



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Απομόνωση και Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών από τα  
Παραδοσιακά τυριά Γκερεμέζι και Καρίκι με σύγχρονες  
μοριακές μεθόδους**

ΒΑΣΙΑ Γ. ΔΡΟΣΟΥ

Αθήνα, 2020

Επιβλέπουσα Καθ. Έφη Τσακαλίδου

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

## **Απομόνωση και Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών από τα Παραδοσιακά τυριά Γκερεμέζι και Καρίκι με σύγχρονες μοριακές μεθόδους**

**Bacteria and yeast isolation & identification from Geremezi and Kariki (Greek traditional cheeses) using modern molecular methods**

**ΒΑΣΙΑ Γ. ΔΡΟΣΟΥ**

Επιβλέπουσα

Καθ. Έφη Τσακαλίδου

Μέλη εξεταστικής Επιτροπής:

Καθ. Ελευθέριος Δροσινός

Αναπλ. Καθ. Ευστάθιος Πανάγου



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα σκιαγραφούν την παράδοση του κάθε τόπου, στον οποίο παράγονται, καθώς έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά. Παράγονται συνήθως με παραδοσιακές μεθόδους και δεν υφίστανται επεξεργασία, όπως συμβαίνει στις βιομηχανίες. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκαν 2 τυριά, το Γκερεμέζι (παραδοσιακό τυρί Αίγινας) και το Καρίκι (παραδοσιακό τυρί Τήνου). Και τα δυο αυτά προϊόντα αποτέλεσαν αντικείμενο της μελέτης με σκοπό την εύρεση οξυγαλακτικών βακτηρίων γνωστών για τις πολύτιμες ουσίες που παράγουν και είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Το διαφορετικό στοιχείο που αποτέλεσε ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρούσα μελέτη ήταν το γεγονός ότι όλες οι καλλιέργειες που μελετήθηκαν προήλθαν από την παρασκευή των τυριών, χωρίς προσθήκη εμπορικών καλλιεργειών. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε το μικροβίωμα των παραπάνω τυριών. Τα απομονωθέντα στελέχη βακτηρίων και ζυμών αρχικά ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο *ger*-PCR και στη συνέχεια, αντιπροσωπευτικά στελέχη βακτηρίων και ζυμών ταυτοποιήθηκαν με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA και της περιοχής ITS DNA, αντίστοιχα. Ταυτοποιήθηκαν κυρίως είδη των γενών *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Pichia*.

## **ABSTRACT**

Traditional dairy products always attribute special features to the place where these are produced due to their unique characteristics, the traditional methods with which these are produced and the fact that these don't undergo processing as it happens in industries. The above reasons set off the study of 2 traditional cheeses, Geremezi (product of Aigina) kai Kariki (product of Tinos). Both products have been the subject of study with purpose of finding LAB which produce beneficial substances for human such as lantibiotics (widely known substances with antimicrobial role). The special element of these two products is the fact of no added starter cultures. In the current study it was investigated the 'microbiota' of the above products. PCR techniques were used to group and then identify the isolated microorganisms. The isolated bacteria and yeasts were grouped using the genotyping technique of rep-PCR. Then, representative strains of bacteria and yeasts were identified at the species level by sequencing the 16S rRNA gene and ITS DNA region, respectively. The results obtained from the sequencing of 16S rRNA gene and ITS DNA region were analyzed using specific tools of bioinformatics and showed mostly strains of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Pichia*, concerning yeasts.

## ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ –KEY WORDS

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Βάση δεδομένων αναζήτησης και στοίχισης γονιδιωμάτων

LAB (Lactic Acid Bacteria): Οξυγαλακτικά βακτήρια

PCR (Polymerase Chain Reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

REP\_PCR (Repetitive Sequence-based PCR): PCR βασιζομενη σε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία

NSLAB (NonStarter Lactic Acid Bacteria): Εναρκτήρια οξυγαλακτική καλλιέργεια

Lactose: Λακτόζη ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )

Citrate: Κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ )

Glucose: Γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ )

Galactose: Γαλακτόζη ( $C_6H_{12}O_6$ )

Lactic acid: Γαλακτικό Οξύ ( $C_3H_6O_3$ )

Acetic acid: Οξικό Οξύ ( $C_2H_4O_2$ )

Propionic acid: Προπιονικό Οξύ ( $C_3H_6O_2$ )

Butyric acid, Βουτυρικό οξύ ( $C_4H_8O_2$ )

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την εισηγήτρια του θέματος αυτού και επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Τσακαλίδου Έφη για την καθοδήγησή της, κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας .

Θα ήθελα στη συνέχεια να ευχαριστήσω τη Γεωπόνο μέλος ΠΕ-ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, κ. Μανωλοπούλου Ευγενία (MSc) για την συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων της εργασίας αυτής. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Dr. Μαρίνα Γεωργαλάκη Γεωπόνο και μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου, για την βοήθειά της στην ανάλυση με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και την Dr. Ουρανία Αναστασίου Βιολόγο και μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου για τη βοήθειά της στις μοριακές αναλύσεις

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου η οποία έδειξε αμέριστη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια συγγραφής της μελέτης αλλά και στο σύνολο των σπουδών μου τα τελευταία χρόνια.

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12</b>
1.1 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΤΥΡΙΑ.....	12
1.2 ΣΧΕΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΤΥΡΙΩΝ .....	12
1.3 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	13
1.4 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	14
1.5 ΛΑΚΤΟΖΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΙΠΟΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ.....	16
1.5.1 Καταβολισμός Λακτόζης.....	18
1.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	19
1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος .....	19
1.6.2 Χαρακτηριστικά των καζεϊνών.....	19
1.6.3 Οι Καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος .....	21
1.6.4 Πρωτεόλυση.....	23
1.6.5 Πρωτεΐνες τυρογάλακτος .....	25
1.7 ΛΙΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΛΙΠΟΛΥΣΗ .....	27
1.8 ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	30
1.9 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ.....	32
1.10 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ, ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΚΑΙ ΑΙΓΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	34
1.10.1 Καρίκι .....	35
1.10.2 Γκερεμέζι .....	37
1.11 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	38
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>39</b>
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΩΝ.....	39
2.2 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ LAB .....	39
2.3 ΧΡΩΣΗ GRAM .....	42
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	43
2.4.1 Απομόνωση DNA βακτηρίων.....	43
2.4.2 Απομόνωση DNA ζυμών.....	45
2.5 REP-PCR.....	47
2.5.1 rep-PCR.....	47
2.5.2 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο της rep-PCR .....	48
2.5.3 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο της rep-PCR .....	49
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης .....	50
2.5.5 Επεξεργασία εικόνων ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του Προγράμματος Bionumerics .....	52
2.6 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΖΥΜΩΝ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA ΚΑΙ ITS ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ....	52
2.6.1 Ταυτοποίηση βακτηρίων .....	52
2.6.2 Ταυτοποίηση των ζυμών με αλληλούχηση της περιοχής ITS.....	55
2.7 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....	56
2.7.1 Μέτρηση pH.....	56
2.7.2 Ξηρά ουσία και Υγρασία .....	56
2.7.3 Προσδιορισμός Λιποπεριεκτικότητας.....	57
2.7.4 Προσδιορισμός της τέφρας .....	58
2.7.5 Ανάλυση σακχάρων και οργανικών οξέων .....	59
2.7.6 Προσδιορισμός Χλωριούχου Νατρίου.....	59
2.7.7 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών .....	60
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>64</b>
3.1 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....	64
3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....	73
3.2.1 Ομαδοποίηση βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR.....	79
3.2.2 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S r RNA.....	81
3.2.3 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR .....	84



3.2.4 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS .....	86
<b><u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u></b>	<b><u>91</u></b>

## ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΑΓΕΛΑΔΙΝΗΣ A <sub>S1</sub> .CN.....	21
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΑΓΕΛΑΔΙΝΗΣ A <sub>S2</sub> .CN.....	22
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΚΥΡΙΑ ΛΙΠΟΥΛΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ.....	29
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΥΝΩΝ -ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ LAB.....	33
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ.....	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 6:ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ REP- PCR.....	48
ΠΙΝΑΚΑΣ 7:ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ,ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ REP-PCR ΓΙΑ ΖΥΜΕΣ.....	49
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ 16S PCR ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	53
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ITS-PCR ΓΙΑ ΖΥΜΕΣ.....	55
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΡΛC ΣΤΑ ΔΥΟ ΤΥΡΙΑ.....	68
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	73
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-ΣΧΗΜΑ : ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ (LOG CFU/G) ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ ΚΑΙ ΚΑΡΙΚΙ.....	74
ΠΙΝΑΚΑΣ 13: ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΖΥΜΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΤΥΡΙΑ ΚΑΡΙΚΙ ΚΑΙ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ.....	78
ΠΙΝΑΚΑΣ 14: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΠΩΣ ΠΡΟΕΚΥΨΕ ΑΠΟ ΤΟ REP-PCR ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΠΩΣ ΠΡΟΕΚΥΨΕ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S RRNA 14 ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	83
ΠΙΝΑΚΑΣ 15: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΠΩΣ ΠΡΟΕΚΥΨΕ ΑΠΟ ΤΟ REP-PCR ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΠΩΣ ΠΡΟΕΚΥΨΕ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΧΗΣ ITS -PCR.....	87

## ΕΙΚΟΝΕΣ

ΕΙΚΟΝΑ 1: Η ΖΥΜΩΣΗ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΑΠΟ ΟΜΟΖΥΜΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΖΥΜΩΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ. ....	15
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΔΕΣΜΟΣ Β (1,4) ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΟΣ.....	16
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΛΙΠΑΣΕΣ.....	29
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	31
ΕΙΚΟΝΑ 5 : ΤΟ ΠΕΤΡΩΜΑ ΤΕΜΑΧΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΝΑ ΠΕΡΑΣΕΙ ΣΤΗ ΜΗΧΑΝΗ ΤΟΥ ΚΙΜΑ.....	36
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΤΟ ΠΕΤΡΩΜΑ ΣΤΗ ΜΗΧΑΝΗ ΤΟΥ ΚΙΜΑ.....	36
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ.....	37
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΔΙΑΣΚΟΡΠΙΣΜΕΝΩΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΤΕΧΝΙΚΗ REP-PCR.....	48
ΕΙΚΟΝΑ 10: ΣΥΣΚΕΥΗ ΚΑΥΣΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΗ KJELDAHD.....	62
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΣΥΣΚΕΥΗ ΑΠΟΣΤΑΞΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΗ KJELDAHD.....	62
ΕΙΚΟΝΑ 12: HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ.....	69
ΕΙΚΟΝΑ 13: HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΚΑΡΙΚΙ.....	70
ΕΙΚΟΝΑ 14: ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ M17 BROTH ΣΤΟ ΚΑΡΙΚΙ (ACA-DC1474).....	76
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΚΥΤΤΑΡΑ ΒΑΚΙΛΛΩΝ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ MRS BROTH ΣΤΟ ΚΑΡΙΚΙ (ACA-DC 1463).....	76
ΕΙΚΟΝΑ 16: ΚΥΤΤΑΡΑ ΛΕΜΟΝΟΕΙΔΩΝ ΖΥΜΩΝ ΜΕ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ NUTRIENT BROTH ΣΤΟ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ (ACA-DC 5287).....	77
ΕΙΚΟΝΑ 17: ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΜΗΚΩΝ ΖΥΜΩΝ ΧΩΡΙΣ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ NUTRIENT BROTH ΣΤΟ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ (ACA-DC 5290).....	77
ΕΙΚΟΝΑ 18: ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΟΜΠΟΛΟΓΟΕΙΔΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ MRS BROTH ΣΤΟ ΓΚΕΡΕΜΕΖΙ (ACA-DC 1473).....	77
ΕΙΚΟΝΑ 19 : ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ REP-PCR . ....	80
ΕΙΚΟΝΑ 20: ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ REP- PCR ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ BIONUMERICS. ....	81
ΕΙΚΟΝΑ 21: ΠΗΚΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΜΕ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S RRNA .	82
ΕΙΚΟΝΑ 22: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ REP-PCR ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙΣΕΣ ΖΥΜΕΣ. 84	
ΕΙΚΟΝΑ 23: ΔΕΝΔΡΟΓΡΑΜΜΑ REP-PCR ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	85
ΕΙΚΟΝΑ 24: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ITS-PCR ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙΣΕΣ ΖΥΜΕΣ ..	86

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Παραδοσιακά τυριά

Σήμερα στην Ελλάδα, όπως και στις υπόλοιπες αναπτυγμένες χώρες, βιομηχανική παραγωγή τυροκομικών προϊόντων βασίζεται στη χρήση εμπορικών εναρκτήριων καλλιιεργειών.

Παρόλα αυτά, στα μικρά τυροκομεία, όπως αυτό της Τήνου, οι παραγωγοί εκμεταλλεύονται την Παραδοσιακή Παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων κι έτσι δημιουργούν πολύ ενδιαφέροντα-από άποψης μικροβιολογίας- τυριά τα οποία προσφέρονται για μελέτη χάριν της πλούσιας μικροχλωρίδας τους. Η Παρασκευή παραδοσιακών τυριών από γάλα τοπικό με χρήση παραδοσιακών μεθόδων και τεχνικών, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ποιότητά του. Η χρήση νεπού γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα την Παρασκευή τυριών πολύ καλής ποιότητας δεδομένου ότι:

- Δεν χάνονται τα μοναδικά αρωματικά χαρακτηριστικά που προέρχονται από τη διατροφή των ζώων σε φυσικούς βοσκότοπους.
- Δεν καταστρέφεται η φυσική μικροβιακή χλωρίδα του γάλακτος η οποία επιδρά στην ωρίμανση του τυριού, τη διαμόρφωση πλούσιου αρώματος, γεύσης και υφής όπως προαναφέρθηκε.

Δεν καταστρέφονται ορισμένα ένζυμα ή ενεργοποιούνται άλλα.

- Δεν αποδομούνται οι πρωτεΐνες του γάλακτος.

Αυτές είναι οι αιτίες που τα τυριά αυτά χαρακτηρίζονται από ένα συνολικά ιδιαίτερο, πιο έντονο οργανοληπτικό προφίλ, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα τεχνολογικό ενδιαφέρον ως πηγή νέων οξυγαλακτικών μικροοργανισμών. Αντίθετα η παστερίωση του γάλακτος και η χρήση εμπορικών εναρκτήριων καλλιιεργειών, όπως επίσης και η τήρηση αυστηρών κανόνων υγιεινής στις σύγχρονες βιομηχανικές μονάδες παρασκευής τυριών, έχει οδηγήσει στην εύρεση σπάνιων οξυγαλακτικών βακτηρίων από τους διάφορους τύπους τυριών.

## 1.2 Σχέση μικροοργανισμών και τυριών

Το γάλα ήταν γνωστό ότι αποτελούσε εξαιρετική πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό από αρχαιοτάτων χρόνων, αφού περιέχει ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών ενώσεων για τους ανθρώπους. Εκτός από το γάλα μεγαλύτερης θρεπτικής αξίας προϊόν αποτελεί το τυρί. Πολλές εκδοχές έχουν προταθεί για την δημιουργία του, εκ των οποίων κυριότερες είναι δύο. Η πρώτη αναφέρει ότι το τυρί προέκυψε τυχαία όταν το γάλα μεταφέρθηκε στη ζεστή έρημο σε παραδοσιακό ασκό φτιαγμένο από στομάχι προβάτου,

ενώ η άλλη αναφέρει πως η δημιουργία του ήταν αποτέλεσμα προσπάθειας του ανθρώπου να εφεύρει τρόπους διατήρησης του γάλακτος, όπως η ξήρανσή του σε αβαθή πήλινα ή ξύλινα δοχεία στον ήλιο.

Και στις δύο περιπτώσεις πάντως είναι κοινή η δημιουργία πήγματος. Σήμερα είναι γνωστό πως το ένζυμο ρεννίνη που υπάρχει στο γαστρικό υγρό στο τέταρτο στομάχι νεαρών μηρυκαστικών ζώων (το λεγόμενο ήνυστρο) προκαλεί τη αποδιάταξη των μικκυλίων καζεΐνης, μετατρέποντάς το πήγμα. Κατόπιν, τα βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προϋπήρχαν στο γάλα, είναι υπεύθυνα για τη μετέπειτα ωρίμανση αυτής, συμβάλλοντας στην υφή, τη γεύση και το άρωμα του πήγματος (*Anyfantakis, 2004*).

Μέχρι τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα η παραγωγή τυριού γινόταν εμπειρικά, όταν η δημοσίευση του Louis Pasteur τα 1857 έδειξε ότι οι ζυμώσεις ήταν αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών. Εικοσιένα χρόνια αργότερα, η δημοσίευση αυτή οδήγησε τον Joseph Lister στην πρώτη απομόνωση βακτηρίου οξίνισης του γάλακτος, του *Bacterium lactis*. Έτσι το 1890 προτάθηκε η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως εναρκτηρίων καλλιιεργειών στα τυριά και το ξινόγαλα (*Stiles & Holzapfel, 1997*). Η αρχική παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων, όπως το τυρί, βασίστηκε σε αυθόρμητες ζυμώσεις, λόγω της ανάπτυξης της φυσικής μικροχλωρίδας των τροφίμων αυτών με αποτέλεσμα η ποιότητα του τελικού προϊόντος να είναι ανάλογη του μικροβιακού φορτίου. Η διαδικασία της ζύμωσης τελειοποιήθηκε με τη μέθοδο εμβολιασμού μικρής ποσότητας από το αρχικό προϊόν (εναρκτήριες καλλιέργειες) στο νέο, μειώνοντας έτσι τη πιθανότητα αποτυχίας. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας ήταν η επικράτηση των καλύτερα προσαρμοσμένων στελεχών.

Από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ξεκίνησε η παραγωγή ενζύμων και βακτηριακών καλλιιεργειών σε βιομηχανικό επίπεδο για τη χρήση τους στην διαδικασία παραγωγής τυποποιημένων προϊόντων ζύμωσης, μεταξύ άλλων και τυριών. Το παραπάνω γεγονός έδωσε στους παραγωγούς τη δυνατότητα να παρασκευάζουν τυριά με καθορισμένη γεύση, υφή, χρώμα, περίοδο ωρίμανσης και διάρκεια ζωής.

### 1.3 Οικονομικά Στοιχεία

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντικό στοιχείο της Μεσογειακής διαίτας και ζωτικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τον (ΕΚ) 853/2004 ως νωπό γάλα ορίζεται “το γάλα το οποίο παράγεται από την έκκριση του μαστού εκτρεφόμενων ζώων και το οποίο δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία άνω των 40 °C ούτε έχει υποστεί οιαδήποτε επεξεργασία που έχει ανάλογη επίδραση”.

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του FAO (*FAO Food Outlook 2019*), η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος το 2019 έφτασε τα 852 εκατομμύρια τόνους με αύξηση 1,4% σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος έχει αυξηθεί πάνω από 58%,

καθώς από 522 εκατομμύρια τόνους έφτασε τα 828 εκατομμύρια τόνους το 2017. Η Ινδία είναι η μεγαλύτερη γαλακτοπαραγωγός χώρα, και ακολουθούν οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Κίνα, το Πακιστάν και η Βραζιλία. Η παραγωγή γάλακτος στην Αφρική αναπτύσσεται με βραδύ ρυθμό σε σχέση με άλλα αναπτυσσόμενα κράτη λόγω της φτώχειας και σε άλλες χώρες λόγω δυσμενών κλιματικών συνθηκών.

Οι χώρες με το μεγαλύτερο πλεόνασμα γάλακτος είναι η Νέα Ζηλανδία, οι Η.Π.Α., η Γερμανία, η Γαλλία, η Αυστραλία και η Ιρλανδία. Αντίθετα οι χώρες με το μεγαλύτερο έλλειμμα σε γάλα είναι η Κίνα, η Ιταλία, η Ρωσική Ομοσπονδία, το Μεξικό, η Αλγερία και η Ινδονησία.

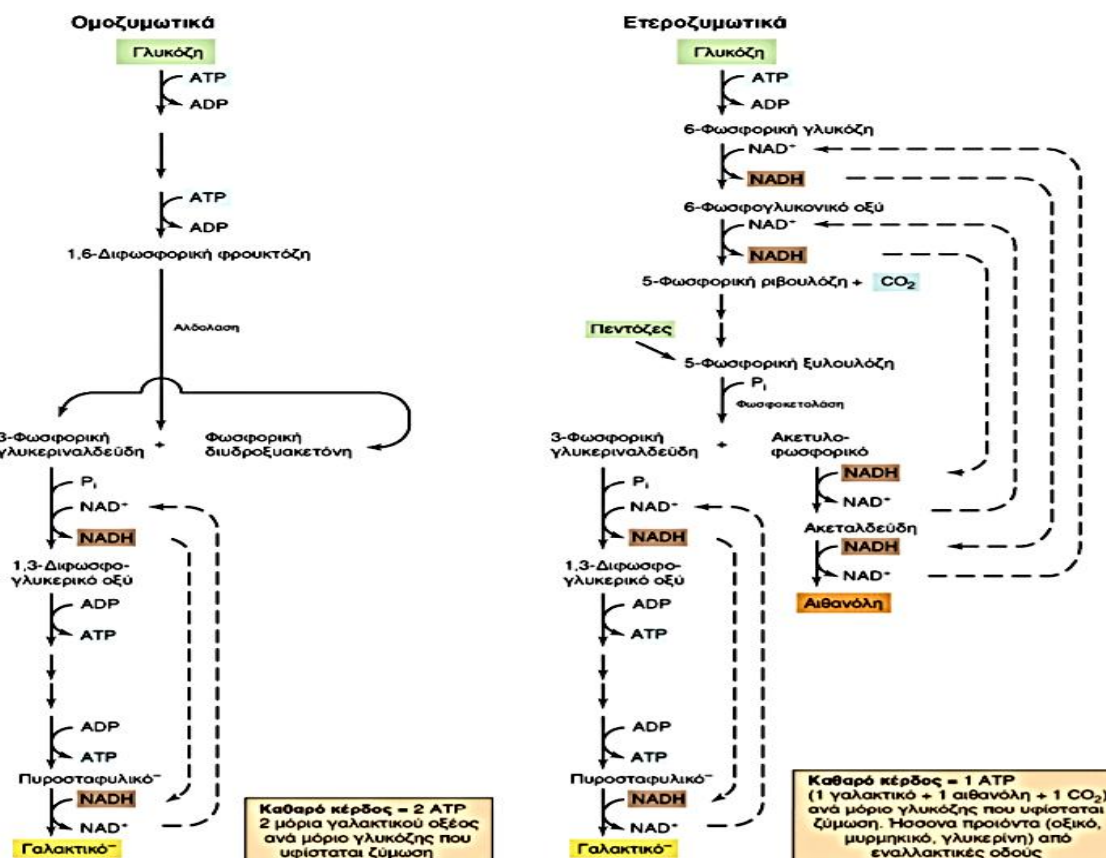
#### 1.4 Οξυγαλακτικά Βακτήρια

Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ομάδα μικροοργανισμών που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια αλλά έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την ικανότητα ζύμωσης της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν μία ποικιλία από μικρού μοριακού βάρους ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τέτοιες ουσίες είναι τα οργανικά οξέα, οι αλκοόλες, το διοξείδιο του άνθρακα, το διακετύλιο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι βακτηριοσίνες. Είναι (+) κατά Gram, μη σποριογόνοι κόκκοι, κοκκοβάκιλοι ή βάκιλοι με λιγότερο από 35mol % G+C DNA, συνήθως προαιρετικά αναερόβιοι και δεν διαθέτουν καταλάση.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε τρεις ομάδες ανάλογα με τις μεταβολικές οδούς που διαθέτουν για τη ζύμωση της γλυκόζης αλλά και με την ικανότητά τους να μεταβολίζουν πεντόζες.

1. Υποχρεωτικά ομοζυμωτικά: Εδώ ανήκουν οι γαλακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus spp.*) οι οποίοι ζυμώνουν τη γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ αποκλειστικά μέσω της γλυκολυτικής οδού και δεν δύνανται να μεταβολίζουν πεντόζες.
2. Προαιρετικά ετεροζυμωτικά: Πρόκειται για βακτήρια που ζυμώνουν τη γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ αποκλειστικά αλλά ζυμώνουν και πεντόζες μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα είδη *Lactococcus spp.*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και *Pediococcus*.

Στην 3<sup>η</sup> κατηγορία συναντούμε τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά βακτήρια τα οποία μεταβολίζουν τη γλυκόζη και τις πεντόζες μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται είδη του γένους *Lactobacillus spp.*, και τα γένη *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*. (Dimitriadou, 2019 Η ομοζυμωτική ομάδα παράγει σχεδόν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ ενώ η ετεροζυμωτική γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ ή αιθανόλη και CO<sub>2</sub> .



Εικόνα 1: Η ζύμωση της λακτόζης από ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια.

Αριστερά: Μονοπάτι Embden-Meyerhof, Δεξιά: Οδός φωσφορικών πεντόζων

Παρατηρούμε ότι δεν συντίθεται ATP από αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό αιθανόλης. Παρουσία οξυγόνου, πολλά ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου με NADH (μέσω φλαβινοενζύμων, ως ενδιάμεσων), σχηματίζοντας νερό. Τότε παράγεται οξικό οξύ αντί της αιθανόλης και έτσι είναι δυνατή η παραγωγή ενός επιπλέον μορίου ATP.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria, LAB) είναι η πιο σημαντική ομάδα μικροοργανισμών που χρησιμοποιείται στη ζύμωση των τροφίμων. Αυτά συνεισφέρουν στη γεύση και τη δομή των ζυμούμενων τροφίμων και επιπλέον αναστέλλουν τα αλλοιογόνα βακτήρια καθώς παράγουν ανασταλτικές ουσίες για την ανάπτυξή των.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν ταχεία οξίνιση της πρώτης ύλης μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων κυρίως γαλακτικού. Επιπρόσθετα, η παραγωγή οξικού οξέος, αιθανόλης, συστατικών αρώματος, βακτηριοσινών, εξωπολυσακχαριτών και αρκετών ενζύμων είναι μεγάλης σημασίας για την ύπαρξη των LAB.

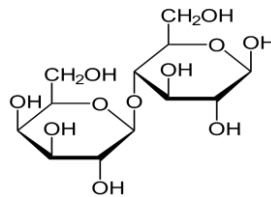
Επειδή τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποκτούν την ενέργεια που χρειάζονται μόνο μέσω του μεταβολισμού των σακχάρων, είναι περιορισμένα να ζουν σε περιβάλλοντα όπου κυριαρχούν τα σάκχαρα. Έχουν περιορισμένη βιοσυνθετική ικανότητα, βιταμίνες, πουρίνες και πυριμιδίνες, έτσι το θρεπτικό μέσο στο οποίο θα μπορέσουν να αναπτυχθούν πρέπει να ικανοποιεί όλες τις θρεπτικές τους απαιτήσεις. Τα περισσότερα ζουν ελεύθερα ή με ωφέλιμη-για τον ξενιστή-σχέση συνήθως ζώα, ενώ ορισμένα είναι ευκαιριακά παθογόνα. Τα συναντούμε σε γαλακτοκομικά προϊόντα και σε αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά. Αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα για τον άνθρωπο στη στοματική κοιλότητα, τον γαστρεντερικό σωλήνα και τον γυναικείο κόλπο, όπου και παίζουν σημαντικό ρόλο.

Λίγα μόνο LAB είναι παθογόνα για τα ζώα και τους ανθρώπους. Στο γένος *Streptococcus* ανήκουν περίπου 80 είδη εκ των οποίων μόνο ο *Streptococcus thermophilus* χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Στα υπόλοιπα είδη του γένους *Streptococcus* ανήκουν παθογόνα, όπως ο *S. pneumoniae* που προκαλεί πνευμονία στον άνθρωπο. (Krzysciak et al, 2013)

Οι καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα συντηρητικών σε τρόφιμα, καθώς παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις που περιλαμβάνουν οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, μυρμηγκικό, φαινυλο-γαλακτικό και καπροϊκό οξύ), διοξειδίο του άνθρακα, υπεροξειδίο του υδρογόνου, διακετύλιο, αιθανόλη και τέλος βακτηριοσύνες.

### 1.5 Λακτόζη και υπόλοιποι υδατάνθρακες

Αμέσως μετά τις πρωτεΐνες, το αμέσως πιο σημαντικό μόριο στο γάλα είναι η λακτόζη που θεωρείται ο κατεξοχήν υδατάνθρακας του γάλακτος. Σε κάποια είδη γάλακτος (πχ ανθρώπινο γάλα) εκτός από τη λακτόζη συναντούμε και άλλα είδη υδατανθράκων. Αυτοί είναι οι ΜΑΟ ολιγοσακχαρίτες- (μη αφομοιώσιμοι ολιγοσακχαρίτες) –prebiotics (C<0,05%) οι οποίοι αποτελούν την κατάλληλη πηγή C για κάποιους από τους μικροοργανισμούς που κατοικοεδρεύουν στο πεπτικό μας σύστημα.



Εικόνα 2: Δεσμός β (1,4) γλυκοζιτικός δείχνει τη σύνδεση β-Γλυκόζης με τη β-Γαλακτόζη



Η β-λακτόζη θερμοδυναμικά είναι πιο σταθερή από την α-λακτόζη. Αυτό οφείλεται στην ανωμέρεια του σακχάρου που έχει έναν ελεύθερο ανωμερή C, άρα είναι ανάγον σακχαρο. Ο ορισμός του ανάγοντος σακχάρου στηρίζεται στη διαθεσιμότητα ελεύθερου ανωμερούς C.

Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος ξεκίνησε με προσεγγίσεις στην αξιοποίηση της λακτόζης. Ο *Whittier(1944)* αναφέρει ότι πρώτος ο Ettmueler το 1688 απομόνωσε λακτόζη από τυρόγαλα και την <<καθάρισε>> με επανακρυστάλλωση. Στη βιομηχανία τροφίμων εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές για την κρυστάλλωση, απομόνωση, καθαρισμό και υδρόλυση για την παραγωγή διάφορων υποπροϊόντων. Η λακτόζη κυριαρχεί ποσοτικά, αφού στο τυρόπηγμα παραμένει ένα μικρό της ποσοστό, μπορεί να απομονωθεί με διάφορες τεχνικές, όπως τεχνικές μεμβρανών και μετά από ξήρανση να παραχθεί σκόνη στην οποία το ποσοστό της είναι περίπου 70%. Οι αρχές που αφορούν την κρυσταλλοποίηση καθώς και παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κρυστάλλων της λακτόζης, έχουν εφαρμοστεί στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Γενικά η ταχεία κρυστάλλωση παράγει μικρού κρυστάλλους. Ο καινοτόμος σχεδιασμός του εξοπλισμού και οι κατάλληλες τεχνικές επεξεργασίας επιτρέπουν τη δημιουργία μικρού μεγέθους κρυστάλλων λακτόζης ώστε να παραχθούν υψηλής ποιότητας προϊόντα. Ένα από τα ελαττώματα υφής σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα που μπορεί να εμφανιστεί η αμμώδης υφή λόγω μεγάλου μεγέθους κρυστάλλων λακτόζης, που ανιχνεύονται στο στόμα, δεν υδρολύονται εύκολα και προκαλούν μία τραχιά ή αμμώδη αίσθηση.

Η υδρόλυση της λακτόζης στα επιμέρους συστατικά, γλυκόζη και γαλακτόζη που είναι ουσίες με μεγαλύτερη γλυκαντική δύναμη, οδηγεί σε παραγωγή σιροπιών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παγωτού καθώς και σε άλλα γαλακτοκομικά ή μη προϊόντα. Η υδρολυμένη λακτόζη αυξάνει τη διαθεσιμότητα των άλλων συστατικών του γάλακτος και βελτιώνει τη δυσανεξία στη λακτόζη (*Geilman 1993*).

Η λακτόζη χρησιμοποιείται ως έκδοχο φαρμάκων και τα παράγωγά της (λακτιτόλη, λακτοσουκρόζη, λακτοβιονικό οξύ κ.α.) έχουν επιτυχώς ταυτοποιηθεί και διατίθενται στο εμπόριο (*Gaenzle et al., 2008*). Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια, αρκετές βιομηχανίες γάλακτος έχουν επιτυχώς στήσει μονάδες παραγωγής λακτίνας που είναι το προϊόν συμπύκνωσης του αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος (απόγαλα) με BOD 30000-50000ppm. Η λακτίνα, που έχει τη μορφή υποκίτρινης σκόνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή είτε όπως είναι είτε σε μίγμα με απόβλητα άλλων βιομηχανιών όπως μελάσα ή φλούδες δημητριακών μετά την επεξεργασία αυτών.

Οι ολιγοσακχαρίτες είναι το τρίτο πιο άφθονο συστατικό του ανθρώπινου γάλακτος (12-14 g/L). Επίσης έχουν βρεθεί σε πολύ μικρότερες ποσότητες στο αγελαδινό πρωτόγαλα και γάλα (*Gopal & Gill, 2000*). Ως γνωστόν οι ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος και κυρίως του ανθρώπινου, μπορεί να είναι παράγοντες ανάπτυξης για τη μικροχλωρίδα του εντέρου (BIFIDO bacteria)

των θηλαζόντων βρεφών (Corra et al., 2004). Δεδομένου ότι υπάρχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά των ολιγοσακχαριτών του γάλακτος των ζώων και του μητρικού, γίνονται προσπάθειες να απομονωθούν τα σάκχαρα αυτά από το τυρόγαλα.

Από το τυρόγαλα απομονώνονται ολιγοσακχαρίτες κατά την υπερδιήθηση που πραγματοποιείται για την παραλαβή του πρωτεϊνικού συμπυκνώματος (Whey Protein Concentrate-WPC) του τυρογάλακτος. Οι Barile et al. (2009) ταυτοποίησαν από υπερδιηθημένο αγελαδινό τυρόγαλα 15 ολιγοσακχαρίτες από τους οποίους οι 7 έχουν ίδια δομή με αυτούς του μητρικού γάλακτος. Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί βρίσκονται αυτούσιοι στο τυρόγαλα και περιέχουν τα σιαλικά οξέα, N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ (NeuAc) και N-γλυκονευραμινικό οξύ (NeuGe).

### 1.5.1 Καταβολισμός Λακτόζης

Ο καταβολισμός της λακτόζης πραγματοποιείται είτε από την ενδογενή χλωρίδα του γάλακτος (αφορά το μη παστεριωμένο γάλα), είτε μέσω των εναρκτήριων καλλιέργειών που προστίθενται στο γάλα.

Τόσο οι εναρκτήριες όσο και οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια άρα καταβολίζουν τη λακτόζη. Το θέμα είναι πόσο γρήγορα την καταβολίζουν και με ποιο μονοπάτι γίνεται αυτό.

#### ➤ Εναρκτήριες καλλιέργειες (Starter cultures)

Μιλάμε για ένα οξυγαλακτικό βακτήριο το οποίο μεταβολίζει πολύ γρήγορα τη λακτόζη έτσι ώστε το pH μέσα σε 6 ώρες να κατέβει κάτω από 5,3 και έπειτα μέχρι τις 24 ώρες να κατέβει κάτω από 5. Εδώ λοιπόν έχουμε ομοζυμωτικό καταβολισμό λακτόζης. Τα βακτήρια αυτά μπαίνουν, παίρνουν τη λακτόζη και υδρολύουν σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Συνήθως καταβολίζουν μόνο τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη την εκκρίνουν προς τα έξω. Ακολουθούν πάντως το κλασικό μονοπάτι της γλυκόλυσης δίνοντας πυροσταφυλικό και στο τέλος κάνουν και τη ζύμωση (αναγωγή του πυροστοφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ).

#### ➤ Μη εναρκτήριες καλλιέργειες (Non starter cultures)

Αυτά καταβολίζουν πιο αργά τη λακτόζη. Παίζουν πού σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση γεύσης και αρώματος του τυριού ακριβώς διότι ακολουθούν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια από τους starter. Εδώ έχουμε το ετεροζυμωτικό μονοπάτι-αυτό των φωσφορικών πεντοζών. Εδώ λοιπόν, εκτός από το γαλακτικό οξύ -που παράγεται και στη πρώτη διαδικασία- παράγεται επιπλέον CO<sub>2</sub>, αιθανόλη και οξικό οξύ. Στο οξικό οξύ αποδίδεται περισσότερο η όξινη γεύση της φέτας παρά στο γαλακτικό οξύ.

Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αφενός παίζει ρόλο στην παραγωγή ενέργειας και αφετέρου στην παραγωγή ριβοζών που χρειάζονται για τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και την αναγέννηση του φωσφορυλιωμένου NADPH, απαραίτητου για οξειδωτικές αντιδράσεις σε βιοσυνθετικές διεργασίες. (πχ στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων -όπου υπάρχει οξειδοαναγωγής αντίδραση).

## 1.6 Ανάλυση και Μεταβολισμός Πρωτεϊνών

### 1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του πρόβειο γάλακτος (5,8% w/w) είναι μεγαλύτερη από αυτή του αίγειου (4,6% w/w) και του αγελαδινού (3,3% w/w). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ειδών και επηρεάζεται από τη φυλή, την περίοδο γαλακτοπαραγωγής, τη διατροφή, το κλίμα, την εποχή και την υγιεινή του μαστού(μαστίτιδα). Το αίγιο και το πρόβειο γάλα περιέχουν περίπου 0,7-1,0% και 0,4-0,8% N, αντίστοιχα. Το αίγιο γάλα έχει μεγαλύτερο ποσοστό μη πρωτεϊνικού N και λιγότερο καζεϊνικό N απ' ότι το πρόβειο και το αγελαδινό γάλα.

Οι κύριες πρωτεΐνες στο πρόβειο και στο αίγιο γάλα είναι ίδιες όπως και στο αγελαδινό , διαφέρουν όμως ως προς τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά. Γενικά, οι πρωτεΐνες του γάλακτος εμφανίζονται σε δύο διακριτές μορφές. Όπως προαναφέρθηκε, η μία είναι μία ασταθής μικυλλιακή φάση που αποτελείται από καζεΐνες με τη μορφή μικκυλίων σε διασπορά. Συνδέονται μεταξύ τους με φωσφορικό ασβέστιο και μικρές ποσότητες Mg, Na, P και κιτρικών αλάτων, και διαθλούν το φως προσδίδοντας στο γάλα το λευκό του χρώμα. Η άλλη είναι μία μορφή διαλυτών πρωτεϊνών που αποτελείται από πρωτεΐνες του ορού (κυρίως β-γαλακτογλοβουλίνη, α-γαλακτοαλβουμίνη, οροαλβουμίνη, ανοσοπρωτεΐνες). Οι καζεΐνες κατακρημνίζονται σε pH 4.6 σε θερμοκρασία δωματίου ενώ κάτω από τις ίδιες συνθήκες οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν εν διαλύσει.

### 1.6.2 Χαρακτηριστικά των καζεϊνών

#### 1) Φωσφορυλίωση

Όλες οι καζεΐνες είναι φωσφορυλιωμένες σε κυμαινόμενο βαθμό σε υπολείμματα σερίνης (SerP) και περιστασιακά σε υπολείμματα θρεονίνης. Οι γενετικές παραλλαγές των κ-,  $\alpha_{s1}$ , και β-καζεϊνών, περιέχουν συνήθως έναν χαρακτηριστικό αριθμό φωσφορυλιωμένων υπολειμμάτων σερίνης και συγκεκριμένα 1 -για την κ-καζεΐνη-, 8 ή 9-για την  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη-, και 4 ή 5-για την β-καζεΐνη και 10-13 για την  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη.

## 2) Γλυκοζυλίωση

Είναι χαρακτηριστικό της κ-CN και είναι ο λόγος στον οποίο οφείλεται η εκτεταμένη ανομοιογένεια των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας. Ωστόσο η μη γλυκοζυλιωμένη περιοχή αποτελεί το κύριο συστατικό της. Στο πλήρες γάλα η κ-καζεΐνη είναι μία φωσφο-γλυκο-πρωτεΐνη η οποία περιέχει τρεις μονοσακχαρίτες: το σιαλικό οξύ (NeuAc), τη γαλακτόζη (Gal) και τη γαλακτοζαμίνη (GalNAc), της οποίας τα μετά ασβεστίου άλατα είναι ευδιάλυτα ενώ των υπολοίπων τριών καζεϊνών είναι αδιάλυτα και έτσι η κ-καζεΐνη προστατεύει το σύνολο των καζεϊνών από την αυτόματη καταβύθισή τους και κατά συνέπεια την καταστροφή της δομής του γάλακτος. Τα υπολείμματα υδατανθράκων εμφανίζονται με τη μορφή τρι- ή τετρασακχαριτών (*Swaisgood, 1992*). Έτσι λοιπόν τα μικρού μεγέθους συστατικά της κ-CN μπορεί να περιέχουν μεταβλητό αριθμό των τελευταίων, οι οποίοι είναι ενωμένοι σε ένα τουλάχιστον από τα 4 υπολείμματα θρεονίνης, κυρίως όμως παρουσιάζονται στο υπόλειμμα Thr<sup>133</sup> (*Eigel et al., 1984*). Οι διαφορές για την κ-CN εντοπίζονται κυρίως στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, το καζεϊνομακροπεπτιδίο (CMP). Κατά την επίδραση του ενζύμου ρεννίνη σε pH ~ 5.5 και T 35°C -όπως γίνεται κατά την παρασκευή του τυριού- η κ-καζεΐνη διασπάται σε ένα ευδιάλυτο γλυκοπεπτιδίο (M.B. 8000) που περιέχει 28% υδατάνθρακες και σε ένα μεγαλύτερο τμήμα, την παρα-κ-καζεΐνης, ελεύθερο υδατανθράκων, της οποίας τα μετά ασβεστίου άλατα είναι αδιάλυτα και καταβυθίζονται, ενώ συγχρόνως καταβυθίζονται και οι υπόλοιπες καζεΐνες λόγω της καταστροφής του προστατευτικού περιβλήματος της κ-καζεΐνης. Η διάσπαση της κ-καζεΐνης γίνεται στον 106<sup>ο</sup> πεπτιδικό δεσμό μεταξύ φαινυλαλανίνης και μεθειονίνης.

## 3) Υπολείμματα κυστεΐνης

Υπάρχουν δύο υπολείμματα καζεΐνης στην αλληλουχία της κ- και της α<sub>s2</sub> καζεΐνης, που τους επιτρέπει να συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών (*Swaisgood, 1992*).

## 4) Σχετικά υψηλά ποσοστά υπολειμμάτων προλίνης

Κυρίως στις β-καζεΐνες (35 στη β-CN, 20 στην κ-CN, 17 στην α<sub>s1</sub> και 10 στην α<sub>s2</sub>-CN), τα οποία επηρεάζουν τη δομή της πρωτεΐνης, αφού διακόπτουν την α-ελικοειδή και β-πτυχωτή δομή και εμφανίζονται συνήθως στις β-στροφές. (*Swaisgood, 1992*).

## 5) Γενετικός πολυμορφισμός

Οφείλεται σε διαφορές ως προς τα υπολείμματα αμινοξέων ή σε απαλοιφές τμημάτων της πεπτιδικής αλυσίδας που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα και διαφορές στη γλυκοζυλίωση, το ηλεκτρικό φορτίο, το μοριακό βάρος και την υδροφοβία.

### 1.6.3 Οι Καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος

Το αγελαδινό γάλα περιέχει 24-28 gr/L καζεΐνη (Swaisgood, 1992). Οι τέσσερις κύριες καζεΐνες  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ - και  $\kappa$ -, βρίσκονται σε αναλογία 39:10:36:13 (Borkova & Snaselova, 2005). Η  $\kappa$ -καζεΐνη περιβάλλει τις 3 υπόλοιπες.

Η αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη περιλαμβάνει 199 αμινοξέα με υπολογισμένο μοριακό βάρος 23.615 Da και αντιπροσωπεύει το 40% το καζεϊνικού κλάσματος. Είναι ευαίσθητη στα ιόντα ασβεστίου και καταβυθίζεται με χλωριούχο ασβέστιο 0,4 M, σε pH 7,0 και θερμοκρασία 40 °C, ενώ δεν περιέχει κυστεΐνη ή σάκχαρα (Anyfantakis, 1994). Η γενετική παραλλαγή A βρέθηκε στις φυλές *Holstein Friesians*, *Red Holsteins* και *German Red*. Η B είναι κυρίαρχη παραλλαγή στο είδος *Bos Taurus*, η C είναι κυρίαρχη παραλλαγή στα είδη *Bos indicus* και *Bos grunniens*, η παραλλαγή D βρέθηκε σε διάφορες φυλές της Γαλλίας και της Ιταλίας και η παραλλαγή E στο είδος *Bos grunniens*. Οι παραλλαγές A,B, C έχουν 8 φωσφορικές ομάδες και η D εννιά (Eigel et al., 1984). Επίσης έχουν χαρακτηριστεί τρεις νέες γενετικές παραλλαγές οι F, G και H (Farrell et al., 2004). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των γενετικών παραλλαγών της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης.

Πίνακας 1: Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -CN

(Πηγή: Farrell et al., 2004).

			Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη						
Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	14-26		53	51-58	59	66	192	
$\alpha_{s1}$ -CN (199 αμινοξέα)	A	Απαλοιφή						Glu	
	B			Ala			Gln	SerP	Glu
	C								Glu
	D			ThrP					Glu
	E						Lys		Glu
	F							Leu	Glu
	G								Glu
	H					Απαλοιφή			Glu

Ο φαινότυπος  $\alpha_{s1}$ -CN BB έχει συσχετιστεί με υψηλότερες αποδόσεις σε γάλα και επομένως υψηλότερη απόδοση σε πρωτεΐνη κατά την γαλακτοπαραγωγή. Ωστόσο ο ίδιος φαινότυπος έχει συσχετιστεί και με χαμηλή πρωτεϊνοπεριεκτικότητα στο γάλα. Φαίνεται ότι τα άτομα που φέρουν τον αλληλόμορφο G παράγουν λιγότερη  $\alpha_{s1}$ -CN και περισσότερες από τις άλλες καζεΐνες- οι ομόζυγες αγελάδες (GG) παράγουν 55% λιγότερη  $\alpha_{s1}$ -CN. Η γενετική παραλλαγή A παρουσιάζει χαρακτηριστικά πολύ διαφορετικά από αυτά των άλλων παραλλαγών, γεγονός που οφείλεται στην απαλοιφή των 13 υπολειμμάτων αμινοξέων, αφού έτσι εξαφανίζονται τα περισσότερα από τα υδροφοβικά υπολείμματα στη N-τελική περιοχή, μεταξύ των οποίων και της αλληλουχίας Phe-Phe-Val, η οποία υδρολύεται από τη χυμοσίνη κατά την ωρίμανση των τυριών. Επομένως αυτή η πρωτεΐνη έχει μειωμένη υδροφοβία και δεν συσσωματώνεται εκτενώς παρουσία ασβεστίου. Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι τα μη συνεκτικά πήγματα δημιουργούνται σε γάλατα που περιέχουν  $\alpha_{s1}$ -CN A. Τα τυριά που παρασκευάζονται από γάλα που περιέχει τη γενετική παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN C, σχηματίζουν πιο συνεκτικό πήγμα σε σχέση με γάλα που περιέχει τη γενετική παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN B (Farrell et al., 2004).

Η  $\alpha_{s2}$  καζεΐνη περιλαμβάνει 207 αμινοξέα, αντιπροσωπεύει το 10% του καζεϊνικού κλάσματος και έχει 25.226 Da. Διαθέτει 10-13 φωσφορικές ομάδες (Brignon et al., 1977). Περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα φωσφόρου σε σχέση με τις υπόλοιπες καζεΐνες (Anyfantakis, 1994). Είναι η ομάδα των καζεϊνών που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στην έκταση της φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα να είναι πιο ευαίσθητες στα ιόντα ασβεστίου απ' ότι οι  $\alpha_{s1}$ -CN. Η πρωτεΐνη αναφοράς γι' αυτήν την ομάδα είναι η  $\alpha_{s2}$ -CN A-11P, ένα πολυπεπίδιο μονής αλυσού με έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των υπολειμμάτων της κυστεΐνης 36 και 40 (Farrell et al., 2004). Οι 4 γνωστές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως A, B, C και D.

Πίνακας 2: Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής  $\alpha_{s2}$ -CN

(Πηγή : Farrell et al., 2004).

		Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη			
Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	33	47	51-99	130
$\alpha_{s2}$ -CN (207 αμινοξέα)	A	Glu	Ala		Thr
	B	Η ολοκληρωμένη αλληλουχία δεν έχει καθοριστεί			
	C	Gly	Thr		Ile
	D	Απαλοιφή			

Η αγελαδινή β-καζεΐνη περιλαμβάνει 209 υπολείμματα αμινοξέων και αντιπροσωπεύει το 45% του καζεϊνικού κλάσματος. Η πρωτεΐνη αυτή είναι αρκετά περίπλοκη λόγω της δράσης της πλασμίνης που είναι ενδογενές ένζυμο του γάλακτος. Η δράση της τελευταίας οδηγεί στο σχηματισμό των  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  και  $\gamma 3$ -CN τα οποία είναι κλάσματα της β-CN και αποτελούνται από τα υπολείμματα 29-209, 106-209 και 108-209 αντίστοιχα. Τα αμινοτελικά κλάσματα της β-CN που απελευθερώνονται από την πλασμίνη, είναι οι πρωτεόζες-πεπτόνες, τα συστατικά 5, 8-slow και 8-fast (*Eigel et al., 1984*) που αντιστοιχούν στα υπολείμματα 1-105 ή 1-107, 1-28 και 29-105 ή 107 αντίστοιχα (*Farrell et al., 2004*).

Η πρωτεΐνη αναφοράς γι' αυτήν την ομάδα είναι η  $A^2$ -5P, που αποτελείται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα που δεν περιλαμβάνει υπολείμματα κυστεΐνης. Η γενετική παραλλαγή A είναι η κυρίαρχη σε όλα τα είδη τους γένους *Bos* που έχουν μελετηθεί. Οι παραλλαγές C και D έχουν μία λιγότερη φωσφορική ομάδα από τις υπόλοιπες. Κύριο χαρακτηριστικό της β-καζεΐνης είναι ότι όλες οι παραλλαγές προκύπτουν από γενετικό πολυμορφισμό, ο οποίος ευθύνεται και για τροποποίηση της φωσφορυλίωσης στις παραλλαγές C και D.

Η κ-καζεΐνη είναι το κλάσμα που σταθεροποιεί όλες τις άλλες καζεΐνες έναντι των ιόντων ασβεστίου. Είναι διαλυτή παρουσία ασβεστίου σε όλες τις θερμοκρασίες και η μοναδική που περιέχει στο μόριό της υδατάνθρακες (γαλακτόζη 1,3%, γαλακτοζαμίνη 1,4%, και σιαλικό οξύ 2,0%) και υπολείμματα κυστεΐνης. Η κ-CN του αγελαδινού γάλακτος, περιέχει δύο υπολείμματα κυστεΐνης που της επιτρέπει να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο αριθμός των υπολειμμάτων σακχάρων που είναι ενωμένα στην πεπτιδική αλυσίδα είναι δυνατό να ποικίλει και κατά συνέπεια ποικίλει και το μοριακό βάρος και η ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Έχει 169 υπολείμματα αμινοξέων στο μόριό της. Περιέχει τον πολύ ευαίσθητο στη χυμοσίνη δεσμό Phe105-Met106, ο οποίος όταν υδρολυθεί χάνεται η προστατευτική ιδιότητά της πάνω στις άλλες καζεΐνες, γεγονός που οδηγεί στην πήξη του γάλακτος (*Anyfantakis & Kalatzopoulos, 1993*).

#### 1.6.4 Πρωτεόλυση

Οι καζεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών του γάλακτος (28 g/L) και είναι πρόδρομες ουσίες πολλών βιοενεργών πεπτιδίων. Η άλλη μεγάλη κατηγορία πρωτεϊνών του γάλακτος είναι οι πρωτεΐνες του ορού. Αποτελούν το 20% των συνολικών πρωτεϊνών του και είναι ένα ετερογενές μίγμα, τα κύρια συστατικά του οποίου είναι η α-λακταλβουμίνη και η β-λακταλβουμίνη. Οι βασικές πρωτεΐνες δηλαδή η α-λακταλβουμίνη και β-λακταλβουμίνη είναι τυπικές γλοβουλίνες με υψηλό βαθμό δευτεροταγούς και τεταρτοταγούς δομής.

Μέρος των πρωτεϊνών του γάλακτος υδρολύεται με την επίδραση ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων(πλασμίνη) ή μικροβιακών πρωτεολυτικών ενζύμων ή εξωγενών ενζύμων όπως η πυτιά στην περίπτωση των τυριών, σε μικρότερου μοριακού βάρους αζωτούχα σώματα. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα διακρίνονται με βάση τη θέση τους στο κύτταρο των βακτηρίων σε εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πρωτεϊνάσες.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαιτούν για την ανάπτυξή τους ελεύθερα αμινοξέα, αζωτούχες βάσεις πουρίνης και πυραμιδίνης και βιταμίνες του συμπλέγματος Β. Η ύπαρξη πρωτεολυτικών συστημάτων έχει ιδιαίτερη σημασία για τα οξυγαλακτικά βακτήρια επειδή με τη δράση τους εξασφαλίζουν πρωτεϊνικό και πεπτιδικό άζωτο που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξή τους και κατ' επέκταση τη δυνατότητα επικράτησής τους σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μεταφέρουν ενεργητικά αμινοξέα και ολιγοπεπτίδια μέσω της κυτταρικής τους μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου με εξειδικευμένα συστήματα. Τα ολιγοπεπτίδια που μπορούν να μεταφέρονται με αυτά τα συστήματα μπορεί να περιέχουν από 3-7 αμινοξέα

Τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν ασθενείς πρωτεολυτικές ιδιότητες σε σχέση με άλλες ομάδες βακτηρίων πχ *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, κολοβακτηριοειδή. Παρ' όλα αυτά είναι αποδεδειγμένη η ύπαρξη πολύπλοκης πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Η πολυπλοκότητα αυτή οφείλεται όχι μόνο στον αριθμό και τον τύπο διάφορων πρωτεϊνών και πεπτιδίων αλλά και στην κατανομή τους στα κύτταρα των οξυγαλακτικών βακτηρίων οποία μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος. Ο διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πεπτιδίων βασίζεται αντίστοιχα στη δυνατότητά τους να αποδοθούν μόνο ακέραιες πρωτεΐνες ή να αποδοθούν πεπτίδια και παράγωγα πεπτιδίων. Οι πρωτεϊνάσες εξωκυτταρικές και οι πεπτιδάσες ενδοκυτταρικές.

Οι πρωτεϊνάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων εντοπίζονται ως επί το πλείστο εξωκυτταρικά, συνδεδεμένες με το κυτταρικό τους τοίχωμα και έχουν μοριακό βάρος 180-190 kDa. Η σύνθεσή τους θεωρείται ότι ελέγχεται από πλασμίδια. Η αποστολή τους είναι η αρχική διάσπαση των πρωτεϊνών σε ολιγοπεπτίδια, τα οποία στη συνέχεια μπορούν είτε να μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου για περαιτέρω διάσπαση από τις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες είτε να διασπαστούν επί τόπου από εξωκυτταρικές πεπτιδάσες, σε όσα είδη αυτές υπάρχουν, όπως π.χ. στον *Lactococcus lactis*. Εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες συνδεδεμένες με το κυτταρικό τοίχωμα, έχουν απομονωθεί κυρίως από είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που σχετίζονται με γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τα *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. delbrückii*, *Lc. lactis* και *Lc. cremoris*.



Η δράση των πρωτεολυτικών συστημάτων των LAB στα τρόφιμα εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες που σχετίζονται με τον περιβάλλον του Τροφίμου και τα συστατικά του. Παράγοντες όπως το χλωριούχο νάτριο, το νιτρικό νάτριο, το ασκορβικό οξύ, η γλυκόζη και οι βιογενείς αμίνες καθώς και το pH, η θερμοκρασία και η ενεργότητα του νερού επιδρούν κατά διαφορετικό τρόπο στις πεπτιδάσες του των οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Christensen et al. 1999*).

#### 1.6.5 Πρωτεΐνες τυρογάλακτος

Στο τυρόγαλα δεν συμπεριλαμβάνεται η καζεΐνη καθώς αυτή παραμένει στο τυρόπηγμα. Κυριαρχούν όμως η β-λακτογλοβουλίνη (β-Lg), η α-λακταλβουμίνη (α-La) και οι ανοσοσφαιρίνες (Igs) που αποτελούν το 80,39% των αζωτούχων ενώσεων του τυρογάλακτος καθώς και άλλες με μικρότερο ποσοστό (*Anyfantakis 2004*). Για να οριστεί μία πρωτεΐνη σαν μακροστοιχείο για τη θρέψη πρέπει να είναι ένα πολυπεπτίδιο με πάνω από 50 αμινοξέα και MB πάνω από 6000 Dalton.

Η βιολογική αξία εκφράζει το ποσοστό της απορροφηθείσας πρωτεΐνης της τροφής μέσω του εντερικού βλεννογόνου που χρησιμοποιήθηκε από τον οργανισμό για αποκλειστικά δομικούς σκοπούς, δηλαδή πόσο αποτελεσματικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρωτεΐνη. Από την άποψη αυτή, οι πρωτεΐνες ορού υπερέχουν και είναι πιο χρήσιμες τόσο στους αθλητές όσο και σε ανθρώπους με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν μεγαλύτερη θρεπτική αξία από την καζεΐνη του τυριού γιατί έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η λυσίνη (8 Lys/100 g pr) και σε μεγαλύτερη αναλογία.

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αποτελείται από τα βασικά διακλαδισμένα αμινοξέα (BCCAs) όπου το ποσοστό λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης είναι πάνω από 20% w/w. Θεωρούνται ρυθμιστές του μεταβολισμού στην ομοιόσταση της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων συμμετέχοντας αρκετά στον έλεγχο του σωματικού βάρους (*Zemel, 2004*).

Το τυρόγαλα είναι μία πλούσια και ισορροπημένη πηγή θειούχων αμινοξέων (μεθειονίνη και κυστεΐνη) τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά καθώς είναι πρόδρομοι παράγοντες σχηματισμού της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (*Smithers, 2008*). Επίσης οι πρωτεΐνες ορού και τα παραγόμενα πεπτιδιά τους, εμφανίζουν ανοσορρυθμιστική, αντιυπερτασική και αντιμικροβιακή δράση (*Madureira et al., 2010*).

#### α-Λακταλβουμίνη

Είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη ορού με MB 14100 Da. Παράγεται στον αδένα του μαστού, ρυθμίζει τη βιοσύνθεση της λακτόζης, δημιουργώντας ένα σύνθετο σύμπλεγμα με την β-1,4 γαλακτοζυλοτρανσφεράση στο μαστικό αδένα και έχει τάση να δεσμεύει το ασβέστιο (*Brew, 2003*).

### β-Λακταλβουμίνη

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το 48-55% των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Αποτελείται από 178 αμινοξέα με MB 18400 Da και υπάρχουν πολλές γενετικές παραλλαγές. Παράγεται και αυτή στον αδένα του μαστού. Μόνο τα μηρυκαστικά και κάποια μονογαστρικά ζώα μπορούν να την παράξουν.

### (Bovine Serum Albumins)- Αλβουμίνη ορού αίματος

Αποτελείται από 582 αμινοξέα και έχει MB 66000 Da. Δε συντίθεται στο μαστικό αδένα αλλά περνά στο γάλα από τα αιμοφόρα αγγεία μέσω παθητικής διάχυσης. Είναι πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων (*Walsh & Duncan, 2000*).

### Ανοσοσφαιρίνες

Πρόκειται για ομάδα πρωτεϊνών που προσδίδουν παθητική ανοσία και λειτουργούν ως αντισώματα. Τα MB κυμαίνονται μεταξύ 22000-70000 Da και υπάρχουν 4 κατηγορίες στο αγελαδινό γάλα: Ig1, Ig2, IgA, IgM. Εκτός από τον ανοσολογικό τους ρόλο, φαίνεται ότι μειώνουν τη χοληστερόλη και την αρτηριακή πίεση.

### Άλλες πρωτεΐνες

Υπόλοιπες σε μικρότερο ποσοστό είναι η λακτοφερίνη (LF), η λακτοπεροξειδάση και οι πρωτεόζες-πεπτόνες. Η λακτοφερίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στους μεταφορείς σιδήρου της οικογένειας των τρανσφερινών και έχει MB 80000 Da. Η λακτοφερίνη θεωρείται ως πολυλειτουργική πρωτεΐνη καθώς φαίνεται ότι έχει διάφορους βιολογικούς ρόλους. Εξαιτίας της ικανότητάς της να δεσμεύει το σίδηρο, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου από το βλεννογόνο του εντέρου των θηλαζόντων βρεφών. Επίσης φαίνεται ότι έχει αντιβακτηριακή, αντιϊκή, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ανοσορυθμιστική δράση.

Η λακτοπεροξειδάση έχει αναγνωριστεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας στο γάλα, το σάλιο και τα δάκρυα. Πρόκειται για ένα φυσικό σύστημα άμυνας εναντίον των βακτηρίων μέσω της οξειδωσης τωνθειοκυανιούχων ιόντων (SCN-) από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τα τελευταία είναι και τα δύο παρόντα στα βιολογικά υγρά και μαζί με τη λακτοπεροξειδάση αποτελούν το σύστημα της λακτοπεροξειδάσης (LP-s). Το LP-s έχει αποδειχθεί βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό σε μία ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών, χωρίς να επιδρά στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα των μικροοργανισμών που το παράγουν. ([www.lactoferrinsearch.org](http://www.lactoferrinsearch.org))

Τεχνολογική σημασία πρωτεϊνών ορού.

Οι πρωτεΐνες ορού προσδίδουν λειτουργικές ιδιότητες στα τρόφιμα, στα οποία προστίθενται. Έχουν γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και πολλές φορές αντικαθιστούν τις πρωτεΐνες αυγού σε προϊόντα πχ ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας. Επίσης είναι ικανές να σχηματίσουν πηκτές (gel) έπειτα από θερμικές επεξεργασίες, τα οποία ποικίλουν σε άρωμα, σταθερότητα, σκληρότητα, ελαστικότητα κ.α. και οι ιδιότητές τους εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως το pH, την αναλογία πρωτεϊνών, την προσθήκη αλάτων κ.ά. (*Kinsella & Whitehead, 1990*). Για να αυξηθεί η χρήση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος χρειάζεται προσπάθεια για να βελτιωθεί η λειτουργικότητά τους, με την παρουσία άλλων συστατικών, όπως άμυλο και άλευρα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί πρώτα με τροποποίηση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος με μετουσίωση της σφαιρικής τους δομής ή με αποδιοργάνωση και ανασχηματισμό των πρωτεϊνών.

### 1.7 Λίπος γάλακτος και Λιπόλυση

Το λίπος είναι οργανωμένο με τη μορφή λιποσφαιρίων. Σ' αυτά οφείλεται το λευκό χρώμα του πλήρους γάλακτος. Τα χαρακτηριστικά του λίπους του γάλακτος είναι τα εξής:

- Η μεγάλη ποικιλία των λιπαρών οξέων (>250 είδη), τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Κυριαρχούν αυτά με 4-18 άτομα άνθρακα.
- Χαρακτηριστικό του λίπους του γάλακτος των μηρυκαστικών είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα (14-18% του λίπους). Ιδιαίτερα το βουτυρικό οξύ είναι το χαρακτηριστικό του γάλακτος των μηρυκαστικών και δεν υπάρχει σε άλλο φυσικό λίπος.
- Η αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι υψηλή, περίπου 63% του λίπους του γάλακτος αποτελείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα.
- Το ελαϊκό οξύ είναι το 70 % των ακόρεστων λιπαρών οξέων του γάλακτος. Τα άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα διαφέρουν ως προς τον αριθμό ατόμων C, τη θέση και τη διαμόρφωση διπλών δεσμών (περίπου 5% όλων των διπλών δεσμών είναι trans).
- Τα τριγλυκερίδια του λίπους του γάλακτος υδρολύονται ενζυμικά με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Όταν στα ελεύθερα λιπαρά οξέα κυριαρχούν τα μικρού M.W. - κυρίως βουτυρικό και καπροϊκό - δημιουργούνται δυσάρεστες ταγγές γεύσεις.

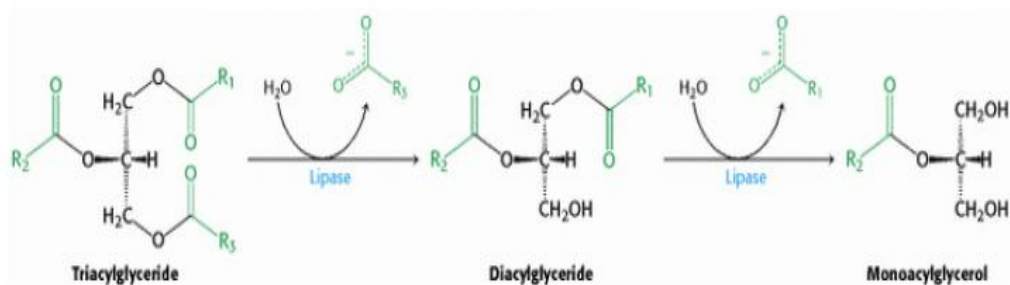
Κατά την ωρίμανση των τυριών, μία από τις σπουδαιότερες διαδικασίες είναι η λιπόλυση. Κατά τη λιπόλυση, απελευθερώνονται λιπαρά οξέα από τα τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, και μονογλυκερίδια του γάλακτος. Τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν συμμετέχουν αυτούσια στο άρωμα των ζυμούμενων προϊόντων είτε αφού μετατραπούν σε μεθυλοκετόνες και θειοεστέρες ενώσεις που πάλι συμβάλλουν στη διαμόρφωση αρώματος. Προϊόντα διάσπασης των τριγλυκεριδίων (όπως δ-κετοοξέα, δ-υδροοξέα, λακτόνες) διαμορφώνουν παρομοίως το άρωμα του τυριού. Ανάμεσα στην ανάπτυξη επιθυμητού αρώματος και την ανάπτυξη ταγγής γεύσης -ως αποτέλεσμα υπέρμετρης λιπόλυσης-υπάρχει μία λεπτή γραμμή (*Collins et al. 2003*).

Τα λιπολυτικά ένζυμα των LAB χωρίζονται σε εστεράσες (υδρολύουν αλυσίδες μεταξύ 2-8 ατόμων άνθρακα) και λιπάσες (υδρολύουν εστέρες με αλυσίδες 10 ή περισσότερων ατόμων άνθρακα). Τα λιπολυτικά ένζυμα είναι εξειδικευμένα πάνω στους εξωτερικούς εστερικούς δεσμούς των τρι- ή διγλυκεριδίων. Αρχικά τα τριγλυκερίδια υδρολύονται προς 1,2- και 2,3- διγλυκερίδια και στη συνέχεια προς 2-μονογλυκερίδια. Το βουτυρικό οξύ βρίσκεται στη θέση sn-3 και είναι αυτό που απελευθερώνεται αρχικά από τα ένζυμα αυτά (*Collins et al. 2003*).

Το βουτυρικό οξύ παράγεται από την αναγωγή του β-υδροξυ-βουτυρικού οξέος, το οποίο συντίθεται από τις διαιτητικές ίνες της τροφής του ζώου με τη δράση των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας κι έτσι η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος δεν είναι ίδια για κάθε γάλα. Το βουτυρικό οξύ (C4:0) έχει συνδεθεί με την τάγγιση του γάλακτος. Εκεί οφείλεται και η οσμή βουτύρου όταν αλλοιώνεται το γάλα. Η παρουσία βουτυρικού οξέος στην θέση 1 ενός τριγλυκεριδίου μπαίνει πρώτο για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης (να μπορεί να ακυλωθεί εύκολα) και κατά την υδρόλυση πάλι φεύγει πρώτο (υδρολυτική τάγγιση). Οι κυριότεροι λιπολυτικοί παράγοντες που επιδρούν κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών περιλαμβάνουν:

- Τις λιπάσες που παράγονται από τα ψυχρότροφα βακτήρια. Οι βακτηριακές λιπάσες (λιπολυτικά ένζυμα) υδρολύουν το λίπος του γάλακτος και απελευθερώνουν μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα (βουτυρικό, καπροϊκό οξύ). Τα λιπολυτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα σε μεγάλο βαθμό για τη αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων.
- Τις ενδογενείς λιπάσες είτε της αρχικής μικροχλωρίδας είτε την εναρκτήρια καλλιέργεια που προστίθεται.

Οι λιπάσες-εστεράσες των LAB φαίνεται ότι είναι αποκλειστικά ενδοκυτταρικές και ενδεχομένως απαιτείται η λύση των κυττάρων για την απελευθέρωση και δράση των ενζύμων στη μάζα του τυριού. Έχει αποδειχθεί ότι οι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκλιοι που χρησιμοποιούνται (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum*) τα οποία κυριαρχούν στην NSLAB χλωρίδα είναι ελάχιστα λιπολυτικά (Weeney & Ousa 2000)



Εικόνα 3: Υδρόλυση τριγλυκεριδίων από τις λιπάσες

Πίνακας 3: Κύρια λιπολυτικά βακτήρια στο γάλα

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ	ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΔΡΑΣΗ
<b>ΛΙΠΟΛΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>				
<i>Achromobacter lipids</i>	Λιπαρά	Χαμηλές Θερμοκρασίες	Λιπαρά οξέα, Γλυκερίνη	Δυσάρεστη οσμή και γεύση στο γάλα και τα προϊόντα του
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	Λιπαρά	>>	>>	>>
<i>Pseudomonas fragi</i>	Λιπαρά	>>	>>	>>

Τα λιπολυτικά βακτήρια μέσω λιπολυτικών ενζύμων υδρολύουν τα λιπίδια του γάλακτος με παραγωγή γλυκερίνης και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Οι λιπάσες του γάλακτος δρουν με παρόμοιο τρόπο αλλά δεν προέρχονται από βακτήρια καθώς περιέχονται στα κανονικά συστατικά του γάλακτος.

Τα ψυχρότροφα βακτήρια με τις θερμοανθεκτικές εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες και λιπάσες που παράγουν είναι η κυριότερη αιτία αλλοίωσης νεπού γάλακτος και της παραγωγής χαμηλής ποιότητας γαλακτοκομικών προϊόντων.

## 1.8 Καταβολισμός κιτρικού οξέος

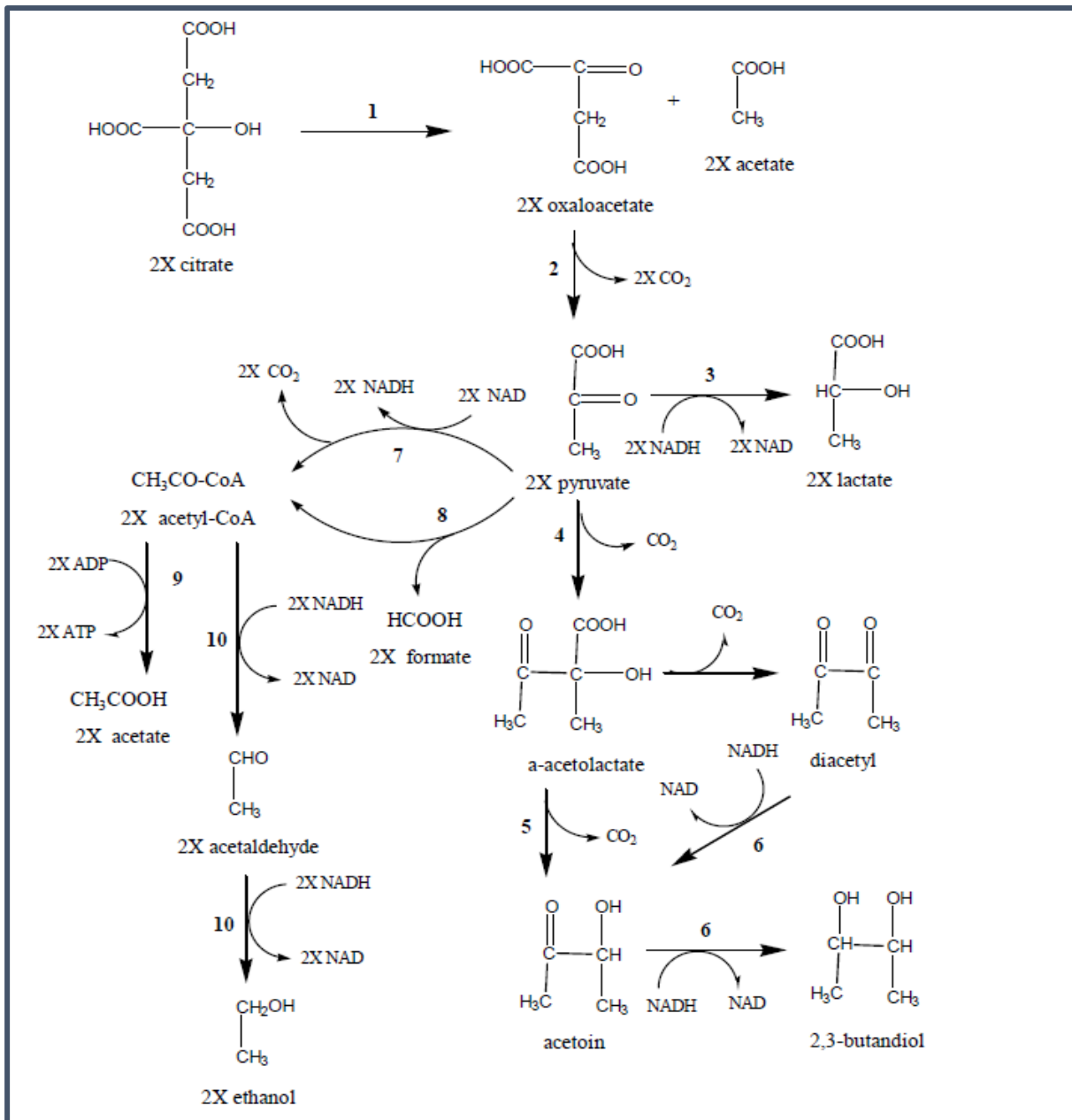
Το κιτρικό οξύ είναι ένα βασικό συστατικό του κύκλου του κιτρικού οξέος του κύκλου του Krebs, αλλά ως ελεύθερο οξύ υπάρχει σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα, κύτταρα κλπ. Στο γάλα έχουμε μικρές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος της τάξης των 10 mM, παίζει όμως σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τυροκομικών προϊόντων όπως στο βούτυρο.

Το κύριο προϊόν του καταβολισμού του κιτρικού οξέος είναι μία απλή καρβονυλική ένωση το διακετύλιο. Στο διακετύλιο οφείλεται η μυρωδιά του βουτύρου. Καταρχήν το κιτρικό οξύ πρέπει να μπει στο κύτταρο των LAB. Υπάρχει λοιπόν μία περμεάση την οποία διαθέτουν μόνο εκείνα τα LAB που μπορούν να καταβολίσουν το κιτρικό οξύ και αυτά συνήθως ανήκουν στο είδος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Αφού λοιπόν το κιτρικό οξύ μπει μέσα στο κύτταρο, υπάρχει ένα ένζυμο - κιτρική λυάση - που διασπά το κιτρικό οξύ σε οξαλοξικό και οξικό οξύ. Παρατηρούμε ότι από την πρώτη αντίδραση παράγονται μεταβολίτες, οι οποίοι διαμορφώνουν το άρωμα και τη γεύση. Το οξικό το είδαμε στα ετεροζυμωτικά βακτήρια ως ένα κύριο προϊόν δίπλα στο γαλακτικό, την αιθανόλη και το CO<sub>2</sub>. Το οξικό οξύ που είναι επιθυμητό για διαμόρφωση της γεύσης του τυριού εδώ το παίρνουμε από την 1<sup>η</sup> αντίδραση.

Το οξαλοξικό στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση δίνει το πυροσταφυλικό οξύ σημείο στο οποίο ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος συναντά τη γλυκόλυση, είτε με την κλασική της μορφή είτε μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Η φυσική πορεία του πυροσταφυλικού θα ήταν η αναγωγή του σε γαλακτικό οξύ μόνο που στην περίπτωση των μικροοργανισμών που καταβολίζουν το κιτρικό οξύ, το πυροσταφυλικό αυτό ακολουθεί άλλη πορεία.

Η κυρίαρχη αντίδραση: Το πυροσταφυλικό δίνει α-ακέτυλο-γαλακτικό οξύ το οποίο είτε αποκαρβοξυλιώνεται χημικά (χωρίς συμμετοχή ενζύμων) σε διακετύλιο είτε αποκαρβοξυλιώνεται ενζυμικά δίνοντας ακετοΐνη (που στην ουσία πρόκειται για ανηγμένο διακετύλιο). Η αντίδραση μεταξύ διακετυλίου και ακετοΐνης μπορεί να γίνει και ενζυμικά δηλαδή η ακετοΐνη να παραχθεί με ενζυμική αναγωγή διακετυλίου ή με την αποκαρβοξυλίωση του α-ακέτυλο γαλακτικού. Το ίδιο ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση μπορεί να καταλύσει και την περαιτέρω αναγωγή της ακετοΐνης σε 2,3 βουτανοδιόλη.

Εκτός της κύριας αντίδρασης υπάρχουν και παράλληλα μονοπάτια. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μας δώσει ακέτυλο-CoA. Το ακέτυλο-CoA είτε θα δώσει οξικό οξύ είτε θα αναχθεί σε ακεταλδεΐδη κι έπειτα σε αιθανόλη. Έχουμε επομένως τις ίδιες ενώσεις, τα ίδια τελικά προϊόντα που είχαμε στο ετεροζυμωτικό καταβολισμό των υδατανθράκων.



Εικόνα 4: Καταβολισμός Κιτρικού οξέος από Οξυγαλακτικά Βακτήρια

## 1.9 Βακτηριοσίνες

Ένας μεγάλος αριθμός από θετικά (+) και αρνητικά (-) κατά Gram βακτήρια παράγουν - κατά την ανάπτυξή τους - ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως (είτε πρωτεΐνες, είτε πεπτίδια) οι οποίες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και ονομάζονται βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν στα αντιβιοτικά όμως κάτι τέτοιο δε συμβαίνει και ο λόγος αναλύεται παρακάτω. Η μεγαλύτερη διαφορά τους είναι ότι οι βακτηριοσίνες δρουν έναντι των φυλογενετικά συγγενών και ένα στέλεχος που παράγει βακτηριοσίνη έχει ανοσία απέναντι σε αυτήν. Τα αντιβιοτικά από την άλλη, έχουν ένα πιο ευρύ φάσμα και ακόμα κι αν η δράση τους περιορίζεται πάραυτα δεν φαίνεται να έχουν προτίμηση στα είδη που προκάλεσαν την παραγωγή τους. Επιπλέον οι βακτηριοσίνες συντίθενται ριβοσωμικά και παράγονται κατά την πρώτη φάση ανάπτυξης (primary phase of growth) ενώ τα αντιβιοτικά συνήθως είναι δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι βακτηριοσίνες έχουν συνήθως μικρό μοριακό, υφίστανται μετά-μεταφραστική τροποποίηση και μπορούν εύκολα ορισμένες να υδρολυθούν με πρωτεολυτικά ένζυμα ειδικά από τις πρωτεάσες του γαστρεντερικού σωλήνα των θηλαστικών γεγονός που τα καθιστά ασφαλή για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Ανάμεσα στα (+) κατά Gram βακτήρια, τα LAB έχουν κερδίσει περισσότερη προσοχή σήμερα λόγω της παραγωγής των βακτηριοσινών. Αυτές οι ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά-βιοκτόνα. Ως αντιμικροβιακή ουσία η νισίνη παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων αντιμικροβιακών ουσιών: 1) είναι μία ουσία ευρέως αναγνωρισμένη ως ασφαλής <<GRAS>> ([Federal Register, 1982](#)), 2) είναι σταθερή σε συνθήκες κατάψυξης και θερμικής επεξεργασίας και 3) είναι ενεργή σε συνθήκες χαμηλού pH. Η εφαρμογή των αντιμικροβιακών συστατικών ως φυσικό εμπόδιο έναντι βακτηριακών παθογόνων και βακτηριακά αλλοιωγόνων μικροοργανισμών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική.



Πίνακας 4: Σύγχρονες εφαρμογές των βακτηριοσυνών -παραγόμενων από LAB

<b>Είδος/Υποείδος</b>	<b>Κύριες χρήσεις στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα</b>	<b>Βιβλιογραφικές Αναφορές</b>
<i>Lactococcus</i> <i>Lc. lactis subsp. lactis</i>	Μεσόφιλη καλλιέργεια που χρησιμοποιείται σε πολλά είδη τυριού, βουτύρου και βουτυρογάλακτος	<a href="#">Broome et al. (2003)</a>
<i>Lc. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i>	Χρησιμοποιείται στο τυρί Gouda, κρέμα-γάλακτος, βουτυρόγαλα και βούτυρο γαλακτικού.	<a href="#">Wouters et al. (2002)</a> <a href="#">Leroy and Vuyst (2004)</a>
<i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i>	Μεσόφιλη καλλιέργεια που χρησιμοποιείται σε πολλά είδη τυριού, βουτύρου και βουτυρογάλακτος	<a href="#">Weerkman et al. (1996)</a>
<i>Streptococcus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Θερμόφιλη καλλιέργεια που χρησιμοποιείται στο γιαούρτι και πολλά είδη τυριών κυρίως σκληρών και ημίσκληρων	<a href="#">Broome et al. (2003)</a>
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>	Προβιοτική φεπιπρόσθετη καλλιέργεια που χρησιμοποιείται στο τυρί και το γιαούρτι.	<a href="#">Briggler-Marco et al (2007)</a>
<i>Lb. delbrueckii subsp. Bularicus</i>	Θερμόφιλη καλλιέργεια για γιαούρτι και πολλά είδη τυριών κυρίως σκληρών και ημίσκληρων που προορίζονται για μαγείρεμα.	<a href="#">Slaterry et al. (2010)</a>
<i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i>	Χρησιμοποιείται σε ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος και τυριά για μαγείρεμα.	<a href="#">Broome et al. (2003) &amp; Giraffa 2009</a>
<i>Lb. helveticus</i>	Θερμόφιλη καλλιέργεια για ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος και πολλά είδη τυριών κυρίως σκληρών και ημίσκληρων που προορίζονται για μαγείρεμα.	<a href="#">Griffiths and Telez (2013)</a>
<i>Lb. casei</i>	Χρησιμοποιείται ως επιπρόσθετη καλλιέργεια σε προβιοτικά γάλατα	<a href="#">Kongo (2013)</a>

	και τη διαδικασία ωρίμασης τυριών.	
<i>Lb. plantarum</i>	Ως επιπρόσθετη καλλιέργεια στην ωρίμαση τυριών.	Leroy and De Vuyst (2004)
<i>Lb. rhamnosus</i>	Επιπρόσθετη προβιοτική καλλιέργεια στα τυριά.	Copolla et al. (2005)
Leuconostoc		
<i>Ln. mesenteroides subsp. cremoris</i>	Μεσόφιλη καλλιέργεια η οποία χρησιμοποιείται στην δημιουργία τυριών Edam, Gouda, φρέσκο τυρί, lactic butter (βούτυρο το οποίο επιτρέπει στο γάλα να <<εκουραστεί>> για αρκετές μέρες γεγονός που ευνοεί το σχηματισμό γαλακτικού οξέος καθώς το γάλα ζυμώνεται και δίνει ένα προϊόν παρόμοιο με το γιαούρτι το οποίο στη συνέχεια μπορεί να δώσει βούτυρο) και κρέμα γάλακτος.	Slaterry et al. (2010)

### 1.10 Διαφορές μεταξύ αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος

Το πρόβειο και το αίγειο γάλα χρησιμοποιούνται στη χώρα μας, σχεδόν στο σύνολό τους, για τυροκόμηση. Κατά συνέπεια οι καζεΐνες τους, που αποτελούν το σκελετό όλων των τυριών, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα δύο είδη γάλακτος παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην καζεΐνοπεριεκτικότητά τους από το αγελαδινό. Πέραν των ποσοτικών, οι καζεΐνες παρουσιάζουν και ποιοτικές διαφορές.

Και στα τρία είδη υπάρχουν 4 κύρια καζεϊνικά κλάσματα τα οποία χαρακτηρίζονται ως  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνες ανάλογα με την ταχύτητα που κινούνται κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Όμως η ταχύτητα κίνησης των αντίστοιχων κλασμάτων είναι διαφορετική. Τις μεγαλύτερες διαφορές παρουσιάζει το αγελαδινό γάλα, τα καζεϊνικά κλάσματα του οποίου, κυρίως η  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη, κινούνται ταχύτερα των αντίστοιχων του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος. Μεταξύ των δύο τελευταίων οι διαφορές είναι πολύ μικρές και συχνά δυσδιάκριτες.

Πέραν αυτών και η δομή των μορίων των καζεϊνικών κλασμάτων τους διαφέρει. Περιέχουν διαφορετικό αριθμό αμινοξέων στο μόριό τους, ενώ και η πρωτοταγής δομή τους εμφανίζει διαφορές στην αλληλουχία τους. Η καζεΐνη υπάρχει στο πρόβειο και αίγιο γάλα, όπως και στο αγελαδινό σε μορφή μικκυλίων παρόμοιας δομής όμως οι διαστάσεις τους είναι διαφορετικές. Αυτά του αίγιου γάλακτος είναι μεγαλύτερα -255 nm- έναντι 196 nm και 175 nm του πρόβειου και του αγελαδινού αντίστοιχα. Διαφορές παρατηρούνται και στη δομή των μικκυλίων τους, στο βαθμό ενυδάτωσής τους και στην περιεκτικότητά τους σε ανόργανα συστατικά. Στα μικύλλια των καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος υπερέχει το άθροισμα των  $\alpha_{s1}$ -και  $\alpha_{s2}$ - καζεϊνών, ενώ σε αυτά του πρόβειου και αίγιου γάλακτος το άθροισμα των  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεϊνών (Alexandraki,2009).

Το αίγιο γάλα υστερεί σε τυροκομικές ιδιότητες σε σύγκριση με το αγελαδινό. Δίνει μικρότερη απόδοση σε τυρί διότι το τυρόπηγμά του είναι λιγότερο συνεκτικό και έχει τη τάση να θρυμματίζεται και να δημιουργεί μικρά τεμαχίδια τα οποία χάνονται στο τυρόγαλα (Anyfantaksi, 2004). Η απώλεια πρωτεΐνης από το πήγμα αίγιου γάλακτος επηρεάζεται σημαντικά από τη λιποπεριεκτικότητα. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Tsigros et al. (2003) παρατηρήθηκε ότι η σκληρή υφή του τυριού σχετίζεται με την αύξηση του ποσοστού αίγιου γάλακτος. Επιπλέον το αίγιο γάλα στραγγίζει περισσότερο από το αγελαδινό με αποτέλεσμα να δίνει τυριά με μικρότερη υγρασία. Τα παραπάνω εξηγούν και το γεγονός χρήσης του αίγιου γάλακτος στην παρασκευή τυριών στα οποία η πήξη επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο τη δράση μικροοργανισμών. Η οξίνιση στο αίγιο γάλα και η πτώση του pH εξελίσσονται με ταχύτερο ρυθμό, το πήγμα που λαμβάνεται στραγγίζει λιγότερο, έχει μεγαλύτερο ιξώδες (Anyfantakis, 2004).

#### 1.10.1 Καρίκι

Το Καρίκι που παράγεται στην Τήνο από μη παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, ωριμάζει μέσα στο φλασκι (νεροκολοκύθα) και αποκτά μία γεύση πλούσια η οποία εντείνεται με παλαιώση που θυμίζει τυριά όπως το Stilton ή το Roquefort. Καρίκι σημαίνει τυράκι που ωριμάζει μέσα σε κολοκύθα. Για την παραγωγή του χρησιμοποιείται πέτρωμα που έχει αλεσθεί στη μηχανή του κιμά και έχει ζυμωθεί με αλάτι. Το ζυμωμένο πέτρωμα πιέζεται ώσπου να βγει ο αέρας και φυλάσσεται μέσα σε ξερή νεροκολοκύθα όπου και ωριμάζει. Για την παρασκευή του φυτεύονται κολοκύθες οι οποίες αφού ξεραθούν οι οποίες αφού ξεραθούν κόβονται οριζόντια, αδειάζονται στο εσωτερικό, γεμίζονται μέχρι τη μέση με το αλεσμένο πέτρωμα και σφραγίζονται με αλευρόκολλα. Τοποθετούνται λοιπόν στρώσεις από τυρί με χοντρό αλάτι, το πιέζουν να φύγει ο αέρας και το κλείνουν ερμητικά κλειστά με τη χρήση κολλητικής ταινίας για μεγαλύτερη απομόνωση του προϊόντος από το εξωτερικό περιβάλλον, η οποία δείχνει και την ημερομηνία παραγωγής του. Εκεί λοιπόν το τυρί μένει για 5 μήνες στους 0-4 °C. ([www.metomati.gr](http://www.metomati.gr))



Εικόνα 5 : Το πέτρωμα περάσει στη μηχανή



τεμαχίζεται για να του κιμά



Εικόνα 6: Το πέτρωμα στη μηχανή του κιμά

Εικόνα 7: Καρίκι

### 1.10.2 Γκερεμέζι

Το Γκερεμέζι είναι ένα παραδοσιακό τυροκομικό προϊόν που παρασκευάζεται στην Αίγινα και χαρακτηρίζεται για την μαλακή υφή (σαν αλοιφή) και όξινη γεύση του – προέρχεται από αίγαιο ή πρόβειο γάλα το οποίο βράζεται τοποθετείται σε τσαντίλα (βαμβακερό ύφασμα κατάλληλο για επαφή με τρόφιμα που συνηθίζεται στην παρασκευή παραδοσιακών τυροκομικών προϊόντων) και εκεί παραπμένει για 4-5 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η τσαντίλα συμπιέζεται και με αυτόν τον τρόπο χάνει μεγάλο μέρος της υγρασίας .



Εικόνα 8: Γκερεμέζι

### 1.11 Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν φυσικοχημική και μικροβιολογική απεικόνιση και η απομόνωση και ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων από παραδοσιακά τυριά Γκερεμέζι (Αίγινα) και Καρίκι (Τήνος) .

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Δείγματα Τυριών

1. **Καρίκι:** Το τυρί ζύγιζε 870 gr εκ των οποίων τα 178 gr η νεροκολοκύθα και τα 692gr το τυρί.
2. **Γκερεμέζι:** Από το τυρί αυτό πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των στελεχών που είχαν απομονωθεί σε προηγούμενη πειραματική μελέτη.

## 2.2 Καταμέτρηση πληθυσμών και απομόνωση LAB

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

Πίνακας 5: Αντιστοιχία θρεπτικού υποστρώματος με μικροοργανισμούς και συνθήκες επώασης

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ (h)	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ °C	ΤΕΧΝΙΚΗ
PCA (Plate Count Agar), (Biokar, France)	ΟΜΧ	96	30 μικροαερόφιλα	Επιφανειακή εξάπλωση
	Ψυχρότροφα βακτήρια	240	7 αερόβια (προαιρετικά αναερόβια)	Επιφανειακή εξάπλωση
YGC (Yeast Glycose Chloramphenicol Agar), (Merck, Germany)	Ζύμες-Μύκητες	72	25 αερόβια	Επιφανειακή εξάπλωση
KAA (Kahamycin Asculin-Azid-Agar), (Merck, Germany)	Εντερόκοκκοι	24	37 αναερόβια	Επιφανειακή εξάπλωση
CFC (Cephaloridine Fucidin cetrinide agar) + (CFC additive - 2ml/500ml διαλύματος, (Merck, Germany)	Ψευδομονάδες	48	30 αερόβια (προαιρετικά αναερόβια)	Επιφανειακή εξάπλωση
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar) + Raparort Vasiliadis. Βάζω τα σωληνάκια στους 37°C overnight και την επόμενη μέρα εμβολιάζω τα XLD τρυβλία	Σαλμονέλα	(βλ πρωτόκολλο)		Επιφανειακή εξάπλωση
PCA +10% reconstituted skim milk	Πρωτεολυτικά βακτήρια	48	30 αερόβια	Επιφανειακή εξάπλωση
MSA (Mannitol Salt Agar), (LabM, UK)	Gram (+) βακτήρια (πχ Staphylococcus, Micrococcaceae)	48	30 αναερόβια	Ενσωμάτωση
SPS (Sulphite Polymyxin Sulphadiazine)	Κλωστρίδια	48	37 αναερόβια	Ενσωμάτωση (διπλή στρώση θρεπτικού μέσου )



MRS broth (De Man-Rogosa and Sharpe), (Biokar, France)	Θερμόφιλοι Λακτοβάκιλλοι	48	42 αναερόβια	Ενσωμάτωση (διπλή στρώση θρεπτικού μέσου )
	Μεσόφιλοι Λακτοβάκιλλοι	48	22 αναερόβια	
M17, (Biokar, France)	Θερμόφιλοι Στρεπτόκοκκοι	48	42 αερόβια	Επιφανειακή εξάπλωση
	Μεσόφιλοι Στρεπτόκοκκοι	48	22 αερόβια	Επιφανειακή εξάπλωση
VRBA (Violet Red Bile Broth), (LabM, UK)	Κολοβακτηρίδια (Coliforms)	48	30 αναερόβια	Ενσωμάτωση (διπλή στρώση θρεπτικού μέσου )
Rogosa	Λακτοβάκιλλοι (NSLAB)	120	30 αναερόβια	Ενσωμάτωση (διπλή στρώση θρεπτικού μέσου )
PCA-tributirin(1%)-arabic gum(1%)	Λιπολυτικά βακτήρια	72	30 αερόβια (προαιρετικά αναερόβια)	Επιφανειακή εξάπλωση

Το ιδιαίτερο πρωτόκολλο που ακολουθείται για την *Salmonella*. περιγράφεται παρακάτω:

1. Ζυγίζονται 10 g δείγματος και 90 ml Peptone water(20 g/l για εμπλουτισμό του υποστρώματος).
2. Επωάζονται στους 37 °C για 16-19 ώρες.
3. Εμβολιάζονται 100 μl από το προηγούμενο μείγμα σε Rappaport-Vassiliadis broth και επωάζονται στους 42 °C overnight.
4. Γίνεται επιφανειακή εξάπλωση 100 μl από το Rappaport σε τρυβλία XLD και επωάζονται στους 37 °C overnight.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την *Listeria monocytogenes* είναι το περιγράφεται παρακάτω:

1. Ζυγίζονται 10 g δείγματος και 90 ml Peptone water(20g/l για εμπλουτισμό του υποστρώματος).
2. Επωάζονται στους 37 °C για 16-19 ώρες.
3. Πραγματοποιούνται αραιώσεις με Ringer.
4. Γίνεται εξάπλωση 100 μl σε τρυβλία ALOA και επωάζονται στους 37 °C για 2 μέρες.

Έπειτα από την απομόνωση των αποικιών πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική εξέταση όλων των αποικιών με στερεοσκόπιο. Από κάθε επιλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, επιλέχθηκαν 10 αποικίες με βάση τη διαφορετικότητα τη μορφολογία, το χρώμα, το μέγεθος και την υφή. Οι αποικίες παρατηρήθηκαν πρώτα γενικά και μετά σε σύγκριση με τις γειτονικές αποικίες, όσον αφορά στο μέγεθός τους (μικρές, μεγάλες), το χρώμα (λευκές, κρεμ, κίτρινες), το σχήμα (στρογγυλές, ωοειδείς, ακανόνιστης περιμέτρου), και τη γενικότερη μορφολογία, δηλαδή, στρογγυλές, λείες, γυαλιστερές, θολές, νηματοειδείς. Η διαδικασία του streaking επαναλήφθηκε όσες φορές ήταν απαραίτητο έτσι ώστε να υπάρχει ένα μόνο είδος αποικιών σε κάθε τρυβλίο. Σε όλες τις απομονώσεις πραγματοποιήθηκε χρώση Gram, και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

### 2.3 Χρώση Gram

Με έναν αποστειρωμένο κρίκο λήφθηκε τμήμα από την φρέσκια καλλιέργεια και τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Το παρασκεύασμα στερεώθηκε περνώντας την αντικειμενοφόρο πάνω από φλόγα. Στη συνέχεια χρωματίστηκε με Crystal Violet (Merck, Germany) για 1 min. Το παρασκεύασμα ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό, προστέθηκε Lugol (Merck, Germany), αφέθηκε για 1 min και ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποχρωματισμός με αλκοόλη 95% v/v και καλό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια το παρασκεύασμα χρωματίστηκε με διάλυμα σαφρανίνης (Merck, Germany) για 30 sec. Η χρώση ολοκληρώθηκε με πλύσιμο της πλάκας με απιονισμένο νερό και στέγνωμα σε κλίβανο στους 52°C. Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων με ελαιοκαταδυτικό φακό αφού πρώτα είχε προστεθεί μία σταγόνα ελαίου. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια φαίνονται στο οπτικό πεδίο χρωματισμένα μπλε, ενώ τα αρνητικά κατά Gram φαίνονται κόκκινα.

Μετά την μικροσκοπική παρατήρηση επιλέχθηκαν οι αποικίες για αποθήκευση σε πλαστικά φιαλίδια (vials) στους -80°C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 20% v/v γλυκερόλη.

## 2.4 Απομόνωση DNA

### 2.4.1 Απομόνωση DNA βακτηρίων

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου των *Pitcher et al (1989)*, το οποίο τροποποιήθηκε σε ορισμένα σημεία. Η μέθοδος αυτή έχει ως βάση τη χρήση θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GES) η οποία αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες κι έτσι απομονώνεται πιο εύκολα και πιο καθαρό το DNA. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Ανανέωση των κυττάρων (1% v/v εμβόλιο), με εμβολιασμό σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (5 ml) και επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης των κυττάρων (exponential phase).
- Μεταφορά 2ml καλλιέργειας σε μικροφιαλίδια τύπου erpendorf. Φυγοκέντρηση 10.000 rpm για 2 min στους 25°C με σκοπό τη συλλογή των κυττάρων.
  - Απόχυση του υπερκειμένου και επανειώρηση 1ml PBS(Phosphate Buffered Saline, pH=7.4. Θέρμανση στους 65°C για 10 min, με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Φυγοκέντρηση 10.000 rpm για 2 min στους 25°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και των σταγόνων με πιπέτα.
- Προσθήκη 100 μl λυσοζύμης στο ίζημα για λύση κυτταρικού τοιχώματος (50mg/mL, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) διαλυμένης σε TE buffer(10 mmol/L, Tris -HCL, 1mmol/L EDTA, pH=8), 10 μL mutanolisin-για λύση κυτταρικού τοιχώματος (5 U/μL, Sigma-Aldrich) και 10 μL RNA-ase για πέψη του υπολειμματικού RNA (Sigma-Aldrich).
- Επώαση στους 37°C για 30min με περιοδική ήπια ανάδευση των erpendorf.
- Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό για περαιτέρω επεξεργασία.
- Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος GES (5μM/L Guanidium thiocyanate(lot 564580 Macherey-Nagel GmbH & Co), 0.5 mol/L EDTA , 5%v/v Sarcosyl) και ήπια ανάδευση. Ψύξη σε πάγο για 5 min.
- Προσθήκη 0,25 ml οξικού αμμωνίου (7.5 mol/L), ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10min.
- Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου και έντονη ανάδευση των δειγμάτων, ώστε να αναμιχθούν οι δύο φάσεις.
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 15min στους 4°C. Παρατηρείται διαχωρισμός 3 φάσεων στο δείγμα. Φάσεις: Η πάνω φάση (DNA), η μεσαία φάση (πρωτεΐνες) και η κάτω φάση (οργανική). Αν ο διαχωρισμός δεν είναι εμφανής, η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

- Μεταφορά της πάνω φάσης(DNA) σε νέο eppendorf των 1.5 ml αποφεύγοντας τη μεσόφαση.
- Προσθήκη 0.54% v/v (του όγκου του κάθε δείγματος) ισοπροπανόλης (-20 °C) και ήπια ανάδευση έως ότου κατακρημνιστεί το DNA.
- Φυγοκέντρωση 7.000 rpm για 3min στους 4°C και απόχυση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 0.7 ml αιθανόλης (70% v/v) και ανάδευση για απομάκρυνση των αλάτων από το DNA. Φυγοκέντρωση 8.000 rpm για 1 min στους 4°C και απόχυση του υπερκειμένου. Επανάληψη 3 φορές.
- Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρωση και απόχυση. Πλήρης απομάκρυνση των σταγόνων με πιπέτα και τοποθέτηση eppendorf σε κλίβανο των 37°C για πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης για 2-3min το μέγιστο ώστε να μην στεγνώσει το ίζημα.
- Διαλυτοποίηση του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (40-60  $\mu$ L)( 10 mmol/L Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA, pH=8). Η ποσότητα του TE εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος-εμπειρικά (όσο πιο λίγο το ίζημα, τόσο πιο μικρή η ποσότητα του TE).
- Αποθήκευση των eppendorf στους 4°C .

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση στο φωτόμετρο Quawell Q5000 (Quawell Technology Inc, San Jose, CA, USA). Μετρήθηκε η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων των δειγμάτων και με χρήση του Προγράμματος ND-1000.33 κατέστη δυνατή η απεικόνιση των δεδομένων σε υπολογιστή. Δύο  $\mu$ l δείγματος τοποθετήθηκαν στη συσκευή στην οποία μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση (Optical Density) του DNA κάθε δείγματος. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε μηδενισμός του φωτόμετρου με 2 $\mu$ l διαλύματος TE ( 10 mmol/L Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA, pH=8) καθώς επίσης και κάθε 30 min συνεχούς χρήσης της συσκευής. Η φωτομέτρηση DNA πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 260 nm και αυτόματα στο excel-στο οποίο παρουσιάστηκαν τα δεδομένα- έγινε η μετατροπή σε ng/ $\mu$ L. Ταυτόχρονα τα δείγματα μετρήθηκαν στα 280 nm (έλεγχος περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες) και στα 230 nm (έλεγχος περιεκτικότητας σακχάρων). Παράλληλα έγινε εκτίμηση και η καθαρότητα του DNA κάθε δείγματος μέσω του λόγου των οπτικών απορροφήσεων 260 nm/280nm καθώς και 260 nm/230nm. Στην πρώτη περίπτωση εκφράζεται η καθαρότητα του δείγματος DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ή φαινόλης. Όταν ο λόγος βρίσκεται μεταξύ 1,8 και 2 το δείγμα θεωρείται καθαρό. Όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1,8 είναι πιθανό να υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης στο δείγμα.

Στη δεύτερη περίπτωση εκφράζεται η καθαρότητα του δείγματος από προσμίξεις σακχάρων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας από σάκχαρα ο λόγος είναι μεταξύ 1,8 και 2 ενώ μικρότερες τιμές από 1,8 υποδεικνύουν παρουσία σακχάρων ή EDTA. Αφού φωτομετρήθηκαν τα δείγματα, ορισμένα έπρεπε να αραιωθούν με διάλυμα TE (και τοποθέτηση σε νέα erpendorf) ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση του καθενός να είναι κοντά στα 25 ng/μL-απαραίτητη συγκέντρωση για την μέθοδο ger-PCR που ακολούθησε.

#### 2.4.2 Απομόνωση DNA ζυμών

Η απομόνωση του DNA ζυμών έγινε βάσει του πρωτοκόλλου των *Kopsahelis et al. (2009)*, το οποίο τροποποιήθηκε σε ορισμένα σημεία. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Ανανέωση των κυττάρων (1% v/v εμ-βόλιο), με εμβολιασμό σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (5 ml) και επώαση για περίπου 24 ώρες στους 25°C μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης των κυττάρων (exponential phase).
- Μεταφορά 2 ml καλλιέργειας σε μικροφιαλίδια τύπου erpendorf. Έπειτα, φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 2 min στους 20°C με σκοπό τη συλλογή των κυττάρων. Επανάληψη σταδίου μέχρι να φυγοκεντρηθούν τα 5ml.
- Απόχυση του υπερκειμένου και έκπλυση των κυττάρων με 1 ml αποστειρωμένου νερού (water for injection). Επανάληψη βήματος με 0.5 ml Water for injection. Θέρμανση στους 65°C για 10 min, με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 10 min
- στους 25°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και των σταγόνων με πιπέτα.
- Επαναίωση των κυττάρων με 0.5 ml διαλύματος (1M sorbitol -0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 7.5).
- Προσθήκη 20 μl λυτικάσης 200U (1000U/μl, Sigma -Aldrich) στο ίζημα για λύση κυτταρικού τοιχώματος και επώαση 2 ώρες στους 37°C με περιοδική ήπια ανάδευση των erpendorf.
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 5 min στους 25°C.
- Επαναίωση του ιζήματος με 0.5 ml (50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 20mM EDTA και 50μl (20 % SDS.
- Επώαση στους 65°C για 30 min.
- Προσθήκη 0.2 ml ammonium acetate (7.5 mol/L)
- Τοποθέτηση δειγμάτων στον πάγο για 1 ώρα.
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 10min στους 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erpendorf.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (-20°C) και ήπια ανάδευση έως ότου κατακρημνιστεί το DNA. Τοποθέτηση στον πάγο για 5 min.



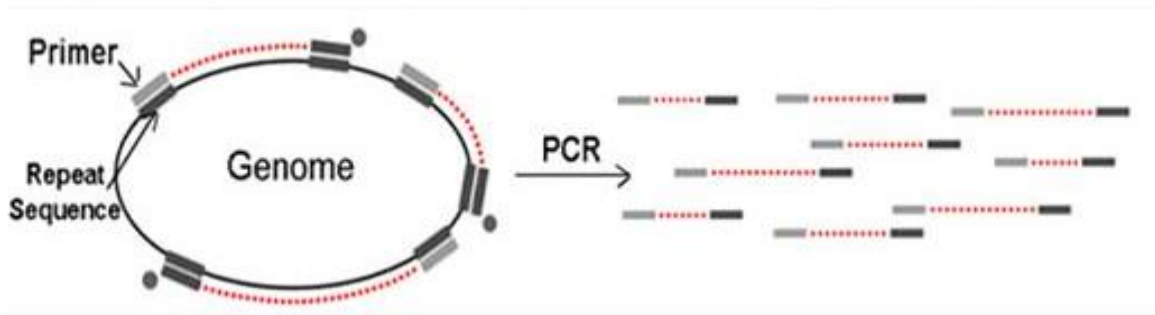
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm για 20min στους 4°C και απόχυση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 0.7 ml αιθανόλης (70% v/v) και ανάδευση για απομάκρυνση των αλάτων από το DNA.
- Φυγοκέντρηση 8.000 rpm για 2 min στους 4°C και απόχυση του υπερκειμένου. Επανάληψη 3 φορές.
- Απομάκρυνση της αιθανόλης με απόχυση. Πλήρης απομάκρυνση των σταγόνων με πιπέτα και τοποθέτηση erpendorf σε κλίβανο των 37°C για πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης για 2-3min το μέγιστο ώστε να μην στεγνώσει το ίζημα.
- Διαλυτοποίηση του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (40-60 μL)( 10 mmol/L Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA, pH=8). Η ποσότητα του TE εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος-εμπειρικά (όσο πιο λίγο το ίζημα, τόσο πιο μικρή η ποσότητα του TE).
- Αποθήκευση των erpendorf στους 4°C .

## 2.5 rep-PCR

### 2.5.1 rep-PCR

Στο DNA περιέχονται διασκορπισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (dispersed repetitive sequences) και στους δύο κλώνους του γενωμικού καθώς και του πλασμιδιακού DNA. Έτσι η μέθοδος της rep-PCR βασίζεται στην ενίσχυση των περιοχών αυτών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και τη χρήση ενός εκκινητή (primer) που έχει παλίνδρομη αλληλουχία, ο οποίος μπορεί να υβριδίζει και να ενισχύει διακριτές περιοχές του ευκαρυωτικού και του προκαρυωτικού γονιδιώματος. Η διαδικασία αυτή αναπαρίσταται στην Εικόνα 14. Αντίστοιχα αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR που βασίζονται στη χρήση ομώνυμων εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που ανευρίσκονται στο γονιδίωμα. Παρόλα αυτά ο όρος rep-PCR χρησιμοποιείται για να περιλάβει όλες τις παραπάνω μεθόδους (*Louws et al., 1999*). Η παραπάνω μεθοδολογία έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη, γρήγορη και με επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Η οικογένεια των εκκινητών REP έχει μήκος μεταξύ 30 και 40 bp, και δίνει 500 έως 1000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, δίνουν ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα (προφίλ), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τη διάκριση σε είδη, υποείδη και στελέχη. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό των οξυγαλακτικών στελεχών.



Εικόνα 9: Ενίσχυση διασκορπισμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών με τη τεχνική rep-PCR

Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στα πρότυπα γονιδιώματα των *Echerichia coli* και *Salmonella sp.* (Louws *et al.*, 1999).

### 2.5.2 Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο της rep-PCR

Για την ομαδοποίηση των στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα 2 δείγματα τυριών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της rep-PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Mohammed *et al.* (2009). Για όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler Gradient της εταιρείας Eppendorf (Hamburg, Germany). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια, ποσότητες και εκκινήτες rep-PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	12.5 $\mu$ l
DNA template (25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
BOXAIR (7,5 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l (5'-3' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG, Eurofins Genomics AT GmbH, Austria
ddH <sub>2</sub> O	10.5



Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

- 2min 92°C
- 30 κύκλοι
  - 30s 92°C
  - 2min 40°C
  - 3 min 72°C
- 3 min 72°C
- Παραμονή 10°C

Τα rep-PCR πραγματοποιήθηκαν με τον εκκινητή BOXAIR και το OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolands, UK). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για όλα τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν, με σταθερές ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις στον θερμικό κυκλοποιητή αναφέρονται παραπάνω.

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

Τα δείγματα DNA των ζυμών που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε ενίσχυση των τμημάτων του γενετικού υλικού μέσω rep-PCR στο θερμικό κυκλοποιητή Mastercycler Gradient της εταιρείας Eppendorf (Hamburg, Germany). Η ενίσχυση των ζυμών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Alves de Silva- Filho et al (2005) και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 7:Αντιδραστήρια ,ποσότητες και εκκινητές rep-PCR για ζύμες

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, USA)	12.5 μl
DNA template (50 ng/μl)	1 μl
Primer ((GTG) <sub>5</sub> (5 pmol/μl)	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	10.5

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

- 5 min 94°C
- 40 κύκλοι
  - 15 s 94°C
  - 45 s 55°C
  - 90 s 72°C
- 6 min 72°C
- Παραμονή στους 10°C

#### 2.5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό φορτισμένων μορίων σε διάλυμα μέσω της διαφορετικής κινητικότητας υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι το DNA - ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω της ύπαρξης φωσφορικών ομάδων κινείται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο αν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, η οποία αποτελεί έναν φυσικό πολυσακχαρίτη, είναι η πιο κλασική μέθοδος που ακολουθείται για το διαχωρισμό τμημάτων του DNA.

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

Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία παρασκευής της πηκτής και της φόρτωσης των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση:

- Διαλυτοποίηση της σκόνης αγαρόζης (Sigma, Taufkirchen, Germany) 1.2 % w/v στο ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (Running buffer ,40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.2) με θέρμανση και ανάδευση.
- Προσθήκη 6 μl EtBr 10mg/ml (Sigma, Taufkirchen, Germany) , πριν την πήξη της αγαρόζης και μεταφορά του διαλύματος σε κατάλληλο καλούπι προς στερεοποίηση.
- Τοποθέτηση πλαστικής <<χτένας>> κάθετα στο υγρό έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα φρεάτια - πηγαδάκια για την τοποθέτηση των διαφορετικών δειγμάτων DNA.
- Μετά την πήξη της αγαρόζης η πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE.
- Τα δείγματα φορτώθηκαν στα φρεάτια με χρήση πιπέτας . Στα δείγματα έχει προηγηθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer- 0.25 % w/v Bromophenol blue, 0.25 % w/v Xylene cyanol, 40% w/v glycerol) (Loading Buffer- NEB). Η ποσότητα στα δείγματα του *ger* PCR ήταν 18 μl, στο 16S ή ITS PCR μόνο 4 μl .
- Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κατάλληλου τροφοδοτικού, εφαρμόστηκε σταθερή τάση 60V για 140 min.
- Η πορεία της ηλεκτροφόρησης ήταν εμφανής χάρη στη χρωστική της βρωμοφαινόλης που περιέχει το διάλυμα φόρτωσης.
- Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται όταν περάσουν 140 min.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η εκάστοτε πηκτή φωτογραφήθηκε. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ήταν ορατά με τη χρήση της συσκευής High Performance Ultraviolet Transilluminator που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία. Τα τμήματα του DNA που ενισχύθηκαν έγιναν ορατά ως φωτεινές πορτοκαλί ζώνες λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου(το οποίο ενσωματώνεται στη διπλή έλικα του DNA ) όταν η πηκτή εκτεθεί σε UV ακτινοβολία.

Η συσκευή UV ήταν συνδεδεμένη με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι μέσω του ειδικού προγράμματος Doc-It(Ed. 2003, UVP, Inc.) ήταν εφικτή η αποθήκευση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.

### 2.5.5 Επεξεργασία εικόνων ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του Προγράμματος Bionumerics

Το πρόγραμμα BioNumerics 6 της εταιρείας Applied Maths συγκρίνει τις ζώνες των αγνώστων στελεχών σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακών μαζών (1 kB) και στηριζόμενο στην απόκλιση και τον αριθμό των ζωνών, δημιουργείται μία ομαδοποίηση παράλληλα με ποσοστά διαφοροποίησης ταυτοσημότητας (cut-off). Έτσι εξάγονται συμπεράσματα για τα πιθανώς όμοια στελέχη. Τα στελέχη αυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν και να επιλεγθούν ορισμένα για περαιτέρω ταυτοποίηση μέσω της ενίσχυσης και αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου για τα βακτήρια καθώς και της περιοχής ITS (Internal transcribed Spacer) για τις ζύμες για να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους.

## 2.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA και ITS αντίστοιχα

### 2.6.1 Ταυτοποίηση βακτηρίων

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

Η διαδικασία του 16S rRNA -PCR πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές 16S F(Forward) και 16S R(Reverse) (Eurofins Genomics AT GmbH, Austria) (*Ntougias et al., 2006*). Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Παρακάτω παρατίθενται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια, ποσότητες και εκκινητές 16S PCR για βακτήρια

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ /ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</b>
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer	25μl
DNA Template	200 ng
Primer 16S F (10 pmol/μl)	1μl
Primer 16S R (10 pmol/μl)	1μl
dH <sub>2</sub> O	μl
Total volume	50 μl
16S-F (νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'-3')	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG
16S-R (νουκλεοτιδική αλληλουχία 3'-5')	CCTCTCAATCTAGAACCGAGTC

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής:

- 2 min 94°C
- 30 κύκλοι
  - 30 s 94°C
  - 30 s 56°C
  - 80 s 72°C
- 5 min 72°C
- Παραμονή στους 10°C

Η επιτυχία της αντίδρασης και η καθαρότητα των δειγμάτων της PCR ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως ήδη περιεγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι ο χρόνος που διαχωρίστηκαν τα δείγματα στην πηκτή αγαρόζης ήταν 45 min.

Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων της PCR προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού βάρους και του ρυθμιστικού διαλύματος.

Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany) βάσει του πρωτοκόλλου που αναφέρεται παρακάτω:

- Προσθήκη όγκου 200 μl προσδετικού παράγοντα NTI (Binding Buffer -MN) σε κάθε 100 μl του προϊόντος της PCR
- Για την πρόσδεση του DNA, σε Eppendorf των 2 ml τοποθετήθηκε στήλη χαλαζία NucleoSpin Gel και PCR Clean-up. Φορτώθηκαν περίπου 700 μl και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 12,000 rpm για 1 min. Το υγρό που διαπέρασε τη στήλη απορρίφθηκε και το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.
- Για την έκπλυση της στήλης προστέθηκαν 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος Wash Buffer NT3, στο οποίο περιέχει αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 rpm για 1 min. Το υγρό που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται μετά τη φυγοκέντρηση.
- Προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και να στεγνώσει η στήλη, η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες.
- Για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, τα eppendorf παραμένουν για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Για να γίνει η έκλυση του DNA, η στήλη τοποθετείται σε νέο eppendorf του 1,5 ml και προστίθενται 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer NE). Έπειτα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 1 min.
- Το καθαρό πλέον προϊόν διατηρείται στους -20°C.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση DNA των δειγμάτων και ρυθμίστηκε σε περίπου 10 ng/μl, ώστε να είναι κατάλληλα για αλληλούχηση. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε από την Eurofins Genomics, Austria και η ταυτοποίηση των υπό μελέτη αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μηχανής αναζήτησης του BLAST(Basic Local Alignment Tool) από το NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Το BLAST χρησιμοποιήθηκε για ταυτοποίηση των στελεχών σύμφωνα με την ομοιότητά τους με τα ήδη ταυτοποιημένα στελέχη που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων που προαναφέρθηκε.

## 2.6.2 Ταυτοποίηση των ζυμών με αλληλούχηση της περιοχής ITS

Η περιοχή ITS (Internal Transcribed Spacer ) βρίσκεται μεταξύ των πολύ συντηρημένων γονιδίων που κωδικοποιούν τα 18S και 28S rRNA. Η ITS περιλαμβάνει τις δύο μη – κωδικές περιοχές ITS1 και ITS4 οι οποίες διαχωρίζονται από πολύ συντηρημένο 5,8S rRNA γονίδιο. Οι ITS1 και ITS2 είναι περισσότερο μεταβλητές από τις παρακείμενες αλληλουχίες γονιδίων (rRNA) κι έτσι υπόσχονται καλύτερο διαχωρισμό των στενά συγγενικών ειδών στις ζύμες.(Internal Transcribed Spacer Sequencing versus biochemical profiling for identification of Medically Important yeasts)

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια, ποσότητες και εκκινητές ITS-PCR για ζύμες

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ /ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer	25μl
DNA Template(200ng/μl)	2 μl
Primer ITS1(10 pmol/μl)	2 μl
Primer ITS4(10 pmol/μl)	2 μl
dH <sub>2</sub> O	19 μl
Total volume	50 μl
ITS1: 5'-3'	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4: 5'-3'	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής:

1 min 94°C

- 35 κύκλοι
- 2 min 55°C
- 2 min 55°C
- 2 min 72°C
- 10 min 72°C

Στη συνέχεια τα δείγματα προωθήθηκαν προς την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και εν συνεχεία στη φωτογράφιση της πηκτής όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα (Παρ 2.4)

Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων της PCR (Nucleospin gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany), μέτρηση της συγκέντρωσής τους, ρύθμιση στα 10 ng/μL και αλληλούχιση όπως αναφέρεται στην παράγραφο.

## 2.7 Φυσικοχημικές Αναλύσεις

### 2.7.1 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH αποσκοπούσε στον προσδιορισμό της ενεργού οξύτητας των δειγμάτων. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρικό pHμετρο (Mettler Toledo). Πριν την ανάλυση το τυρί ομογενοποιήθηκε με ισόποση ποσότητα απεσταγμένου νερού σε συσκευή Stomacher.

### 2.7.2 Ξηρά ουσία και Υγρασία

Ο προσδιορισμός της ξηράς ουσίας έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της FIL-IDF 58:1970 και τη μετέπειτα τροποποίησή του που περιγράφεται στο ISO 2920/IDF 085:2004. Η μέτρηση βασίστηκε στην αποξήρανση ποσότητας τυριού, μέχρι σταθερού βάρους. Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν πορσελάνινες κάψες με αλάτι ως μέσο ανάμειξης του τυριού, ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια του τυριού και να διευκολυνθεί η απομάκρυνση της υγρασίας. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις. Σε κάθε κάψα χρειάστηκε ένα μικρό γυάλινο ραβδάκι ανάδευσης και ποσότητας άλατος περίπου 30g. Όλες οι κάψες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως ξηραθεί σε κλίβανο θερμοκρασίας περί τους 105°C για 24 ώρες μέχρι σταθερού βάρους. Στη συνέχεια σε κάθε κάψα ζυγίστηκε και το βάρος της και αποτέλεσε απόβαρο που αντιστοίχισε στη μέτρηση (A), προστέθηκαν 3g τυριού και τελικά μετρήθηκε το μεικτό βάρος (B). Οι κάψες με το τυρί τοποθετήθηκαν στους 100 °C στον κλίβανο για να ξηραθούν για 24 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό μέτρηση (Γ).



Η ξηρά ουσία εκφράζεται σε ποσοστό % δείγματος με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Ξηρά Ουσία} = (Γ - Α) / (Β - Α)$$

Όπου :

A=απόβαρο κάψας

B=μικτό βάρος πριν την ξήρανση

Γ=Μικτό βάρος μετά την ξήρανση

Η υγρασία προκύπτει ως εξής:

$$\% \text{ Υγρασία} = 100 - \% \text{ Ξηρά Ουσία}$$

### 2.7.3. Προσδιορισμός Λιποπεριεκτικότητας

Με τον όρο λιποπεριεκτικότητα του τυριού εννοούμε τη συνολική ποσότητα λίπους και λιπαρών ουσιών, εκπεφρασμένη κατά βάρος. Η μέτρηση του λίπους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Gerber-Van Gulik(1973). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι όταν θειικό οξύ ορισμένης πυκνότητας (ειδικό βάρος 1,53 στους 15 °C) προστεθεί στο τυρί, διαλυτοποιούνται όλα τα συστατικά του πλην του λίπους. Εκλύεται θερμότητα η οποία ρευστοποιεί το λίπος που παραμένει αιωρούμενο μέσα στο οξύ από το οποίο διαχωρίζεται τελικώς με φυγοκέντρηση. Ο διαχωρισμός του λίπους υποβοηθείται με την προσθήκη μικρής ποσότητας αμυλικής αλκοόλης.

Απαραίτητα μέσα

1. Φυγόκεντρος ικανή να αναπτύξει 1100-1200 στροφές/min , με ηλεκτρική αντίσταση για να διατηρείται η θερμοκρασία στους 60-65° C κατά τη φυγοκέντρηση.
2. Μετρητές για την προσθήκη θειικού οξέος και της αμυλικής αλκοόλης
3. Υδατόλουτρο για διατήρηση θερμοκρασίας 65±1° C
4. Βουτυρόμετρα τύπου Gerber-Van Gulik, για 3 gr τυριού , βαθμονομημένα από 0-40%, ανοιχτά και από τα δύο άκρα
5. Υποδοχείς για τη ζύγιση του τυριού και εισαγωγή του μέσα στο βουτυρόμετρο
6. Ζυγός ακριβείας 1mg

## Μέθοδος

Στον υποδοχέα βουτυρόμετρου ζυγίστηκαν 3 gr τυριού και τοποθετήθηκαν στο βουτυρόμετρο. Από το μικρό υποδοχέα του βουτυρόμετρου προστέθηκεθειϊκό οξύ( $H_2SO_4$  ειδικού βάρους 1,53 στους  $15^\circ C$ ), μέχρι να καλυφτεί το τυρί. Το βουτυρόμετρο πωματίστηκε και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $65-70^\circ C$  για 20-30 min μέχρι να διαλυθεί η μάζα του τυριού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν ανάδευση για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση του τυριού. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml αμυλική αλκοόλη( $C_5H_{11}OH$  ειδικού βάρους 0,815 στους  $15^\circ C$ ) και έγινε πιο ζωνρή ανάδευση. Έπειτα προστέθηκε εκ νέουθειϊκό οξύ μέχρι να καλυφθούν τα 4/5 στην κλίμακα του βουτυρόμετρου. Το βουτυρόμετρο τοποθετήθηκε πάλι στο υδατόλουτρο για 5 min και τελικά στην φυγόκεντρο όπου για 5 min φυγοκεντρήθηκε σε 1100-1200 στροφές/min. Τέλος το βουτυρόμετρο τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο για 5 min και στη συνέχεια έγινε ανάγνωση της στάθμης. Η στιβάδα του λίπους μετράται-αναγιγνώσκεται στην ειδική κλίμακα του βουτυρόμετρου Van Gulik και αντιστοιχεί στο λίπος %. Σαν αρχή της στήλης λαμβάνεται η διαχωριστική γραμμή μεταξύ λίπους και λοιπού περιεχομένου του βουτυρόμετρου. Το αποτέλεσμα του λίπους προκύπτει από το μέσο όρο 3 μετρήσεων.

### 2.7.4 Προσδιορισμός της τέφρας

Ο προσδιορισμός της τέφρας γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της FIL-IDF 27:1964. Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο, τοποθετούνται πορσελάνινες κάψες (μικρότερες από αυτές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ξηράς ουσίας) άδειες στον κλίβανο, ώστε να εξατμιστεί κάθε ίχνος υγρασίας, για 24 ώρες. Έπειτα, οι κάψες βγαίνουν από τον κλίβανο, τοποθετούνται σε ξηραντήριο και αφού αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου τοποθετούνται 5 gr από τα δείγματα των 2 τυριών σε καθεμία και επανατοποθετούνται στον κλίβανο για άλλες 24 ώρες. Αφού βγουν από τον κλίβανο, τοποθετούνται σε ξηραντήριο, κρυώνουν, ζυγίζονται, καίγεται το περιεχόμενό τους σε φλόγα και στη συνέχεια τοποθετούνται στον αποτεφρωτήρα. Στον αποτεφρωτήρα μένουν για 5 με 6 ώρες και στη συνέχεια αφού κρυώσουν σε ξηραντήριο ζυγίζονται και γίνεται συλλογή της τέφρας για τυχόν περαιτέρω εξετάσεις. Η δοκιμή αυτή έγινε 2 φορές με 2 επαναλήψεις για το τυρί. Το ποσοστό της τέφρας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ΤΕΦΡΑ}\% = \frac{\text{ΒΑΡΟΣ ΤΗΣ ΤΕΦΡΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}}{\text{ΑΡΧΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} * 100$$

### 2.7.5 Ανάλυση σακχάρων και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός των οργανικών οξέων και των σακχάρων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με σύστημα HPLC(Scientific Equipment, Dandenong, Victoria, Australia) με αντλία GBC, LC1150 και ανιχνευτή διάθλασης (RI) GBC , LC 1240. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Χρησιμοποιήθηκε στήλη Aminex HPX-87H (BIO-RAD, California, USA).

Η προετοιμασία του δείγματος για την ανάλυση στο χρωματογράφο έγινε ως εξής: Ζυγίστηκαν 4 gr από το κάθε τυρί τα οποία διαλύθηκαν με νερό και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στη φιάλη προστέθηκαν 40ml βολφραμικού οξέος και συμπληρώθηκε ο όγκος 100 ml νερό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12,500 rpm για 60 min. Η υπερκείμενη φάση διηθήθηκε από φίλτρο πορώδους 0,22 μm. Στη συνέχεια σύριγγα Hamilton 20 μl από το κάθε δείγμα πέρασαν από στήλη.

Η έκλουση έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 30 min. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας καμπύλες αναφοράς που έχουν προκύψει από χρωματογράφηση διαφόρων οργανικών οξέων και σακχάρων γνωστής συγκέντρωσης.

Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης-έκλουσης (Retention time). Ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε ένωσης γίνεται.

### 2.7.6 Προσδιορισμός Χλωριούχου Νατρίου

Σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού χλωριούχου νατρίου στα τυριά, η οργανική ουσία του προϊόντος αυτού καταστρέφεται με υπερμαγγανικό κάλι και νιτρικό οξύ με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του χλωριούχου νατρίου. Αυτό αντιδρά με νιτρικό άργυρο που προστίθεται -κατά τη διαδικασία- και έτσι σχηματίζεται ίζημα χλωριούχου αργύρου. Η περίσσεια του νιτρικού αργύρου τιτλοδοτείται στη συνέχεια με θειοκυανιούχο αμμώνιο (*Anyfantakis, 2004*).

### Μέθοδος:

Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 2 gr τυρί και τοποθετήθηκαν σε γυάλινη κωνική φιάλη. Προστέθηκαν 25 ml διαλύματος 0,1 N Νιτρικού Αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ), έγινε ανάδευση και προστέθηκαν 25 ml πυκνού νιτρικού οξέος ( $\rho=1,4$ ,  $\text{HNO}_3$ ). Πραγματοποιήθηκε θέρμανση μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml υπερμαγγανικού καλίου (7,5%  $\text{KMnO}_4$ ) και πραγματοποιήθηκε ήπιος βρασμός. Προστέθηκε εκ νέου υπερμαγγανικό κάλιο καθώς το δείγμα αποχρωματίστηκε. Γενικά, αν το χρώμα δεν αλλάζει (από σκούρο μωβ θέλουμε να γίνει ανοιχτό κίτρινο) προστίθεται μικρή ποσότητα οξαλικού οξέος. Στη συνέχεια αφού διαύγασε το δείγμα μου απομακρύνθηκε από την εστία θερμότητας και προστέθηκαν 100 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα, κρύωσε λίγο προστέθηκαν 5ml ενναμώσιο θεικού σιδήρου (στυπτηρία 26,8%) και τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα 0,1 N θειοκυανιούχου αμμωνίου την περίσσεια του νιτρικού αργύρου μέχρι να εμφανιστεί ένα κοκκινοκάστανο χρώμα το οποίο θα παραμείνει αμετάβλητο για τουλάχιστον 1 min.

$$\% \text{ Αλάτι} = (0,585 * (V_1 - V_2)) / P$$

$V_1$ : ml νιτρικού αργύρου που καταναλώθηκαν (25 ml)

$V_2$ : ml θειοκυανιούχου αμμωνίου που καταναλώθηκαν για την τιτλοδότηση

P: βάρος σε gr του δείγματος (2 gr)

### 2.7.7 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των αζωτούχων ουσιών στο τυρί χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kjeldahl, όπως αυτή περιγράφεται από το πρωτόκολλο IDF20\_1:2001. Με τη μέθοδο Kjeldahl μπορεί να προσδιοριστεί το ολικό και το υδατοδιαλυτό άζωτο. Στη συνέχεια με την αφαίρεση αυτών των δύο ποσοτήτων προσδιορίζεται το καζεϊνικό άζωτο. Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην καύση των οργανικών ουσιών του τυριού με τη βοήθεια της θέρμανσης και του θειϊκού οξέος και στη μετατροπή του αζώτου του γάλακτος σε αμμωνιακό.

Έπειτα η αμμωνία ελευθερώνεται με την επίδραση καυστικού νατρίου, αποστάζεται, παραλαμβάνεται σε βορικό οξύ, τιτλοδοτείται με υδροχλωρικό οξύ και με βάση τον τύπο υπολογίζεται το ολικό άζωτο του τυριού.

$$\text{Nολ} = \frac{1,4 \times N \times (V_s - V_b)}{W}$$

Όπου

$V_s$  = Η κατανάλωση σε ml του διαλύματος HCL για την τιτλοδότηση του δείγματος

$V_b$  = Η κατανάλωση σε ml του διαλύματος HCL για την τιτλοδότηση του τυφλού

$N$  = Η κανονικότητα του διαλύματος HCL που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση

$W$  = Το βάρος σε g του δείγματος

Το ποσοστό του ολικού αζώτου μετατράπηκε σε πρωτεΐνη πολλαπλασιάζοντας με το συντελεστή 6,83. Επομένως Ολικές πρωτεΐνες% =  $\text{Nολ}\% \times 6,83$ .

Για τον προσδιορισμό των ολικών αζωτούχων ουσιών, σε μία φιάλη Kjeldahd τοποθετούνται α) 2,5 gr από το τυρί προς εξέταση, β) 2 ταμπλέτες καταλυτών που αντιστοιχούν σε 7 gr θεικού καλίου, 0,210 gr ένυδρο θεικού χαλκού και 0,210 gr διοξειδίου του τιτανίου, γ) 10 ml πυκνό θεικό οξύ (97-98%), δ) 3-4 σταγόνες αντιαφριστικό παράγοντα (υδατικό διάλυμα σιλικόνης 30%) και ε) 5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου 30%. Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετούνται στις ειδικές εστίες καύσης με σύστημα απαγωγής ατμών, όπου παραμένουν για 2,5 ώρες περίπου σύμφωνα με το πρόγραμμα καύσης (συνδυασμός θερμοκρασίας και χρόνου). Εκτός από τα δείγματα, έχει παρασκευαστεί και ένα τυφλό δείγμα, το οποίο αποτελείται από όλα τα αντιδραστήρια και 2,5 ml διαλύματος σουκρόζης 10% αντί τυριού.

Η συσκευή καύσης που χρησιμοποιήθηκε για την καύση των δειγμάτων είναι η Tecator 2020 Digestor και απεικονίζεται παρακάτω:



Εικόνα 10: Συσκευή καύσης που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή Kjeldahd

Μετά την καύση των δειγμάτων μας ακολουθεί η απόσταξη αυτών από την ειδική συσκευή απόσταξης, η οποία απεικονίζεται παρακάτω:



Εικόνα 11: Συσκευή απόσταξης που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμή Kjeldahd

Όπως φαίνεται η παραπάνω συσκευή αποτελείται από 1 υποδοχή της φιάλης Kjeldahl η οποία περιέχει το δείγμα που είναι προς απόσταξη και μία υποδοχή για κωνική φιάλη στην οποία λαμβάνεται το απόσταγμα μετά την επεξεργασία του με βορικό οξύ 4%. Στο απόσταγμα προστίθεται και ένας δείκτης-χρωστική ο οποίος βοηθά στην τιτλοδότηση του δείγματος μας με θειικό οξύ 0,1N. Τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης χρησιμοποιούνται στον τύπο που προαναφέρθηκε για τον υπολογισμό του ολικού αζώτου για το κάθε δείγμα τυριού. Η δοκιμή έγινε μία φορά με 2 επαναλήψεις για το κάθε τυρί.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 3.1 Φυσικοχημικές Αναλύσεις

Οι διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι μετρήθηκαν και παρουσιάζονται στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα. Είναι αποφασιστικής σημασίας, αφού είναι αυτές που καθορίζουν το μεγαλύτερο κομμάτι της δομής, της γεύσης και του αρώματος των τυριών που μελετήθηκαν.

	pH	Υγρασία (%)	Λιποπεριεκτικότητα (%)	Τέφρα (%)	Λίπος επί Ξηρού (%)	Χλωριούχο Νάτριο (%)	Ολικές Πρωτεΐνες %
<b>Καρίκι</b>	4,92	16,48	32,25	3,72	58,33	2,64	35,50
<b>Γκερεμέζι</b>	3,62	66,93	25,00	1,61	21,92	0,99	13,86

### pH

Η τελική τιμή pH για το Καρίκι προέκυψε ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων της μέτρησης και ήταν 4,92 ενώ για το Γκερεμέζι ήταν 3,62.

### Υγρασία

Η υγρασία στο Καρίκι υπολογίστηκε στο 16,48% με τυπική απόκλιση (s) 0,15 και διακύμανση (s<sup>2</sup>) 0,022. Η υγρασία που παρουσιάζει το Καρίκι είναι χαμηλή και πλησιάζει τα ανώτατα όρια που ορίζονται στο άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών στην κατηγορία 1.6 Πολύ Σκληρά Τυριά όπου εκεί η μέγιστη υγρασία φτάνει το 30%. Η υγρασία που παρουσιάζει το Γκερεμέζι είναι υψηλή και φαίνεται ότι ανήκει στην κατηγορία 2 (Άρθρο 83) του Κ.Τ.Π. στα τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση.



### Λιποπεριεκτικότητα

Η λιποπεριεκτικότητα % στο Καρίκι φτάνει το 32,25 % με τυπική απόκλιση (s) 7,82 και διακύμανση ( $s^2$ ) 61,26. Το ποσοστό βρίσκεται και πάλι στην Κατηγορία 1.6 του Κώδικα Τροφίμων δηλαδή στα Πολύ Σκληρά Τυριά. Η λιποπεριεκτικότητα % στο Γκερεμέζι φτάνει το 25 %, μεγαλύτερη από τη συνήθη λιποπεριεκτικότητα στην ξινομυζήθρα με την οποία μοιάζει αρκετά το τυρί αυτό.

### Τέφρα- Λίπος επί ξηρού

Η τέφρα στο Καρίκι υπολογίστηκε στο 3,72 % και το Λίπος επί Ξηρού στο 58,33%. Το λίπος επί ξηρού είναι χαρακτηριστικό των πολύ σκληρών τυριών, πάλι σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών. Η τέφρα στο Γκερεμέζι υπολογίστηκε στο 1,61 % και το Λίπος επί Ξηρού στο 21,92% γεγονός που μας θυμίζει τυριά όπως η Κοπανιστή και η Ξινομυζήθρα Κρήτης δηλαδή τυριά με αλοιφώδη υφή, μαλακά, όπως είναι δηλαδή και το Γκερεμέζι.

### Χλωριούχο Νάτριο

Η αλατότητα στο Καρίκι προσδιορίστηκε στο 2,64%. Το αλάτι εκτός από την επίδραση που έχει στη γεύση, τη δομή και τη συντήρηση του τυριού, επηρεάζει και την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Έχει παρατηρηθεί ότι μεγάλες συγκεντρώσεις αλατιού στο τυρί παρεμποδίζουν την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Οι περισσότερες ομάδες οξυγαλακτικών βακτηρίων αναπτύσσονται καλά σε 2% αλάτι και 4-5 % αλάτι στην υγρή φάση (Walstra et al., 2005). Τα γαλακτικά βακτήρια και ιδίως κάποια στελέχη του γένους *Lactococcus* που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές, διεγείρεται η παραγωγή τους από χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιού, αλλά παρεμποδίζεται από συγκεντρώσεις αλατιού μεγαλύτερες από 5%. Επίσης οι υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού στο τυρί σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα λίπους και των πρωτεϊνών εξαιτίας της απώλειας υγρασίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Fox et al., 2000).

Τα ποσοστά αλατιού λοιπόν σχετίζονται εκτός από την ανάπτυξη μικροοργανισμών και με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάθε τυριού αφού σχετίζονται άμεσα με τα ποσοστά υγρασίας και το pH. Η υγρασία καθορίζει σε μεγάλο ποσοστό την υφή και τη συνεκτικότητα του τυριού ενώ το pH και κατά συνέπεια το αλάτι, τη γεύση (O' Connor, 1971). Το αλάτι μπορεί επίσης να ενεργοποιεί ή να απενεργοποιεί ορισμένα ένζυμα του γάλακτος ή των μικροοργανισμών. Η πλασμίνη (ενδογενής πρωτεϊνάση του γάλακτος) που συμβάλει αρκετά στο βαθμό πρωτεόλυσης όλων των τυριών, ενεργοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιού, περίπου 2%, αλλά αδρανοποιείται σε πολύ υψηλές, πάνω από 8%. Αντίθετα, στα ένζυμα των μικροοργανισμών έχει αποδειχθεί, σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, ότι δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση (Fox et al., 2000). Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατοπεριεκτικότητας η πρωτεόλυση επιβραδύνεται, ενώ σε χαμηλές παρατηρούνται ελαττώματα όπως όξινη και πικρή γεύση. Οι ανεπιθύμητες γεύσεις εμφανίζονται λόγω υπερβολικής ή ανισόρροπης ενζυμικής δραστηριότητας (Fox et al., 2000). Το ίδιο το αλάτι συνεισφέρει ενεργά στη γεύση του τυριού ενώ επίσης ενισχύει την αίσθηση στο στόμα και μειώνει τις ανεπιθύμητες γεύσεις (Moller et al., 2013).

## Προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων : HPLC

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των οργανικών οξέων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση HPLC. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη τυριών σύμφωνα με την εφαρμοζόμενη τεχνολογία παρασκευής, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια ωρίμανσης, την εποχή παραγωγής και τη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται. Επιπλέον, το επίπεδο των οργανικών οξέων εξαρτάται από το είδος των εναρκτήριων οξυγαλακτικών καλλιεργείων και των συμπληρωματικών καλλιεργείων-που προστίθενται (Manolaki et al., 2006). Σχεδιάσθηκαν πρότυπες καμπύλες, βάσει των οποίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Κατά την παρασκευή ενός τυριού η ζύμωση της λακτόζης είναι η κύρια και η πιο γρήγορη βιοχημική μεταβολή που πραγματοποιείται στο τυρί και οδηγεί στην παραγωγή κυρίως γαλακτικού οξέος. Γι' αυτό και στο Γκερεμέζι είναι το πρώτο οξύ που παρατηρήθηκε.

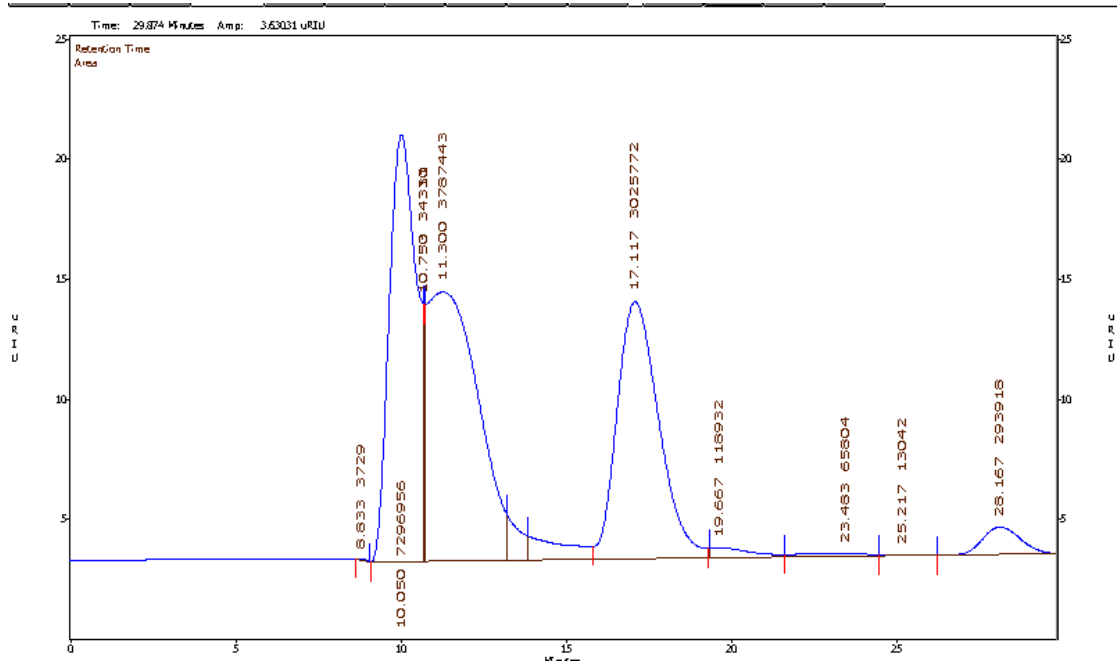
Οι πτητικές ενώσεις των τυριών σχηματίζονται κατά την παρασκευή τους. Τα φρέσκα τυριά (γκερεμέζι), οφείλουν τα αρωματικά συστατικά τους σε μεγάλο βαθμό, είτε σε προϊόντα της γαλακτικής ζύμωσης όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και η αιθανόλη είτε σε προϊόντα μεταβολισμού του κιτρικού οξέος όπως η ακετοΐνη και το διακετύλιο.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σχηματίζονται κατά τη λιπόλυση. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα βραχείας (4-12 άτομα C) και μεσαίας αλύσου (12-16 άτομα C), επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το άρωμα και τη γεύση των τυριών. Τα περισσότερα λιπαρά οξέα με 4-20 άτομα C προέρχονται από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό, κατά κανόνα εκείνα με 2-6 άτομα C προέρχονται από την αποικοδόμηση της λακτόζης και των αμινοξέων (Curioni and Bosset, 2002).

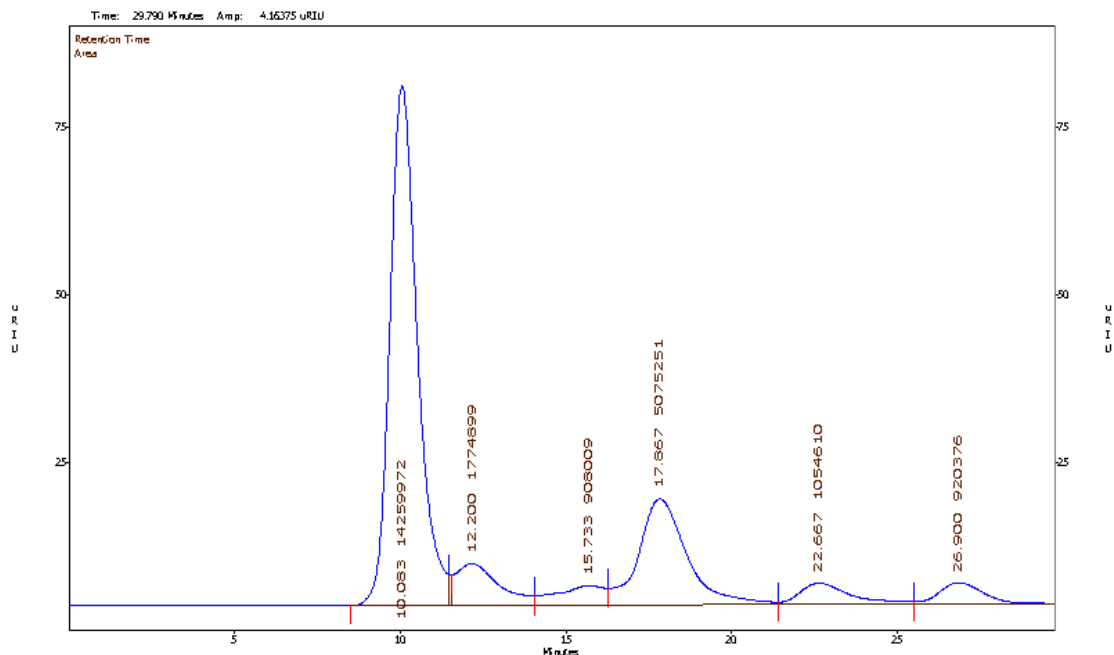
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενώσεων, πραγματοποιήθηκε βάσει εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής του χρωματογραφήματος. Οι συγκεντρώσεις των διάφορων ουσιών που εντοπίστηκαν με βάση το χρόνο κατακράτησης (Retention time) υπολογίστηκαν βάσει εξισώσεων που προέκυψαν από τη χρωματογράφιση οργανικών οξέων και σακχάρων γνωστών συγκεντρώσεων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 10: Ενώσεις που ανιχνεύτηκαν με την HPLC στα δύο τυριά  
(δυ: Δεν Υπολογίστηκε)

<u>Σάκχαρο ή Οξύ</u>	<u>Συγκέντρωση στο Καρίκι (mM)</u>	<u>Συγκέντρωση στο Γκερεμέζι (mM)</u>
Λακτόζη	0	14,80
Γλυκόζη	0	δυ
Γαλακτικό Οξύ	310,50	185,18
Οξικό Οξύ	0	8,50
Ηλεκτρικό Οξύ	8,95	0
Προπιονικό οξύ/ Ακετοΐνη	δυ	0
Βουτυρικό οξύ	δυ	0
Μεθανόλη	0	δυ
Αιθανόλη	0	δυ



Εικόνα 12: HPLC Χρωματογράφημα σακχάρων και οργανικών οξέων στο Γκερεμέζι



Εικόνα 13: HPLC Χρωματογράφημα σακχάρων και οργανικών οξέων στο Καρίκι Λακτόζη

Η λακτόζη στα τυριά μεταβολίζεται κατά κύριο λόγο σε γαλακτικό οξύ μετά από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων. Η μετατροπή αυτή είναι ταχεία ώστε να θεωρείται ότι σε 24 h από την παρασκευή του τυριού έχει διασπαστεί το μεγαλύτερο μέρος της (Accolas et al., 1977). Από πολλούς ερευνητές έχει διαπιστωθεί η μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης κατά την ωρίμανση των τυριών σε σχέση με την αρχική συγκέντρωσή του γάλακτος. Λακτόζη ανιχνεύθηκε μόνο στο Γκερεμέζι με συγκέντρωση 14,80 mM (20,26 g/kg).

#### Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ ανιχνεύθηκε και στα δύο δείγματα που μελετήθηκαν με τη συγκέντρωση στο Καρίκι να φτάνει τα 310,5 mM (111,89 g/kg) και στο Γκερεμέζι 185,18 mM (66,72 g/kg). Το γαλακτικό οξύ παράγεται από τη ζύμωση της λακτόζης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ο σχηματισμός του γαλακτικού οξέος επιδρά στην πήξη του γάλακτος και στην στράγγιση του τυροπήγματος καθώς και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού. Προκαλεί πτώση του pH και κατά αυτόν τον τρόπο επηρεάζει άμεσα το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται. Είναι επομένως απαραίτητο για την ανάπτυξη του αρώματος, την κανονική ωρίμανση και την καλή ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Califano & Bevilacqua, 2000). Παρατηρήθηκε εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και στα δύο τυριά που μελετήθηκαν γεγονός που ήταν εν μέρει αναμενόμενο αφού τα αρωματικά στοιχεία των φρέσκων τυριών οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στα προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης, όπως προαναφέρθηκε.

### Οξικό οξύ

Στο τυρί Blue Cheese, η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν 0,25 mg/g τυριού (Marsili et al., 1981). Σύμφωνα με τους [Mullin & Emmons \(1997\)](#), η συγκέντρωση του οξικού οξέος στα τυριά Brie, Camembert και Blue Cheese ήταν 1,206, 1,07 και 2,227 mg/g τυριού αντίστοιχα. Στην περίπτωση του τυριού Γκερεμέζι, η συγκέντρωση ήταν 2,04 g/kg, αρκετά υψηλότερη από τα παραδείγματα που αναφέρονται. Το οξικό οξύ προσδίδει έντονο άρωμα αλλά και έντονα όξινη γεύση στο τυρί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ([Califano & Bevilaqua, 2000](#)).

### Αιθανόλη

Στο Γκερεμέζι μετρήθηκε συγκέντρωση 14,02 mM γεγονός που ενισχύει την αρχική υπόθεση ότι τα φρέσκα τυριά οφείλουν τα αρωματικά συστατικά τους σε μεγάλο βαθμό, είτε σε προϊόντα της γαλακτικής ζύμωσης όπως το γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη. Αλλά και στη φέτα τα κυριότερα πτητικά συστατικά που έχουν βρεθεί είναι η αιθανόλη και το οξικό οξύ σύμφωνα με τους [Kondyli et al. \(2012\)](#) και [Sarantinopoulos et al. \(2002\)](#). Η παραγωγή της αιθανόλης συνδέεται και με την ύπαρξη των εντερόκοκκων στο Γκερεμέζι αφού είναι οι κύριες πτητικές ενώσεις που παράγουν οι εντερόκοκκοι της φέτας ([Psomas et al., 2001](#)).

Άλλες ουσίες που μετρήθηκαν ήταν το προπιονικό οξύ 60,57 mM (Καρίκι), η μεθανόλη (αλκοόλη) (Γκερεμέζι) και το βουτυρικό οξύ (Καρίκι). Για το Καρίκι ενδιαφέρον εμφανίζει η παρουσία βουτυρικού οξέος το οποίο φανερώνεται με την έντονη -όχι ευχάριστη-οσμή κατά το άνοιγμα της νεροκολοκύθας. Ο [Urbach \(1990\)](#) ανέφερε ότι η διατροφή που επάγει το σχηματισμό προπιονικού οξέος στο στομάχι, οδηγεί στο σχηματισμό λακτόνων που χαρακτηρίζονται από μια γλυκιά οσμή βατόμουρου. Πράγματι το Καρίκι είχε μία έντονη γλυκιά γεύση που θα μπορούσε να παραπέμψει στο βατόμουρο. Μεθανόλη είχε ανιχνευτεί σε τυρόγαλα που προήλθε από τυροκόμηση τυριού Cheddar με τη χρήση εναρκτήριων καλλιιεργειών, σύμφωνα με τους [Karagul-Yuccer et al. \(2003\)](#). Τα οξέα με την πιο δυσάρεστη οσμή είναι το βουτυρικό και το βαλερικό οξύ τα οποία έχουν και χαμηλό όριο ανίχνευσης των οσμών σε σχέση με το οξικό και το προπιονικό ([Zahn et al., 2001](#)). Έτσι οι οσμές των λιπαρών οξέων δεν είναι ευθέως ανάλογες με τις συγκεντρώσεις αυτών αλλά κυρίως με τις συγκεντρώσεις του βουτυρικού και του βαλερικού οξέος ([Zhu et al., 1997](#)) Το καρίκι είχε σαφώς έντονη και όχι ιδιαίτερα ευχάριστη μυρωδιά γεγονός που δικαιολογείται από την παρουσία βαλερικού οξέος. Κατά την τυροκόμηση, το 96-98% της λακτόζης του γάλακτος αποβάλεται στο τυρόγαλα. Το ποσό της λακτόζης που μένει στο τυρόπηγμα ζυμώνεται γρήγορα από τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες προς γλυκόζη και γαλακτόζη και οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Το γαλακτικό είναι δυνατό να μεταβολιστεί ( είτε με το μονοπάτι ομοζυμωτικών είτε με αυτό των ετεροζυμωτικών) .

Το κιτρικό οξύ δεν ανιχνεύτηκε γεγονός που έχει λογική εξήγηση καθώς το 94% του κιτρικού βρίσκεται στην υδατική φάση του γάλακτος και αυτό που μένει στο τυρόπηγμα μετατρέπεται σε αρωματικά συστατικά όπως το οξικό οξύ, το διακετύλιο η ακετοΐνη .

Τα φρέσκα τυριά που δεν ωριμάζουν όπως το γκερεμέζι, οφείλουν τα γευστικά τους χαρακτηριστικά στα προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό, η ακετοΐνη.

Η αιθανόλη ήταν η αλκοόλη που παρήχθη στο Γκερεμέζι. Η αιθανόλη μπορεί να προήλθε από τη ζύμωση της λακτόζης από ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια ή ζυμομύκητες.

Το οξικό οξύ που προέρχεται από το μεταβολισμό του γαλακτικού ξέος είναι χαρακτηριστικό αρωματικό συστατικό των λευκών τυριών άλμης.



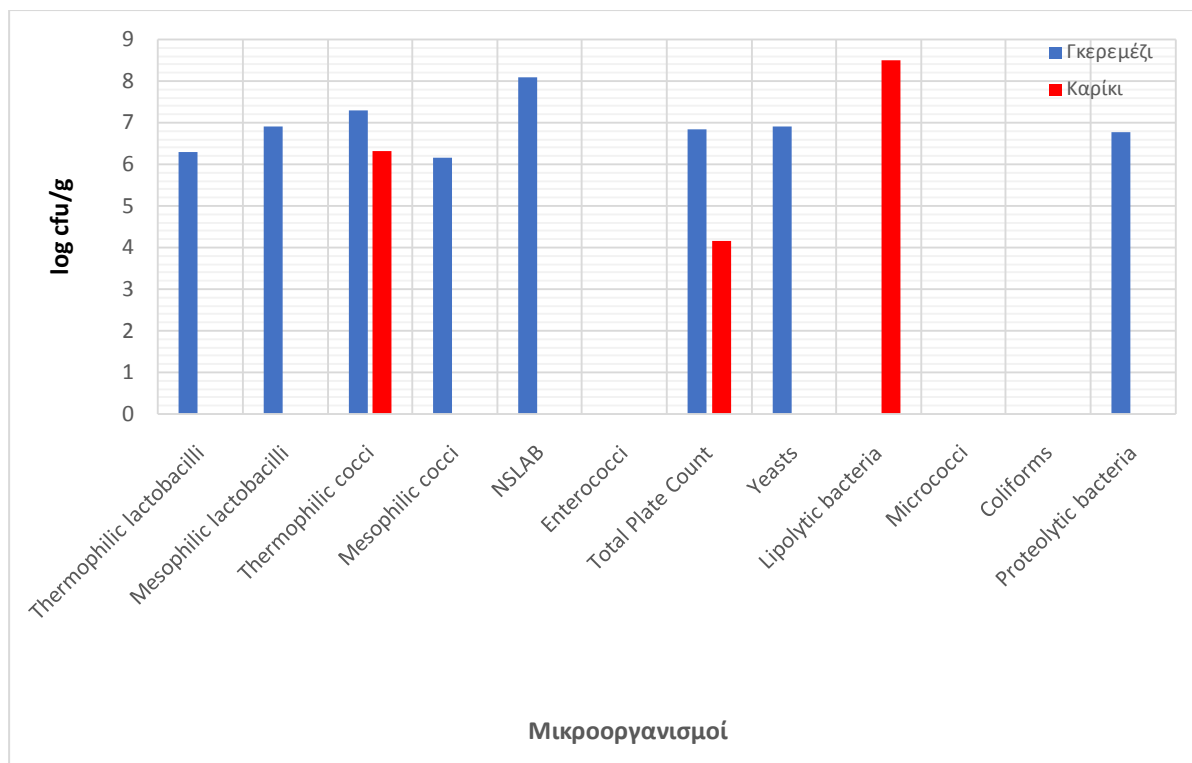
### 3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

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

Οι πληθυσμοί των μικροβιακών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα δύο δείγματα παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 11. Το βασικό χαρακτηριστικό που παρατηρείται στον παρακάτω πίνακα είναι η παρουσία πολύ λιγότερων μικροοργανισμών στο Καρίκι, συγκριτικά με το Γκερεμέζι. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη μεγάλη διάρκεια κατά την οποία ωριμάζει το παρόν τυρί καθώς και στις συνθήκες υγιεινής κατά την ωρίμανση και την παρασκευή του. Την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και στα δύο τυριά αποτέλεσαν οι θερμοφιλοι κόκκοι, ενώ γαλακτοβάκιλλοι (θερμοφιλοι-μεσόφιλοι), μεσόφιλοι κόκκοι, ζύμες και πρωτεολυτικά βακτήρια παρατηρήθηκαν μόνο στο Γκερεμέζι. Τα λιπολυτικά βακτήρια εμφανίστηκαν μόνο στο Καρίκι.

Πίνακας 11: Πληθυσμός μικροοργανισμών

Ομάδα μικροοργανισμών	Γκερεμέζι Αίγινα (log cfu/g)	Καρίκι Τήνος (log cfu/g)
<b>Thermophilic lactobacilli</b>	6,30	0,00
<b>Mesophilic lactobacilli</b>	6,90	0,00
<b>Thermophilic cocci</b>	7,30	6,32
<b>Mesophilic cocci</b>	6,15	0,00
<b>NSLAB</b>	8,08	0,00
<b>Enterococci</b>	0,00	0,00
<b>Total Plate Count</b>	6,85	4,16
<b>Yeasts</b>	6,90	0,00
<b>Lipolytic bacteria</b>	0,00	8,50
<b>Micrococci</b>	0,00	0,00
<b>Coliforms</b>	0,00	0,00
<b>Proteolytic bacteria</b>	6,78	0,00



Πίνακας 12-Σχήμα : Μικροβιακοί πληθυσμοί (log cfu/g) των τυριών Γκερεμέζι και Καρίκι

Όλες οι απομονώσεις έγιναν σε υψηλές αραιώσεις (έως  $10^{-8}$ ) που σημαίνει ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων που απομονώθηκαν ήταν μεγάλος και τα είδη αυτά κυριαρχούσαν στο Γκερεμέζι.

Τα NSLAB αποτελούν μία ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία δεν ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια των εκκινητριών καλλιιεργειών (LAB starters), αλλά αναπτύσσονται στα τυριά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους. Βέβαια υπάρχει και η πιθανότητα της επιμόλυνσης από στελέχη που βρίσκονται στον εξοπλισμό της τυροκομικής μονάδας. Οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες στο Γκερεμέζι ήταν σε υψηλό πληθυσμό γεγονός που εξηγείται καθώς το γάλα για την παρασκευή του δείγματος δεν υπόκειται παστερίωση. Πρόκειται για ετεροζυμωτικά βακτήρια τα οποία αντέχουν σε υψηλές τιμές αλατιού και οξύτητας και οι πληθυσμοί διαφέρουν ανάλογα τον τύπο του τυριού που παρασκευάζεται και το στάδιο ωρίμανσής του (Fox et al., 2000). Αυτές οι ομάδες των μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, της μείωσης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δραστηριότητας (Steele, 1995).

Οι πληθυσμοί των θερμοφίλων κόκκων που καταγράφηκαν για το Γκερεμέζι ήταν 7,30 log cfu/g ενώ των μεσόφιλων κόκκων ήταν 6,15 log cfu/g.

Οι ομάδες των ζυμών και των μυκήτων αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι αναπτύσσονται δευτερογενώς στο τυρί, κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, όταν το pH είναι χαμηλό και τα βακτήρια δε μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτό (Fox et al., 2000). Ακόμη, μπορούν να αναπτυχθούν και σε πολύ χαμηλές τιμές  $a_w$  και σχεδόν πάντα, όπως και στη συγκεκριμένη μελέτη, αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τυριών, αφού πρόκειται για αερόβιους μικροοργανισμούς. Αποτελούν την κυριότερη επιμόλυνση των φρέσκων ιδίως τυριών και οι πληθυσμοί τους μπορούν να αυξηθούν γρήγορα σε αυτά (Fox et al., 2000). Σε φρέσκο τυρί από γίδινο γάλα που παρασκευάζεται στη Τουρκία, έχουν αναφερθεί πληθυσμοί τη τάξεως  $10^3$  cfu/grf κατά την πρώτη μέρα της παραγωγής τους (Kilic et al., 2004). Οι ζύμες βρέθηκαν σε πληθυσμούς 6,90 log cfu/g στο Γκερεμέζι. Οι ζύμες δεν αποτελούν μέρος των εναρκτήριων καλλιεργειών. Ωστόσο παρατηρούνται σε σχετικά υψηλά νούμερα σε πολλά μαλακά τυριά. Πιθανότατα προέρχονται από τις συσκευές και το περιβάλλον κατά τη διαδικασία της τυροκόμησης (Viljoen, 2001).

Ένα θετικό στοιχείο είναι η απουσία κολοβακτηριοειδών που αποτελούν ένδειξη κακής υγιεινής. Η παρουσία των βακτηρίων αυτών υποδηλώνει κακές συνθήκες αποθήκευσης και συντήρησης από τον παραγωγό.

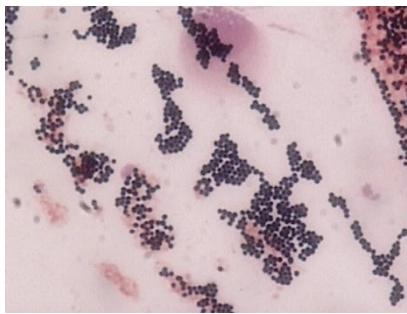
Τα λιπολυτικά βακτήρια παρατηρήθηκαν στο Καρίκι. Συνήθη λιπολυτικά βακτήρια είναι τα *Achromobacter lipids*, *Achromobacter lipolyticum* και *Pseudomonas fragi*. Η κατηγορία των βακτηρίων αυτών αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες παράγουν λιπαρά οξέα και γλυκερίνη και προσδίδουν δυσάρεστη οσμή και γεύση στο γάλα και κατ' επέκταση στα προϊόντα τους.

Πρωτεολυτικά βακτήρια αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα από το Γκερεμέζι. Πρόκειται για θερμοανθεκτικούς μικροοργανισμούς που είτε προσδίδουν διαυγές χρώμα στο γάλα είτε πραγματοποιούν τη λεγόμενη <<γλυκιά πήξη>> του γάλακτος καθώς μετατρέπουν τις πρωτεΐνες σε μαλακό πήγμα χωρίς να προηγηθεί γαλακτική ζύμωση. Κύριοι αντιπρόσωποι της άνω κατηγορίας είναι τα *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* και *Streptococcus liquefaciens*.

Το κοινό χαρακτηριστικό των τυριών των οποίων μελετήθηκαν ήταν η μη προσθήκη εναρκτήριων καλλιεργειών. Επομένως το μικροβιακό τους φορτίο προέρχεται εξ ολοκλήρου από τη φυσική μικροχλωρίδα του γάλακτος, τις επιμολύνσεις από το περιβάλλον στο οποίο παρασκευάστηκαν τα τυριά και τον εξοπλισμό.

Ακολούθησε μακροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών με σκοπό την απομόνωση νέων στελεχών.

Στο Καρίκι από τις 27 αποικίες που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν μόλις 4 προχώρησαν στη διαδικασία της ταυτοποίησης καθώς η ανάπτυξη των υπολοίπων 23 ήταν πολύ μικρή. Στο θρεπτικό υπόστρωμα PCA βρέθηκαν αποικίες λευκές στρογγυλές και λευκομπέζ στρογγυλές οι οποίες έμοιαζαν μορφολογικά με κόκκους και στη συνέχεια όταν αναπτύχθηκαν σε broth M17 όντως αναπτύχθηκαν κόκκοι.



Εικόνα 14: Κύτταρα κόκκων σε ανάπτυξη M17 broth στο Καρίκι (ACA-DC1474)

Στο υπόστρωμα M17, στο Καρίκι, καλή ανάπτυξη παρουσίασε το ACA-DC 1462 το οποίο ήταν στρογγυλές μεζ αποικίες και η απομόνωσή του έδειξε κόκκους.

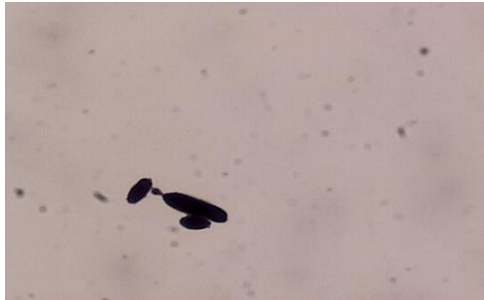
Στα λιπολυτικά τώρα βακτήρια, στο Καρίκι, ενδιαφέρον παρουσίασαν οι στρογγυλές μεζ αποικίες που αναπτύχθηκαν στο ACA-DC 1463 οι οποίες όταν απομονώθηκαν περαιτέρω σε υπόστρωμα MRS έδειξε βακίλους.



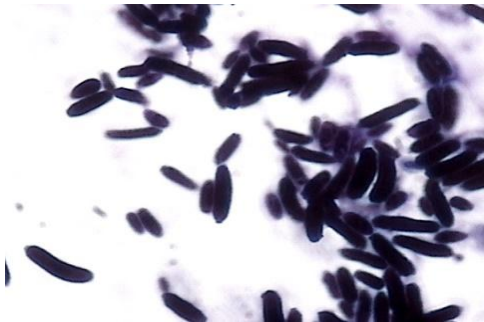
Εικόνα 15: Κύτταρα βακίλλων σε ανάπτυξη MRS broth στο Καρίκι (ACA-DC 1463)

Στο Γκερεμέζι από τις 53 αποικίες που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν μόλις 17 προχώρησαν στη διαδικασία της ταυτοποίησης καθώς η ανάπτυξη των υπολοίπων είτε ήταν μικρή είτε η μορφολογία των αποικιών ήταν παρόμοια και αποφασίστηκε να ταυτοποιηθούν οι εξής αποικίες.

Στις ζύμες οι αποικίες που παρατηρήθηκαν ήταν λεμονοειδείς με εκβλαστήσεις, επιμήκεις με εκβλαστήσεις και λεμονοειδείς χωρίς εκβλαστήσεις.



Εικόνα 16: Κύτταρα λεμονοειδών ζυμών με εκβλαστήσεις σε ανάπτυξη nutrient broth στο Γκερεμέζι (ACA-DC 5287)



Εικόνα 17: Κύτταρα επιμήκων ζυμών χωρίς εκβλαστήσεις σε ανάπτυξη nutrient broth στο Γκερεμέζι (ACA-DC 5290)

Στους βακίλους οι μορφολογίες που ξεχώρισαν ήταν βάκιλοι με σπόρια και χωρίς σπόρια, ενώ στους κόκκους είχαμε κομπολογοειδείς, επιμήκεις, συσσωματώματα κόκκων και αλυσίδες κόκκων.



Εικόνα 18: Κύτταρα κομπολογοειδών κόκκων σε ανάπτυξη Mrs broth στο Γκερεμέζι (ACA-DC 1473)

Πίνακας 13: Στελέχη βακτηρίων και ζυμών που απομονώθηκαν από τα τυριά Καρίκι και Γκερεμέζι

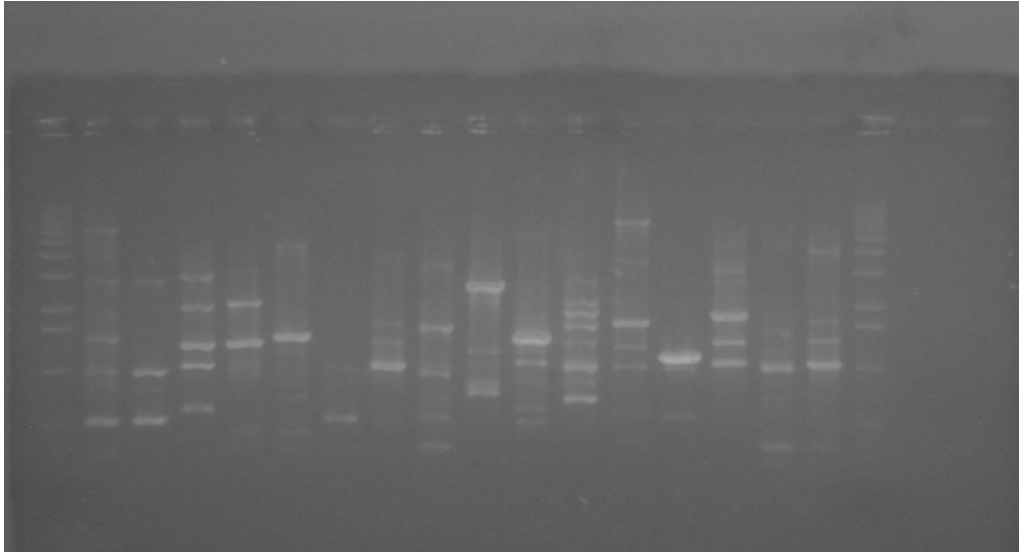
Στέλεχος	ACA-DC Number	Τύπος Μικροοργανισμού	Θρεπτικό Υπόστρωμα Απομόνωσης	Θερμοκρασία Επώασης
6 ΓΚΕΡ	ACA-DC 5286	ΖΥΜΗ	YGC	25°C
11b ΓΚΕΡ	ACA-DC 5287	ΖΥΜΗ	YGC	25°C
40 ΓΚΕΡ	ACA-DC 5290	ΖΥΜΗ	YGC	25°C
4 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1461	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
7 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1462	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
17 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1463	ΒΑΚΙΛΟΣ	MRS	37°C
11a ΓΚΕΡ	ACA-DC 1464	ΚΟΚΚΟΣ	M17	30°C
12 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1465	ΚΟΚΚΟΣ	M17	30°C
17 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1466	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
18 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1467	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
23 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1468	ΚΟΚΚΟΣ	M17	30°C
27 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1469	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
29 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1470	ΒΑΚΙΛΟΣ	MRS	37°C
30 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1471	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
31 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1472	ΒΑΚΙΛΟΣ	MRS	30°C
42B ΓΚΕΡ	ACA-DC 1473	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C
43A ΓΚΕΡ	ACA-DC 1474	ΚΟΚΚΟΣ	M17	37°C

### 3.2.1 Ομαδοποίηση βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR

Η rep-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση των βακτηριακών στελεχών, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο την ταυτοποίησή τους ευκολότερη και γρηγορότερη. Η rep-PCR οδήγησε σε μια συνεκτική ομαδοποίηση. Στην παρούσα μελέτη θεωρήσαμε ότι η ταξινόμηση επιτεύχθηκε σε επίπεδο είδους και όχι σε επίπεδο στελέχους.

Χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, ελήφθησαν αποτυπώματα για 16 στελέχη. Ενδεικτικά παρατίθεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης που προέκυψε από την ενίσχυση του DNA των βακτηρίων. Λόγω της διαφορετικότητας των αποτυπωμάτων των ζωνών μπόρεσε να πραγματοποιηθεί επιτυχής διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών στελεχών.

M 1 4 7 17 11a 12 17 18 23 27 29 30 31 42b 43 44 M

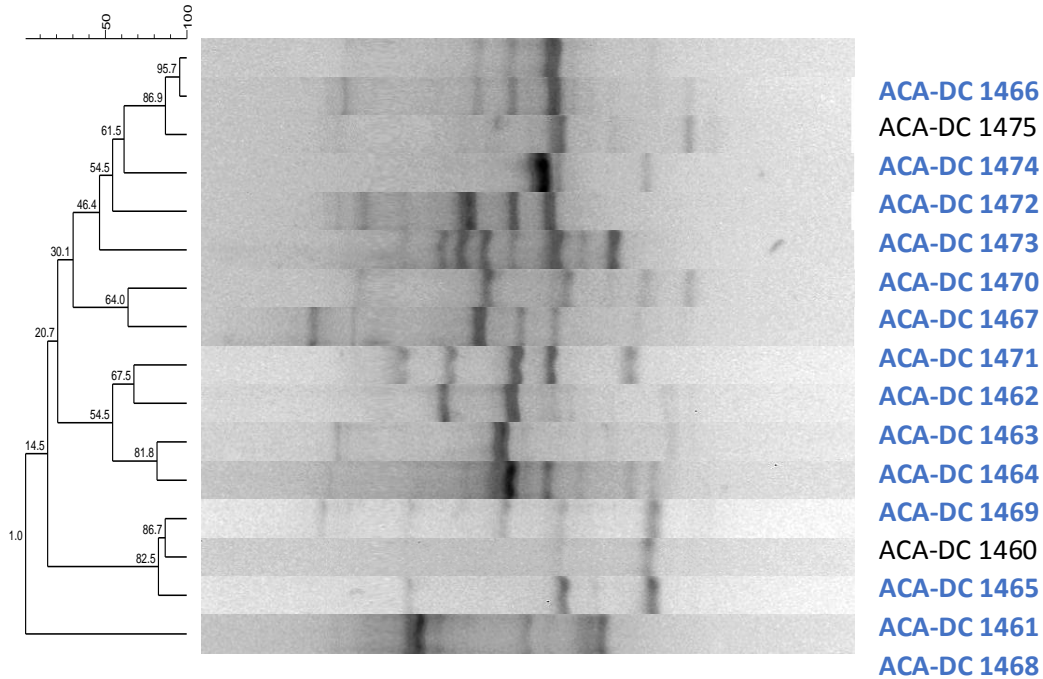


Εικόνα 19 : Πηκτή αгарόζης με τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης από την rep-PCR .

**M:** Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), **1.** ACA-DC 1460 Καρίκι Κοκκος **4.** ACA-DC 1461 Καρίκι Κοκκος, **7.** ACA-DC 1462 Καρίκι Κοκκος, **17** ACA-DC 1463 Καρίκι Βάκιλλος, **11a** ACA-DC 1464 Γκερεμέζι Κόκκος, **12.** ACA-DC 1465 Γκερεμέζι Κόκκος, **17.** ACA-DC 1466 Γκερεμέζι Κόκκος, **18.** ACA-DC 1467 Γκερεμέζι Κόκκος, **23.** ACA-DC 1468 Γκερεμέζι Κόκκος, **27.** ACA-DC 1469 Γκερεμέζι Κόκκος, **29.** ACA-DC 1470 Γκερεμέζι Βάκιλλος, **30.** ACA-DC 1471 Γκερεμέζι Κόκκος, **31.** ACA-DC 1472 Γκερεμέζι Βάκιλος, **42b.** ACA-DC 1473 Γκερεμέζι Κόκκος, **43.** ACA-DC 1474 Γκερεμέζι Κόκκος, **44.** ACA-DC 1461 Γκερεμέζι Κόκκος, **M:** marker)

Οι 16 καλλιέργειες βακτηρίων διαχωρίστηκαν σε 14 ομάδες, βάσει του βακτηριακού τους προφίλ με ποσοστό ομοιότητας >86,7%. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Bionumerics 6 και με τη βοήθεια του αλγορίθμου U.P.G.M.A. (unweighted pair-grouping) προέκυψε το δενδρόγραμμα που ακολουθεί. Στη συνέχεια 14 αντιπροσωπευτικά στελέχη επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση.



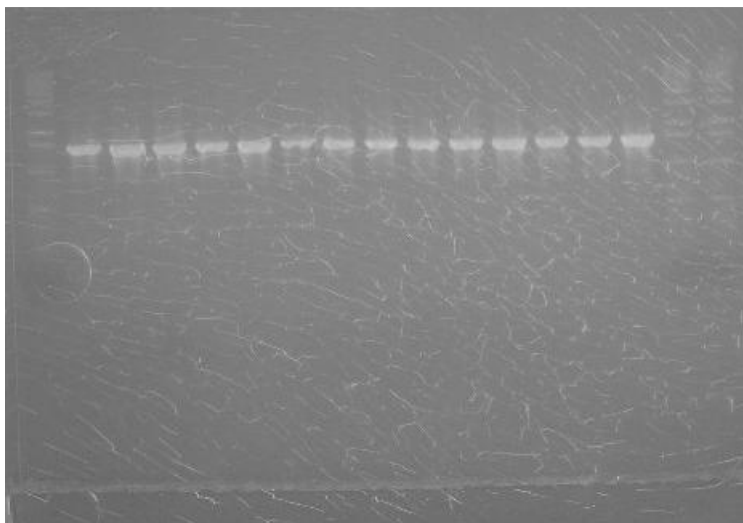


Εικόνα 20: Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Bionumerics.

### 3.2.2 Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S r RNA

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως επιλέχθηκαν 13 στελέχη λαμβάνοντας υπόψη τόσο το ποσοστό ομοιότητας του με τα υπόλοιπα στελέχη ανά ομάδα, όσο και τη διαφορετικότητα του προφίλ τους. Παρακάτω παρουσιάζεται η Εικόνα των προϊόντων PCR για το γονίδιο 16S r RNA. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτή αгарόζης, είναι μία φωτεινή ζώνη. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα, εκτιμούμε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 1600 ζεύγη βάσεων.

M 4 7 17 11a 12 17 18 23 27 29 30 31 42b 43 M



Εικόνα 21: Πηκτή ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16s rRNA.

**M:** Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), **4.** ACA-DC 1461 Καρίκι Κοκκος, **7.** ACA-DC 1462 Καρίκι Κοκκος, **17** ACA-DC 1463 Καρίκι Βάκιλλος. **11a** ACA-DC 1464 Γκερεμέζι Κόκκος, **12.** ACA-DC 1465 Γκερεμέζι Κόκκος, **17.** ACA-DC 1466 Γκερεμέζι Κόκκος, **18.** ACA-DC 1467 Γκερεμέζι Κόκκος, **23.** ACA-DC 1468 Γκερεμέζι Κόκκος, **27.** ACA-DC 1469 Γκερεμέζι Κόκκος, **29.** ACA-DC 1470 Γκερεμέζι Βάκιλλος, **30.** ACA-DC 1471 Γκερεμέζι Κόκκος, **31.** ACA-DC 1472 Γκερεμέζι Βάκιλλος, **42b.** ACA-DC 1473 Γκερεμέζι Κόκκος, **43.** ACA-DC 1474 Γκερεμέζι Κόκκος, M: marker)

Μετά τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από την πηκτή αгарόζης και την αλληλούχηση, πραγματοποιήθηκε στοίχιση (alignment) με τον αλγόριθμο blast του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών παρουσιάζονται παρακάτω:

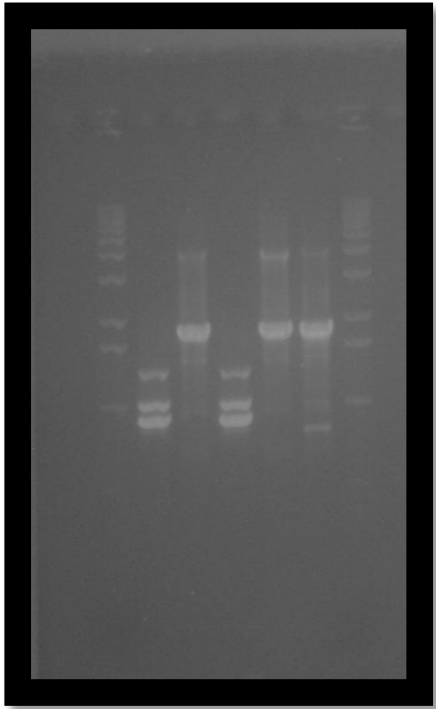
Πίνακας 14: Αποτελέσματα της ομαδοποίησης όπως προέκυψε από το ger-PCR και της ταυτοποίησης όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του γονιδίου 16s rRNA 14 στελεχών

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ACA-DC	ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΟΥ 16S rRNA
17 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1466	ACA-DC 1466	<i>Enterococcus faecalis</i>
44 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1475		
43 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1474	ACA-DC 1474	<i>Streptococcus thermophilus/salivarius</i>
31 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1472	ACA-DC 1472	<i>Lactobacillus helveticus/ crispatus</i>
42B ΓΚΕΡ	ACA-DC 1473	ACA-DC 1473	<i>Streptococcus oralis/mitis</i>
29 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1470	ACA-DC 1470	<i>Lysinibacillus xylanilyticus/ pakistanensis</i>
18 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1467	ACA-DC 1467	<i>Staphylococcus aureus/ simiae</i>
30 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1471	ACA-DC 1471	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
7 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1462	ACA-DC 1462	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1463	ACA-DC 1463	<i>Staphylococcus aureus/ petrasii</i>
11A ΓΚΕΡ	ACA-DC 1464	ACA-DC 1464	<i>Staphylococcus epidermidis/ caprae</i>
27 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1469	ACA-DC 1469	<i>Staphylococcus epidermidis/ caprae/ saccharolyticus</i>
1 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1460	ACA-DC 1461	<i>Enterococcus faecium/ durans</i>
4 ΚΑΡΙΚ	ACA-DC 1461		
23 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1468	ACA-DC 1468	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
12 ΓΚΕΡ	ACA-DC 1465	ACA-DC 1465	<i>Staphylococcus epidermidis/ caprae</i>

### 3.2.3 Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR

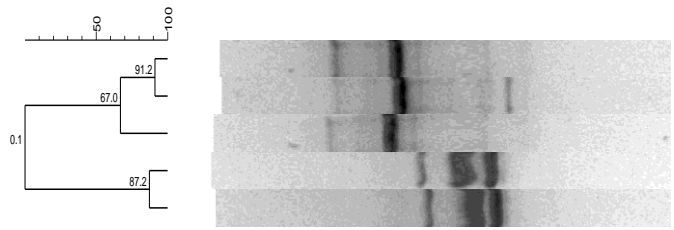
Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της rep-PCR, όπου ενισχύθηκαν συγκεκριμένα τμήματα DNA των στελεχών των ζυμών ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αгарόζης τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω:

M 6 11b 21 28b 40



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες. **M**: Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), **6**. ACA-DC 5286 Ζύμη Γκερεμέζι, **11b**. ACA-DC 5287 Ζύμη Γκερεμέζι, **21** ACA-DC 5288 Ζύμη Γκερεμέζι, **28b**. ACA-DC 5289 Ζύμη Γκερεμέζι **40**. ACA-DC 5290 Ζύμη Γκερεμέζι, M: marker

Για την ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών έγινε επεξεργασία των φωτογραφιών της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα Bionumerics (Applied Maths NV). Από τα αποτελέσματα του προγράμματος προέκυψε ένα δένδrogramma, όπου τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ. Στελέχη με ποσοστά ομοιότητας >87,25 θεωρήθηκε ότι αποτελούν μία ομάδα. Από κάθε ομάδα επιλέχθηκαν ενδεικτικά κάποια στελέχη για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η ITS PCR προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή τους.



ACA-DC 5289

**ACA-DC 5290**

**ACA-DC 5287**

ACA-DC 5286

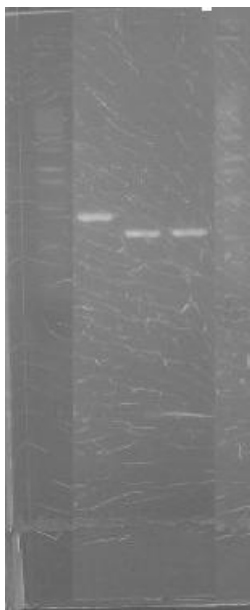
**ACA-DC 5288**

Εικόνα 23: Δενδρόγραμμα ger-PCR των στελεχών των ζυμών.

### 3.2.4 Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS

Για την ταυτοποίηση των στελεχών των ζυμών ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης της περιοχής ITS. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αλληλούχησης έγινε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω:

M 40 11 21M



Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ITS-PCR για τις απομονωθείσες ζύμες.

**M:** Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen), **11b.** ACA-DC 5287 Ζύμη Γκερεμέζι, **21** ACA-DC 5288 Ζύμη Γκερεμέζι, **40.** ACA-DC 5290 Ζύμη Γκερεμέζι, **M:** marker

Μετά τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζης και την αλληλούχηση, πραγματοποιήθηκε στοίχιση (alignment) με τον αλγόριθμο blast του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ομαδοποίησης όπως προέκυψε από το rep-PCR και της ταυτοποίησης όπως προέκυψε από την αλληλούχηση της περιχής ITS -PCR

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ACA-DC	ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ITS-PCR
28B ΓΚΕΡ	ACA-DC 5289	ACA-DC 5290	<i>Pichia kudriavzevii/Candida albicans</i>
40 ΓΚΕΡ	ACA-DC 5290		
11B ΓΚΕΡ	ACA-DC 5287	ACA-DC 5287	<i>Pichia kudriavzevii/Issatchenkia orientalis</i>
6 ΓΚΕΡ	ACA-DC 5286	ACA-DC 5288	<i>Kluyveromyces lactis</i>
21 ΓΚΕΡ	ACA-DC 5288		

Συγκριτικά με τα δύο προϊόντα που μελετήθηκαν, μεγαλύτερο μικροβιολογικό ενδιαφέρον παρουσίασε το Γκερεμέζι καθώς σε αυτό υπήρχε πληθώρα μικροοργανισμών ενώ στο Καρίκι δεν αναπτύχθηκαν επαρκώς οι μικροοργανισμοί. Τα γένη *Staphylococcus* και *Enterococcus* για τα βακτήρια και *Pichia*, *Kluyveromyces* για τις ζύμες ήταν αυτά που κυριάρχησαν κατά τις ταυτοποιήσεις.

Συγκριτικά με τους στρεπτόκοκκους, ο *Streptococcus thermophilus*, μαζί με τον *Lactobacillus helveticus*, αποτελεί συχνά εναρκτήρια καλλιέργεια για την παρασκευή πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι, και έχει απομονωθεί από τυριά (Beresford et al., 2001). Η ταυτοποίηση του *Streptococcus mitis* ως βακτήριο της στοματικής κοιλότητας αποτελεί ένδειξη ελλιπούς υγιεινής κατά τη διάρκεια της παρασκευής του (Caufield et al., 2000).

Στους σταφυλόκοκκους τώρα, ο *Staphylococcus epidermidis* είναι συνηθισμένο βακτήριο που αποικεί στο δέρμα και το βλεννογόνο των θηλαστικών και είναι ο κυρίαρχος σταφυλόκοκκος που παρατηρείται στους ανθρώπους. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι υγιείς άνθρωποι φέρουν μεταξύ 10-24 διαφορετικά στελέχη του *S. epidermidis* ανά πάσα στιγμή. Υπάρχει η εικασία ότι ένα προνόμιο της ύπαρξης του *S. epidermidis* στον άνθρωπο είναι η αναχαίτηση άλλων πιο λοιμογόνων βακτηρίων όπως ο *Staphylococcus aureus*. Σε αντίθεση με το *S. aureus* που θεωρείται περισσότερο παθογόνο για τον άνθρωπο, ο κύριος λοιμογόνος παράγοντας που συνδέεται με τον *S. epidermidis* είναι η ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένια (biofilms) και να αποικίζει βιοϋλικά. Αυτό σημαίνει ότι για να μπορέσει να θεραπευτεί ένας ασθενής με προσβεβλημένη συσκευή εντός του σώματός τους από *S. epidermidis* προϋποθέτει την αφαίρεση της συσκευής με ρίσκο για την έκβαση της επέμβασης καθώς και για την μετέπειτα υγεία του (Fey et al., 2010). Ο *Staphylococcus simiae* απομονώθηκε πρώτη φορά το 2000 από τη μαϊμού σκίουρο της Νότιας Αμερικής και έχει μεγάλη φυλογενετική σύνδεση με το *S. aureus*. Ο *S. aureus* είναι ένα γνωστό παθογόνο βακτήριο τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων και έχει αναπτύξει μεγάλη ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά (Suzuki et al., 2012). Ο *S. aureus* είναι από τα πιο σημαντικά μεταδοτικά παθογόνα που προκαλούν μαστίτιδες στα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή. Πρόκειται για ένα ζωοονοσογόνο βακτήριο που η αντιμετώπισή του έχει όχι μόνο οικονομική σημασία στην γαλακτοπαραγωγή αλλά και στην ανθρώπινη υγεία εν γένει. Μελέτες έδειξαν ότι συγκεκριμένα στελέχη του βακτηρίου υπάρχουν στην πρωτογενή παραγωγή αλλά και στην διαδικασία τυροκόμησης. Οι εντεροτοξίνες που παράγει ο *S. aureus* έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν δηλητηριάσεις στους ανθρώπους μέσω των γαλακτοκομικών προϊόντων. Έτσι απαιτούνται πρακτικές και στρατηγικές υγιεινής από την πρωτογενή παραγωγή κι όλας με σκοπό την αποφυγή πιθανής μεταφοράς εντεροτοξινών (παράγονται από το *S. aureus*) στην διαδικασία τυροκόμησης και τελικά στον τελικό καταναλωτή (Kummel et al., 2016).

Ο *Staphylococcus lugdunensis* εντοπίζεται στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Πάραυτα σε πρόσφατες μελέτες έχει ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις τόσο του δέρματος όσο και μαλακών ιστών (Manica et al., 2017).

Η *Candida albicans* ανήκει στο γένος *Candida* το οποίο έχει καταγραφεί ως αλλοιωγόνος μύκητας σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Garnier et al., 2017) όπως π.χ. σε τυρί Mozzarella (Minervini et al., 2001) αλλά και σε συνεκτική γιαούρτη (Rohm et al., 1990).



Ο *Kluyveromyces lactis* απομονώθηκε σε μεγάλους πληθυσμούς σε συμπληρωματική καλλιέργεια στο γάλα από το τυρί Chantale (Π.Ο.Π. στη Γαλλία) ( De Freitas et al., 2008). Μελέτες έδειξαν ότι το στέλεχος *Kluyveromyces lactis* B9 αποτελεί πιθανή προβιοτική ζύμη (Oliveira et al., 2019).

Το κοινό χαρακτηριστικό των τυριών των οποίων μελετήθηκαν ήταν η μη προσθήκη εναρκτήριων καλλιιεργειών. Επομένως το μικροβιολογικό τους φορτίο προέρχεται εξ' ολοκλήρου από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του γάλακτος, τις επιμολύνσεις από το περιβάλλον στον οποίο παρασκευάστηκαν τα τυριά.

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη του τυριού είναι πολύ απαιτητική και μεγάλης σημασίας σε έναν ευρύτερο τομέα της επιστήμης των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η φύση του τυριού είναι τέτοια που προκειμένου να κατασκευαστεί ένα συγκεκριμένο προφίλ, χρειάζεται να εξεταστούν διάφορες ιδιότητες.

Τα τυριά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το Γκερεμέζι από αίγιο γάλα το οποίο χαρακτηρίζεται μαλακό με αλοιφώδη υφή και διαδικασία παραγωγής η οποία διαρκεί 4 μέρες το οποίο μοιάζει με την ξινομυζήθρα. Το Καρίκι είναι σκληρό τυρί από μη παστεριωμένο αγελαδινό γάλα που ωριμάζει για περισσότερο από 2 μήνες.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αντικείμενο έρευνας αποτέλεσε το μικροβιακό φορτίο και οι φυσικοχημικές ιδιότητες παραδοσιακών τυριών από τα νησιά Αίγινα και Τήνο. Οι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν στα δείγματα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης να είναι ικανοποιητικά καθώς κυμάνθηκαν από 95-99 %. Τα κυρίαρχα είδη ζυμών ήταν τα *Pichia kudriavzevii* και *Kluyveromyces lactis* στο Γκερεμέζι ενώ στο Καρίκι η κυριαρχία των βακτηρίων *Lactobacillus* και *Leuconostoc* φαίνεται ότι σχετίζονται με την έντονα πικάντικη γεύση του.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη επιστημονική επαφή με τα τυριά Γκερεμέζι και Καρίκι. Μέσα από μία σειρά αναλύσεων (μικροβιολογικές, φυσικοχημικές) των οποίων τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν πιο πάνω, δημιουργήθηκε μία λεπτομερής εικόνα για το χαρακτηριστικό προφίλ των παραπάνω προϊόντων.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Accolas, J.P., Bloquel, R., Didiene, R., Regnier, J., (1977). Proprietes acidifiantes des bacteries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt 57:1-23.
2. Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis In't Veld, J. H. J., & Ten Brink, B. (1998).
3. Ammor, M. S., Florez, A.B. & Mayo, B. (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 24, 559-570
4. Anyfantaki, E. & Kalatzopoulos, G. (1993) *Dairy*, Edition 1<sup>st</sup>, STamoulis edition
5. Anyfantakis, E.M., (2004) *Chessemaking*, 2nd edition, 51-52
6. Aquilanti, L., Dell'Aquila, L., Zannini, E., Zocchetti, A., & Clementi, F. (2006) Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Lett. Appl Microbiol* 43, 161-167
7. Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11:259-274
8. Bergonzelli, G.E., Blum, S., Brüssli, H., Corthesy-Theulaz, I. (2005). Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? *Digestion.* 71(1), pp. 57-68
9. Bogicevic, B., Fuchsmann, P., Breme, K., Portmann, R., Guggenbuhl, B. & Irnmler, S. (2013). A preliminary study on the effect of *Lactobacillus casei* expressing cystathionine lyase/cystathionine lyase2 on Cheddar cheese and the formation of sulphur containing compounds. *Int. Dairy J.* 33, 97-103
10. Borkova, M., Snaselova. (2005) Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products-review. *Czech J. Food Science*, 41-50
11. Brew, K., 2003. Alpha lactalbumin. In *advanced Dairy Chemistry*, Rds., Fox P. F., Mcsweny, 3<sup>rd</sup> edition, Kluwer Academic, New York
12. Briggiler-Marco, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., & Hynes, E., (2007). Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *J. Dairy Science*90, pp. 4532-4542
13. Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.-C., Pelissier, J.P. & Das, B.C. Complete amino acid sequence of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *FEBS Lett.*, 76 (1977). pp: 274-279
14. Broome, M.C., Powel, I. B & Limsowtin, G. K. Y. (2003). Starter cultures: Specific properties. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol 1 ed. Reginski, H. Fuquay, J.W. & Fox, P. F. 269-275. London Academic Press

15. Buckenhiiskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS microbiol rev* 12, 253-272
16. Califano, A.N., Bevilacqua, A.E., 2000. Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda-type cheese during ripening. *J. Food Comp. Anal.* 13, 949-960
17. Casey, M.G., Haeni, J.P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W., & Wechsler, D. (2006). Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria of Gruyere PDO cheese. *Lait* 86, pp.407-414
18. Caufield, P.W., & Griffen, A.L. (2000) Dental caries. An infectious and transmissible disease. *Pediatric Clinic North America* 47(5)
19. Christensen, J. E., & Steele, J.L. (2003) Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. bacteriol.* 185. Pp. 3297-3306
20. Christensen, J.E. et al., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 217-246
21. Collins, Y. F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acids catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866.
22. Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli L., Soldi, S., Gabrielli, O., 2004. The first biotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38 :80-83
23. Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. & Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait* 85,193-204
24. Curioni P.M.G., Bosset J.O. (2002). Key odorants in various types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12, 959-984
25. Cutter, C. N., Siragusa, G. R., 1994. Efficacy of organic acids against *Echerichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model washer. *J. Food Prot.* 57-97-103
26. De Freitas I., Pinon, N., Berdague, J. L., & Thierry, A. (2008) *Kluyveromyces lactis* but not *Pichia fermentans* used as adjunct culture modifies the olfactory profiles of Cantalet cheese. *Journal of Dairy Science* (2): 531-543
27. Delcour, J. de Vuyst, L., & Shortt, C. (1999). Recombinant dairy starters, probiotics and prebiotics: Scientific, technological and regulatory challenges. *Int. Dairy J. (Special Issue)* 9, 3-80
28. Dimitriadou, M. I., Study of probiotic strains isolated from fermented milk coming from Fiji Islands. Master Thesis, pp 8-9

29. Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M. Jr, Harwalkar, V. R., Jennes, R., McL Whitney, R. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth Revision, Journal of Dairy Science, 67, 1599-1631
30. Farrell, M. H. Jr., Jimerez-Flores, E., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. and Swaisgood, H. E. (2004) ) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth Revision, Journal of Dairy Science,87, 1641-1674
31. Fey, P.D., Olson, M.E., Current concepts in biofl, formation of Staohylococcus epidermidis. Future microbiology, Jun 5 (6): 917-933
32. Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C., Manachini, P.L. Specific identification of Lactobacillus helveticus by PCR with pepC, pepN and htrA targeted primers. (2001). FEMS Microb. Lett. 198(1), p. 85-9
33. Fox, P. F. (1982). Proteolysis in milk and dairy products, 598<sup>th</sup> Meeting Dublin (10), 282-283
34. Fox, P. F., Guinee T.P., Cogan T.M. & McSweeney P.L.H. (2000): Fundamentals of cheese science.
35. Frohlich-Wyder, M., & Bachmann, H. (2004). Cheeses with propionic acid fermentation. Cheese:Chemistry,Physics and Microbiology 2<sup>nd</sup> Edn. Pp. 141-156
36. Gaenzle, M.G., Haase, G., Jelen, P. 2008. Lactose-Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy journal, 18:685-694
37. Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotte, N., Baroncelli, R., & Mounier, J., (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. International Journal of food microbiology, 241, 191-197.
38. Geilman, W.G., 1993. Preparation and properties of syrups made by the hydrolysis of lactose. IDF Bulletin 289, pp.33-37. Brussels, Belgium, International Dairy Federation
39. Gerber-van gulik & Schmid B. R., Fat content of cheese (1973)
40. Giraffa F., Zago M., Bonvini B., Carminati D., 2009. Detection and quantification of Enterococcus gilvus in cheese by real-time PCR, Systematic and Applied Microbiology, 32(7)
41. Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. Research Microbiol 161, 480-487
42. Griffith, M.W., Tellez, A.M., (2013) *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. Front Microbiology. (4) pp.30
43. Guinee, T.P., O'Kennedy, B.T., & Kelly, P.M. (2006) Effect of Milk Protein Standardization Using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. American Dairy Science Association. 89:468-482

44. Guler, Z., 2007. Changes in salted yoghurt during storage. *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 535-564
45. Ivens et al., 2017. Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. *American Dairy Science Association*, 100:1629-1639
46. Karagul-Yuceer Y., Drake, M.A., Cadwallader, K. R., 2003. Aroma-active components of liquid cheddar whey. *Journal of Food Science*, 68(4) :1215-1219
47. Kilic S., Uysal H., Kavas G., Akbulut N., Kesencas H. (2004): Manufacture and some properties of TURKISH Fresh Goat Cheese (*Pakistan J. Biological Sci.* 7 (6) :1037-1039
48. Kimoto, H., Nomura, M., & Suzuki, I. (1999). Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. *International dairy journal*, 9(12), 857-869
49. Kinsella J.E., Whitehead D.M., 1990. Proteins in whey: Chemical, Physical, and Functional properties. In *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 33, pp.379-457
50. Kongo, J.M., & Malcata, F.X. (2012). Azorean traditional cheesemaking: a case study pertaining to a unique food chain. In *Food Chains: New Research*, edited by Melissa A., Jensen & Danielle W. Mueller. Nova Science Publisher Inc, New York
51. Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Vlieg, J.H., Ursing, B., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., & Siezen, R. J. (2002) Flavor formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J* 12, 111-121
52. Krzysciak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Koscielniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Microbiology & Infectious Diseases*, 32(11), 1361-1376
53. Kuipers, O.P., Buist, G., Kok, J., (2000) Current strategies for improving food bacteria. *Res. Microbiol.* 151: 67-78
54. Kummel, J., Stress B., & Ehling-Schulz M., (2016) *Staphylococcus aureus* entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology*
55. Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), pp. 67-78
56. Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science and Technology*, (15)
57. Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748

58. Madureira, A., Tavares T., Gomes A., Pintado M., Malcata F., 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(2). 437-455
59. Manika, L.A., & Cohen P.R., (2017). *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: a case series and review. *Dermatology and Therapy* 7(4): 555-562
60. Manolaki P., Katsiari M. C., Alichanidis E., (2006). Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chem.* 98(4):658-663
61. McSweeney, P.L.H., & Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening. A review. *Lait* 80, 293-324
62. Moser, A., Berthoudm H., Eugster, E., Meile, L., & Irmiler, S. (2017). Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. *Int. Dairy J.* (68), pp. 52-59
63. Oliveira, D.R., Alencar-Lopes, A.C., Pereira, R.A., & Cardoso, P.G., 2019. Selection of potentially probiotic *Kluyveromyces lactis* for the fermentation of cheese whey- based beverage. *Annals of Microbiology.* pp:1361-1372
64. Panesar P. S., John F., Kennedy J.F., Dina N. Gandhi D. N., Bunko K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1):1-14
65. Pidot, S.J., Gao, W., Buutljens, A.H. (2018) Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci. Transl Med.* 1(10): 452
66. Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, *Applied Microbiology Purification and characterization of thermophilim T, a novel bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus ACA-DC 0040.* *Journal of applied Microbiology*, 84(4),568-576
67. Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., & Tzanetakis, N. (2001) Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *Int. of Food Microbiology.* 125-133
68. Rakhmarova, A., Khan, Z.A., Kamran S., 2018. A mini review fermentation and preservation: Role of Lactic Acid Bacteria. *MOJ Food Processing & Technology*, pp.415-418
69. Rank, T.C., Grappin, R., & Olson, N.F (1985) Secondary Proteolysis of cheese during ripening: A review. *J.Dairy Sci.* 94, 4374-4382
70. Rohm, H., Lechner, F., & Lehner, M. (1990). Microflora of Austrian natural-set yogurt. *Journal of Food Protection*, 53(6), 478-480
71. Schnurer, J., Magnusson, J., (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16(1-3) :70-78

72. Sharma, R., Sanodiya, B.S., Bagrodia, D., Pandey, M., Sharma, A., Biesen, P.S., (2012) Efficacy and potential of Lactic acid bacteria modulating human health. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 3(4): 935-948
73. Slaterry, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G.F. (2010) Invited review: *Lactobacillus helveticus*-thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal Dairy Science* 93(10), pp.4435-4454
74. Smit, G., Smit, B.A., & Engels, W.J.M. (2005) Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheeses products. *FEMS Microbio Rev* 29, 591-610
75. Smithers, G. W. (2008) Whey and whey proteins -From gutter-to-gold. *International Dairy Journal*,18,695-704
76. Steele, J., Broadbent, J., Kok., (2013) Perspective on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opin. Biotechnol.* 24(2): 135-141
77. Steele, J.L., (1995). Contribution of lactic-acid bacteria to cheese ripening. In: Malin, E.L., Gibbs, M., Skinner, F.A. (Eds.), *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. Academic Press, London, UK, pp. 65-79
78. Stiles M.E., Holzapfel W.H., *Lactic acid* bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1997
79. Suzuki, H., Lefebure, T., Bitar, P.P., & Stanhope, M.J. (2012). Comparative genomic analysis of the *Staphylococcus aureus* and its newly described sisterspecies *Staphylococcus simiae*. *BMC Genomics*, 2012
80. Swaisgood, H.E. (1992) Chemistry of caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. (edr P.F.Fox), Elsevier Science Publishers LTD, Essex, England, 63-110
81. Tsigros, D., Folland, E., Moate, R. and Brennan, C.S. (2003) Feta cheese texture: the effect of caprine and ovine milk concentration. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 233-236
82. Urbach, G., (1990). Effect of feed on flavor in Dairy foods. *Journal of Dairy Science* 73(12): 3639-3650
83. Viljoen B.C., (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 37-44.
84. Walsh, M., Duncan S., 2000. Milk. Pp 291-310. In *Food Chemistry: Principles and Application*. Christen, Genevieve and Smith, Scott, ed. Science Technology System, West Sacramento
85. Walsta P., Wouters J.T.M. & Geuters T.J., 2005. *Dairy Science and Technology*, Second Edition (CRC, Taylor & Francis Group).
86. Weeney, P.L.H.M.C.S. & Ousa, M. J. S., 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: A review., 80, 293-324



87. Weerkam, A. H., Klijn, N., Neeter, R., & Smit, G. 1996. Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally fermented raw milk products. *Netherlands Milk and Dairy Journal* (Netherlands)
88. Whittier, E.O., 1994. Lactose and its utilization a review. *Journal of Dairy Science*, 27:505-537
89. Wouters, T.M. Jan., Hugenholtz, J., Ayad, H.E.A., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk to fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3):2-14
90. Yu, J., Wang, W.H., Menghe, B.L. (2011) Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented products in Mongolia. *Journal Dairy Science*, 94(7), pp.3229-3241
91. Yvon, M., & Rijnen, L. (2001) Cheese flavor formation by aminoacid catabolism. *Int. Dairy J.* 11, 185-201
92. Zahn, J. A., Hatfield, D.A., Laird, T.T., Hart, Y.S., & DiSpirito, A.A. (2001b). Functional classification of swine manure management systems based on effluent and gas emission characteristics, *J. Environment Qual.* 30: 635-647
93. Zemel, M.B. (2004) Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Americal Journal of Clinical Nutrition*, 79(Suppl.), 907-912
94. Zemel, M.B., 2004. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *American journal of clinical nutrition*, 79(Suppl.): 907-912