης η βάση καθαρίζεται προσεχτικά με απορροφητικό χαρτί και προετοιμάζεται για το επόμενο δείγμα. Η φωτομέτρηση για το DNA γίνεται σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (Optical Density) υπολογίζεται αυτόματα η συγκέντρωση.

Όσον αφορά την καθαρότητα του DNA, πραγματοποιείται παράλληλη μέτρηση του δείγματος στα 280 nm για έλεγχο της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ελέγχοντας το λόγο των απορροφήσεων 260/280. Το δείγμα θεωρείται καθαρό όταν

οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 1,8-2, ενώ αν οι τιμές είναι χαμηλότερες τότε πιθανόν να υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών στο δείγμα. Ένας άλλος δείκτης καθαρότητας είναι ο λόγος των απορροφήσεων 260/230 που αφορά τα σάκχαρα και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8-2,2 για δείγματα υψηλής καθαρότητας.

Τέλος, τα δείγματα μετά τη φωτομέτρηση αραιώθηκαν και το DNA προσδιορίστηκε εκ νέου ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων σε νουκλεϊκά οξέα να είναι ίση με 50 ng/μl τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τη rep-PCR.

## 2.5 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο της rep-PCR

Με τη μέθοδο της rep-PCR η οποία στηρίζεται στη χρήση του γλυκοζιτικού ενζύμου λυτικάση, καθώς και διαλύματος δωδεκασουλφουρικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), ενός παράγοντα που αποδιατάσσει πρωτεΐνες με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση όλων των απομονωθέντων στελεχών ζυμών σύμφωνα με το πρωτοκόλλο των Alves da Silva-Filho et al. (2005) με τη χρήση του εκκινητή GTG<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') και ενός μίγματος Mix το οποίο περιέχει:

- MgCl<sub>2</sub> 75 nmoles
- dNTPs 12,5 nmoles each
- BSA 0,625 μg
- Taq Polymerase 1,25 U

Οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση παρέμεναν σταθερές και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.4** Αντιδραστήρια rep-PCR

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα ανά αντίδραση</b>
<b>DNA</b>	1 $\mu$ l
<b>Primer GTG<sub>5</sub></b>	0,5 $\mu$ l
<b>Mix</b>	12,5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	11 $\mu$ l
<b>Τελικός Όγκος 25 <math>\mu</math>l</b>	

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε μικροφιαλίδια τύπου errendorf στον πάγο και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (Εικόνα 2.4) με τις ακόλουθες συνθήκες:

- ❖ 94 ° C για 5 λεπτά ώστε να γίνει η πρώτη αποδιάταξη του DNA
  - ❖ 94 ° C 15 s συνέχεια αποδιάταξης
  - ❖ 55 ° C 45 s annealing
  - ❖ 72 ° C 90 s επέκταση πολυμεράσης
  - σε συμπληρωματικές αλληλουχίες
  - ❖ 72 ° C 6 min
- 40 κύκλοι



Εικόνα 2.4 Μηχάνημα PCR

### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική Αγαρόζη**

Τα προϊόντα της rep-PCR στη συνέχεια οδηγήθηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη για την παρασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστατικά:

- 1,56 g αγαρόζη 1,3 % w/v
- 120 ml 1 x TAE
- 6 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία:

- Διαλυτοποίηση της αγαρόζης με βρασμό στο ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TAE σε κωνική φιάλη για διαύγαση και ολιγόλεπτη αναμονή έως ότου χαμηλώσει η θερμοκρασία
- Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και μεταφορά μίγματος στην εστία ηλεκτροφόρησης πριν στερεοποιηθεί
- Τοποθέτηση χτένας κάθετα στο υγρό μίγμα για τη διαμόρφωση των εγκοπών που

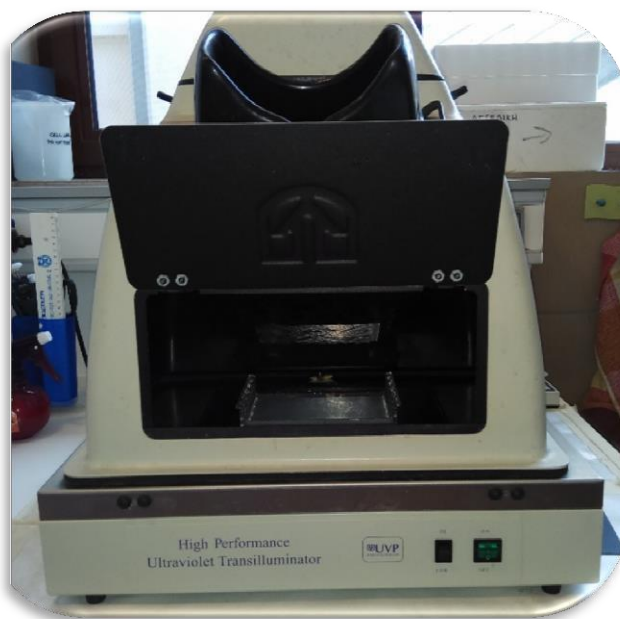


θα προστεθούν τα προϊόντα της *rep*-PCR και αφαίρεση χτένας όταν το μίγμα στερεωθεί και διαυγάσει.

- Ενεργοποίηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης και προσθήκη μίγματος 1 x TAE για την πλήρη κάλυψη της αγαρόζης
- Προσθήκη 5 μl από τον μάρτυρα 1 kb (DNA ladder) στην πρώτη εσοχή ως σημείο αναφοράς
- Προσθήκη 18 μl από κάθε δείγμα με τη χρήση πιπέτας στις ειδικά διαμορφωμένες εσοχές
- Ενεργοποίηση του τροφοδοτικού για ηλεκτροφόρηση της πηκτής αγαρόζης στα 60 V για 150 min.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αγαρόζης μεταφέρθηκε στη συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (High Performance Ultraviolet Transilluminator, Ultra Violet Products, UK) (Εικόνα 2.5) ώστε να γίνουν ορατά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Τα τμήματα του DNA ήταν ορατά ως λευκές ζώνες, λόγω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε υπολογιστή και φωτογραφικό σύστημα Polaroid.

Τέλος, η φωτογραφία της πηκτής αγαρόζης υπέστη κατάλληλη επεξεργασία με το πρόγραμμα BionNumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium) το οποίο σύγκρινε τις ζώνες των προϊόντων της PCR και κατέταξε τα στελέχη των ζυμών ομαδοποιημένα με βάση τα ποσοστά ομοιότητάς τους με τη μορφή δενδρογράμματος.



**Εικόνα 2.5** Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας

## 2.6 Ταυτοποίηση των ζυμών με ITS PCR

Η αλληλούχηση των περιοχών ITS (ITS: Internal Transcribed Spacers) βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και περιλαμβάνει την ενίσχυση διαστημάτων που παρεμβάλλονται μεταξύ της μικρής και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, δηλαδή των εσωτερικά μεταγραφόμενων διαστημάτων (Νησιώτου, 2008). Με τη μέθοδο ITS πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) με τη διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.4 και το DNA ρυθμίστηκε ώστε συγκέντρωση όλων των δειγμάτων σε νουκλεικά οξέα να είναι ίση με 400 ng/μl.

Με τη μέθοδο της ITS PCR όπως την περιέγραψαν και ο Korabenca (2007) χρησιμοποιείται ευρέως για τις ζύμες και πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των επιλεγθέντων στελεχών ζυμών μετά την ομαδοποίηση με τη χρήση των εκκινητών ITS1 (F): 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3' και ITS4 (R): 5'-TCC TCC GCT

TAT TGA TAT GC-3'

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.5** Αντιδραστήρια ITS PCR

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα ανά αντίδραση</b>
<b>DNA</b>	1 μl
<b>Primer ITS1</b>	2 μl
<b>Primer ITS2</b>	2 μl
<b>2xMix</b>	25 μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	20 μl
<b>Τελικός Όγκος 50 μl</b>	

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε μικροφιαλίδια τύπου erpendorf στον πάγο και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή με τις ακόλουθες συνθήκες:

- ❖ 94 ° C για 2 min ώστε να γίνει η πρώτη αποδιάταξη του DNA
  - ❖ 94 ° C 30 s συνέχεια αποδιάταξης
  - ❖ 55 ° C 30 s annealing
  - ❖ 72 ° C 60 s επέκταση πολυμεράσης
  - σε συμπληρωματικές αλληλουχίες
  - ❖ 72 ° C 10 s
  - ❖ 10 ° C hold
- 35 κύκλοι

### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική Αγαρόζη**

Τα προϊόντα της ITS PCR στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη για την παρασκευή της οποίας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε παραπάνω με τη διαφορά πως φορτώθηκαν 10 μl από κάθε δείγμα και η τάση ρυθμίστηκε στα 100 V για 60 min.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτική αγαρόζη μεταφέρθηκε στη συσκευή

εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (High Performance Ultraviolet Transilluminator, Ultra Violet Products, UK) (Εικόνα 2.5) ώστε να γίνουν ορατά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Τα τμήματα του DNA ήταν ορατά ως λευκές ζώνες, λόγω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε υπολογιστή και φωτογραφικό σύστημα Polaroid.

Για τον καθαρισμό των προϊόντων ITS PCR ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Macherey – Nagel και η διαδικασία με την οποία πραγματοποιήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Ανάμιξη 1 όγκου δείγματος με 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος NT1
2. Τοποθέτηση της στήλης καθαρισμού προϊόντος PCR (πήκτωμα NucleoSpin® Gel) σε σωλήνα συλλογής (2 mL) και προσθήκη δείγματος μέχρι 700 µL. Φυγοκέντρηση για 30 s στα 11.000 rpm. Απόχυση του υγρού που πέρασε από την στήλη και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο σωλήνα συλλογής. Προσθήκη δείγματος για δεύτερη φορά εάν είναι απαραίτητο και επανάληψη της διαδικασίας φυγοκέντρησης.
3. Προσθήκη 700 µl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στο NucleoSpin® Gel και στη στήλη καθαρισμού PCR. Φυγοκέντρηση για 30 s στα 11.000 rpm. Απόχυση του υγρού που πέρασε από την στήλη και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο σωλήνα συλλογής.
4. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 rpm για αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος NT3. χωρίς να έρχεται σε επαφή η στήλη περιστροφής με τη ροή κατά την αφαίρεση της από τη φυγόκεντρο και τον σωλήνα συλλογής.
5. Τοποθέτηση του NucleoSpin® Gel και της στήλης καθαρισμού PCR σε ένα νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου 1.5 mL (δεν παρέχεται). Προσθήκη 15-30 µL Buffer NE και επώαση σε συνθήκες δωματίου (18-25 °C) για 1 min.

Τέλος τα δείγματα στάλθηκαν για ταυτοποίηση και τα αποτελέσματα

στάλθηκαν στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, με τη χρήση της ηλεκτρονικής πλατφόρμας NCBI Standard Nucleotide BLAST in suite μας έδωσαν τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με βάση τη σειρά των αλληλουχιών του κάθε στελέχους.

## **2.7 Βιοχημικές ιδιότητες των ζυμών**

### **2.7.1 Πρωτεολυτική δραστηριότητα**

Για την μελέτη της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των 14 στελεχών ζυμών χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία τα οποία περιείχαν ως θρεπτικό υπόστρωμα ανασυσταμένη σκόνη άπαχου γάλακτος σύμφωνα με τους Mazzucotelli (2013), Belda (2016) και Strauss (2001). Συγκεκριμένα, το υπόστρωμα περιείχε:

- 5% w/v skim milk powder (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και
- 1,5% w/v άγαρ,

τα οποία αποστειρώθηκαν ξεχωριστά στους 120 °C για 5 min και 15 min αντίστοιχα και στη συνέχεια αναμείχθηκαν. Στο στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό, εμβολιάστηκαν 5 μL από κάθε στέλεχος ζύμης, σχηματίζοντας «κηλίδες». Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25 °C για 5 ημέρες και παρατηρήθηκαν για εμφάνιση ζωνών διάγασης γύρω από τις αποικίες, λόγω της υδρόλυσης των πεπτιδικών δεσμών. Σε περίπτωση διάγασης η ακτίνα μετρήθηκε.

### **2.7.2 Εστερολυτική δραστηριότητα**

Για την μελέτη της της εστερολυτικής ενεργότητας των ζυμών χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με τριβουτυρίνη, εφαρμόζοντας τη μέθοδο των Gupta et al. (2003) και Hernandez et al. (2007), μερικώς τροποποιημένες (Georgalaki et al., 2000). Για την Παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- 20 g/L Nutrient Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France),
- 1,5% w/v άγαρ (Bacteriological Agar Type E, Biokar, Diagnostics, Beauvais, France),
- 1% v/v τριβουτυρίνη (Glyceryl Tributyrate, Sigma, Steinheim, Germany) και
- 1% w/v αραβικό κόμμι ως γαλακτωματοποιητής (Gum Arabic, Sigma, Steinheim, Germany).

Για την ομοιογενοποίηση χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA- Labortechnik για 5 min στις 20500 rpm και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπόστρωμα αποστειρώθηκε στους 121 °C για 10 min.

Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν 5 μL από κάθε στέλεχος ζύμης στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25 °C για 7 ημέρες, οπότε και ελεγχόταν η εμφάνιση ή μη διαυγούς ζώνης, οφειλόμενη στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών της τριβουτυρίνης, γύρω από τα σημεία ανάπτυξης.

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων, βάσει των Gobinath et al. (2005), Mazzucotelli et al. (2013), η μέθοδος επαναλήφθηκε μεταφέροντας 3 μL από κάθε στέλεχος ζύμης στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος με Tween 80. Για την παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν:

10 mL/L Tween 80 (Research Organics, Ohio, USA),

10 g/L πεπτόνη (Proteose Peptone, Merck, Darmstadt, Germany),

0,1 g/L CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),

5 g/L NaCl (Sodium Chloride, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και

15 g/L agar.

Το pH του ρυθμίστηκε στην τιμή 7,0. Τα τρυβλία επώαστηκαν επίσης στους 25 °C και ελέγχονταν ανά 24 h είτε για εμφάνιση κρυστάλλων άλατος ασβεστίου σχηματιζόμενων από τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από την δράση του ενζύμου, είτε για διαύγαση γύρω από τις αποικίες λόγω της πλήρους αποδόμησης του άλατος ασβεστίου (Gobinath, 2005).

### 2.7.3 Παραγωγή λιπάσης

Τα στελέχη ζυμών στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την παραγωγή λιπάσης. Η εκτίμηση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία τα οποία περιείχαν 0,002 % w/v ροδαμίνη (Rhodamine B, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Η ροδαμίνη είναι μία χρωστική ουσία που συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης σε βιοχημικές μελέτες. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της ένωσης αυτής να φθορίζει όταν δεσμεύει τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από τα τριγλυκερίδια κατά την υδρόλυσή τους (Anderson 1972).

Το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε, 4,5 g Nutrient broth, 1,25 g Yeast Extract, 10 g Agar, 450 ml απιονισμένο νερό, και αφού ρυθμίστηκε το pH του στην τιμή 7,0, αποστειρώθηκε για 15 min στους 120 °C. Παράλληλα, παρασκευάστηκε το εξής γαλάκτωμα: 15 mL ελαιόλαδο, 125 μl Tween 80, 25 ml απιονισμένο νερό, στο οποίο (αφότου ομοιογενοποιήθηκε στο μηχάνημα Ultra Tarax. T25 για 2 min και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αποστειρώθηκε και ψύχθηκε στο 60 °C) προστέθηκαν 10 μl αποστειρωμένου με διήθηση (φίλτρα FP 30/0,2 μm CA-S, Whatman, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) υδατικού διαλύματος ροδαμίνης 0,1 % w/v. Το βασικό υλικό και το γαλάκτωμα που περιείχε τη ροδαμίνη αναμείχθηκαν, και στρώθηκαν σε τρυβλία με το υπόστρωμα αυτό (Cadirci & Yassa, 2010).

Αφού το στρεπρό υπόστρωμα στέγνωσε εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια αυτού 5 μl καλλιέργειας από κάθε στέλεχος ζύμης. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25 °C για 48 h. Η εκτίμηση της ενεργότητας έγινε με τον φωτισμό των τρυβλίων με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) μήκους κύματος 366 nm (UVL-21 BLACK-Ray Lamp Ultra-Violet Products Inv. San Gabriel, CA-USA). Τα στελέχη τα οποία ήταν θετικά στην παραγωγή λιπάσης παρουσίασαν πορτοκαλί φθορισμό υπό το φως της λάμπας UV (Mazzucotelli, 2013).

#### 2.7.4 Ξυλανολυτική ενεργότητα

Η εκτίμηση της ξυλανολυτικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YEA (Yeast Extract Agar, Laboratorius Conda, Mandrid, Spain) σύμφωνα με τους Tofalo et al. (2013). Το θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτίστηκε με 5 g/L ξυλάνιο (Xylan from beech wood, Serva, Heidelberg, Germany), 5 g/L πεπτόνη και 5 g/L NaCl. Από κάθε στέλεχος ζύμης εμβολιάτηκαν 5 μl καλλιέργειας στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος σχηματίζοντας κηλίδες. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25 °C για 10 ημέρες και παρατηρήθηκαν για την εμφάνιση ζωνών διαύγασης λόγω υδρόλυσης των β1, 4-γλυκοζιτικών δεσμών της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης.

#### 2.7.5 Πηκτινολυτική δράση

Τα στελέχη των ζυμών εξετάστηκαν για την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YNB (Yeast Nitrogen, Base without added aminoacids, Laboratorius Conda, Mandrid, Spain) agar, pH 4,0, εμπλουτισμένο με 0,125 % πηκτίνες (Pectins from citrus peel, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ως μοναδική πηγή άνθρακα ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Tofalo et al. (2013) και Hernandez (2007) με μικρές τροποποιήσεις. Στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου εμβολιάστηκαν 5 μl από κάθε στέλεχος. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25 °C για 10 ημέρες και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των στελεχών σε αυτά. Τα στελέχη τα οποία αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα χαρακτηρίστηκαν θετικά. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη ανάπτυξη των ζυμών στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς προσθήκη πηκτικινών. Συμπληρωματικά οι αποικίες που σχηματίστηκαν εκπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και στην επιφάνεια των τρυβλίων προστέθηκε υδατικό διάλυμα ερυθρού του ρουθινίου (Ruthenium Red, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 0,1 % w/v. Το ερυθρό του ρουθινίου (Ruthenium Red) είναι μία ανόργανη χρωστική ουσία που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία συχνά για τη χρώση και την καλύτερη παρατήρηση πολυανιωνικών μορίων. Η πηκτινή αποτελείται από μόρια



πολυγαλακτουρονικού οξέος σε αλυσίδα. Το ερυθρό του ρουθινίου έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τα μόρια του πολυγαλακτουρονικού οξέος με αποτέλεσμα στην περίπτωση που η πηκτίνη έχει υδρολυθεί από τα ένζυμα και έχουν ελευθερωθεί μόρια πολυγαλακτουρονικού οξέος, αυτά να γίνονται εμφανή ως μωβ ίζημα γύρω από τα σημεία ανάπτυξης (Torres, 2011).

## 2.8 Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά δειγμάτων γιαούρτης και Κρητικής Στάκας

### 2.8.1 Ανάλυση HPLC δειγμάτων γιαούρτης και Κρητικής Στάκας

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό οργανικών οξέων και σακχάρων είναι των Zerra et al. 2009 ελαφρώς τροποποιημένο.

Οι συνθήκες της HPLC για το συγκεκριμένο πείραμα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.5 Συνθήκες HPLC

Στήλη	Aminex HPX – 87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
Διαλύτης	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5 mM)
Θερμοκρασία	60 °C
Ταχύτητα Ροής	0,5 ml/min
Ποσότητα Δείγματος	20 μl

#### Προετοιμασία δειγμάτων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων με σκοπό την ανάλυση με τη μέθοδο της HPLC ήταν η εξής:

1. Ζύγισμα περίπου 2 g από κάθε δείγμα σε falcon tubes
2. Προσθήκη 5 ml ζεστού υπερκάθαρου νερού το οποίο βρισκόταν στο υδατόλουτρο και χρήση Vortex για ομογενοποίηση του δείγματος.
3. Μέτρηση και ρύθμιση pH στο 4,5
4. Τοποθέτηση των falcon tubes σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 60 min.

5. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στους 4 °C για 30 min.
6. Απόχυση των υπερκειμένων των δειγμάτων σε καινούρια erpendorf.

#### Διαδικασία προετοιμασίας HPLC

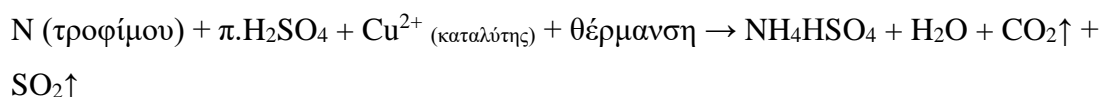
- ❖ Εξισορρόπηση της στήλης με το διαλύτη θεικού οξέος 5 mM
- ❖ Φιλτράρισμα των δειγμάτων με φίλτρα Wattman.
- ❖ Εισαγωγή 50 μl δείγματος στη στήλη (ανοίγεται η θύρα της στήλης στο load και γίνεται ένεση του δείγματος )
- ❖ Χρόνος έκλυσης 30 min (retention time).

### **2.8.2 Προσδιορισμός ολικών αζωτούχων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl**

Για τον προσδιορισμό των ολικών αζωτούχων πρωτεϊνών με τη χρήση της Kjeldahl ζυγίστηκε ποσότητα δείγματος (3 g για το γιαούρτι και 5 g για τη Στάκα) η οποία υποβλήθηκε σε υγρή καύση με πυκνό θειικό οξύ παρουσία θειικού καλίου και θειικού χαλκού. Το οργανικώς δεσμευμένο άζωτο μετατράπηκε σε αμμωνία που δεσμεύτηκε από την περίσσεια του οξέος. Το μίγμα ψύχθηκε και ακολούθως προστέθηκε περίσσεια πυκνού δ/τος καυστικού νατρίου. Ελευθερώθηκε αμμωνία, που απομακρύνθηκε (απόσταξη με υδρατμούς) και δεσμεύτηκε από γνωστή περίσσεια προτύπου δ/τος οξέος. Η περίσσεια του οξέος προσδιορίστηκε αλκαλιμετρικώς. Από την ποσότητα της αμμωνίας υπολογίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο η οποία ανάγεται σε πρωτεΐνες.

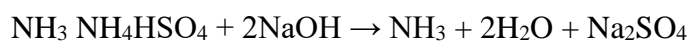
#### **Αντιδράσεις**

1° Στάδιο: Υγρή πέψη ή χώνευση



Το εκλυόμενο SO<sub>2</sub> δεσμεύεται σε παγίδα με NaOH και εξουδετερώνεται

2° Στάδιο: Απόσταξη



3<sup>ο</sup> Στάδιο: Εξουδετέρωση



### Υπολογισμοί

$$n(\text{HCl}) = n(\text{NH}_3) + n(\text{NaOH}) \text{ οπότε}$$

$$n(\text{NH}_3) = n(\text{HCl}) - n(\text{NaOH}) \text{ } n(\text{NH}_3) = n(\text{N}) \text{ άρα}$$

$$m(\text{N}) = n(\text{N}) \times 14 \% \text{ N (τροφίμου)} = [m(\text{N}) / m(\text{τροφίμου})] \times 100 \%$$

πρωτεΐνη = % N x 6.38 όπου: 6.25 ο γενικός συντελεστής μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες. γάλακτος

## 2.8.3 Προσδιορισμός οξύτητας και pH

Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε pHμετρο Radiometer pioneer. 10 που προηγουμένως είχε βαθμονομηθεί με ρυθμιστικά διαλύματα pH 4,0 και 7,0.

Για τον υπολογισμό της οξύτητας σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 10 g δείγματος και αραιώθηκαν με θερμό απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια προστέθηκαν τρεις σταγόνες φαινολοφθαλείνης και το δείγμα τιτλοδοτήθηκε με πρότυπο διάλυμα N/9 υδροξειδίου του νατρίου (Ανυφαντάκης 1982). Στο τελικό σημείο το δείγμα λαμβάνει ρόδινο χρώμα που πρέπει να διατηρείται για μερικά δευτερόλεπτα πριν αποχρωματιστεί. Ο αποχρωματισμός οφείλεται σε δευτερεύουσες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του NaOH και των αλάτων στο δείγμα. Ο όγκος NaOH ( $V_{\text{NaOH}}$ ) που καταναλώθηκε χρησιμοποιείται στον παρακάτω τύπο για τον υπολογισμό της ογκομετρούμενης οξύτητας η οποία εκφράζεται σε ποσοστό % γαλακτικού οξέος.

$$\% \text{ γαλακτικό οξύ (w/v)} = (V_{\text{NaOH}} \times N \times 0.090) \times 100 / m_{\text{δείγματος}}$$

όπου N η κανονικότητα του διαλύματος NaOH (= 0,1) και τα 0,090 τα χιλιοστοισοδύναμα (mEq) του NaOH.

## 2.8.4 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αποξήρανσης σε κλίβανο (ISO 2920/IDF 058:2004). Αρχικά ζυγίστηκαν 10 g αλατιού σε κάψα στην οποία τοποθετήθηκε γυάλινο ραβδάκι. Η κάψα με το ραβδάκι παρέμειναν στον κλίβανο στους 105 °C για τουλάχιστον 24 h και στη συνέχεια μετρήθηκε το βάρος τους (α). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 3 g δείγματος τα οποία αναμίχθηκαν με τη βοήθεια του ραβδιού με το αλάτι, ώστε να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Το δείγμα με το αλάτι τη ράβδο και την κάψα ζυγίστηκαν (β) και στη συνέχεια παρέμειναν στον κλίβανο των 105 °C και έπειτα ξαναζυγίστηκαν (γ). Όλα τα βάρη ζυγίζονται με ακρίβεια 0,0001 g. Ο υπολογισμός της % περιεκτικότητας σε υγρασία γίνεται με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$$\% \text{ υγρασία} = (\beta - \gamma) / (\beta - \alpha)$$

## 2.8.5 Προσδιορισμός τέφρας

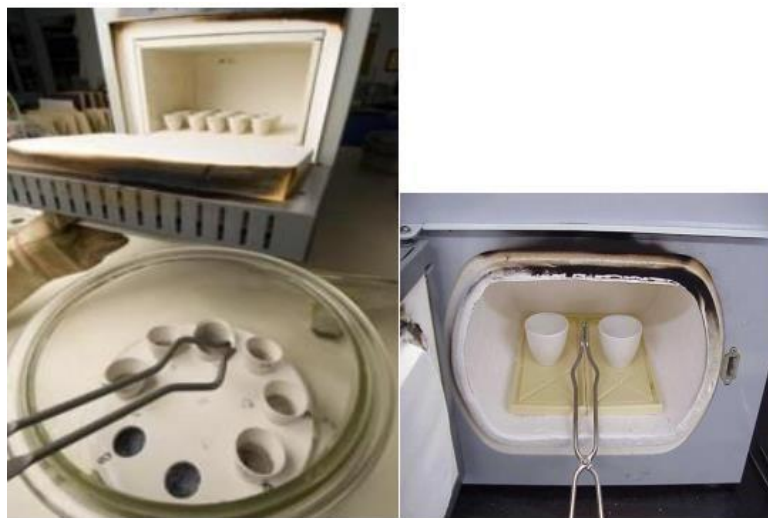
Για τη διαδικασία της ξηράς αποτέφρωσης απαιτείται θέρμανση σε κλίβανο σε πολύ υψηλή θερμοκρασία μεταξύ 500 και 600 °C για περίπου 6 ώρες. Το νερό και άλλες πτητικές ουσίες εξατμίζονται και οι οργανικές ουσίες καίγονται με την παρουσία του οξυγόνου προς CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και N<sub>2</sub>. Τα περισσότερα μέταλλα μετατρέπονται σε οξείδια ή σε θειικά, φωσφορικά, χλωριούχα ή πυριτικά άλατα. Τα στοιχεία Fe, Pb και Hg είναι πτητικά σε αυτές τις υψηλές θερμοκρασίες, οπότε για τον προσδιορισμό τους απαιτείται άλλη μέθοδος αποτέφρωσης σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

Στο υπόλειμμα που απομένει μετά την πλήρη οξείδωση της οργανικής ύλης περιέχονται:

- κύρια ανόργανα στοιχεία: K, Na, Mg, Ca, P, Cl.
- ιχνοστοιχεία Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co, Mo, Cr, V, Se, I, F, B, Si, Pb, Cd, Hg, As, Al, Sn και άλλα.

### Μεθοδολογία ξηράς αποτέφρωσης

- Προζυγισμένη ποσότητα δείγματος (α) φέρεται σε κατάλληλο προζυγισμένο πορσελάνινο υποδοχέα (κάψα) που έχει προπυρωθεί και ψυχθεί (β).
- Γίνεται απαυθράκωση πάνω από λύχνο Bunsen (γ).
- Αποτέφρωση στους 550 °C για πολλές ώρες (6 ωρών) (Εικόνα 2.6)
- Ψύξη σε ξηραντήρα
- Ζύγιση (δ)
- Υπολογισμός % περιεκτικότητας τέφρας χρησιμοποιώντας τον τύπο  
$$\% \text{ Τέφρα} = ((\delta - \alpha) / (\beta - \alpha)) \times 100$$



**Εικόνα 2.6** Τοποθέτηση καψών σε αποτεφρωτήρα

## 2.8.6 Προσδιορισμός λίπους

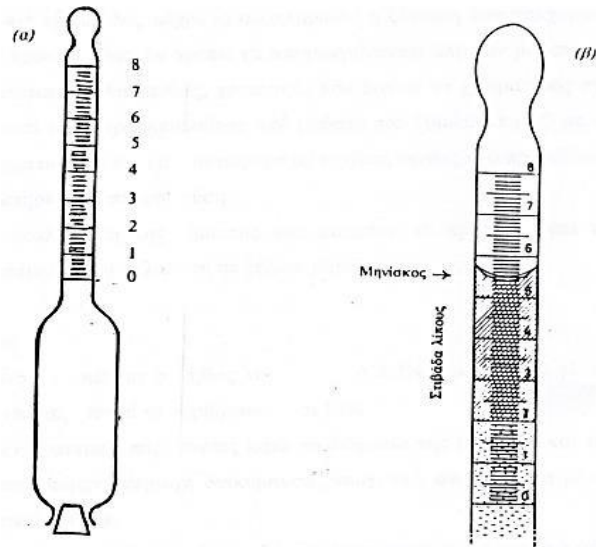
Για τον υπολογισμό του % ποσοστού λίπους στα δείγματα γιαουρτιού και Στάκας ακολουθήθηκε η ογκομετρική μέθοδος Gerber – Van Gulik.

Τα αντιδραστήρια – Σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- i.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  με ειδικό βάρος 1,5
- ii. Αμυλική αλκοόλη
- iii. Σωλήνες βουτυρόμετρου
- iv. Υδατόλουτρο 65 °C
- v. Φυγόκεντρος
- vi. Αναλυτικός ζυγός
- vii. Σιφόνιο 10 ml

Η διαδικασία που έλαβε χώρα για τον υπολογισμό του λίπους αναλύεται παρακάτω:

- Σε ειδικό σωλήνα του βουτυρόμετρου ζυγίζονται ακριβώς 3 g δείγματος για τη Στάκα και 11 g για το γιαούρτι
- Πωματίζεται ο σωλήνας και τοποθετείται στο βουτυρόμετρο. Στο άλλο ανοιχτό στόμιο του βουτυρόμετρου προστίθενται 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  με ειδικό βάρος 1,5 και το βουτυρόμετρο τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 70 °C.
- Στη συνέχεια αναταράσσετε ζωηρά ώσπου να διαλυθεί εντελώς η μάζα του τυριού
- Προστίθεται 1 ml αμυλικής αλκοόλης και η ανατάραξη επαναλαμβάνεται
- Η στιβάδα του λίπους πρέπει να βρίσκεται μέσα στην κλίμακα του βουτυρόμετρου και αυτό ρυθμίζεται με προσθήκη θειικού οξέως.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 1000 rpm και τοποθέτηση του βουτυρόμετρου σε υδατόλουτρο στους 65 °C
- Σημειώνεται ο όγκος της στιβάδας λίπους και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και η θέρμανση στους 65 °C
- Ο τελικός όγκος της στιβάδας του λίπους δίνει την % κατά βάρος περιεκτικότητα λίπους στο τυρί.



Εικόνα 2.7 Βουτυρόμετρο Gerber – Van Gulik

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών

Οι απομονωμένες ζύμες των υπό μελέτη δειγμάτων παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.1 με τις απαραίτητες πληροφορίες καθώς και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών έπειτα από μικροσκοπική εξέταση.

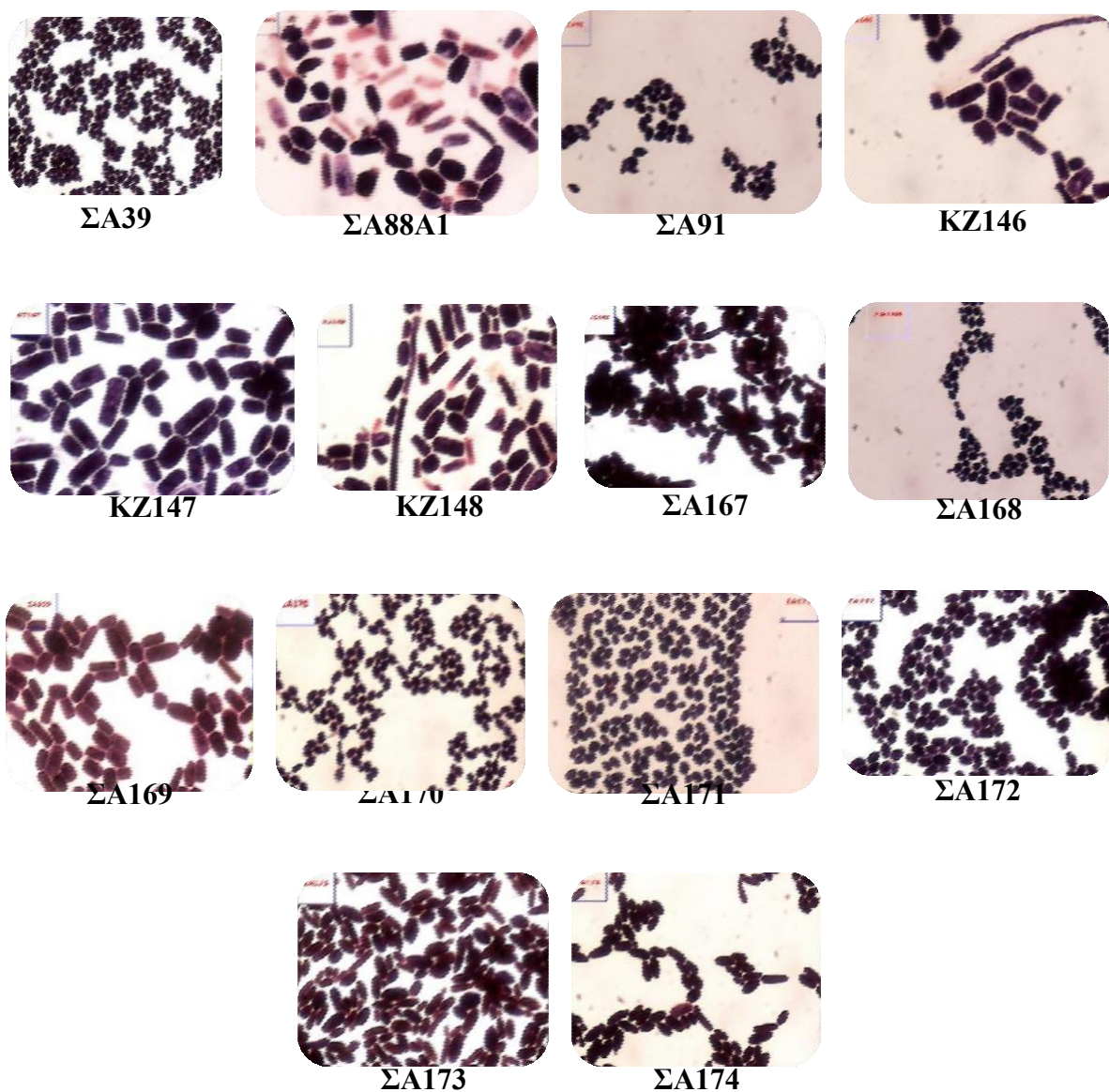
Πίνακας 3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων ζυμών

Αριθμός απομόνωσης	Αριθμός ACA-DC	Δείγμα	Μορφολογία αποικιών – 3D	Μορφολογία κυττάρου
ΣΑ39	5261	Στάκα 2	πολύ μικρές γυαλιστερές ανοιχτό κρεμ	ζύμη
ΣΑ88Α1	5262		χνουδωτές μεγάλες (ριζοειδείς)	ζύμη μεγάλη
ΣΑ91	5263		πολύ μικρές γυαλιστερές κρεμ	ζύμη
KZ146	5273	Μπακούλ ας	μικρές και μεγάλες στρογγυλές ακανόνιστες κρεμ	ζύμη
KZ147	5274		μικρές και μεγάλες χνουδωτές ακανόνιστες κρεμ	ζύμη
KZ148	5275		μικρές και μεγάλες χνουδωτές κρεμ	ζύμη
ΣΑ167	5265	Στάκα 2	γυαλιστερές μικρές κρεμ	ζύμη μικρή



<b>ΣΑ168</b>	5266	Στάκα 3	γυαλιστερές στρογγυλές μικρές λευκές	ζύμη
<b>ΣΑ169</b>	5267		ριζοειδείς μεγάλες (επωάστηκαν παραπάνω)	ζύμη μεγάλη
<b>ΣΑ170</b>	5268		γυαλιστερές μικρές στρογγυλές ανοιχτό κρεμ	ζύμη
<b>ΣΑ171</b>	5269		γυαλιστερές μικροσκοπικές λευκές ομοιόμορφες	ζύμη μικρή
<b>ΣΑ172</b>	5270		γυαλιστερές πολύ μικρές στρογγυλές λευκές	ζύμη μικρή
<b>ΣΑ173</b>	5271		γυαλιστερές μικρές στρογγυλες κρεμ	ζύμη
<b>ΣΑ174</b>	5272		γυαλιστερές μικροσκοπικές λευκές ομοιόμορφες	ζύμη μικρή

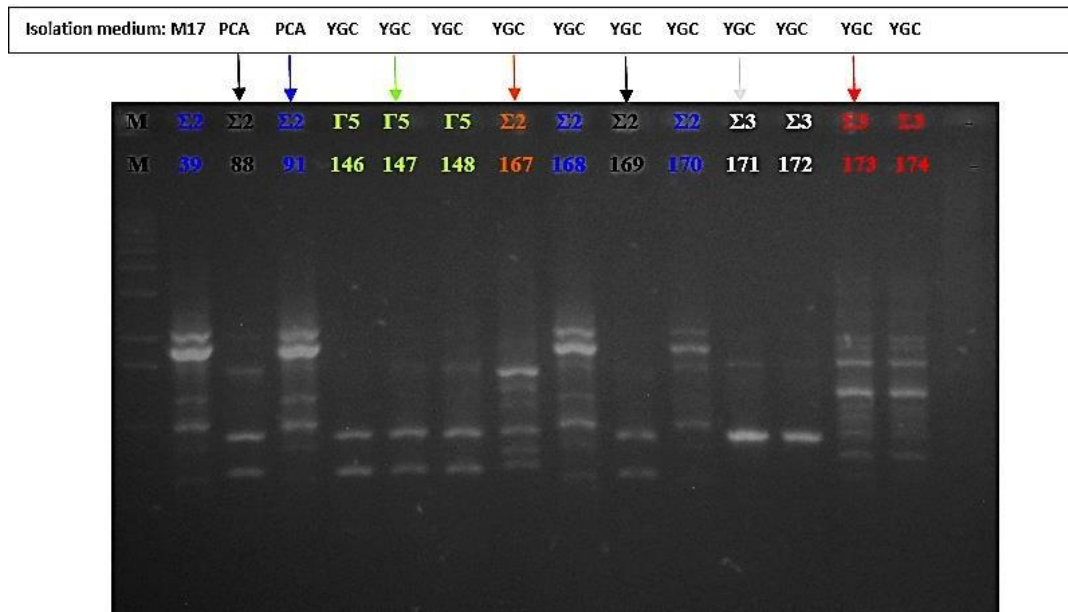
Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ζυμών που απομονώθηκαν από τα δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας, τα οποία παρατηρήθηκαν τόσο μακροσκοπικά έπειτα από την ανάπτυξη τους στο θρεπτικό μέσο, όσο και μικροσκοπικά έπειτα από χρώση Gram με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Παρατήρηση ζυμών μικροσκοπικά με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού.

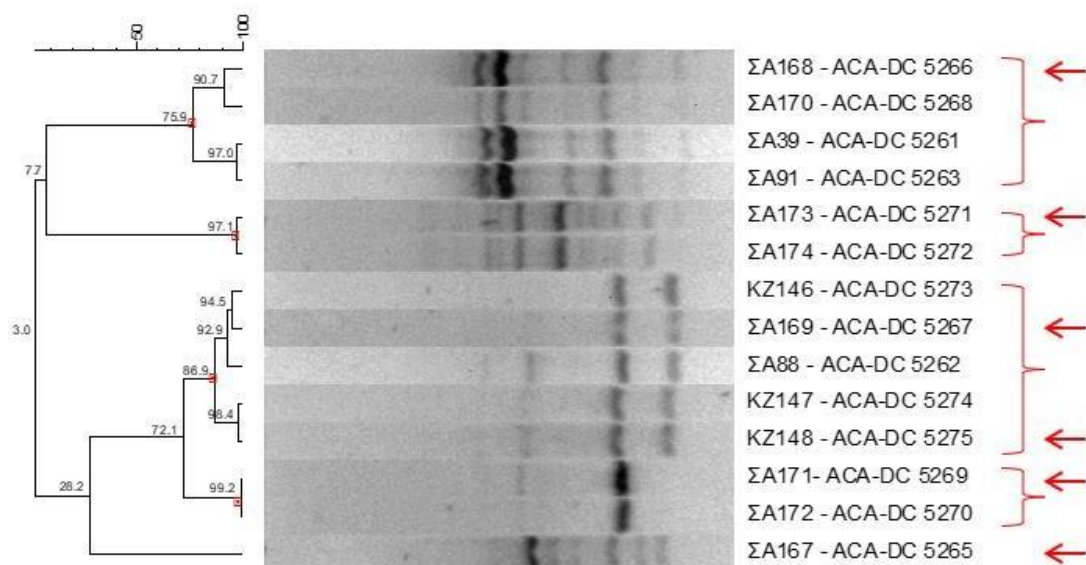
### 3.2 Μοριακή Ανάλυση δειγμάτων και ταυτοποίηση ζυμών

Αρχικά τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της REP-PCR για την διερεύνηση και ομαδοποίηση των ζυμών. Τα αποτελέσματα της REP-PCR εμφανίζονται στην Εικόνα 3.2



**Εικόνα 3.2** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της REP PCR

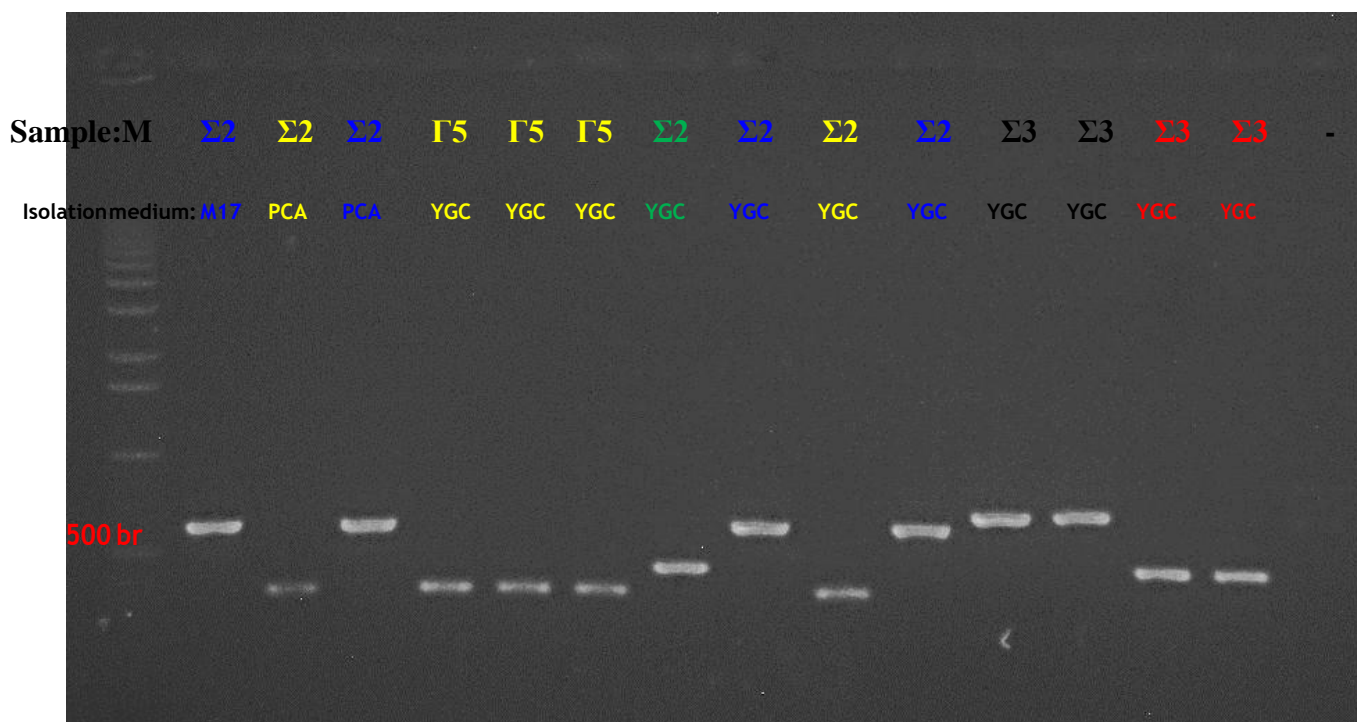
Έπειτα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. Το ηλεκτροφορητικό προφίλ φωτογραφήθηκε με τη βοήθεια ακτινοβολίας UV και οδηγήθηκε για διαφοροποίηση των στελεχών με τη χρήση Bionumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium) και τη βοήθεια του λογισμικού U.P.G.M.A για τη δημιουργία του δενδρογράμματος με βάση το ποσοστό ομοιότητας των στελεχών ζυμών όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3.



**Εικόνα 3.3** Δενδρογράμμα της ανάλυσης κατά συστάδες των 14 στελεχών ζυμών, με βάση το

ποσοστό ομοιότητας με χρήση του προγράμματος Bionumerics. Με τα βέλη σημειώνονται τα στελέχη που επιλέχθηκαν για να ταυτοποιηθούν.

Μετά την ομαδοποίηση, όπως παρουσιάζεται και στο δενδρόγραμμα οι ζύμες κατατάχτηκαν σε έξι ομάδες. Στη συνέχεια επιλέχθηκε μία ζύμη από κάθε ομάδα για την ενίσχυση της ITS περιοχής.



**Εικόνα 3.4** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS PCR

Αφού καθαρίστηκε το προϊόν της PCR, στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της αλληλούχησης και της ταυτοποίησης η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BLAST. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2

**Πίνακας 3.2** Αναλυτικά αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών ζυμών με τη χρήση του προγράμματος BLAST μετά την ενίσχυση της ITS περιοχής

Εκκινητής	Αριθμός απομόνωσης	Αριθμός ACA-DC	Ποσοστό Ταύτισης	Ζύμη
148 ITS4	KM 146	5275	99%-99%	<i>Geotrichum candidum</i>
			99%-99%	<i>Galactomyces geotrichum</i>
167 ITS4	ΣΑ 167	5265	99%-95%)	<i>Pichia fermentans</i>
167 ITS4	ΣΑ 167	5265	99%-93%)	<i>Pichia fermentans</i>
168 ITS4	ΣΑ 168	5266	100%-100%	<i>Candida zeylanoides</i>
169 ITS4	ΣΑ 169	5267	100%-100%	<i>Dipodascus australiensis</i>
			100%-100%	<i>Geotrichum candidum</i>
			98%-100%	<i>Galactomyces candidum</i>
171 ITS4	ΣΑ 171	5269	99%	<i>Kazachstania barnettii</i>
173 ITS4	ΣΑ 173	5271	100%	<i>Pichia fermentans</i>

Το *Geotrichum candidum* είναι μια πανταχού παρούσα ζύμη που συνήθως ενοφθαλμίζεται σε τυριά που έχουν ωριμάσει στην επιφάνεια για τη συμβολή της στη διαδικασία ωρίμανσης και στο σχηματισμό γεύσης. Στο δέρμα του τυριού, οι πρωτεολυτικές, αμινοπεπτιδικές και λιπολυτικές δραστηριότητες του *G. candidum* παράγουν αρκετές αρωματικές ενώσεις και μειώνουν το πίκρισμα (Boutrou and Guéguen 2005, Boutrou et al., 2006, Jollivet et al., 1994, Sacristan et al., 2012). Επιπλέον, το *G. candidum* βοηθά στην αλκαλοποίηση της επιφάνειας του τυριού μέσω γαλακτικού καταβολισμού και απελευθέρωσης αμμωνίας (Boutrou and Guéguen 2005, Marcellino et al., 2001). Αυτό προάγει την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης σε οξύ μικροχλωρίδας στην επιφάνεια του τυριού, ένα ουσιαστικό βήμα στην

διαδικασία ωρίμανσης (Boutrou and Guéguen 2005). Εκτός από τα στελέχη που εμβολιάστηκαν σκόπιμα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τυροκόμησης, μπορούν να αναπτυχθούν τυχαία στελέχη *G. candidum* στο τυρί (Lavoie et al., 2011). Τα στελέχη *G. candidum* παρουσιάζουν πολλά εξαρτώμενα από το στέλεχος χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των διμορφικών αποικιών μορφοτύπων (από τη μορφή ζυμομυκήτων χρώματος κρεμ ως τη λευκή μορφή που μοιάζει με μούχλα), με διαφορετικές μεταβολικές οδούς, και την ανοχή σε αλάτι (Boutrou and Guéguen 2005; Boutrou et al. 2006; Guéguen and Jacquet 1982, Νεωκόρος et al. 2011). Επιπλέον, άλλες μελέτες αναγνώρισαν τη γονιδιωματική ετερογένεια στο είδος *G. candidum*.

Η ταξινόμηση του γένους, *Geotrichum* (*Hemiascomycetes*) έχει μελετηθεί σε βάθος από τον Smith και τους συνεργάτες του σε μια σειρά δημοσιεύσεων (de Hoog et al 1986, Smith et al., 1995, 2000, Smith & Poot 1998, 2003, Naumov et al., 1999, Naumova et 2001). Σύμφωνα με την αναθεώρηση της ταξινόμησης με βάση της συγκρίσεις της ριβοσωμικής αλληλουχίας (18S, 26S, ITS) (De Hoog GS and Smith MT, 2004), οι οποίες οδήγησαν σε προτεινόμενες τροποποιήσεις των τελεομορφών (*teleomorph*)/ανομορφών (*anamorph*), δηλαδή τον αναπαραγωγικό τρόπο των γενών. Οι *Galactomyces* και *Dipodascus* συνδέθηκαν με τον τρόπο αναπαραγωγής του *Geotrichum* γεγονός το οποίο δικαιολογεί την ύπαρξη του *Dipodascus australiensis* στα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

Το στέλεχος *Pichia fermentans* έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ως συστατικό της μικροχλωρίδας στην κοπανιστή (Tzanetakakis et al. 1987), στο κεφίρ καθώς και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Rohm et al. 1992). Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει βρεθεί επίσης σε μελέτη στην οποία απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στελέχη ζυμών κατά την παρασκευή και την ωρίμανση του τυριού Cabrales, όπου βρέθηκε να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Alvarez-Martín et al., 2007).

Όσον αφορά το στέλεχος *Candida zeylanoides* το οποίο ταυτοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, έχει βρεθεί σε αρκετά μικρά ποσοστά σε αρκετές μελέτες (Corbo et

al., 2001, Cocolin et al., 2002, Borelli et al. 2006). Σε μια μελέτη σχετικά με την εμφάνιση ζυμομυκήτων στο τυρί Fiore Sardo αποδείχθηκε ότι τα *Candida zeylanoides*, υπήρχαν στο 7,7% των δειγμάτων γάλακτος προβάτου, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σε 38,4% στο τυρί 48 ωρών ωρίμανσης (Fadda et al., 2004). Η υψηλότερη ποσοστό που παρατηρείται σε αυτή τη μελέτη μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλή ανοχή σε χαμηλή θερμοκρασία αυτού του είδους (Kobatake et al., 1992, Ismail et al., 2000), θεωρώντας ότι τα δείγματα που αναλύθηκαν συλλέχθηκαν το χειμώνα.

Η παρουσία ζυμών που ανήκουν στο γένος *Kazachstania* έχει τεκμηριωθεί καλά σε προϊόντα τύπου κεφίρ (LatorreGarcia et al., 2007, Gao et al., 2012, Garofalo et al., 2015) και αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως το πλέον διαδεδομένο είδος ζυμομύκητα σε κεφίρ και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης με ανάλυση βασισμένη στην αλληλουχία 25 δειγμάτων διαφορετικής προέλευσης (Marsh et al., 2013). Σε άλλη μελέτη, η ζύμη *Kazachstan unispora* (συνώνυμο *Saccharomyces unisporus*) απομονώθηκε από δύο τύπους κεφίρ (Kalamaki and Angelidis, 2016) καθώς και άλλα προϊόντα ζύμωση όπως το Tarag (τύπος γιαουρτιού) και το Koumiss (τύπος ροφήματος) (Watanabe et al., 2008, Mu et al., 2012). Επιπλέον, η *Kazachstania barnettii* έχει βρεθεί σε ζυμώμενα προϊόντα ως μέρος της μικροχλωρίδας του κεφίρ, από τους Marsh et al. (2013) και τους Kalamaki and Angelidis, 2016.

Τα πιο διαδεδομένα είδη ζύμης που απομονώνονται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* (η τέλεια κατάσταση του *Candida kefyr*), *Yarrowia lypolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida famata* (η ατελής κατάσταση των *Debaryomyces hansenii*), *Candida diffluens*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Pichia anomala* και *Saccharomyces cerevisiae*, μεταξύ άλλων, (Suriyarachchi and Fleet, 1981, Jakobsen and Narvhus, 1996, Caggia et al. 2001, Minervini et al, 2001).

Η ανάπτυξη ζυμών στο γιαούρτι σχετίζεται με την ικανότητα αυτών των ειδών να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης, να ζυμώνουν τη λακτόζη και τη σακχαρόζη και να παράγουν λιπολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα που υδρολύουν το λίπος και τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Τα κύρια είδη ζυμών τα οποία απομονώνονται από τα γιούρτια είναι τα *Candida* spp. και *Kluyveromyces* spp. (Fleet, 1992), ενώ τα

γιαούρτια φρούτων, λόγω της προσθήκης ζάχαρης ή / και φρούτων, είναι επίσης επιρρεπή στην αλλοίωση που προκαλείται από το *Saccharomyces cerevisiae* (Viljoen, 2001).

Όσον αφορά το προϊόν της Κρητικής Στάκας, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες να έχει μελετηθεί, επομένως δεν υπάρχει σύγκριση ως προς τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Για το λόγο αυτό αντιμετωπίστηκε ως ζυμωμένη ξινή κρέμα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν παραπάνω με βάση μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση.

### 3.3 Βιοχημικές Ιδιότητες

Τα αποτελέσματα των ελέγχων που αφορούσαν τις βιοχημικές ιδιότητες των ζυμών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

**Πίνακα 3.3** Αναλυτικά αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων

Αριθμός απομόνωσης	Ζύμη	Πρωτεωλυτική Δράστικότητα	Ξυλανολυτική Δραστικότητα	Εστερολυτική Δραστικότητα	Πηκτινολυτική Δράση	Παραγωγή Λιπάσης
KM 146	<i>Geotrichum candidum</i>					
	<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	-	-	-	+
ΣΑ 167	<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-	-	-
ΣΑ 168	<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	
ΣΑ 169	<i>Dipodascus australiensis</i>					
	<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	+
	<i>Galactomyces candidum</i>					
ΣΑ 171	<i>Kazachstan ia barnettii</i>	-	-	-	-	-
ΣΑ 173	<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-	-	-



Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα τα αποτελέσματα που αφορούσαν τις βιοχημικές ιδιότητες ήταν αρνητικά για όλα τα στελέχη ζυμών ως προς την πρωτεολυτική, εστερολυτική και πηκτινολυτική ενεργότητα, την ξυνολυτική δράση καθώς και την παραγωγή βιογενών αμινών. Ωστόσο, το στέλεχος *Candida zeylanoides* εμφανίστηκε να είναι θετικό στο καταβολισμού του κιτρικού οξέος. Σε προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί το συγκεκριμένο ΕΙΔΟΣ ανήκει στους ζυμομήκυτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για παραγωγή κιτρικού οξέος (Roehr et al., 1993, Grewal and Kalra, 1995).

Τα αποτελέσματα της λιπόλυσης ήταν θετικά για τα στελέχη ΣΑ 169 *Geotrichum candidum* και *Galactomyces geotrihum*, (Εικόνα 3.4)



**Εικόνα 3.5** Θετικό στέλεχος ΣΑ 169 *Geotrichum candidum* και *Galactomyces geotrihum* στην παραγωγή λιπάσης

γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται για ζυμομένα τρόφιμα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Οι λιπάσες από *Geotrichum candidum*, μια ομάδα μεγαλομοριακών λιπασών (MW ~ 60 kDa), παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις ακετυλοχολινεστεράσες (Cygler et al, 1993). Η εξωκυτταρική λιπάση που εκκρίνεται

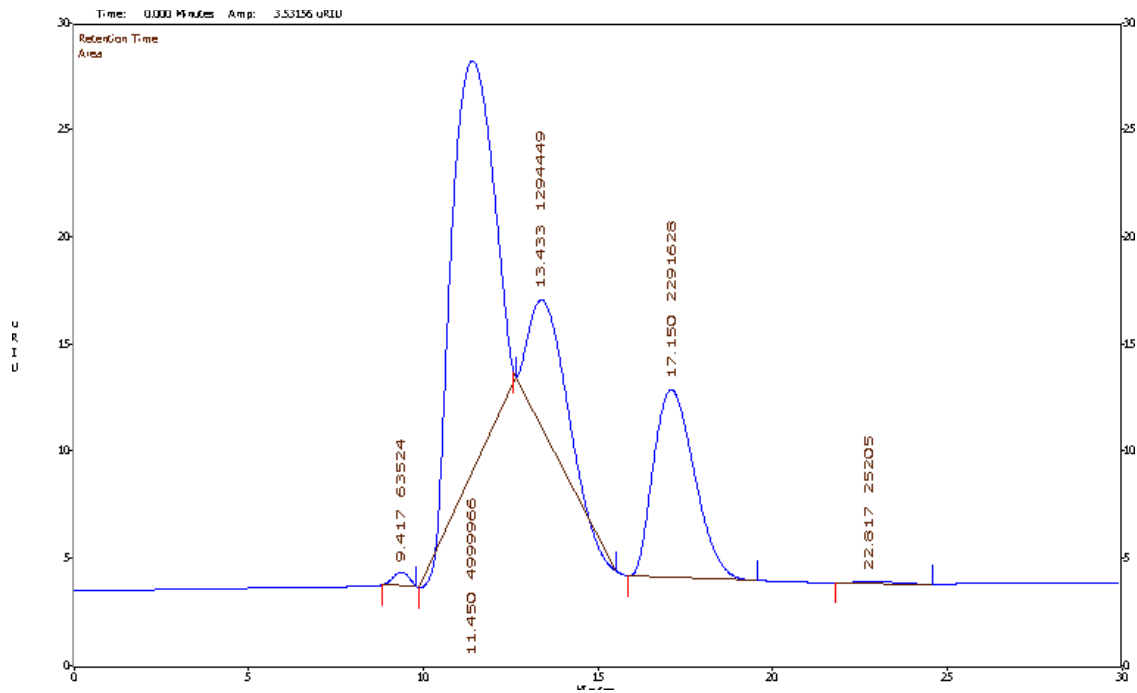
από το *Geotrichum candidum* έχει μελετηθεί πιο συχνά λόγω της ικανότητάς της να υδρολύει το λίπος στα γαλακτοκομικά προϊόντα και λόγω της εξειδίκευσής της για τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, (Alford et al. 1964). Το *G. candidum* είναι πιθανόν υπεύθυνο για τη μεταβολή των προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων υπέρ των ακόρεστων οξέων κατά την ωρίμανση του τυριού. (Kuzdzal and Kuzdzal-Savoie, 1966).

Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δραστηριότητα των λιπασών του *Geotrichum candidum* έχουν δοθεί μελετώντας την ωρίμανση του τυριού Armada όπου το *Geotrichum candidum* είναι ένα από τα κύρια είδη ζυμομύκητα, που κυριαρχούν στα πρώτα στάδια ωρίμανσης (Tornadijo et al., 1998). Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη πολύ έντονης λιπόλυσης, πολύ υψηλότερης από αυτή που περιγράφεται αλλού για άλλες ποικιλίες τυριού που έχουν ωριμάσει και είναι συγκρίσιμα με εκείνα που παρατηρούνται στα μπλε τυριά. Το προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παρατηρούνται στο τυρί Armada καθ' όλη την ωρίμανση (Fresno et al., 1997) και η αναλογία C16 / C18: 1 των κύριων ελεύθερων λιπαρών οξέων σε αυτό το τυρί είναι πολύ χαμηλή (0,5) με περισσότερα C18: 1 κατά τις πρώτες εβδομάδες ωρίμανσης όταν επικρατεί το *Geotrichum candidum*, το οποίο συμφωνεί με τη δραστηριότητα λιπάσης του. Αυτό το αποτέλεσμα υπογραμμίζει την ιδιαίτερη δραστηριότητα της λιπάσης του *Geotrichum candidum*.

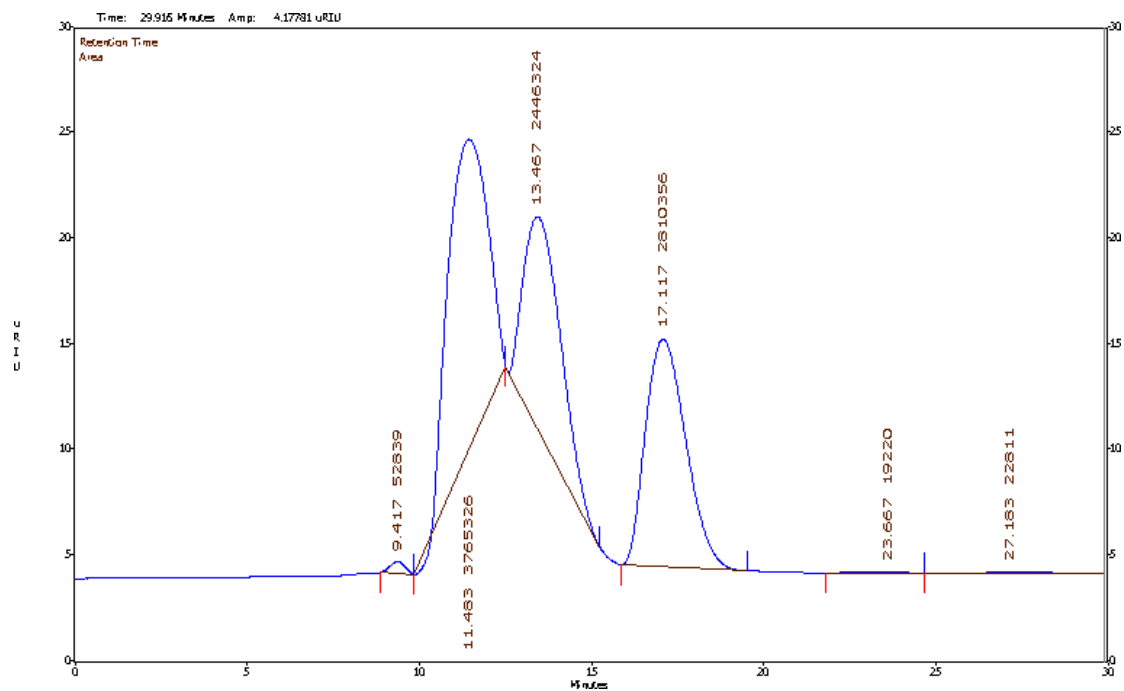
### **3.4 Αποτελέσματα φυσικοχημικών χαρακτηριστικών**

#### **3.4.1 Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC**

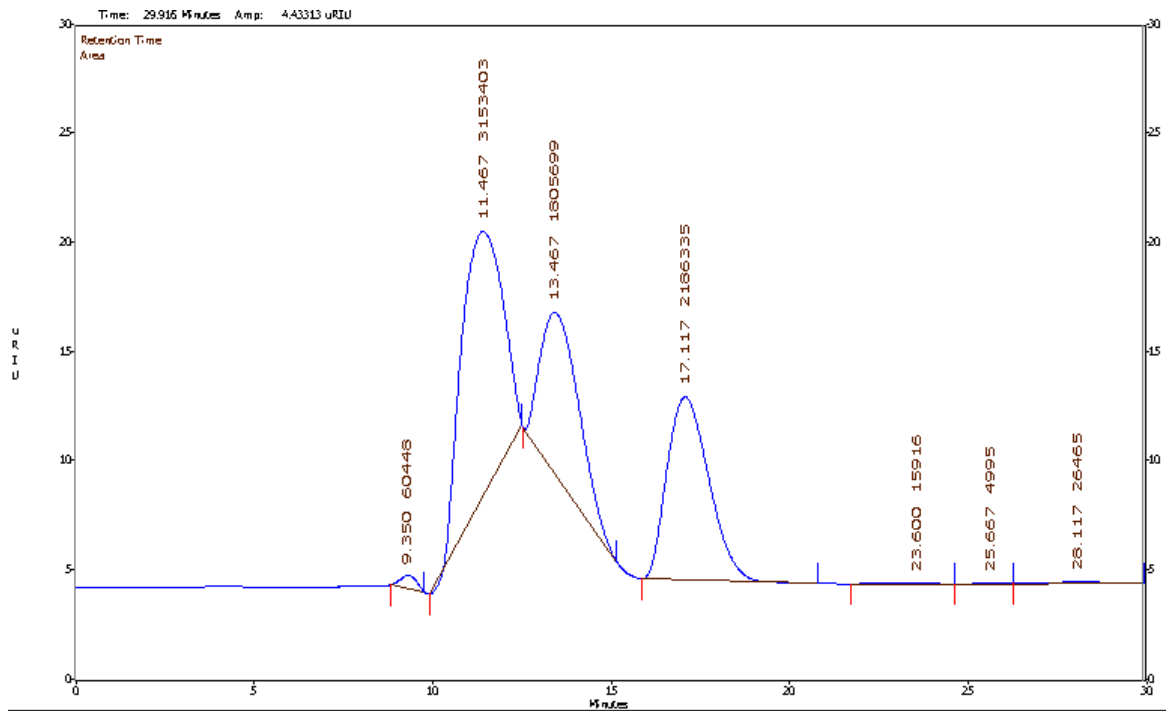
Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών οξέων και σακχάρων στα δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) και παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα –με τους χρόνους κατακράτησης (retention time)  $t_R$ .



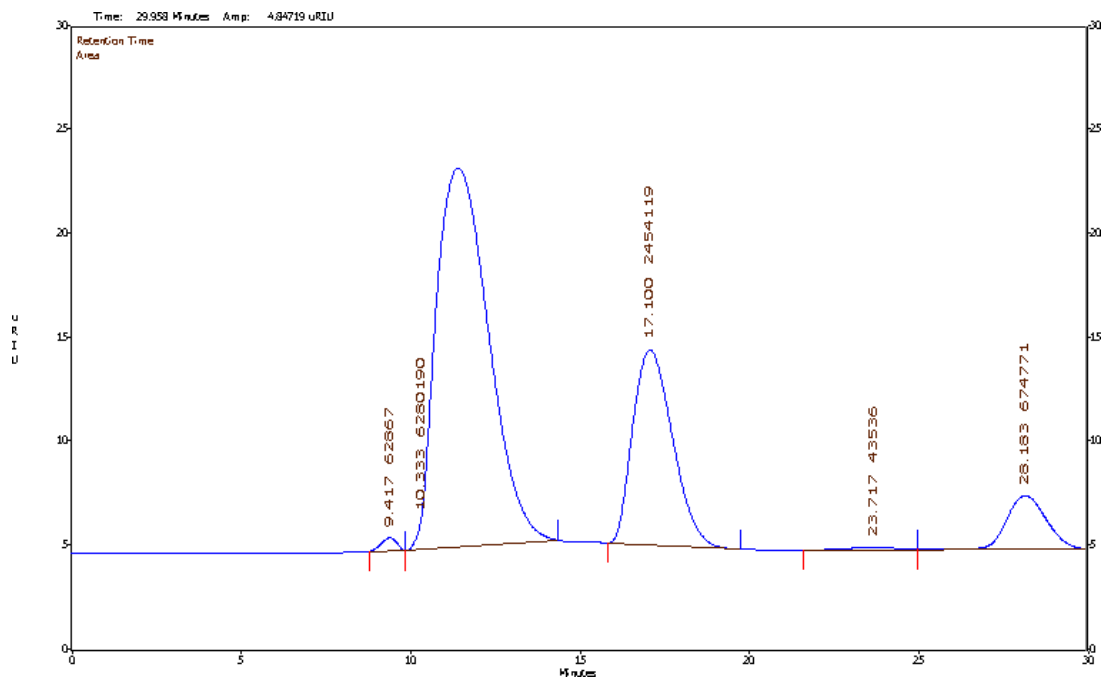
Σχήμα 3.1 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 1



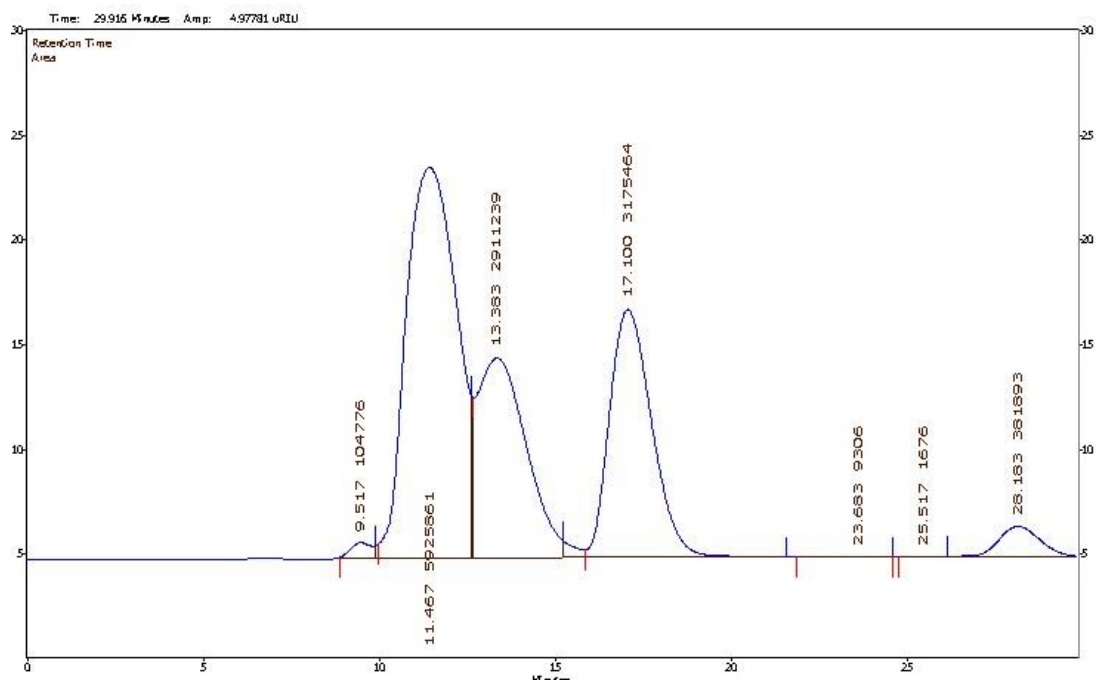
Σχήμα 3.2 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 2



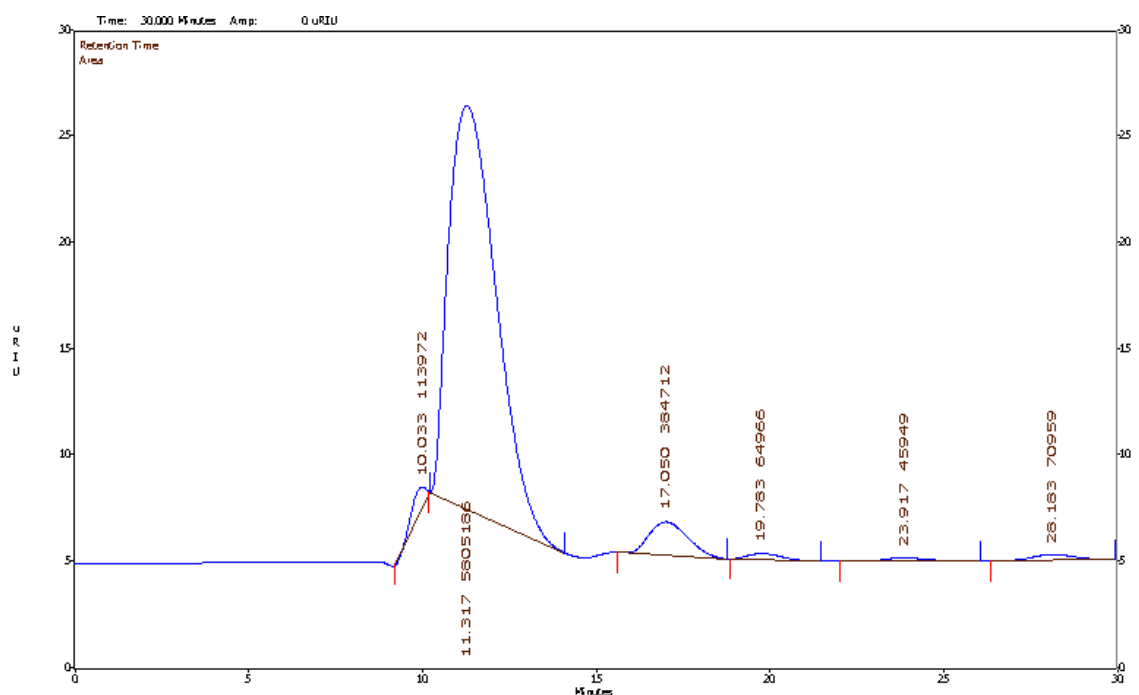
Σχήμα 3.3 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 3



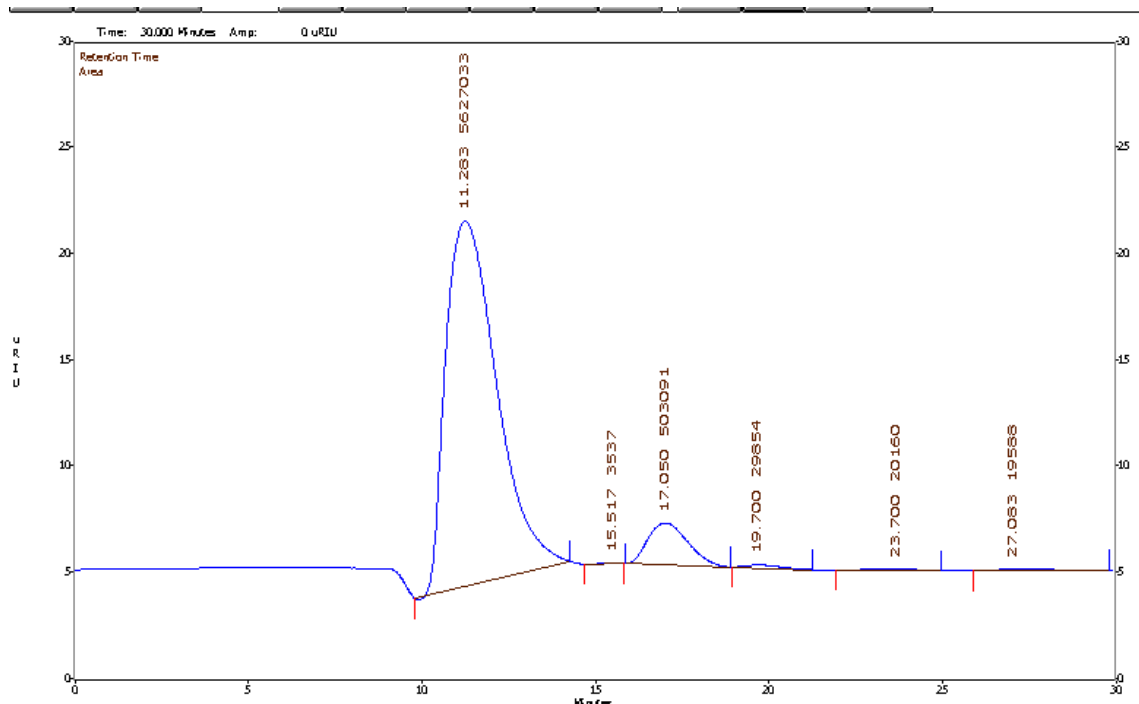
Σχήμα 3.4 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 4



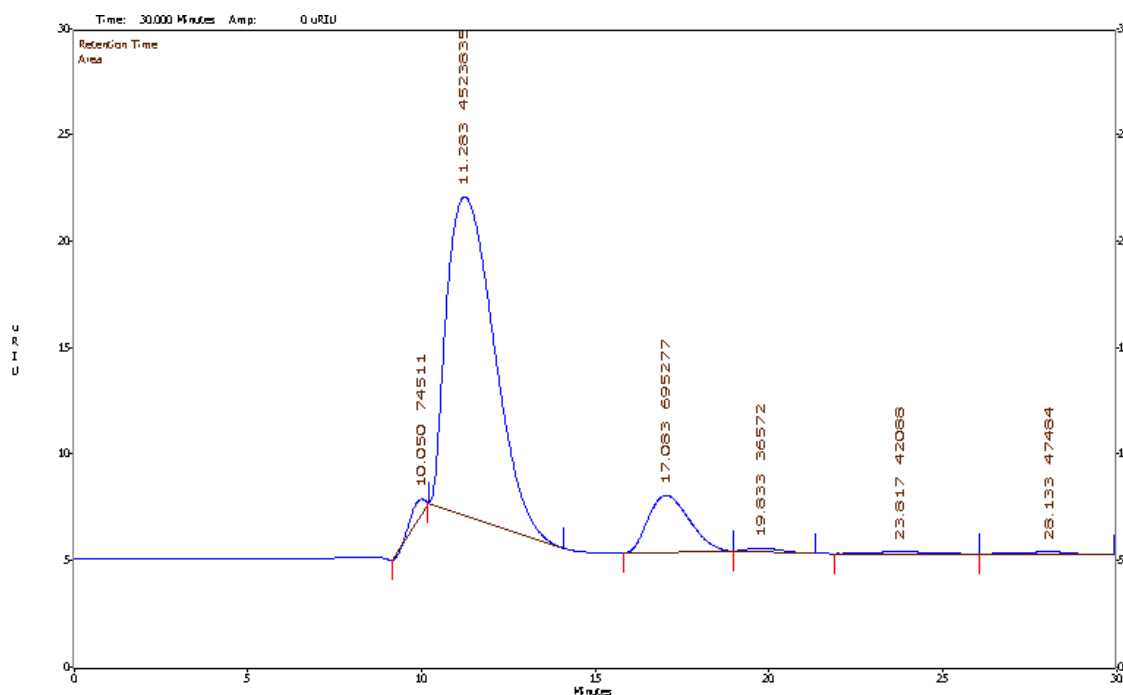
Σχήμα 3.5 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Γιαούρτι 5



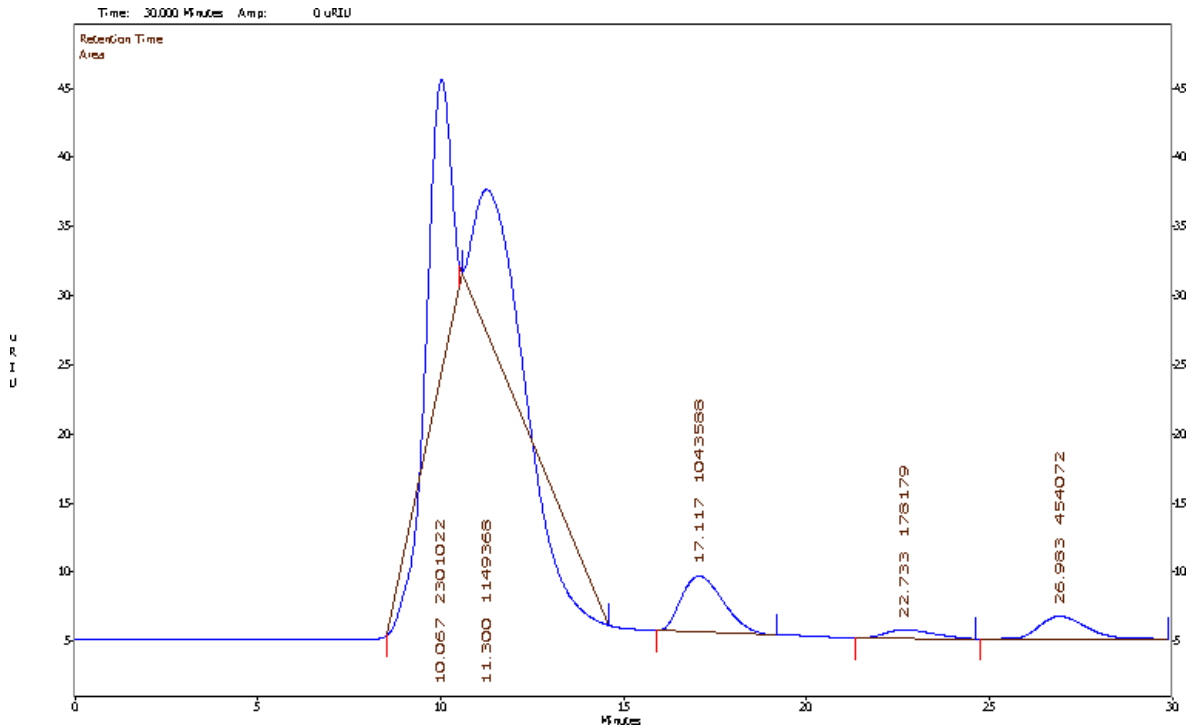
Σχήμα 3.6 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 1



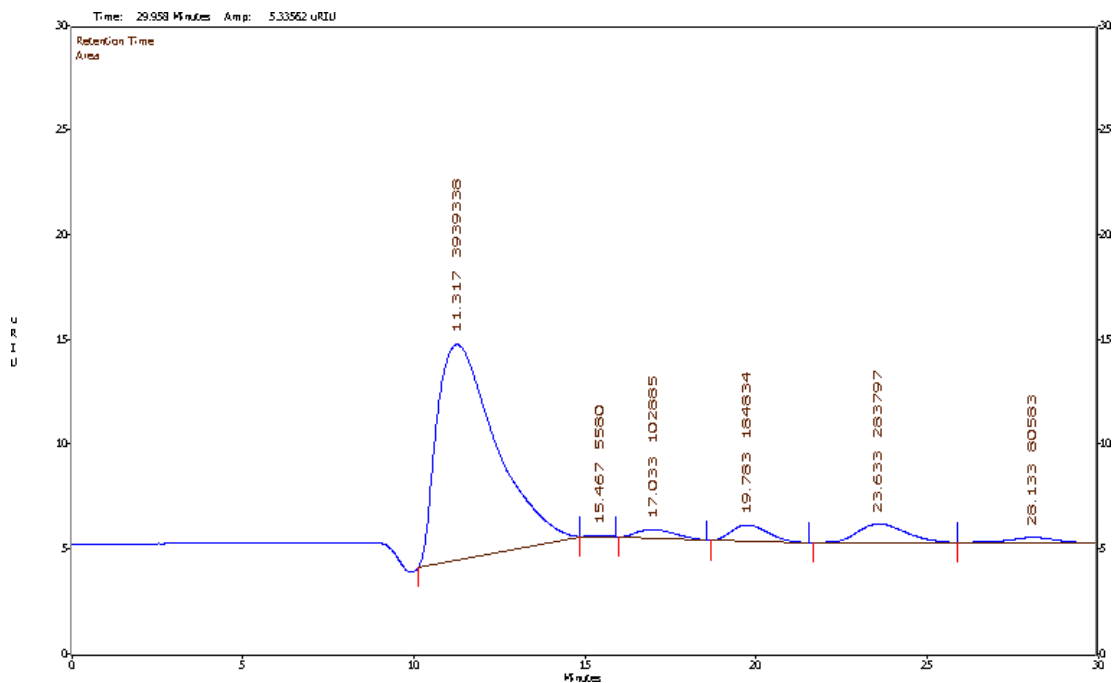
Σχήμα 3.7 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 2



Σχήμα 3.8 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 3



Σχήμα 3.9 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 4



Σχήμα 3.10 Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα Στάκα 5

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενώσεων, πραγματοποιήθηκε βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής. Αυτό είναι ανάλογο των ενώσεων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας πρότυπα της ουσίας διαφορετικής συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις των ενώσεων παρουσιάζονται για κάθε δείγμα στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4** Ποσοτικός προσδιορισμός ενώσεων ανά δείγμα σε g/kg

	Λακτόζη (11,3 min)	Γαλακτόζη (13,6 min)	Ηλεκτρικό οξύ (15,6 min)	Γαλακτικό οξύ (17,1 min)	Οξικό οξύ (20,01 min)	Προπιονικό οξύ (22,7 min)	Βουτυρικό οξύ (26,8 min)	Αιθανόλη (28,6min)
Δείγμα	Συγκέντρωση (g/kg)							
Γιαούρτι 1	25,80	8,95		34,66		0,00	0,01	
Γιαούρτι 2	21,75	11,40		41,72			0,07	
Γιαούρτι 3	16,95	8,53	0,19	32,10				0,15
Γιαούρτι 4	22,02			35,75				3,70
Γιαούρτι 5	20,00	6,30	0,34	43,76				2,10
Στάκα 1	24,74		0,28	8,06	1,35			0,39
Στάκα 2	17,18			6,65	0,95		0,06	
Στάκα 3	18,53			10,01	0,77			0,26
Στάκα 4	39,98		0,12	16,29		1,72	1,28	
Στάκα 5	13,59			2,0	1,62			0,20

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα τα δείγματα γιουρτιού βρέθηκε λακτόζη, γαλακτόζη, γαλακτικό οξύ και αιθανόλη γεγονός το οποίο είναι λογικό σύμφωνα με άλλες μελέτες.



Οι κυριότερες ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο γιαούρτι είναι υδατάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, εστέρες, λακτόνες, συστατικά που περιέχουν θείο, πυραζίνες και παράγωγα του φουρανίου (Ott et al., 1997; Marshall, 1982). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τα συστατικά του γιαουρτιού μπορούν να μεταβληθούν ανάλογα με τις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν, τη σύσταση του προϊόντος και τις συνθήκες της αποθήκευσης (Brauss et al., 1999; Tamime and Deeth, 1980; Ulberth and Kneifel, 1992).

Το γαλακτικό οξύ, καθώς και άλλα οξέα παράγονται συνήθως με υδρόλυση λίπους γάλακτος ή βακτηριακή ανάπτυξη (Marsili et al., 1981) και διαδραματίζουν συγκεκριμένους ρόλους στην διαμόρφωση του γιαουρτιού. Το γαλακτικό οξύ είναι η πηγή γεύσης και λειτουργικότητας για πολλά ζυμωμένα προϊόντα και είναι υπεύθυνο για τη δροσερή ξινή γεύση του γιαουρτιού (Panagiotidis and Tzia, 2001). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής γιαουρτιού ποσοστό περίπου 20 – 40% της λακτόζης που υπάρχει στο γάλα, μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα του γιαουρτιού σε γαλακτικό οξύ να είναι περίπου 0,9%.

Μια άλλη ομάδα ουσιών που συνεισφέρουν στο άρωμα και τη γεύση του γιαουρτιού είναι οι αλκοόλες και κυρίως η αιθανόλη, η οποία είναι το τελικό προϊόν της αποδόμησης της γλυκόζης με αλκοολική ζύμωση ( $C_6H_{12}O_6$  (γλυκόζη)  $\rightarrow$   $2CH_3CH_2OH$  (αιθανόλη) +  $2CO_2$  (διοξείδιο του άνθρακα)) και του καταβολισμού των αμινοξέων (Guler, 2007; Urbach, 1995). Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αγελαδινό γιαούρτι κυμαίνεται μεταξύ 0,2 και 9,9 mg/kg (Pourahmad and Assadi, 2005; Hild, 1979; Ott et al., 1999; Rysstad and Abrahamsen, 1987), ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση για το αιγοπρόβειο γιαούρτι είναι χαμηλότερη (Georgala et al., 1995; Rysstad and Abrahamsen, 1987).

Στο γιαούρτι απαντώνται επίσης οι εστέρες που αντιστοιχούν στα οξέα και τις αλκοόλες που υπάρχουν στο γάλα και το ίδιο το γιαούρτι. Οι αιθυλικοί εστέρες που προέρχονται από την ενζυμική ή χημική εστεροποίηση των οξέων με αιθανόλη, διαθέτουν μια ευχάριστη και γλυκιά γεύση με φρουτώδεις τόνους. Οι περισσότεροι εστέρες έχουν μια φρουτώδη γεύση και συμβάλλουν στο άρωμα και τη γεύση με την ελαχιστοποίηση της πικράδας που μεταδίδεται από λιπαρά οξέα και αμίνες (Guler, 2007; Molimard and Spinnler, 1996).

Όσον αφορά την Κρητική Στάκα η οποία αντιμετωπίστηκε ως ξινή κρέμα παρουσίασε από τα αποτελέσματα επίσης λακτόζη και γαλακτικό οξύ καθώς επίσης

ηλεκτρικό, οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ.

Το οξικό, βουτυρικό, κιτρικό, γαλακτικό, προπιονικό, και ουρικό είναι τα πιο κοινά οργανικά οξέα στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την εξέταση των συγκεντρώσεων αυτών των οργανικών οξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβανομένου του τυριού (Izco κ.ά., 2002, Tormo και Izco, 2004), γιαουρτιού (Marsili et al., 1981, Bevilacqua and Califano, 1989; Fernandez-Garcia and McGregor, 1994), κεφίρ (Marsili et al., 1981) και ξινή κρέμα (Marsili et al., 1981).

Τα περισσότερα από αυτά τα οργανικά οξέα δεν είναι πτητικά και ως εκ τούτου δεν είναι αρωματικά δραστικά, αλλά εμφανίζουν ξεχωριστά προφίλ γεύσης (Marsili et al., 1981). Οι ειδικές συνεισφορές τους στη γεύση ξινή κρέμα ή την αποδοχή δεν είναι γνωστές.

### **3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldhal**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας πραγματοποιήθηκε αρχικά προσδιορισμός ολικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl (1883), όπως έχει σήμερα τροποποιηθεί. Στη μέθοδο αυτή το τρόφιμο που περιέχει πρωτεΐνη, διασπάται με χρήση πυκνού θεικού οξέος παρουσία καταλύτου, κατά τη διαδικασία δε αυτή το άζωτο ανάγεται προς αμμωνία, που προσδιορίζεται με τιτλοδότηση. Το ποσό αζώτου πολλαπλασιαζόμενο επί 6,38 (σταθερά για τα γαλακτομικά προϊόντα) δίνει το ολικό ποσοστό πρωτεΐνης. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.5) παρουσιάζονται τα ποσοστά αζώτου καθώς και το ολικό ποσοστό πρωτεϊνών ανά δείγμα.

**Πίνακας 3.5** Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε δείγματα γιαούρτης και Στάκας

Δείγμα	Ολικό άζωτο (% w/w)	Πρωτεΐνη (% w/w)
Γιαούρτι 1	1,209825	7,718686
Γιαούρτι 2	1,260336	8,040943
Γιαούρτι 3	0,789222	5,035236
Γιαούρτι 4	1,131286	7,217605
Γιαούρτι 5	0,955749	6,097679
Στάκα 1	0,353216	2,25352
Στάκα 2	0,408154	2,60402
Στάκα 3	0,465965	2,972854
Στάκα 4	2,515247	16,04727
Στάκα 5	0,9958	6,353202

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται πως κατά κύριο λόγο τα δείγματα γιαούρτης παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης. Αξιοσημείωτο είναι δε το ποσοστό που παρουσιάζει το δείγμα Στάκα 4 το οποίο διαφέρει σε μεγάλο βαθμό έναντι των υπολοίπων δειγμάτων. Πρόκειται για ένα δείγμα σπιτικής, ψημένης Στάκας που ενδεχομένως το υψηλό αυτό ποσοστό να οφείλεται σε κάποια μετουσίωση των πρωτεϊνών του συγκεκριμένου δείγματος η σε υπερεκτίμηση της πραγματικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, λόγω παρουσίας λόγω παρουσίας μη αζωτούχων ενώσεων όπως έχει αναφερθεί από τους Moller, 2010a, van Camp and Huyghebaert, 1996, Yuan et al., 2010).

### 3.4.3 Υγρασία

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση της υγρασίας από τα δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.6)

**Πίνακας 3.6** Αποτελέσματα υγρασίας δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

Δείγμα	Υγρασία % w/w	Ξηρά ουσία w/w
Γιαούρτι 1	84,08	15,92
Γιαούρτι 2	81,57	18,43
Γιαούρτι 3	82,29	17,71
Γιαούρτι 4	76,10	23,90
Γιαούρτι 5	82,67	17,33
Στάκα 1	34,52	65,48
Στάκα 2	29,54	70,46
Στάκα 3	36,43	63,57
Στάκα 4	27,05	72,95
Στάκα 5	48,25	51,75

Σύμφωνα με τον πίνακα παρατηρείται πως τα δείγματα γιαουρτιού κυμάνθηκαν σε αρκετά υψηλότερες τιμές από αυτά της Κρητικής Στάκας, γεγονός το οποίο είναι λογικό λόγω της φύσης των δύο προϊόντων.

### 3.4.4 Τέφρα

**Πίνακας 3.7** Αποτελέσματα TEFRA δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

Δείγμα	Τέφρα MONADES
Γιαούρτι 1	0,82
Γιαούρτι 2	0,93
Γιαούρτι 3	0,90
Γιαούρτι 4	0,93
Γιαούρτι 5	0,94
Στάκα 1	0,27
Στάκα 2	0,21
Στάκα 3	0,22
Στάκα 4	3,42
Στάκα 5	2,15

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζεται μία μεγάλη διαφορά μεταξύ των δειγμάτων γιαούρτης και Κρητικής Στάκας. Με τα πρώτα να κυμαίνονται σε υψηλές τιμές ενώ τα δεύτερα κυμανθήκαν σε αρκετά χαμηλότερες τιμές.

### 3.4.5 Λίπος

**Πίνακας 3.8** Αποτελέσματα λίπους δειγμάτων γιαούρτης και Στάκας

<b>Δείγμα</b>	<b>Λίπος MONADES</b>
<b>Γιαούρτι 1</b>	5,89
<b>Γιαούρτι 2</b>	5,92
<b>Γιαούρτι 3</b>	7,54
<b>Γιαούρτι 4</b>	8,43
<b>Γιαούρτι 5</b>	6,09
<b>Στάκα 1</b>	41,87
<b>Στάκα 2</b>	46,47
<b>Στάκα 3</b>	40,57
<b>Στάκα 4</b>	32,68
<b>Στάκα 5</b>	30,31

Αρχικά, όσον αφορά τα γιαούρτια, προέρχονται κυρίως από γάλα πρόβειο και αναφέρονται ως παραδοσιακά. Τα συγκεκριμένα δείγματα κυμαίνονται σε χαμηλότερες τιμές από αυτές που αναφέρονται στον ΚΩΔΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΠΟΤΩΝ & ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΩΝ ΚΟΙΝΗΣ ΧΡΗΣΗΣ, στο Άρθρο 82 το οποίο αναφέρει πως τα γιαούρτια τα οποία προέρχονται από αγνό γάλα πρόβειο θα πρέπει να έχουν λιποπεριεκτικότητα 8%.

Τα δείγματα Κρητικής Στάκας από την άλλη μεριά, κυμαίνονται σε πολύ υψηλά επίπεδα λίπους. Λόγω της έλλειψης βιβλιογραφίας, θεωρώντας την Κρητική Στάκα ως ζυμωμένη ξινή κρέμα οι τιμές λίπους των συγκεκριμένων δειγμάτων είναι αρκετά υψηλότερες από δείγματα ξινή κρέμας που έχουν μελετηθεί σε άλλες έρευνες (Shepard et al., 2013) όπου οι πλήρεις σε λίπος κρέμες κυμαίνονται περίπου στο 22

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική μελέτη εξετάστηκαν άγρια στελέχη ζυμών τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα παραδοσιακής γιαούρτης και Κρητικής Στάκας. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης ήταν απολύτως ικανοποιητικά με ποσοστό ταύτισης 99- 100 % με τα είδη *Geotrichum candidum*, *Galactomyces geotrichum* να είναι τα κύρια είδη ζυμών τόσο για τη γιαούρτη όσο και για τη Στάκα, ενώ για τη Στάκα βρέθηκαν και άλλοι ζυμομύκητες που αποτέλεσαν μέρος της μικροχλωρίδας της και ήταν οι *Pichia fermentans*, *Candida zeylanoides* *Dipodascus australiensis*, *Kazachstania barnettii*. Τα αποτελέσματα συμβάδιζαν με αυτά άλλων μελετών καθιστώντας τους συγκεκριμένους ζυμομύκητες χαρακτηριστικούς όσον αφορά τα γαλακτοκομικά προϊόντα και ιδιαίτερα τα ζυμωμένα. Σε αυτούς οφείλονται πολλά από τα χαρακτηριστικά, όπως είναι το χρώμα, η υφή, η γεύση και το άρωμα τα οποία προσδίδονται σε κάθε γαλακτοκομικό προϊόν και το κάνουν να ξεχωρίζει.

Ως προς τις βιοχημικές ιδιότητες, τα αποτελέσματα κατά κύριο λόγο ήταν αρνητικά για τα περισσότερα στελέχη πέραν του *Geotrichum candidum*, *Galactomyces geotrichum* ως προς την παραγωγή λιπάσης. Επίσης τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία αν και για τους τελευταίους μικροοργανισμούς θα περιμέναμε να είναι θετικοί στον έλεγχο πρωτεόλυσης μιας και αναφέρεται ότι έχουν υψηλή πρωτεολυτική ενεργότητα στα γαλακτοκομικά προϊόντα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Τέλος, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων κυμανθήκαν στις αναμενόμενες τιμές, αξιοσημείωτο όμως ήταν το ποσοστό πρωτεΐνης το οποίο περιείχε το δείγμα Στάκα 4, το οποίο αναφερόταν σε δείγμα παραδοσιακής, ψημένης σπιτικής Στάκας και κυμάνθηκε σε ποσοστό 16 %.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την ταυτοποίηση των άγριων στελεχών ζυμών και της μελέτης των βιοχημικών τους ιδιοτήτων συμβάδιζαν με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία όσον αφορά τα δείγματα γιαούρτης καθώς αποτέλεσαν και μια αρχική μελέτη όσον αφορά το προϊόν της Κρητικής Στάκας. Περαιτέρω μελέτη κρίνεται απαραίτητη για την πλήρη κατανόηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων του προϊόντος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη Βιβλιογραφία

- ❖ Anderson, M. M. and McCarty, R. E. 1972. Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6G. *The Journal of Lipid Research* 45, 260-270.
- ❖ Anifantakis, E. M. and Moatsou, G. 2006. *Feta and Other Balkan Cheeses*. Blackwell Publishing Ltd. 43-76.
- ❖ Anifantakis, E. M. 1991. Traditional Feta cheese. In: R.K. Robinson, A.Y. Tamine (Eds.) *Feta and Related Cheese*, 46-49. New York, NY, USA: Ellis Horwood.
- ❖ Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D. and Santos, D. 2016. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 223, 1-8.
- ❖ Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A.A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 407-415
- ❖ Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Franco, G.R., Rosa, C.A., 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 1115–1119.
- ❖ Brejning, J., Arneborg, N. & Jespersen, L., 2005. Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing

- yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 98, 261-271.
- ❖ Burnett GS, Neil EL 1977: A note on the effect of probioticum feed additive on the live-weight gain, feed conversion and carcass quality of bacon pigs. *Animal Production* 25, 95–98.
  - ❖ Bylund G. 1995. *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden
  - ❖ Cadirci, B. H. and Yasa, I. 2010. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64, 155-161.
  - ❖ C. Andrighetto, E. Psomas, N. Tzanetakis, G. Suzzi and A. Lombardi 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products, *Letters in Applied Microbiology*, 30, 5–9
  - ❖ Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR– DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12, 407–411.
  - ❖ Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M., 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* 69, 147–152
  - ❖ Cromie, S. J., Giles, J. E., & Dullely, J. R. (1987). Effect of elevated temperature on the microflora of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 54, 69–76.
  - ❖ De Hoog GS, Smith MT 2004. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Stud Mycol* 50:489–515



- ❖ Dimitrellou, D., Kandyli, P., Kourkoutas, Y., Koutinas, A.A., & Kanellaki, M. 2009. Evaluation of thermally-dried *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Chemistry*, 115, 691–696
- ❖ Dluzewski, M., Bruderer, G., 1963. Proteolytic activity of *Oospora lactis*. *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences*, 221 – 225.
- ❖ Dufour, J. et al. (2003), *Yeast in foods*, Woodhead, Κέμπριτζ.
- ❖ Dugan, F.M. (2009), «Dregs of our Forgotten Ancestors», *Fungi*, vol. 2, pp. 16-39.
- ❖ Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., Cosentino, S., 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology* 95, 51–59.
- ❖ FAO/WHO, 1977*a*. Code of principles concerning milk and milk products. Draft standard for yoghurt and sweetened yoghurt. (standard No A-11a, Step7)
- ❖ Fernández-Espinar M.T., Martorell P., De Ilanos R. and Querol Amparo 2006. *Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages*, *Yeasts in Food and Beverages* (pp.55-82)
- ❖ Fernandes, C.F., Dubash, P.J., & Walker, C.E. (1985). Accelerated breadmaking process at two fermentation temperatures. *Cereal Chemistry*, 62, 413-415.
- ❖ Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Bernado, A., Gonzales-Prieto, J., 1997. Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat cheese (Armada variety). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, 148

- ❖ Gao J, Gu F, Abdella N H, Ruan H and He G 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *Journal of Food Science* 77 M425–M433
- ❖ Garofalo C, Osimani A, Milanovic V et al. (2015) Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* 49 123–133
- ❖ Georgalaki M. D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E. S., Vuyst, L., Kalantzopoulos and E. Tsakalidou. 2000. Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasserli cheese. *Journal of Applied Microbiology* 88, 817-825.
- ❖ Goddik L. 2012. Sour Cream and Crème Fraîche
- ❖ Grewal HS, Kalra KL. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*. 1995;13(2):209-234.
- ❖ Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. and Bradoo, S. 2003. Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 63-71
- ❖ Helen Rawsthorne, Trevor G. Phister 2006. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices, *International Journal of Food Microbiology* 112, 1–7
- ❖ Hernandez, A., Martín, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F. and Córdoba, M. G. 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology* 24, 346-351.

- ❖ Hernandez, A., Martin, A., Cordoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E. and Perez-Nevado, F. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology* 121, 178-188.
  
- ❖ Hogarty Steven L. and Frank Joseph F. 1982. Low-Temperature Activity of Lactic Streptococci Isolated from Cultured Buttermilk, *Journal of Food Protection*, Vol. 45, No. 13, Pages 1208-1211
  
- ❖ Fernandez Diez, M. J., Castro Ramos, R., Garrido Fernandez, A., Gonzalez Cancho, F., Gonzalez Pellisso, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Minguez Mosquera, M. I., Rejano Navarro, L., Duran Quintana, M. C., Sanchez Roldan, F., Garcia Garcia, P. and Castro G. M. A. 1985. *Biotechnologia de la aceituna de mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Instituto de la Grasa, Madrid-Sevilla, Spain.
  
- ❖ Fernández-Espinar, M.T., Martorell, P., De Llanos, R., Querol, A., 2006. Molecular methods to identify and characterise yeast in foods and beverages. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *The Yeast Handbook*. Springer, Berlin.
  
- ❖ Fleet G. H. 1990. Food spoilage yeasts. In: Spencer J. F. T. & Spencer D. M. (Eds.), *Yeast Technology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 124-166

- ❖ Fryer TF (1970) J Dairy Res Vol 37 pp. 9–15
- ❖ Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., & Certel, M. (2005). Sourdoughbread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40, 691–697
- ❖ Hutkins Robert W, 2001. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*
- ❖ Ismail, S.A.S., Deak, T., Abd El-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M., Beuchat, L.R., 2000. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 62, 113–121.
- ❖ Jahan, N., Azmuda, N., & Khan, A.R. 2007. Isolation and identification of indigenous bakers' yeast. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24, 65-66.
- ❖ Kobatake, M., Kreger-vanRij, N.J.W., Placido, M.T., van Uden, N., 1992. Isolation of proteolytic psychrotrophic yeasts from fresh raw seafoods. *Letters in Applied Microbiology* 14, 37–42.
- ❖ Kollaritsch van H, Holst H, Grobara P, Wiedermann G. Prophylaxe des Reisediarrhoe mit *Saccharomyces boulardii*. (Prevention of traveler's diarrhea by *Saccharomyces boulardii*. Results of a placebo-controlled double-blind study.) *Fortschritte der Medizin* 1993; 111:153-6
- ❖ Kopsahelis, N., Nisiotou, A., Kourkoutas, Y., Panas, P., Nychas, G. J. E. and Kanellaki, M. 2009. Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature

range. *Bioresource Technology* 100, 4854-4862.

- ❖ Korabecna M. 2007. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Mendez-Vilas (Ed), 783-787.
- ❖ Kurtzman Cletus and Fell Jack W. 2006. *Yeast Systematics and Phylogeny—Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp.11-30)
- ❖ Kusachi, M. (1981). Use of lactic yeasts in confectionary and bread. *Nyu Fudo Indasutori*, 23, 24-28
- ❖ Kuzdzal, W., Kuzdzal-Savoie, S., 1966. Etude compare'e des acides gras non volatils libres et este'rie's dans les fromages, pp. 335 – 342.
- ❖ Latorre-Garcia L, del Castillo-Agudo L and Polaina J 2007. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 785–791.
- ❖ L. C. Laleye, R. E. Simard, B. -H. Lee, R. A. Holley, and R. N. Giroux (1987) Involvement of Heterofermentative Lactobacilli in Development of Open Texture in Cheeses. *Journal of Food Protection*: December 1987, Vol. 50, No. 12, pp. 1009-1012.
- ❖ Marsh A J, O'Sullivan O, Hill C, Ross R P and Cotter P D 2013. Sequence-based

analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. PLoS ONE 8 e69371.

- ❖ Martley, F.G. and Crow, V.L. (1993) Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* 3, 461±483.
- ❖ Mary Kalamaki and Apostolos Angelidis 2016. Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir, *International Journal of Dairy Tachnology*
- ❖ Mazzucotelli, C. A., Ponce, A. G., Kotlar, C. E. and Moreira, M. R. 2013. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Sci. Technol., Campinas* 33(2), 295-303.
- ❖ McFarland,L.V.,Bernasconi,P. 1993. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 6
- ❖ Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 785–792.
- ❖ Pablo A´ lvarez-Marti´n, Ana Bele´n Flo´reza , Teresa Mari´a Lo´pez-Di´az , Baltasar Mayo (2007) Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal* 17, 961–967.
- ❖ Plessas, S., Fisher, A., Koureta, K., Psarianos, C., Nigam, P., & Koutinas, A.A. 2008. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chemistry*, 106, 985-990

- ❖ Ramesh C. Chandan, Arun Kilara, Nagendra P. Shah 2012. *Dairy Processing and Quality Assurance*, Chapter 13, pp. 235-246.
- ❖ Robinson R.K., Lusey J.A. and Tamime A.Y. (2006). *Manufacture of Yoghurt*. In Tamime A.Y. (Ed.) *Fermented milks*. Pp 53-73 Blackwell Science, SDT, Oxford, UK
- ❖ Roehr M., Kubicek CP, Komínek J. Citric acid. In: Rehm HC, Reed G, eds. *Biotechnology* (vol. 6). Germany: Verlagsgesellschaft; 1993:388-395
- ❖ Rohm, H., Eliskases-Lechner, F. and Brauer, M (1992) Diversity of yeasts in selected dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 370–376.
- ❖ Shannon E. L., Olson N. F. and Deibel R. H., 1977. Oxidative Metabolism of Lactic Acid Bacteria Associated with Pink Discoloration in Italian Cheese *Journal of Dairy Science* 60(11):1693-1697
- ❖ Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G. and Rensburg P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91, 182-190
- ❖ Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A and Pretorius I.S 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor, *Australian Journal of Grape and Wine Research*
- ❖ Susan J. Cromie, Janet E. Giles and John R. Dullely 1987. Effect of elevated

ripening temperature on the microflora of Cheddar cheese, *Journal of Dairy Research* 54(01):69 – 76.

- ❖ Tamime A.Y. and Robinson R. K. (1999). *Yoghurt, Science and Technology*, 2nd edition. Pp. 1-128, 432-485. Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC.
- ❖ Teven L. Hogarty and Joseph F. Frank (1982). Low-Temperature Activity of Lactic Streptococci Isolated from Cultured Buttermilk, *Journal of Food Protection*, Vol. 45, No. 13, Pages 1208-1211
- ❖ Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G. and Corsetti, A. 2013. Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology* 161, 203-208.
- ❖ Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Sarmiento, R.M., Carballo, J., 1998. Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Lait* 78, 647 – 659.
- ❖ Torres, S., Sayago, J. E., Ordonez, R. M. and Isla, M. I. 2011. A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 123-128.
- ❖ Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Manolkidis, K. (1987) Microbiology of kopanisti, a traditional Greek cheese. *Food Microbiol.* 4, 251–256.
- ❖ Watanabe K, Fujimoto J, Sasamoto M, Dugersuren J, Tumursuh T and Demberel S (2008) Diversity of lactic acid bacteria and yeast in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and*



Biotechnology 24 1313–1325

- ❖ Wigley, R.C., 1996. Cheese and whey. In: Godfrey, T., West, S. (Eds.), Industrial Enzymology. The Macmillan Press Ltd, London, pp. 134 – 154
- ❖ Williams, W., & Luksas, A.J. (1981). Bread leavening yeast. U.S. patent 4, 292, 330

#### Ελληνική Βιβλιογραφία

- ❖ Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009). Βασικά Γαλακτοκομικά Προϊόντα. Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο.
- ❖ Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης, (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος: Ζυμούμενα προϊόντα, Παγωτό, Κρέμα-Βούτυρο. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη 2001
- ❖ Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009). Βασικά Γαλακτοκομικά Προϊόντα. Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο.
- ❖ Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσης (2003). Μέρος Α': Τρόφιμα και Ποτά, Κεφάλαιο 1. Ελληνική Δημοκρατία. Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών. Γενικό Χημείο του Κράτους.
- ❖ Λιτοπούλου- Τζανετάκη Ευανθία, 2010. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ. Εκδόσεις Αιβάζη. Σελ 351-358
- ❖ Μάντης Α. (2000). Υγιεινή και Τεχνολογία Γάλακτος και των Προϊόντων του. Γ΄ Έκδοση. Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη.