

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΑΙ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Δ. Π. Μ. Σ.

«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

**ΩΡΙΜΑΣΗ ΤΥΡΙΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΘΕΡΜΑΣΜΕΝΟ ΠΗΓΜΑ
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

της

Αγγελικής Α. Γκικοπούλου

Επιβλέπουσα: Γκόλφω Μοάτσου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Βασιλική Ευαγγελίου, Αναπλ. Καθηγήτρια ΤΕΤΔΑ

Μαρία Χαρισμιάδου, Επικ. Καθηγήτρια ΤΕΖΠΥ

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΑΙ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Δ. Π. Μ. Σ.

«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

**ΩΡΙΜΑΣΗ ΤΥΡΙΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΘΕΡΜΑΣΜΕΝΟ ΠΗΓΜΑ
ΑΓΕΛΛΑΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Ripening of cheese manufactured from heat-treated curd

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

της

Αγγελικής Α. Γκικοπούλου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γκόλφω Μοάτσου, Αναπλ. Καθηγήτρια

Βασιλική Ευαγγελίου, Αναπλ. Καθηγήτρια

Μαρία Χαρισμιάδου, Επικ. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ωρίμαση τυριού από αναθερμασμένο πήγμα αγελαδινού γάλακτος.

Τα χαρακτηριστικά σημεία της τεχνολογίας που εφαρμόστηκε στη παρούσα μελέτη ήταν πήγμα αγελαδινού γάλακτος, διαίρεση σε κύβους 1×1 cm, θερμική επεξεργασία του διαιρεμένου πήγματος 42-43°C/30 min, σχηματοδότηση σε μικρά κεφάλια βάρους λιγότερο από 1kg, πίεση για περιορισμένο χρονικό διάστημα ίση με το βάρος του τυριού, αλάτισμα σε άλμη 22% αλάτι 0,3% CaCl₂ σε αναλογία φρέσκο τυρί:άλμη ~1:2 και για χρόνο που να αντιστοιχεί σε ~2.5 ώρες ανά 0,5 kg τυρί και ωρίμαση τριών σταδίων: 1) 10-11°C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά Β), 2) 18 °C για 14 ημέρες, 3) συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο. Η ωρίμαση είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις παραμέτρους που αφορούσαν τη σύσταση και την κατατομή υφής των τυριών. Αντίθετα, η εφαρμογή επικάλυψης την 7^η ημέρα δεν επηρέασε αυτά τα χαρακτηριστικά. Σε ότι αφορά τις μικροβιακές ομάδες που σχετίζονται με την επιφανειακή μικροχλωρίδα των τυριών η ωρίμαση μηδένιζε τα κολιβακτήρια, μείωνε τους μικρόκοκκους και υποδιπλασίαζε τις ζύμες, χωρίς να διαπιστωθεί επίδραση της εφαρμογής της επικάλυψης. Όλα τα τυριά αξιολογήθηκαν με υψηλές βαθμολογίες ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, οι οποίες δεν επηρεάστηκαν από τους παράγοντες του πειράματος. Στις 21 ημέρες ωρίμασης, η μέση σύσταση των τυριών ήταν pH 5,4, οξύτητα 1,19% γαλακτικό οξύ, υγρασία 39,7% και αλάτι 1,95%. Μετά από περίπου 20 εβδομάδες συντήρησης στο ψυγείο, το pH ήταν 5,02, η οξύτητα 1,38% γαλακτικό οξύ, η υγρασία 36,83% και το αλάτι 1,82%. Ο μέσος δείκτης πρωτεόλυσης στις 160 ημέρες (διαλυτό προς ολικό άζωτο) ήταν 15,7% και το μισό από αυτό το ποσοστό ήταν μεσαία/μικρά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα.

Πήγμα αγελαδινού γάλακτος, ωρίμαση, εφαρμογή επικάλυψης.

SUMMARY

Ripening of cheese manufactured from heat-treated curd

The main points of the technology applied in this study were: cow's milk curd, divided into 1×1 cm cubes, heating of the divided curd at 42-43°C/30 min, molding in small wheels weighing less than 1 kg, pressure for a limited amount of time equal to the weight of the cheese, salting in brine 22% salt 0.3% CaCl₂ in a ratio fresh cheese:brine 1:2 for 2.5 h per 0,5 kg cheese and three-stage-ripening scheme, i.e., 1) 10-11°C for 7 days- cheese coating (group B), 2) 18°C for 14 days, 3) vacuum packaging under plastic film- cold store. Ripening had a statistically significant effect on the parameters of the composition and texture of cheeses. In contrast, coating application on day 7 did not affect these characteristics. In terms of cheese surface microbiology , ripening eliminated coliforms, reduced the micrococci counts while yeasts were reduced by half; no effect of coating application was detected. The organoleptic scores of all cheeses were high and they were not affected by the factors of the experiment. At 21 days of ripening the average cheese composition was pH 5.4, acidity 1.19% lactic acid, moisture 39.7% and salt 1.95%. After approximately 20 weeks of cold storage, the pH was at 5.02, acidity 1.38% lactic acid, moisture 36.83% and salt 1.82%. The average proteolysis index at 160 days (soluble on total nitrogen) was 15.7%;half of this percentage was medium/small peptides and free amino acids.

Cow's milk curd, ripening, coating application.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου και επιβλέπουσα της μελέτης, κα. Μοάτσου Γκόλφω, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για τις συμβουλές της, τη συνεχή καθοδήγηση, τη σημαντικότερη βοήθεια και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ευαγγελίου Βασιλική, Αναπληρώτρια καθηγήτρια ΤΕΤΔΑ, για την ανυπολόγιστη συμβολή, τη καθοδήγηση της και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη κα Χαρισσιάδου Μαρία, Επίκουρη καθηγήτρια ΤΕΖΠ, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις της κατά τη συγγραφή της μελέτης, όπως και για την άψογη συνεργασία μας.

Επίσης, θερμότερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ζωίδου Ευαγγελία και τον κ. Σακκά Λάμπρο, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν, κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής μου μελέτης, και την πολύτιμη καθοδήγησή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Θεόδωρο Πάσχο για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων και τους συμφοιτητές μου για την άψογη συνεργασία που είχαμε, κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, και για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
A. Εισαγωγή.....	10
1. Ωρίμαση των τυριών	10
1.1 Γενικά.....	10
1.2 Συνθήκες ωρίμασης.....	11
1.3 Επιτάχυνση της ωρίμασης.....	14
1.4 Βιοχημικές μεταβολές	15
1.4.1 Λακτόζη.....	15
1.4.2 Λίπος	16
1.4.3 Πρωτεΐνες.....	18
2. Μικροβιολογία των τυριών	19
2.1 Γενικά.....	19
2.2 Σημαντικοί μικροοργανισμοί για τη μικροβιολογία του τυριού.....	20
2.2.1 Βακτήρια εκκίνησης.....	20
2.2.2 Εντερόκοκκοι	21
2.2.3 Γαλακτικά βακτήρια μη-εκκίνησης.....	21
2.2.4 Προπιονικά βακτήρια	22
2.2.5 Ζύμες	22
2.2.6 Μύκητες.....	23
2.2.7 Μικρόκοκκοι και Σταφυλόκοκκοι.....	23
2.2.8 Κορυνομορφα Βακτήρια	23
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη.....	24
2.3.1 Θερμοκρασία.....	24
2.3.2 pH – Οργανικά οξέα.....	24
2.3.3 Υγρασία – Ενεργότητα νερού.....	25
2.3.4 Αλάτι	26
2.3.5 Δυναμικό οξειδοαναγωγής (Redox potential - E_h)	27
2.4 Μικροβιακή αλλοίωση των τυριών	27
2.4.1 Πρώιμη διόγκωση ή φούσκωμα ή παραγωγή αερίων.....	28
2.4.2 Όψιμη διόγκωση ή φούσκωμα ή παραγωγή αερίων.....	29
2.4.3 Επιφανειακή αλλοίωση	30
3. Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις στα τυριά- Συσκευασία	30
3.1 Γενικά.....	30
3.2 Υλικά για την παρασκευή των επικαλύψεων και μεμβρανών.....	30
3.2.1 Πολυσακχαρίτες	30

3.2.2	Λίπη	33
3.2.3	Πρωτεΐνες ορού γάλακτος	34
3.2.4	Αλγινικό νάτριο	34
3.2.5	Πλαστικοποιητές	35
3.3	Αντιμικροβιακοί παράγοντες.....	35
3.3.1	Νισίνη.....	35
3.3.2	Ναταμυκίνη	36
3.3.3	Λυσοζύμη.....	36
3.3.4	Αιθέρια έλαια	37
3.3.5	Οργανικά οξέα.....	38
3.4	Μέθοδοι εφαρμογής των επικαλύψεων και μεμβρανών	38
3.5	Συσκευασία	39
3.5.1	Τεχνικές συσκευασίας	39
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
4.	Υλικά και μέθοδοι	41
4.1	Πειραματικές τυροκομήσεις.....	41
4.2.	Δειγματοληψία και σήμανση.....	42
4.3.	Παρασκευή και εφαρμογή μεμβράνης	42
4.4.	Αναλύσεις των τυριών.....	43
4.4.1	Μικροβιολογικές αναλύσεις επιδερμίδας τυριών	43
4.4.2	Ανάλυση κατατομής δομής των τυριών	43
4.4.3	Μέτρηση του pH τυριών	45
4.4.4	Προσδιορισμός της οξύτητας.....	45
4.4.5	Σύσταση των τυριών	45
4.4.6	Προσδιορισμός χλωριούχου νατρίου	45
4.4.7	Προσδιορισμός της ξηρής ουσίας-υγρασίας των τυριών	45
4.4.8	Προσδιορισμός του ολικού (TN), του υδατοδιαλυτού (WSN) και TCA (TCA-N) αζώτου.....	46
4.5	Οργανοληπτικός έλεγχος των τυριών.....	47
4.6	Στατιστική ανάλυση.....	48
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
5.1	Πειραματικές τυροκομήσεις.....	49
5.2.	Εξέλιξη της σύστασης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών.....	50
5.3.	Η έκταση της πρωτεόλυσης στα ώριμα τυριά	55
5.4.	Κατατομή υφής κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών	56

5.5. Πληθυσμοί της επιφανειακής μικροβιολογικής χλωρίδας κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών	60
5.6. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών	62
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μια από τις σύγχρονες καταναλωτικές τάσεις στην αγορά των τυριών είναι η αγορά μικρού μεγέθους συσκευασμένων τυριών. Είναι δεδομένο ότι το μέγεθος και το σχήμα των τυριών σε συνδυασμό με τη συσκευασία τους επηρεάζουν την εξέλιξη της ωρίμασής τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνολογίας που θα επιτρέπει την παραγωγή ημίσκληρου/σκληρού τυριού μικρού μεγέθους π.χ. με βάρος λιγότερο από 1kg, το οποίο να αποκτά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά σε λιγότερο χρόνο από ό,τι απαιτείται για τα τυριά αυτής της κατηγορίας και να μπορεί να διατεθεί στην αγορά χωρίς προηγούμενη διαίρεση. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειραματικές τυροκομήσεις αγελαδινού γάλακτος εφαρμόζοντας «μέτριες» συνθήκες επεξεργασίας του πηγματος, υγρό αλάτισμα και ωρίμαση τριών σταδίων. Επίσης, διερευνήθηκε και η δυνατότητα επικάλυψής τους με μεμβράνη πρωτεϊνών εδώδιμου τύπου.

A. Εισαγωγή

1. Ωρίμαση των τυριών

1.1 Γενικά

Παραδοσιακά, το τυρί παράγεται μετατρέποντας το υγρό γάλα σε πήγμα με τη χρήση ενός ενζυμικού παράγοντα, όπως η πυτιά, οξίνισης, θερμότητας ή συνδυασμό τους. Το τυρί μπορεί να ποικίλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, όπως το χρώμα, το άρωμα, την υφή, τη γεύση και την σταθερότητά του, τα οποία μπορεί γενικά να αποδοθούν στην τεχνολογία παραγωγής, το είδος του γάλακτος, το ποσοστό υγρασίας και το χρόνο ωρίμασης, όπως και στη παρουσία συγκεκριμένων ειδών μυκήτων, ζύμης και βακτηρίων (Santiago-López et al., 2018).

Τα περισσότερα είδη τυριών υποβάλλονται σε περίοδο ωρίμασης που κυμαίνεται από δύο εβδομάδες (π.χ. Mozzarella) έως δύο έτη (π.χ. Parmigiano-Reggiano ή extra-mature Cheddar), ενώ η διάρκεια της ωρίμασης είναι γενικά αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα του τυριού σε υγρασία. Πολλά είδη μπορούν να καταναλωθούν σε οποιοδήποτε στάδιο ωρίμασης, ανάλογα με τις προτιμήσεις των καταναλωτών και οικονομικούς παράγοντες (Fox & McSweeney, 2017).

Η ωρίμαση περιλαμβάνει αλλαγές στη μικροχλωρίδα του τυριού, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου και της λύσης των αρχικών κυττάρων, την ανάπτυξη τυχαίας μικροχλωρίδας εκτός των καλλιεργειών εκκίνησης (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) και, σε πολλά τυριά, την ανάπτυξη μιας δευτερεύουσας μικροχλωρίδας. Η μεταβολική δραστηριότητα της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας συχνά κυριαρχεί στην ανάπτυξη της γεύσης/αρώματος και σε μερικές περιπτώσεις, όπως στα τυριά που ωριμάζουν με μύκητες, στην υφή των διαφόρων (McSweeney, 2004).

Η ωρίμαση συνήθως μαλακώνει την υφή του τυριού, ως συνέπεια της υδρόλυσης του πλέγματος της καζεΐνης, αλλάζει την ικανότητα συγκράτησης νερού του τυροπήγματος και το pH, το οποίο μπορεί να προκαλέσει άλλες αλλαγές όπως η μεταφορά και η κατακρήμνιση του φωσφορικού ασβεστίου (McSweeney, 2004).

Το τυρόπηγμα αμέσως μετά την παρασκευή του είναι άγευστο, έτσι είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των διαφορετικών ειδών τυριών σε αυτό το στάδιο (McSweeney, 2004). Κατά την ωρίμαση, γίνονται όλες εκείνες οι φυσικοχημικές μεταβολές οι οποίες διαμορφώνουν τελικά τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους τυριού (Μάντης κ.ά., 2015).

Υπάρχουν παράγοντες από πέντε, και πιθανώς έξι, πηγές που εμπλέκονται στην ωρίμαση των τυριών (McSweeney, 2004):

- Ένζυμα από τη πυτιά
- Ενδογενή ένζυμα του γάλακτος
- Βακτήρια εκκίνησης και τα ένζυμά τους, τα οποία απελευθερώνονται μετά το θάνατο και τη λύση των κυττάρων
- Ένζυμα από δευτερογενείς εκκινητές (π.χ., *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, Gram θετικά βακτήρια στην επιφάνεια τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακό επίχρισμα (smear-ripened), ζύμες και μύκητες, όπως οι *Penicillium roqueforti* και *P. camemberti*), που έχουν μεγάλη σημασία σε κάποιες κατηγορίες τυριών.
- Βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκίνησης (NSLAB), όπως οργανισμοί που επιζούν από τη παστερίωση ή κατά τη παρασκευή του τυροπήγματος
- Εξωγενή ένζυμα που προστίθενται για την επιτάχυνση της ωρίμασης του τυριού.

Οι φυσικοχημικές μεταβολές αρχίζουν ουσιαστικά με την προσθήκη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας και συνεχίζονται σ' όλη τη διάρκεια της ωρίμασης, αλλά και μετά την ωρίμαση με βραδύτερο, ωστόσο ρυθμό (Μάντης κ.ά., 2015).

Η μετατροπή του τυροπήγματος σε τυρί περιλαμβάνει τρία κύρια βιοχημικά μονοπάτια, τη γλυκόλυση, τη λιπόλυση και τη πρωτεόλυση, τα προϊόντα των οποίων τροποποιούνται μέσω διαφόρων βιοχημικών και ίσως χημικών αντιδράσεων. Οι πρωταρχικές αντιδράσεις είναι κυρίως υπεύθυνες για τις αλλαγές στην υφή και τη λειτουργικότητα, ενώ η γεύση πιθανώς δημιουργείται από τη τροποποίηση των προϊόντων των πρωτογενών αντιδράσεων (Fox, 2002).

Η γλυκόλυση και τα σχετικά γεγονότα προκαλούνται από ζωντανούς μικροοργανισμούς (εκκίνησης και/ή μη-εκκίνησης), ενώ η λιπόλυση και η πρωτεόλυση καταλύονται κυρίως από τα ένζυμα της πυτιάς, του γάλακτος, των βακτηρίων εκκίνησης, των τυχαίων βακτηρίων μη-εκκινητών και, από δευτερογενείς (συμπληρωματικές) καλλιέργειες (Fox, 2002).

1.2 Συνθήκες ωρίμασης

Σύμφωνα με τους Μάντη κ.ά. (2015), η πορεία της ωρίμασης ενός τυριού εξαρτάται:

1. Από το είδος και τη δραστηριότητα της ειδικής (και συχνά μη ειδικής) μικροβιακής χλωρίδας που υπάρχει στο τυρί. Αν το προς τυροκόμηση γάλα παστεριωθεί (72°C για 15 sec), ή τουλάχιστον υποστεί θέρμιση (60-65°C για 30-15 sec) και προστεθεί οξυγαλακτική καλλιέργεια, η πορεία της ωρίμασης είναι ελεγχόμενη.
2. Από τις τιμές των φυσικοχημικών παραμέτρων των τυριών (pH, a_w , NaCl κ.ά.) που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη.

3. Από τη θερμοκρασία ωρίμασης.
4. Από τη σχετική υγρασία (relative humidity-RH) του θαλάμου ωρίμασης.

Στα περισσότερα τυριά, προστίθενται καλλιέργειες εκκίνησης για τη μείωση του pH, που συμβάλλει στην διαμόρφωση σταθερής ποιότητας, καθώς και στην τροποποίηση χαρακτηριστικών της υφής και στη δημιουργία ενώσεων γεύσης κατά την ωρίμαση (Lucey, 2002).

Η θερμοκρασία επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης μικροβίων της επιθυμητής μικροχλωρίδας και τη δραστικότητα των ενζύμων τους, όπως κι αυτή εξωγενών ενζύμων, ιδιαίτερα από της πυτιάς και τους εκκινητών, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό ωρίμασης. Γενικά, η υψηλότερη θερμοκρασία προκαλεί ταχύτερη ωρίμαση, αλλά ταυτόχρονα αυξάνει το κίνδυνο αλλοίωσης από ανεπιθύμητη μικροβιακή ανάπτυξη. Τύποι τυριών που είναι ευαίσθητα σε ανεπιθύμητες ζυμώσεις μπορεί κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου ωρίμασης να βρίσκονται σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι να καταστεί δυνατή ομοιόμορφη κατανομή του αλατιού στο τυρί. Εάν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, ο ρυθμός ωρίμασης δεν είναι ικανοποιητικός. Σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες η γεύση παραμένει «επίπεδη» και μη χαρακτηριστική. Αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία, μετά από προηγούμενη ωρίμαση σε υψηλότερη θερμοκρασία, έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση των συνεχών διεργασιών ωρίμασης και τη καθυστέρηση εμφάνισης ελαττωμάτων. Έτσι, παρατείνεται ο χρόνος αποθήκευσης (Walstra et al., 2006).

Η υγρασία, η θερμοκρασία και η ταχύτητα του αέρα επηρεάζουν την εξάτμιση του νερού. Η υγρασία έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του τυριού. Για να σχηματίσουν τα τυριά ικανοποιητική εξαιρετική επιφάνεια κατά την ωρίμαση πρέπει να αναστρέφονται συχνά, ειδικότερα στα πρώτα στάδια ωρίμασης. Οι αναστροφές ενισχύουν την ανάπτυξη οποιασδήποτε αερόβιας χλωρίδας σε ολόκληρη την επιφάνεια του τυριού και αποτρέπουν σε τυριά χωρίς ειδική επιφανειακή μικροχλωρίδα την ανάπτυξη μικροαερόφιλων μικροοργανισμών μεταξύ του τυριού και του ραφιού. Η υγρασία κοντά στην επιφάνεια του τυριού μπορεί να διαφέρει αισθητά από άλλα σημεία του θαλάμου ωρίμασης (Walstra et al., 2006).

Η αποθήκευση του ωριμασμένου τυριού αποσκοπεί στο να διατηρηθεί παραμένοντας κατάλληλο για κατανάλωση. Το προϊόν πρέπει να έχει αναπτύξει τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες: γεύση/οσμή, συνοχή, σώμα (εμφάνιση εγκάρσιας τομής) και επιδερμίδα. Οποιαδήποτε απώλεια, ειδικά αυτή που προκαλείται από την υπερβολική εξάτμιση του νερού, καθώς και η αλλοίωση του φλοιού και/ή της υφής λόγω ανεπιθύμητων μικροβίων, πρέπει να αποτραπεί. Η μεταχείριση εξαρτάται σημαντικά από τον τύπο του τυριού και ποικίλλει ανάλογα με την πρόοδο της ωρίμασης. Διάφοροι τύποι έχουν σύντομο χρόνο ωρίμασης και διάρκεια ζωής, ενώ άλλα τυριά προσαρμόζονται για εκτεταμένη αποθήκευση (Πίνακας 1.1, Walstra et al., 2006).

Πίνακας 1.1. Συνθήκες συντήρησης και ωρίμασης διαφόρων τύπων τυριών (πηγή: Walstra et al., 2006).

Τύπος Τυριού	Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Σχετική Υγρασία (%)	Διάρκεια Ωρίμασης (ημέρες)
Μαλακό τυρί		12-14	95	15-20
Μαλακό τυρί με επιφανειακό επίχρισμα		12-16	≥95	35
Μαλακό τυρί με λευκούς μύκητες π.χ. Camembert	1. 10 ημέρες	11-14	85-90	
	2. Συσκευασμένο	4	85-90	35
Τυρί με ανάπτυξη μυκήτων στη μάζα του π.χ. Roquefort		7-10	95	100
Ημισκληρό τυρί π.χ. Gouda		12-16	85-90	50-300
Ημισκληρό τυρί με επιφανειακή μικροχλωρίδα		12-16	90-95	150
Σκληρό τυρί με επιφανειακή μικροχλωρίδα	1. 2 εβδομάδες	10-14	≥95	
	2. 5-10 εβδομάδες	16	85-90	
	3. Υπόλοιπο	10-14	85	300
Σκληρό τυρί με μεγάλες τρύπες	1. 2 εβδομάδες	10-14	80-85	
	2. 5-10 εβδομάδες	20-24	80-85	
	3. Υπόλοιπο	10-14	85	90-200
Σκληρό τυρί - ξηρά αλατισμένο π.χ. Cheddar	1. 2 εβδομάδες	12-16	75-80	
	2. Υπόλοιπο	5-7	75-80	60-300
Πολύ σκληρό τυρί π.χ. Parmesan	1. 1 χρόνος	16-18	80-85	
	2. 1 χρόνος	10-12	85-90	700

1.3 Επιτάχυνση της ωρίμασης

Η ωρίμαση είναι μία αργή και κατά συνέπεια δαπανηρή διαδικασία. Το κόστος ωρίμασης ενός τυριού προκύπτει κυρίως όταν υπάρχει απόθεμα μεγάλων ποσοτήτων τυριού στις αποθήκες και από την φροντίδα των θαλάμων ωρίμασης. Η θερμοκρασία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, η σχετική υγρασία του θαλάμου ωρίμασης πρέπει να ελέγχονται, προσθέτοντας έτσι κόστος στην ωρίμαση του τυριού (Fox, 2002).

Διάφοροι τρόποι έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιτάχυνση της ωρίμασης του τυριού, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυξημένης θερμοκρασίας ωρίμασης, προσθήκης εξωγενών ενζύμων ή εξασθενημένων εκκινητών, χρήσης συμπληρωματικών καλλιέργειών, χρήσης γενετικώς τροποποιημένων βακτηρίων εκκίνησης και επεξεργασιών υψηλής πίεσης (Fox, 2002).

Η άνοδος της θερμοκρασίας επηρεάζει θετικά τον ρυθμό ανάπτυξης της οξυγαλακτικής καλλιέργειας και όλες τις βιοχημικές αντιδράσεις που γίνονται κατά την ωρίμαση, γι' αυτό επιταχύνεται η ωρίμαση. Επηρεάζει όμως θετικά και τα ανεπιθύμητα μικρόβια που πιθανόν να υπάρχουν (Μάντης κ.ά., 2015).

Ένα από τα κύρια αποτελέσματα της αύξησης της θερμοκρασίας είναι η αυξημένη πρωτεολυτική δράση της κανονικής καλλιέργειας εκκίνησης. Επίσης, η λιπόλυση αυξάνεται πολύ περισσότερο από την αύξηση της θερμοκρασίας απ' ό,τι η πρωτεόλυση (Walstra et al., 2006).

Αν και η αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμασης προσφέρει στη βιομηχανία μια τεχνολογικά απλή μέθοδο με την οποία επιταχύνονται οι αντιδράσεις σχηματισμού γεύσης/αρώματος στο τυρί, πρέπει να δίνεται προσοχή στην ποιότητα του γάλακτος και στις συνθήκες υγιεινής που χρησιμοποιούνται κατά τη παραγωγή του, ώστε να αποφευχθούν ελαττώματα στη γεύση και η ανάπτυξη παθογόνων (El-Soda, 2002).

Η εφαρμογή υπερυψηλών πιέσεων μπορεί να επιταχύνει σημαντικά τη διαδικασία ωρίμασης του τυριού. Η υπερύψηλή πίεση (HP) προκαλεί αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις όπως η γλυκόλυση, η λιπόλυση και η πρωτεόλυση κατά την ωρίμαση του τυριού που οδηγεί σε μείωση του χρόνου ωρίμασης και βελτίωση της ποιότητας. Σε τυρί που παρασκευάστηκε από γάλα επεξεργασμένο με HP (στα 300 ή 400 MPa για 10 λεπτά), αυξήθηκε η υδρόλυση β-καζεΐνης, καθώς και το επίπεδο των ελεύθερων αμινοξέων (Free Amino Acids, FAAs) (Mandal & Kant, 2017).

Η χρήση λιπολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων μπορεί να επιταχύνει τη παραγωγή αρωματικών ενώσεων. Η επιτυχής χρήση των παρασκευασμάτων που περιέχουν αυτά τα ένζυμα περιπλέκεται από την ανάγκη να διατηρηθεί ικανοποιητική ισορροπία με τα ένζυμα που εμπλέκονται στην ωρίμαση. Μια ανισορροπία προκαλεί εύκολα δυσάρεστες γεύσεις και πολύ ισχυρή πρωτεόλυση μπορεί να οδηγήσει σε ελαττώματα συνεκτικότητας (Walstra et al., 2006). Οι κύριοι περιορισμοί στη χρήση εξωγενών ενζύμων σχετίζονται με τη μέθοδο της προσθήκης των ενζύμων. Όταν τα ένζυμα προστίθενται στο γάλα, ένα πολύ μικρό μέρος διατηρείται στο τυρόπηγμα, γεγονός που αυξάνει το κόστος. Η προσθήκη ενζύμων στο τυρόπηγμα είναι αποτελεσματική στην περίπτωση των τυριών τύπου Cheddar, που επιτρέπει την προσθήκη ενζύμων με το αλάτι κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του τυροπήγματος (El-Soda, 2002).

Η συντόμευση του χρόνου ωρίμασης επιτυγχάνεται με την αύξηση της ποσότητας της οξυγαλακτικής καλλιέργειας που προστίθεται στο γάλα ώστε να ενισχυθούν οι ζυμώσεις. Επίσης, η χρησιμοποίηση οξυγαλακτικών καλλιεργειών που έχουν υποστεί μετάλλαξη (με χημικά ή φυσικά μέσα ή οξυγαλακτικές καλλιέργειες επεξεργασμένες με λυσοζύμη ή n-βουτανόλη ή που έχουν υποστεί θερμικό ή και ψυχρό stress), ώστε να ζυμώνουν με βραδύ ρυθμό τη λακτόζη αλλά και να παράγουν μεγάλη ποσότητα πρωτεολυτικών ενζύμων (Μάντης κ.ά., 2015).

Συνοπτικά, η ωρίμαση του τυριού μπορεί να επιταχυνθεί με διάφορους τρόπους. Δίνεται μεγάλη προσοχή στο σχηματισμό πεπτιδίων και αμινοξέων χαμηλής μοριακής μάζας, λόγω της πρωτεόλυσης. Η συσχέτιση με την ανάπτυξη της γεύσης μπορεί, ωστόσο, να είναι κακή. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του αρώματος στο τυρί δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστοί, όπως και οι σχέσεις μεταξύ των γενετικών ιδιοτήτων των γαλακτικών βακτηρίων και της παραγωγής αρωματικών ενώσεων (Walstra et al., 2006).

1.4 Βιοχημικές μεταβολές

Οι φυσικοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά το χρόνο ωρίμασης των τυριών είναι αποτέλεσμα της δράσης κυρίως ενζύμων από τα ειδικά οξυγαλακτικά στελέχη της καλλιέργειας-εκκίνησης (Lactic Acid Bacteria, LAB), αλλά συχνά και από την αυτόχθονη χλωρίδα του γάλακτος ή τις επιμολύνσεις (Non-Starter LAB - NSLAB), ή προστέθηκαν στο γάλα για την επιτάχυνση της ωρίμασης και μπορεί να είναι μέχρι και 40 διαφορετικά ένζυμα (Μάντης κ.ά., 2015).

Τα φυσικοχημικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά το χρόνο ωρίμασης των τυριών είναι πολύπλοκα και δεν είναι δυνατόν να περιγραφούν σύντομα. Είναι όμως γνωστό ότι οι μεταβολές αυτές αναφέρονται κυρίως στη λακτόζη, τις πρωτεΐνες και το λίπος (Μάντης κ.ά., 2015).

1.4.1 Λακτόζη

Η λακτόζη διασπάται από τα βακτήρια με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτικού οξέος αλλά ανάλογα με τα γένη και είδη των βακτηρίων σχηματίζονται επίσης και άλλα οξέα όπως φορμικό, οξικό, και άλλες ουσίες όπως διακετύλιο, ακεταλδεΐδη, αιθανόλη οι οποίες μπορούν επίσης να προέλθουν από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος. Υπάρχουν όμως και περαιτέρω μεταβολές, από τις οποίες προέρχονται και άλλες ουσίες, π.χ. από το γαλακτικό οξύ δημιουργείται προπιονικό οξύ με τη δράση των προπιονικών βακτηρίων (Ζερφυρίδης, 2001).

Το μεγαλύτερο ποσοστό (98%) της λακτόζης του γάλακτος απομακρύνεται στον ορό γάλακτος ως λακτόζη ή γαλακτικό οξύ, αλλά το τυρόπηγμα φρέσκου τυριού περιέχει $1 \pm 2\%$ λακτόζη. Για τις περισσότερες κατηγορίες τυριών, το pH του τυροπήγματος είναι $6,2 \pm 6,4$ στο καλούπι και δεδομένου ότι το τυρόπηγμα δεν αλατίζεται συνήθως σε αυτό

το σημείο, τα βακτήρια εκκίνησης μεταβολίζουν πλήρως την υπολειμματική λακτόζη εντός περίπου 12 ωρών (Fox, 2002).

Το τελικό στάδιο στη γλυκόλυση της λακτόζης είναι η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό το οποίο καταλύεται από τη γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Ανάλογα με τον τύπο της LDH (D- ή L-LDH) στο κύτταρο, το D- (π.χ., *Lb. delbrueckii* subsp, *bulgaricus*), L- (π.χ., *Lactococcus*, *Sc. thermophilus*) ή D / L- (π.χ., *Lb. helveticus*) γαλακτικό είναι το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης που μετατρέπει 1 mol λακτόζης σε 4 mol γαλακτικού με την παραγωγή 4 mol ATR (McSweeney, 2004).

Το γαλακτικό συμβάλλει στην γεύση του τυριού, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της ωρίμασης, αλλά το σημαντικό αποτέλεσμα της οξίνισης στην ανάπτυξη γεύσης είναι έμμεσο δεδομένου ότι, μαζί με τη ρυθμιστική ικανότητα του τυροπήγματος, επηρεάζει το pH και συνεπώς την ανάπτυξη της δευτερογενούς χλωρίδας και τη δραστηριότητα των ενζύμων ωρίμασης (McSweeney, 2004).

Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες στις πρώτες φάσεις της τυροκόμησης παράγουν το γαλακτικό οξύ γι' αυτό και τα φρέσκα τυριά έχουν γεύση γαλακτικού οξέος, το δε άρωμα τους προέρχεται κυρίως από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος. Η παρουσία του γαλακτικού οξέος, περιορίζει την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών και ελαττώνει το pH του τυροπήγματος. Αυτό ρυθμίζει τη δράση των ενζύμων, το δε χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής διατηρεί τις ουσίες της καλής γεύσης στην αναγωγική τους μορφή υπό την οποία είναι οργανοληπτικά αρεστές (Ζερφυρίδης, 2001).

Κατά τις δευτερογενείς ζυμώσεις της λακτόζης και του κιτρικού οξέος παράγεται και το διακετύλιο, το οποίο συντελεί στη γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων γενικά. Σχετικά με το κιτρικό οξύ, αν και η περιεκτικότητά του στο γάλα μόλις μπορεί να φτάσει το 0.02%, κατά τη ζύμωσή του δίνει αρκετή ποσότητα ακετοΐνης η οποία είναι σημαντική για τη γεύση/άρωμα του τυριού, αρκεί να υπάρχει η μικροχλωρίδα η οποία μπορεί να κάνει αυτή τη ζύμωση (Ζερφυρίδης, 2001).

Επιγραμματικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι η λακτόζη μέσω της γαλακτικής ζύμωσης και τις δευτερογενών ζυμώσεων των προϊόντων διάσπασης της έχει, κατά σειρά εμφάνισης τις εξής θετικές επιδράσεις (Ζερφυρίδης, 2001):

- Συντελεί στην καλύτερη πήξη του γάλακτος για τη λήψη τυροπήγματος.
- Δημιουργεί συνθήκες που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών κι έτσι διατηρείται το τυρί καλύτερα.
- Συντελεί στην καλή στράγγιση του τυροπήγματος.
- Συμβάλλει στη γεύση και το άρωμα των τυριών.

1.4.2 Λίπος

Το λίπος του γάλακτος και κατ' ακολουθία και των τυριών είναι κατά 98% τριγλυκερίδια δηλαδή εστέρες της γλυκερόλης και των λιπαρών οξέων. Ο αριθμός των λιπαρών οξέων που συμμετέχουν στο σχηματισμό τους είναι πολύ μεγάλος πάνω από

150, αλλά τα περισσότερα βρίσκονται σε ίχνη. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που συμμετέχουν στο σχηματισμό τους είναι τα κορεσμένα με άτομα άνθρακα από C₄-C₂₀ κατά 65% και το ακόρεστο ελαϊκό κατά 25% του συνόλου των λιπαρών οξέων, σε moles (Ζερφυρίδης, 2001).

Η λιπόλυση στο τυρί οφείλεται στην παρουσία λιπολυτικών ενζύμων, όπως οι υδρολάσες που διασπούν τον εστερικό δεσμό μεταξύ ενός λιπαρού οξέος και του πυρήνα της γλυκερόλης του τριακυλογλυκεριδίου, παράγοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), και μονο- και διακυλογλυκερίδια (Deeth & Touch, 2000).

Τα λιπολυτικά ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν ως εστεράσες ή λιπάσες, οι οποίες διακρίνονται σύμφωνα με τρία κύρια χαρακτηριστικά: (1) το μήκος της υδρολυμένης αλυσίδας ακυλεστέρα, (2) τη φυσικοχημική φύση του υποστρώματος και (3) την ενζυματική κινητική (Collins et al., 2003).

Οι λιπάσες στο τυρί προέρχονται από έξι πιθανές πηγές (Collins et al., 2003):

1. Το γάλα (ενδογενής λιποπρωτεϊνική λιπάση)
2. Το παρασκεύασμα πυτιάς
3. Τη καλλιέργεια εκκίνησης
4. Συμπληρωματικό εκκινητή
5. Βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκίνησης (NSLAB) και, ενδεχομένως
6. Την προσθήκη τους ως εξωγενείς λιπάσες.

Η δραστικότητα της ενδογενούς λιποπρωτεϊνικής λιπάσης είναι σημαντικότερη για το τυρί που παράγεται από νοπό γάλα από εκείνο που παράγεται από παστεριωμένο γάλα, αφού το ένζυμο αδρανοποιείται με τη παστερίωση (McSweeney, 2004).

Τα λιπαρά οξέα έχουν άμεση επίδραση στη γεύση πολλών ειδών τυριών. Συγκεκριμένα, τα C₄-C₁₀ οξέα είναι έντονα αρωματισμένα. Τα επίπεδα λιπαρών οξέων ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των ειδών τυριών. Εκτός από τον άμεσο ρόλο τους στη γεύση του τυριού, τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά πρόδρομα συστατικά για την παραγωγή άλλων πτητικών ενώσεων αρώματος κατά την ωρίμαση (McSweeney, 2004).

Το επίπεδο της λιπόλυσης στο τυρί προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας διάφορες μη ειδικές τεχνικές (π.χ., εκχύλιση με διαλύτη και τιτλοδότηση των λιπαρών οξέων με αλκοολικό KOH) ή με ποσοτικό προσδιορισμό των ατόμων λιπαρών οξέων, συνήθως με αέρια χρωματογραφία (Collins et al., 2003).

Επειδή η λιπόλυση είναι αποτέλεσμα δράσης λιπασών, δηλαδή ενζύμων, επηρεάζεται άμεσα από το pH. Είναι πιο αυξημένη στα τυριά μεγαλύτερης ηλικίας και επίσης είναι μεγαλύτερη όταν το γάλα για τυροκόμηση είναι απαστερίωτο παρά παστεριωμένο. Ευνόητο, βέβαια, είναι ότι η δράση αυτή επηρεάζεται ανάλογα και από την θερμοκρασία διατήρησης του τυριού η οποία εφόσον είναι υψηλή, η λιπόλυση είναι έντονη. Πρέπει λοιπόν όταν επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο λιπόλυσης να ρυθμιστεί η θερμοκρασία ώστε να αναχαιτισθεί η περαιτέρω εξέλιξή της, ώστε το τυρί να διατηρηθεί στην άριστη δυνατή κατάσταση μέχρι να καταναλωθεί (Ζερφυρίδης, 2001).

1.4.3 Πρωτεΐνες

Η πρωτεόλυση είναι η πλέον περίπλοκη αλλά και η πλέον σημαντική μεταβολή που συμβαίνει κατά την ωρίμαση των τυριών. Τα προϊόντα της πρωτεόλυσης είναι πεπτίδια μεγάλα, μεσαία και μικρά και η διάσπασή τους φτάνει μέχρι ελεύθερα αμινοξέα ακόμη και αμμωνία. Επίσης με τη πρωτεόλυση μαλακώνει η δομή του τυριού και η αντίληψη της γεύσης γίνεται πιο εύκολα γιατί απελευθερώνονται και άλλες ουσίες γεύσης/αρώματος κατά την μάσηση του τυριού, οι οποίες αλλιώς θα έμεναν δεσμευμένες στο καζεϊνικό πλέγμα (Ζερφυρίδης, 2001).

Η πρωτεόλυση συνεισφέρει σημαντικά σε αλλαγές στη δομή του τυροπήγματος, όπως η διάσπαση του πρωτεϊνικού δικτύου, η μείωση της a_w εξαιτίας της δέσμευσης H_2O από τις απελευθερωμένες καρβοξυλο- και αμινομάδες των πεπτιδίων και την αύξηση του pH εξαιτίας της παραγωγής NH_3 από την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων, κυρίως στα τυριά που ωριμάζουν με μύκητες. Επίσης, συμβάλλει άμεσα στη γεύση (σχηματισμός πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων) και στα ελαττώματα γεύσης (πικρή γεύση λόγω υδροφοβικών πεπτιδίων). Οδηγεί στην απελευθέρωση υποστρωμάτων (αμινοξέων) για άλλες αντιδράσεις που σχετίζονται με τη γεύση (π.χ. απαμίνωση, αποκαρβοξυλίωση). Τέλος, έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη μάζα του τυριού που διευκολύνουν την απελευθέρωση γευστικών ουσιών κατά τη μάσηση (Fox & McSweeney, 1996).

Η πρωτεόλυση στο τυρί κατά την ωρίμαση καταλύεται από ένζυμα που προέρχονται από (Fox & McSweeney, 1996):

- Το παρασκεύασμα του πηκτικού ενζύμου (χυμοσίνη, πεψίνη, μικροβιακές όξινες πρωτεϊνάσες, κ.ά.)
- Το γάλα (πλασμίνη, καθεψίνη D και πιθανόν άλλες πρωτεϊνάσες των σωματικών κυττάρων)
- Τις καλλιέργειες εκκίνησης
- Οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών-εκκινητών (NSLAB)
- Τη δευτερεύουσα χλωρίδα
- Εξωγενείς πρωτεϊνάσες ή/και πεπτιδάσες που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση της ωρίμασης.

Η παραγωγή μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων προκαλείται από τη δράση των μικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων, αντίστοιχα. Παρασκευάσματα επιλεγμένων ασπάρτυλ-πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για την πήξη του γάλακτος. Η χυμοσίνη είναι η κύρια πρωτεϊνάση (88-94%) σε παραδοσιακές πυτιές μοσχαριού, το υπόλοιπο είναι πεψίνη. Αν και, ο κύριος ρόλος του πηκτικού στην παραγωγή τυριού είναι η πήξη του γάλακτος, μέρος της δραστηριότητας διατηρείται στο τυρόπηγμα, ανάλογα με παράγοντες όπως, ο τύπος της πυτιάς, θερμοκρασία τυροκόμησης και pH κατά την στράγγιση, και συμβάλλει στην πρωτεόλυση σε πολλές κατηγορίες τυριών (McSweeney, 2004).

Οι πρωτεϊνάσες του γάλακτος δεν αδρανοποιούνται με τη παστερίωση. Η πρωτεόλυση από πρωτεϊνάσες γάλακτος αυξάνει την ποσότητα των διαλυτών αζωτούχων ενώσεων,

που αποτελούνται κυρίως από πεπτίδια ενώ η παραγωγή αμινοξέων είναι μικρή (Walstra et al., 2006).

Τα τελικά προϊόντα της πρωτεόλυσης είναι αμινοξέα, η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από το είδος του τυριού. Η συγκέντρωση των αμινοξέων στο τυρί σε δεδομένο στάδιο ωρίμασης είναι το αποτέλεσμα της απελευθέρωσης των αμινοξέων από τις καζεΐνες μέσω της πρωτεόλυσης και τον καταβολισμό ή τον μετασχηματισμό τους σε άλλα αμινοξέα από την μικροχλωρίδα του τυριού. Τα αμινοξέα συμβάλλουν απευθείας στη γεύση του τυριού όπως μερικά αμινοξέα έχουν γεύση γλυκιά (π.χ., Gly, Ser, Thr, Ala, Pro), ξινή (π.χ., His, Glu, Asp) ή πικρή (π.χ., Arg, Met, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile, Trp). Βέβαια, η επιτάχυνση της πρωτεόλυσης δεν επιταχύνει απαραίτητως την ανάπτυξη γεύσης, υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή αμινοξέων δεν περιορίζει την ανάπτυξη γεύσης στη τυρί. Έτσι θεωρείται ότι ο κύριος ρόλος της πρωτεόλυσης στην παραγωγή γευστικών ενώσεων είναι η απελευθέρωση των αμινοξέων ως πρόδρομων ενώσεων για μια σύνθετη σειρά καταβολικών αντιδράσεων που παράγουν σημαντικές πτητικές ενώσεις αρώματος (McSweeney, 2004).

2. Μικροβιολογία των τυριών

2.1 Γενικά

Κύριο ρόλο κατά την παρασκευή της πλειοψηφίας των τυριών έχει η μικροβιακή ζύμωση του γάλακτος από επιλεγμένα γαλακτικά βακτήρια, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη λακτόζη, που με τη σειρά του μειώνει το pH του τυροπήγματος (Cogan, 2002). Η μικροχλωρίδα του τυριού είναι σημαντική στην ανάπτυξη των μοναδικών χαρακτηριστικών κάθε είδους τυριού. Μπορεί να χωριστεί σε δύο ομάδες: τα βακτήρια εκκίνησης και τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που προέρχονται από άλλες πηγές. Τα βακτήρια εκκίνησης εμπλέκονται στη παραγωγή οξέος κατά τη τυροκόμηση και συμβάλλουν στην ωρίμαση. Η υπόλοιπη μικροχλωρίδα δεν συμβάλλει κατά τη τυροκόμηση, αλλά έχει σημαντικό ρόλο κατά την ωρίμαση. Η υπόλοιπη μικροχλωρίδα αποτελείται από βακτήρια εκτός των καλλιεργειών-εκκίνησης (NSLAB) που αναπτύσσονται εσωτερικά στα περισσότερα είδη τυριών και άλλα βακτήρια, ζύμες και/ή μύκητες, που αναπτύσσονται εσωτερικά ή εξωτερικά και είναι συνήθως ιδιαίτερα για συγκεκριμένες κατηγορίες τυριών (Beresford et al., 2001). Η ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών είναι επιθυμητή. Ωστόσο, πρέπει να γίνεται εξάλειψη ή πρόληψη της εισόδου των παθογόνων στο τυρί (Beresford & Williams, 2004).

2.2 Σημαντικοί μικροοργανισμοί για τη μικροβιολογία του τυριού

2.2.1 Βακτήρια εκκίνησης

Στα περισσότερα τυριά, επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων προστίθενται σκόπιμα στο γάλα κατά την τυροκόμηση. Αυτά τα βακτήρια επιλέγονται για την ικανότητά τους να παράγουν γαλακτικό οξύ στην κατάλληλη ποσότητα για το τυρί που παρασκευάζεται, να αντισταθούν στην επίθεση βακτηριοφάγων και να παράγουν στο τυρί την επιθυμητή γεύση (Cogan, 2002). Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται ως βακτήρια εκκίνησης επειδή αρχίζουν την παραγωγή γαλακτικού οξέος και χωρίζονται σε δύο τύπους: μεσόφιλα και θερμόφιλα. Τα μεσόφιλα περιλαμβάνουν τα *Lactococci* και *Leuconostocs*, ενώ τα θερμόφιλα τα *Streptococcus thermophilus* και θερμόφιλους βάκιλους (Cogan, 2011). Τα γαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται επίσης ως ομοιοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά. Τα ομοιοζυμωτικά ζυμώνουν τη γλυκόζη αποκλειστικά προς γαλακτικό οξύ. Τα ετεροζυμωτικά ζυμώνουν τη γλυκόζη εκτός από το γαλακτικό οξύ και προς οξικό οξύ, CO₂ ή αιθανόλη. Σε ορισμένα παραδοσιακά τυριά από νωπό γάλα, η παραγωγή γαλακτικού οξέος στηρίζεται στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα του γάλακτος χωρίς να γίνει προσθήκη βακτηρίων εκκίνησης (Farkye, 2014). Σε αυτά τα τυριά, οι λακτόκοκκοι που υπάρχουν στο γάλα, συνθέτουν το μεγαλύτερο μέρος της μικροχλωρίδας στην έναρξη της ωρίμασης (Cogan, 2011).

Ο αρχικός αριθμός των βακτηρίων εκκίνησης κυμαίνεται από 10⁵ έως 10⁷ cfu mL⁻¹, ανάλογα με το τύπο του τυριού και γρήγορα μπορεί να φτάσει τα 10⁹ cfu g⁻¹, μέσα σε λίγες ώρες από τη προσθήκη τους στο γάλα. Έτσι, τα βακτήρια εκκίνησης είναι οι κυρίαρχοι οργανισμοί κατά την έναρξη της ωρίμασης (Hayaloglu, 2016). Καθώς πολλαπλασιάζονται, παράγουν γαλακτικό οξύ σε άμεση αναλογία με τη ποσότητα λακτόζης που χρησιμοποιήθηκε από αυτούς. Αυτή η ενέργεια προκαλεί τη μείωση του pH του τυροπήγματος και του ορού (Cogan, 2002). Η επιλογή για την χρησιμοποίηση μεσόφιλης ή θερμόφιλης καλλιέργειας εξαρτάται από την κατηγορία/είδος του τυριού που παράγεται (Beresford et al., 2001).

Η λύση των βακτηρίων προκαλείται από την ενδοκυτταρική μουραμινιδάση που υδρολύει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (Hayaloglu, 2016). Τα περισσότερα βακτήρια εκκίνησης αυτολύονται σχετικά γρήγορα κατά την ωρίμαση, αλλά αυτή η ικανότητα ποικίλλει. Μερικά στελέχη αυτολύονται αργά. Τυριά που έχουν παρασκευαστεί με βακτήρια εκκίνησης με γρήγορη αυτόλυση έχει παρατηρηθεί πως ωριμάζουν γρηγορότερα σε σχέση με αυτά που αυτολύονται αργά (Cogan, 2002). Η λύση των βακτηριακών κυττάρων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της περιεκτικότητας του αλατιού στο τυρί και της παρουσίας φάγων στη καλλιέργεια εκκίνησης (Cogan, 2011).

2.2.2 Εντερόκοκκοι

Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς ($>10^7 \text{ g}^{-1}$) σε πολλά παραδοσιακά τυριά. Αυτά τα βακτήρια μπορεί να προέρχονται είτε από το γάλα ή να προστέθηκαν σκόπιμα. Για το λόγο αυτό σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρονται ως καλλιέργειες εκκίνησης. Βρίσκονται τόσο σε τυριά από νωπό γάλα, όσο και σε αυτά που έχουν δεχτεί παστερίωση, αφού επιζούν της παστερίωσης (Hayaloglu, 2016). Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση γεύσης/αρώματος των τυριών. Στελέχη των εντεροκόκκων θεωρούνται παθογόνα και τα τελευταία χρόνια έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές λοιμώξεις. Αποκτούν αντίσταση σε αντιβιοτικά, ειδικά στη βανκομυκίνη, η οποία συνήθως επιλέγεται ως αντιβιοτικό για τη θεραπεία σχετικών μολύνσεων. Επομένως, η παρουσία τους στο τυρί τίθεται υπό αμφισβήτηση (Cogan, 2011).

2.2.3 Γαλακτικά βακτήρια μη-εκκίνησης

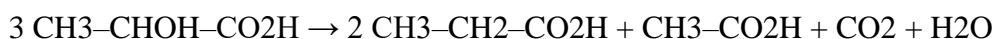
Τα γαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκίνησης (NSLAB) αποτελούν σημαντικό ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού, πιθανώς, όλων των ειδών τυριών που ωριμάζουν. Εκτός από τα *Leuconostocs*, τα NSLAB δεν προστίθενται σκόπιμα ως μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης ή ως συμπληρωματική, αλλά είναι τυχαία συχνά από επιμολύνσεις, τα οποία αναπτύσσονται κατά την ωρίμαση. Δεν συμβάλλουν στην παραγωγή οξέων, αλλά έχουν αντίκτυπο στην ανάπτυξη της γεύσης κατά την ωρίμαση του τυριού. Οι κύριες βακτηριακές ομάδες NSLAB είναι τα: *Lactobacilli*, *Leuconostocs*, *Pedicocci* και *Enterococci* (Beresford & Williams, 2004).

Τα περισσότερα NSLAB είναι ανεκτικά στο αλάτι, οξυάντοχα, προαιρετικά αναερόβια κι έτσι αναπτύσσονται αρκετά καλά στο τυρί. Χρειάζονται έναν ζυμώσιμο υδατάνθρακα για την παραγωγή ενέργειας και την ανάπτυξη τους, αλλά η πηγή ενέργειας τους είναι ασαφής, δεδομένου ότι τη στιγμή της ανάπτυξης τους η λακτόζη δεν υπάρχει. Μία πιθανή πηγή είναι και τα σάκχαρα που υπάρχουν στις γλυκοπρωτεΐνες του λίπους του γάλακτος (Hayaloglu, 2016).

Σε αντίθεση με τις καλλιέργειες εκκίνησης, ο αρχικός αριθμός των NSLAB στο τυρί είναι σχετικά χαμηλός (100 cfu g^{-1}), αλλά αναπτύσσονται σχετικά γρήγορα σε μεγάλους αριθμούς (10^8 cfu g^{-1}), εντός των πρώτων ημερών της ωρίμασης. Ο ρυθμός ανάπτυξης τους εξαρτάται κυρίως από τα υπάρχοντα στελέχη, τη θερμοκρασία ωρίμασης και την υγρασία του τυριού. Η ανάπτυξη τους είναι ταχύτερη σε τυριά με υψηλή υγρασία σε σχέση με τυριά χαμηλής υγρασίας. Επίσης, τα NSLAB πεθαίνουν πολύ αργά στα σκληρά τυριά και τα ενδοκυτταρικά τους ένζυμα πιθανώς δεν απελευθερώνονται στο πλέγμα του τυριού. Γενικά, τα κύτταρα των NSLAB είναι βιώσιμα και στις υψηλές κυτταρικές πυκνότητες που βρίσκονται στο τυρί, έχουν σημαντική μεταβολική δραστηριότητα, για παράδειγμα, μετατρέπουν το L-γαλακτικό σε D-γαλακτικό (Hayaloglu, 2016).

2.2.4 Προπιονικά βακτήρια

Τα προπιονικά βακτήρια είναι αναερόβια και θετικά στην καταλάση. Τα κύρια προπιονικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τυριά είναι το *Propionibacterium freudenreichii*, *P. thioenii*, *P. jensenii* και *P. acidipropionici* (Ratray, 2002). Το πιο σημαντικό είδος είναι το *Propionibacterium freudenreichii* (Hayaloglu, 2016). Η κύρια λειτουργία τους είναι να μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τα βακτήρια εκκίνησης σε προπιονικό οξύ, οξικό οξύ και CO₂:



Το CO₂ είναι υπεύθυνο για τις μεγάλες τρύπες, που ονομάζονται «μάτια» (Cogan, 2011). Το pH του τυριού αυξάνεται ελαφρώς λόγω αυτής της ζύμωσης (Walstra et al., 2006). Τα προπιονικά βακτήρια έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 25 ± 32°C και pH 6,5 ± 7,0. Είναι γενικά ευαίσθητα σε συνθήκες υψηλής οξύτητας, σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια. Μπορούν να αναπτυχθούν σε 6 ± 7% NaCl κάτω από βέλτιστες συνθήκες, όμως ο συνδυασμός χαμηλού pH (pH 5,2 ± 5,4) και NaCl μειώνει την ανάπτυξη τους (Ratray, 2002).

Οι συνήθεις ποσότητες προπιονικών βακτηρίων που προστίθενται στο τυρί είναι κυρίως χαμηλές, της τάξης των 10³ cfu g⁻¹. Βέβαια, όταν το τυρί μεταφέρεται σε ζεστό περιβάλλον (18-25°C) κατά την ωρίμαση, τα προπιονικά βακτήρια μπορούν να φτάσουν τα 10⁸-10⁹ cfu g⁻¹ σε 20-30 ημέρες μετά την παρασκευή του τυριού (Farkye, 2014).

2.2.5 Ζύμες

Οι ζύμες αποικίζουν την επιφάνεια του τυριού 1-2 μέρες μετά τη παρασκευή του και φθάνουν το πληθυσμό των 10⁷-10⁹ κυττάρων g⁻¹ τυριού (Ratray, 2002). Βρίσκονται όχι μόνο στην επιφάνεια του τυριού, αλλά και στο εσωτερικό του (Beresford & Williams, 2004). Οι ζύμες είναι πολύ ανεκτικές σε χαμηλό pH και σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Ταυτόχρονα, οξειδώνουν το γαλακτικό σε CO₂ και H₂O, και παράγουν NH₃ από την απαμίνωση των αμινοξέων, και τα δύο οδηγούν σε αύξηση του pH. Η αύξηση του pH προωθεί την ανάπτυξη βακτηρίων, τα οποία είναι δεν είναι ανθεκτικά σε χαμηλές τιμές pH (Cogan, 2011). Επίσης, οι ζύμες παράγουν ενδοκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην πρωτεόλυση (Farkye, 2014).

Τέλος, οδηγούν στη δημιουργία της χαρακτηριστικής ανεπιθύμητης ζυμώδους ή φρουτώδους γεύσης και στη παραγωγή αερίων στα τυριά. Ωστόσο, λόγω της παραγωγής μεταβολιτών, όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, συγκεκριμένα στελέχη μπορεί να συμβάλλουν στην ωρίμαση και τον σχηματισμό αρώματος (Kongo & Malcata, 2016).

2.2.6 Μύκητες

Οι μύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμαση ορισμένων τυριών. Τα τυριά που ωριμάζουν με μύκητες διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: αυτά που ωριμάζουν λόγω της παρουσίας του *Penicillium roqueforti* που αναπτύσσεται και σχηματίζει μπλε φλέβες μέσα στο τυρί, όπως τα Roquefort, Gorgonzola, Stilton και Danish blue, και εκείνα που ωριμάζουν με το *P. camemberti* που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των τυριών, όπως το Camembert και το Brie (Beresford et al., 2001).

Το *Penicillium roqueforti* αναπτύσσεται στους αέριους χώρους μεταξύ των κομματιών τυροπήγματος που δεν έχουν πλήρως συνενωθεί και είναι υπεύθυνο για τις μπλε φλέβες που υπάρχουν στο μπλε τυρί, ενώ ο *P. camemberti* μεγαλώνει ως μια συμπαγής, αφράτη μάζα στην επιφάνεια του Camembert και του Brie (Cogan, 2011).

Οι μύκητες είναι υποχρεωτικά αερόβιοι, και ως εκ τούτου χρειάζονται O_2 για την ανάπτυξή τους. Δεν θεωρούνται καλλιέργειες εκκίνησης, καθώς δεν έχουν κανένα ρόλο στη παραγωγή οξέος. Οι ζύμες και οι μύκητες αναπτύσσονται καλύτερα από ορισμένα βακτήρια στο pH του τυριού και γι' αυτό είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που θα αναπτυχθούν στην επιφάνεια του τυριού. Έτσι το χαμηλό pH του φρέσκου τυριού είναι επιλεκτικό προς την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Τέλος, οι ζύμες και οι μύκητες είναι θερμό-ευαίσθητα και θανατώνονται με τη παστερίωση (Cogan, 2011).

2.2.7 Μικρόκοκκοι και Σταφυλόκοκκοι

Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς ($>10^6$ cfu g^{-1}) στην επιφάνεια των σκληρών, ημισκληρών και μαλακών τυριών με επιφανειακό επίχρισμα (smear-ripened). Μικροσκοπικά μοιάζουν αρκετά, αλλά δεν σχετίζονται φυλογενετικά. Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram, ενώ οι μικρόκοκκοι είναι αρνητικοί κατά Gram. Διακρίνονται εύκολα μεταξύ τους, για παράδειγμα, οι σταφυλόκοκκοι παράγουν οξύ αερόβια και αναερόβια από τη γλυκόζη και είναι αρνητικοί στην οξειδάση και ευαίσθητοι στην λυσοσταφίνη, ενώ οι μικρόκοκκοι παράγουν οξύ μόνο αερόβια από τη γλυκόζη, είναι θετικοί στην οξειδάση και ανθεκτικοί στη λυσοσταφίνη (Cogan, 2011).

Οι κυρίαρχοι σταφυλόκοκκοι στα τυριά είναι οι *Staphylococcus saprophyticus*, *S. equorum*, *S. vitulus* και *S. xylosus*, που όλοι είναι αρνητικοί στη πηκτάση (κοαγκουλάση). Πρόσφατα το γένος *Micrococcus* χωρίστηκε σε πέντε γένη, τα *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus*, *Dermacoccus*, και *Micrococcus*, και τα στελέχη που απομονώνονται από την επιφάνεια των τυριών περιλαμβάνουν τα *Kocuria rosea*, *K. varians*, *Dermacoccus sedantarius*, *Micrococcus lyslae* και *M. luteus*. Ο ακριβής ρόλος των σταφυλόκοκκων και των μικρόκοκκων στο τυρί δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά πολλοί από αυτούς παράγουν πρωτεΐνες και λιπάσες (Cogan, 2011).

2.2.8 Κορνόμορφα Βακτήρια

Τα κορνόμορφα βακτήρια βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια των τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακό επίχρισμα (smear-ripened) και για μεγάλο χρονικό

διάστημα το *Brevibacterium linens* θεωρούνταν το πιο σημαντικό, υπεύθυνο για το κόκκινο ή πορτοκαλί χρώμα στην επιφάνεια των τυριών. Για το λόγο αυτό, συχνά εμβολιάζεται εσκεμμένα στην επιφάνεια των τυριών μετά το αλάτισμα σε άλμη. Άλλα σημαντικά κορυνόμορφα βακτήρια είναι τα *Arthrobacter*, *Agrococcus*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium* και *Microbacterium* spp. Γενικά, οι σταφυλόκοκκοι είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του τυριού και μετά ακολουθούν τα κορυνόμορφα (Cogan, 2011). Τα κορυνόμορφα, οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν τα κύρια συστατικά της μικροχλωρίδας της επιφάνειας των τυριών (Cogan, 2002). Οι πηγές μόλυνσης αυτών των βακτηρίων περιλαμβάνουν την άλμη και τα ράφια ωρίμασης, όπως και τη χειρωνακτική μεταχείριση των τυριών, αφού τα κορυνόμορφα, οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας του δέρματος (Cogan, 2011).

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη

2.3.1 Θερμοκρασία

Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στη παρασκευή και την ωρίμαση των τυριών είναι είτε μεσόφιλοι ή θερμοφιλοι κι έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30°C ή 42°C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία στην οποία ωριμάζει ένα τυρί αποτελεί συμβιβασμό μεταξύ της ανάγκης να προωθηθούν οι αντιδράσεις ωρίμασης και ο έλεγχος ανάπτυξης της επιθυμητής δευτερεύουσας μικροχλωρίδας, και της ανάγκης να προληφθεί η ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων που θα επιφέρουν αλλοίωση (Beresford et al., 2001). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες προάγουν την ταχύτερη ωρίμαση από τα βακτήρια εκκίνησης και τη δευτερεύουσα μικροχλωρίδα, αλλά επίσης επιτρέπουν την ανάπτυξη αλλοιώσεων και παθογόνων βακτηρίων (Cogan, 2011). Για ορισμένα είδη τυριών, η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 20°C στην αρχή της ωρίμασης για την προώθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και της δραστηριότητας αποξίνισης των ζυμών (Monnet et al., 2015).

2.3.2 pH – Οργανικά οξέα

Τα περισσότερα βακτήρια απαιτούν ουδέτερη τιμή pH για βέλτιστη ανάπτυξη και παρουσιάζουν κακή ανάπτυξη σε τιμές pH <5,0. Το pH του τυροπήγματος μετά την παρασκευή του κυμαίνεται από 4,5 έως 5,3, και είναι σημαντικός παράγοντας στον έλεγχο της βακτηριακής ανάπτυξης στο τυρί (Cogan, 2011). Τα γαλακτικά βακτήρια, ιδιαίτερα οι γαλακτοβάκιλοι, γενικά έχουν βέλτιστο pH κάτω από 7, και ο *Lactobacillus* spp. μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές pH περίπου 4, οι περισσότερες ζύμες

και μύκητες έχουν βέλτιστο pH 5-7 αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και σε τιμές <3. Οι μικρόκοκκοι θεωρείται ότι είναι αδύνατο να αναπτυχθούν σε τιμές pH κάτω από 5,5 ή 6,0 (Hayaloglu, 2016).

Στα πρώτα στάδια της ωρίμασης, το pH είναι περίπου 5. Αυτή η χαμηλή τιμή pH, ευνοεί επιφανειακά την ανάπτυξη αερόβιων ζυμών και μυκήτων, που είναι περισσότερο ανεκτικοί στην οξύτητα σε σχέση με τα βακτήρια. Οι ζύμες και οι μύκητες συμβάλλουν στην αύξηση του pH του τυριού μετατρέποντας το γαλακτικό οξύ σε CO₂, όπως και με τη παραγωγή αμμωνίας από τα αμινοξέα. Στο τέλος της ωρίμασης το pH στην επιφάνεια του τυριού μπορεί να φτάσει τιμές πάνω από 7,5 (Monnet et al., 2015).

Η αποτελεσματικότητα των οργανικών οξέων ως αναστολέων της μικροβιακής ανάπτυξης θεωρείται ότι εξαρτάται από τη ποσότητα του αδιάστατου οξέος που υπάρχει και συνεπώς από τη σταθερά διάταξης του οξέος (pKa) και το pH. Τα κύρια οξέα που βρίσκονται στα τυριά είναι το προπιονικό, το οξικό και το γαλακτικό οξύ με τιμές pKa 4.87, 4.75 και 3.08, αντίστοιχα. Έτσι, στην ίδια συγκέντρωση το γαλακτικό οξύ είναι το λιγότερο αποτελεσματικό και το προπιονικό ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας. Ωστόσο, η συγκέντρωση του οξέος είναι εξίσου σημαντική και στο τυρί το γαλακτικό οξύ είναι πάντοτε παρόν στο τυρόπηγμα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα άλλα δύο. Το pH πολλών μαλακών τυριών χαρακτηριστικά αυξάνεται κατά την ωρίμαση, ιδιαίτερα στην επιφάνεια, και αυτό μειώνει τις ανασταλτικές ιδιότητες της επιφάνειας. Το προπιονικό οξύ είναι πολύ αποτελεσματικό στην καταστολή της ανάπτυξης των μυκήτων (Cogan, 2011).

2.3.3 Υγρασία – Ενεργότητα νερού

Το νερό είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σημαντικότερος παράγοντας είναι η διαθεσιμότητα του νερού και όχι το συνολικό ποσό που υπάρχει. Η διαθεσιμότητα νερού μετράται ως ενεργότητα νερού (a_w), η οποία ορίζεται ως η αναλογία της τάσης ατμών πάνω από το τυρί προς τη τάση ατμών του καθαρού νερού σε αυτή τη θερμοκρασία. Η τιμή της a_w κυμαίνεται από 0 έως 1.0. Το NaCl και τα οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό και προπιονικό) διαλύονται στην υγρασία του τυριού και μειώνουν την τάση ατμών. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων, τόσο χαμηλότερη είναι η a_w (Cogan, 2011).

Κατά τα πρώτα στάδια της παραγωγής των τυριών, η ενεργότητα νερού είναι περίπου 0.99, η οποία υποστηρίζει την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα της καλλιέργειας εκκίνησης. Ωστόσο, μετά την στράγγιση του τυρογάλακτος, του αλατίσματος και κατά την ωρίμαση τα επικρατέστερα επίπεδα a_w είναι σημαντικά χαμηλότερα (0.917-0.988; Rüegg & Blanc, 1981) από τις βέλτιστες απαιτήσεις των βακτηρίων εκκίνησης. Είναι έτσι πιθανό η a_w να συμβάλλει στον έλεγχο της μεταβολικής δραστηριότητας και του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων εκκίνησης (Brown, 1976).

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε μεγαλύτερες τιμές a_w από τις ζύμες και οι ζύμες σε μεγαλύτερες τιμές από τους μύκητες. Τα περισσότερα βακτήρια απαιτούν $a_w > 0.92$ για να αναπτυχθούν (Cogan, 2011). Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) γενικά έχουν μεγαλύτερα ελάχιστα όσον αφορά την a_w . Η ελάχιστη a_w για τα *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* και *Propionibacterium*

freudenreichii ssp. *shermanii* είναι 0.93, >0.98, >0.96 και 0.96, αντίστοιχα (Weber & Ramet, 1987). Το όριο για τις περισσότερες ζύμες είναι περίπου 0.83, ενώ για τους μύκητες 0.75. Η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε χαμηλές τιμές a_w χαρακτηρίζεται από μεγάλης διάρκειας λανθάνουσα φάση, αργό ρυθμό ανάπτυξης και μείωση του μέγιστου αριθμού κυττάρων που παράγονται. Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες συμβάλλει στο περιορισμό του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών (Cogan, 2011).

Το τυρί, εκτός εάν έχει συσκευαστεί υπό κενό, έχει απώλεια υγρασίας μέσω εξάτμισης κατά την ωρίμαση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η a_w στο τυρί να έχει διαβάθμιση (μικρότερη στην επιφάνεια του τυριού σε σχέση με το εσωτερικό του). Η διαβάθμιση της a_w είναι πιο έντονη σε μεγάλα τυριά, παρά σε μικρά. Οι πρωτεΐνες στο τυρί είναι ενυδατωμένες και αυτό το «δεσμευμένο» νερό δεν είναι διαθέσιμο για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η υδρόλυση των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων προς αμινοξέα και λιπιδίων σε ακυλ-γλυκερόλες και λιπαρά οξέα κατά την ωρίμαση μειώνει τη διαθεσιμότητα νερού, επειδή ένα μόριο νερού προστίθεται σε κάθε δεσμό που υδρολύεται (Cogan, 2011).

Ο έλεγχος της απώλειας υγρασίας μπορεί να γίνει με την αύξηση της σχετικής υγρασίας στο χώρο ωρίμασης ή συσκευάζοντας το τυρί σε κερί ή πλαστικό (Beresford et al., 2001).

2.3.4 Αλάτι

Το NaCl χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων. Η απαιτούμενη συγκέντρωση εξαρτάται από τη φύση του τροφίμου, το pH και την υγρασία του, αλλά γενικά <10% είναι επαρκής (Cogan, 2011). Η προσθήκη αλατιού στο τυρόπηγμα, είναι κοινή πρακτική στα περισσότερα τυριά, που επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη των βακτηρίων εκκίνησης. Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια παρεμποδίζονται εν μέρει ή πλήρως σε 5% NaCl. Ωστόσο, τα διαφορετικά στελέχη έχουν και διαφορετική ανοχή αλατιού, επομένως αυτό το κριτήριο είναι σημαντικό στην επιλογή του στελέχους ώστε να διασφαλιστεί ότι το pH του τυριού μπορεί να ελεγχθεί μετά τη παραγωγή του (Broome et al., 2002).

Το αλάτι και η a_w σχετίζονται, και η αναστολή των βακτηρίων εκκίνησης όσο και αυτών που προκαλούν αλλοιώσεις αντανάκλουν την επίδραση του αλατιού στη μείωση της a_w . Η μείωση της a_w που συμβαίνει όταν το αλάτι διαλύεται στο νερό, είναι ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας (Rüegg & Blanc, 1977).

Σε τυριά αλατισμένα σε άλμη, παρατηρείται μία διακύμανση στη περιεκτικότητα άλατος (υψηλότερη στο εξωτερικό, χαμηλότερη στο εσωτερικό) κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμασης, η οποία μειώνεται σχετικά αργά κατά τη διάρκεια αυτής. Η συγκέντρωση του αλατιού επηρεάζεται από το μέγεθος του τυριού, τη περιεκτικότητα της άλμης σε αλάτι, τη θερμοκρασία της άλμης και τη διάρκεια που το τυρί βρίσκεται βυθισμένο σε αυτή. Γενικά, χρησιμοποιείται άλμη 21% NaCl, με pH 5,2 (ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ), που περιέχει 0.2% Ca ώστε να προληφθεί η έκπλυση γαλακτικού και Ca από την επιφάνεια του τυριού. Όλα τα τυριά που αλατίζονται με άλμη έχουν υψηλότερα επίπεδα αλατιού στα επιφανειακά στρώματα, ως εκ τούτου οι δευτερεύοντες μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στην επιφάνειά τους πρέπει να είναι ανθεκτικοί στο αλάτι (Cogan, 2011).

2.3.5 Δυναμικό οξειδοαναγωγής (Redox potential - E_h)

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής είναι η μέτρηση της ικανότητας ενός χημικού/βιοχημικού συστήματος να οξειδώνεται (να χάνει ηλεκτρόνια) ή να ανάγεται (να κερδίζει ηλεκτρόνια). Το E_h μετριέται σε mV, θετική τιμή mV δηλώνει τάση οξείδωσης, ενώ αρνητική τιμή δηλώνει αναγωγή. Το E_h του γάλακτος είναι περίπου +150 mV, ενώ του τυριού είναι περίπου -250 mV (Beresford et al., 2001).

Ο ακριβής μηχανισμός της μείωσης του E_h στο τυρί δεν έχει αποδειχθεί πλήρως, πιθανότατα σχετίζεται με τη οξυγαλακτική ζύμωση από τη καλλιέργεια εκκίνησης κατά την ωρίμαση, και την κατανάλωση από αυτήν των μικρών ποσοτήτων οξυγόνου στο γάλα (Crow et al., 1995). Εξαιτίας αυτών των αντιδράσεων, το εσωτερικό του τυριού είναι ουσιαστικά αναερόβιο σύστημα, το οποίο μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη υποχρεωτικών ή προαιρετικά αναερόβιων μικροβίων. Σε διαφορετικές μικροβιακές καλλιέργειες, το E_h μπορεί να κυμαίνεται από +300 mV για τα αερόβια και λιγότερο από -400 mV για τα αναερόβια (Brown & Emberger, 1980).

Το E_h του τυριού είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν στο τυρί, έτσι οι υποχρεωτικά αερόβιοι, όπως οι *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* και *Micrococcus* spp. δεν αναπτύσσονται στο εσωτερικό του τυριού. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του τυριού είναι κατά κύριο λόγο υποχρεωτικά αερόβια (Beresford et al., 2001).

2.4 Μικροβιακή αλλοίωση των τυριών

Πολλοί μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια ενός τυριού μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις τόσο στη γεύση όσο και στη δομή. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται κάποιοι μικροοργανισμοί και οι αλλοιώσεις που προκαλούν στα τυριά.

Πίνακας 1.2. Μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις σε ώριμα τυριά πηγή: Walstra et al., 2006).

Μικροοργανισμός	Πηγή μόλυνσης	Πηγή άνθρακα	Ευαισθησία στο αλάτι	Θανάτωση από χαμηλή παστερίωση	Αλλοίωση γεύσης	Σχηματισμός αερίων	Παρατηρήσεις
Yeasts		Λακτόζη	Κυρίως	Ναι	Γεύση ζύμης, Φρουτώδης	CO ₂	
Κολοβακτηριοειδή	Γάλα, τυρόπηγμα, ορός γάλακτος	Λακτόζη	Ναι	Ναι	Γεύση ζύμης, Ασαφής	H ₂ , CO ₂	Πρώιμη διόγκωση ^β
Propionibacterium spp.	Γάλα	Γαλακτικό	Ναι	Ναι	Γλυκιά	CO ₂	Επιθυμητό σε κάποιες ποικιλίες τυριών
Lactobacillus casei, paracasei	Γάλα, τυρόπηγμα	Αμινοξέα	Λίγο	Ναι	Ασαφής	CO ₂	
Lactobacillus plantarum, brevis, buchneri	Τυρί, άλμη	Αμινοξέα	Όχι	Ναι		CO ₂	Σχηματίζει ρωγμές
Lactococcus lactis var. maltigenes	Γάλα, καλλιέργεια εκκίνησης	Λακτόζη	Ναι	Ναι	Καμμένη	-	
Enterococcus malodoratus	Γάλα, τυρόπηγμα	Λακτόζη	Λίγο	Μερικώς	H ₂ S	-	
Streptococcus thermophilus	Εξοπλισμός θέρμησης	Λακτόζη	Λίγο	Όχι	Ασαφής	CO ₂	
Clostridium tyrobutyricum	Γάλα	Γαλακτικό	Ναι	Όχι		H ₂ , CO ₂	
Yeasts ^α	Άλμη, συσκευασμένο τυρί	Λακτόζη, Γαλακτικό	Ποικίλει	Ναι	Ποικίλει		Γλοιώδης επιδερμίδα
Coryneforms ^α	Συσκευασμένο τυρί	Λακτόζη, Γαλακτικό	Ποικίλει	Ναι			Γλοιώσης, κόκκινη επιδερμίδα
Aspergillus versicolor, etc. ^α	Αέρας, συσκευασμένο τυρί	Λακτόζη	Λίγο	Ναι	Μούχλας		Παράγει sterigmatocystine

^α Αναπτύσσεται επιφανειακά (αερόβια).

^β Εκτός από τα coliforms, όλα τα βακτήρια που παράγουν αέρια στα τυριά μπορούν να προκαλέσουν όψιμη διόγκωση.

2.4.1 Πρώιμη διόγκωση ή φούσκωμα ή παραγωγή αερίων

Σύμφωνα με τους Μάντης κ.ά. (2015), η πρώιμη διόγκωση παρατηρείται κατά τα αρχικά στάδια παραγωγής. Τότε, αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια βακτήρια και κυρίως κολοβακτηριοειδή, αλλά και ζύμες μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν αέρια από τη ζύμωση της λακτόζης. Τα αέρια διογκώνουν την τυρομάζα η οποία σε τομή παρουσιάζει μικρές πολυπληθείς οπές και έχει εμφάνιση σπόγγου.

Τα κολοβακτηριοειδή είναι μεσόφιλα, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν στους 10 °C και 40 °C, αναστέλλονται σε χαμηλό pH 4.1-3.85 και περιλαμβάνουν ψυχρότροφα είδη. Ζυμώνουν την υπολειμματική λακτόζη στα φρέσκα τυριά και παράγουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη, CO₂ και H₂. Το H₂ είναι ασθενώς διαλυτό στο νερό και ευνοεί τη διόγκωση. Οι ζύμες παράγουν CO₂ από το μεταβολισμό του γαλακτικού ή της λακτόζης (Moschoroulou et al., 2018).

Αν και ο αριθμός των κολοβακτηριοειδών μειώνεται κατά την ωρίμαση, η υψηλή υγρασία και η υπολειμματική λακτόζη σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία και το pH της φρέσκης τυρομάζας ευνοούν το πολλαπλασιασμό τους στα φρέσκα τυριά

(Moschoroulou et al., 2018). Η πρόιμη διόγκωση αφορά κυρίως μαλακά τυριά, και όχι σκληρά εξαιτίας της μεγαλύτερης a_w των μαλακών τυριών. Αποτελεσματικοί τρόποι για τον έλεγχο της πρόιμης διόγκωσης είναι η προσθήκη νιτρικών στο γάλα, η γρήγορη ζύμωση της λακτόζης από τη καλλιέργεια εκκίνησης, η σωστή στράγγιση, η παστερίωση του γάλακτος και η σωστή υγιεινή κατά τη τυροκόμηση σύμφωνα με τους Cogan (2011) και Moschoroulou κ.α. (2018).

Η παραγωγή αερίων σε μαλακά ή αλοιφώδους σύστασης τυριά συσκευασμένα σε πλαστικό μέσο προκαλεί διόγκωση της συσκευασίας, συχνά χωρίς να υπάρχει διόγκωση της τυρομάζας. Αυτό οφείλεται στην επιφανειακή επιμόλυνση τους με αεριογόνους μικροοργανισμούς. Για την αποτροπή της διόγκωσης μπορεί να γίνει παστερίωση του έτοιμου προϊόντος μετά τη συσκευασία του (Μάντης κ.α., 2015).

2.4.2 Όσιμη διόγκωση ή φούσκωμα ή παραγωγή αερίων

Η όσιμη διόγκωση, εμφανίζεται μεταγενέστερα στην ωρίμαση και οφείλεται στη ζύμωση του γαλακτικού οξέος σε βουτυρικό, CO_2 και H_2 από τα *Clostridium tyrobutyricum* και *Clostridium butyricum*. Τα χαρακτηριστικά της όσιμης διόγκωσης συνοψίζονται παρακάτω από τους Cogan (2011), Moschoroulou κ.α. (2018) και Μάντης κ.α. (2015).

Τα κλωστρίδια είναι αναερόβια και αναπτύσσονται μερικές εβδομάδες ή και μήνες μετά τη τυροκόμηση. Από την ανάπτυξή τους συνήθως παράγεται βουτυρικό οξύ, που είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη ανεπιθύμητων γεύσεων και αερίων που οδηγούν στη δημιουργία μεγάλων οπών στο τυρί. Συγκεκριμένα το *Clostridium tyrobutyricum* είναι οξυάντοχο, αναερόβιο που αναπτύσσεται σε pH 4,5-7,5 και μεταβολίζει το γαλακτικό παράγοντας βουτυρικό οξύ, οξικό οξύ, CO_2 και H_2 . Σε βέλτιστο pH 5,8, μπορεί να ανεχτεί 5,5-6% αλάτι. Έτσι, γρήγορη πτώση του pH σε τιμές χαμηλότερες του 5 σε συνδυασμό με γρήγορη πρόσληψη αλατιού (>5,5 % αλάτι σε υγρασία) δεν ευνοεί την όσιμη διόγκωση στα τυριά.

Για να αποτραπεί αυτή η αλλοίωση πρέπει να ληφθούν μέτρα που αφορούν, τόσο στην ποιότητα του γάλακτος, όσο και τις συνθήκες τυροκόμησης και ωρίμασης. Η καλή ποιότητα ενσιρώματος και οι ορθές πρακτικές άμελης περιορίζουν τον αρχικό αριθμό σπορίων στο γάλα. Η βακτηριοκάθαρση του γάλακτος μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση της αλλοίωσης. Επίσης, μπορεί να γίνει προσθήκη νιτρικών αλάτων (π.χ. KNO_3 , NaNO_3), που σε συνδυασμό με το NaCl δρουν ανασχετικά κυρίως στην ανάπτυξη των κλωστηριδίων, χωρίς να επηρεάζουν την οξυγαλακτική καλλιέργεια. Ακόμα, μπορεί να γίνει προσθήκη λυσοζύμης, η οποία υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες φυσικά στο γάλα και υδρολύει το κυτταρικό τοίχωμα ευαίσθητων βακτηρίων, όπως το *Cl. tyrobutyricum*, προκαλώντας τη λύση τους.

Τέλος, στα τυριά που ωριμάζουν με καλλιέργεια που προκαλεί ετεροζυμωτική ή και προπιονική ζύμωση (π.χ. Emmental), η όσιμη διόγκωση μπορεί να προκαλείται από έντονη ζύμωση και υπερβολική παραγωγή CO_2 από τη φυσιολογική οξυγαλακτική γλωρίδα των τυριών αυτών, χωρίς όμως να συνοδεύεται από κακοσμία και αλλοίωση της γεύσης του προϊόντος.

2.4.3 Επιφανειακή αλλοίωση

Το εξωτερικό μέρος ενός τυριού, αποτελεί την επιδερμίδα/φλοιό του, που είναι ευαίσθητη στην αλλοίωση λόγω άμεσης επαφής με το περιβάλλον του τυριού και συγκεκριμένα με τον αέρα. Γενικά, οι συνθήκες που επικρατούν στην επιφάνεια του τυριού ευνοούν την ανάπτυξη ζυμών, μυκήτων, αερόβιων και ανθεκτικών στο αλάτι μικρόκοκκων, όπως και corynebacteria (Moschoroulou et al., 2018).

3. Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις στα τυριά- Συσκευασία

3.1 Γενικά

Οι κυριότερες απώλειες κατά την εμπορευματοποίηση του τυριού συμβαίνουν κατά την αποθήκευση του, όπου η μόλυνση του τυριού από βακτήρια, μύκητες και ζύμες είναι συνήθης και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων γεύσεων, μειώνοντας τη ποιότητα του τυριού, κυρίως όταν αποθηκεύεται χωρίς συσκευασία. Επίσης, σε ορισμένα είδη τυριών μπορεί να συμβεί υψηλή απώλεια υγρασίας, με αποτέλεσμα την αύξηση της σκληρότητας τους και ανεπιθύμητες οργανοληπτικές ιδιότητες. Με σκοπό την επίλυση αυτών των προβλημάτων, έχουν προταθεί διάφορα συστήματα συσκευασίας, συμπεριλαμβανομένου της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) και συσκευασίας υπό κενό (vacuum). Σήμερα, για αυτές τις συσκευασίες χρησιμοποιούνται υλικά όπως το πολυαιθυλένιο, το πολυαμίδιο και το πολυπροπυλένιο (Costa et al., 2018).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον γύρω από τη χρήση εδώδιμων επικαλύψεων και μεμβρανών, εξαιτίας των πλεονεκτημάτων τους, σε σχέση με τα συνθετικά. Η χρήση εδώδιμων επικαλύψεων και μεμβρανών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αποβλήτων και της μόλυνσης του περιβάλλοντος (Bourtoom, 2008).

3.2 Υλικά για την παρασκευή των επικαλύψεων και μεμβρανών

3.2.1 Πολυσακχαρίτες

3.2.1.1 Κυτταρίνη και παράγωγα

Η κυτταρίνη αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες μέσω β-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών. Εξαιτίας της κρυσταλλικής δομής της είναι ανάγκη να αυξηθεί η διαλυτότητα της. Η διαλυτότητα της μπορεί να αυξηθεί μέσω της κατεργασίας της κυτταρίνης με αλκάλια, ώστε να διογκωθεί η δομή της, ακολουθούμενη από αντίδραση με χλωροοξικό οξύ, μεθυλοχλωρίδιο ή προπυλενοξείδιο που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (carboxymethyl cellulose, CMC), μεθυλοκυτταρίνης (methyl cellulose, MC) ή υδροξυπροπυλοκυτταρίνης (hydroxypropyl cellulose, HPC). Οι CMC, MC και HPC μεμβράνες έχουν καλή ικανότητα σχηματισμού φιλμ και είναι γενικά άοσμες, άγευστες, εύκαμπτες, με μέτρια αντοχή σε έλαια και λίπη και μέτρια διαπερατότητα στην υγρασία και το οξυγόνο (Bourtoom, 2008).

Η CMC είναι ένα ανιοντικό παράγωγο της κυτταρίνης που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα εξαιτίας του ιξώδους της. Μπορεί να δημιουργήσει μεμβράνες με διαφορετική

αντοχή ανάλογα με το μοριακό βάρος και το βαθμό υποκατάστασης (Youssef et al., 2017).

Η MC είναι η πιο ανθεκτική στο νερό και η λιγότερο υδρόφιλη από τα παράγωγα της κυτταρίνης και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ζελατινώδεις επικαλύψεις που επάγονται θερμικά (Bourtoom, 2008).

3.2.1.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, που είναι διαθέσιμο στο εμπόριο και χρησιμοποιείται σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως βρώσιμο υλικό συσκευασίας. Η ανάμιξη της χιτοζάνης με άλλα φυσικά πολυμερή δίνει μεμβράνες και επικαλύψεις με καλές ιδιότητες, όπως καλός σχηματισμός και μηχανικές ιδιότητες, απουσία τοξικότητας και σχετικά πιο υδρόφοβη φύση που θα μπορούσε να παρέχει καλύτερο φράγμα στην υγρασία και αντοχή στο νερό (Elsabee & Abdou, 2013).

Η χιτοζάνη προέρχεται από την χιτίνη με αποακετυλίωση σε αλκαλικό μέσο. Έχει αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση, που πιστεύεται πως προέρχεται από τη πολυκατιονική φύση της (Elsabee & Abdou, 2013). Η χιτοζάνη δεν είναι διαλυτή στο νερό αλλά διαλυτή σε αραιό οξικό οξύ ή αραιό HCl (Youssef et al., 2017).

Οι λειτουργικές ιδιότητες των μεμβρανών χιτοζάνης μπορούν να βελτιωθούν συνδυάζοντάς τες με άλλα υδροκολλοειδή. Ένας εναλλακτικός τρόπος βελτίωσης των μηχανικών και φυσικών ιδιοτήτων αυτών των βιουμενίων είναι ο συνδυασμός τους με πρωτεΐνες (π.χ. πρωτεΐνες γάλακτος, πρωτεΐνη σόγιας, κολλαγόνο και ζελατίνη) και με πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλα, αλγινικά, κυτταρίνη) (Elsabee & Abdou, 2013).

Οι Coma et al.. (2002), εμβολίασαν τυρί Emmental έτοιμο για κατανάλωση με *Listeria innocua* και χρησιμοποίησαν επικάλυψη με χιτοζάνη 1% (v/v), ώστε να δράσει ως αντιμικροβιακό και να αναστείλει την ανάπτυξη του παθογόνου. Αυτή η προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή του *L. innocua* κατά τη διάρκεια 132 h, όταν η επικάλυψη εφαρμόστηκε σε δείγματα τυριού 1-3 cm που επώαστηκαν στους 37 °C.

Σε άλλο παράδειγμα, επικάλυψη με χιτοζάνη και συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC) αποδείχθηκε αποτελεσματική στη παράταση της διάρκειας ζωής τυριού Ricotta χωρίς επιδερμίδα, κατά την αποθήκευση του στους 4°C έως 30 ημέρες. Στο μη επικαλυμμένο τυρί τα όρια μικροβιολογικής αποδοχής για τα μεσόφιλα βακτήρια ήταν πάνω από το όριο μετά από 7 ημέρες, μεταξύ 7 και 14 ημερών για τα ψυχρόφιλα βακτήρια και μεταξύ 14 και 21 ημερών για τα γαλακτικά βακτήρια. Αντίθετα, σε επικαλυμμένα δείγματα, κατά τη διάρκεια των 30 ημερών αξιολόγησης οι τιμές ήταν πάντα κάτω από το όριο μικροβιολογικής αποδοχής. Επίσης, υπήρξε καθυστέρηση στην ανάπτυξη της ανεπιθύμητης οξύτητας, καλύτερη διατήρηση της υφής και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα επικαλυμμένα δείγματα σε σύγκριση με τα μη επικαλυμμένα (Di Pierro et al., 2011).

3.2.1.3 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης. Χρησιμοποιείται συχνά στα βιομηχανικά τρόφιμα, για την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών για την μερική ή πλήρη αντικατάσταση των πλαστικών πολυμερών λόγω του χαμηλού κόστους, της δυνατότητας ανανέωσης και των καλών μηχανικών ιδιοτήτων του (Xu et al., 2005).

Η χρήση αμύλου αραβοσίτου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη οδηγεί σε μεμβράνες βελτιωμένων ιδιοτήτων. Η χημική υποκατάσταση και η όξινη υδρόλυση αμύλων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη βελτιώνει τη καθαρότητα και ευκαμψία των επικαλύψεων που κατασκευάζονται από αυτά. Η προσθήκη πλαστικοποιητών βελτιώνει αποτελεσματικά τις ιδιότητες των μεμβρανών, όμως επιβαρύνει το φραγμό που προσφέρουν (Kramer, 2009). Συγκεκριμένα, μεμβράνες που παράγονται από άμυλο αραβοσίτου υψηλής περιεκτικότητας σε αμυλόζη (71%), δεν είχαν ανιχνεύσιμη διαπερατότητα οξυγόνου σε επίπεδα σχετικής υγρασίας (RH) μικρότερα από 100% (Mark et al., 1966).

3.2.1.4 Γαλακτομαννάνες

Οι γαλακτομαννάνες είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στο ενδοσπέρμιο πολλών φυτών. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν τις ιδιότητες σχηματισμού μεμβράνης των γαλακτομαννανών είναι η αναλογία μαννόζη/γαλακτόζη (M/G), το μέσο μοριακό βάρος, η fine structure λεπτή δομή και το ιξώδες τους (Nieto, 2009).

Το μεγάλο πλεονέκτημα των γαλακτομαννανών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν πολύ ιξώδη διαλύματα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις που επηρεάζονται ελάχιστα από το pH, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκή επεξεργασία (Cerqueira et al., 2011).

Πλαστικοποιημένες επικαλύψεις γαλακτομαννανών με γλυκερόλη που περιέχουν έλαιο καλαμποκιού μείωσαν σημαντικά την κατανάλωση O₂ και τα ποσοστά παραγωγής CO₂ στο ημίσκληρο τυρί “Regional”. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή αυτής της επικάλυψης μειώνει την απώλεια νερού, τη σκληρότητα και την αλλαγή χρώματος κατά την αποθήκευση του τυριού (Cerqueira et al., 2010).

3.2.1.5 Καραγενάνες

Οι καραγενάνες είναι θειωμένοι πολυσακχαρίτες. Βάσει του αριθμού θειικών ομάδων (degree of sulfation) ταξινομούνται σε κάπα (κ, χαμηλή θείωση), γιώτα (ι, μέση θείωση) και δέλτα (δ, υψηλή θείωση), το οποίο επηρεάζει τη διαλυτότητα τους στο νερό. Η δ είναι διαλυτή σε κρύο νερό, ενώ η κ χρειάζεται θέρμανση στους 82 °C για να διαλυτοποιηθεί. Μεταξύ των τριών ειδών η κ παράγει τη δυνατότερη μεμβράνη και η δ τη λιγότερο δυνατή, αλλά παρουσιάζουν παρόμοια δύναμη διάτρησης (Nieto, 2009).

3.2.2 Λίπη

Τα λίπη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βρώσιμες επικαλύψεις, ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον σε συνδυασμό με άλλα υλικά, στοχεύοντας στην αύξηση της υδροφοβικότητας των επικαλύψεων (Costa et al., 2018). Σύμφωνα με τη δομή τους, μπορούν να χωριστούν σε φυσικούς κηρούς και ρητίνες, ακετυλογλυκερίδια, λιπαρά οξέα και διάφορα είδη φυτικών ελαίων (Galus & Kadzińska, 2015). Μπορούν να είναι υγρά και στερεά σε θερμοκρασία δωματίου, και αυτό είναι το χαρακτηριστικό που θα επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο θα χρησιμοποιηθούν, δηλαδή αν θα εφαρμοστούν απευθείας στην επιφάνεια του τυριού ή σε συνδυασμό με άλλα υλικά στο διάλυμα της επικάλυψης (Costa et al., 2018).

Τα φυτικά έλαια (αραβοσιτέλαιο, ελαιόλαδο, κραμβέλαιο, ηλιέλαιο) είναι εύκολα διαθέσιμα, έχουν χαμηλό κόστος, είναι μη τοξικά, αποτελούν πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και η χρησιμοποίησή τους σε εδώδιμες επικαλύψεις στα τρόφιμα σχετίζεται με διάφορα θετικά οφέλη για την υγεία (Ma et al., 2012).

Οι κηροί είναι εστέρες αλειφατικών οξέων μακράς αλυσίδας με αλειφατικές αλκοόλες μακράς αλύσου. Είναι πιο ανθεκτικά στη διάχυση του νερού (water diffusion) από τα περισσότερα άλλα εδώδιμα υλικά φιλμ λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε πολικές ομάδες και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπαρές αλκοόλες μακράς αλύσου και αλκάνια (Galus & Kadzińska, 2015).

Στη περίπτωση των κηρών μόνο λίγες μελέτες έδειξαν τη πιθανή χρήση τους στα τυριά, με το κεριό μέλισσας να έχει ήδη εφαρμοστεί σε τυρί με επιτυχία. Οι Yilmaz και Dagdemir (2012) χρησιμοποίησαν κεριό μέλισσας σε τυρί Kashar με μονή ή διπλή επικάλυψη, που εφαρμόστηκε με εμβάπτιση. Τα τυριά ωρίμασαν για 4 μήνες στους 4°C με σχετική υγρασία 85%, δείχνοντας ότι το κεριό μέλισσας λειτουργούσε ως προστατευτικό υλικό επικάλυψης μειώνοντας τους μύκητες σε τιμές 1.89 log (CFU/g) στις 120 ημέρες, ενώ ο μάρτυρας παρουσίαζε τιμή 4.60 log (CFU/g). Στην οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε κλίμακα κυμαινόμενη από 1 (φτωχή) έως 9 (εξαιρετική), οι βρώσιμες επικαλύψεις έδειξαν βελτιωμένη υφή (7.62), γεύση (7.61) και οσμή (7.62) όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα στρώμα επικάλυψης στο τυρί και όταν συγκρίθηκε με τυρί Kashar συσκευασμένο υπό κενό παρουσίασε τιμές 7.23, 7.34 και 7.46, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση της απώλειας υγρασίας κατά τη σύγκριση επικαλυμμένου και μη επικαλυμμένου τυριού, με τιμές 61.36 και 67.85% ξηράς ουσίας, αντίστοιχα.

Σε άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε σύνθετο φιλμ zein-wax σε συνδυασμό με λυσοζύμη, κατεχίνη (catechin) και γαλλικό οξύ (gallic acid) ως βιοδραστικές ενώσεις, για την επικάλυψη τυριού Kashar. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί τύποι κεριών (κερί carnauba, κεριό cacandelilla και κεριό μέλισσας) σε συνδυασμό με ζείνη (zein). Το φιλμ zein-carnauba, οδήγησε σε σημαντική μείωση του *L. monocytogenes* που είχε εμβολιαστεί στα δείγματα τυριού. Οι μεμβράνες με την ενσωμάτωση λυσοζύμης, κατεχίνης και γαλλικού οξέος ήταν εκείνες που έδειξαν την υψηλότερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα με τιμές 5.59 log CFU/g όσον αφορά το *L. monocytogenes* σε σύγκριση με το μάρτυρα (8.13 log CFU/g), και έδειξαν ταυτόχρονα καλύτερες αντιοξειδωτικές

ιδιότητες αποφεύγοντας την οξείδωση των λιπιδίων του τυριού, όταν τα τυριά αποθηκεύονται στους 4°C για 8 εβδομάδες (Ünal et al., 2013).

3.2.3 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος λαμβάνονται από την παρασκευή τυριού και καζεΐνης και περιέχουν διαφορετική ποσότητα πρωτεϊνών με διακριτές ιδιότητες. Είναι διαθέσιμες ως συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού (WPC) ή απομονωμένη πρωτεΐνη ορού (WPI), ανάλογα με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, 20-80% και 90%, αντίστοιχα. Έχουν καλή ικανότητα σχηματισμού φιλμ και παρουσιάζουν ως κύριο πλεονέκτημα τις ιδιότητες χαμηλού φραγμού, ειδικότερα στο οξυγόνο (σε σχέση με φιλμ που έχουν ως βάση το πετρέλαιο), πτητικά αρώματα και λιπίδια (Ramos et al., 2012).

Οι Ramos κ.α. (2012), αξιολόγησαν επικαλύψεις με βάση WPI ενσωματώνοντας διαφορετικούς συνδυασμούς αντιμικροβιακών ενώσεων για την παράταση της διάρκειας ζωής ενός ημίσκληρου τυριού. Παρατήρησαν μείωση κατά 10% της απώλειας υγρασίας και χαμηλότερη μεταβολή της σκληρότητας και του χρώματος κατά την αποθήκευση των επικαλυμμένων τυριών όταν συγκρίθηκαν με τα μη επικαλυμμένα δείγματα. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητα των επικαλύψεων που έχουν ως βάση WPI να δρουν ως φράγμα στους υδρατμούς και έτσι να αποφεύγεται η απώλεια υγρασίας και να εξασφαλίζεται η διατήρηση της σκληρότητας.

Σε άλλη εργασία, έχει δειχθεί ότι οι επικαλύψεις με βάση WPI σε συνδυασμό με 3% αιθέριο έλαιο δυόσμου στο τυρί Ιογ (50 g) μειώνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης στους 4 °C. Η ποιότητα και η ασφάλεια του τυριού βελτιώθηκαν με μία συνολική μείωση (0 log CFU/g) των *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* και την ανάπτυξη ζυμών-μυκήτων, ενώ υπήρξε μείωση στην ανάπτυξη του *E. coli* (2.01 log CFU/g), σε σύγκριση με το μάρτυρα (7.9, 7.71, 7.87 και 7.93 log CFU/g, αντιστοίχως). Στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε πλήρης βακτηριοκτόνος και αντιμικροβιακή δράση όταν χρησιμοποιήθηκε 4% αιθέριο έλαιο δυόσμου, από την πρώτη ημέρα έως το τέλος του πειράματος, 15 ημέρες αργότερα στους 4 °C (Kavas & Kavas, 2014)

3.2.4 Αλγινικό νάτριο

Το αλγινικό νάτριο, εξάγεται από καστανά φύκια της τάξης των *Phaeophyceae*, είναι γραμμικό συμπολυμερές των μονομερών D- μαννουρονικού και L- γουλουρονικού οξέος (guluronic). Η ικανότητα των αλγινικών να αντιδρούν με δισθενή και τρισθενή κατιόντα χρησιμοποιείται στο σχηματισμό των μεμβρανών τους (Cha & Chinnan, 2004). Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου σχηματίζουν απευθείας πηκτή με την προσθήκη ασβεστίου ή οποιουδήποτε δισθενούς κατιόντος. Το αλγινικό νάτριο σχηματίζει μια ικανοποιητικά ισχυρή μεμβράνη, παρά το αρνητικό φορτίο του μορίου (Nieto, 2009).

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη συνδύασε επικαλύψεις με βάση το αλγινικό νάτριο σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) (50% CO₂, 50% N₂) για τη συντήρηση τυριού Mozzarella στους 4°C. Η διάρκεια ζωής υπολογίστηκε σύμφωνα με το όριο μικροβιολογικής αποδοχής του *Pseudomonas*, το όριο οργανοληπτικής

αποδοχής, τη συνολική ποιότητα, το μέσο χρόνο για το τελικό στάδιο αποθήκευσης στο οποίο οι μύκητες δεν ήταν ορατοί και το συντομότερο χρόνο αποθήκευσης στο οποίο οι μύκητες ήταν ορατοί. Η διάρκεια ζωής του τυριού αυξήθηκε έως και 160 ημέρες, ενώ ο μάρτυρας είχε διάρκεια ζωής 53 ημέρες. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως οι βρώσιμες επικαλύψεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των τυριών (Mastromatteo et al., 2014).

3.2.5 Πλαστικοποιητές

Η χρήση βιοπολυμερών κατάλληλων για τρόφιμα στη παρασκευή βρώσιμων επικαλύψεων/μεμβρανών αποδίδει εύθρυπτες και δύσκαμπτες μεμβράνες λόγω των υπερβολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των πολυμερών (Rivero et al., 2010). Οι πλαστικοποιητές είναι υδρόφιλα μόρια, όπως οι πολυόλες, συμπληρωματικοί των υλικών παρασκευής των μεμβρανών με σκοπό την ανάπτυξη των φυσικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους (Suput et al., 2015). Το νερό αποτελεί τον ευρέως διαδεδομένο πλαστικοποιητή των υδρόφιλων πολυμερών (Rivero et al., 2010). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πλαστικοποιητή και των μορίων του πολυμερούς μειώνουν τις διαμοριακές δυνάμεις καθώς αυξάνουν τη κινητικότητα των αλυσίδων των πολυμερών, κι έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του συντελεστή ελαστικότητας και των μηχανικών ιδιοτήτων των μεμβρανών. Επιπλέον, η χρήση πλαστικοποιητών αυξάνει την αντίσταση των μεμβρανών/επικαλύψεων στη διείσδυση ατμών και αερίων. Η γλυκερόλη θεωρείται ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος πλαστικοποιητής, αλλά γίνεται και χρήση σορβιτόλης και αιθυλενογλυκόλης (Youssef et al., 2017).

3.3 Αντιμικροβιακοί παράγοντες

Έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός αντιμικροβιακών παραγόντων, ώστε να βελτιωθούν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των επικαλύψεων και των μεμβρανών. Θα πρέπει να αποτελούν πρακτική προσέγγιση μόνο όταν είναι αποτελεσματικοί σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Με βάση τον τρόπο με τον οποίο τα υλικά αυτά εκδηλώνουν τις δραστηριότητές τους, ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν εκείνα που για να δράσουν απαιτείται μεταφορά μικρής ποσότητάς τους στην επιφάνεια των τροφίμων, ενώ στην άλλη κατηγορία ανήκουν εκείνα που δρουν αποτελεσματικά στη πρόληψη της μικροβιακής ανάπτυξης στην επιφάνεια των τροφίμων χωρίς να μεταναστεύουν σε αυτή (Cha & Chinnan, 2004).

3.3.1 Νισίνη

Η νισίνη είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 34 υπολείμματα αμινοξέων, με μοριακή μάζα 3.5 kDa, και ταξινομείται ως βακτηριοσίνη. Παράγεται από στελέχη *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* απομονωμένα από γάλα και προϊόντα με βάση τα

λαχανικά και η σημασία της οφείλεται στο ευρύ φάσμα δραστηριότητας της κατά Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων. Η νισίνη έχει υψηλή επιφανειακή δραστηριότητα και έχει την ικανότητα να προσροφάται σε στερεές επιφάνειες και να θανατώνει μικροοργανισμούς που στη συνέχεια προσκολλώνται στις επιφάνειες αυτές (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008).

Η νισίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε βρώσιμες επιστρώσεις και οδήγησε στην καθυστέρηση της μικροβιακής ανάπτυξης σε διάφορα είδη τυριών. Σε τυρί Ricotta, μετά από 7 ημέρες στους 4 °C η μέτρηση του εμβολιασμένου *L. monocytogenes* στην επιφάνεια του τυριού ήταν μικρότερη (4 log CFU/g) σε σχέση με τα δείγματα χωρίς επικάλυψη ($p < 0.05$) (6.2 log CFU/g), όπως και σε αυτά με επικάλυψη γαλακτομαννάνης χωρίς νισίνη (4.7 log CFU/g), αποδεικνύοντας πως η χρήση νισίνης μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* (Martins et al., 2010).

Σε άλλη εργασία χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες με βάση WPI με 3% μηλικό οξύ και 50 IU/mL νισίνης έναντι των *P. aeruginosa* και *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από τυρί Castelo Branco. Παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής 3.2 mm για το *L. monocytogenes* και 0.8 mm για το *P. aeruginosa* που απέδειξε την αντιμικροβιακή δράση της νισίνης και του μηλικού οξέος έναντι αυτών των βακτηρίων (Pintado et al., 2010).

3.3.2 Ναταμυκίνη

Η ναταμυκίνη ανήκει στα αντιβιοτικά της ομάδας των πολυενίων. Παράγεται από αερόβια ζύμωση από τον *Streptomyces natalensis* και από συναφή είδη. Χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακό στην επιφάνεια των τυριών λόγω της δραστηριότητας της κατά των ζυμών και μυκήτων. Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι η ναταμυκίνη δεν έχει τοξικές επιδράσεις ακόμη και σε υψηλές ποσότητες κατάποσης, η εφαρμογή της ως πρόσθετη ύλη τροφίμων εξακολουθεί να περιορίζεται από το νόμο παγκόσμια. Ο στόχος είναι να αποφευχθεί η μετανάστευση της στο εσωτερικό των τροφίμων, λόγω πιθανού κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητάς στα αντιβιοτικά. Στην Ευρώπη επιτρέπεται η χρήση ναταμυκίνης 1 mg/dm² για επιφάνεια τυριού (απουσία σε βάθος 5 mm) (European Parliament and Council, 2011, Costa et al., 2018).

Εδώδιμες επικαλύψεις με ναταμυκίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές σε τυριά. Οι Ture κ.α. (2011) χρησιμοποίησαν επικαλύψεις με βάση τη γλουτένη σίτου με ναταμυκίνη για να μειώσουν τη μικροβιακή ανάπτυξη σε φρέσκο τυρί κατά την αποθήκευση του. Έδειξαν την αποτελεσματική απομάκρυνση του *Aspergillus niger* από φρέσκο τυρί Kashar μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 10 °C, όταν χρησιμοποιήθηκαν 2 mg ναταμυκίνης ανά 10 g διαλύματος μεμβράνης.

3.3.3 Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη είναι μια απλή πεπτιδική πρωτεΐνη, η οποία έχει ενζυματική δραστηριότητα έναντι των β-1-4 γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ N ακετυλομουραμικού οξέος και N ακετυλογλυκοζαμίνης που βρίσκονται στην πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος τόσο των θετικών κατά Gram όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος από

τη λυσοζύμη βλάπτει τη δομική ακεραιότητα του και οδηγεί σε λύση των βακτηριακών κυττάρων. Η λυσοζύμη παρουσιάζει ενδιαφέρον για χρήση σε συστήματα τροφίμων, καθώς είναι ένζυμο που φυσικά παράγεται από ανθρώπους και ζώα και παρουσιάζει δραστηριότητα ειδικά εναντίον της κυτταρικής δομής των βακτηρίων (Cha & Chinnan, 2004).

Οι Conte et al. (2009) χρησιμοποίησαν ένα συνδυασμό επικάλυψης αλγινικού νατρίου με λυσοζύμη σε συνθήκες MAP (Modified Atmosphere Packaging) 30% CO₂, 5% O₂ και 65% N₂ σε τυρί Fiori di Latte (50 g) και αξιολόγησαν την επέκταση του χρόνου αποθήκευσης χρησιμοποιώντας το χαμηλότερο όριο μικροβιολογικής αποδοχής και τη χαμηλότερη οργανοληπτική τιμή αποδοχής στους 10 °C. Παρατήρησαν αύξηση της διάρκειας ζωής κατά 3 ημέρες σε σύγκριση με το μάρτυρα. Επίσης, όταν αξιολογήθηκαν οι οργανοληπτικές ιδιότητες που σχετίζονται με την εξωτερική εμφάνιση, τη συνοχή, το χρώμα, τη γεύση και τη συνολική αποδοχή χρησιμοποιώντας μια κλίμακα από 0 έως 7, όπου το 4 ορίστηκε ως κατώφλι αποδοχής, οι τιμές οργανοληπτικής αποδοχής του τυριού ήταν ίδιες για το επικαλυμμένο και το μάρτυρα, και αντιστοιχούσαν κατά μέγιστο σε τρεις ημέρες συντήρησης.

3.3.4 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικές ουσίες που παράγονται από φυτά, τα οποία ανήκουν σε αγγειόσπερμες οικογένειες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία για διαφορετικούς σκοπούς (Pavela, 2015). Ως εκ τούτου, τα αιθέρια έλαια είναι φυσικά προϊόντα που λαμβάνονται από φυτικά υλικά, όπως λουλούδια, μπουμπούκια, φύλλα, στελέχη, φλοιοί και σπόροι. Η σύνθεση και η ποιότητα τους επηρεάζονται από χαρακτηριστικά του φυτού, όπως το στάδιο ανάπτυξης, η ποικιλία, η γεωγραφική προέλευση, το μέρος του χρησιμοποιούμενου φυτού, η ηλικία, η εποχή και η κατάσταση του φυτού κατά τη συγκομιδή. Επίσης, επηρεάζονται από τη μέθοδο εξαγωγής, τις συνθήκες ανάλυσης και τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Τα αιθέρια έλαια έχουν ενσωματωθεί σε βρώσιμες/βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες και επικαλύψεις μέσω της γαλακτωματοποίησης, επηρεάζοντας τις δομικές, φυσικές και βιοδραστικές ιδιότητες των φιλμ. Η προσθήκη αιθέριων ελαίων συνεπάγεται ασυνέχεια στο δίκτυο που σχηματίζουν τα πολυμερή, οδηγώντας σε αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες τους (συνήθως κάποια εξασθένηση, μειωμένη διαπερατότητα στο νερό και αυξημένη αδιαφάνεια). Με στόχο την επέκταση της ζωής του προϊόντος και τη προσθήκη αξίας σε αυτό, τα αιθέρια έλαια παρέχουν στις μεμβράνες/επικαλύψεις αντιοξειδωτικές ή/και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται, όχι μόνο από τη δράση των ενώσεων του ελαίου, αλλά και από τη διαπερατότητα στο οξυγόνο της μεμβράνης/επικάλυψης. Η ενσωμάτωση σε βρώσιμες μεμβράνες μπορεί να προάγει την αντιμικροβιακή ικανότητα των αιθέριων ελαίων και η αποτελεσματικότητα των μεμβρανών κατά της μικροβιακής ανάπτυξης εξαρτάται από τη φύση του ελαίου και τον τύπο του μικροοργανισμού (Atarés & Chiralt, 2016).

Παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες, η χρήση αιθέριων ελαίων είναι περιορισμένη λόγω της επίδρασης τους στις οργανοληπτικές ιδιότητες των τυριών, αφού από την έντονη μυρωδιά και γεύση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αλλάξουν τη γεύση του τυριού (Costa et al., 2018).

Οι Artiga-Artigas κ.α. (2017), εφάρμοσαν επικάλυψη με βάση νανογαλάκτωμα που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης ως αντιμικροβιακό παράγοντα και εφαρμόστηκε σε κομμάτι τυρί με χαμηλά λιπαρά ώστε να παραταθεί η διάρκεια ζωής του. Η σύνθεση του γαλακτώματος ήταν 2.0% (β/β) αλγινικό νάτριο, 0.5% (β/β) ίνα μανταρινιού, 2.5% (β/β) Tween 80 και 1.50%, 2.0% ή 2.5% (β/β) αιθέριο έλαιο ρίγανης. Οι επικαλύψεις με τουλάχιστον 2.0% (β/β) αιθέριο έλαιο ρίγανης μείωσαν τον πληθυσμό του *Staphylococcus aureus* από 6.0 στους 4.6 log CFU/g μετά από 15 ημέρες. Τα επικαλυμμένα τεμάχια τυριού που περιείχαν 2.5% (β/β) αιθέριο έλαιο ανέστειλαν ψυχρόφιλα βακτήρια ή μύκητες και ζύμες κατά τη διάρκεια 6 ή 24 ημερών αποθήκευσης, αντίστοιχα.

3.3.5 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται συνήθως ως πρόσθετα των τροφίμων για τη διατήρησή τους, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης και της ικανότητας οξίνισης που διαθέτουν. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες σχετίζονται με την δραστηριότητα χηλικποίησης των οργανικών οξέων και την ικανότητα τους να διασπώνται μέσα στο κύτταρο και να μειώνουν το pH. Επίσης, η δραστηριότητα των οργανικών οξέων σχετίζεται με το pKa, καθώς χαμηλότερες τιμές του pKa οδηγούν σε μεγαλύτερη μείωση του pH (Costa et al., 2018).

Οι Pintado et al. (2009) χρησιμοποίησαν επικαλύψεις με βάση WPI σε συνδυασμό με κίτρινο, γαλακτικό και μηλικό οξύ μαζί με νισίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα οργανικά οξέα έχουν από μόνα τους αποτέλεσμα κατά της λιστέριας που σε συνδυασμό με τη νισίνη, αυξάνεται, υποδεικνύοντας ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα. Οι επικαλύψεις με βάση WPI με μηλικό και κίτρινο οξύ έδειξαν τη μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση έναντι των στελεχών *L. monocytogenes* και *L. innocua*, εξαιτίας του αντιμικροβιακού δυναμικού των οργανικών οξέων.

3.4 Μέθοδοι εφαρμογής των επικαλύψεων και μεμβρανών

Μία από τις σημαντικές πτυχές της χρήσης επικαλύψεων/μεμβρανών είναι η μέθοδος εφαρμογής τους. Αυτή η επιλογή εξαρτάται από τον τύπο και το μέγεθος του τυριού, στο οποίο πρόκειται να εφαρμοστεί η επικάλυψη/μεμβράνη, ενώ επηρεάζει το κόστος και την αποτελεσματικότητα της επικάλυψης, η οποία θα πρέπει να μπορεί να προσαρμοσθεί στη γραμμή παραγωγής. Η εφαρμογή μιας βρώσιμης συσκευασίας (επικάλυψης ή μεμβράνης) μπορεί να πραγματοποιηθεί με εμβάπτιση, με ψεκασμό, με ηλεκτροστατικό ψεκασμό και με τη χρήση πινέλου στην περίπτωση των επικαλύψεων και περιτύλιξης στη περίπτωση των μεμβρανών (Ollé Resa et al., 2012, Zhong et al., 2014).

Η πιο κατάλληλη μέθοδος εφαρμογής είναι αυτή που εγγυάται τη συνολική κάλυψη του τυριού κι έτσι συμβάλει στην καλύτερη παράταση της διάρκειας ζωής. Επίσης,

είναι σημαντικό να εξεταστεί το είδος του τυριού και το μέγεθος της παραγωγής, ώστε να καθοριστεί η πιο αποτελεσματική μέθοδος (Costa et al., 2018).

Η εμφάνιση είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος εφαρμογής επικάλυψης των τυριών σε εργαστηριακή κλίμακα λόγω της απλότητας, του χαμηλού κόστους και της καλής κάλυψης που προσφέρει ακόμη και σε ανώμαλη επιφάνεια τροφίμων. Ωστόσο, η εμφάνιση οδηγεί σε αραίωση του διαλύματος επικάλυψης, αφήνει υψηλή ποσότητα υπολειμμάτων και στη δεξαμενή εμφάνισης υπάρχει ανάπτυξη μικροοργανισμών (Zhong et al., 2014).

Η εφαρμογή μεμβράνης με χρήση πινέλου εφαρμόζεται για να αποφευχθούν τα μειονεκτήματα της εμφάνισης. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη σε εργαστηριακή κλίμακα και παραγωγή τυριού μικρής κλίμακας (Kampf & Nussinovitch, 2000).

Ο ψεκασμός χρησιμοποιείται ευρέως για την εφαρμογή επικαλύψεων. Προσφέρει ομοιόμορφη επικάλυψη, με ελεγχόμενο πάχος και τη δυνατότητα διαδοχικών εφαρμογών χωρίς να μολύνεται το διάλυμα επικάλυψης (Andrade et al., 2012).

Ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να ελέγχει το μέγεθος των σταγονιδίων, να αυξάνει τη κάλυψη και εναπόθεση τους, ενώ το διάλυμα κατανέμεται ομοιογενώς και μειώνεται η σπατάλη του (Edward Law, 2001).

Ο Zhong κ.α. (2014) αξιολόγησαν τα διαλύματα (2% χιτοζάνη και 0.5% γλυκερόλη σε 1% οξικό οξύ), (1% αλγινικό νάτριο και 0.25% γλυκερόλη σε απιονισμένο νερό) και (5% απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας και 1.25% γλυκερόλη σε απιονισμένο νερό) ως υλικά επικάλυψης σε τυρί Mozzarella. Το τυρί επικαλύφθηκε με αυτά τα διαλύματα με εμφάνιση, engraving, ψεκασμό και ηλεκτροστατικό ψεκασμό. Το διάλυμα αλγινικού νατρίου είχε το μεγαλύτερο ιξώδες και τη καλύτερη ικανότητα επικάλυψης στο τυρί. Το πάχος της μεμβράνης διέφερε εμφανώς με βάση τη μέθοδο επικάλυψης (κυμαινόταν από 30.6 έως 83.3 mm). Η επικάλυψη του τυριού από τους δύο τρόπους ψεκασμού οδήγησε σε λεπτότερο φιλμ επικάλυψης. Το διάλυμα αλγινικού νατρίου είχε τις καλύτερες φυσικοχημικές ιδιότητες κατά την αποθήκευση, ενώ δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη διατήρηση του τυριού μεταξύ των τεσσάρων μεθόδων επικάλυψης.

3.5 Συσκευασία

Σήμερα η συσκευασία τροφίμων συμμετέχει πολυλειτουργικά στη βιομηχανία τροφίμων. Οι συσκευασίες έχουν πολλαπλές λειτουργίες, περιέχουν, διατηρούν και προστατεύουν το προϊόν. Το εξωτερικό κάλυμμα πρέπει επίσης να ενημερώνει τον καταναλωτή σχετικά με το προϊόν και το σχέδιο του πρέπει να το προωθεί. Η συσκευασία έχει επίσης μια δευτερεύουσα λειτουργία, αυτή της μείωσης των απωλειών και των αποβλήτων για τον παρασκευαστή και τον καταναλωτή και τη διευκόλυνση της αποθήκευσης, του χειρισμού και άλλων εμπορικών διεργασιών (Pora & Belc, 2007).

3.5.1 Τεχνικές συσκευασίας

Σημαντική πρόσθετη λειτουργία στις μεθόδους συσκευασίας αποτελεί η παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων. Υπάρχουν πολλές νέες μέθοδοι, που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, σε συσκευασίες τροφίμων βασισμένες στη μείωση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου που περιβάλλει το τρόφιμο (Pora & Belc, 2007).

3.5.1.1 Συσκευασία κενού (Vacuum Packaging)

Με αυτή τη τεχνική η συσκευασία «εκκενώνεται» και κλείνει αφήνοντας πολύ χαμηλή ποσότητα αέρα, ιδιαίτερα οξυγόνου, σε επαφή με το τρόφιμο.

3.5.1.2 Μέτρια συσκευασία κενού (Moderate Vacuum Packaging)

Το προϊόν αποθηκεύεται υπό πίεση περίπου 400 mBar σε θερμοκρασία ψύξης. Αυτό μπορεί να γίνει σε άκαμπτο, αεροστεγές δοχείο ή σε πλαστική θήκη. Η ποσότητα του διαθέσιμου οξυγόνου στο τρόφιμο, είναι περίπου το ένα τρίτο της φυσιολογικής, επιβραδύνοντας έτσι την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης.

3.5.1.3 Ενεργή συσκευασία (Active packaging)

Η σύνθεση της ατμόσφαιρας της συσκευασίας μπορεί να αλλάξει τοποθετώντας φακελάκια με συλλέκτες οξυγόνου ή μικροοργανισμούς που παράγουν CO₂ ή χρησιμοποιώντας άλλα ειδικά μέσα. Τα υλικά συσκευασίας πρέπει να έχουν χαμηλή διαπερατότητα στα διάφορα αέρια που χρησιμοποιούνται.

3.5.1.4 Βρώσιμες επικαλύψεις (Edible coatings)

Εδώδιμες επικαλύψεις ή μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα ως προστατευτικό επιφανειακό στρώμα. Προστατεύουν τα τρόφιμα από τη μικροβιακή αλλοίωση και την απώλεια ποιότητας και αναπτύσσονται με βάση πρωτεΐνες, άμυλα, κεριά, λιπίδια, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ενώσεις.

3.3.1.5 Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified atmosphere packaging)

Στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας δημιουργείται μια ατμόσφαιρα με σύνθεση αερίων διαφορετική από εκείνη του ατμοσφαιρικού αέρα. Οι ιδιότητες των κύριων χρησιμοποιούμενων αερίων είναι οι εξής:

CO₂ - αντιμικροβιακή δράση,

O₂ – ο στόχος της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι να μειωθεί η συγκέντρωση οξυγόνου στο εσωτερικό της συσκευασίας κάτω από 1-2%, ακόμη και στο 0.2% αντικαθιστώντας το οξυγόνο με άζωτο και /ή διοξείδιο του άνθρακα,

N₂ – αδρανές αέριο.

Στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας των τροφίμων που δεν «αναπνέουν» (non respiring foods) χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλή περιεκτικότητα σε CO₂ (20%) με χαμηλή περιεκτικότητα σε O₂ (0.5%) και συνιστάται θερμοκρασία αποθήκευσης 5°C. Σε τρόφιμα που αναπνέουν, δηλ. σε νωπά φρούτα και λαχανικά, μόλις η ατμόσφαιρα μεταβληθεί στο επιθυμητό επίπεδο, ο ρυθμός αναπνοής του τροφίμου πρέπει να ισούται με τη διάχυση αερίων διαμέσου του υλικού συσκευασίας προκειμένου να επιτευχθεί ατμόσφαιρα ισορροπίας στη συσκευασία.

3.3.1.6 Ασηπτική συσκευασία (Aseptic packaging)

Τα τρόφιμα μετά από θερμική επεξεργασία μεταφέρονται σε αποστειρωμένα και ερμητικά σφραγισμένα δοχεία υπό ασηπτικές συνθήκες, έτσι ώστε να μη συμβεί εκ νέου μόλυνση. Η αρχή αυτή είναι γνωστή για τα υγρά προϊόντα, όπως το γάλα (UHT),

οι χυμοί φρούτων κλπ. Η τεχνολογία που καλείται «clean room» αποσκοπεί στη δραστική μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών στις περιοχές που παράγονται, τεμαχίζονται ή συσκευάζονται τρόφιμα, με σκοπό την αύξηση της ασφάλειας και της σταθερότητας τους.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Πειραματικές τυροκομήσεις

Πραγματοποιήθηκαν τρεις τυροκομήσεις, χρησιμοποιώντας 50kg νωπό, αγελαδινό γάλα από τις αγελάδες του Κτηνοτροφείου του Γ.Π.Α., η σύσταση του οποίου προσδιοριζόταν σε αυτόματο αναλυτή υπερύθρου (Milkoscan 133, Foss Electric Denmark).

Οι συνθήκες τυροκόμησης ήταν:

1. Γάλα: 50kg αγελαδινό γάλα χωρίς τυποποίηση
2. Διήθηση
3. Παστερίωση 68°C/10min
4. Ψύξη στους 35°C
5. Προσθήκη 15mL CaCl₂ 50%
6. Προσθήκη καλλιέργειας CHOOZIT™ AlpD της εταιρείας Danisco-DuPont
7. Προσθήκη 1,5g κλασικής πυτιάς (Βλαχοπούλα)
8. Ηρεμία, σχηματισμός πηγματος
9. Διαίρεση σε κύβους 1x1cm
10. Αναθέρμανση 42-43°C/30min
11. Ηρεμία για 5min
12. Καλούπιασμα
13. Πίεση με τα χέρια και μηχανικά για δύο ώρες (πραγματοποιήθηκε αναστροφή στο μέσο του χρόνου)
14. Παραμονή στο θάλαμο 10-12°C όλο το βράδυ

15. Την επόμενη ημέρα, αφαίρεση του πηγματος από τα καλούπια και αλάτισμά τους σε άλμη 22% αλάτι, 0,3% CaCl₂ σε αναλογία φρέσκο τυρί:άλμη 1:2 και για χρόνο που να αντιστοιχεί σε 2,5 ώρες ανά 0,5kg κεφαλιού τυριού
16. Μετά το τέλος του αλατίσματος, παραμονή των τυριών στους 10-11°C για 7 ημέρες με αναστροφές, μετά από στέγνωμα της επιφάνειάς τους.
17. Εφαρμογή επικάλυψης στα μισά δείγματα των τυριών και δημιουργία δύο ομάδων. Ομάδα Α (χωρίς επικάλυψη) και ομάδα Β (με επικάλυψη).
18. Μεταφορά στους 18°C για δύο εβδομάδες
19. Συσκευασία και μεταφορά στο ψυγείο.

4.2. Δειγματοληψία και σήμανση

Η σήμανση των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφεται στον Πίνακα 4.1

Πίνακας 4.1. Σήμανση δειγμάτων τυριών

Τυροκόμηση	Εφαρμογή επικάλυψης	Ηλικία (ημέρες)
2Τ, 3Τ, 4Τ	Α (χωρίς επικάλυψη) Β (με επικάλυψη)	7, 21, 160

Τα σημεία των δειγματοληψιών ορίστηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2. Δειγματοληψία και σήμανση τυριών

Ηλικία τυριού (ημέρες)	7	21	160
Σήμανση	2Τ7,3Τ7,4Τ7	2Τ21Α,2Τ21Β,3Τ21Α, 3Τ21Β,4Τ21Α,4Τ21Β	2Τ160Α,2Τ160Β,3Τ160Α, 3Τ160Β,4Τ160Α,4Τ160Β
Στάδιο ωρίμασης	Μεταφορά στους 18°C	Τέλος ωρίμασης	Τυρί στη συντήρηση

4.3. Παρασκευή και εφαρμογή μεμβράνης

Η αναγκαία ποσότητα σκόνης whey protein isolate (WPI) διαλύθηκε με σταδιακή προσθήκη σε απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10% κ.β. Κατόπιν, προστέθηκε γλυκερόλη, σε συγκέντρωση 5% κ.β., ως πλαστικοποιητής και το διάλυμα αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 2 ώρες. Ακολούθως, το διάλυμα θερμάνθηκε υπό συνεχή ανάδευση στους

80°C για 20min και μετά ψύχθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως τελικό βήμα το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο pH 7 χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 1M. Το διάλυμα παρέμενε για 24 h στο ψυγείο. Την 7^η μέρα ωρίμασης τα τυριά χωρίζονταν σε δύο ομάδες A και B. Στην ομάδα B πραγματοποιούνταν η επικάλυψη με τη χρήση πινέλου από τη μία πλευρά, ενώ την 8^η μέρα μετά από αναστροφή του τυριού επικαλυπτόταν και η άλλη πλευρά του.

4.4. Αναλύσεις των τυριών

4.4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις επιδερμίδας τυριών

Φέρονται 10g δείγματος τυριού τα οποία ομογενοποιούνται με 90ml αποστειρωμένου διαλύματος κιτρικού τρινατρίου σε Bagmixer 400 (Interscience) και γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με διάλυμα Ringer. Επίσης, 10g δείγματος τυριού ομογενοποιούνται με 90ml αποστειρωμένου διαλύματος Peptone water και γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με διάλυμα Peptone water. Τα κολιβακτήρια θα προσδιοριστούν με εμβολιασμούς 1ml από το διάλυμα τυριού-Ringer σε θρεπτικό Violet red bile agar με τη μέθοδο της διπλής επίστρωσης και επώαση στους 37°C για 24h. Οι μικρόκοκκοι θα προσδιοριστούν με εμβολιασμούς 100μl από το διάλυμα τυριού-Peptone water σε θρεπτικό Mannitol salt agar με τη μέθοδο της επίστρωσης και επώαση στους 30°C για 3 ημέρες. Τέλος, οι ζύμες-μύκητες θα προσδιοριστούν με εμβολιασμούς 1ml από το διάλυμα τυριού-Ringer σε θρεπτικό Yeast extract Glucose Chloramphenicol agar με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης και επώαση στους 25°C για 5 ημέρες.

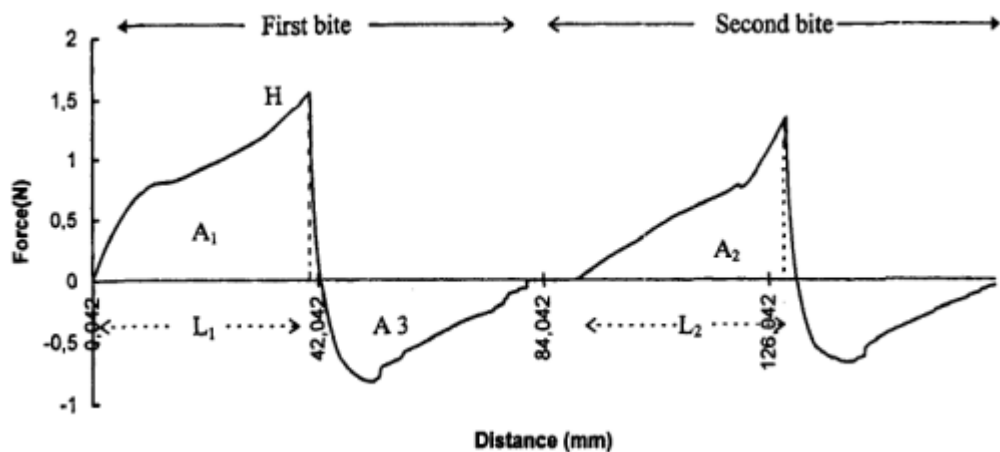
4.4.2 Ανάλυση κατατομής δομής των τυριών

Τα δείγματα όλων των τυριών ηλικίας 7, 21 και 160 ημερών, εξετάστηκαν ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή που αναφέρεται από τους Kaminarides & Stachtiaris (2000) και βασίζεται στη συμπίεση του δείγματος του τυριού με έμβολο σε δύο κύκλους (δαγκωματιές). Η δύναμη που ασκείται από το έμβολο στο δείγμα προκαλεί το τυπικό διάγραμμα συμπίεσης (Εικόνα 4.2). Οι συνθήκες ανάλυσης του δείγματος ήταν:

- Όργανο Shimadzu AGS-500 NG
- Θερμοκρασία δείγματος: ~20° C
- Διάμετρος εμβόλου: 6x6 mm
- Ταχύτητα κεφαλής: 25 mm/min
- Δείγμα: ολόκληρο κομμάτι τυριού

Από την επεξεργασία των μετρήσεων που καταγράφονταν με το ειδικό λογισμικό προέκυπταν τα εξής χαρακτηριστικά δομής του τυριού, όπως αναφέρονται από τους Kaminarides & Stachtiaris (2000):

- Σκληρότητα /Hardness (N): είναι η απαιτούμενη δύναμη για να συμπιεστεί ένα τρόφιμο μεταξύ των γομφίων του στόματος και ορίζεται ως η μέγιστη κορυφή κατά την πρώτη συμπίεση του δείγματος.
- Συνεκτικότητα/Cohesiveness (N mm): είναι η «ένταση» των δεσμών που συγκρατούν ένα τρόφιμο και ορίζεται ως ο λόγος του εμβαδού της δεύτερης συμπίεσης προς το εμβαδό της πρώτης συμπίεσης, A_2/A_1 .
- Συγκολλητικότητα/Adhesiveness (N mm): είναι η «ενέργεια» που απαιτείται για να αποκολληθεί ένα τρόφιμο από μια επιφάνεια και ορίζεται ως το εμβαδό της πρώτης αποσυμπίεσης, A_3 .
- Ελαστικότητα/Elasticity (mm): είναι το μέτρο της δυνατότητας που έχει ένα συμπιεσμένο τρόφιμο να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση όταν πάψει να υφίσταται το φορτίο μεταξύ των δύο «δαγκωματιών» και ορίζεται ως ο λόγος L_1/L_2 .
- Κομμιώδες-Κολλητικότητα/Gumminess (N): η δύναμη που απαιτείται για να «αποσυντεθεί» ένα τρόφιμο ώστε να είναι δυνατή κατάποσή του και ορίζεται ως το γινόμενο της σκληρότητας επί τη συνεκτικότητα, $H \times (A_2/A_1)$.
- Μασητικότητα/Chewiness (J): είναι η δύναμη που απαιτείται για να μασηθεί ένα τρόφιμο μέχρι να είναι έτοιμο για κατάποση και ορίζεται ως το γινόμενο της κολλητικότητας επί την ελαστικότητα, $H \times (A_2/A_1) \times (L_2/L_1)$.



Εικόνα 4.2: Τυπική καμπύλη ανάλυσης κατατομής δομής δείγματος τυριού. H: σκληρότητα, A1: εμβαδό πρώτης συμπίεσης, A2: εμβαδό δεύτερης συμπίεσης, A3: συγκολλητικότητα (Kaminarides & Stachtariis, 2000)

4.4.3 Μέτρηση του pH τυριών

Για τη μέτρηση του pH των τυριών 10g τριμμένου τυριού αναμείχθηκαν με 10mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρονικό πεχάμετρο υπό συνεχή ανάδευση. Οι μετρήσεις έγιναν μια φορά για το κάθε δείγμα.

4.4.4 Προσδιορισμός της οξύτητας

Ο προσδιορισμός της οξύτητας έγινε με την κλασική μέθοδο ογκομέτρησης. Η μέθοδος βασίζεται στην εξουδετέρωση των οξέων του τυριού με διάλυμα καυστικού νατρίου γνωστής κανονικότητας (0,1N). Η οξύτητα εκφράζεται σε γαλακτικό οξύ %.

4.4.5 Σύσταση των τυριών

Το τριμμένο δείγμα του κάθε τυριού τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri, τα οποία εισήχθησαν χωρίς το καπάκι στη συσκευή Foodscan™ της Foss Analytical Instruments με σκοπό τον προσδιορισμό της γενικής σύστασης.

4.4.6 Προσδιορισμός χλωριούχου νατρίου

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του χλωριούχου νατρίου (αλάτι) στο τυρί έγινε σύμφωνα με την πρότυπη ποτενσιομετρική μέθοδο της IDF 88/ISO 5943:2006. Τρία (3g) τριμμένου τυριού αναμείχθηκαν με 40mL απεσταγμένου νερού και 2,5mL HNO₃. Τυτλοδοτούνται ποτενσιομετρικά τα χλωριόντα με πρότυπο διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1N.

Τύπος υπολογισμού

$$\% \text{ αλάτι} = \frac{(V1 - V0) \times c \times f}{M}$$

M

V1 = η κατανάλωση (mL) του νιτρικού αργύρου. 0,1N

V0 = η κατανάλωση του νιτρικού αργύρου. 0,1N για το λευκό

f = 5,84

m = τα g του τυριού

4.4.7 Προσδιορισμός της ξηρής ουσίας-υγρασίας των τυριών

Η υγρασία προσδιορίστηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα με τη μέθοδο της αποξήρανσης σε κλίβανο. Αρχικά, γινόταν ξήρανση για 20-24 ώρες σε κλίβανο 105±1°C πορσελάνινων καψών που περιείχαν περίπου 20g αλάτι και μικρή γυάλινη

ράβδο. Οι κάψες αποκτούσαν θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήριο και ακολουθούσε προσδιορισμός του βάρους τους και του μικτού βάρους μετά την τοποθέτηση περίπου ~3g ομογενοποιημένου τυριού σε ζυγό ακριβείας με ακρίβεια 0,1mg. Το τυρί αναμιγνυόταν προσεκτικά με το αλάτι με τη βοήθεια της μικρής ράβδου και οι κάψες με το περιεχόμενό τους τοποθετούνταν στον κλίβανο $105 \pm 1^\circ\text{C}$ έως σταθερού βάρους. Μετά την ξήρανση και την ψύξη των καψών με τον τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω γινόταν νέα ζύγιση ακριβείας. Η υγρασία υπολογιζόταν με βάση τη διαφορά των βαρών πριν και μετά την ξήρανση. Η περιεκτικότητα σε % υγρασία υπολογίστηκε ως 100-ΞΟ (%).

4.4.8 Προσδιορισμός του ολικού (TN), του υδατοδιαλυτού (WSN) και TCA (TCA-N) αζώτου

Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε στα δείγματα 160 ημερών με τη μέθοδο Kjeldahl, η οποία περιλαμβάνει τρία στάδια: την καύση του δείγματος, την απόσταξη και την τιτλοδότηση.

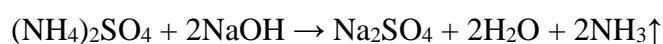
1^ο στάδιο: Καύση δείγματος

Ποσότητα δείγματος, ζυγισμένη με μεγάλη ακρίβεια, θερμαίνεται για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα σε συσκευή καύσης με ένα μίγμα πυκνού θειικού οξέος που δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, 2-3 σταγόνες αντιαφριστικού, 5 mL υπεροξειδίου του υδρογόνου και 2 ταμπλέτες καταλύτη Kjeldahl (αντιστοιχούν σε 7 g θειικό κάλιο, 0,210 g ένυδρο θειικό χαλκό και 0,210 g διοξειδίου του τιτανίου). Σκοπός είναι η καύση των οργανικών ουσιών του δείγματος και η μετατροπή του οργανικού αζώτου σε θειικό αμμώνιο και του άνθρακα και του υδρογόνου σε CO_2 και H_2O . Η θέρμανση του δείγματος γίνεται σε ειδικούς σωλήνες της μονάδας της συσκευής Kjeldahl. Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο στάδιο αυτό είναι:



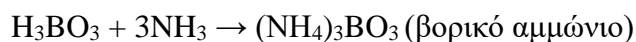
2^ο στάδιο: Απόσταξη

Στη συνέχεια, στους σωλήνες καύσης, με το κρύο προϊόν του θειικού αμμωνίου, προσθέτουμε περίσσεια καυστικού νατρίου προς απελευθέρωση της αμμωνίας. Ακολουθεί απόσταξη της αμμωνίας με ατμό σε ημιαυτόματη ή αυτόματη μονάδα απόσταξης της συσκευής Kjeldahl.



Η αμμωνία, ως πτητική, μεταφέρεται με το ρεύμα υδρατμών στον ψυκτήρα, όπου υγροποιείται και, στη συνέχεια, πέφτει σταγόνα σταγόνα, με τη μορφή υδατικού

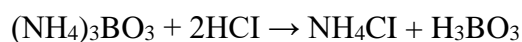
διαλύματος, μέσα σε κωνική φιάλη με περίσσεια διαλύματος βορικού οξέος, όπου δεσμεύεται και συλλέγεται ως βορικό αμμώνιο.



Η αμμωνία δεν μπορεί να συλλεχθεί σε νερό χωρίς απώλειες, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της. Για να αποφευχθούν, λοιπόν, οι απώλειες της αποσταζόμενης αμμωνίας, συλλέγεται σε διάλυμα βορικού οξέος.

3^ο στάδιο: Τιτλοδότηση

Το βορικό αμμώνιο που σχηματίστηκε κατά το στάδιο της απόσταξης τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος.



Η ανίχνευση του τελικού σημείου της τιτλοδότησης γίνεται με συσκευή pHμετρου ή με αλλαγή χρώματος ειδικού δείκτη. Παράλληλα πραγματοποιείται λευκός προσδιορισμός ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και στο δείγμα, χρησιμοποιώντας όμως αντί για τυρί 5 mL απιονισμένο νερό και 0,85 g σουκρόζης.

4.5 Οργανοληπτικός έλεγχος των τυριών

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τυριά ηλικίας 21 και 160 ημερών. Οι δοκιμαστές καλούνταν να αξιολογήσουν συγκριτικά δύο τυριά (Α και Β) από κάθε πειραματική τυροκόμηση, τα οποία συμβολίζονταν με τυχαίους κωδικούς, και να απαντήσουν στο ερωτηματολόγιο της Εικόνας 4.3. Τα τυριά βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 0-10 ως προς: εμφάνιση-χρώμα, υφή-δομή και γεύση-οσμή. Οι βαθμολογίες για τις τρεις αυτές μεταβλητές πολλαπλασιάζονταν με διαφορετικούς συντελεστές βαρύτητας, οι οποίοι ήταν 1, 4 και 5, αντίστοιχα.

ΦΥΛΛΟ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΗΜΙΣΚΛΗΡΩΝ-ΣΚΛΗΡΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

ΟΝΟΜΑ:
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:

Αξιολογείτε τα παρακάτω δείγματα ΤΥΡΙΩΝ ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, με κλίμακα 10 σημείων, στην οποία το 10 αντιστοιχεί στο χαρακτηρισμό «εξαιρετικό». Σημειώστε τη βαθμολογία σας στο αντίστοιχο κελί.

	429	987	289	429
ΕΜΦΑΝΙΣΗ-ΧΡΩΜΑ (0-10 βαθμους)				
ΥΦΗ-ΔΟΜΗ (0-10 βαθμους)				
ΓΕΥΣΗ-ΟΣΜΗ (0-10 βαθμους)				

Χαρακτηρίστε με √ την εμφάνιση και το χρώμα του τυριού:

	429	987	289	429
Ομοιογενές χρώμα				
Ενιαία τομή χωρίς οπές, σγιόμες κλπ				
Οπές (τύπος: κατά κανόνα συμμετρικές)*				
Σγιόμες				
Κατάσταση επιδερμίδας: **				

* παρακάτω, σημειώστε εάν υπάρχουν οπές ή σγιόμες και εάν είναι λίγες ή πολλές, μεγάλες ή μικρές

** παρακάτω, σημειώστε εάν η εξωτερική επιφάνεια του τυριού είναι:
καθαρή, λεία ή ανώμαλη, σκληρή ή μαλακή, με μοθyla ή γαρίες, αποδεκτή ή μη-αποδεκτή

Χαρακτηρίστε με √ την υφή-δομή του τυριού:

	429	987	289	429
Σκληρή				
Ημισκληρή				
Μελισσι				
Ελαστική				
«Στεγνή»				
«Λασταμένη»				

Χαρακτηρίστε με √ την γούση-οσμή του τυριού:

	321	657	289	429
Γλυκιά				
Ξινή				
«Αρωματική - πλούσια»				
«Λιπαρή»				
Πικάντικη				
Γαγγισμένη				
Πικρή				
Αλατισή				
Μεταλλική				

Χαρακτηρίστε με √ την κατάσταση ωριμότητας του τυριού:

	321	657	289	429
Ανώριμο				
Γούστο				
Υπερώριμο				

ΆΛΛΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Εικόνα 4.3 Φύλλο οργανοληπτικού ελέγχου

4.6 Στατιστική ανάλυση

Η επίδραση των παραγόντων του πειράματος (επικάλυψη, ηλικία των τυριών) καθώς και οι τυχόν αλληλεπιδράσεις τους στις μεταβλητές που προσδιορίστηκαν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης παραλλακτικότητας (Analysis Of Variance, ANOVA). Η επίδραση των επεξεργασιών θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν η τιμή P του F-

test ήταν $<0,05$ ($P<0,05$). Ο έλεγχος των διαφορών των μέσων όρων έγινε με τη δοκιμή της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (Least Significance Difference Test, LSD) σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό Statgraphics Centurion XVI.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Πειραματικές τυροκομήσεις

Οι συνθήκες των τριών πειραματικών τυροκομήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Αν και η πήξη έγινε σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία $\sim 35,33^{\circ}\text{C}$, ο μέσος χρόνος πήξης ήταν σχετικά υψηλός ~ 19 min. Η πήξη με πυτιά εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το pH του γάλακτος. Η θερμοκρασία ήταν ευνοϊκή αφού η ταχύτητα σχηματισμού του πήγματος αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 έως τους $40-42^{\circ}\text{C}$. Όμως, η πτώση του pH από το 7 σε 5.2 προκαλεί σημαντική μείωση του χρόνου πήξης. Οι περισσότερες ασπαρτικές πρωτεάσες όπως η χυμοσίνη είναι σταθερές σε όξινο pH και αποσταθεροποιούνται αντιστρεπτά κοντά στο ουδέτερο pH 7. Μάλιστα η χυμοσίνη είναι σταθερή στην περιοχή pH 5.3-6.3 (Moschoroulou 2011, Yegin and Dekker 2013). Επομένως, ο σχετικά μεγάλος χρόνος πήξης μπορεί να αποδοθεί στο σχετικά υψηλό pH ~ 6.76 του γάλακτος. Το φυσιολογικό μέσο pH του γάλακτος είναι $\sim 6,6-6,65$ και η αύξησή του υποδηλώνει δυσλειτουργία των γαλακτικών κυττάρων που το βιοσυνθέτουν που μπορεί να οφείλεται σε φλεγμονή του μαστού, στην ηλικία του ζώου ή στο τέλος της γαλακτικής περιόδου. Ο χρόνος πήξης είχε ως αποτέλεσμα να καθυστερήσει ανάλογα και η διαίρεση του πήγματος.

Η διαίρεση του πήγματος έγινε σε διαστάσεις που αντιστοιχούν σε ημίσκληρο πήγμα και η αναθέρμανση σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που εφαρμόζονται σε τυριά τύπου «Κεφαλοτύρι» (Moschoroulou & Moatsou, 2016, Moatsou & Govaris 2011). Το pH την επόμενη ημέρα (οξίνιση) είχε μειωθεί κατά 1,5 μονάδα, εξαιτίας της παραγωγής γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της υπολειμματικής λακτόζης από τα βακτήρια και οι συνθήκες αναθέρμανσης που εφαρμόστηκαν περιόρισαν την περαιτέρω μείωσή του. Η μέση απόδοση σε φρέσκο (μη-αλατισμένο) τυρί ήταν $\sim 12\%$, η οποία μετά το αλάτισμα μειώθηκε κατά 3% της αρχικής, $\sim 11,66\%$. Η απώλεια υγρασίας κατά το

αλάτισμα οφείλεται στον μηχανισμό πρόσληψης αλατιού από την μάζα του τυριού. Η αιτία είναι η διαφορά οσμωτικής πίεσης μεταξύ της άλμης και της υγρής φάσης του τυριού και οι διεργασίες αυτές έχουν ως σκοπό την εξισορρόπηση της μεταξύ της άλμης και της υγρής φάσης του τυριού (Guinee & Fox, 2004).

Πίνακας 5.1. Συνθήκες των πειραματικών τυροκομήσεων (μέσος όρος τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση)

Βάρος Γάλακτος που τυροκομήθηκε (kg)	50
Θερμοκρασία κατά την προσθήκη της πυτιάς (°C)	35,33 \pm 0,577
pH κατά την προσθήκη της πυτιάς	6,76 \pm 0,040
Χρόνος πήξης (min)	19,33 \pm 0,577
Χρόνος Διαίρεσης σε κύβους 1x1 cm (min) ¹	58 \pm 1,732
Θερμοκρασία (°C) / διάρκεια αναθέρμανσης (min)	42-43 / 30
pH την επόμενη ημέρα πριν το αλάτισμα	5,47 \pm 0,289
pH μετά το αλάτισμα	5,24 \pm 0,071
Βάρος την επόμενη ημέρα πριν το αλάτισμα (kg)	6 \pm 0,318
Βάρος μετά το αλάτισμα (kg)	5,83 \pm 0,274

¹ μετά την προσθήκη της πυτιάς

5.2. Εξέλιξη της σύστασης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών

Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζεται η εξέλιξη της γενικής χημικής σύστασης των τυριών την 1^η, 3^η και 22^η εβδομάδα. Οι 7 (1^η εβδομάδα) και οι 21 ημέρες (3^η εβδομάδα) είναι χρονικά σημεία στα οποία έγιναν σημαντικές επεμβάσεις. Την 7^η ημέρα εφαρμόστηκε η επικάλυψη στα μισά τυριά και αυξήθηκε η θερμοκρασία ωρίμασης από τους 11 στους 18 °C κατά τα πρότυπο των τυριών τύπου Γραβιέρας (Moschopoulou & Moatsou, 2016). Την 21^η ημέρα όλα τα τυριά συσκευάστηκαν σε πλαστικό υμένιο υπό κενό και μεταφέρθηκαν στο ψυγείο για συντήρηση που ταυτόχρονα μπορεί να εξελιχθεί και σε αργή ωρίμαση. Στις Εικόνες 5.1 και 5.2 παρουσιάζονται βασικές παράμετροι στη σύσταση των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμασής τους.

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, προέκυψε πως ο παράγοντας «επικάλυψη» δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στις παραμέτρους της σύστασης είτε όταν προσδιορίστηκαν με την αυτοματοποιημένη ανάλυση είτε με τις μεθόδους

αναφοράς. Αντίθετα, η ωρίμαση είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ($P < 0.05$) σε όλες τις παραμέτρους σύστασης. Η αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμασης αναμένεται να επιταχύνει τόσο ορισμένες ζυμώσεις όσο και χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις που διαμορφώνουν το φυσικοχημικό περιβάλλον και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών (Mc Sweeney, 2004). Τα τυριά των συγκεκριμένων πειραμάτων πριν την αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμασης στους 18°C ήταν ημίσκληρα με μέση υγρασία $>42\%$, η οποία μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά την παραμονή δύο εβδομάδων στην υψηλότερη θερμοκρασία. Η μείωση συνεχίστηκε και κατά την παραμονή των τυριών στο ψυγείο παρά την συσκευασία, με αποτέλεσμα τα τυριά στις 160 ημέρες να κατατάσσονται στην κατηγορία των σκληρών. Η μείωση της υγρασίας κατά την παραμονή στο ψυγείο εξελίχθηκε με πολύ αργό ρυθμό που ήταν $-0,14\%$ ανά εβδομάδα σε αντίθεση με τη ταχεία μείωση που παρατηρήθηκε μεταξύ πρώτης και τρίτης εβδομάδας που ήταν $-2,1\%$ ανά εβδομάδα. Αντίστοιχα, εξελίχθηκε και η υγρασία επί των μη-λιπαρών συστατικών (ΥΜΛΣ ή MNFS, moisture on non-fat substances), που αποτελεί την πιο αντικειμενική τεχνολογική παράμετρο για τα τυριά. Το αλάτι στην υγρή φάση (ΑΥΦ ή SM, salt-in-moisture) αυξανόταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$) κατά την ωρίμαση/συντήρηση των τυριών και αντιστρόφως ανάλογα και παράλληλα με την υγρασία. Η απώλεια της υγρασίας προκάλούσε συμπύκνωση των στερεών συστατικών των τυριών όπως η πρωτεΐνη, το λίπος αλλά και το αλάτι. Ενώ το pH δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την ωρίμαση/συντήρηση, η ογκομετρούμενη οξύτητα αυξανόταν σημαντικά ($P < 0.05$). Συγκρίνοντας τους Πίνακες 5.1 και 5.2 παρατηρούμε ότι κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας το pH των τυριών παρουσίασε μία έντονη μείωση $0,2$ μονάδων που προφανώς οφείλεται στη ζύμωση της λακτόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η σημαντική αύξηση ($P < 0.05$) της οξύτητας μετά την πρώτη εβδομάδα, αναμενόταν να προκαλέσει και αντίστοιχη σημαντική μείωση του Ph, επειδή αυτές οι δύο παράμετροι εκφράζουν την οξίνιση. Στην πραγματικότητα το pH εκφράζει τη συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου, ενώ η ογκομετρούμενη οξύτητα αφορά και σε άλλα συστατικά όπως οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα τυριά, όπως και στα τυριά του συγκεκριμένου πειράματος, με αποτέλεσμα την έντονη μείωσή τους κυρίως μεταξύ μίας και τριών εβδομάδων και αντίστοιχο αποτέλεσμα στην ογκομετρούμενη οξύτητα (Πίνακας 5.2). Τέλος, ο λόγος πρωτεΐνη/λίπος των τυριών, οποίος στις 7 και στις 21 ημέρες ήταν μεταξύ $0,83-0,84$, στις 160 ημέρες αυξήθηκε αισθητά, υποδεικνύοντας μείωση του λίπους, Πράγματι, μείωση παρατηρείται κατά την ενζυμική υδρόλυση των

τριγλυκεριδίων και την επακόλουθη μετατροπή τους προς μικρότερου μοριακού βάρους πτητικά συστατικά των τυριών (Choisy et al. 1986, Collins et al. 2003, McSweeney 2004).

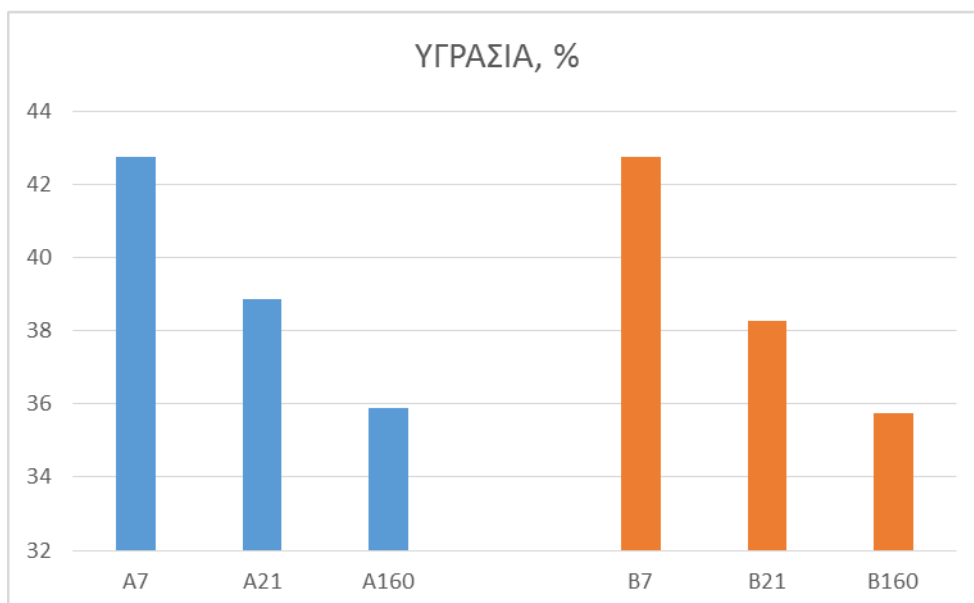
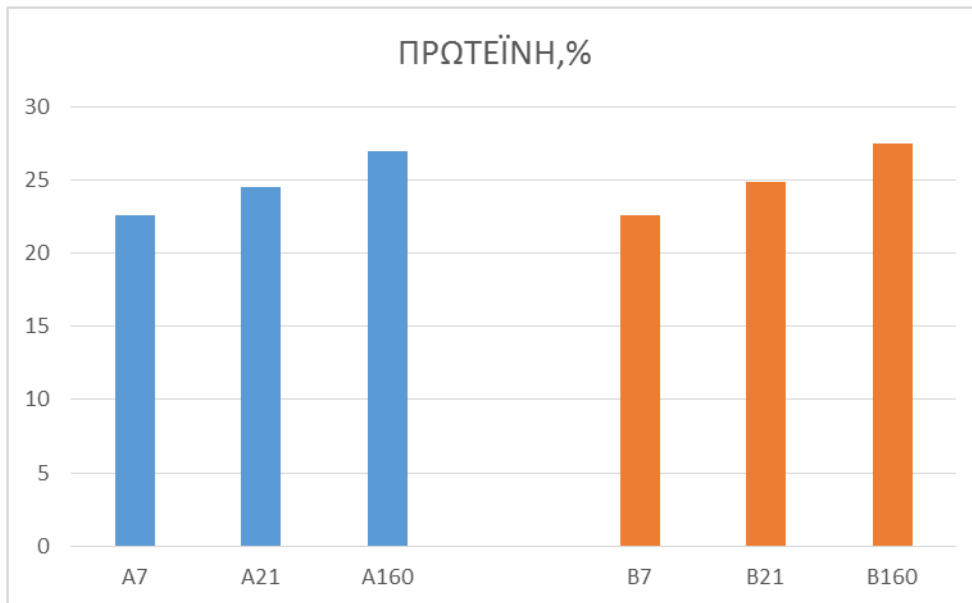
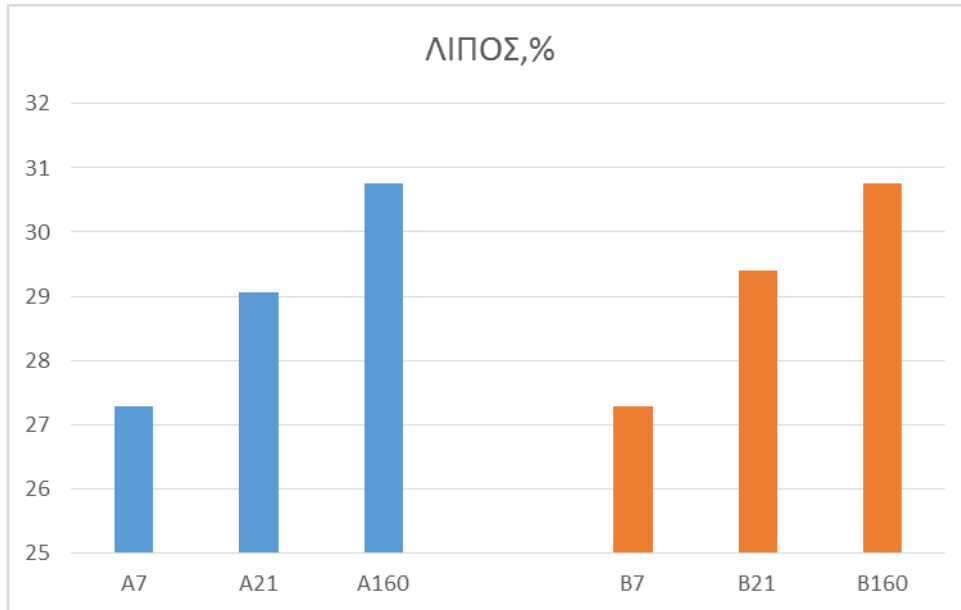
Πίνακας 5.2. Μέσοι όροι παραμέτρων της φυσικοχημικής σύστασης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών των δύο ομάδων. Ομάδα Α: χωρίς επικάλυψη, Ομάδα Β: με επικάλυψη. Ακολουθία ωρίμασης: 1) 10-11°C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά Β), 2) 18 °C για 14 ημέρες, 3) συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο.

A (-): ομάδα Α χωρίς επικάλυψη, Β (+): ομάδα Β με επικάλυψη.

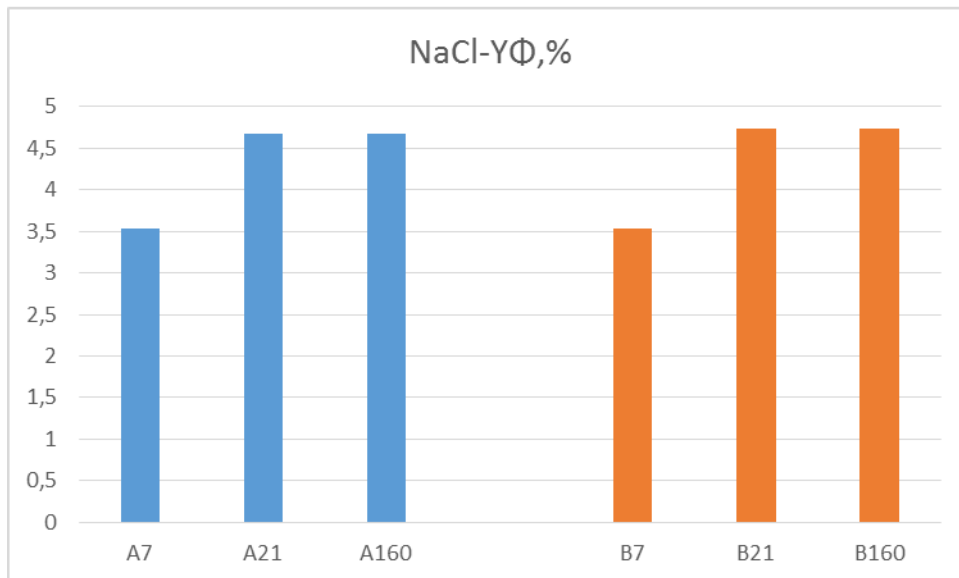
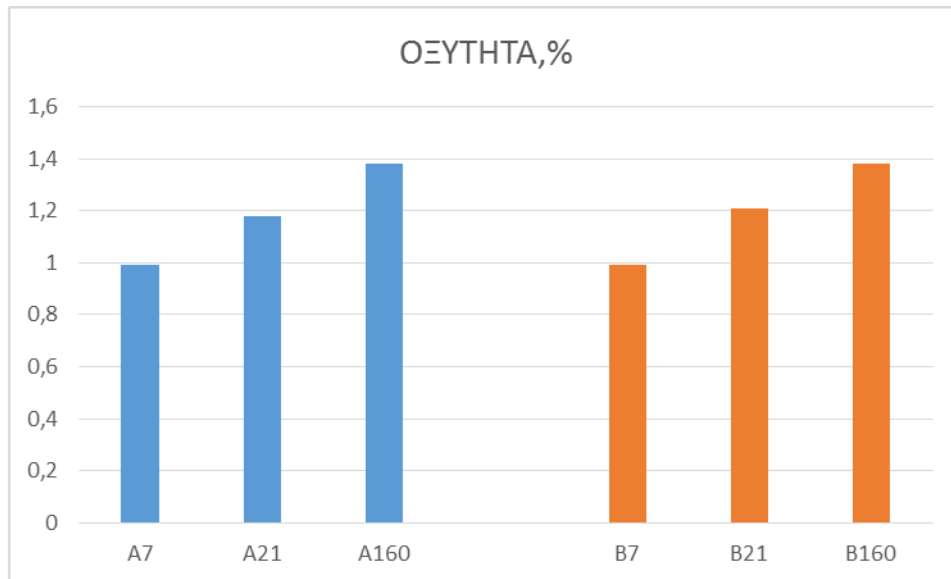
a, b, c: τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν ποιοι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

1 Αυτοματοποιημένη φασματοσκοπία υπερύθρου (FOODSCAN), 2 Ποτενσιομετρική μέθοδος, 3 Αποξήρανση σε κλίβανο, 4 τυπικό σφάλμα.

	ΠΛΗΘΟΣ	Foodscan							Μέθοδοι Αναφοράς				
		ΛΙΠΟΣ (FAT), %	ΠΡΩΤΕΪΝΗ (PROT), %	ΥΓΡΑΣΙΑ (MOI), % ¹	ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΣΤΕΡΕΑ (%)	ΥΜΑΣ, %	ΑΛΑΤΙ, % ¹	ΑΥΦ, % ¹	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ, %	ΥΓΡΑΣΙΑ (MOI-R), % ³	NaCl, % ²	NaCl-ΥΦ % ²
ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ	18	29,09	24,81	39,05	60,94	55,01	1,56	3,89	5,04	1,19	40,35	1,80	4,31
Επικάλυψη													
A (-)	9	29,04	24,65	39,17	60,82	55,14	1,57	3,9	5,03	1,18	40,43	1,79	4,29
B (+)	9	29,15	24,97	38,93	61,07	54,88	1,56	3,89	5,05	1,19	40,26	1,80	4,33
ΤΣ ⁴		0,354	0,231	0,343	0,343	0,303	0,048	0,117	0,041	0,017	0,385	0,035	0,090
Ημέρες													
7	6	27,29 a	22,55 a	42,76 a	57,24 a	58,80 a	1,41 a	3,19 a	5,06	0,99 a	44,51 a	1,63 a	3,53 a
21	6	29,24 b	24,68 b	38,55 b	61,44 b	54,49 b	1,61 b	4,02 b	5,04	1,19 b	39,70 b	1,95 b	4,70 b
160	6	30,76 c	27,21 c	35,83 c	64,16 c	51,74 c	1,67 b	4,46 c	5,02	1,38 c	36,83 c	1,82 c	4,71 b
ΤΣ ⁴		0,434	0,282	0,420	0,420	0,371	0,059	0,143	0,050	0,021	0,472	0,044	0,110
Επικάλυψη × Ημέρες													
A7	3	27,29	22,55	42,76	57,24	58,80	1,41	3,19	5,06	0,99	44,51	1,63	3,53
A21	3	29,07	24,48	38,85	61,14	54,78	1,62	4,00	5,04	1,18	40,0	1,96	4,67
A160	3	30,76	26,93	35,9	64,1	51,84	1,69	4,49	5,0	1,38	36,78	1,80	4,68
B7	3	27,29	22,55	42,76	57,24	58,80	1,41	3,19	5,06	0,99	44,51	1,63	3,53
B21	3	29,40	24,88	38,26	61,73	54,2	1,61	4,04	5,03	1,21	39,40	1,95	4,73
B160	3	30,76	27,49	35,76	64,23	51,65	1,66	4,43	5,05	1,38	36,88	1,83	4,73
ΤΣ ⁴		0,614	0,400	0,594	0,594	0,525	0,084	0,203	0,071	0,030	0,668	0,062	0,156



Εικόνα 5.1 Εξέλιξη της βασικής σύστασης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. A: ομάδα A χωρίς επικάλυψη, B: ομάδα B με επικάλυψη. 7, 21, 160: ημέρες ωρίμασης.



Εικόνα 5.2 Εξέλιξη της οξύτητας και της συγκέντρωσης του αλατιού στην υγρή φάση (συντελεστής άλατος σύμφωνα με τη μέθοδο αναφοράς) κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. A: ομάδα A χωρίς επικάλυψη, B: ομάδα B με επικάλυψη. 7, 21, 160: ημέρες ωρίμασης.

5.3. Η έκταση της πρωτεόλυσης στα ώριμα τυριά

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3 η επικάλυψη δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πρωτεόλυση, όπως αυτή εκφράζεται από την αναλογία του

υδατοδιαλυτού αζώτου (WSN) και του αζώτου διαλυτού σε 12% τριγλωροξικό οξύ (TCAN) προς το ολικό άζωτο των τυριών στις 160 ημέρες.

Το υδατοδιαλυτό άζωτο των τυριών (WSN) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του ορού καθώς και όλα τα πεπτίδια και αμινοξέα που προκύπτουν από την υδρόλυση της καζεΐνης, ενώ το TCAN είναι κλάσμα του προηγούμενου και περιλαμβάνει μικρά και μεσαία πεπτίδια με 4-20 αμινοξέα καθώς και ελεύθερα αμινοξέα (Nega & Moatsou, 2012). Τα αποτελέσματα δείχνουν περιορισμένη πρωτεόλυση στα τυριά της παρούσας μελέτης σε σχέση με τα περισσότερα σκληρά τυριά που αναφέρονται από τους Nega & Moatsou (2012), παρότι τα δεύτερα είχαν πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλάτι. Το φαινόμενο αυτό μπορεί αποδοθεί στην μεταφορά στο ψυγείο μετά την τρίτη εβδομάδα που εφαρμόστηκε για να μην συμβεί ταχεία μείωση της υγρασίας εξαιτίας του μικρού μεγέθους των τυριών.

Πίνακας 5.3. Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της πρωτεόλυσης μετά από 160 ημέρες ωρίμασης των τυριών. Μέσος όρος τριών πειραμάτων. A: ομάδα A χωρίς επικάλυψη, B: ομάδα B με επικάλυψη. Ακολουθία ωρίμασης: 10-11 °C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά B) – 18 °C για 14 ημέρες – συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο. TA, τυπικό σφάλμα, Protein: πρωτεΐνη, TN: ολικό άζωτο, WSN: διαλυτό άζωτο, TCAN: άζωτο διαλυτό σε 12% τριγλωροξικό οξύ.

	Πλήθος	%Protein	%TN	%WSN/TN	%TCAN/TN
Επικάλυψη	6	27,21	4,26	15,67	8,44
A	3	27,58	4,32	15,46	8,12
B	3	26,85	4,21	15,89	8,77
TΣ		0,300	0,046	0,463	0,196

5.4. Κατατομή υφής κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατατομής υφής παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4 και την Εικόνα 5.3. Η επικάλυψη των τυριών δεν επηρέασε καμία από τις παραμέτρους υφής-δομής, ενώ αντίθετα η ωρίμαση/συντήρηση προκάλεσε σημαντικές ($P < 0.05$) αλλαγές.

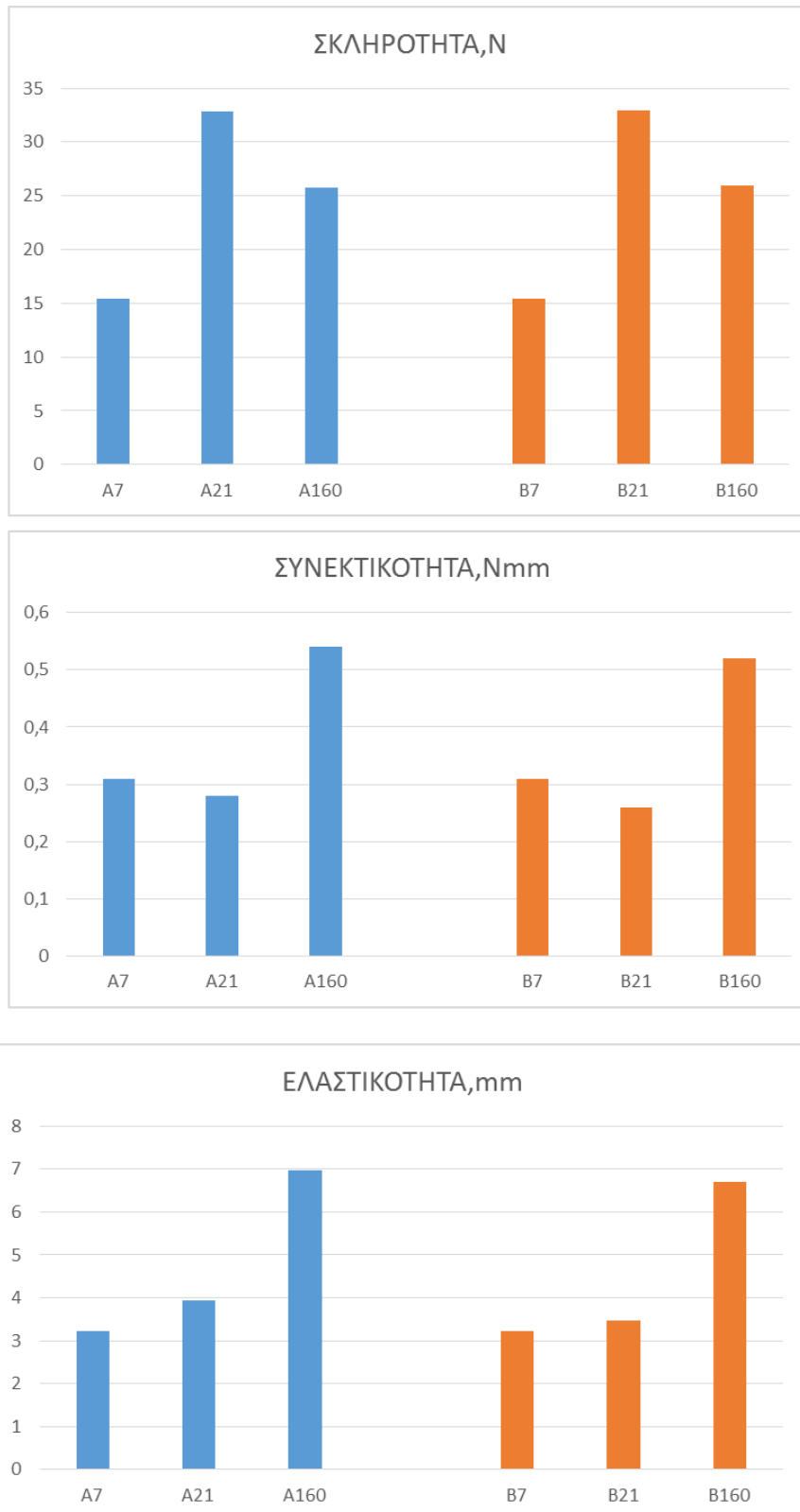
Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η τεχνική της μονοαξονικής συμπίεσης, μεθοδολογία που είναι γνωστή ως «ενόργανη ανάλυση της κατατομής της δομής» (instrumental texture profile analysis). Το όργανο και η μεθοδολογία της ανάλυσης

αυτής περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» και βασιζόταν στον έλεγχο της παραμόρφωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια δύο κύκλων συμπίεσης (δαγκωματιών). Τα χαρακτηριστικά δομής/υφής των τυριών σχετίζονται με τη μελέτη της παραμόρφωσης και της ροής των υλικών όταν αυτά υποβάλλονται σε πίεση. Στα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνονται χαρακτηριστικά όπως η σκληρότητα και η ελαστικότητα, τα οποία κυρίως σχετίζονται με τη σύσταση, τη δομή και τη δύναμη των έλξεων μεταξύ των δομικών στοιχείων των τυριών (Fox et al. 2000). Εν συντομία, η σκληρότητα των τυριών εκφράζει τη δύναμη που απαιτείται για την αποδιοργάνωση του τυριού στο στόμα κατά την πρώτη δαγκωματιά. Η συνεκτικότητα εκφράζει το βαθμό «συγκράτησης» της μασημένης μπουκιάς ως ενιαίας μάζας, η συγκολλητικότητα εκφράζει την ένταση με την οποία το μασημένο τυρί «κολλάει» στις επιφάνειες του στόματος. Το κομμωίδες εκφράζει την ενέργεια που απαιτείται ώστε να γίνει το τυρί έτοιμο προς κατάποση (Moatsou et al. 2019). Η ωρίμαση μπορεί να επηρεάσει αυτές τις ιδιότητες όπως συμβαίνει στην παρούσα μελέτη καταρχήν εξαιτίας των μεταβολών της υγρασίας. Η μείωση της υγρασίας αυξάνει τη σκληρότητα των τυριών, καθώς επίσης και η μείωση του pH και η αύξηση της αλατοπεριεκτικότητας. Στη συνέχεια επιδρά και η πρωτεόλυση, η οποία προκαλεί περιορισμένη αποικοδόμηση (χαλάρωση) του παρακαζεϊνικού δικτύου (Guinee, 2003).

Κατά την πρώτη φάση η αποβολή υγρασίας σκλήρυνε τα τυριά στις 21 ημέρες, τα οποία στη συνέχεια έγιναν μαλακότερα, συνεκτικότερα και ελαστικότερα καθώς η πρωτεόλυση προχώρησε και η περαιτέρω μείωση της υγρασίας ήταν περιορισμένη. Η σκληρότητα σε συνδυασμό με τη συνεκτικότητα επηρεάζει πάρα πολύ και τις μεταβολές των άλλων ιδιοτήτων, ο υπολογισμός των οποίων από το χαρακτηριστικό διάγραμμα βασίζεται στις δύο προηγούμενες.

Πίνακας 5.4. Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της κατατομής υφής κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Μέσος όρος τριών πειραμάτων. Ακολουθία ωρίμασης: 10-11°C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά Β) – 18 °C για 14 ημέρες – συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο. ΤΣ, τυπικό σφάλμα

	ΠΛΗΘΟΣ	ΣΚΛΗΡΟΤΗ ΤΑ (N)	ΣΥΝΕΚΤΙΚΟ ΤΗΤΑ (N mm)	ΕΛΑΣΤΙΚΟ ΤΗΤΑ (mm)	ΚΟΜΜΙΩ ΔΕΣ (N)	ΜΑΣΗΤΙΚΟ ΤΗΤΑ (J)	ΣΥΓΚΟΛΗ ΤΙΚΟΤΗΤΑ (N mm)
ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ	18	24,73	0,37	4,59	9,24	48,38	74,83
Επικάλυψη							
A	9	24,68	0,38	4,71	9,41	50,63	78,54
B	9	24,77	0,36	4,47	9,08	46,14	71,12
ΤΣ		1,014	0,019	0,329	0,559	5,631	8,119
Ημέρες							
7	6	15,47 a	0,31 a	3,23 a	4,81 a	15,58 a	24,18 a
21	6	32,88 c	0,27 a	3,72 a	9,09 b	34,48 a	66,09 b
160	6	25,83 b	0,53 b	6,83 b	13,83 c	95,10 b	134,22 c
ΤΣ		1,242	0,023	0,403	0,684	6,896	9,944
Επικάλυψη × Ημέρες							
A7	3	15,47	0,31	3,23	4,81	15,58	24,18
A21	3	32,84	0,28	3,95	9,40	37,81	70,74
A160	3	25,74	0,54	6,96	14,02	98,50	140,70
B7	3	15,47	0,31	3,23	4,81	15,58	24,18
B21	3	32,92	0,26	3,48	8,78	31,15	61,45
B160	3	25,93	0,52	6,69	13,65	91,69	127,74
ΤΣ ⁴		1,757	0,033	0,569	0,968	9,753	14,063



Εικόνα 5.3 Μεταβολές της σκληρότητας, της συνεκτικότητας και της ελαστικότητας κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Α: ομάδα Α χωρίς επικάλυψη, Β: ομάδα Β με επικάλυψη. 7, 21, 160: ημέρες ωρίμασης.

5.5. Πληθυσμοί της επιφανειακής μικροβιολογικής χλωρίδας κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών

Στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των καταμετρήσεων αποικιών ομάδων μικροοργανισμών που σχετίζονται με την επιφάνεια των τυριών και τις αλλοιώσεις της. Οι ομάδες που επιλέχθηκαν ήταν οι ζύμες, οι μικρόκοκκοι και τα κολιβακτήρια.

Στις συνθήκες που επικρατούν στην επιφάνεια των τυριών, όπως η χαμηλή υγρασία και η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι αντέχουν οι ζύμες και οι μύκητες και τα αερόβια κορυνόμορφα βακτήρια καθώς και οι μικρόκοκκοι. Οι μικρόκοκκοι είναι τα κυριότερα μη-γαλακτικά βακτήρια των τυριών και αναπτύσσονται πολύ καλά στους 10-12°C που είναι θερμοκρασία ωρίμασης/συντήρησης πολλών τυριών (Choisy et al. 1986b). Η ανάλυση για τις ζύμες για τα τυριά των 160 ημερών δεν πέτυχε και δεν παρουσιάζεται τον Πίνακα. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις της επιδερμίδας των τυριών και η επίδραση των παραγόντων του πειράματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5. Στατιστική ανάλυση των πληθυσμών ορισμένων μικροβιακών ομάδων (log cfu/mL) κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Μέσος όρος τριών πειραμάτων. Α: ομάδα Α χωρίς επικάλυψη, Β: ομάδα Β με επικάλυψη. Ακολουθία ωρίμασης: 1) 10-11 °C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά Β), 2) 18 °C για 14 ημέρες, 3) συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο.

	<i>Πλήθος</i>	Yeasts (Logcfu/ml)	Micrococci (Logcfu/ml)	Coliforms (Logcfu/ml)
ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ	18	2,31	3,48	1,62
Επικάλυψη				
A (-)	9	2,83	3,47	2,20
B (+)	9	2,68	3,48	2,68
ΤΣ		0,359	0,750	0,762
Ημέρες				
7	6	3,73 a	3,2	2,3 a
21	6	1,78 b	4,46	2,58a
160	6	-	2,78	0 b
ΤΣ		0,320	0,918	0,762
Επικάλυψη × Ημέρες				
A7	3	3,73	3,2	2,3
A21	3	1,93	4,43	2,1
A160	3	-	2,8	-
B7	3	3,73	3,2	2,3
B21	3	1,63	4,5	3,06
B160	3	-	2,76	-
ΤΣ ⁴		0,508	1,299	0,879

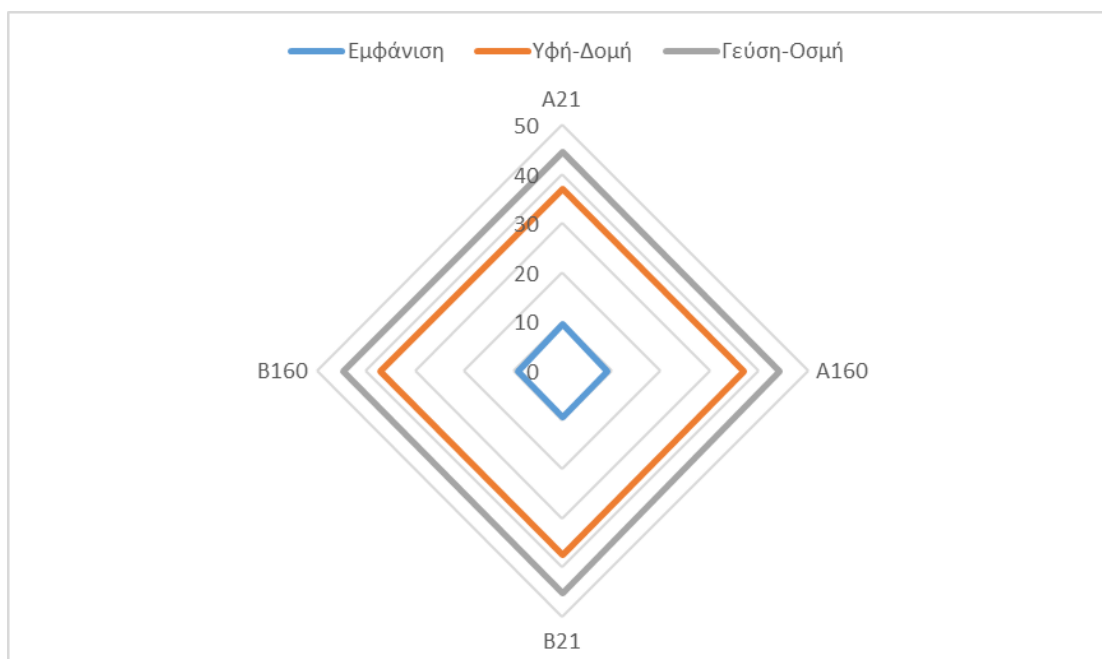
5.6. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ώριμων τυριών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6. Η επικάλυψη δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη γενική βαθμολογία των τυριών, ενώ η ωρίμαση επηρέασε στατιστικά σημαντικά μόνο την εμφάνιση των τυριών.

Όλα τα τυριά πήραν πολύ υψηλή οργανοληπτική βαθμολογία, η οποία ουσιαστικά παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια της σχετικά μακρόχρονης συντήρησης τους έως τις 160 ημέρες, με εξαίρεση την εμφάνιση. Το χαρακτηριστικό αυτό ναι μεν πήρε στατιστικά σημαντικά μικρότερη βαθμολογία στις 160 ημέρες, όμως η βαθμολογία αυτή ήταν υψηλή (>9/10). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η υψηλή βαθμολογία της υφής-δομής (~37/40) η οποία μάλιστα παρουσίαζε και μικρό τυπικό σφάλμα. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδοθεί στην ωρίμαση τριών σταδίων που εφαρμόστηκε.

Πίνακας 5.6. Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της οργανοληπτικής αξιολόγησης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Μέσος όρος τριών πειραμάτων. Α: Ομάδα Α χωρίς επικάλυψη, Β: ομάδα Β με επικάλυψη. Ακολουθία ωρίμασης: 1) 10-11°C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά Β), 2) 18 °C για 14 ημέρες, 3) συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο.

	<i>Πλήθος</i>	Εμφάνιση	Υφή-Δομή	Γεύση-Οσμή	Συνολική βαθμολογία
ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ	12	9,3	37,1	44,75	91,15
Επικάλυψη					
A (-)	6	9,3	37,0	44,5	90,8
B (+)	6	9,3	37,2	45,0	91,5
ΤΣ		0,123	0,537	0,786	1,272
Ημέρες					
21	6	9,53 a	37,26	45,0	91,8
160	6	9,06 b	36,93	44,5	90,5
ΤΣ		0,123	0,537	0,786	1,272
Επικάλυψη × Ημέρες					
A21	3	9,5	37,06	44,66	91,23
A160	3	9,1	36,93	44,33	90,36
B21	3	9,56	37,46	45,33	92,36
B160	3	9,03	36,93	44,66	90,63
ΤΣ		0,174	0,760	1,111	1,798



Εικόνα 5.4 Κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών μετά από 21 και 160 ημέρες ωρίμασης/συντήρησης. A: ομάδα A χωρίς επικάλυψη, B: ομάδα B με επικάλυψη. 21, 160: ημέρες ωρίμασης.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα χαρακτηριστικά σημεία της τεχνολογίας που εφαρμόστηκε στη παρούσα μελέτη ήταν πήγμα αγελαδινού γάλακτος, διαίρεση σε κύβους 1×1 cm, θερμική επεξεργασία του διαιρεμένου πηγματος 42-43°C/30min, σχηματοδότηση σε μικρά κεφάλια βάρους λιγότερο από 1kg, πίεση για περιορισμένο χρονικό διάστημα ίση με το βάρος του τυριού, αλάτισμα σε άλμη 22% αλάτι 0,3% CaCl₂ σε αναλογία φρέσκο τυρί:άλμη ~1:2 και για χρόνο που να αντιστοιχεί σε ~2.5 ώρες ανά 0,5kg κεφαλιού τυριού και ωρίμαση τριών σταδίων, 10-11°C για 7 ημέρες – επικάλυψη (τυριά B) – 18 °C για 14 ημέρες – συσκευασία σε πλαστικό υμένιο υπό κενό – ψυγείο.

Η ωρίμαση είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στις παραμέτρους που αφορούσαν τη σύσταση και την κατατομή υφής των τυριών. Αντίθετα, η εφαρμογή επικάλυψης την 7^η ημέρα δεν επηρέασε αυτά τα χαρακτηριστικά.

Σε ό,τι αφορά τις μικροβιακές ομάδες που σχετίζονται με την επιφανειακή μικροχλωρίδα των τυριών η ωρίμαση μηδένιζε τα κολιβακτήρια, μείωνε τους μικρόκοκκους και υποδιπλασίαζε τις ζύμες, χωρίς να διαπιστωθεί επίδραση της εφαρμογής της επικάλυψης.

Όλα τα τυριά αξιολογήθηκαν με υψηλές βαθμολογίες ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, οι οποίες δεν επηρεάστηκαν από τους παράγοντες του πειράματος.

Στις 21 ημέρες ωρίμασης η μέση σύσταση των τυριών ήταν pH 5,04, οξύτητα 1,19% γαλακτικό οξύ, υγρασία 39,7% και αλάτι 1,95%. Μετά από περίπου 20 εβδομάδες συντήρηση στο ψυγείο το pH ήταν 5,02, η οξύτητα 1,38% γαλακτικό οξύ, η υγρασία 36,83% και το αλάτι 1,82%.

Ο μέσος δείκτης πρωτεόλυσης στις 160 ημέρες (διαλυτό προς ολικό άζωτο) ήταν 15,7% και το μισό από αυτό το ποσοστό ήταν μεσαία/μικρά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ

Andrade RD, Olivier S, Osorio FA (2012). Atomizing spray systems for application of edible coatings. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 11(3):323–337.

Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1–12.

Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51–62.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 259–274.

Beresford, T., & Williams, A. (2004). *The Microbiology of Cheese Ripening. General Aspects*, 287–317.

Broome, M. C., Powell, I. B., Limsowtin, G. K. Y. (2002). Starter Cultures: Specific Properties. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 273.

Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriology Reviews*, 40, 803–846.

Brown, H. M., & Emberger, O. (1980). Oxidation–reduction potential. In *Microbial ecology of foods: Factors affecting life and death of microorganisms*, Vol. 1 (pp. 112–125). New York: ICMSF Academic Press Inc.

Bourtoom, T. (2008). Review article Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15(3): 237-248.

Cerqueira, M. A., Souza-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aquilar, R., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., et al. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *Journal of Food Engineering*, 97, 87-94.

Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 662–671.

CHA, D. S., & CHINNAN, M. S. (2004). Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223–237.

Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G., Lenoir J., Tourneur C. (1986α). Microbiological and biochemical aspects of ripening. In: A. Eck (Ed.) *Cheesemaking-Science and Technology*, 2nd Edition translated by C.D. Thomson. Lavoisier Publishing Inc. New York USA, pp. 62-96.

Choisy, C., Gugeuen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.L., Tourneur, C., 1986b. Microbiological aspects, In: *Cheesemaking-Science and Technology*, 2nd Edition. A. Eck (Editor) translated by C.D. Thomson. Lavoisier Publishing Inc. (Eds), New York, USA. pp. 259-292.

- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., & Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5, 855-875.
- Cogan, T. M. (2011). *Microbiology of Cheese*. 625-631.
- Cogan, T. M. (2002). Cheese/Microbiology of milk. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 306-307.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Food Microbiology and Safety*, 67(3), 1162–1169.
- Conte, A., Gammariello, D., Di Giulio, S., Attanasio, M., & Del Nobile, M. A. (2009). Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 887–894.
- Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, 107, 84–92.
- Deeth, H. C., & Touch, V. (2000). Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 153–168.
- Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2324–2327.
- Edward Law S (2001) Agricultural electrostatic spray application. A review of significant research and development during the 20th century. *J Electrostat* 51–52:25–42.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819–1841.
- El-Soda M. El., (2002). Accelerated Cheese Ripening. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 4th ed. pp. 327-328.
- Farkye, N. Y. (2014). *Microbiology of Cheesemaking and Maturation*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1, 395-401.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12(4), 457–509.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese: An Overview. *Cheese*, 5–21.
- Fox P.F. (2002). Cheese/Biochemistry of cheese ripening. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1st ed. (Eds Roginski H., Fuquay J.W. & Fox P.F.), Academic Press, London, pp. 320-326, 357.

Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 273–283.

Guinee, T.P. (2003). Role of protein in cheese and cheese products. In: *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1, 3rd ed. Eds. P.F.Fox and P.L.H. McSweeney, Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 1083-1174.

Guinee TP & Fox PF (2004) *Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects*. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1, p 207-259, Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, Ireland.

Hayaloglu, A. (2016). *Cheese: Microbiology of Cheese*. Reference Module in Food Sciences.

Kampf N, Nussinovitch A (2000). Hydrocolloid coating of cheeses. *Food Hydrocoll* 14:531–537.

Kavas, G., & Kavas, N. (2014). The effects of mint (*Mentha spicata*) essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of lor cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12(3–4), 40–45.

Kramer, ME (2009). Structure and function of starch-based edible films and coatings. In: Embuscado ME, Huber KC (eds) *Edible films and coatings for food applications*. Springer Science + Business Media, LLC, pp 113–134.

Kongo, J. M., Malcata, F. X. (2016). *Cheese: Chemistry and Microbiology*. *Encyclopedia of Food and Health*, 735-740.

Lucey J. A. (2002). *Cheese/Rennet Coagulation of Milk*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 4th ed, pp. 286-287.

Ma, W., Tang, Ch-H., Yin, S.-W., Yang, X.-Q., Wang, Q., Liu, F., et al. (2012). Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Research International*, 49, 572-579.

Mandal R. & Kant R. (2017). High-Pressure Processing and its applications in the dairy industry. *Food Science and Technology : An International Journal (FSTJ)* Vol.1, No.1.

Mark, A. M., Roth, W. B., Mehlretter, C. L. and Rist, C. E. 1966. Oxygen permeability of amylo maize starch films. *Food Technology* 20: 75-80.

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Avides, M. C., & Vicente, A. A. (2010). Shelf-life extension of Ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1884–1891.

Mastromatteo, M., Conte, A., Faccia, M., Del Nobile, M. A., & Zambrini, A. V. (2014). Combined effect of active coating and modified atmosphere packaging on prolonging the shelf life of low-moisture mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 36–45.

McSweeney, P. L. H. (2004). *Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview*. *General Aspects*, 347–360.

McSweeney P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127-144.

Moatsou, G.; Zoidou, E.; Choundala, E.; Koutsaris, K.; Kopsia, O.; Thergiaki, K.; Sakkas, L. (2019) Development of Reduced-Fat, Reduced-Sodium Semi-Hard Sheep Milk Cheese. *Foods*, 8, 204.

Moatsou G. & Govaris A. (2011) White Brined cheeses: a diachronic exploitation of small ruminants milk in Greece. *Small Ruminants Research*, 101, 113-121.

Moschopoulou E. (2011) Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production, *Small Ruminant Research*, 101, 1–3, 2011, 188-195.

Moschopoulou E. & Moatsou G. (2016). Greek Dairy Products: Composition and Processing. In: *Mediterranean Food: Composition & Processing*. R.M.S. da Cruz & M.M.C. Vieira (Editor), CRC Press, Taylor & Francis Group (Eds), Boca Raton, Florida, USA, pp. 268-320.

Monnet, C., Landaud, S., Bonnarne, P., & Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1), 1–9.

Moschopoulou E., Moatsou G., Syrokou M.K., Paramithiotis S. & Drosinos E.H. (2018) Food quality changes during shelf life. In: *Food Quality and Shelf Life*, Charis Galanakis (Editor), Elsevier- Academic Press (Eds). In press.

Nega A. & Moatsou G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 92, 57-73.

Nieto MB (2009) Structure and function of polysaccharide gumbased edible films and coatings. In: Embuscado ME, Huber KC (eds) *Edible films and coatings for food applications*. Springer Science + Business Media, LLC, pp 57–112.

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174-187.

Popa, M., Belc, N. (2007). Packaging. *Food Safety*, 68-87.

Pintado, C., Ferreira, M., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1891–1896.

Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240–246.

Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da-Silva, J. A., ... Malcata, F. X. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey

protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6282–6292.

Ratray, F. P. (2002). Cheese/ Secondary Cultures. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 279.

Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R. de, & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 132–140.

Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 369–375.

Rüegg, M., & Blanc, B. (1977). Beziehungen zwischen Wasseraktivität, Wasser-Sorptionsvermögen und Zusammensetzung von Käse. *Milchwissenschaft*, 32, 193–201.

Rüegg, M., & Blanc, B. (1981). Influence of water activity on the manufacture and ageing of cheese. In L. B. Rockland, & G. F. Stewart (Eds.), *Water activity: Influences on food quality* (pp. 791–811). New York: Academic Press.

Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757.

Sobrinho-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), 329–343.

Suput DZ, Lazic VL, Popovic SZ, Hromis NM (2015). Edible films and coatings—sources, properties and applications. *Food Feed Res* 42:11–22.

Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., & Soyer, F. (2011). Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(1), 154–160.

Ünalán, İ. U., Arcan, I., Korel, F., & Yemenicioğlu, A. (2013). Application of active zein-based films with controlled release properties to control *Listeria monocytogenes* growth and lipid oxidation in fresh Kashar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 208–214.

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2012). Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomyces cerevisiae* activity. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3124–3133.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and technology*. Second Edition, 625–627, 645–646, 670–671, 685.

Weber, F., & Ramet, J. P. (1987). Comparative technology of the Ripening methods of different types of cheese. In A. Eck (Ed.), *Cheesemaking, science and technology* (pp. 293–309). New York: Lavoisier Publishing.

Xu, X.Y., Kim, K.M., Hanna, M.A. and Nag, D. 2005. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products an International Journal* 21:185-192.

Yegin, S. & Dekker, P. (2013) Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci. & Technol.* 93, 565–594.

Youssef, A. M., Assem, F. M., El-Sayed, S. M., Salama, H., & Abd El-Salam, M. H. (2017). Utilization of Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Preservation of Cheeses. *Journal of Packaging Technology and Research*, 1(2), 87–99.

Yilmaz, F., & Dagdemir, E. (2012). The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2582–2589.

Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1–8.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ζερφυρίδης Γ. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος-Τυροκομία, Εκδόσεις Γιαχούδη, 2^η Έκδοση. Δυναμική κατάσταση του τυριού, 280-283, 290, 293.

Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α. (2015). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, 401-405, 464 Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.