



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ. ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ»**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη μικροβιώματος, προσδιορισμός λιπαρών οξέων και ανάλυση
αντιοξειδωτικού συστήματος γάλακτος από ελληνικές φυλές όνων



Μαρία - Άννα Δ. Λαγονίκου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2021**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη μικροβιώματος, προσδιορισμός λιπαρών οξέων και ανάλυση
αντιοξειδωτικού συστήματος γάλακτος από ελληνικές φυλές όνων

“Microbiome research, determination of fatty acids and assessment of
antioxidant system of milk from Greek donkeys”

Μαρία - Άννα Δ. Λαγονίκου

Εξεταστική Επιτροπή:

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
Ελένη Τσιπλάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ
Αναστάσιος Ακτύπης, Λέκτορας ΓΠΑ

Μελέτη μικροβιώματος, προσδιορισμός λιπαρών οξέων και ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος γάλακτος από ελληνικές φυλές όνων

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων. Γαλακτοκομία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα είδη γάλακτος που προέρχονται από μη παραδοσιακά ζώα (όνος, καμήλα, βουβάλι) κερδίζουν ολοένα και περισσότερο την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, κυρίως λόγω της καταλληλότητάς τους να συμπληρώνουν τις ανάγκες ειδικών πληθυσμιακών ομάδων (βρέφη, ηλικιωμένοι). Τα τελευταία χρόνια, το γάλα όνου έχει αποκτήσει μεγάλη προσοχή λόγω της παρόμοιας φυσικοχημικής σύστασής του με εκείνης του ανθρώπινου γάλακτος καθώς και λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του στην ανθρώπινη υγεία. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν επτά δείγματα ναπού γάλακτος όνου, τα οποία συλλέχθηκαν από όλες τις γαλακτοπαραγωγές φάρμες όνων, διασκορπισμένες σε όλη την Ελλάδα. Αρχικά, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κλασσική μικροβιολογική ανάλυση χρησιμοποιώντας επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης με σκοπό την καταμέτρηση των πληθυσμών επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική ανάλυση, ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος και προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA από τα δείγματα για την ταυτοποίηση του μικροβιώματος (βακτήρια και ζύμες/μύκητες) μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αλληλούχης αμπλικονίων. Σύμφωνα με την καταμέτρηση των μικροβιακών ομάδων, αυξημένοι ήταν οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των ψυχρότροφων μικροοργανισμών στην πλειοψηφία των δειγμάτων αλλά και οι πιθανοί μεσόφιλοι κόκκοι, μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και τα εντεροβακτήρια, σε διαφορετικά $\log \text{CFU mL}^{-1}$ στο κάθε δείγμα. Εξαιρέση αποτέλεσαν το δείγμα 7, στο οποίο δεν αναπτύχθηκαν καθόλου ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί και τα δείγματα 5 και 6, στα οποία απουσίαζαν τα εντεροβακτήρια. Έπειτα από την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τη χρήση μοριακών μεθόδων, το 54 % των απομονώσεων ταυτοποιήθηκαν ως οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria ; LAB) και συγκεκριμένα ανήκαν στα γένη *Enterococcus*, *Lactocaseibacillus*, *Pediococcus*, *Lentilactobacillus* και *Leuconostoc*. Μεγάλο ποσοστό συμμετοχής στην διαμόρφωση του μικροβιώματος του γάλακτος όνου καταλαμβάνουν ακόμα τα γένη *Staphylococcus* και *Enterobacter*. Όσον αφορά τις ζύμες, στα δείγματα ταυτοποιήθηκαν μόνο τρία είδη ζυμών, και συγκεκριμένα τα είδη *Cutaneotrichosporon curvatum*, *Wickerhamiella pararugosa* και *Cutaneotrichosporon cutaneum*. Σε αντίθεση με την κλασσική μικροβιολογική ανάλυση, από τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης προκύπτει ότι το μικροβιακό προφίλ του συγκεκριμένου είδους γάλακτος είναι πλούσιο όχι μόνο σε βακτήρια αλλά και ζύμες/μύκητες. Μεταξύ των 100 ειδών ζυμών/μυκήτων, ανιχνεύθηκαν γένη που παρουσιάζουν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον, όπως τα γένη *Kluyveromyces* και *Penicillium*, αλλά και γένη με ανεπιθύμητες επιπτώσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στις βιομηχανίες τροφίμων, όπως τα γένη *Eurotium*, *Alternaria* και *Aspergillus*. Τα βακτήρια που βρέθηκαν μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης σχετίζονται με βακτήρια που απαντώνται στο γάλα αλλά και στο έδαφος, το νερό και τα φυτά. Ακόμα, η μεταγονιδιωματική ανάλυση επιβεβαιώνει την παρουσία των LAB, και συγκεκριμένα των γενών *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* και *Streptococcus*. Μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης δεν βρέθηκε το γένος *Pediococcus*, το οποίο ταυτοποιήθηκε μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης ενώ μέσω της ανάλυσης αυτής δεν ταυτοποιήθηκε το γένος *Streptococcus*. Η ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων ανέδειξε πως το παλμιτικό οξύ μαζί με τα λιπαρά οξέα (ΛΟ) μικρής και μεσαίας αλυσού (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}) αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των κορεσμένων ΛΟ. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το γάλα όνου είναι πλούσιο σε ακόρεστα ΛΟ, κυρίως σε μονοακόρεστα

ΛΟ. Το βασικό ΛΟ των δειγμάτων αποτέλεσε το ελαιϊκό οξύ, με εξαίρεση το δείγμα 3, στο οποίο το κυρίαρχο ΛΟ ήταν το παλμιτικό οξύ. Σχετικά με τα πολυακόρεστα ΛΟ, κύριοι εκπρόσωποι ήταν το λινελαϊκό οξύ και το α-λινολενικό οξύ. Τέλος, σύμφωνα με την ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος τα δείγματα παρουσίασαν διαφορές ως προς το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο, δεδομένου ότι αυτό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η διατροφή των όνων. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αποτύπωση του μικροβιώματος (βακτήρια και ζύμες/μύκητες) δειγμάτων νωπού γάλακτος όνου από όλες τις γαλακτοπαραγωγές φάρμες όνων στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας μία ολιστική προσέγγιση που συνδυάζει την κλασική μικροβιολογική και την μεταγονιδιωματική ανάλυση αλληλούχησης αμπλικονίων. Εκτός αυτού, μία ακόμα πρωτοτυπία αυτής της μελέτης αποτελεί η πραγματοποίηση αναλύσεων που σχετίζονται με την ποιότητα του γάλακτος όνου, και συγκεκριμένα η ανάλυση του προφίλ των ΛΟ αλλά και του αντιοξειδωτικού συστήματος, καλύπτοντας όλες τις γαλακτοπαραγωγές φάρμες της Ελλάδος.

Επιστημονική περιοχή: Γάλα όνου

Λέξεις κλειδιά: γάλα όνου, κλασική μικροβιολογική ανάλυση, μεταγονιδιωματική ανάλυση, φυσικοχημική ανάλυση, προφίλ λιπαρών οξέων, αντιοξειδωτική ικανότητα

Microbiome research, determination of fatty acids and assessment of antioxidant system of milk from Greek donkeys

MSc in Current Food Technology. Dairy Science
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Dairy Research

ABSTRACT

Milks from non-traditional animal species (donkey, camel, buffalo) are increasingly gaining the attention of the scientific community, mainly due to the fact that they are considered suitable to supplement the needs of special population groups (infants, the elderly). In recent years the attention on donkey milk has increased because of its similar physicochemical composition to human milk and its beneficial effects on human health. In the present study, seven raw donkey milk samples collected from all the dairy farms throughout Greece. Samples were initially subjected to the classical microbiological analysis using selective growth media and culture conditions in order to count selected microbial groups. In the meantime, the samples undergo physicochemical analysis, assessment of the antioxidant system and determination of fatty acid profile. Afterwards, total DNA was extracted from all samples to identify the microbiome (bacteria and yeast/fungi) through amplicon-based metagenomics analysis. The colony count method of raw donkey milk samples revealed increased populations of total mesophilic flora and psychrotrophic microorganisms in the majority of the samples. Also high presumptive mesophilic cocci, mesophilic lactobacilli and *Enterobacteriaceae* populations were counted, in different counts in each sample. An exception in this study was the sample 7, in which no psychrotrophic microorganisms were grown. *Enterobacteriaceae* populations were also absent in samples 5 and 6. Based on molecular techniques, 54% of the isolates were identified as Lactic Acid Bacteria (LAB), in particular belonging to the genera *Enterococcus*, *Lactocaseibacillus*, *Pediococcus*, *Lentilactobacillus* and *Leuconostoc*. The genera *Staphylococcus* and *Enterobacter* still occupy a large percentage of milk microbiome. Regarding yeasts, *Cutaneotrichosporon curvatum*, *Wickerhamiella pararugosa* and *Cutaneotrichosporon cutaneum*, were the only three species identified. In contrast to classical microbiological analysis, the results of metagenomic analysis showed the rich microbial profile of donkey milk of bacteria and yeasts/fungi. Among the 100 species of yeasts/fungi which were detected, there were genera with technological interest, such as the genera *Kluyveromyces* and *Penicillium*, and genera with adverse effects on both human health and food industry, such as the genera *Eurotium*, *Alternaria* and *Aspergillus*. Concerning bacteria found, they are associated with bacteria found in milk as well as in soil, water and plants. Furthermore, metagenomics analysis confirms the presence of LAB, specifically the genera *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus*. The genus *Pediococcus* which was identified through the classical microbiological analysis, was not found through the metagenomics analysis, while the genus *Streptococcus* was not identified through the classical microbiological analysis. The analysis of the fatty acid profile revealed that the palmitic acid, the short and medium chained fatty acids (FA) (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}) constitute the largest part of saturated fatty acids. Furthermore, the donkey milk samples were characterized by a high unsaturated fatty acids content, mainly monounsaturated fatty acids. The basic FA of the samples was oleic acid, apart from sample 3, in which the predominant fatty acid was palmitic acid. Regarding polyunsaturated fatty acids, the most abundant fatty acids were linoleic acid and α -linolenic acid. Finally, according to the assessment of the antioxidant system, differences were observed in the samples for the antioxidant content, as this is influenced by many factors such as the effect of different feeding strategies. This is the first report on the microbiome (bacteria and yeasts/fungi) of raw donkey milk from all Greek dairy farms by a holistic approach combining both classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses. In addition, another

innovation of the research was the implementation of analyses which are related to the quality of milk, specifically the determination of the fatty acid profile and the antioxidant system, covering all the dairy farms of Greece.

Scientific area: Donkey milk

Keywords: donkey milk, classical microbiological analysis, metagenomic analysis, physicochemical analysis, fatty acid profile, antioxidant capacity

*Στην οικογένειά μου,
Αλεξάνδρα, Δημήτριο και Θίσβη*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μελέτης βασίζεται στη συνεργασία ενός συνόλου ατόμων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθένα ξεχωριστά.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κα. Έφη Τσακαλίδου για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποκομίσω μια σπουδαία ερευνητική εμπειρία και φυσικά για την επιστημονική καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Η κα. Τσακαλίδου στάθηκε δίπλα μου ακόμα και στις πιο δύσκολες στιγμές εν μέσω κορωνοϊού, αντιμετώπιζε τις δυσκολίες και μου έδινε κίνητρο για να προχωρήσω.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, κα. Ελένη Τσιπλάκου όχι μόνο για την διάθεση συνεργασίας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής με το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών αλλά και για την πρόσβαση μου στον εργαστηριακό χώρο καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και υποστήριξη της κατά τη διάρκεια της μελέτης μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Μεταδιδάκτορα Μαρία Κάζου για όλο το χρόνο που μου αφιέρωσε, για την υπομονή και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε απλόχερα. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης καθώς ανά πάσα στιγμή ήταν διαθέσιμη για όποια απορία ή δυσκολία αντιμετώπιζα.

Σημαντικό μερίδιο στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης κατέχει ο Μεταδιδάκτορας Αλέξανδρος Μαυρομμάτης εξαιτίας των γνώσεων, των συμβουλών και της βοήθειας που μου παρείχε σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Χρύσα, την Λένα, την Παναγιώτα και την Αγγελική για τη συνεργασία τους και τις ευχάριστες στιγμές στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας.

Ευχαριστώ ακόμα τον Λέκτορα του ΓΠΑ, κο. Αθανάσιο Ακτύπη, που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζουν οι γονείς μου, Δημήτριος και Αλεξάνδρα, και η αδελφή μου Θίσβη, που με στηρίζουν ηθικά και οικονομικά όλα αυτά τα χρόνια, δίνοντάς μου κουράγιο να προχωρώ και να αντιμετωπίζω κάθε εμπόδιο για να φτάσω στο στόχο μου.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

3'-SL: 3-sialyllactose

6'-SL: 6-sialyllactose

α -La: α -lactalbumin

β -Lg: β -lactoglobulin

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

BSA: Bovine Serum Albumin

C_{18:2}: Linoleic Acid

C_{18:3}: Linolenic Acid

CAT: Catalase

CP: Carbonyls Protein

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

DPPH-H: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction

EtBr: Ethidium Bromide

FAO: Food and Agriculture Organization

Fe(II): Divalent iron

Fe(III): Trivalent iron

FeCl₃: Ferric Chloride

FID: Flame Ionization Detector

FISH: Fluorescent *in situ* Hybridization

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma

GES: Guanidium thiocyanate EDTA sarkosyl

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSH: Reduced glutathione

GSSG: Oxidized glutathione

H₂O₂: hydrogen peroxide

HTS: High Throughput Sequencing

ITS: Internal Transcribed Spacer

LA: Linoleic acid

ALA: α -Linolenic acid
LAB: Lactic Acid Bacteria
LSU: Large subunit
MDA: Malondialdehyde
MUFA: Monounsaturated Fatty Acids
NGS: Next Generation Sequencing
NSLAB: Non-Starter Lactic Acid Bacteria
OD: Optical Density
 $O_2^{\bullet-}$: Superoxide anion
 OH^{\bullet} : Hydroxyl radical
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids
RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction
REP: Repetitive Extragenic Palindromic
rep-PCR: Repetitive Sequence Based-Polymerase Chain Reaction
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms
ROS: Reactive Oxygen Species
rRNA: ribosomal RNA
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
SFA: Saturated Fatty Acids
SNF: Solids Not Fats
SOD: Superoxide dismutase
SSCP: Single Stranded Conformation Polymorphisms
SSU: Small subunit
TBA: Thiobarbituric Acid
TCA: Trichloroacetic Acid
TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TFA: Total Fatty Acids
TS: Total Solids
TPTZ: Tris-pyridyl-s-triazine
USFA: Unsaturated Fatty Acids
VBNC: Viable But Not Culturable
WHO: World Health Organization
XOD: Xanthine oxidase

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1 Παγκόσμια παραγωγή και κατανάλωση γάλακτος.....	14
1.2 Ιστορία γάλακτος όνου.....	15
1.3 Διατροφική αξία γάλακτος όνου.....	16
1.3.1 Φυσικοχημική σύσταση γάλακτος όνου.....	17
1.3.1.1 Πρωτεϊνικό κλάσμα.....	18
1.3.1.2 Λίπος.....	19
1.3.1.3 Υδατάνθρακες.....	20
1.3.1.4 Βιταμίνες.....	21
1.3.1.5 Άλατα.....	22
1.3.2 Συσχέτιση γάλακτος όνου με την υγεία του ανθρώπου και πιθανές ευεργετικές ιδιότητες.....	23
1.4 Χρήσεις γάλακτος όνου.....	24
1.5 Αντιοξειδωτικές ενώσεις και η δράση τους.....	26
1.6 Το μικροβίωμα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.....	28
1.6.1 Βακτήρια.....	28
1.6.1.1 Ωφέλιμοι μικροοργανισμοί.....	28
1.6.1.1α Προ-τεχνολογικοί μικροοργανισμοί.....	29
1.6.1.1β Προβιοτικοί μικροοργανισμοί.....	31
1.6.1.2 Αλλοιωγόνιοι μικροοργανισμοί.....	32
1.6.1.3 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	33
1.6.2 Ζύμες και Μύκητες.....	35
1.6.3 Το μικροβίωμα του γάλακτος όνου.....	36
1.7 Μικροβιολογικές μέθοδοι.....	37
1.7.1 Culture-dependent methods: Κλασσική μικροβιολογική ανάλυση.....	37
1.7.2 Culture-independent methods: Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	39
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1 Συλλογή δειγμάτων γάλακτος όνου.....	45

3.2 Προσδιορισμός της χημικής σύστασης και οξύτητας (pH) των δειγμάτων	45
3.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων.....	46
3.3.1 Εκχύλιση λίπους.....	46
3.3.2 Μεθυλεστεροποίηση λίπους.....	46
3.3.3 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία.....	47
3.4 Ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος.....	47
3.4.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	47
3.4.1.1 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).....	48
3.4.1.2 Καταλάση (CAT).....	49
3.4.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).....	50
3.4.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).....	51
3.4.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.....	52
3.4.2.1 Μέθοδος FRAP.....	52
3.4.2.2 Μέθοδος ABTS.....	54
3.4.2.3 Μέθοδος DPPH.....	55
3.4.3 Οξειδωτικοί δείκτες.....	56
3.4.3.1 Μέθοδος μηλονικής αλδεΐδης (MDA).....	56
3.4.3.2 Μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC).....	57
3.4.4 Στατιστική ανάλυση.....	58
3.5 Καταμέτρηση πληθυσμών και απομόνωση αποικιών.....	59
3.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών.....	61
3.6.1 Απομόνωση DNA.....	61
3.6.1.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα βακτηρίων.....	61
3.6.1.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα ζυμών.....	62
3.6.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του DNA.....	64
3.6.3 Ενίσχυση DNA με την μέθοδο της rep-PCR.....	65
3.6.3.1 Ενίσχυση DNA με την μέθοδο της rep-PCR σε βακτήρια.....	65
3.6.3.2 Ενίσχυση DNA με την μέθοδο της rep-PCR σε ζύμες.....	66
3.6.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	67
3.6.5 Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Bionumerics.....	68
3.6.6 Αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων και της περιοχής ITS των ζυμών.....	69
3.6.6.1 Αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων.....	69
3.6.6.2 Αλληλούχηση της περιοχής ITS των ζυμών.....	70

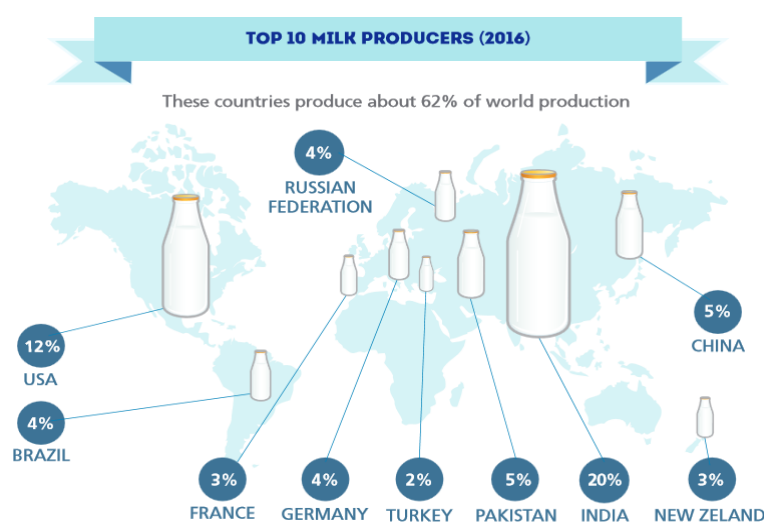
3.6.7 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	71
3.6.8 Ταυτοποίηση στελεχών.....	72
3.6.9 Στατιστική ανάλυση.....	72
3.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	72
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	75
4.1 Χημική σύσταση και pH.....	75
4.2 Λιπαρά οξέα.....	76
4.3 Αντιοξειδωτικό σύστημα.....	80
4.4 Μικροβιολογική ανάλυση.....	86
4.4.1 Καταμέτρηση πληθυσμών.....	86
4.4.2 Απομόνωση αποικιών.....	92
4.4.3 Ομαδοποίηση βακτηρίων και ζυμών.....	93
4.4.4 Ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA.....	97
4.4.5 Ταυτοποίηση ειδών ζυμών μέσω αλληλούχησης της ITS περιοχής.....	101
4.4.6. Στατιστική ανάλυση.....	103
4.5 Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	104
4.5.1 Βακτήρια.....	104
4.5.2 Ζύμες/Μύκητες.....	109
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	113
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	115
6.1 Ξένη Βιβλιογραφία.....	115
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	125
6.3 Ιστοσελίδες.....	126
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	127

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παγκόσμια παραγωγή και κατανάλωση γάλακτος

Το γάλα είναι ένα τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας καθώς περιέχει θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τη διατροφή του ανθρώπου (πρωτεΐνες, λίπος, υδατάνθρακες, βιταμίνες, άλατα). Η κατανάλωση του γάλακτος διαφέρει μεταξύ των χωρών εξαιτίας των διαφορετικών διατροφικών συνηθειών, των προτιμήσεων των καταναλωτών αλλά και των πολιτιστικών και θρησκευτικών παραδόσεων. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization, FAO; 2020), η κατά κεφαλήν κατανάλωση του γάλακτος είναι υψηλή (>150 kg/κατά κεφαλή/έτος) στην Αργεντινή, την Αρμενία, την Αυστραλία, την Κόστα Ρίκα, την Ευρώπη, το Ισραήλ, το Κιργιστάν, τη Βόρεια Αμερική και το Πακιστάν. Μέση κατανάλωση γάλακτος (30 έως 150 kg/κατά κεφαλή/έτος) σημειώνουν η Ινδία, η Ισλαμική Δημοκρατία του Ιράν, η Κένυα, το Μεξικό, η Μογγολία, η Νέα Ζηλανδία, η Βόρεια και Νότια Αφρική, το μεγαλύτερο μέρος της Εγγύς Ανατολής, το μεγαλύτερο μέρος της Λατινικής Αμερικής και η Καραϊβική. Στις περιοχές με χαμηλή κατανάλωση (<30 kg/κατά κεφαλή/έτος) συγκαταλέγονται το Βιετνάμ, η Σενεγάλη, το μεγαλύτερο μέρος της Κεντρικής Αφρικής και το μεγαλύτερο μέρος της Ανατολικής και Νοτιοανατολικής Ασίας (FAO, 2020).

Ο γαλακτοκομικός τομέας αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους και σημαντικότερους παραγωγικούς κλάδους σε παγκόσμιο επίπεδο. Ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου δυναμικού ασχολείται με την παραγωγή γάλακτος. Στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 1) παρουσιάζονται οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος.



Σχήμα 1: Χώρες με τη μεγαλύτερη γαλακτοπαραγωγή (Πηγή: FAO, 2018)

Στο Σχήμα 1 φαίνεται ότι η χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος για το έτος 2016 ήταν η Ινδία, ακολουθούμενη από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), την Κίνα, το Πακιστάν και τη Βραζιλία. Συγκεκριμένα, η Ινδία είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή βουβαλίσσιου γάλακτος, το οποίο αποτελεί περίπου το 50 % της εγχώριας παραγωγής της (Hegde, 2019). Οι ΗΠΑ, οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και η Ινδία είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο μέρος (περίπου το 70 %) της παγκόσμιας παραγωγής αγελαδινού γάλακτος (Statista, 2019). Οι Μεσογειακές χώρες συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην παραγωγή γάλακτος και συγκεκριμένα στην παραγωγή πρόβειου και αίγειου γάλακτος (FAO, 2018).

Η παραγόμενη ποσότητα γάλακτος, σε παγκόσμιο επίπεδο, οφείλεται σχεδόν εξ ολοκλήρου στο αγελαδινό, στο βουβαλίσιο, στο αίγειο, στο πρόβειο και στο καμηλίσιο γάλα. Συγκεκριμένα, το αγελαδινό γάλα αντιπροσωπεύει το 81 % της παγκόσμιας παραγωγής. Στη δεύτερη θέση βρίσκεται το βουβαλίσιο γάλα (15 %), ακολουθούμενο από το κατσικίσιο (2 %), το πρόβειο (1 %) και τέλος το γάλα καμήλας με ποσοστό συμμετοχής 0,5 %. Το υπόλοιπο 0,5 % προέρχεται από γιαιά και από είδη της οικογένειας Equidae (άλογα και όνους) (FAO, 2020).

1.2 Ιστορία γάλακτος όνου

Ο όνος ανήκει στο γένος *Equus* της οικογένειας των ιππιδών (Equidae) και θεωρείται ότι προέρχεται από το άγριο Αφρικάνικο είδος *Equus asinus*, η εξημέρωση του οποίου άρχισε το 6.000 π.Χ στη Βόρεια Αφρική (Madhusudan *et al.*, 2017) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: *Equus asinus* (Πηγή: Natural.History.Notebooks.gr)

Η ιστορία του γάλακτος όνου ξεκινάει από την αρχαιότητα. Κατά το 400 π.Χ, ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής, συνιστούσε το γάλα όνου για την καταπολέμηση πολλών προβλημάτων της υγείας, όπως τις ασθένειες του ήπατος, τις μολυσματικές ασθένειες, τον πυρετό, το οίδημα, τις ρινορραγίες, τις δηλητηριάσεις και τις πληγές. Ομοίως, ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος το συνιστούσε για τις δηλητηριάσεις, τον πυρετό, την κόπωση, τα αδύναμα δόντια, το έλκος, το άσθμα, και για ορισμένες γυναικολογικές παθήσεις (Holloway, 2014). Σύμφωνα με τον Schwarez (2017), στην Αρχαία Αίγυπτο η βασίλισσα Κλεοπάτρα έκανε καθημερινά μπάνιο με γάλα όνου για την φροντίδα του δέρματος της. Στα ταξίδια της συνοδευόταν από 700 όνους για να εξασφαλίζεται αυτή η διαδικασία. Ακόμα, η δεύτερη σύζυγος του Ρωμαίου Αυτοκράτορα Νέρωνα, Poppea Sabina, ακολουθούσε το ίδιο μυστικό ομορφιάς και νεότητας με την Κλεοπάτρα. Περίπου το 1880, σε νοσοκομείο του Παρισιού χρησιμοποιήθηκε γάλα όνου, σε ερευνητικό στάδιο, για την ανάρρωση παιδιών με μεταδοτικές ασθένειες. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το γάλα όνου έχει καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με το πρόβειο και το αγελαδινό γάλα στην καταπολέμηση των μεταδοτικών ασθενειών στα παιδιά (latte.history.gr). Με το πέρασμα των χρόνων, το γάλα όνου εξακολουθούσε να αναγνωρίζεται για τις ευεργετικές ιδιότητές του. Κατά το 19^ο αιώνα, οι ανώτερες κοινωνικές τάξεις κατανάλωναν γάλα όνου ενώ οι λιγότερο ευκατάστατες οικογένειες το αποθήκευαν και το χρησιμοποιούσαν σε περιπτώσεις που το χρειαζόταν ένα άρρωστο παιδί ή ένας άρρωστος ηλικιωμένος. Ταυτόχρονα, άρχισε η χρήση του γάλακτος όνου σε νοσοκομεία μητρότητας ως τροφή για βρέφη. Τέλος, μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, το γάλα όνου διατίθενταν στην αγορά ως τροφή για ορφανά βρέφη, άρρωστα παιδιά, ενήλικες και ηλικιωμένους (Aspri *et al.*, 2016b).

1.3 Διατροφική αξία γάλακτος όνου

Σε σύγκριση με το γάλα των μηρυκαστικών ζώων, το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς από την επιστημονική κοινότητα, το γάλα όνου έχει μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον και οι επενδύσεις κεφαλαίων για το γάλα όνου έχουν σημειώσει σημαντική αύξηση εξαιτίας της σύστασής του, η οποία είναι παρόμοια με εκείνη του ανθρώπινου γάλακτος (Chiofalo *et al.*, 2015). Τις τελευταίες δεκαετίες μάλιστα γίνονται προσπάθειες τόσο για την αποκατάσταση της βιοποικιλότητας και τη διάσωση ορισμένων φυλών όνων που έχουν σχεδόν εξαφανιστεί όσο και για την διεξοδικότερη έρευνα για το γάλα όνου. Λόγω της αύξησης των τροφικών αλλεργιών, υπάρχει αυξημένη ανάγκη για ένα «φυσικό» γάλα, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του αγελαδινού γάλακτος σε περίπτωση νεογνών που εμφανίζουν αλλεργίες στις πρωτεΐνες του

(Martini *et al.*, 2018). Το γάλα όνου συνιστάται για αυτές τις περιπτώσεις και αυτός είναι και ένας από τους βασικούς λόγους που βρίσκεται στο προσκήνιο των ερευνητικών μελετών την τελευταία δεκαετία (Marletta *et al.*, 2016).

1.3.1 Φυσικοχημική σύσταση γάλακτος όνου

Η χημική σύσταση του γάλακτος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, ένας από τους οποίους είναι το είδος του ζώου. Συνεπώς, τα συστατικά του γάλακτος διαφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά μεταξύ των διαφόρων ειδών ζώων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Φυσικοχημική σύσταση γάλακτος ανά είδος ζώου (Πηγή: Polidori *et al.*, 2009; Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014; Bhosale *et al.*, 2009; Giacometti *et al.*, 2016; Cavallarini *et al.*, 2015)

Συστατικό/ pH	Γάλα όνου (% w/w)	Ανθρώπινο γάλα (% w/w)	Αίγαιο γάλα (% w/w)	Πρόβειο γάλα (% w/w)	Αγελαδινό γάλα (% w/w)
Πρωτεΐνες	1,4-2,2	0,8-1,9	2,5-5,2	4,5-7,0	3,0-3,9
Λίπος	0,1-1,8	2,1-5,2	3,0-7,2	5,0-9,0	2,5-5,4
Λακτόζη	5,8-7,4	6,3-9,0	3,2-6,3	3,7-5,0	3,6-5,6
Τέφρα	0,3-0,9	0,2-0,3	0,7-1,1	0,7-1,0	0,6-0,9
Ολικά στερεά	8,5-11,7	10,7-12,9	11,9-16,3	15,2-20,0	10,5-13,5
pH	7,0-7,3	7,0-7,5	6,2-6,6	6,6-6,7	6,6-6,8

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα, το γάλα όνου διαφέρει από το γάλα των μηρυκαστικών ζώων, καθώς η περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνη είναι χαμηλή, και εξαιτίας του μεγαλύτερου ποσοστού λακτόζης που περιέχει. Ωστόσο, το γάλα όνου μοιάζει πολύ με το ανθρώπινο γάλα, τόσο στο πρωτεϊνικό προφίλ όσο και στην περιεκτικότητα σε λακτόζη (Martini *et al.*, 2018).

1.3.1.1 Πρωτεϊνικό κλάσμα

Ένα από τα κύρια συστατικά του γάλακτος, που έχει υψηλή διατροφική αξία και μοναδικές ιδιότητες από τεχνολογικής άποψης, είναι οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων που διαφέρουν μεταξύ τους φυσικοχημικά και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες του ορού.

Στο γάλα όνου η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι χαμηλή (1,4-2,2 % w/w) σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (3,0-3,9 % w/w). Ωστόσο είναι παρόμοια με το ανθρώπινο γάλα (0,8-1,9 % w/w). Το πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος όνου είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες ορού, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 35-50% του αζωτούχου κλάσματος, ενώ στο αγελαδινό γάλα αντιπροσωπεύουν μόνο το 20%. Συγκεκριμένα, ο λόγος καζεΐνης/πρωτεΐνες ορού είναι 52/37 και κυμαίνεται μεταξύ των χαμηλότερων ορίων για το ανθρώπινο και των υψηλότερων για το αγελαδινό γάλα (Aspri *et al.*, 2016b). Για τις καζεΐνες του γάλακτος όνου έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες. Παρόλα αυτά, εξαιτίας των πρόσφατων εξελίξεων στην πρωτεωμική τεχνολογία, έχουν ταυτοποιηθεί και τα 4 καζεϊνικά κλάσματα (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, και κ -καζεΐνη). Σύμφωνα με τους Martini *et al.* (2018), η β -καζεΐνη είναι η κυρίαρχη καζεΐνη τόσο στο γάλα όνου όσο και στο ανθρώπινο. Αντίθετα, η α_{s1} -, και η κ -καζεΐνη βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο γάλα όνου. Ακόμα, η ποσότητα της καζεΐνης τύπου γ είναι μεταβλητή, πιθανώς λόγω δράσης των ενδογενών πρωτεασών του γάλακτος, όπως η πλασμίνη, στη β -καζεΐνη (Salimei & Fantuz, 2012)

Πίνακας 2: Πρωτεϊνικά προφίλ γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων (Πηγή: Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2019a; Salimei & Fantuz, 2012)

Πρωτεΐνη	Γάλα όνου (% w/w)	Ανθρώπινο γάλα (% w/w)	Αίγιο γάλα (% w/w)	Πρόβειο γάλα (% w/w)	Αγελαδινό γάλα (% w/w)
Καζεΐνες	0,6-1,0	0,2-0,4	2,3-4,6	4,1-6,6	2,4-2,8
α_{s1} -καζεΐνη	Παρουσία	0,07-0,08	0,1-1,3	0,3-2,2	0,8-1,1
α_{s2} -καζεΐνη	Παρουσία	-	0,2-1,1	0,5-1,1	0,2-0,4
β -καζεΐνη	Παρουσία	0,2-0,3	0,1-3,0	1,5-2,9	0,7-0,9
κ -καζεΐνη	Παρουσία	0,01-0,03	0,2-1,3	0,3-1,1	0,2-0,4
γ -καζεΐνη	Παρουσία	-	0,15-0,18	0,3-0,6	0,08-0,2
Πρωτεΐνες ορού	0,5-0,9	0,6-0,8	0,3-1,2	0,8-1,6	0,5-0,7
β -Lg	0,18-0,34	-	0,1-0,5	0,3-0,8	0,1-0,4
α -La	0,1-0,2	0,1-0,3	0,07-0,2	0,10-0,49	0,10-0,15

Αλβουμίνη ορού	0,036-0,04	0,04-0,05	0,015-0,025	0,04-0,06	0,03-0,04
Ανοσοσφαιρίνες	0,06-0,13	0,06-0,2	0,003-0,03	0,05-0,07	0,05-0,1
Λακτοφερρίνη	0,007-0,04	0,1-0,2	0,002-0,03	0,07-0,09	0,002-0,05
Λυσοζύμη	0,1-0,14	0,01-0,08	$250 \cdot 10^{-7}$	$100 \cdot 10^{-7}$	$(70-600) \cdot 10^{-7}$

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ορού στο γάλα όνου είναι υψηλή (Πίνακας 2). Οι περισσότερες από τις υποτιθέμενες διατροφικές ιδιότητες αυτού του είδους γάλακτος μπορούν να αποδοθούν σε αυτό το κλάσμα, το οποίο αποτελείται κυρίως από β-γαλακτογλοβουλίνη (β-lactoglobulin, β-Lg), α-γαλακτοαλβουμίνη (α-lactalbumin, α-La) και λυσοζύμη. Επίσης, υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες ανοσοσφαιρίνες, αλβουμίνη ορού και λακτοφερρίνη (Lf). Η πιο άφθονη πρωτεΐνη ορού στο γάλα όνου είναι η β-Lg, η οποία απουσιάζει από το ανθρώπινο γάλα (Marletta *et al.*, 2016). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι σε σύγκριση με το ανθρώπινο γάλα, το γάλα όνου έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λυσοζύμη (1 g/L), η οποία στο αίγιο, το πρόβειο και το αγελαδινό γάλα υπάρχει σε ίχνη, σύμφωνα με τον Πίνακα 2.

1.3.1.2 Λίπος

Ένα ακόμα κύριο συστατικό του γάλακτος με μεγάλη οικονομική και διατροφική σημασία αποτελεί το λίπος του. Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος όνου είναι πολύ χαμηλή (0,3-1,8 % w/w). Το συγκεκριμένο κλάσμα του γάλακτος θεωρείται παρόμοιο με του ανθρώπινου γάλακτος (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Προφίλ λιπαρών οξέων γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων (Πηγή: Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014)

Λίπος	Γάλα όνου (% των συνολικών ΛΟ)	Ανθρώπινο γάλα (% των συνολικών ΛΟ)	Αίγιο γάλα (% των συνολικών ΛΟ)	Πρόβειο γάλα (% των συνολικών ΛΟ)	Αγελαδινό γάλα (% των συνολικών ΛΟ)
SFA ^a	44-68	35-57	57-78	47-80	52-76
MUFA ^b	15-35	17-45	10-36	13-39	18-34
PUFA ^c	11-30	8,0-31	0,5-8,0	2,4-9,0	2,0-6,0

^a Saturated Fatty Acids

^b Monounsaturated Fatty Acids

^c Polyunsaturated Fatty Acids

C _{18:2} ^a	3,5-15	6,0-26	0,1-6,0	1,6-4,6	1,4-3,1
C _{18:3} ^b	2,1-16,3	0,5-3,4	0,2-1,2	0,35-2,7	0,3-1,8

Πιο αναλυτικά, το λίπος του γάλακτος όνου περιέχει υψηλή αναλογία ελεύθερων λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων. Επιπλέον είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) (λινολεϊκό και λινολενικό οξύ) (Faye, 2016). Σχετικά με τα ω-λιπαρά οξέα, ο λόγος ω-6/ω-3 ΛΟ στο γάλα όνου είναι χαμηλός (Martemucci & D'Alessandro, 2012). Η περιεκτικότητα σε κορεσμένα ΛΟ (Saturated Fatty Acids, SFA) είναι παρόμοια με την αντίστοιχη περιεκτικότητα στο ανθρώπινο (περίπου 57 και 45 g/100 g λίπους, αντίστοιχα) και χαμηλότερη από την περιεκτικότητα στο αγελαδινό γάλα (περίπου 71 g/100 g λίπους). Όσον αφορά στα ακόρεστα ΛΟ (Unsaturated Fatty Acids, USFA), η ποσότητα τους στο γάλα όνου είναι παρόμοια με αυτήν στο ανθρώπινο (περίπου 43 και 55 g/100 g λίπους, αντίστοιχα) και υψηλότερη από αυτήν στο αγελαδινό γάλα (περίπου 29 g/100 g λίπους). Ο λόγος USFA/SFA παρουσιάζει τιμές (0,75) ενδιάμεσες μεταξύ ανθρώπινου (1,22) και αγελαδινού γάλακτος (0,41) (Martini *et al.*, 2018). Τέλος, αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι στο λίπος του γάλακτος όνου οι τιμές αθηρογόνων και θρομβογόνων δεικτών είναι χαμηλές (Martemucci & D'Alessandro, 2012)

1.3.1.3 Υδατάνθρακες

Ο κύριος υδατάνθρακας του γάλακτος είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη. Η συγκέντρωση της λακτόζης στο γάλα επηρεάζεται από το είδος του ζώου. Το γάλα όνου έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη (5,8-7,4 % w/w). Η συγκέντρωση αυτή είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση στο αγελαδινό και το πρόβειο (3,5-5,5 % w/w) αλλά παρόμοια με το ανθρώπινο γάλα (6,3-9,0 % w/w). Η υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη είναι υπεύθυνη για την ωραία γεύση του γάλακτος όνου αλλά και για κάποιες από τις ευεργετικές του ιδιότητες οι οποίες παρουσιάζονται σε επόμενη ενότητα (Ενότητα 1.3.2) (Madhusudan *et al.*, 2017). Ακόμα, το γάλα όνου περιέχει τους ίδιους ολιγοσακχαρίτες με το ανθρώπινο γάλα. Σύμφωνα με τους Wang *et al.* (2019), οι κυρίαρχοι ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος όνου είναι οι σιαλυλιωμένοι ολιγοσακχαρίτες (sialylated oligosaccharides). Αυτοί οι ολιγοσακχαρίτες είναι οι: 3-σιαλυλολακτόζη (3-sialyllactose, 3'-SL), 6-σιαλυλολακτόζη (6-sialyllactose, 6'-SL) και δισιαυλο-λακτο-N-τετραόζη (disialyl-lacto-N-tetraose) (Carminati & Tidona, 2017). Παρόλο που η περιεκτικότητα του γάλακτος όνου σε 3'-SL και 6'-SL είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή

^a Λινελαϊκό οξύ

^b Λινολενικό οξύ

στο ανθρώπινο γάλα, η περιεκτικότητα σε 6'-SL είναι υψηλότερη από ότι σε 3'-SL δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο παρόμοιο με εκείνο του ανθρώπινου γάλακτος (Wang *et al.*, 2019).

1.3.1.4 Βιταμίνες

Όλες οι βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την διατροφή του ανθρώπου περιέχονται στο γάλα, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα το είδος του ζώου. Η περιεκτικότητα του γάλακτος όνου σε βιταμίνες είναι κατά μέσο όρο χαμηλότερη συγκριτικά με το γάλα των μηρυκαστικών ζώων (Alichanidis *et al.*, 2016) (Πίνακας 4). Οι Martini *et al.*, (2018) αναφέρουν ότι το γάλα όνου είναι πλούσιο σε βιταμίνη C, ενώ η περιεκτικότητα σε βιταμίνες A, E και σε άλλες υδατοδιαλυτές είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα. Ακόμα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4, η ποσότητα της θειαμίνης (βιταμίνη B1) και της ριβοφλαβίνης (βιταμίνη B2) στο γάλα όνου είναι υψηλότερη συγκριτικά με το ανθρώπινο γάλα, ενώ πολύ υψηλότερη παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε βιταμίνη B12 (κοβαλαμίνη) (Aspri *et al.*, 2016b; Alichanidis *et al.*, 2016).

Πίνακας 4: Περιεκτικότητα γάλακτος, από διαφορετικά είδη ζώων, σε βιταμίνες (Πηγή: Aspri *et al.*, 2016b; Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014)

Βιταμίνη	Γάλα όνου (µg/100 mL)	Ανθρώπινο γάλα (µg/100 mL)	Αίγαιο γάλα (µg/100 mL)	Πρόβειο γάλα (µg/100 mL)	Αγελαδινό γάλα (µg/100 mL)
A	1,70	30-200	25-84	40-84	17-50
E	5,00-5,10	300-800	30-120	110-120	20-299
C	2.000	3.500-10.000	900-4.200	425-6.000	0-2.300
B1	21-60	10-20	30-90	28-80	20-90
B2	30-97	20-60	40-310	160-429	20-202
B3	57-90	147-600	100-370	300-500	50-200
B12	110	0,01-0,10	0,06-0,10	0,30-0,70	0,20-0,90

1.3.1.5 Άλατα

Τα άλατα είναι πολύ σημαντικά και απαραίτητα για την ανάπτυξη του ανθρώπινου σκελετού. Σημαντική είναι επίσης η συμβολή τους στην τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Το γάλα αποτελεί σημαντική πηγή ιχνοστοιχείων στην ανθρώπινη διατροφή και η περιεκτικότητά του σε αυτά επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος του γάλακτος. Στο γάλα όνου, η περιεκτικότητα των περισσότερων ανόργανων συστατικών είναι υψηλότερη συγκριτικά με το ανθρώπινο γάλα, αλλά σημαντικά χαμηλότερη από ό,τι στο γάλα από μηρυκαστικά ζώα. Αξίζει να σημειωθεί πως το γάλα όνου περιέχει περίπου 2 με 3 φορές περισσότερο ασβέστιο και φώσφορο από ότι το ανθρώπινο γάλα (Clayes *et al.*, 2014) (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Περιεκτικότητα γάλακτος, διαφόρων ειδών ζώων, σε ιχνοστοιχεία (mg/100g)
(Πηγή: Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014)

Ιχνοστοιχείο	Γάλα όνου (mg/100 mL)	Ανθρώπινο γάλα (mg/100 mL)	Αίγαιο γάλα (mg/100 mL)	Πρόβειο γάλα (mg/100 mL)	Αγελαδινό γάλα (mg/100 mL)
Ασβέστιο	33-115	28-35	90-199	160-205	91-184
Φώσφορος	32-71	8-60	86-163	121-158	59-235
Κάλιο	24-104	51-64	144-228	107-140	106-170
Μαγνήσιο	2-9	3-4	9-19	9-21	7-14
Νάτριο	10-27	10-20	23-61	30-75	26-90
Χλώριο	14-50	22-63	130-223	82-270	77-119
Σίδηρος	0,01-0,26	0,04-0,20	0,01-0,65	0,03-0,120	0,001-0,57
Χαλκός	0,01-0,09	0,02-0,10	0,02-0,36	0,01-0,07	0-0,09
Ψευδάργυρος	0,12-0,62	0,05-0,4	0,05-0,6	0,4-0,9	0,20-0,60

1.3.2 Συσχέτιση γάλακτος όνου με την υγεία του ανθρώπου και πιθανές ευεργετικές ιδιότητες

Το γάλα όνου έχει πολλές δυνητικές θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Εκτός από τη χρήση του ως εναλλακτικής λύσης για ασθενείς που εμφανίζουν αλλεργία στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, πιθανώς να έχει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιπολλαπλασιαστική και αντιδιαβητική δράση (Derdak *et al.*, 2020).

Το αγελαδινό γάλα παρόλο που αποτελεί την πιο συνηθισμένη τροφή μετά τον απογαλακτισμό του βρέφους και χρησιμοποιείται ευρέως ως υποκατάστατο του ανθρώπινου γάλακτος, είναι υπεύθυνο για μία από τις πιο κοινές τροφικές αλλεργίες στην παιδική ηλικία (Madhusudan *et al.*, 2017). Σύμφωνα με τους Barłowska *et al.* (2011), τα πιο κοινά αλλεργιογόνα του γάλακτος είναι η β-Lg και η α_{s1}-καζεΐνη. Όπως έχει ήδη τονιστεί, η χημική σύσταση του γάλακτος όνου είναι παρόμοια με του ανθρώπινου γάλακτος, με μεγάλες διαφορές ταυτόχρονα από το γάλα των μηρυκαστικών ζώων. Ακριβέστερα, τα δύο είδη γάλακτος μοιάζουν λόγω της παρόμοιας περιεκτικότητας σε λακτόζη, πρωτεΐνες και λίπος. Επιπροσθέτως, όσον αφορά τις παιδικές αλλεργίες, στο γάλα όνου η α_{s1}-καζεΐνη υπάρχει σε ίχνη και η β-Lg έχει διαφορετική δομή από ό,τι στο αγελαδινό γάλα. Συγκεκριμένα, στο γάλα που προέρχεται από ζώα της οικογένειας των ιππιδών η β-Lg δεν έχει ελεύθερη σουλφιδρυλική ομάδα (SH) και είναι σε μονομερή μορφή (σε ουδέτερο pH) σε αντίθεση με το αγελαδινό γάλα που έχει μία ελεύθερη SH και απαντάται με τη μορφή διμερών στο pH του γάλακτος (Barłowska *et al.*, 2011; Uniacke-Lowe & Fox 2011). Κατά συνέπεια, το γάλα όνου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για το αγελαδινό γάλα σε περιπτώσεις αλλεργικών αντιδράσεων (Claeys *et al.*, 2014).

Το προφίλ των ΛΟ στο γάλα όνου (υψηλή αναλογία φωσφολιπιδίων, πολυακόρεστων ΛΟ και χαμηλό λόγο ω-6/ω-3 ΛΟ) φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία λόγω ανοσοδιεγερτικών ιδιοτήτων, μείωσης της χοληστερόλης, αποτροπής σχηματισμού θρόμβων στο αίμα και μείωσης του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου της καρδιάς, υπέρτασης και θρόμβωσης (Aspri *et al.*, 2016b). Ακόμα, σημαντική είναι η συμβολή των PUFA στην νευρολογική ανάπτυξη και την καρδιαγγειακή υγεία.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη προάγει την διαδικασία της οστεογένεσης, διευκολύνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου, και επηρεάζει τη συσσώρευση τους στον ανθρώπινο σκελετό, μέσω της οποίας ενισχύεται η πρόληψη της οστεοπόρωσης (Aspri *et al.*, 2016b). Μία ακόμα ευεργετική ιδιότητα, που προσφέρει το συγκεκριμένο κλάσμα, είναι ότι αποτελεί σημαντική πηγή γαλακτόζης, η οποία με την σειρά

της αποτελεί μια βασική πηγή ενέργειας για τον οργανισμό και μπορεί να είναι ευεργετική σε πολλές ασθένειες, ιδιαίτερα σε αυτές που επηρεάζουν την λειτουργία του εγκεφάλου (Martini *et al.*, 2018). Σχετικά με τους σιαλυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες, η δημιουργία του ίδιου μοτίβου 3'/6'-SL με το ανθρώπινο γάλα επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του συγκεκριμένου είδους γάλακτος ως βρεφικής τροφής, ενώ ταυτόχρονα η παρουσία τους στο γάλα όνου είναι πολύ σημαντική λόγω της δυνατότητας τους να ρυθμίζουν την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας, να επηρεάζουν γαστρεντερικές και φλεγμονώδεις διεργασίες και να παρέχουν προστασία έναντι βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων (Wang *et al.*, 2019; Carminati & Tidona, 2017).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του γάλακτος όνου σχετίζονται με την υψηλή περιεκτικότητα σε λυσοζύμη και τη λακτοφερρίνη. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του γάλακτος όνου μπορεί να οφείλεται στη συνεργιστική δράση της λυσοζύμης με τη λακτοφερρίνη. Η δράση της λυσοζύμης είναι ισχυρή ενάντια στα θετικά κατά Gram βακτήρια και πολύ λιγότερο στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ωστόσο λόγω της συνεργιστικής της δράσης με τη λακτοφερρίνη πιθανώς να ενισχύεται η αντιβακτηριακή δράση και κατά των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Marletta *et al.*, 2016). Η λακτοφερρίνη μπορεί να δρα επίσης ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας σε τοπικά σημεία φλεγμονής, όπως στο αναπνευστικό σύστημα. Παράλληλα, η λυσοζύμη πιθανώς να συμβάλει στην πρόληψη εντερικών λοιμώξεων κατά την βρεφική ηλικία (Vincenzetti *et al.*, 2012). Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, η λυσοζύμη δεν πέπτει καλά από τα ανθρώπινα γαστρεντερικά ένζυμα. Αυτό συνεπάγεται ότι μπορεί να φτάσει στον εντερικό σωλήνα και να ασκήσει αντιμικροβιακή δράση στα βακτήρια του εντέρου (Martini *et al.*, 2018). Επιπλέον, η λυσοζύμη έχει και άλλες σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντι-καρκινική και αντι-αγγειογενετική δράση (Madhusudan *et al.*, 2017).

Όπως προαναφέρθηκε, στο γάλα όνου η περιεκτικότητα σε βιταμίνη B12 είναι υψηλή συνεπώς ενισχύεται η φυσιολογική λειτουργία των νευρικών κυττάρων και η σύνθεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του DNA (Aspri *et al.*, 2016b).

1.4 Χρήσεις γάλακτος όνου

Λόγω των μοναδικών ωφελειών που παρέχει η κατανάλωση του γάλακτος όνου, το γάλα αυτό υπάρχει στην αγορά ως τρόφιμο σε μορφή παστεριωμένου γάλακτος, βιολογικού ή μη, λυοφιλιωμένης σκόνης γάλακτος, σε γιαούρτι, Κεφίρ, καθώς και σε μπισκότα, σοκολάτες, παγωτά, κουλούρια, βιολογικά ζυμαρικά και καραμέλες για το λαιμό που φτιάχνονται με προσθήκη γάλακτος όνου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Προϊόντα παρασκευασμένα με προσθήκη γάλακτος όνου (Πηγή: Farma Metsono, οικογένεια Αβραμίδη, OLA-BIO)

Αξιοσημείωτη είναι η χρήση του γάλακτος όνου από τις βιομηχανίες καλλυντικών. Από την αρχαιότητα γινόταν χρήση του γάλακτος όνου από την βασίλισσα Κλεοπάτρα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, λόγω των μοναδικών ωφελειών του για την επιδερμίδα. Στα οφέλη αυτά ανήκουν οι αντιγηραντικές ιδιότητες, η αποτελεσματικότητα στη θεραπεία των ρυτίδων, των εκζεμάτων και της ακμής, η ικανότητα αναδιάρθρωσης και αναγέννησης του προσώπου καθώς και η συμβολή του στην ενυδάτωση και θρέψη του δέρματος (Devi *et al.*, 2018). Ως επακόλουθο των ιδιοτήτων του, το γάλα όνου χρησιμοποιείται ως συστατικό σε σαμπούνια, σαμπουάν καθώς και σε κρέμες προσώπου, σώματος και μαλλιών (Εικόνα 3).



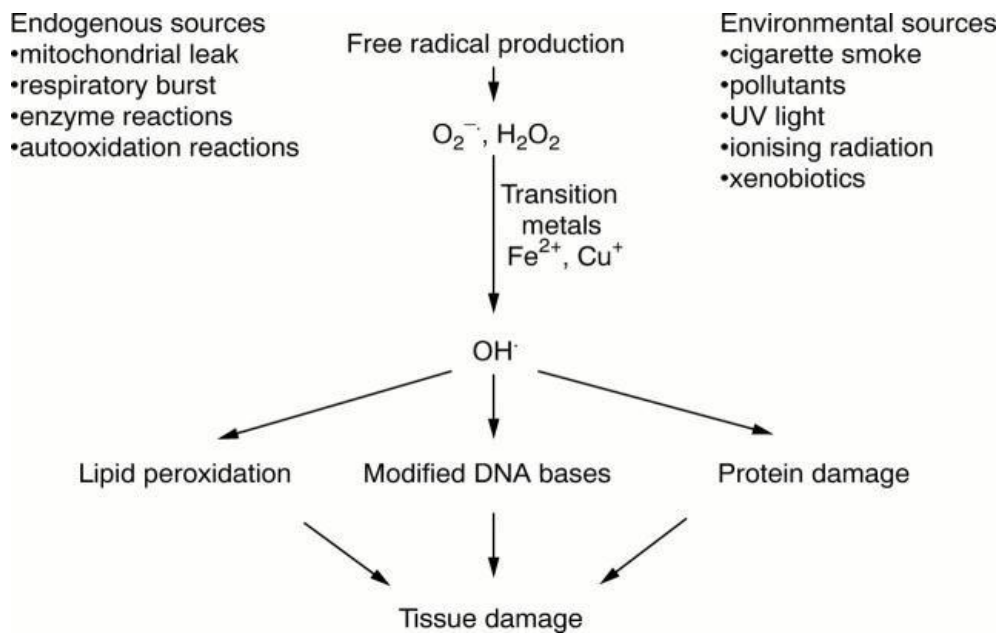
Εικόνα 3: Προϊόντα ομορφιάς παρασκευασμένα με προσθήκη γάλακτος όνου (Πηγή: Biofarm, Venus Secrets Organics, Sostar)

Σύμφωνα με τον Prasad (2020), απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την διερεύνηση των ωφελειών που σχετίζονται με την υγεία και τη διατροφή μέσω της χρήσης γάλακτος όνου.

1.5 Αντιοξειδωτικές ενώσεις και η δράση τους

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) είναι φυσικά υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού των κυττάρων. Τέτοιες ρίζες είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η υδροξυλική ρίζα (OH^{\bullet}). Χαμηλές συγκεντρώσεις ROS είναι απαραίτητες για τη διατήρηση φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μεταγωγή σήματος και η γονιδιακή έκφραση (Nita & Grzybowski, 2016). Ωστόσο, όταν οι ROS υπερβαίνουν την ικανότητα της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, προκαλείται μια κατάσταση, γνωστή ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress). Υψηλές συγκεντρώσεις ROS μπορούν να βλάψουν όλα τα κύρια συστατικά των κυττάρων, όπως τα λιπίδια (υπεροξείδωση ακόρεστων ΛΟ), τις πρωτεΐνες (μετουσίωση), τους υδατάνθρακες και τα νουκλεϊκά οξέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία λειτουργικής βλάβης των κυττάρων (Živković *et al.*, 2015; Shalaby & Shanab, 2013) (Σχήμα 2). Εκτός από τα αρνητικά αποτελέσματα που έχει η υπερβολική συκέντρωση των ROS στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούν προβλήματα ακόμα και στην παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η οξείδωση του λίπους του γάλακτος είναι μία αλυσιδωτή αντίδραση, στην οποία τα ακόρεστα ΛΟ μπορούν να οξειδωθούν με την προσρόφιση οξυγόνου και μετά από μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων να παραχθούν προϊόντα (π.χ. αλδεΐδες, κετόνες) που επηρεάζουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Καμινारीδης & Μοάτσου 2009). Αναλυτικότερα, κατά την οξείδωση του λίπους του γάλακτος δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων, οι οποίες διασπώνται προς άλλες ενώσεις με έντονη γεύση-άρωμα.

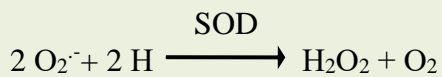
Ένας τρόπος για να περιοριστεί το φαινόμενο της οξείδωσης και οι αρνητικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών είναι η παρουσία των αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι χημικές ουσίες που αποτρέπουν την οξείδωση άλλων χημικών ενώσεων. Στα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται ένζυμα (enzymatic antioxidants) αλλά και μη-ενζυμικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση (non enzymatic antioxidants). Παραδείγματα αντιοξειδωτικών ενζύμων αποτελούν η καταλάση (catalase, CAT), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase, SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR) ενώ στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν οι βιταμίνες E και C, τα καροτινοειδή, το σελήνιο, η λακτοφερρίνη και τα φλαβονοειδή (Shalaby and Shanab, 2013; Mehta & Gowder, 2015; Lindmark-Månsson & Åkesson, 2000). Σύμφωνα με τους Bhardwaj *et al.* (2019), το γάλα όνου θεωρείται εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών.



Σχήμα 2: Πηγές ελεύθερων ριζών και αρνητικές επιπτώσεις (Πηγή: Mehta & Gowder, 2015)

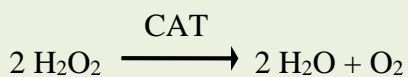
Οι αντιδράσεις που καταλύουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι οι εξής:

- Η SOD μετατρέπει το ανιόν του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σύμφωνα με την αντίδραση:

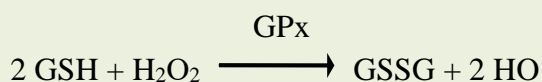


Η εξουδετέρωση του H₂O₂, το οποίο δημιουργείται από την αντίδραση που καταλύει η SOD, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της αντίδρασης που καταλύει η CAT, η GPx ή άλλοι αναγωγικοί παράγοντες (Živković *et al*, 2015).

- Η CAT καταλύει την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μετατρέποντας το σε νερό και μοριακό οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:

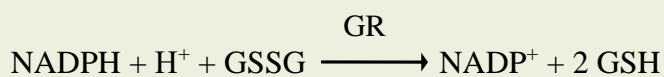


- Το ένζυμο GPx χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την ανηγμένη (μη οξειδωμένη μορφή, GSH) γλουταθειόνη για να εξουδετερώσει το H₂O₂ παράγοντας οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:



Στη συνέχεια, η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη στη μη οξειδωμένη μορφή της έτσι ώστε να ανακυκλώνεται και να επαναχρησιμοποιείται (Mehta & Gowder, 2015).

- Η GR καταλύει την εξής αντίδραση:



1.6 Το μικροβίωμα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων

Το γάλα είναι ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών εξαιτίας της περιεκτικότητας του σε θρεπτικά συστατικά και νερό αλλά και λόγω του pH του (6,6-6,8). Ένα πλήθος μικροοργανισμών προερχόμενο από πολλές και διαφορετικές πηγές (π.χ. μαστός ζώου, χέρια αμελκτής, μηχανή αμέλγατος, περιβάλλον εκτροφής) μπορεί να αναπτυχθεί στο νοπό γάλα, δημιουργώντας ένα σύνθετο μικροβιακό οικοσύστημα. Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στο γάλα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, δηλαδή εκείνοι που έχουν ενδιαφέρον τόσο από τεχνολογικής όσο και από την άποψη της υγείας του ανθρώπου (π.χ. είδη των γενών *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Propionibacterium*). Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. τα γένη *Pseudomonas*, *Clostridium*). Τέλος, υπάρχουν και οι μικροοργανισμοί που έχουν αρνητικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (π.χ. τα γένη *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*) (Quigley *et al.*, 2013).

1.6.1 Βακτήρια

1.6.1.1 Ωφέλιμοι μικροοργανισμοί

Στην κατηγορία των ωφέλιμων μικροοργανισμών ανήκουν οι μικροοργανισμοί που συμβάλλουν σημαντικά στην παραγωγή ζυμωμένων τροφίμων, όπως γαλακτοκομικών καθώς και εκείνοι που προάγουν την ανθρώπινη υγεία.

1.6.1.1α: Προ-τεχνολογικοί μικροοργανισμοί

Οι πιο σημαντικοί προ-τεχνολογικοί μικροοργανισμοί είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) με κυρίαρχα τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* καθώς ακόμα και γένη (π.χ. *Lacticaseibacillus*) τα οποία προήλθαν από την πρόσφατη αναταξινόμηση του γένους *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020). Τα LAB είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, μη σποριογόνα, αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης και εμφανίζουν μορφολογία σφαιρικών (κόκκων) ή ραβδοειδών (βάκιλλων) κυττάρων. Επιπλέον, αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες, αλλά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και παρουσία οξυγόνου (Khalid *et al.*, 2011). Η ονομασία τους προέρχεται από την βασική ικανότητα τους να ζυμώνουν τη λακτόζη κατά κύριο λόγο σε γαλακτικό οξύ. Υπάρχουν δύο κατηγορίες οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν από την λακτόζη σχεδόν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν επιπλέον αιθανόλη ή οξικό οξύ καθώς και διοξείδιο του άνθρακα. Η χρήση τους σε γαλακτοβιομηχανίες είναι ευρέως διαδεδομένη και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της παραγωγικής διαδικασίας. Στελέχη των LAB έχουν απομονωθεί από το γάλα και έχουν προστεθεί ως εναρκτήριες καλλιέργειες για να παρέχουν επιθυμητά χαρακτηριστικά κατά την παρασκευή των γαλακτοκομικών προϊόντων (Καμινारीδης & Μοάτσου, 2009) (Πίνακας 6). Η παρασκευή τυριών βασίζεται στην χρήση των LAB (π.χ. στα είδη *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) λόγω της ταχείας οξύνισης του γάλακτος μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, και την επακόλουθη μείωση του pH, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την τελική σύσταση, ποιότητα και ασφάλεια του τυριού.

Η χρήση των LAB δεν περιορίζεται μόνο στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Κύριες λειτουργίες των LAB αποτελούν ακόμα η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, εξωπολυσακχαριτών και ενώσεων που συμβάλλουν στο άρωμα (π.χ. το είδος *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*). Λόγω αυτών των λειτουργιών η χρήση των μη-εναρκτήριων οξυγαλακτικών βακτηρίων (Non-Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) ως συμπληρωματικών καλλιιεργειών κατά την παρασκευή τυριών είναι ευρέως διαδεδομένη. Οι καλλιέργειες αυτές δεν προστίθενται για την αρχική μείωση του pH, αλλά για τη συμβολή τους στο άρωμα, τη γεύση και τη δομή του τελικού προϊόντος. Έτσι, η αρχική συγκέντρωση τους στο τυρόπηγμα είναι χαμηλή αλλά αυξάνεται κατά την διαδικασία της ωρίμανσης (Settanni & Moschetti, 2010). Η χρήση των NSLAB είναι συνηθισμένη στα σκληρά και ημίσκληρα τυριά, ειδικά στο Cheddar, το Emmental, και τη Γραβιέρα (Blaya *et al.*, 2018). Τα επικρατέστερα

NSLAB που απαντώνται στα τυριά περιλαμβάνουν είδη του γένους *Lactobacillus* και των γενών, τα οποία προήλθαν από την πρόσφατη αναταξινόμηση, όπως τα είδη *Companilactobacillus farciminis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus fermentum* και *Levilactobacillus brevis* (Settanni & Moschetti, 2010). Εκτός από αυτά τα είδη, στα NSLAB ανήκουν ακόμα είδη των γενών *Pediococcus*, *Enterococcus* και *Leuconostoc* (Beresford, 2003).

Συνεπώς τα LAB συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό τόσο στη δομή και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος όσο και στην αύξηση του χρόνου ζωής και της ασφάλειάς τους (Marcelino, 2013).

Πίνακας 6: Τα κυριότερα LAB και η χρήση τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Πηγή: Marcelino, 2013; Gemechu, 2015)

Είδος LAB	Χρήση σε γαλακτοκομικά προϊόντα
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Σε διάφορα είδη τυριών (π.χ. Gouda, Edam), σε βούτυρο, βουτυρόγαλα και όξινη κρέμα
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	Σε διάφορα είδη τυριών (π.χ. Cheddar), όξινη κρέμα, βούτυρο
<i>Streptococcus thermophiles</i>	Σε γιαούρτι και σε πολλούς τύπους τυριών, ιδιαίτερα σκληρά και ημίσκληρα, και σε φέτα
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και σε πολλούς τύπους τυριών, ιδιαίτερα σκληρά και ημίσκληρα
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Σε γιαούρτι, σε πολλούς τύπους τυριών, ιδιαίτερα σκληρά και ημίσκληρα, σε Κούμης
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	Σε τυριά ωρίμανσης ως συμπληρωματική καλλιέργεια (π.χ. Cheddar, Κασέρι)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Σε τυριά ωρίμανσης ως συμπληρωματική καλλιέργεια (π.χ. Cheddar)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Σε τυριά ωρίμανσης ως συμπληρωματική καλλιέργεια (π.χ. Cheddar)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Σε τυριά όπως Edam, Gouda, Γραβιέρα) και σε φρέσκα τυριά, σε όξινη κρέμα

<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Σε ελβετικού τύπου τυριά (π.χ. Emmental) (χαρακτηριστικές οπές)
<i>Brevibacterium lines</i>	Σε τυριά που ωριμάζουν με επιφανειακό επίχρισμα (π.χ. Limburger)

1.6.1.1β: Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως πολλά LAB έχουν θετικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία, λόγω της προβιοτικής τους δράσης. Τα προβιοτικά ορίζονται από τον FAO και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί που επιφέρουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες» (Joint FAO/WHO Working Group Report, 2002). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι φορείς τροφίμων για τη χορήγηση προβιοτικών. Αναλυτικότερα, τα LAB ασκούν τις ευεργετικές τους δράσεις μέσω δύο μηχανισμών: είτε άμεσα με τις δράσεις των ζωντανών μικροβιακών κυττάρων είτε έμμεσα μέσω των δευτερογενών αντιμικροβιακών μεταβολιτών (όπως οργανικά οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες) που παράγουν κατά την διαδικασία της ζύμωσης (Giraffa, 2012). Η κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών παρέχει πληθώρα ωφελειών στην ανθρώπινη υγεία. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί ρυθμίζουν την ισορροπία του εντερικού μικροβιώματος, καταστέλλουν δυνητικά επιβλαβή βακτήρια εξαιτίας της ανταγωνιστικής τους δράσης και ενισχύουν τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού (Azat *et al.*, 2016). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Suscovic *et al.* (2010), μέσω της κατανάλωσης προβιοτικών επιτυγχάνεται η διατήρηση της υγιούς μικροχλωρίδας του εντέρου και ενισχύεται η προστασία έναντι γαστρεντερικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των γαστρεντερικών λοιμώξεων και των φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, η πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου και η μείωση των τροφικών αλλεργιών.

Η πλειοψηφία των ειδών των προβιοτικών μικροοργανισμών ανήκει στο μέχρι πρόσφατα γένος *Lactobacillus* και στα νέα γένη που προήλθαν από αυτό, έπειτα από την πρόσφατη αναθεώρηση της ταξινόμησης του συγκεκριμένου γένους (Mercenier, 2003; Zheng *et al.*, 2020). Ορισμένα από αυτά τα είδη είναι τα *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus (para)casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* και *Limosilactobacillus fermentum*. Εκτός από το γένος *Lactobacillus* πολλοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί ανήκουν στο γένος *Bifidobacterium*, με κυρίαρχο εκπρόσωπο τους το είδος *Bifidobacterium bifidus*, το γένος *Bacillus* και το γένος *Saccharomyces* για τις

ζύμες (Giraffa, 2012; Fijan, 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* και *Saccharomyces boulardii* χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Σχετικά με το γένος *Bacillus*, στελέχη των ειδών *Bacillus coagulans* και *Bacillus cereus* έχουν ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία είτε των ανθρώπων είτε των ζώων (Holzapfel et al., 2001; Fijan, 2014).

1.6.1.2 Αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί

Στο γάλα υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Οι αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί δημιουργούν προβλήματα στις γαλακτοβιομηχανίες διότι μέσω της επιβίωσης τους στο γάλα και εξαιτίας των μεταβολικών δραστηριοτήτων τους αλλοιώνουν το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Πίνακας 7). Οι κύριες δράσεις τους είναι τόσο η οξύνιση που προκαλείται από σακχαρολυτικούς μικροοργανισμούς όσο και η πρωτεόλυση και η λιπόλυση, λόγω της δράσης πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων (Perin et al., 2019).

Τα ψυχρότροφα βακτήρια αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, η οποία περιλαμβάνει είδη που ανήκουν μεταξύ άλλων στα γένη *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* και *Listeria* (Perin et al., 2019; Velázquez-Ordoñez et al., 2019). Σχετικά με το νωπό γάλα, τα επικρατέστερα είδη ψυχρότροφων βακτηρίων ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Τα ψυχρότροφα βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά ένζυμα (πρωτεάσες, λιπάσες και φωσφολιπάσες), πολλά από τα οποία είναι ανθεκτικά στη θερμική επεξεργασία που υφίστανται στη γραμμή παραγωγής, διατηρώντας έτσι την ενζυμική τους δραστηριότητα ακόμη και μετά την θερμική επεξεργασία. Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται αρνητικά η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτή η υποβάθμιση της ποιότητας μεταφράζεται ως αλλαγή στη γεύση, ανεπιθύμητη πήξη των πρωτεϊνών και αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ΛΟ και αμινοξέων (Velázquez-Ordoñez et al., 2019).

Σημαντική αιτία αλλοίωσης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελούν επίσης και τα σποριογόνα βακτήρια (Spore-Forming Bacteria). Η αλλοίωση που προκαλούν οφείλεται τόσο στη δράση πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων, όσο και στην παραγωγή οξέων (π.χ. γαλακτικό, βουτυρικό, οξικό οξύ) και αερίων (H_2 , CO_2) (Lopez-Brea, 2017). Τα πιο κοινά σποριογόνα βακτήρια που απαντώνται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα ανήκουν στα είδη *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum* και *Clostridium tyrobutyricum* (Ledenbach & Marshall, 2009; Quigley et al., 2011).

Αλλοιωγόνο δράση έχουν και οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην ομάδα των coliforms. Τα περισσότερα coliforms (π.χ. τα γένη *Escherichia*, *Klebsiella* και *Serratia*) ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae, ενώ τουλάχιστον ένα γένος με είδη αναγνωρισμένα ως coliforms, το *Aeromonas*, ανήκει στην οικογένεια Aeromonadaceae (Martin *et al.*, 2016). Αυτοί οι μικροοργανισμοί επηρεάζουν αρνητικά τόσο τη γεύση και το άρωμα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων όσο και την εμφάνιση των τυριών, μέσω των ενζύμων που παράγουν (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009; Martin *et al.*, 2016).

Πίνακας 7: Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί και ελαττώματα που προκαλούν στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Πηγή: Martin *et al.*, 2018; Ledenbach & Marshall, 2009; Quigley *et al.*, 2013 Velázquez-Ordoñez *et al.*, 2019)

Γένος/είδος	Προϊόν/ελάττωμα
Ψυχρότροφα (π.χ. <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Alcaligenes</i> spp.)	Βλεννώδης επιφάνεια σε τυριά, αλλαγή χρόνου πήξης και ποιότητας τυροπήγματος, ανώμαλος χρωματισμός, πικρή/ταγκή γεύση
<i>Clostridium</i> spp. (π.χ. <i>C. butyricum</i> , <i>C. sporogenes</i>)	Οπές, φουσκώματα και σχισμές σε τυριά, παραγωγή αερίων, οσμή βουτυρικού οξέος
<i>Bacillus</i> spp.	Πήξη γάλακτος, παραγωγή δύσοσμων παραγώγων σε τυριά, κρέμα και βούτυρο, ελαττώματα εμφάνισης και δομής σε γιαούρτια
<i>Coliforms</i>	Φουσκώματα σε τυριά, δυσάρεστη οσμή

1.6.1.3 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Στο γάλα είναι δυνατόν να περιέχονται διάφορα παθογόνα στελέχη μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να καταλήξουν στο νωπό γάλα είτε μέσω του αίματος του ζώου είτε μέσω μόλυνσης του μαστού από εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. κόπρανα) (Verraes *et al.*, 2015). Αρκετές τροφιμογενείς ασθένειες οφείλονται στην κατανάλωση νωπού γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων παρασκευασμένων με γάλα που δεν παστεριώθηκε σωστά ή επιμολύνθηκε μετά την θερμική επεξεργασία λόγω λανθασμένων χειρισμών. Σύμφωνα με τους Verraes *et al.* (2015), τα κύρια γένη/είδη που αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και

σχετίζονται με την κατανάλωση νωπού αγελαδινού, αίγειου και πρόβειου γάλακτος είναι τα *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Clostridium botulinum*, *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Cryptosporidium parvum* και *Toxoplasma gondii*.

Οι πιο γνωστές ασθένειες που προκαλούνται από τα παθογόνα βακτήρια του γάλακτος είναι η φυματίωση, η αιμορραγική κολίτιδα, η βρουκέλλωση, η δυσεντερία, η γαστρεντερίτιδα, η καμπυλοβακτηρίωση, η λιστερίωση, η σαλμονέλλωση, και η τροφική τοξίνωση. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα παθογόνα βακτήρια που είναι πιθανό να περιέχονται στο γάλα και η σχέση τους με τις ασθένειες που προκαλούν.

Πίνακας 8: Παθογόνα βακτήρια γάλακτος (Πηγή: Μάντης, 2018; Καμινारीδης & Μοάτσου, 2009; eody.gov.trofimogeni-nosimata.gr; aua.biosafetyoffoods.microbies.gr)

Γένος/είδος	Ασθένεια	Συμπτώματα
<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i>)	Σαλμονέλλωση	πυρετός, διάρροια, εμετός, ακόμα και θάνατος
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (παράγει τοξίνες Shiga-like)	Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο	αιμορραγική διάρροια, κράμπες στην κοιλιά, ναυτία, εμετός, νεφρική ανεπάρκεια, καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Υερσίνωση – Γαστρεντερίτιδα	έντονη διάρροια, ανορεξία, πυρετός, εμετός, κεφαλαλγία, αρθρίτιδα
<i>Bacillus cereus</i>	Τροφική τοξίνωση	ναυτία, εμετός, κοιλιακό άλγος, διάρροια
<i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i>)	Καμπυλοβακτηρίωση	διάρροια, κράμπες, κοιλιακός πόνος, πυρετός

<i>Listeria monocytogenes</i>	Λιστερίωση	πυρετός, μυϊκοί πόνοι, ναυτία (κίνδυνος εξάπλωσης της λοίμωξης στο νευρικό σύστημα με την επακόλουθη εμφάνιση κεφαλαλγίας, δυσκαμψίας του αυχένα, και μηνιγγίτιδας)
<i>Brucella (B. melitensis, B. abortus)</i>	Βρουκέλλωση	πυρετός, εφίδρωση, πονοκέφαλος, φλεγμονή σε διάφορα όργανα (ήπαρ), λοιμώξεις στο γεννητικό και ουροποιητικό σύστημα

1.6.2 Ζύμες και Μύκητες

Οι ζύμες και οι μύκητες αποτελούν σημαντικές μικροβιακές ομάδες του νοπού γάλακτος. Εκτός από την εμφάνιση τους ως οργανισμοί αλλοίωσης, οι ζύμες και οι μύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρασκευή ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ιδιότητα τους αυτή προέρχεται από τα φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η ικανότητα κατανάλωσης λακτόζης ή γαλακτόζης, η υψηλή πρωτεολυτική ή λιπολυτική δραστηριότητα, και η ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και να αντέχουν την υψηλή αλατοπεριεκτικότητα (Quigley *et al.*, 2013). Οι ζύμες συμβάλλουν στην ανάπτυξη των ημίσκληρων και μαλακών τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακό επίχρισμα λόγω της συνεργιστικής τους δράσης με βακτήρια όπως είναι τα είδη *Brevibacterium linens* και *Microbacterium lacticum*, οι μικρόκοκκοι και τα LAB (Büchl *et al.*, 2011). Σημαντική είναι η συνεισφορά ορισμένων στελεχών των ζυμών στα οξυγάλατα Κεφίρ και Κούμης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζει ο *Kluyveromyces marxianus* λόγω της υψηλής θερμοαντοχής του, του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης, της έκκρισης ενζύμων (π.χ. β-γαλακτοζιδάση και αμινοπεπτιδάσες) και της παραγωγής αιθανόλης και αρωματικών ενώσεων (Quigley *et al.*, 2013; Tabanelli *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2008). Τα είδη *K. marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia fermentans* αποτελούν τις κύριες ζύμες των κόκκων Κεφίρ (Gethins *et al.*, 2016). Εκτός των προτεχνολογικών ιδιοτήτων του, το είδος *K. marxianus* συμβάλλει στη θεραπεία της γαστρεντερίτιδας και πιθανώς να έχει προβιοτική δράση (Abd El Latif *et al.*, 2016). Οι μύκητες

που εμφανίζουν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον ανήκουν στο γένος *Penicillium* και χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παραγωγή ειδικών τύπων τυριών, όπως το είδος *Penicillium roqueforti* που είναι υπεύθυνο για την χαρακτηριστική γεύση και εμφάνιση στα τυριά Roquefort και το *Penicillium camemberti*, η παρουσία του οποίου δίνει στο τυρί Camembert τη χαρακτηριστική εμφάνιση καθώς και το τυπικό άρωμα και γεύση (Καμινάρειδης & Μοάτσου, 2009; Spinnler & Gripon, 2004).

Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί αυτοί παρά την θετική τους επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις γαλακτοβιομηχανίες λόγω της αλλοιωγόνου δράσης τους. Με τον πολλαπλασιασμό τους προκαλούν αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, δημιουργώντας δυσάρεστη οσμή και γεύση στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το χαμηλό pH και τα θρεπτικά συστατικά των περισσότερων τυριών δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των ζυμών. Τα κύρια ελαττώματα που προκαλούνται είναι η φρουτώδης ή πικρή γεύση, η παραγωγή αερίων, οι αποχρωματισμοί και οι αλλαγές στην υφή (Fleet *et al.*, 1990; Fröhlich-Wyder & Marie-Therese, 2003). Οι πιο κοινές ζύμες που εμφανίζονται στα τυριά περιλαμβάνουν τα γένη/είδη *Candida* spp., *K. marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* και *Pichia* spp. (Ledenbach & Marshall, 2009). Η ανάπτυξη των μυκήτων στα τυριά επιφέρει μείωση της ποιότητας τους λόγω ορατών ή αόρατων ελαττωμάτων, όπως η ανεπιθύμητη οσμή, εμφάνιση και γεύση. Οι πιο γνωστοί ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Rhizopus* και *Aspergillus* (Μάντης, 2018).

1.6.3 Το μικροβίωμα του γάλακτος όνου

Παρόλο που τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου έχουν μελετηθεί εκτενώς, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα σχετικά με το μικροβίωμα του συγκεκριμένου είδους γάλακτος. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι το γάλα όνου περιέχει χαμηλό μικροβιακό φορτίο, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις ενδογενείς αντιμικροβιακές ενώσεις που περιέχει, όπως η λακτοφερρίνη και η λυσοζύμη (Zhang *et al.*, 2008, Sarno *et al.*, 2012). Παρά την ύπαρξη των αντιμικροβιακών αυτών ενώσεων, παραμένει ανεπιθύμητη η ανάπτυξη των LAB και των μυκήτων με αποτέλεσμα το γάλα όνου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βασικό συστατικό για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων (Zhang *et al.*, 2008). Επίσης, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη ευνοείται η ανάπτυξη και η επιβίωση ορισμένων προβιοτικών γαλακτοβακίλλων, όπως του είδους *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Carminati *et al.*, 2014; Coppola *et al.*, 2002).

Οι Zhang *et al.* (2008) μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης συμπέραναν ότι βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και οι εντερόκοκκοι ίσως να καταλαμβάνουν ένα μεγάλο μέρος της μικροχλωρίδας του γάλακτος όνου. Επιπλέον, σύμφωνα με τη μελέτη των Soto del Rio *et al.* (2017), στην οποία εφαρμόστηκε αλληλούχηση υψηλής απόδοσης (High Throughput Sequencing, HTS), η πλειονότητα των μικροοργανισμών του γάλακτος όνου βρέθηκε να είναι κυρίως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, με τα επικρατέστερα γένη να είναι τα γένη *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Citrobacter* και *Sphingobacterium*. Οι πληροφορίες για τα LAB που απαντώνται στο γάλα όνου είναι περιορισμένες. Ωστόσο, οι Soto del Rio *et al.* (2017) βρήκαν ότι τα είδη των LAB του μικροβιώματος του γάλακτος όνου ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Carnobacterium*. Σε προηγούμενη μελέτη τους, μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης και την παράλληλη εφαρμογή της RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) σε συνδυασμό με την αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων, τα είδη που εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ήταν τα *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* και *Carnobacterium maltaromaticum* (Soto del Rio *et al.*, 2016). Ακόμα, οι Aspri *et al.* (2016a) ταυτοποίησαν LAB που ανήκουν στο γένος *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Lacticaseibacillus*, με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να ανήκει στο γένος *Enterococcus*. Τέλος, σύμφωνα με culture-dependent μεθόδους, δεν έχουν ανιχνευθεί *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. και *Campylobacter* spp. σε δείγματα γάλακτος όνου, μικροοργανισμοί που αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία (Cavallarin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008; Malissiova *et al.*, 2015).

1.7 Μικροβιολογικές μέθοδοι

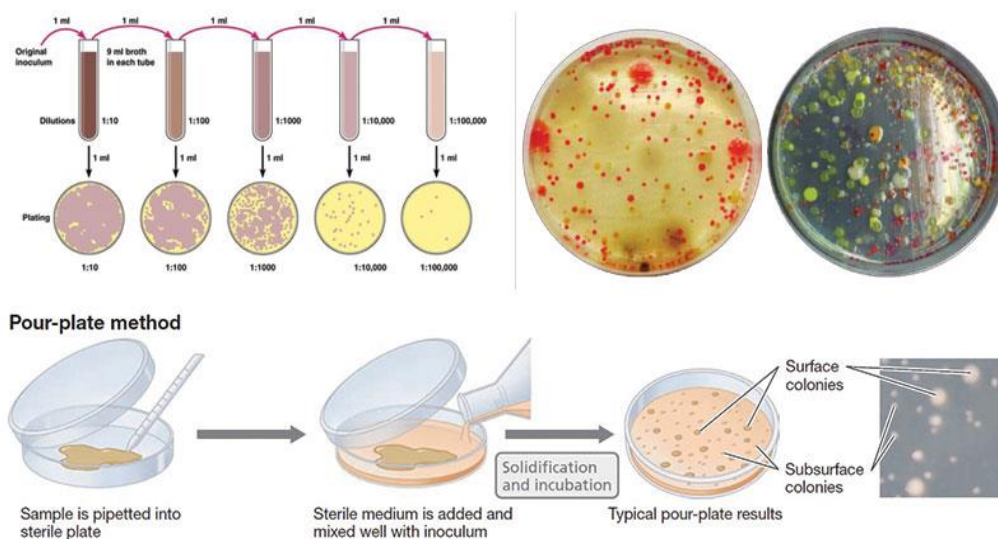
1.7.1 Culture-dependent methods: Κλασική μικροβιολογική ανάλυση

Η κλασική μικροβιολογική ανάλυση αποτελεί μία μέθοδο που στηρίζεται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-dependent method). Αποτελούσε και αποτελεί ακόμα και σήμερα μία βασική πρακτική στα περισσότερα εργαστήρια για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών καθώς και την ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Laurpland & Valiquette, 2013; Quigle *et al.*, 2013). Οι μικροβιολόγοι χρησιμοποιούν την κλασική μικροβιολογική ανάλυση για την μελέτη των μικροοργανισμών σε φυσικούς οικότοπους για πάνω από 150 χρόνια (Fry, 2004).

Οι culture-dependent μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης (Εικόνα 4). Για την ταυτοποίηση

των μικροοργανισμών εφαρμόζονται φαινοτυπικές (για τα μορφολογικά, φυσιολογικά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά) ή/και μοριακές μέθοδοι (Quigle *et al.*, 2013; Vester *et al.*, 2014). Αναλυτικότερα, η εξέταση της μορφολογίας ενός μικροοργανισμού μέσω οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρέχει πληροφορίες για το σχήμα των κυττάρων, την ύπαρξη μαστιγίων και σωματιδίων εγκλεισμού (inclusion bodies), ενώ το χρώμα και η μορφή των αποικιών μελετώνται μέσω μακροσκοπικής παρατήρησης. Επιπροσθέτως, πληροφορίες για την φυσιολογία ενός μικροοργανισμού λαμβάνονται μέσω της ανάπτυξής του σε διαφορετικές θερμοκρασίες, τιμές pH, συγκεντρώσεις άλατος και οξυγόνου, ενώ για τη βιοχημεία του μέσω δοκιμών που σχετίζονται με τις μεταβολικές ιδιότητές του (π.χ. καταβολισμός ενώσεων, παραγωγή ενζύμων), όπως η δοκιμή της καταλάσης, της κοαγκουλάσης, της ουρέασης, της ινδόλης και ο καταβολισμός σακχάρων (Donelli *et al.*, 2013). Τα τελευταία όμως χρόνια, η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιείται με τη χρήση μοριακών μεθόδων, οι περισσότερες από τις οποίες στηρίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Tang *et al.*, 1998). Σχετικά με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι περισσότερες πληροφορίες έχουν αποκτηθεί μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης σε συνδυασμό με φαινοτυπικές ή μοριακές μεθόδους για την ταυτοποίησή τους (Quigle *et al.*, 2013; Soto del Rio *et al.*, 2017).

Η κλασική μικροβιολογική ανάλυση είναι μία σχετικά οικονομική μέθοδος χωρίς υψηλές τεχνολογικές απαιτήσεις αλλά ταυτόχρονα χρονοβόρα (Quigle *et al.*, 2013). Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε χαμηλούς πληθυσμούς, σε κατάσταση καταπόνησης ή τραυματισμού πιθανότατα να μην ταυτοποιούνται μέσω culture-dependent μεθόδων. Ένας ακόμα περιορισμός των culture-dependent μεθόδων είναι η ύπαρξη μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορεί να βρίσκονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (viable but not culturable, VBNC). Συνεπώς, αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν ανιχνεύονται, λόγω της μη ικανότητάς τους να αναπτύσσονται στα εργαστηριακά συνθετικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης (Hiraoka *et al.*, 2016; Quigley *et al.*, 2011; Cocolin *et al.*, 2011). Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί, ειδικά στη μικροβιολογία των τροφίμων, μέθοδοι ανεξάρτητες από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-independent methods) (Ercolini, 2013).



Εικόνα 4: Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε θρεπτικά υποστρώματα, μέσω ενσωμάτωσης

(Πηγή: Microbe notes, 2019)

1.7.2 Culture-independent methods: Μεταγονιδιωματική ανάλυση

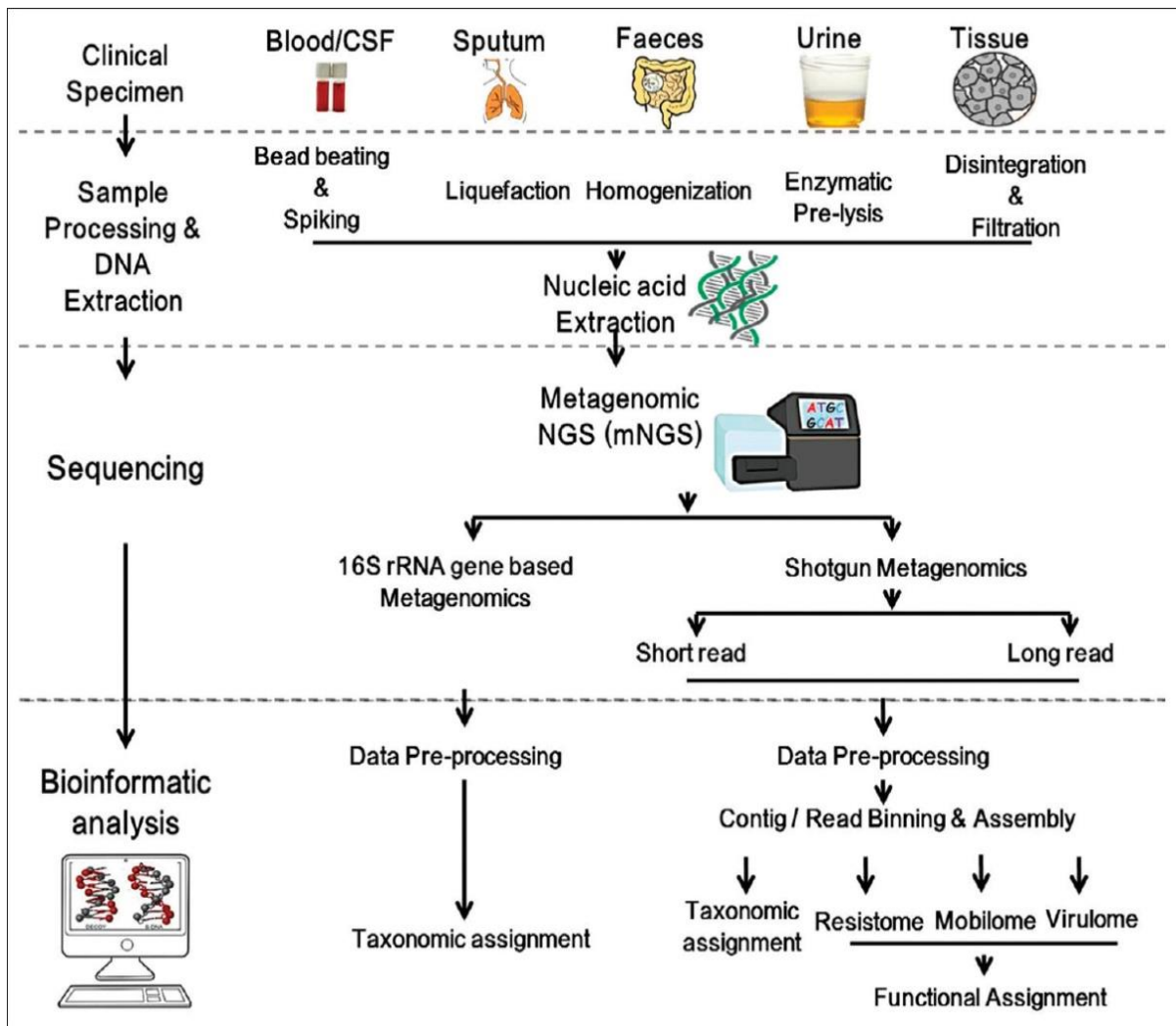
Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μελέτες που αφορούν στον προσδιορισμό της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων βασίζονται όλο και περισσότερο σε culture-independent μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην εκχύλιση του ολικού DNA (ή RNA) από το υπό μελέτη μικροβιακό οικοσύστημα χωρίς κανένα στάδιο καλλιέργειας των μικροοργανισμών (Jany *et al.*, 2008). Παραδείγματα culture-independent μεθόδων αποτελούν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική με βαθμίδωση αποδιατακτικής ουσίας (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) ή θερμοκρασίας (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE), ο πολυμορφισμός διάταξης μονής αλυσίδας (Single Stranded Conformation Polymorphisms, SSCP), ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού τερματικού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP), οι DNA μικροσυστοιχίες, ο *in situ* φθορίζων υβριδισμός (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH) και η μεταγονιδιωματική ανάλυση (Su *et al.*, 2011; Jany *et al.*, 2008; Cocolin *et al.*, 2013).

Η έλευση των τεχνολογιών αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (High Throughput Sequencing, HTS) το 2004 έφερε επανάσταση στον τομέα της μικροβιακής οικολογίας, βελτιώνοντας τις κλασικές culture-independent μεθόδους (π.χ. DGGE, RFLP). Συγκριτικά με τις κλασικές culture-independent μεθόδους, οι τεχνολογίες HTS παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση ακόμη και μικροοργανισμών που βρίσκονται σε

χαμηλούς πληθυσμούς, οι οποίοι πιθανώς να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο προς εξέταση μικροβιακό οικοσύστημα. Επιπλέον, η έλευση των τεχνολογιών HTS μείωσε σημαντικά το κόστος και το χρόνο της ανάλυσης, σε σύγκριση με την κλασσική αλληλούχηση κατά Sanger (De Filippis *et al.*, 2018). Τα τελευταία 15 χρόνια έχει υπάρξει μία μεταβολή από την αλληλούχηση κατά Sanger στην αλληλούχηση της επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing, NGS), με τις πλατφόρμες 454/Roche και Illumina/Solexa να εφαρμόζονται ευρέως στη μεταγονιδιωματική ανάλυση (Thomas *et al.*, 2012). Ο συνδυασμός της αλληλούχησης HTS και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης έχει αυξήσει εκθετικά τη δυνατότητα της μελέτης των γονιδιώματων των πολύπλοκων οικοσυστημάτων (Γύπας & Μέντης, 2014).

Η μεταγονιδιωματική (metagenomics) ανάλυση, μια culture-independent μέθοδος, έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο, το οποίο δίνει καλύτερη κατανόηση της δομής και της φυσιολογικής σημασίας των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος (Chauhan, 2019). Ο όρος μεταγονιδιωματική διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Handelsman *et al.* (1998), και αφορούσε την μαζική ανάλυση του γενετικού υλικού σε μικρόβια του εδάφους (Hollister *et al.*, 2015). Η μεταγονιδιωματική ορίζεται ως η άμεση γενετική ανάλυση των γονιδιωμάτων που περιέχονται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Η συγκεκριμένη ανάλυση εφαρμόζει μια σειρά από γονιδιωματικές τεχνολογίες (genomics technologies) και εργαλεία βιοπληροφορικής για απευθείας πρόσβαση στο γενετικό υλικό ολόκληρης της μικροβιακής κοινότητας (Hiraoka *et al.*, 2016). Τα τελευταία χρόνια, πολλά ερευνητικά εργαστήρια χρησιμοποιούν την μεταγονιδιωματική ανάλυση για την μελέτη μικροβιακών οικοσυστημάτων καθώς αυτή αναμένεται να επιταχύνει την κατανόηση της σύστασης του μικροβιώματος (Thomas *et al.*, 2011; Hiraoka *et al.*, 2016).

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση περιλαμβάνει δύο βασικές προσεγγίσεις, την μαζική αλληλούχηση (shotgun metagenomics) και την αλληλούχηση αμπλικονίων (amplicon-based metagenomics) (Εικόνα 5). Η αλληλούχηση αμπλικονίων χρησιμοποιείται συχνότερα διότι αποτελεί, συγκριτικά με την μαζική αλληλούχηση, μια οικονομική και λιγότερο απαιτητική από πλευράς βιοπληροφορικής ανάλυσης, μέθοδο (Rausch *et al.*, 2019). Στη μεταγονιδιωματική ανάλυση αλληλούχησης αμπλικονίων, τμήμα του 16S rRNA γονιδίου και της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (Internal Transcribed Spacer, ITS) αποτελούν τους φυλογενετικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών/μυκήτων, αντίστοιχα (De Filippis *et al.*, 2017; Colabella *et al.*, 2018).



Εικόνα 5: Μαζική αλληλούχηση και αλληλούχηση αμπλικονίων (Πηγή: Jacob *et al.*, 2019)

Συγκεκριμένα, το γονίδιο 16S rRNA έχει μήκος περίπου 1600 bp (base pairs) και αποτελείται από εννέα μεταβλητές περιοχές (V1-V9) που πλαισιώνονται από συντηρημένες αλληλουχίες, οι οποίες είναι κατάλληλες για την σύνδεση των εκκινητών (Εικόνα 6). Η επιλογή της/των περιοχής/ών για αλληλούχηση επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των βακτηρίων κατά την μεταγονιδιωματική ανάλυση (Cao, 2017; Bukin *et al.*, 2019).

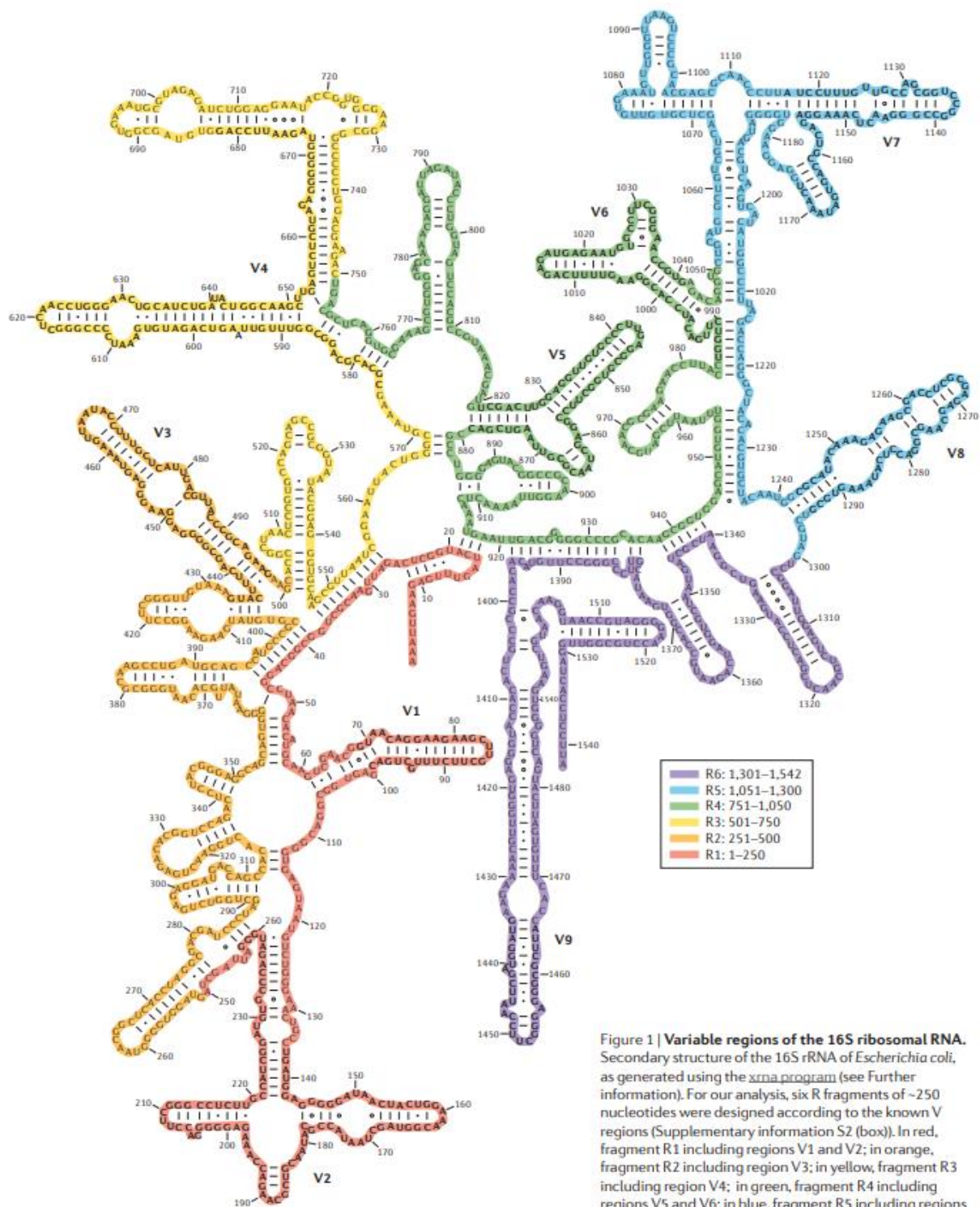
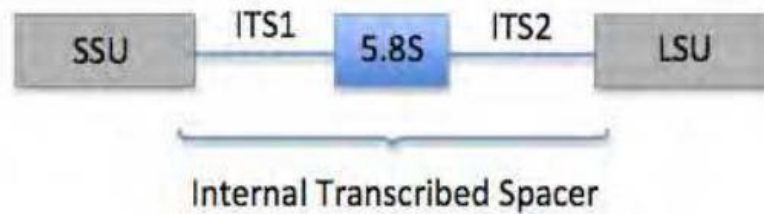


Figure 1 | Variable regions of the 16S ribosomal RNA. Secondary structure of the 16S rRNA of *Escherichia coli*, as generated using the *xna* program (see Further information). For our analysis, six R fragments of ~250 nucleotides were designed according to the known V regions (Supplementary information S2 (box)). In red, fragment R1 including regions V1 and V2; in orange, fragment R2 including region V3; in yellow, fragment R3 including region V4; in green, fragment R4 including regions V5 and V6; in blue, fragment R5 including regions

Εικόνα 6: Οι 9 περιοχές του 16s rRNA γονιδίου των βακτηρίων (Πηγή: Yarza *et al.*, 2014)

Στις ζύμες/μύκητες, η περιοχή ITS τοποθετείται μεταξύ της μικρής (small subunit, SSU, 18S) και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (large subunit, LSU, 28S) και αποτελείται από τις μεταβλητές περιοχές ITS1 και ITS2, στις οποίες παρεμβάλλεται η συντηρημένη περιοχή

του 5.8S rRNA γονιδίου (Branco, 2011) (Εικόνα 7). Οι περιοχές των 18S, 5.8S και 28S rRNA γονιδίων εξελίσσονται αργά και διατηρούνται μεταξύ των μυκήτων, παρέχοντας έτσι μια μοριακή βάση για τη δημιουργία φυλογενετικών σχέσεων. Ωστόσο, οι περιοχές ITS1 και ITS2 εξελίσσονται ταχύτερα, οδηγώντας σε αλληλουχίες υψηλής μεταβλητότητας, σε επίπεδο γένους και είδους (Iwen *et al.*, 2002). Παρόλο που η περιοχή ITS είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη για την ταυτοποίηση των ζυμών/μυκήτων, τα γονίδια 26S και 28S rRNA χρησιμοποιούνται και αυτά αλλά σε μικρότερο βαθμό.



Εικόνα 7: Ενδομεταγραφόμενη περιοχή (ITS) των ζυμών/μυκήτων (Πηγή: Branco, 2011)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση του μικροβιώματος του γάλακτος όνου, από Ελληνικές φάρμες όνων, μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης και παράλληλα σύγχρονων μοριακών μεθόδων, καθώς επίσης και η μελέτη της επίδρασης του μικροκλίματος της κάθε περιοχής στο μικροβίωμα του γάλακτος όνου μέσω της μεταγονιδιωμιατικής ανάλυσης αλληλούχησης αμπλικονίων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική ανάλυση, προσδιορισμός των λιπαρών οξέων και ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος στα ίδια δείγματα γάλακτος με στόχο τη διερεύνηση της ποιότητας και των πιθανών διατροφικών ωφελειών του συγκεκριμένου είδους γάλακτος.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή δειγμάτων γάλακτος όνου

Τα δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν από επτά Ελληνικές φάρμες όνων (Πίνακας 9). Σε κάθε φάρμα συλλέχθηκε το ημερήσιο δείγμα γάλακτος (0,5 L από την πρωινή και 0,5 L από την απογευματινή άμελξη) από ανάμιξη του γάλακτος όλων των ζώων της κάθε φάρμας, τα οποία βρίσκονταν στο ίδιο στάδιο της γαλακτικής περιόδου (2-3 μήνες μετά τον τοκετό). Τα δείγματα γάλακτος τοποθετήθηκαν σε καθαρά πλαστικά μπουκάλια και στάλθηκαν υπό ψύξη στους 4 °C στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η κλασική μικροβιολογική ανάλυση και η μέτρηση του pH των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν εντός 24 h από την άφιξή τους στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Για τις φυσικοχημικές αναλύσεις, τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και την ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος τα δείγματα γάλακτος διατηρήθηκαν στους -80 °C, ενώ για την ανάλυση των ΛΟ στους -40 °C.

Πίνακας 9: Φάρμες που συμμετείχαν στις δειγματοληψίες γάλακτος

Κωδικός δείγματος	Φάρμα	Περιοχή
1	Μετσόβου	Χρυσοβίτσα Ιωαννίνων
2	Γάλα Γαϊδούρας	Μελιγαλάς Μεσσηνίας
3	Γάλα όνου	Αυλώνα Αττικής
4	Δριμιλή	Αμυγδαλιές Ηλείας
5	Τσιχουρίδη	Οινόη Κοζάνης
6	Onnos Farm	Νιγρίτα Σερρών
7	Latte	Αργολίδα

3.2 Προσδιορισμός της χημικής σύστασης και οξύτητας (pH) των δειγμάτων

Η χημική σύσταση των δειγμάτων προσδιορίστηκε μέσω υπέρυθρης φασματοσκοπίας με τη χρήση της αυτοματοποιημένης συσκευής MilkoscanTM FT 120 (Foss Electric, Hilleroed, Denmark). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύρια συστατικά του γάλακτος έχουν χαρακτηριστικές ομάδες που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα (%)

των επτά δειγμάτων σε πρωτεΐνη, λίπος και λακτόζη, και με βάση αυτά υπολογίσθηκαν τα ολικά στερεά (Total Solids, TS) και τα ολικά στερεά άνευ λίπους (Solids Not Fats, SNF). Επιπλέον, η μέτρηση του pH έγινε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland).

3.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων

Για την ανάλυση των ΛΟ προηγήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων, η οποία αφορά την εκχύλιση του λίπους, στη συνέχεια τη μεθυλεστεροποίηση του απομονωθέντος λίπους, και τέλος τον προσδιορισμό των ΛΟ με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.

3.3.1 Εκχύλιση λίπους

Η εκχύλιση του λίπους βασίστηκε στη μέθοδο των Jiang *et al.* (1996) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων
2. Προσθήκη 15 mL ισοπροπανόλης σε 8,5 mL γάλακτος στους 37 °C και ανάδευση
3. Προσθήκη 11,25 mL εξανίου και ανάδευση
4. Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 5 min στους 4° C
5. Παραλαβή υπερκειμένου και τοποθέτηση σε νέο falcon
6. Προσθήκη 11,25 mL εξανίου στο παλιό falcon και φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 5 min στους 4°C. Έπειτα, τοποθέτηση του υπερκειμένου στο νέο falcon (ένωση υπερκειμένων) και επανάληψη του βήματος
7. Στο νέο falcon: προσθήκη 7,5 mL Na₂SO₄ (0,47 M) ανάδευση και αναμονή για 5 min
8. Παραλαβή 20 mL υπερκειμένου και τοποθέτηση σε κλίβανο στους 35 °C για 17-20 ώρες

3.3.2 Μεθυλεστεροποίηση λίπους

Για τη μεθυλεστεροποίηση του λίπους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Kelly *et al* (1998) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προσθήκη 2 mL εξανίου σε 40 mg λίπους
2. Προσθήκη 40 μl οξικού μεθυλεστέρα (methyl acetate) και ανάδευση

3. Προσθήκη 40 µl methylation reagent (1,75 mL μεθανόλη/0,4 mL μεθυλικό νάτριο 5,4 M)
4. Ανάδευση σε συσκευή vortex και παραμονή σε ηρεμία για 10 min
5. Προσθήκη 60 µl διαλύματος οξαλικού οξέος (1 g οξαλικό/30 mL διαιθυλεθέρα)
6. Φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 5 min στους 5 °C
7. Μεταφορά 90 µl υπερκειμένου σε φιαλίδιο και προσθήκη 10 µl εσωτερικού πρότυπου διαλύματος. Το εσωτερικό πρότυπο διάλυμα (internal standard) παρασκευάζεται από το λιπαρό οξύ C_{23:0}, το οποίο γνωρίζουμε ότι δεν απαντάται στο γάλα
8. Τέλος, αποθήκευση των φιαλιδίων στους -20 °C μέχρι την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο

3.3.3 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία

Ο χρωματογράφος (Agilent Technologies, μοντέλο 6890N) που χρησιμοποιήθηκε ήταν εφοδιασμένος με πολική στήλη HP-88 μήκους 60 m, διαμέτρου 0,25 mm και πάχους εσωτερικού φιλμ 0,20 nm (Agilent, Santa Clara, USA), η οποία λειτουργεί σε εύρος θερμοκρασιών 50-260 °C. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν φλόγας ιοντισμού (flame ionization detector, FID) ρυθμισμένος στους 260 °C. Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως προωθητικό αέριο με γραμμική ταχύτητα ρυθμισμένη στα 30 cm/sec.

3.4 Ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος

Οι αναλύσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς και ο προσδιορισμός των οξειδωτικών δεικτών περιγράφεται αναλυτικά από τους Tsiplakou *et al.* (2017). Στη συνέχεια θα αναφερθούν τα σημαντικότερα βήματα και η αρχή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν. Για τις αναλύσεις του αντιοξειδωτικού συστήματος χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο GenesysTM 180 (GenesysTM 180 UV-Visible Spectrophotometer, Thermoscientific).

3.4.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών ενζύμων:

Τα δείγματα αποψύχθηκαν ομαλά από τους -80 °C και φυγοκεντρήθηκαν στα 14.000 g για 10 min στους 4 °C προκειμένου να διαχωριστεί και να απομακρυνθεί το λίπος. Μοναδική

εξαίρεση αποτελεί η καταλάση, για τον προσδιορισμό της οποίας χρησιμοποιήθηκε μη-αποκορυφωμένο γάλα. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν ξανά στους -80°C μέχρι την χρήση τους. Για την δραστικότητα των ενζύμων οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

3.4.1.1 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD)

Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης SOD

Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)	ABS (nm)	Χρόνος (sec)
25	7,8	1	550	300

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 216 mM, Alfa Aesar) (pH 7,8)
2. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA, 10,7 mM, Panreac ITW Companies)
3. Κυτόχρωμα C (1,1 mM, Sigma-Aldrich)
4. Διάλυμα ξανθίνης (0,108 mM, Alfa Aesar)
5. Ενζυμικό διάλυμα οξειδάσης της ξανθίνης, 0,05 units/mL dd H_2O (xanthine oxidase, XOD, Sigma-Aldrich)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων
2. Προετοιμασία της κυψελίδας «χωρίς αναστολή» η οποία περιέχει:
 - 934 μl reaction cocktail (pH 7,8), το οποίο παρασκευάστηκε από: dd H_2O , KH_2PO_4 , EDTA, κυτόχρωμα C και διάλυμα ξανθίνης
 - 33 μl dd H_2O
 - 33 μl ενζυμικού διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης
3. Μέτρηση απορρόφησης της κυψελίδας «χωρίς αναστολή»
4. Προετοιμασία της κυψελίδας του δείγματος, η οποία περιέχει:
 - 957 μl reaction cocktail
 - 33 μl ενζυμικού διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης
 - 10 μl δείγματος
5. Μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στα 550 nm.

6. Υπολογισμός της αναστολής (%) με τον τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = (\Delta A/\text{min}_{\text{χωρίς αναστολή}} - \Delta A/\text{min}_{\text{δείγματος}}) * 100 / (\Delta A/\text{min}_{\text{χωρίς αναστολή}})$$

7. Τέλος, η δραστηκότητα υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Units/mL} = \% \text{ Αναστολή} / (50 * V_{\text{δείγματος(mL)}})$$

3.4.1.2 Καταλάση (Catalase, CAT)

Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Συνθήκες αντίδρασης CAT

Θερμοκρασία (°C)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)	ABS (nm)	Χρόνος (sec)
38	7	1	520	-

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 (50mM, pH 7)
2. Διάλυμα υπεροξειδάσης (800-1200 units/mg)
3. KH_2PO_4 (150 mM, pH 7)
4. 4 αμινο-αντιπυρίνη (2,25 mM)
5. 3,5-διχλωρο-2- υδροξυβενζυλοσουλφονικό οξύ (2 mM)
6. Διάλυμα H_2O_2 (200 mM). Η μέτρηση της απορρόφησης του έγινε σε UV στα 240 nm και
7. Διάλυμα αζιδίου του νατρίου (15 mM)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων (χρησιμοποιήθηκε μη-αποκορυφωμένο γάλα)
2. Προσθήκη 25 μl διαλύματος H_2O_2 και 75 μl δείγματος σε σωληνάριο erpendorf. Ο μάρτυρας (blank) αντίστοιχα αντί για δείγμα περιέχει 75 μl ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 (pH 7)
3. Επώαση για 4 min
4. Προσθήκη 900 μl διαλύματος αζιδίου του νατρίου
5. Μεταφορά 50 μl από το σωληνάριο erpendorf σε 950 μl από διάλυμα το οποίο περιέχει:

- Διάλυμα υπεροξειδάσης
 - KH_2PO_4
 - 4 αμινο-αντιπυρίνη και
 - 3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζυλοσουλφονικό οξύ
6. Επώαση για 12 min
 7. Φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 2 min στους 28 °C
 8. Μεταφορά υπερκειμένου και μέτρηση απορρόφησης στα 520 nm
 9. Τέλος, υπολογισμός της δραστηκότητας από τον τύπο:

$$\text{Units/mL} = (\text{ABS}_{\text{blank}} - \text{ABS}_{\text{δείγματος}} * 20) / (4 * 0,075)$$

3.4.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx)

Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Συνθήκες αντίδρασης GPx.

Θερμοκρασία (°C)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)	ABS (nm)	Χρόνος (sec)
25	7	1	340	180

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 (100 mM) και EDTA (1 mM), (pH 7)
2. L-Γλουταθειόνη ανηγμένη (GSH, 75 mM, Alfa Aesar)
3. Διάλυμα H_2O_2 0,047 % v/v (Sigma-Aldrich)
4. β -NADPH (10 mM, Alfa Aesar) και
5. Αναγωγή της γλουταθειόνης (from baker's yeast, *S. cerevisiae*) (Grd, Sigma-Aldrich)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων
2. Προετοιμασία κυψελίδας, η οποία περιέχει:
 - 519 μl ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 και EDTA
 - 8 μl GSH
 - 30 μl H_2O_2
 - 12 μl β -NADPH

- 30 µl δείγματος και
 - 1 µl Grd
3. Μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στα 340 nm.
 4. Υπολογισμός της δραστηρότητας από τον τύπο:

$$\text{Units/mL} = \Delta A / \text{min} * (-1) / (6,2 * V_{\text{δείγματος(mL)}})$$

3.4.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR)

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την αντίδραση παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συνθήκες αντίδρασης GR

Θερμοκρασία (°C)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)	ABS (nm)	Χρόνος (sec)
25	7,6	1	340	180

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 (100 mM) και EDTA (3,4 mM) (pH 7,6)
2. L-Γλουταθειόνη οξειδωμένη (GSSG, 30 mM, Sigma-Aldrich)
3. β -NADPH (0,8 mM) και
4. Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine serum albumin, BSA, 1% w/v, Alfa Aesar)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων
2. Προσθήκη σε κυψελίδα τις εξής ποσότητες:
 - 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 και EDTA
 - 217 µl dd H_2O
 - 33 µl GSSG
 - 117 µl β -NADPH
 - 33 µl BSA και
 - 100 µl δείγματος
3. Μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στα 340 nm
4. Τέλος, η δραστηρότητα προσδιορίστηκε με τον τύπο:

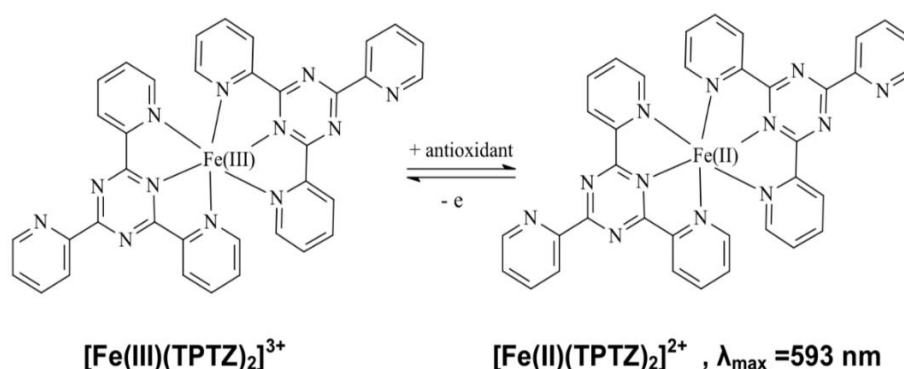
$$\text{Units/mL} = \Delta A / \text{min} * (-1) / (6,22 * V_{\text{δείγματος(mL)}})$$

3.4.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

Για την απομόνωση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των δειγμάτων γάλακτος και την περαιτέρω ανάλυσή του (μέθοδος FRAP, ABTS και DPPH) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που βασίζεται στους Li *et al.* (2007).

3.4.2.1 Μέθοδος FRAP

Η FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) αποτελεί τη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να ανάγουν τον Fe(III) στο σύμπλοκο σιδηρο-2,4,6,τριπυριδυλο-s-τριαζίνης (Fe(III)-TPTZ) σε Fe(II) στο αντίστοιχο σύμπλοκο σιδήρου (Fe(II)-TPTZ) σε όξινο περιβάλλον (Εικόνα 8). Κατά την αναγωγή του Fe(III) σε Fe(II), παρουσία TPTZ, σχηματίζεται ένα χρωματισμένο σύμπλοκο που απορροφά στα 593 nm.



Εικόνα 8: Μέθοδος FRAP (Πηγή: Μηνιώτη, 2009)

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. $CH_3COONa \times 3 H_2O$ (300 mM, pH 3,6)
2. TPTZ (10 mM) + HCl (40 mM) και
3. $FeCl_3 \times 6 H_2O$ (20 mM)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

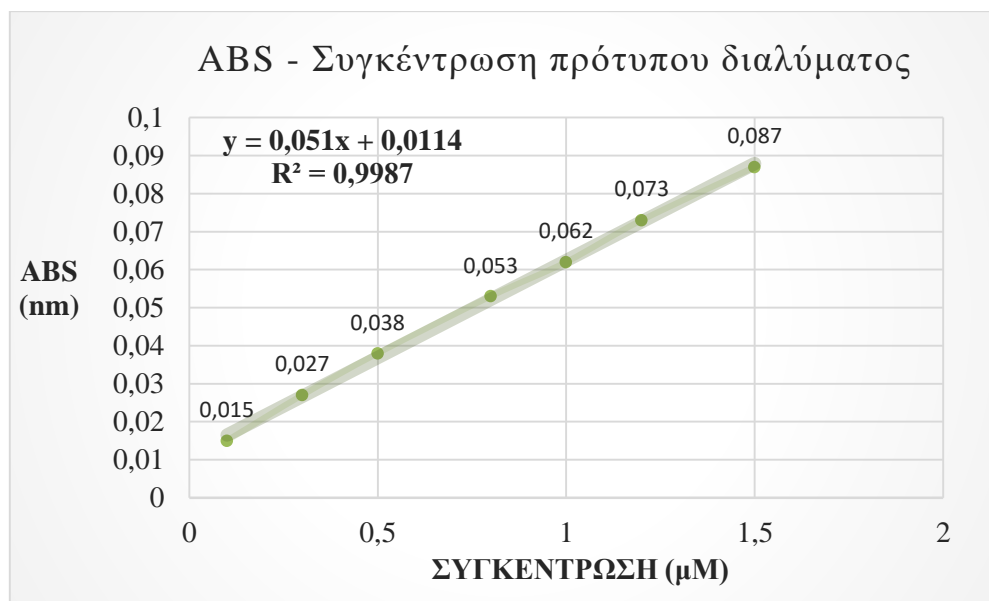
1. Παρασκευή διαλύματος FRAP με ανάμειξη, σε αναλογία 10:1:1, των εξής αντιδραστηρίων: 1) $CH_3COONa \times 3 H_2O$
2) TPTZ + HCl και

3) FeCl₃ x 6 H₂O

2. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων και ανάδευση σε συσκευή vortex
3. Τοποθέτηση 900 μl από το διάλυμα FRAP και 100 μl δείγματος σε κυψελίδα
4. Ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 4 min
5. Μέτρηση απορρόφησης στα 593 nm έναντι του μάρτυρα (blank: 1 mL διαλύματος FRAP). Λόγω ευαισθησίας της μεθόδου το κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές για δύο συνεχόμενους κύκλους (4 τιμές)

Πρότυπη καμπύλη:

Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ασκορβικό οξύ, συγκέντρωσης 1 mM. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της απορρόφησης και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του πρότυπου διαλύματος (Πίνακας 14).



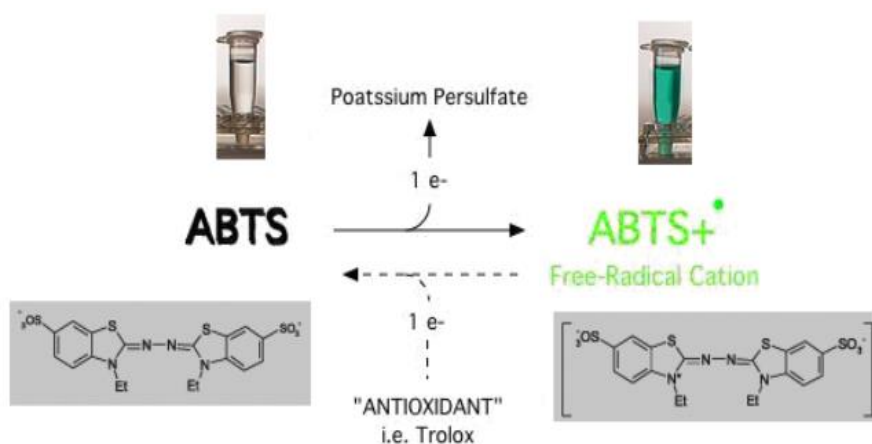
Πίνακας 14: Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος

Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε μM (ισοδύναμα ασκορβικού οξέος) σύμφωνα με την εξίσωση (Πίνακας 14):

- Τιμή FRAP(μM) = (ABS_{δείγματος} - 0,0114) / 0,051

3.4.2.2 Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος ABTS βασίζεται στην ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να ανάγει και να αποχρωματίζει τη δραστική ρίζα ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Χημική αντίδραση ABTS (Πηγή: Boligon *et al.*, 2014)

Έγινε χρήση των εξής αντιδραστηρίων:

1. ABTS (7 mM, Alfa Aesar)
2. Υπερθειικό κάλιο (2,45 mM, Sigma-Aldrich) και
3. PBS (Phosphate Buffered Saline, 0,005 M, pH 7.4)

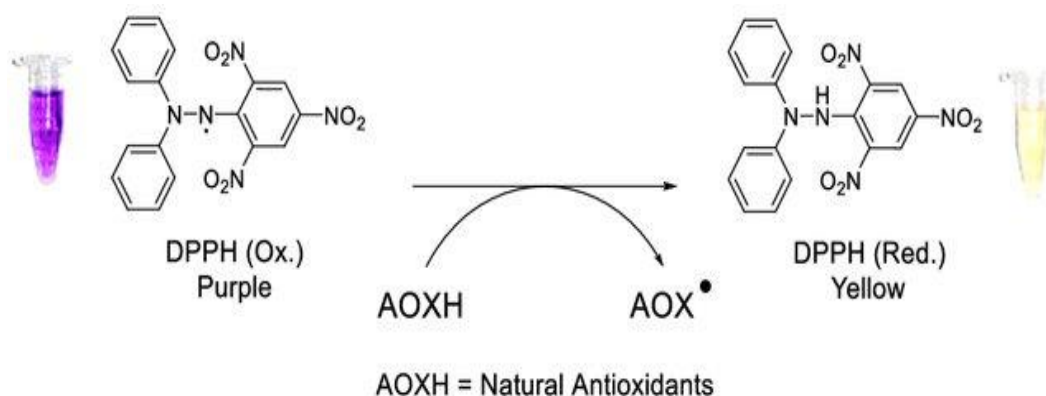
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Παρασκευή του stock solution: ανάμειξη ABTS και υπερθειικού καλίου σε αναλογία 1:1 και επώαση για 12-16 h στο σκοτάδι
2. Παρασκευή του working solution: Αραίωση του stock solution με PBS μέχρι η απορρόφηση στα 734nm να είναι ίση με $0,700 \pm 0,005$
3. Ομαλή απόψυξη των δειγμάτων και ανάδευση σε συσκευή vortex
4. Προσθήκη 10 μl δείγματος σε 990 μl working solution
5. Επώαση για 10 min
6. Μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm έναντι του μάρτυρα (blank: 1 mL working solution). Λόγω ευαισθησίας της μεθόδου το κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές για δύο συνεχόμενους κύκλους (4 τιμές)
7. Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατράπηκαν σε αναστολή % με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

- Αναστολή % = $(ABS_{\text{blank}} - ABS_{\text{δείγματος}}) / ABS_{\text{blank}} * 100$

3.4.2.3 Μέθοδος DPPH

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH βασίζεται στην αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (DPPH[•]). Με την προσθήκη αντιοξειδωτικών, η ρίζα DPPH[•] ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζίνη (DPPH-H) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Χημική αντίδραση DPPH (Πηγή: Arce-Amezquita *et al.*, 2019)

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

1. DPPH (0,6 mM, Sigma-Aldrich) και
2. Μεθανόλη

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

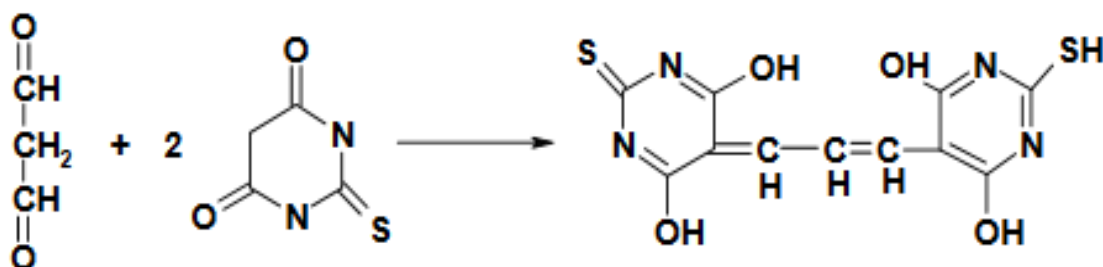
1. Παρασκευή stock solution DPPH διαλύοντας 0,0238 g DPPH σε 100 mL μεθανόλη
2. Παρασκευή working solution DPPH/MetOH (0,06 mM) με την 1/10 αραίωση του stock solution με μεθανόλη
3. Προσθήκη 20 μl δείγματος και 980 μl working solution DPPH/MetOH και παραμονή στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Η παρασκευή του blank έγινε με 1 mL working solution DPPH/MetOH
4. Μέτρηση απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 515 nm. Η μέτρηση του κάθε δείγματος έγινε εις τριπλούν
5. Τέλος, υπολογίστηκε η αναστολή % με τον εξής τύπο:

$$\text{Αναστολή \%} = (\text{DPPH}_{\text{blank}} - \text{DPPH}_{\text{δείγματος}}) / \text{DPPH}_{\text{blank}} * 100$$

3.4.3 Οξειδωτικοί δείκτες

3.4.3.1 Μέθοδος μηλονικής αλδεϋδης (MDA)

Η μηλονική αλδεϋδη (Malondialdehyde, MDA) μπορεί να βρεθεί στα περισσότερα βιολογικά δείγματα, ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η χρήση της είναι ευρέως διαδεδομένη για την εκτίμηση των επιδράσεων του οξειδωτικού στρες (Khoubnasabjafari *et al.*, 2015). Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της MDA με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), κατά την οποία σχηματίζεται ένα προϊόν MDA-TBA₂ που απορροφά έντονα στα 532 nm (Grotto *et al.*, 2009) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Αντίδραση MDA με TBA (Πηγή: Grotto *et al.*, 2009)

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

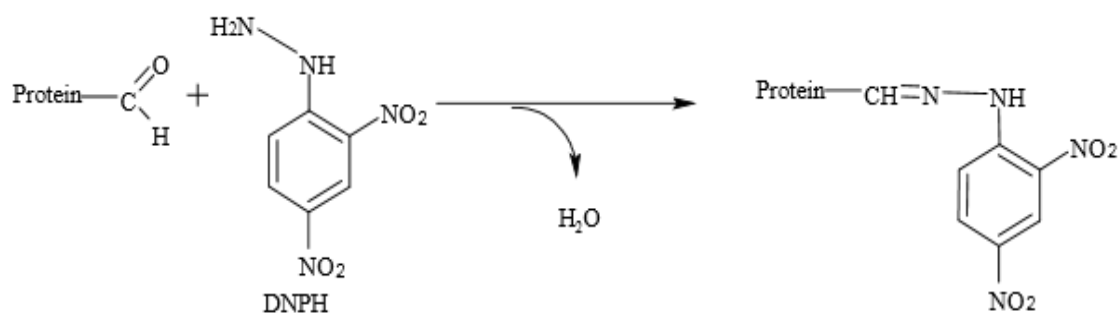
1. 1% ορθοφωσφορικού οξέος (Panreac ITW Companies) και
2. 0,6% TBA (Sigma-Aldrich)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προσθήκη 7 mL 1% ορθοφωσφορικού οξέος και 2 mL 0,6% TBA σε 1 mL δείγματος μη-αποκορυφωμένου γάλακτος. Η ποσότητα του δείγματος ήταν αποθηκευμένη στους -40 °C
2. Επώαση στους 100 °C για 60 min
3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε ψυχρό υδατόλουτρο για μείωση της θερμοκρασίας
4. Με μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 532 nm
5. Οι τιμές των απορροφήσεων μετατράπηκαν σε MDA (μM) με τη χρήση της εξίσωσης:
 - $MDA (\mu M) = (ABS/155) * 1000$

3.4.3.2 Μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC)

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Η μέθοδος των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην αντίδραση του 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) με την καρβονυλομάδα της πρωτεΐνης και στο σχηματισμό υδραζόνης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Αντίδραση DNPH με πρωτεϊνικά καρβονύλια (Πηγή Purdel *et al.*, 2014)

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. DNPH (10 mM) σε HCl (2,5 N)
1. Διάλυμα ουρίας (5 M, pH 2,3)
2. Τριχλωροξικό οξύ 20% (TCA, Sigma-Aldrich)
3. Τριχλωροξικό οξύ 10% και
4. Διάλυμα αιθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) (Merck KGaA)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προσθήκη 50 μl δείγματος και 50 μl TCA 20 % σε σωληνάριο eppendorf. Το κάθε δείγμα έχει και δικό του μάρτυρα που αποτελείται επίσης από 50 μl δείγματος και 50 μl TCA 20 %
2. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή vortex
3. Παραμονή για 15 min σε πάγο
4. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή vortex
5. Φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 22 $^{\circ}\text{C}$
6. Αφαίρεση υπερκειμένου
7. Προσθήκη 500 μl HCl (2,5 N) στα σωληνάρια eppendorf του μάρτυρα και 500 μl DNPH σε αυτά του δείγματος

8. Επώαση για 1 h στο σκοτάδι με ανάδευση σε συσκευή vortex ανά 15 min
9. Φυγοκέντρωση στα 15.000 g για 5 min στους 22 °C
10. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 1 mL TCA 10 %
11. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή vortex
12. Φυγοκέντρωση στα 15.000 g για 5 min στους 22 °C
13. Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 1 mL διαλύματος αιθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρωση στα 15.000 g για 5 min στους 22 °C. Επανάληψη του βήματος 2 φορές
14. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 1 mL ουρίας
15. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή vortex
16. Επώαση στους 37 °C για 15 min
17. Καλή ανάδευση σε συσκευή vortex
18. Φυγοκέντρωση στα 15.000 g για 3 min στους 22 °C
19. Παραλαβή υπερκείμενου και μέτρηση απορρόφησης στα 375 nm έναντι του μάρτυρα. Για κάθε δείγμα η μέτρηση έγινε δύο φορές
20. Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατράπηκαν σε πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mL) με τη χρήση της εξίσωσης:
 - Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mL) = ABS*45,45

3.4.4 Στατιστική ανάλυση

Για το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο έγινε διαχωριστική ανάλυση (Discriminant Analysis) μέσω του προγράμματος SPSS Statistics. Η διαχωριστική ανάλυση είναι μία στατιστική τεχνική μέσω της οποίας εξετάζονται οι διαφορές μεταξύ δυο ή περισσότερων ομάδων και εντοπίζει εκείνες τις μεταβλητές με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό των ομάδων, οι οποίες έχουν οριστεί εκ των προτέρων. Η ανάλυση αυτή αποτελεί μία εικόνα για το πώς τα δείγματα σχετίζονται μεταξύ τους. Η διαχωριστική ανάλυση ως προς το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των δειγμάτων έγινε με τη χρήση των αποτελεσμάτων, και συγκεκριμένα των διπλών μετρήσεων, από τις αναλύσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς και του προσδιορισμού των οξειδωτικών δεικτών. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε StepWise ανάλυση (βηματική παλινδρόμηση), μέσω της οποίας προκύπτει ένα μοντέλο που περιλαμβάνει μόνο τις απαραίτητες μεταβλητές. Ωστόσο, ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων βασίστηκε σε όλες τις μεταβλητές, χωρίς να παραλείπεται καμία.

3.5 Καταμέτρηση πληθυσμών και απομόνωση αποικιών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κλασική μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε εντός 24 h από την άφιξη των δειγμάτων στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Κατά την διαδικασία των αραιώσεων 1 mL γάλακτος αναμείχθηκε με 9 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer (Biokar Diagnostics) υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, έγινε εμβολιασμός 0,1 mL ή 1,0 mL από τις αραιώσεις με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate) ή της ενσωμάτωσης (pour plate), αντίστοιχα, στα θρεπτικά υποστρώματα που επιλέχθηκαν για την καταμέτρηση των πληθυσμών συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στις κατάλληλες συνθήκες ανάλογα με τη μικροβιακή ομάδα ανάπτυξης, σύμφωνα με τον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Μικροβιακή ομάδα, θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες ανάπτυξης

Μικροβιακή ομάδα	Θρεπτικό υπόστρωμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (d)	Συνθήκες επώασης	Μέθοδος εμβολιασμού	Παρατηρήσεις
Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι	MRS	30	2	Αναερόβιες (διπλή στρώση agar)	Ενσωμάτωση	Προσθήκη κυκλοεξαμιδίου (0,1 % w/v)
Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι	MRS	42	2	Αναερόβιες (διπλή στρώση agar)	Ενσωμάτωση	Προσθήκη κυκλοεξαμιδίου (0,1 % w/v)
NSLAB	Rogosa	30	3-5	Αναερόβιες (διπλή στρώση agar)	Ενσωμάτωση	
Μεσόφιλοι Κόκκοι	M17	30	2	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση	Προσθήκη κυκλοεξαμιδίου (0,1 % w/v)
Θερμόφιλοι κόκκοι	M17	42	2	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση	Προσθήκη κυκλοεξαμιδίου (0,1 % w/v)
Εντερόκοκκοι	KAA	37	1	Μικροαερόφιλες	Επιφανειακή επίστρωση	
Εντεροβακτήρια	VRBGA	37	1	Αναερόβιες (διπλή στρώση agar)	Ενσωμάτωση	
Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX)	PCA	30	4	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση	

Ψυχρότροφα	PCA	4	10	Μικροαερό-φιλες	Ενσωμά-τωση	
Ζύμες	YGC	25	3-5	Μικροαερό-φιλες	Επιφανεια-κή επίστρωση	Περιέχει χλωραμφαινικό-λη (0,1 % w/v)

Μετά την επώαση των τρυβλίων στις κατάλληλες συνθήκες, ακολούθησε ο υπολογισμός του μικροβιακού φορτίου (colony count method). Για την καταμέτρηση επιλέχθηκαν τρυβλία τα οποία περιείχαν λιγότερες από 300 αποικίες και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μονάδες $\log \text{ CFU mL}^{-1}$. Έπειτα ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός αποικιών από τις συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες: μεσόφιλοι και θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (de Man Rogosa Sharpe, MRS 30 και 42 °C, αντίστοιχα), NSLAB (Rogosa), μεσόφιλοι και θερμόφιλοι κόκκοι (M17 30 και 42 °C, αντίστοιχα) και ζύμες (Yeast Glucose Chloramphenicol, YGC). Συγκεκριμένα, μέσω μακροσκοπικής παρατήρησης σε στερεοσκόπιο επιλέχθηκαν οι αποικίες που διέφεραν ως προς τη μορφολογία τους (μέγεθος, χρώμα, σχήμα) και μεταφέρθηκαν από τα τρυβλία σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 5 mL αντίστοιχο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (broth). Εξάιρεση αποτέλεσαν οι αποικίες, οι οποίες απομονώθηκαν από το υπόστρωμα Rogosa, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα το MRS καθώς επίσης και οι αποικίες που απομονώθηκαν από το YGC, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε Yeast Extact (5 g/ 1000 mL απιονισμένο νερό) και γλυκόζη (20 g/ 1000 mL απιονισμένο νερό). Μετά την ανάπτυξή τους, ακολούθησε η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) με τη χρήση αποστειρωμένου κρίκου με σκοπό τη δημιουργία μεμονωμένων αποικιών. Σε περίπτωση που οι αποικίες εμφάνιζαν διαφορές στη μορφολογία η διαδικασία του streaking επαναλαμβανόταν. Οι καθαρές πλέον αποικίες μεταφέρθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε broth με βάση το θρεπτικό υπόστρωμα από το οποίο απομονώθηκαν. Αφού αναπτύχθηκαν ακολούθησε χρώση Gram (Παράρτημα 7) και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού (x100) και λήψη ψηφιακών φωτογραφιών με το πρόγραμμα SigmaScan Pro 5. Τέλος, μέχρι την πραγματοποίηση των μοριακών αναλύσεων με σκοπό την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, οι αποικίες αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε αποστειρωμένα μικροφιαλίδια (vials) περιεκτικότητας 0,6 mL σε Nutrient Broth (Biokar, France) και 0,2 mL σε αποστειρωμένη γλυκερόλη (Fluka Analytical, St. Gallen, Switzerland) ως κρυοπροστατευτικού παράγοντα.

Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε διαχωριστική ανάλυση με τη χρήση των αποτελεσμάτων από τις καταμετρήσεις των πληθυσμών, μέσω του προγράμματος SPSS Statistics, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.4.4.

3.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών

3.6.1 Απομόνωση DNA

3.6.1.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα βακτηρίων

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Pitcher *et al.* (1989) μερικώς τροποποιημένο. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (guanidinium thiocyanate), ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα πρωτεϊνών με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA, καθώς επίσης και τη χρήση των ενζύμων λυσοζύμη και μουτανολυσίνη, υπεύθυνων για τη λύση των κυττάρων τόσο των Gram θετικών βακτηρίων (LAB) όσο και των Gram αρνητικών.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Για την ανανέωση των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν 50 μl βιομάζας από κάθε καθαρή καλλιέργεια (-80 °C), τα οποία μεταφέρθηκαν σε 5 mL MRS ή M17 broth (εμβόλιο 1% v/v) και επώαστηκαν στους 30 ή 42 °C για 1-2 d
2. Μετά την ανανέωση ακολούθησε: παραλαβή 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια και φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm για 2 min στους 20 °C. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη του βήματος δύο φορές
3. Ακολούθησε επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL PBS (NaCl: 137 mM, KCl: 2.7 mM, Na₂HPO₄: 10 mM και KH₂PO₄: 1.8 mM, pH 7,4) και φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 2 min στους 20 °C. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη του βήματος
4. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL PBS. Διάλυση του ιζήματος με ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 65 °C για 10 min
5. Φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm για 1 min στους 20 °C
6. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου
7. Στο ίζημα προστέθηκαν: 100 μl λυσοζύμης (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich) διαλυμένης σε TE buffer (10 mmol Tris-HCL, 1 mmol/L EDTA, pH 8), 10 μl μουτανολυσίνης (5 U/μl) και 10 μl διαλύματος ριβονουκλεάσης (RNase, Sigma kit, GenElute)
8. Ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 37 °C για 30 min, με ανάδευση των μικροφιαλιδίων κάθε 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποικοδόμησης του DNA, ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε με ήπιες κινήσεις

9. Προσθήκη 0,5 mL αντιδραστηρίου GES (5 mol/L guanidium thiocyanate, 100 mmol/L EDTA και 0.5% v/v sarkosyl) στα μικροφιαλίδια στην απαγωγό
 10. Ήπια ανάδευση και τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στον πάγο για 10 min
 11. Προσθήκη 0,25 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 M) στην απαγωγό
 12. Ήπια ανάδευση και τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στον πάγο για 10 min
 13. Προσθήκη 0,5 mL χλωροφορμίου στην απαγωγό και ήπια ανάδευση μέχρι την πλήρη ανάμειξη των δύο σχηματιζόμενων φάσεων
 14. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 min στους 4 °C. Έπειτα, προσεκτική μεταφορά υπερκειμένου σε νέα μικροφιαλίδια και αποφυγή παραλαβής των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση. Σε περίπτωση που δεν έχει γίνει καλός διαχωρισμός των δύο φάσεων επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης
 15. Προσθήκη 0,54 φορές επί του όγκου του δείγματος παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση
 16. Φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 2 min στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου
 17. Προσθήκη 0,7 mL παγωμένης αιθανόλης (70 % v/v) και φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 3 min στους 4 °C. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη του βήματος 2 φορές
 18. Φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 1 min στους 4 °C και πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης
 19. Τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στους 37 °C για 2-3 min για να εξατμιστεί η εναπομείνασα αιθανόλη
 20. Διαλυτοποίηση του DNA σε 25-40 μl διαλύματος TE, ήπια ανάδευση και παραμονή στους 37 °C για 1-2 h
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

3.6.1.2 Απομόνωση ολικού DNA από κύτταρα ζυμών

Για την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα των ζυμών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Kopsahelis *et al.* (2009) μερικώς τροποποιημένο. Η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα των ζυμών στηρίζεται στη χρήση του γλυκοζιτικού ενζύμου λυτικάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη λύση των κυττάρων των ζυμών, καθώς και του διαλύματος δωδεκασουλφονικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), ενός παράγοντα που

αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA.

Τα στάδια κατά την διαδικασία της απομόνωσης είναι τα εξής:

1. Για την ανανέωση των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν 50 μl βιομάζας από κάθε καθαρή καλλιέργεια (-80 °C), τα οποία μεταφέρθηκαν σε 5 mL θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη (2% g/mL) και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, 0,5% g/mL) (εμβόλιο 1% v/v) και επωάστηκαν στους 25 °C για 1-2 d
2. Μετά την ανανέωση ακολούθησε: παραλαβή 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια και φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 5 min στους 20 °C. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη του βήματος δύο φορές
3. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL απιονισμένου νερού. Ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 5 min στους 20 °C. Απόχυση του υπερκειμένου και δεύτερη επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,5 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 65 °C για 10 min
4. Φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 5 min στους 20 °C
5. Απόχυση του υπερκειμένου και φυγοκέντρηση για 1 min
6. Πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M σορβιτόλης (D-Sorbitol, Serva, Heidelberg, Germany) και 0,1 M Na₂EDTA (AppliCherm, Darmstadt, Germany) (pH 7,5)
7. Προσθήκη 200 μl λυτικάσης (Lyticase *Arthobacter luteus*, L4025, Sigma-Aldrich), και 10 μl RNAse, ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση για 1 h στους 37 °C. Κατά την διάρκεια της επώασης πραγματοποιούνταν αναδεύσεις κάθε 10 min
8. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 5 min στους 20 °C. Απόχυση υπερκειμένου και ξανά φυγοκέντρηση για 1 min
9. Απομάκρυνση υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich) και 20 mM EDTA (pH 7,4), καθώς και 50 μl SDS 20 % w/v
10. Ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 65°C για 30 min. Κατά την διάρκεια της επώασης πραγματοποιούνταν αναδεύσεις κάθε 10 min. Στο σημείο αυτό ολοκληρώθηκε η λύση του κυττάρου για αυτό ο χειρισμός των δειγμάτων στα επόμενα βήματα έγινε με ήπιες κινήσεις
11. Προσθήκη 0,2 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 M, Sigma-Aldrich) και ήπια ανάδευση
12. Παραμονή των δειγμάτων για 1 h σε πάγο

13. Φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 10 min στους 4 °C και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο μικροφιαλίδιο. Επανάληψη του βήματος
 14. Προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης 100 % v/v (Merck, Darmstadt, Germany) στα νέα μικροφιαλίδια, ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 5 min
 15. Φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm για 10 min στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου
 16. Προσθήκη 700 μl παγωμένης αιθανόλης (70% v/v), ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Απομάκρυνση της αιθανόλης και επανάληψη του βήματος
 17. Τοποθέτηση των μικροφιαλιδίων στους 37 °C για 1-2 min για την εξάτμιση της εναπομείνουσας αιθανόλης
 18. Διαλυτοποίηση του DNA σε 25-40 μl διαλύματος TE, ήπια ανάδευση και παραμονή στους 37 °C για 1-2 h
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

3.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και έλεγχος καθαρότητας του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητάς του με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων Quawell Q5000 (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) (Εικόνα 13) και του προγράμματος Q5000 V6.0.3.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Επιλογή του προγράμματος της συσκευής «Nucleic Acid»
2. Μηδενισμός της συσκευής με 2 μl διαλύματος TE (blank)
3. Ήπια ανάδευση των δειγμάτων και μεταφορά 2 μl στην ειδική βάση του φασματοφωτόμετρου
4. Στο τέλος της κάθε μέτρησης, η βάση καθαριζόταν με απορροφητικό χαρτί και η διαδικασία επαναλαμβανόταν για το επόμενο δείγμα. Η φωτομέτρηση του DNA έγινε σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (Optical Density) υπολογίστηκε αυτόματα η συγκέντρωσή του. Παράλληλα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 και 230 nm (OD_{280nm} και OD_{230nm}) για τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA. Όταν ο λόγος OD_{260nm}/OD_{280nm} κυμαίνεται μεταξύ 1,8-2 και αντίστοιχα ο OD_{260nm}/OD_{230nm} μεταξύ 2-2,2 είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού DNA. Αποκλίσεις από τις προαναφερόμενες τιμές των δύο λόγων είναι

ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων (π.χ. πρωτεϊνών ή άλλων ενώσεων από τη διαδικασία της απομόνωσης)



Εικόνα 13: Φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων (Quawell Q5000)

3.6.3 Ενίσχυση DNA με τη μέθοδο της rep-PCR

3.6.3.1 Ενίσχυση DNA με την μέθοδο της rep-PCR σε βακτήρια

Αρχικά, τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι περίπου 50 ng/μl. Κατά την ενίσχυση τμημάτων DNA από βακτήρια μέσω της rep-PCR (Παράρτημα 7) χρησιμοποιήθηκε το OneTaq Quick Load 2X Master Mix (New England Biolabs-NEB, Massachusetts, USA), ο εκκινητής BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') καθώς και η βόεια αλβουμίνη ορού (Bovine Serum Albumine, BSA, New England Biolabs-NEB, 100x) με στόχο τη δέσμευση των παρεμποδιστών της αντίδρασης στις ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Αντιδραστήρια και ποσότητες κατά την τεχνική της rep-PCR σε δείγματα βακτηρίων

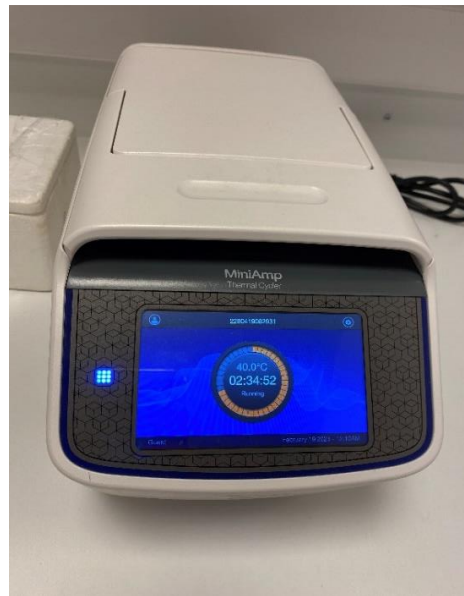
Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl/ δείγμα)
Master Mix	12,5
BOXA1R primer 10 pmol/μl	1
BSA (20 mg/mL)	0,5

Δείγμα (50 ng) + dd H ₂ O	11
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε ειδικά μικροφιαλίδια τύπου erpendorf, τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems MiniAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) (Εικόνα 14) και ξεκίνησε η αντίδραση. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη: 2 min στους 92 °C
2. 30 κύκλοι κατά τους οποίους:
 - 30 s στους 92 °C
 - 2 min στους 40 °C και
 - 3 min στους 72 °C
3. Τελική επιμήκυνση: 15 min στους 72 °C και τέλος παραμονή στους 10 °C

Τα προϊόντα της *rep*-PCR αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.



Εικόνα 14: Θερμικός κυκλοποιητής

3.6.3.2 Ενίσχυση DNA με την μέθοδο της *rep*-PCR σε ζύμες

Ομοίως με τα βακτήρια, τα δείγματα DNA των ζυμών αραιώθηκαν με υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι περίπου 50 ng/μl. Για την διαδικασία της *rep*-PCR χρησιμοποιήθηκε το OneTaq Quick Load 2X Master Mix, ο εκκινητής

(GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') και η BSA στις ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17: Αντιδραστήρια και ποσότητες κατά την τεχνική της rep-PCR σε δείγματα ζυμών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl/ δείγμα)
Master Mix	12,5
(GTG) ₅ primer 10 pmol/μl	1
BSA (10 mg/mL)	1
Δείγμα (50 ng) + dd H ₂ O	10,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Αφού ετοιμάστηκαν τα ειδικά μικροφιαλίδια της PCR με τις κατάλληλες ποσότητες των αντιδραστηρίων, τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή για την έναρξη της αντίδρασης. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη: 5 min στους 94 °C
2. 35 κύκλοι κατά τους οποίους:
 - 15 s στους 94 °C
 - 45 s στους 55 °C και
 - 90 s στους 72 °C
3. Τελική επιμήκυνση: 6 min στους 72 °C και τέλος παραμονή στους 10 °C
Έπειτα τα προϊόντα της rep-PCR αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι την ηλεκτροφόρησή τους.

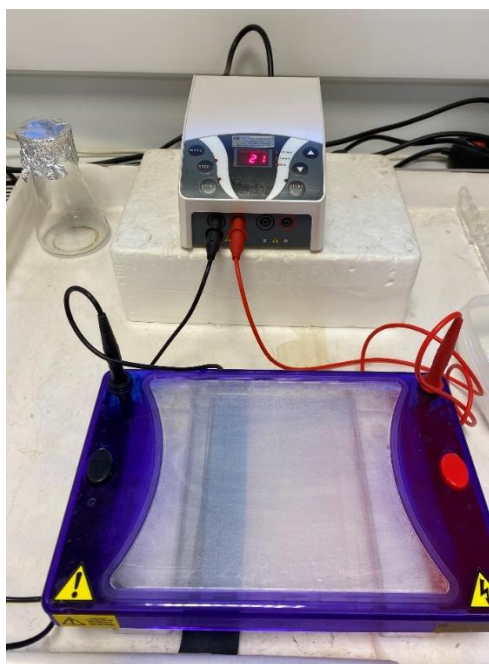
3.6.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR σε πηκτή αγαρόζης

Η διαδικασία για την ηλεκτροφόρηση (Παράρτημα 7) των προϊόντων της rep-PCR σε πηκτή αγαρόζης είναι η εξής:

1. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης με διαλυτοποίηση 1,56 g αγαρόζης (Sigma-Aldrich) σε 120 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetate, 1 mM EDTA) με χρήση θερμότητας
2. Προσθήκη 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/mL τελική συγκέντρωση EtBr, FLUKA, Munich, Germany) πριν την πήξη της αγαρόζης

3. Τοποθέτηση της υγρής αгарόζης στο ειδικό καλούπι και χρήση της πλαστικής ειδικής «χτένας» για τη δημιουργία των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια)
4. Μετά την στερεοποίηση της αгарόζης: αφαίρεση της ειδικής «χτένας» και τοποθέτηση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 15)
5. Φόρτωση των δειγμάτων, 18 μl από κάθε δείγμα, στα πηγαδάκια. Στο πρώτο και στο τελευταίο πηγαδάκι τοποθετήθηκαν από 10 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb (DNA Ladder-Invitrogen, California USA)
6. Εφαρμογή σταθερής τάσης 60 V για 140 min και έναρξη ηλεκτροφόρησης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε στην τράπεζα συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP GelDoc-It® Imager, UVP Transilluminator, Analytik Jena, Jena, Germany). Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής και η αποθήκευση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων της με τη χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος VisionWorks.



Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

3.6.5 Ομαδοποίηση στελεχών με τη χρήση του προγράμματος Bionumerics

Η ομαδοποίηση των στελεχών με βάση το ηλεκτροφορητικό τους προφίλ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Bionumerics 6.1 (Applied Maths). Το

λογισμικό πρόγραμμα Bionumerics συγκρίνει τα ηλεκτροφορητικά προφίλ των στελεχών μεταξύ τους αλλά και με το μάρτυρα μοριακών μαζών (1 kb ladder). Έτσι προκύπτει ένα δενδρόγραμμα, στο οποίο τα στελέχη ομαδοποιούνται με βάση τα ποσοστά ομοιότητάς τους. Στην παρούσα μελέτη τα στελέχη με ποσοστά ομοιότητας >90 % θεωρήθηκε ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα.

3.6.6 Αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων και της περιοχής ITS των ζυμών

3.6.6.1 Αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων

Μετά την ομαδοποίηση των στελεχών, από κάθε ομάδα επιλέχθηκαν 1-3 αντιπροσωπευτικά στελέχη στα οποία πραγματοποιήθηκε 16S-PCR. Αρχικά, τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με υπερκάρθαρo αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι περίπου 200 ng/μl. Κατά την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το OneTaq Quick Load 2X Master Mix (New England Biolabs-NEB, Massachusetts, USA), οι εκκινητές 16S-F (5'- GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G -3') και 16S-R (5'- AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC -3') και η BSA στις ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Αντιδραστήρια και ποσότητες κατά την PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl/ δείγμα)
Master Mix	25
16S-R (10pmol/μl)	1
16S-F (10pmol/μl)	1
BSA (20 mg/mL)	0,5
Δείγμα (200 ng) + dd H ₂ O	22,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε ειδικά μικροφιαλίδια τύπου eppendorf, τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή και ξεκίνησε η αντίδραση. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη: 3 min στους 94 °C
 2. 30 κύκλοι κατά τους οποίους:
 - 30 s στους 94 °C
 - 30 s στους 56 °C και
 - 80 s στους 72 °C
 3. Τελική επιμήκυνση: 5 min στους 72 °C και τέλος παραμονή στους 10 °C
- Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR (Κεφάλαιο 3.6.7).

3.6.6.2 Αλληλούχηση της περιοχής ITS των ζυμών

Ομοίως με τα βακτήρια, τα αντιπροσωπευτικά δείγματα DNA των ζυμών που επιλέχθηκαν για ταυτοποίηση, αραιώθηκαν με υπερκίθαρο αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι περίπου 200 ng/μl. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε το OneTaq Quick Load 2X Master Mix, οι εκκινητές ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') και ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') και η BSA στις ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19: Αντιδραστήρια και ποσότητες κατά την PCR για την ενίσχυση της περιοχής ITS των ζυμών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl/ δείγμα)
Master Mix	25
ITS1 (10pmol/μl)	1
ITS4 (10pmol/μl)	1
BSA (20 mg/mL)	0,5
Δείγμα (200 ng) + dd H ₂ O	22,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50

Αφού ετοιμάστηκαν τα ειδικά μικροφιαλίδια της PCR με τις κατάλληλες ποσότητες των αντιδραστηρίων, τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή για την έναρξη της αντίδρασης. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

4. Αρχική αποδιάταξη: 4 min στους 94 °C
5. 35 κύκλοι κατά τους οποίους:
 - 1 min στους 94 °C

- 2 min στους 55,5 °C και
 - 2 min στους 72 °C
6. Τελική επιμήκυνση: 10 min στους 72 °C και τέλος παραμονή στους 10 °C
Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR.

3.6.7 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR από τα υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, της BSA, των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού μεγέθους και του ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προσθήκη 50 μl απιονισμένου νερού στα φιαλίδια με το προϊόν της PCR
2. Προσθήκη 200 μl διαλύματος NT1
3. Μεταφορά του διαλύματος (300 μl) σε κατάλληλο μικροφιαλίδιο με ειδική στήλη χαλαζία (PCR Clean-up Column) και φυγοκέντρωση στα 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
4. Απόχυση του διηθήματος
5. Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3 αφού προηγουμένως έχει προστεθεί σε αυτό αιθανόλη
6. Φυγοκέντρωση στα 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και απόχυση του διηθήματος
7. Επανάληψη της φυγοκέντρωσης για 1 min, για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3
8. Επώαση στους 37 °C για 2 min για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης
9. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό μικροφιαλίδιο και προσθήκη 25 μl διαλύματος έκλουσης NE
10. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000 g. Επανατοποθέτηση του διαλύματος έκλουσης NE στη στήλη και επανάληψη του βήματος για πλήρη ανάκτηση του DNA

Το διήθημα περιείχε, πλέον, το καθαρό προϊόν και ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης όπως αυτή περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3.6.4, με την διαφοροποίηση ότι η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 100 V για 60 min και η ποσότητα του κάθε δείγματος ήταν

5 μl ενώ του μάρτυρα μοριακών μαζών 10 μl. Ακόμα, στα δείγματα DNA έγινε προσθήκη 0,5 μl χρωστικής. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της PCR.

3.6.8 Ταυτοποίηση στελεχών

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο με σκοπό την ταυτοποίησή τους, η οποία πραγματοποιήθηκε με την σύγκριση των αλληλουχιών των στελεχών των δειγμάτων με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων Nucleotide collection, μέσω της μηχανής αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.6.9 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα των ταυτοποιηθέντων βακτηρίων και ζυμών σε επίπεδο γένους Πραγματοποιήθηκε Discriminant Analysis με βάση τα ποσοστά, ανά δείγμα (Σχήμα 10).

3.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Για την απομόνωση του ολικού DNA για τη μεταγονιδιωματική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το DNeasy PowerFood Microbial Kit.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Προσθήκη 1,8 mL γάλακτος σε περιέκτη συλλογής των 2 mL και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 °C
2. Απομάκρυνση του λίπους, απόχυση του υπερκειμένου και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 °C
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου με χρήση πιπέτας, προσθήκη 450 μl διαλύματος MBL και ανάδευση σε συσκευή vortex
4. Μεταφορά των επαναιωρημένων κυττάρων σε PowerBead Tube.
5. Χρήση του Bead beater σε συνθήκες 5.500 rpm για 2 κύκλους διάρκειας 18 s
6. Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 °C
7. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 mL και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 °C. Επανάληψη του βήματος

8. Προσθήκη 100 μL διαλύματος IRS, ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 2-8 $^{\circ}\text{C}$ για 5 min
9. Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$ και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 mL. Επανάληψη του βήματος
10. Προσθήκη 900 μL διαλύματος MR και ανάδευση σε συσκευή vortex
11. Μεταφορά 650 μL υπερκειμένου σε μία MB Spin Column και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$. Απόχυση του υγρού και επανάληψη του βήματος μέχρι εξαντλήσεως του υπερκειμένου
12. Τοποθέτηση της MB Spin Column σε καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 mL
13. Προσθήκη 650 μL διαλύματος PW και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$
14. Απόχυση του υγρού, προσθήκη 650 μL αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$
15. Απόχυση του υγρού και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 2 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$
16. Τοποθέτηση της MB Spin Column σε καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 mL και επώαση στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 3 min
17. Προσθήκη 25 μL απιονισμένου νερού (70 $^{\circ}\text{C}$) στο κέντρο της στήλης, επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$
18. Επανατοποθέτηση των 25 μL απιονισμένου νερού, του προηγούμενου βήματος, στο κέντρο της στήλης, επώαση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 min στους 20 $^{\circ}\text{C}$

Μετά την απομόνωση ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του DNA όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 3.6.2. Η ελάχιστη αποδεκτή συγκέντρωση DNA είναι 2 ng/ μL .

Πριν την αποστολή των δειγμάτων DNA για μεταγονιδιωμιακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε 16S-PCR για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA ως προς την ύπαρξη παρεμποδιστών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ήδη περιγραφεί στο Κεφάλαιο 3.6.6.1. Ωστόσο οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και η συγκέντρωση του DNA ήταν διαφορετικές (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Αντιδραστήρια και ποσότητες κατά την PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μL / δείγμα)
---------------	---------------------------------------

Master Mix	12,5
16S-R (10pmol/μl)	1
16S-F (10pmol/μl)	1
BSA (20 mg/mL)	1
Δείγμα (180 ng) + dd H ₂ O	9,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Τα προϊόντα της 16S-PCR ηλεκτροφορήθηκαν, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3.6.4 με την διαφοροποίηση ότι η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 100 V για 60 min.

Στην συνέχεια, έπειτα από την επιβεβαίωση της καθαρότητας του DNA, τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση αμπλικονίων (bTEFAP®) με την πλατφόρμα αλληλούχησης Illumina MiSeq στο Molecular Research DNA (MR DNA, Shallowater, Texas). Η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλομορφίας βασίστηκε στην ενίσχυση των περιοχών υψηλής μεταβλητότητας V1-V3 του γονιδίου του 16S rRNA με την χρήση των εκκινητών 27F (5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') και 519R (5'-GTN TTA CNG CGG CKG CTG-3'). Για την ταυτοποίηση των ζυμών/μυκήτων ενισχύθηκε η περιοχή ITS1-ITS2 με τους εκκινητές ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') και ITS2R (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC3'). Οι συνθήκες της PCR καθώς και ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Papademas *et al.* (2019). Στο τέλος τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωμιακής ανάλυσης εκφράστηκαν ως % σχετική αφθονία.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Χημική σύσταση και pH δειγμάτων

Η χημική σύσταση και το pH των δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Χημική σύσταση και pH των δειγμάτων νοπού γάλακτος όνου

Δείγμα	pH	Πρωτεΐνη (% w/w)	Λίπος (% w/w)	Λακτόζη (% w/w)	TS (% w/w)	SNF (% w/w)
1	7,29	1,74	0,70	6,30	9,50	9,01
2	7,24	1,38	0,12	6,33	8,55	8,65
3	7,14	1,77	0,32	6,58	9,39	9,32
4	7,27	1,80	0,11	6,16	8,85	8,94
5	7,29	1,55	0,32	6,08	8,71	8,59
6	7,30	2,53	0,26	5,20	8,95	8,75
7	7,25	1,69	0,65	5,72	8,88	8,37
Εύρος τιμών	7,14-7,30	1,38-2,53	0,11-0,70	5,20-6,58	8,55-9,50	8,37-9,32
Μέσος Όρος ± SD ^a	7,25±0,05	1,78±0,34	0,35±0,22	6,05±0,43	8,98±0,32	8,80±0,29

Οι τιμές pH των δειγμάτων δεν εμφάνισαν αποκλίσεις μεταξύ τους και κυμαίνονταν από 7,14 έως 7,30 (Πίνακας 21). Τέτοιες τιμές είναι σύμφωνες και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (pH 7,00-7,30) (Chiofalo *et al.* 2015; Giacometti *et al.*, 2016).

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη κυμαίνονταν από 1,38 έως 2,53 % w/w. Τα ποσοστά αυτά ήταν για όλα τα δείγματα εντός του ορίου που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (1,40-2,20 % w/w) εκτός από τα δείγματα 2 και 6, των οποίων η περιεκτικότητα βρέθηκε στο 1,38 και 2,53 % w/w, αντίστοιχα (Polidori *et al.*, 2009; Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014). Ωστόσο, οι αποκλίσεις αυτές είναι πολύ μικρές και είναι αποδεκτές εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών παραγόντων (όπως η διατροφή, το κλίμα, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και η υγεία του ζώου) που επηρεάζουν τη χημική σύσταση του γάλακτος.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε λίπος ήταν αρκετά χαμηλή, από 0,11 έως 0,70 % w/w. Τα ποσοστά αυτά μεταξύ των δειγμάτων δεν διέφεραν με εξαίρεση τα δείγματα 1 και 7, στα οποία μετρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά (0,70 και 0,65 % w/w, αντίστοιχα). Τα υψηλά αυτά ποσοστά είναι εντός των βιβλιογραφικών ορίων (0,3-1,8 % w/w) αλλά επηρεάζονται από

^a SD= Standard deviation (τυπική απόκλιση)

ένα πλήθος παραγόντων για αυτό και παρατηρούνται αποκλίσεις μεταξύ των δειγμάτων (Polidori *et al.*, 2009; Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014; Chiavari *et al.* 2005, Salimei *et al.* 2014).

Η αυξημένη περιεκτικότητα των δειγμάτων σε λακτόζη ήταν αναμενόμενη, σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (5,80-7,40 % w/w) (Chiofalo *et al.*, 2015; Alichanidis *et al.*, 2016; Claeys *et al.*, 2014; Bhosale *et al.*, 2009). Στην παρούσα μελέτη η περιεκτικότητα σε λακτόζη κυμαίνονταν από 5,20 έως 6,58 % w/w. Χαμηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη (5,20 % w/w) μετρήθηκε στο δείγμα 6. Ωστόσο, σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Malissiova *et al.* (2015), οι οποίοι μέτρησαν, σε δείγματα νωπού γάλακτος όνων, περιεκτικότητα σε λακτόζη της τάξεως του 3,54 % w/w.

Τέλος, οι τιμές για τα TS και τα SNF κυμαίνονταν από 8,55 έως 9,50 % w/w και από 8,37 έως 9,32 % w/w, αντίστοιχα. Μεταξύ των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις ούτε στις τιμές των TS ούτε των SNF. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα TS του νωπού γάλακτος όνου κυμαίνονται από 8,8 έως 11,7 % w/w (Aspri *et al.*, 2016b; Claeys *et al.*, 2014). Τέλος, σε μελέτη των Cavallarini *et al.* (2015) βρέθηκε περιεκτικότητα σε TS της τάξης του 8,35 % w/w.

4.2 Λιπαρά οξέα

Για την ευκολότερη και σαφέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, κρίθηκε σκόπιμη η ομαδοποίηση των λιπαρών οξέων. Η ομαδοποίηση που έγινε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 22: Ομαδοποίηση λιπαρών οξέων

Ομάδες Λιπαρών οξέων	Λιπαρά οξέα
Μικρής αλυσού ΛΟ (Short Chain Fatty Acids, SCFA)	C _{4:0} + C _{6:0} + C _{8:0}
Μεσαίας αλυσού ΛΟ (Medium Chain Fatty Acids, MCFA)	C _{10:0} + C _{11:0} + C _{12:0} + C _{13:0} + C _{14:0}
Μακράς αλυσού ΛΟ (Long Chain Fatty Acids, LCFA)	C _{15:0} + C _{16:0} + C _{17:0} + C _{18:0} + C _{20:0} + C _{21:0} + C _{22:0} + C _{23:0} + C _{24:0}
Πολυακόρεστα ΛΟ (PUFA)	C _{18:2n-6t} + C _{18:2n-6c} + C _{18:3n-6} + C _{18:3n-3} + C _{20:3n-3} + C _{20:3n-6} + cis-9, trans-11 C _{18:2} (Conjugated)

	Linoleic Acid, CLA) + trans-10, cis-12 C _{18:2+} C _{20:2+} C _{20:4+} C _{20:5+} C _{22:6}
Μονοακόρεστα ΛΟ (MUFA)	C _{14:1+} C _{15:1+} C _{16:1+} C _{17:1+} trans C _{18:1+} trans-11 C _{18:1} (Vaccenic acid, VA) + cis-9 C _{18:1+} C _{24:1}
Ακόρεστα ΛΟ (USFA)	PUFA+ MUFA
Κορεσμένα ΛΟ (SFA)	SCFA+ MCFA+ LCFA
Ακόρεστα/Κορεσμένα (USFA/SFA)	(PUFA+ MUFA)/(SCFA+ MCFA+ LCFA)

Τέλος, ο αθηρωματικός δείκτης (atherogenic index, AI) υπολογίστηκε από τον τύπο (C_{12:0+} + 4*C_{14:0+} + C_{16:0})/ (PUFA+ MUFA) (Ulbricht & Southgate, 1991).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προφίλ των ΛΟ των δειγμάτων νωπού γάλακτος όνου παρουσιάζονται στους Πίνακες 22 και 23.

Πίνακας 22: Συγκεντρώσεις των μεμονωμένων λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών οξέων)

ΛΟ	ΔΕΙΓΜΑ							Μέσος Όρος ± SD
	Γ1	Γ2	Γ3	Γ4	Γ5	Γ6	Γ7	
C _{4:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,03±0,08
C _{6:0}	0,34	0,00	0,42	0,00	0,00	0,00	0,24	0,14±0,17
C _{8:0}	2,95	3,67	4,91	4,15	3,98	1,67	2,79	3,45±0,99
C _{10:0}	5,07	7,90	11,40	8,99	8,87	2,69	5,87	7,25±2,69
C _{11:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{12:0}	4,01	7,25	9,85	8,11	9,00	1,91	6,52	6,66±2,61
C _{13:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{14:0}	4,70	5,85	7,79	7,38	7,63	2,90	5,91	6,02±1,65
C _{14:1}	0,29	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,18	0,13±0,16
C _{15:0}	0,35	0,00	0,33	0,00	0,35	0,31	0,57	0,27±0,19
C _{15:1}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{16:0}	21,51	19,10	24,71	21,46	21,61	27,18	19,07	22,09±2,72
C _{16:1}	4,12	1,72	2,24	4,28	2,81	8,69	5,05	4,13±2,16
C _{17:0}	0,16	0,00	0,32	0,18	0,00	0,00	0,19	0,12±0,12
C _{17:1}	0,42	0,00	0,31	0,00	0,32	0,44	0,53	0,29±0,20
C _{18:0}	0,90	2,32	2,42	4,24	1,08	1,30	1,01	1,90±1,12
trans C _{18:1}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
trans-11 C _{18:1} (VA)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
cis-9 C _{18:1}	25,54	33,40	18,77	23,26	23,60	38,39	27,85	27,26±6,17

C _{18:2n-6t}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{18:2n-6c}	22,73	11,19	8,29	8,37	17,03	8,64	20,80	13,86±5,76
C _{18:3n-6}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{20:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{18:3n-3}	4,49	7,62	7,91	9,60	3,30	5,56	2,41	5,84±2,44
cis-9, trans-11 C _{18:2} (CLA)	2,41	0,00	0,33	0,00	0,00	0,32	0,28	0,48±0,80
trans-10, cis-12 C _{18:2}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{21:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{20:2}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,05±0,11
C _{20:3n-6}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{22:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{20:3n-3}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,03±0,07
C _{20:4}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{20:5}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{24:0}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{24:1}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C _{22:6}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00

Πίνακας 23: Ποσοστά ομάδων λιπαρών οξέων (% των ολικών ΛΟ), λόγος ακόρεστων/κορεσμένα λιπαρά οξέα (USFA/SFA), λόγος ω-6/ω-3 και τιμές αθηρωματικού δείκτη

Ομάδες λιπαρών οξέων	ΔΕΙΓΜΑ							Μέσος Όρος ± SD
	Γ1	Γ2	Γ3	Γ4	Γ5	Γ6	Γ7	
SFA (% των ολικών ΛΟ)	40,00	46,08	62,14	54,50	52,52	37,96	42,39	47,94±8,43
USFA (% των ολικών ΛΟ)	60,00	53,92	37,86	45,50	47,48	62,04	57,61	52,06±8,43
MUFA (% των ολικών ΛΟ)	30,37	35,12	21,33	27,54	27,15	47,52	33,81	31,83±8,26
PUFA (% των ολικών ΛΟ)	29,63	18,80	16,53	17,97	20,33	14,52	23,80	20,23±4,82
USFA/SFA	1,50	1,17	0,61	0,83	0,90	1,63	1,36	1,14±0,35
ω-3 (% των ολικών ΛΟ)	4,49	7,62	7,91	9,60	3,30	5,56	2,61	5,87±2,40
ω-6 (% των ολικών ΛΟ)	22,73	11,19	8,29	8,37	17,03	8,64	20,80	13,86±5,76
ω-6/ω-3	5,07	1,47	1,05	0,87	5,16	1,55	7,98	3,31±2,56
AI	0,74	0,92	1,74	1,30	1,29	0,66	0,85	1,07±0,36

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε SFA κυμαίνονταν από 37,96 έως 62,14 % των ολικών ΛΟ του γάλακτος όνου, με μέση περιεκτικότητα 47,94 %, ενώ για τα USFA από 37,86 έως 62,04 %, με μέση περιεκτικότητα 52,06 %. Μεταξύ των SFA, το παλμιτικό οξύ (C_{16:0}) ήταν το κυρίαρχο ΛΟ με ποσοστό συμμετοχής στα SFA περίπου 50 % (μέσος όρος= 47,44 +/- 10,89 %). Μαζί με το C_{16:0}, τα ΛΟ μικρής και κυρίως τα μεσαίας αλύσου (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0} και C_{14:0}) αποτέλεσαν το μεγαλύτερο μέρος των SFA, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις μετρήθηκαν ακόμα C_{4:0} (σε ένα δείγμα), C_{6:0} (σε 3 από τα 7 δείγματα), C_{15:0} (σε 5 από τα 7 δείγματα), C_{17:0} (σε 4 από τα 7 δείγματα) και C_{18:0} (σε όλα τα δείγματα) (Πίνακας 22). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Martemucci & D'Alessandro (2012), Chiofalo *et al.* (2015), Gastaldi *et al.* (2010), Martini *et al.* (2015) και Koutb *et al.* (2016), οι οποίοι αναφέρουν πως το κυρίαρχο ΛΟ μεταξύ των SFA του γάλακτος όνου είναι το C_{16:0}, το οποίο μαζί με τα ΛΟ μικρής και μεσαίας αλύσου (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}) αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των SFA του συγκεκριμένου είδους γάλακτος. Οι Koutb *et al.* (2016) προσδιόρισαν ακόμα και αυξημένη συγκέντρωση του λιπαρού οξέος C_{20:0}, το οποίο στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 23, το γάλα όνου είναι πλούσιο σε ακόρεστα ΛΟ (USFA=PUFA+MUFA), κυρίως σε MUFA. Κύριος εκπρόσωπος των MUFA και ταυτόχρονα το βασικό ΛΟ των δειγμάτων αποτέλεσε το ελαϊκό οξύ (cis-9 C_{18:1}) (μέσος όρος= 27,26 +/- 6,17 % των ολικών λιπαρών οξέων). Εξαιρεση αποτελεί το δείγμα 3, στο οποίο το κυρίαρχο λιπαρό οξύ βρέθηκε να είναι το παλμιτικό οξύ. Σχετικά με τα PUFA, κύριοι εκπρόσωποι των PUFA ήταν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (essential fatty acids) δηλαδή το λινελαϊκό οξύ (LA, C_{18:2n-6c}) και το α-λινολενικό οξύ (ALA, C_{18:3n-3}). Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν τόσο οι Martemucci & D'Alessandro (2012) και Martini *et al.* (2015) οι οποίοι μελέτησαν τις αλλαγές του προφίλ των ΛΟ του γάλακτος όνου κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου όσο οι Gastaldi *et al.* (2010) και Chiofalo *et al.* (2015), συγκρίνοντας το γάλα όνου με το ανθρώπινο. Ακόμα οι Li *et al.* (2017) μελετώντας το προφίλ των ΛΟ στο γάλα όνου βρήκαν ότι το λινελαϊκό οξύ (LA) αντιπροσώπευε το 19,3 % των ολικών ΛΟ (Total Fatty Acids, TFA) ενώ το α-λινολενικό οξύ (ALA) το 4,3 % των TFA. Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν με τα ποσοστά της παρούσας μελέτης, τα οποία ήταν 13,86 % για το LA και 5,84 % για το ALA.

Αξίζει να σημειωθεί πως στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν τα ω-3 ΛΟ, EPA (C_{20:5}, eicosapentaenoic acid) και DHA (C_{22:6}, docosahexaenoic acid). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων ΛΟ (EPA, DHA) στο γάλα όνου είναι πολύ μικρές (Salimei & Fantuz, 2012; Madhusudan *et al.*, 2017).

Το προφίλ των λιπιδίων του γάλακτος όνου και πιο αναλυτικά οι υψηλές τιμές του λόγου ακόρεστων/κορεσμένα ΛΟ, η υψηλή περιεκτικότητα σε ω-6 ΛΟ και η χαμηλή αναλογία των ω-6/ω-3 ΛΟ φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία λόγω μείωσης της

χοληστερόλης, αποτροπής σχηματισμού θρόμβων αίματος, ελαχιστοποίησης του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και υπέρτασης καθώς και λόγω συμβολής στην πρόληψη καρδιαγγειακών, αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων (Aspri *et al*, 2016b; Carminati & Tidona, 2017). Επιπλέον, η χαμηλή περιεκτικότητα σε μικρής αλύσου ΛΟ το καθιστά κατάλληλο για τη βρεφική διατροφή (Chiafalo, 2015). Έτσι, επιβεβαιώνεται η χρήση του γάλακτος όνου ως λειτουργικής τροφής στη διατροφή των ενηλίκων αλλά και η αξιοποίησή του στη βρεφική διατροφή. Από την άλλη πλευρά, τα PUFA είναι επιρρεπή στην οξείδωση, δημιουργώντας σημαντικό πρόβλημα στις γαλακτοβιομηχανίες. Για αυτόν το λόγο ο χειρισμός του γάλακτος όνου θα πρέπει να είναι ο κατάλληλος έτσι ώστε να αποφεύγονται οι αρνητικές συνέπειες τις οξείδωσης των λιπιδίων του γάλακτος.

4.3 Αντιοξειδωτικό σύστημα

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και οι οξειδωτικοί δείκτες των δειγμάτων νωπού γάλακτος όνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 24, 25 και 26, αντίστοιχα.

Πίνακας 24: Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GR, GPX, CAT), εκφρασμένη σε Units/mL

Δείγμα	Αντιοξειδωτικά ένζυμα			
	SOD (Units/mL)	GR (Units/mL)	GPX (Units/mL)	CAT (Units/mL)
1	87,28	0,04	0,16	5,17
2	90,27	0,15	0,10	9,50
3	80,37	0,09	0,19	4,10
4	73,14	0,01	0,11	5,47
5	60,46	0,01	0,12	6,60
6	106,18	0,09	0,16	6,70
7	117,23	0,01	0,10	5,51
Εύρος τιμών	60,46-117,23	0,01-0,15	0,10-0,19	4,10-9,50
Μέσος όρος ± SD	87,85±17,85	0,06±0,05	0,13±0,03	6,15±1,59

Η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD κυμάνθηκε από 60,46 έως 117,23 Units/mL (Πίνακας 24), σημειώνοντας διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η μικρότερη δραστηριότητα μετρήθηκε στο δείγμα 5 (60,46 Units/mL) ενώ η μεγαλύτερη, σχεδόν διπλάσια, στο δείγμα 7 (117,23 Units/ mL). Σχετικά με την GR, η δραστηριότητά της παρουσίασε διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων και κυμάνθηκε από 0,01 έως 0,15 Units/mL (Πίνακας 24). Όσον αφορά τις τιμές της GPX αυτές κυμαίνονταν από 0,10 έως 0,19 Units/mL.

Στα δείγματα 2, 4, 5 και 7 η δραστηριότητα της GPX πήρε τιμές από 0,10 έως 0,12 Units/mL ενώ στα δείγματα 1, 3 και 6 από 0,16 έως 0,19 Units/mL. Η δραστηριότητα της CAT κυμάνθηκε από 4,1 έως 9,5 Units/mL (Πίνακας 24). Στα περισσότερα δείγματα ήταν < 7 Units/mL. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα 2, στο οποίο η δραστηριότητα ήταν 9,50 Units/mL.

Οι δραστηριότητες των ενζύμων διαφοροποιούνται διότι επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως η διατροφή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου ή η κατάσταση υγείας του ζώου (Novac & Andrei 2020). Για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα στο γάλα όνου δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς επίσης και τα δεδομένα για τα υπόλοιπα είδη γάλακτος είναι περιορισμένα. Ακόμα, οι μελέτες που έχουν γίνει τόσο για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όσο και για το αντιοξειδωτικό σύστημα στα διάφορα είδη γάλακτος είναι δύσκολο να συγκριθούν μεταξύ τους εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών πρωτοκόλλων που ακολουθούνται σε κάθε μελέτη.

Στον Πίνακα 25 παρατίθενται οι μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων νοπού γάλακτος όνου.

Πίνακας 25: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP, ABTS, DPPH)

Δείγμα	Μέθοδος		
	FRAP (μM ισοδύναμων ασκορβικού οξέος)	ABTS (% αναστολή)	DPPH (% αναστολή)
1	3,19	12,92	68,76
2	2,75	10,60	69,74
3	2,71	12,13	67,63
4	2,69	12,76	66,36
5	2,76	12,73	67,39
6	2,82	16,95	63,95
7	2,04	13,81	56,41
Εύρος τιμών	2,04-3,19	10,60-16,95	56,41-69,74
Μέσος όρος \pm SD	2,71 \pm 0,32	13,13 \pm 1,80	65,75 \pm 4,18

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP κυμαίνονταν από 2,04 έως 3,19 μM ισοδύναμων ασκορβικού οξέος, χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων. Μέσω της μεθόδου ABTS, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, κυμαίνονταν από 10,60 έως 16,95 %. Η μεγαλύτερη αναστολή (16,95 %) μετρήθηκε στο δείγμα 6, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα οι τιμές κυμαίνονταν από 10 έως 13 %. Τέλος, η ολική αντιοξειδωτική

ικανότητα, μέσω της μεθόδου DPPH κυμαίνονταν από 56,41 έως 69,74 %, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των περισσότερων δειγμάτων. Εξαίρεση στην μέθοδο DPPH αποτέλεσε το δείγμα 7, στο οποίο η % αναστολή ήταν μικρότερη από 60 %.

Οι οξειδωτικοί δείκτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 26.

Πίνακας 26: Οξειδωτικοί δείκτες (MDA, PC)

Δείγμα	Αντιοξειδωτικοί δείκτες	
	PC (nmol/mL)	MDA (μM MDA)
1	2,57	0,09
2	2,34	0,04
3	2,80	0,03
4	2,86	0,04
5	3,02	0,03
6	4,75	0,12
7	3,09	0,03
Εύρος τιμών	2,34-4,75	0,03-0,12
Μέσος όρος±SD	3,06±0,73	0,05±0,03

Η συγκέντρωση των PC κυμάνθηκε από 2,34 έως 4,75 nmol/mL. Στα περισσότερα δείγματα η συγκέντρωση των PC ήταν περίπου 2,3-3,0 nmol/mL. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα 6, στο οποίο μετρήθηκαν αυξημένα PC, της τάξεως των 5,0 nmol/mL. Το ίδιο παρατηρείται και με την συγκέντρωση της MDA, η συγκέντρωση της οποίας κυμάνθηκε από 0,03 έως 0,12 μM, με το δείγμα 6 να σημειώνει την πιο υψηλή τιμή (0,12 μM).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι οξειδωτικοί δείκτες δεν έχουν μελετηθεί καθόλου στο γάλα όνου. Ωστόσο, η καρβονυλίωση είναι μια από τις πιο αξιοσημείωτες εκφράσεις της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών και η μέθοδος DNPH είναι η πιο κοινή διαδικασία για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Οι διατροφολόγοι τονίζοντας τις επιπτώσεις της οξείδωσης των πρωτεϊνών στα συστήματα τροφίμων, αναφέρουν τη μειωμένη λειτουργικότητα και πεπτικότητα τους, την αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθώς και πιθανές ανησυχίες για την ασφάλεια των τροφίμων ως αποτέλεσμα της πρόσληψης οξειδωμένων πρωτεϊνών και αμινοξέων (Estevez *et al.*, 2019; Zhenjiang *et al.*, 2021). Ακόμα, η οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων προκαλεί μείωση της διάρκειας ζωής των προϊόντων (Horbańczuk *et al.*, 2009). Συνεπώς, σύμφωνα με τον Πίνακα 26 το δείγμα

6 αποτελεί γάλα κατώτερης ποιότητας συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα, λόγω των αυξημένων επιπέδων των PC. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και με την αυξημένη συγκέντρωση της MDA (0,12 μM MDA) στο συγκεκριμένο δείγμα (υποπροϊόν της οξείδωσης των λιπιδίων), η οποία είναι τοξικό μόριο και μπορεί να διαταράξει πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ένας σημαντικός δείκτης ποιότητας των προϊόντων επειδή τα οξειδωμένα λιπίδια όχι μόνο αλλάζουν το χρώμα, το άρωμα, τη γεύση, την υφή και τη θρεπτική αξία των τροφίμων, αλλά προκαλούν επίσης και πολλές επιβλαβείς βιολογικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της MDA έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή λόγω του δυνητικού κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία εξαιτίας μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων επιδράσεων (Reitznerová *et al.*, 2017).

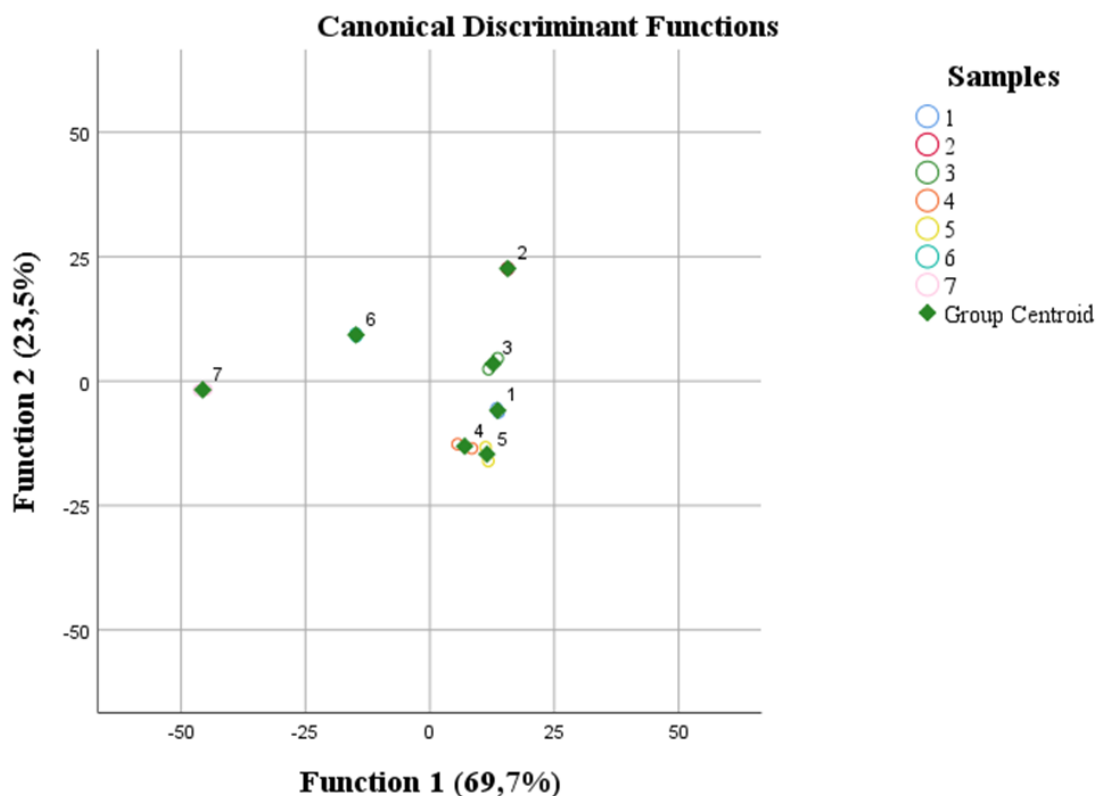
Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται οι μελέτες και τα αποτελέσματά τους, οι οποίες σχετίζονται με την ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος όνου.

Πίνακας 27: Βιβλιογραφικά δεδομένα για το αντιοξειδωτικό σύστημα του γάλακτος όνου

Δείγμα	Περιοχή	Αποτελέσματα- Συμπεράσματα	Βιβλιογραφία
Νωπό γάλα όνου φυλής Halari και Poitu	Ινδία	<u>Total Antioxidant Capacity (TAC)</u> (μέσω micro plate assay technique): -Φυλή Halari: 0,033 μM eq. Trolox -Φυλή Poitu: 0,029 μM eq. Trolox <u>Frap:</u> -Φυλή Halari: 74,62 $\mu\text{mole/L}$ -Φυλή Poitu: 101,95 $\mu\text{mole/L}$	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2019
Νωπό γάλα όνου	Κίνα	<u>TAC:</u> Ελάχιστη τιμή: 13,933 \pm 1,387 U/mL Μέγιστη τιμή: 16,578 \pm 0,291 U/mL <u>DPPH</u> Ελάχιστη Radical scavenging activity (RSA):19,533 \pm 0,412% Μέγιστη RSA: 23,567 \pm 0,197%	Li <i>et al.</i> , 2017

Νωπό γάλα όνου, αίγαιο, πρόβειο, αγελαδινό και μητρικό γάλα	Ιταλία	-Η TAC του γάλακτος όνου δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη γαλακτική περίοδο -Το αίγαιο και το πρόβειο γάλα παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη TAC σε σύγκριση με αυτή του γάλακτος όνου, του αγελαδινού αλλά και του ανθρώπινου γάλακτος, το οποίο είχε την σημαντικά χαμηλότερη TAC	Beghelli <i>et al.</i> , 2016
Νωπό γάλα όνου, αίγαιο, πρόβειο και αγελαδινό	Κροατία	-Το <u>λίπος</u> που απομονώθηκε από το αγελαδινό γάλα και το γάλα όνου εμφάνισε την υψηλότερη οξειδωτική σταθερότητα (oxidative stability) -Ο <u>ορός</u> του γάλακτος όνου παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος	Bucevic-Popovic <i>et al.</i> , 2014
Νωπό γάλα όνου από δύο φάρμες της Ρουμανίας	Ρουμανία	<u>TAC</u> (μέσω της μεθόδου ACL, antioxidant capacity of lipid-soluble compounds): Ελάχιστη τιμή: 15,68 U/ml Μέγιστη τιμή: 17,63 U/ml	Longodor <i>et al.</i> , 2019

Για το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο έγινε Discriminant Analysis, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Διαχωριστική ανάλυση ως προς το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο στα δείγματα νοπού γάλακτος όνου

Για την Discriminant Analysis όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα μαζί. Το Function 1 περιγράφει το 69,7 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 ($p < 0,001$). Το Function 2 περιγράφει το 23,5 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 ($p < 0,001$). Εισάγοντας τις μεταβλητές με τη μέθοδο StepWise το μοντέλο αποδέχεται μόνο την συνεισφορά των MDA, GR, FRAP, DPPH, PC και ABTS. Στο Σχήμα 3 το δείγμα 7 φαίνεται απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα δείγματα (δηλαδή παρουσιάζει διαφορετικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο) πιθανώς λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της SOD, η οποία ήταν σχεδόν διπλάσια από την πλειοψηφία των υπόλοιπων δειγμάτων αλλά και της μειωμένης ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογισμένης μέσω της μεθόδου FRAP και DPPH. Σχετικά με το δείγμα 6, αυτό διαφέρει από τα υπόλοιπα δείγματα λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της SOD, της αυξημένης ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογισμένης μέσω της μεθόδου ABTS αλλά και της αυξημένης συγκέντρωσης των PC και της MDA. Ωστόσο, τα δείγματα 1, 4 και 5 εμφανίζουν παρόμοιο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο, πιθανώς λόγω της παρόμοιας δραστηριότητας των ενζύμων GR, GPX και CAT, της παρόμοιας ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω των μεθόδων ABTS και DPPH αλλά και της συγκέντρωσης των PC. Ακόμα, το δείγμα 3 εμφανίζει παρόμοιο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο με τα δείγματα 1, 4 και 5 λόγω

της παρόμοιας ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογισμένης μέσω της μεθόδου ABTS και DPPH αλλά και της συγκέντρωσης των PC. Τέλος, το δείγμα 2 παρουσιάζει διαφορετικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο από τα υπόλοιπα δείγματα λόγω της αυξημένης δραστηριότητας της CAT.

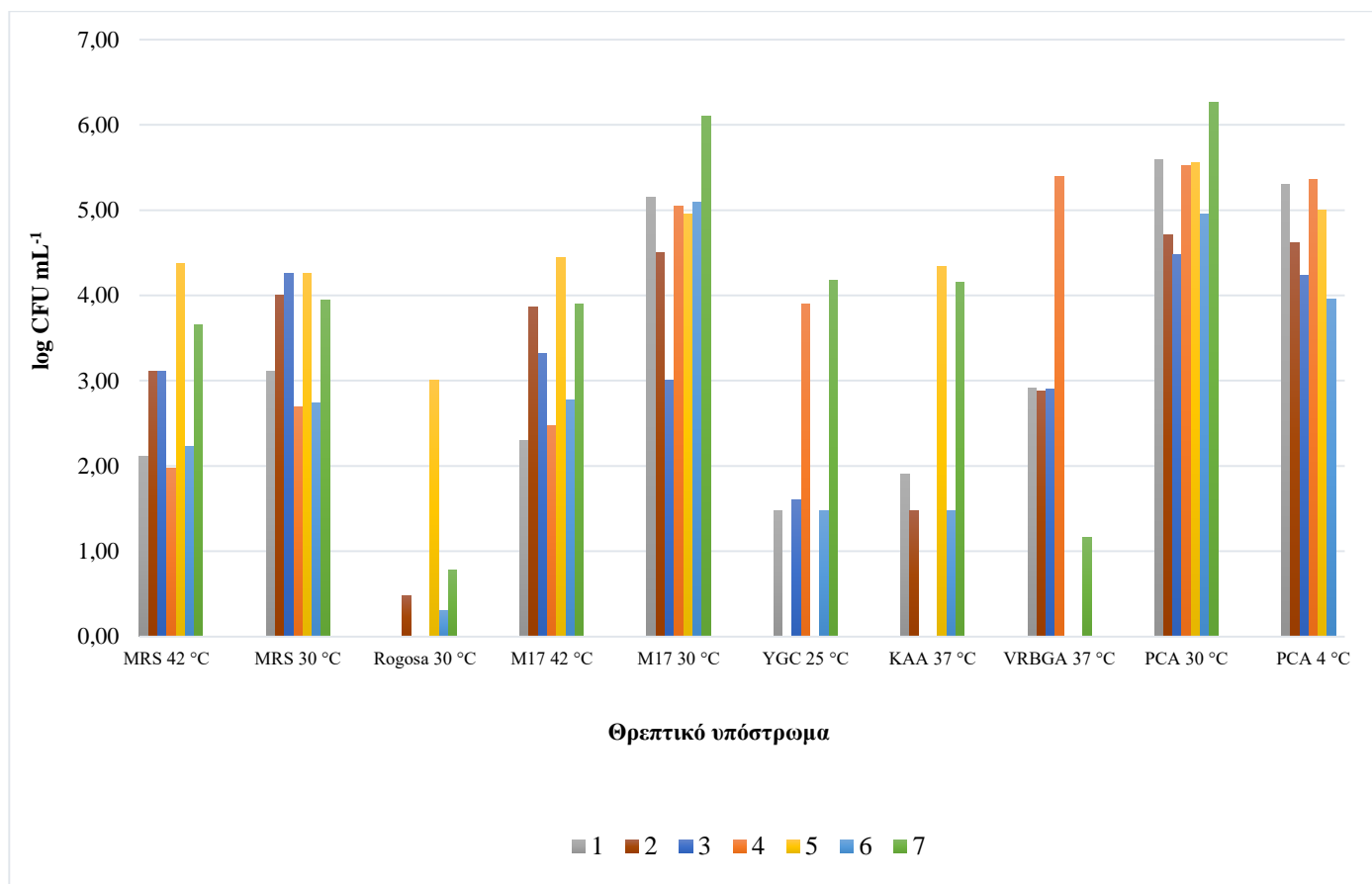
4.4 Μικροβιολογική ανάλυση

4.4.1 Καταμέτρηση πληθυσμών

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί, οι οποίοι καταμετρήθηκαν σε κάθε υπόστρωμα, παρουσιάζονται αριθμητικά στον Πίνακα 28 και γραφικά και στο Σχήμα 4.

Πίνακας 28: Μικροβιακοί πληθυσμοί ανά θρεπτικό υπόστρωμα, εκφρασμένοι σε log CFU mL⁻¹

Δείγμα	Θρεπτικό υπόστρωμα / Θερμοκρασία επώασης									
	MRS 42 °C	MRS 30 °C	Rogosa 30 °C	M17 42 °C	M17 30 °C	YGC 25 °C	KAA 37 °C	VRBGA 37 °C	PCA 30 °C	PCA 4 °C
1	2,11	3,11	0,00	2,30	5,15	1,48	1,90	2,91	5,59	5,30
2	3,10	4,00	0,48	3,86	4,50	0,00	1,48	2,88	4,71	4,61
3	3,11	4,26	0,00	3,32	3,00	1,60	0,00	2,90	4,48	4,23
4	1,98	2,70	0,00	2,48	5,04	3,90	0,00	5,40	5,53	5,36
5	4,38	4,26	3,00	4,45	4,95	0,00	4,34	0,00	5,55	5,00
6	2,23	2,74	0,30	2,78	5,10	1,48	1,48	0,00	4,95	3,95
7	3,66	3,94	0,78	3,90	6,10	4,18	4,15	1,16	6,26	0,00
Εύρος τιμών	1,98- 4,38	2,70- 4,26	0,00- 3,00	2,30- 4,45	3,00- 6,10	0,00- 3,90	0,00- 4,34	0,00- 5,40	4,48- 6,26	0,00- 5,30
Μέσος όρος ± SD	2,94 ± 0,82	3,57 ± 0,65	0,65 ± 1,00	3,30 ± 0,75	4,83 ± 0,87	1,81 ± 1,55	1,91 ± 1,63	2,18 ± 1,79	5,30 ± 0,57	4,06 ± 1,73



Σχήμα 4: Μικροβιακοί πληθυσμοί ανά θρεπτικό υπόστρωμα, εκφρασμένοι σε log CFU mL⁻¹

Σύμφωνα με τον Πίνακα 28 και το Σχήμα 4, η OMX (PCA 30 °C) των δειγμάτων κυμάνθηκε από 4,48 έως 6,26 log CFU mL⁻¹. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών της OMX. Ωστόσο, υψηλότεροι πληθυσμοί OMX κατά 1-2 λογαρίθμους, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα, καταμετρήθηκαν στο δείγμα 7. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η χημική σύσταση του γάλακτος επηρεάζει την συγκέντρωση και το είδος των μικροοργανισμών που απαντώνται σε αυτό. Συνεπώς η αυξημένη περιεκτικότητα του δείγματος 7 σε λίπος πιθανώς να ευνόησε κάποια είδη μικροοργανισμών. Υπάρχουν ακόμα πολλοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα σύνθετο βιολογικό υπόστρωμα όπως είναι το γάλα, όπως η ατομικότητα του ζώου, ο τύπος εκτροφής καθώς και οι συνθήκες παραλαβής και διακίνησής του. Όσον αφορά την OMX του δείγματος 7, τέτοια τιμή αποκλίνει από τα βιβλιογραφικά όρια. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η OMX του γάλακτος όνου είναι χαμηλή και κυμαίνεται από 2,40 έως 5,87 log CFU mL⁻¹ (Aspri *et al.*, 2016a; Carminati & Tidona, 2017; Zhang *et al.*, 2008; Coppola *et al.*, 2002; Cavallarini *et al.*, 2015; Salimei & Fantuz, 2012). Πιο συγκεκριμένα, στην Ιταλία σύμφωνα με έρευνα των Sarno *et al.* (2012) η

OMX (PCA 32 °C) δειγμάτων νοπού γάλακτος όνου κυμαίνονταν από 2,80 έως 4,00 log CFU mL⁻¹. Ομοίως, οι Zhang *et al.* (2008) βρήκαν ότι το νοπό γάλα όνων στην Κίνα περιείχε χαμηλή περιεκτικότητα σε OMX (PCA 37 °C), με μέσο όρο τους 4,34 log CFU mL⁻¹. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν τόσο οι Corprola *et al.* (2002) όσο οι Cavallarin *et al.* (2015) και οι Chiavari *et al.* (2005), οι οποίοι καταμέτρησαν πληθυσμούς OMX με μέσο όρο τους 4,6 (PCA 28 °C), 5,38 (PCA 30 °C) και 4,24 (PCA 30 °C) log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Για τον σκοπό των παραπάνω πειραμάτων συλλέχθηκαν δείγματα νοπού γάλακτος από όνους σε διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας. Ωστόσο, μικρότερους πληθυσμούς OMX (1,00-2,40 log CFU mL⁻¹) καταμέτρησαν οι Pilla *et al.* (2010), σε δείγματα γάλακτος όνων στην Ιταλία.

Στα υποστρώματα ανάπτυξης των πιθανών θερμόφιλων και μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων (MRS 42 και 30 °C, αντίστοιχα) καταμετρήθηκαν πληθυσμοί, οι οποίοι κυμαίνονταν από 1,98 έως 4,38 log CFU mL⁻¹ και από 2,70 έως 4,26 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις τόσο μεταξύ των πληθυσμών των θερμόφιλων όσο και των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων. Εξάίρεση αποτελεί το δείγμα 5, στο οποίο καταμετρήθηκε ο υψηλότερος πληθυσμός πιθανών θερμόφιλων γαλακτοβακίλλων (4,38 log CFU mL⁻¹), ο οποίος ήταν κατά 1-2 λογαρίθμους υψηλότερος συγκριτικά με τους πληθυσμούς των υπόλοιπων δειγμάτων. Επιπλέον, στο ίδιο δείγμα (δείγμα 5) ο πληθυσμός των πιθανών θερμόφιλων γαλακτοβακίλλων ήταν υψηλότερος από αυτόν των πιθανών μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα. Στη βιβλιογραφία, παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι έρευνες των Massouras *et al.* (2020), Cavallarin *et al.* (2015), Saric *et al.* (2012) και Chiavari *et al.* (2005), σύμφωνα με τις οποίες ο πληθυσμός σε πιθανούς μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλους (MRS 30 °C) σε δείγματα νοπού γάλακτος όνου κυμαίνονταν από <1,00 έως 4,34 log CFU mL⁻¹. Ακόμα, αυξάνοντας την θερμοκρασία ανάπτυξης στους 37 °C (MRS 37 °C), οι Carminati *et al.* (2014) και οι Zhang *et al.* (2008) καταμέτρησαν πληθυσμούς πιθανών LAB στα 3,57 και 4,24 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα ήταν ακόμα και οι Aspri *et al.* (2016a), οι οποίοι καταμέτρησαν πληθυσμούς πιθανών LAB στα 3,4 log CFU mL⁻¹, χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά υποστρώματα (M17 45 °C, MRS 30 °C με pH 5,7 και MRS 37 °C με pH 6,2).

Είναι η πρώτη φορά που γίνεται καταμέτρηση των πιθανών NSLAB σε νοπό γάλα όνου καθώς δεν υπάρχουν αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές. Πληθυσμοί πιθανών NSLAB καταμετρήθηκαν μόνο σε 4 δείγματα (δείγματα 2, 5, 6 και 7), οι οποίοι ήταν <0,80 log CFU mL⁻¹ εκτός από το δείγμα 5 στο οποίο ο πληθυσμός των πιθανών NSLAB βρέθηκε στα 3,00 log CFU mL⁻¹.

Στα υποστρώματα ανάπτυξης των πιθανών θερμόφιλων και μεσόφιλων κόκκων LAB (M17 42 και 30 °C, αντίστοιχα) καταμετρήθηκαν πληθυσμοί, οι οποίοι κυμαίνονταν από 2,30

έως 4,45 log CFU mL⁻¹ και από 3,00 έως 6,10 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις τόσο μεταξύ των πληθυσμών των πιθανών θερμοφίλων όσο και των πιθανών μεσόφιλων κόκκων LAB. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα 7, στο οποίο καταμετρήθηκε ο υψηλότερος πληθυσμός (6,10 log CFU mL⁻¹) πιθανών μεσόφιλων κόκκων LAB αυξημένος κατά 1-3 λογαρίθμους συγκριτικά με αυτούς των υπόλοιπων δειγμάτων. Μία ακόμα εξαιρέση αποτελεί το δείγμα 3, στο οποίο καταμετρήθηκαν περισσότεροι πιθανοί θερμοφιλοί από ότι μεσόφιλοι κόκκοι LAB σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα. Σχετικά με την βιβλιογραφία, υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα για το περιεχόμενο του γάλακτος όνου σε κόκκους LAB. Ωστόσο, οι Carminati *et al.* (2014) και οι Massouras *et al.* (2020) ανέφεραν πληθυσμούς κόκκων της τάξης των 4,00 και 2,00 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι τόσο στις προαναφερθείσες όσο και στην παρούσα μελέτη οι πληθυσμοί των πιθανών κόκκων ήταν μεγαλύτεροι από αυτούς των πιθανών γαλακτοβακίλλων. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα του γάλακτος όνου σε λυσοζύμη, καθώς οι κόκκοι είναι πιο ανθεκτικοί στη λυσοζύμη από ότι οι γαλακτοβάκιλλοι (Aspri *et al.*, 2016a; Neniani *et al.*, 1991).

Εντερόκοκκοι (KAA) καταμετρήθηκαν στα δείγματα 1, 2, 5, 6 και 7, με πληθυσμούς 1,90, 1,48, 4,34, 1,48 και 4,15 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Στα δείγματα 5 και 7 καταμετρήθηκαν υψηλότεροι πληθυσμοί συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Σχετικά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, στην πρόσφατη μελέτη των Massouras *et al.* (2020) οι πληθυσμοί των εντερόκοκκων (KAA 37 °C) κυμαίνονταν από 0,22 έως 0,89 log CFU mL⁻¹. Ακόμα, οι Copolla *et al.* (2002) καταμέτρησαν πληθυσμούς εντερόκοκκων (Slanetz & Bartley 37 °C) της τάξεως των 1,50 log CFU mL⁻¹. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός πως το γένος *Enterococcus* ανήκει στα LAB και εκτός από τα είδη που θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου, περιλαμβάνει και είδη με ιδιαίτερα τεχνολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία αξιοποιούνται ως εναρκτηρίες καλλιέργειες ή ακόμα και ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί (Franz *et al.*, 2003; Aspri *et al.*, 2016a). Σύμφωνα με την μελέτη των Aspri *et al.* (2016a), το νωπό γάλα όνου περιέχει είδη του γένους *Enterococcus* που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτηρίες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων.

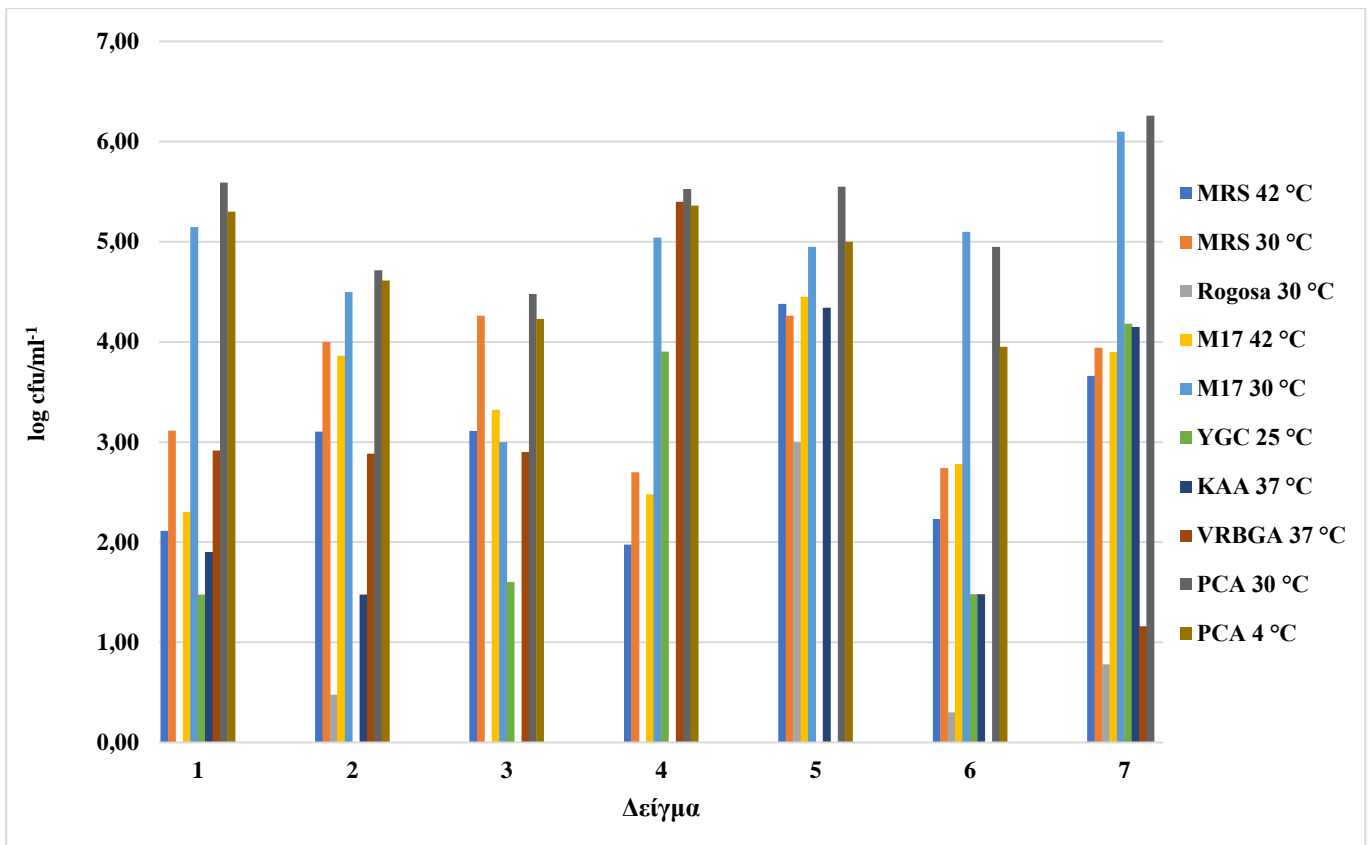
Εντεροβακτήρια (VRBGA) καταμετρήθηκαν στα δείγματα 1, 2, 3, 4, και 7. Στα δείγματα 1, 2, 3 και 7 οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων κυμαίνονταν από 1,16 έως 2,90 log CFU mL⁻¹. Πολύ μεγαλύτεροι πληθυσμοί, της τάξεως των 5,40 log CFU mL⁻¹, καταμετρήθηκαν στο δείγμα 4. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι Malissiova *et al.* (2015) καταμέτρησαν εντεροβακτήρια που κυμαίνονταν από 2,95 έως 3,65 log CFU mL⁻¹. Στην έρευνα των Sarno *et al.* (2012) βρέθηκε ότι οι πληθυσμοί των εντεροβακτηρίων (VRBGA 37 °C) κυμαίνονταν από 0,68 έως 1,93 log CFU mL⁻¹. Ακόμα, ο μέσος όρος της καταμέτρησης

των Aspri *et al.* (2016a), των Zhang *et al.* (2008) και των Corolla *et al.* (2002) ήταν 3,20, 2,13 και 3,20 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Θα πρέπει να αναφερθεί πως στις έρευνες των Cavallarin *et al.* (2015), Malissiova *et al.* (2015), Sarno *et al.* (2012) και Saric *et al.* (2012) δεν ανιχνεύθηκαν *Salmonella* spp. και *E. coli*. Παρόλα αυτά η παρουσία των εντεροβακτηρίων στο γάλα όνου τονίζει τη σημασία της καθιέρωσης ορθών πρακτικών διαχείρισης των ζώων.

Οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (PCA 4 °C) που καταμετρήθηκαν στα δείγματα κυμαίνονταν από 3,95 έως 5,36 CFU mL⁻¹, ενώ στο δείγμα 7 δεν καταμετρήθηκαν καθόλου πληθυσμοί ψυχρότροφων. Όσον αφορά τα βιβλιογραφικά δεδομένα, στην έρευνα των Massouras *et al.* (2020) οι πληθυσμοί των ψυχρότροφων (PCA 7 °C) κυμαίνονταν από 1,48 έως 2,37 log CFU mL⁻¹. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα ήταν και οι Sarno *et al.* (2012), οι οποίοι καταμέτρησαν πληθυσμούς ψυχρότροφων (PCA 5 °C) που κυμαίνονταν από 1,27 έως 2,12 log CFU mL⁻¹. Ακόμα, οι Corolla *et al.* (2002) καταμέτρησαν πληθυσμούς ψυχρότροφων (PCA 7 °C) στα 1,50 log CFU mL⁻¹. Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη καταμετρήθηκαν πληθυσμοί ψυχρότροφων υψηλότεροι κατά 1-3 λογαρίθμους από τις τιμές που υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Το γεγονός αυτό, της παρουσίας υψηλών πληθυσμών ψυχρότροφων μικροοργανισμών, μπορεί να εξηγηθεί από την πολύωρη μετακίνηση των δειγμάτων υπό συνθήκες ψύξης για την αποστολή τους στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας.

Πληθυσμοί ζυμών καταμετρήθηκαν στα 5 από τα 7 δείγματα. Συγκεκριμένα στα δείγματα 1, 3, 4, 6 και 7 καταμετρήθηκαν 1,48, 1,60, 3,90, 1,48 και 4,18 log CFU mL⁻¹, αντίστοιχα. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τον πληθυσμό των ζυμών στο γάλα όνου ποικίλλουν. Οι Corolla *et al.* (2002) και Malissiova *et al.* (2015) ανέφεραν πληθυσμούς ζυμών/μυκήτων της τάξεως των 4,50 (YPD 28 °C) και 3,69 log CFU mL⁻¹ (ISO 6611:2004), αντίστοιχα. Ωστόσο οι Zhang *et al.* (2008) καταμέτρησαν σημαντικά χαμηλότερους πληθυσμούς ζυμών/μυκήτων και συγκεκριμένα της τάξεως των 0,7 log CFU mL⁻¹ (RBM 37 °C). Ακόμα, στην έρευνα των Massouras *et al.* (2020) οι πληθυσμοί των ζυμών/μυκήτων κυμαίνονταν από 1,86 έως 2,95 log CFU mL⁻¹ (YGC 30 °C). Τέλος, οι Aspri *et al.* (2016a) δεν καταμέτρησαν ζύμες/μύκητες, παρά μόνο στα 2 από τα 11 δείγματα (μέσος όρος καταμέτρησης: 3,86 log CFU mL⁻¹) (DRBC 25 °C).

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών ανά δείγμα.

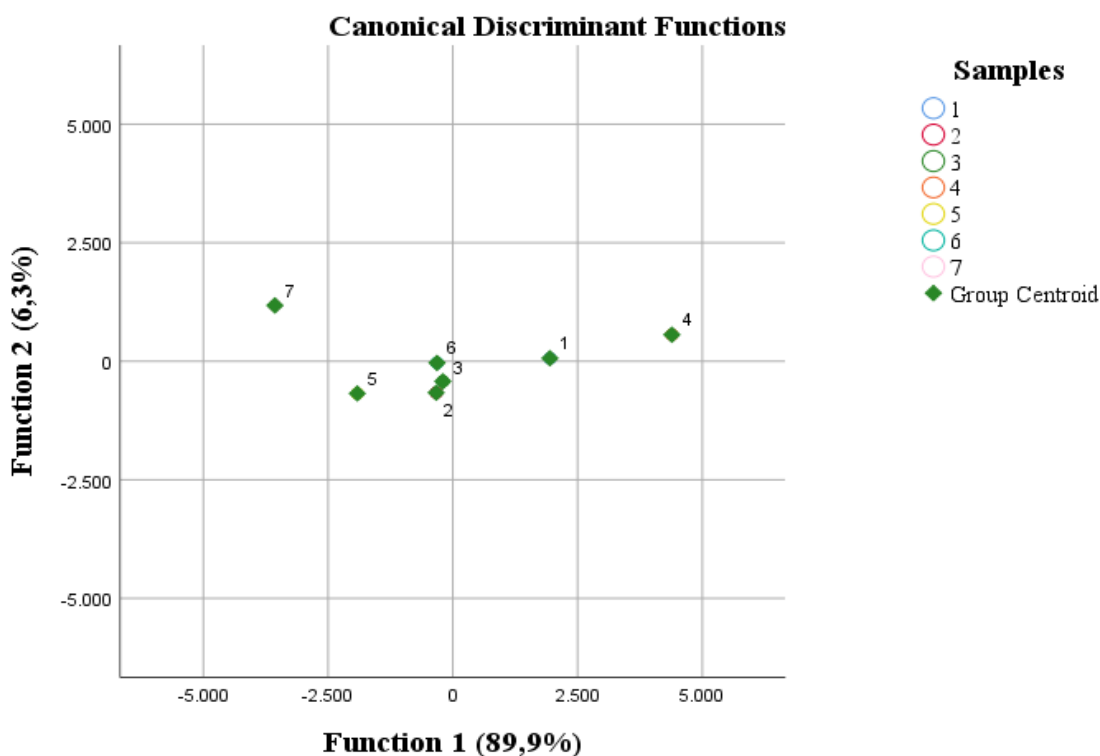


Σχήμα 5: Μικροβιακοί πληθυσμοί ανά δείγμα, εκφρασμένοι σε log CFU mL⁻¹

Στο δείγμα 1 η κύρια μικροβιακή ομάδα είναι η OMX ακολουθούμενη με μικρή διαφορά από τους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς και τους πιθανούς μεσόφιλους κόκκους. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στο δείγμα 2, 5 και 7, με τη μόνη διαφορά ότι στο δείγμα 7, δεν αναπτύχθηκαν καθόλου ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Σχήμα 5). Στο δείγμα 3 η κύρια μικροβιακή ομάδα είναι η OMX, ακολουθούμενη με μικρή διαφορά από τους πιθανούς μεσόφιλους γαλακτοβάκιλλους και έπειτα τους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς. Ακόμα, στο δείγμα 4 καταμετρήθηκαν αυξημένοι πληθυσμοί ψυχρότροφων, εντεροβακτηρίων και OMX και στην συνέχεια με μικρή διαφορά πληθυσμοί πιθανών μεσόφιλων κόκκων. Τέλος, στο δείγμα 6 κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα αποτέλεσαν οι πιθανοί μεσόφιλοι κόκκοι ενώ αυξημένος ήταν και ο πληθυσμός της OMX (Σχήμα 5).

Στο Σχημα 6 παρουσιάζεται η διαχωριστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ως προς τις καταμετρήσεις των πληθυσμών. Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα μαζί. Το Function 1 περιγράφει το 89,9 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 (p<0,001). Το Function 2 περιγράφει το 6,3 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 (p<0,001). Εισάγοντας τις μεταβλητές με τη μέθοδο StepWise το μοντέλο αποδέχεται μόνο την συνεισφορά των VRBGA 37 °C, YGC 25 °C, ROGOSA 25 °C, PCA 4 °C, M17 30 °C και KAA 37 °C. Στο Σχήμα 6 το δείγμα 7 είναι απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα δείγματα, δηλαδή εμφανίζει διαφορετικό

μικροβιακό προφίλ, λόγω της απουσίας των ψυχρότροφων μικροοργανισμών και της υψηλής παρουσίας πιθανών μεσόφιλων κόκκων. Επίσης, το δείγμα 4 εμφανίζει διαφορετικό μικροβιακό προφίλ συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα εξαιτίας των αυξημένων πληθυσμών των *Enterobacteriaceae* (VRBGA). Τα δείγματα 2, 3 και 6 παρουσιάζουν ομοιότητες λόγω των παρόμοιων καταμετρήσεων στα υποστρώματα Rogosa, PCA 30 °C και PCA 4 °C ενώ μεταξύ των δειγμάτων 2 και 3 υπάρχουν περισσότερες ομοιότητες λόγω των παρόμοιων καταμετρήσεων ακόμα στα υποστρώματα MRS 42 °C, MRS 30 °C, M17 42 °C και VRBGA 37 °C. Τέλος, το δείγμα 5 είναι λίγο πιο απομακρυσμένο από τα δείγματα 2,3 και 6 λόγω των υψηλών πληθυσμών πιθανών NSLAB (Rogosa) και των εντερόκοκκων (KAA) ενώ το δείγμα 1 λόγω των χαμηλότερων καταμετρήσεων στο υπόστρωμα M17 42 °C και των υψηλότερων στα PCA 30 °C και PCA 4 °C.



Σχήμα 6: Διαχωριστική ανάλυση ως προς τις καταμετρήσεις των πληθυσμών

4.4.2 Απομόνωση αποικιών

Συνολικά απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν για ταυτοποίηση 124 αποικίες βακτηρίων και 6 αποικίες ζυμών. Από τις 124 αποικίες βακτηρίων οι 70 απομονώθηκαν από θρεπτικό υπόστρωμα M17 (30 και 42 °C), οι 41 από το MRS (30 και 42 °C), οι 10 από το Rogosa (30 °C) και οι 3 από το YGC (25 °C). Επίσης για ταυτοποίηση αποθηκεύτηκαν 6 ζύμες, εκ των οποίων οι 4 απομονώθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα YGC

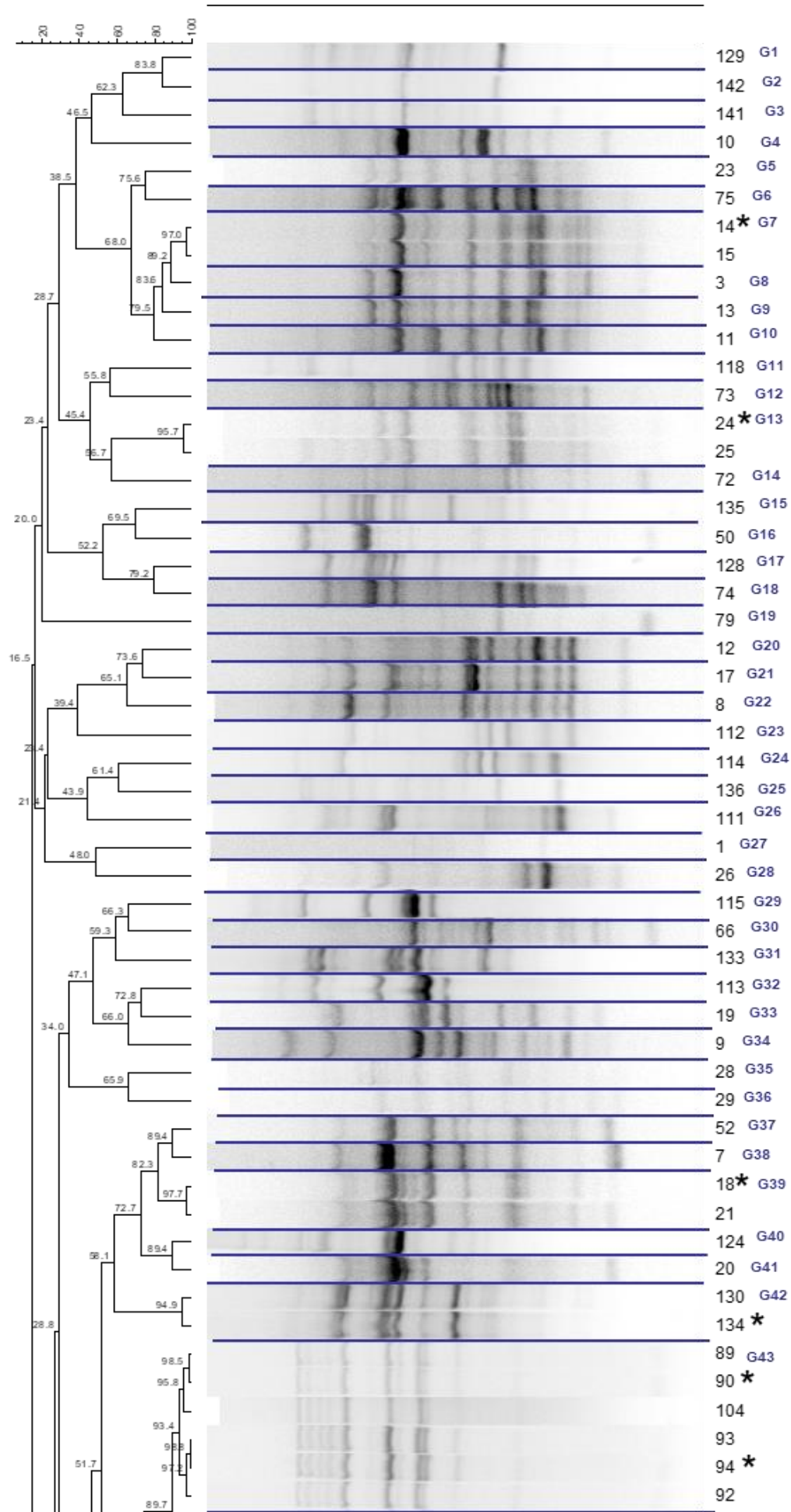
(25 °C) και οι 2 από το Rogosa (30 °C). Είναι χρήσιμο να τονιστεί πως παρά την χρήση επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων και συνθηκών ανάπτυξης για συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες, δεν παρεμποδίζεται τελείως η ανάπτυξη άλλων μικροβιακών ομάδων, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη (Nigro & Steward, 2015). Στον Πίνακα 29 παρουσιάζεται ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε δείγμα.

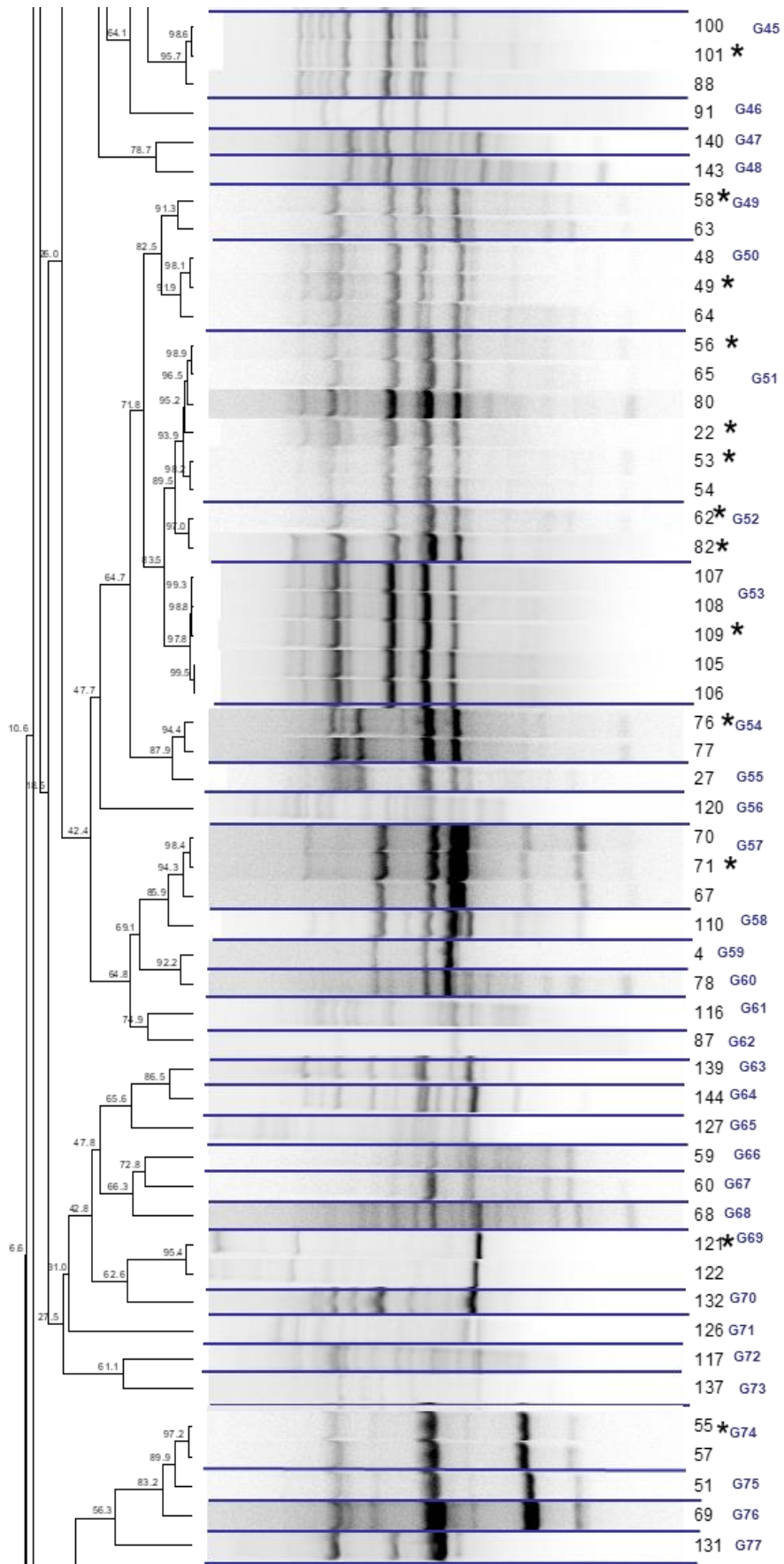
Πίνακας 29: Αριθμός απομονωμένων αποικιών ανά θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε δείγμα (όπου B: Βακτήρια και Z: Ζύμες)

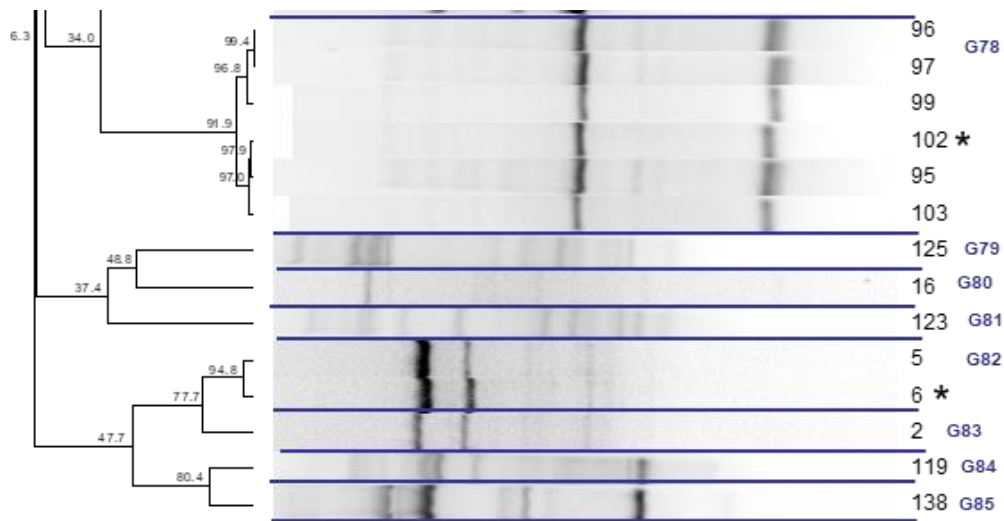
Θρεπτικό υπόστρωμα/ Θερμοκρασία επώασης	Αριθμός αποικιών ανά δείγμα													
	1		2		3		4		5		6		7	
	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z
MRS 30 °C	3	-	6	-	1	-	3	-	2	-	2	-	6	-
MRS 42 °C	3	-	5	-	-	-	-	-	5	-	1	-	4	-
Rogosa 30 °C	-	-	2	-	-	-	-	-	3	-	2	-	3	2
M17 30 °C	3	-	12	-	5	-	2	-	3	-	5	-	7	-
M17 42 °C	4	-	10	-	4	-	2	-	5	-	3	-	5	-
YGC 25 °C	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	2
Σύνολο αποικιών ανά δείγμα	13	1	35	-	10	1	7	-	18	-	13	-	28	4
Σύνολο αποικιών σε όλα τα δείγματα	Βακτήρια: 124 Ζύμες: 6													

4.4.3 Ομαδοποίηση βακτηρίων και ζυμών

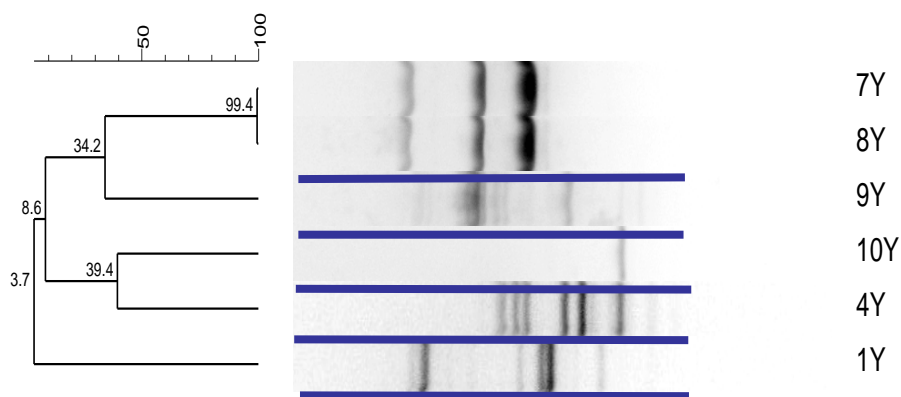
Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της *ger*-PCR και τη χρήση του προγράμματος Bionumerics 6.1 προέκυψε ένα δενδρόγραμμα για τα βακτήρια όλων των δειγμάτων (Εικόνα 16) και ομοίως ένα για τις ζύμες (Εικόνα 17). Τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα δενδρογράμματα (Κεφάλαιο 3.6.5). Πιο συγκεκριμένα, τα 124 βακτήρια κατατάχθηκαν σε 85 ομάδες (Εικόνα 16) και οι 6 ζύμες σε 5 ομάδες (Εικόνα 17).







Εικόνα 16: Δενδρόγραμμα βακτηρίων (μπλε γραμμές: διαχωρισμός ομάδων, αστερίσκος: αντιπροσωπευτικά στελέχη κάθε ομάδας που επιλέχθηκαν για 16S rRNA gene PCR για ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους)



Εικόνα 17: Δενδρόγραμμα ζυμών (μπλε γραμμές: διαχωρισμός ομάδων, αστερίσκος: αντιπροσωπευτικά στελέχη κάθε ομάδας που επιλέχθηκαν για ITS DNA region PCR για ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους)

Παράλληλα κατασκευάστηκαν 7 δενδρογράμματα βακτηρίων, ένα για το κάθε δείγμα. Σύμφωνα με αυτά τα δενδρογράμματα (Παράρτημα), στο δείγμα 1 τα 13 βακτήρια κατατάχθηκαν σε 10 ομάδες, στο δείγμα 2 τα 35 βακτήρια σε 33 ομάδες, στο δείγμα 3 τα 10 βακτήρια σε 9 ομάδες, στο δείγμα 4 τα 7 βακτήρια σε 6 ομάδες, στο δείγμα 5 τα 18 βακτήρια σε 9 ομάδες, στο δείγμα 6 τα 13 βακτήρια σε 11 ομάδες και τέλος στο δείγμα 7 τα 28 βακτήρια σε 8 ομάδες.

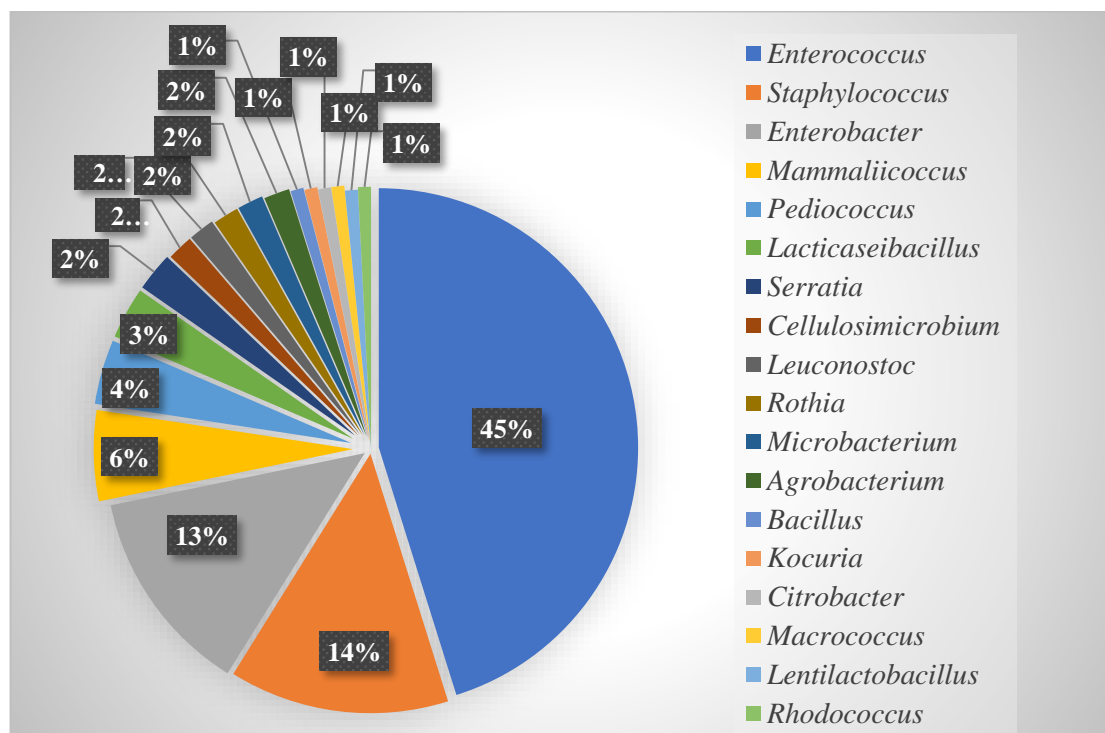
4.4.4 Ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω αλληλούχησης του γονιδίου 16S rRNA

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης μετά την αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου και τη χρήση του προγράμματος BLAST (Κεφάλαιο 3.6.8) παρουσιάζονται στον Πίνακα 30 και το Σχήμα 7.

Πίνακας 30: Ταυτοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο είδους ή γένους

Είδος/Γένος	Δείγμα							Συνολικές απομονώσεις ανά είδος ή γένος
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2							2
<i>Bacillus endophyticus</i>		1						1
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>						2		2
<i>Citrobacter</i> sp.		1						1
<i>Enterobacter hormaechei</i>		4						4
<i>Enterobacter ludwigii</i>		1						1
<i>Enterobacter</i> sp.		9	2					11
<i>Enterococcus durans</i>		4						4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1		3				8
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1			11	2	27	43
<i>Enterococcus gallinarum</i>		1						1
<i>Kocuria varians</i>							1	1
<i>Lacticaseibacillus casei</i>						2		2
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>					1	1		2
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>						1		1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		2						2
<i>Macrococcus caseolyticus</i>		1						1
<i>Mammaliicoccus sciuri</i>	2		5					7
<i>Microbacterium oxydans</i>		1						1
<i>Microbacterium</i> sp.					1			1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1				3			4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>					1			1
<i>Rhodococcus qingshengii/Rhodococcus erythropolis</i>						1		1
<i>Rothia marina/Rothia endophytica</i>		1						1
<i>Rothia</i> sp.		1						1
<i>Serratia marcescens</i>	1		2					3
<i>Staphylococcus aureus</i>		1		3				4
<i>Staphylococcus delphini</i>			1					1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1						1

<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1			1	4		7
<i>Staphylococcus sp.</i>		3						3
<i>Staphylococcus warneri</i> / <i>Staphylococcus pasteurii</i>				1				1
Συνολικές απομονώσεις ανά δείγμα	13	35	10	7	18	13	28	124

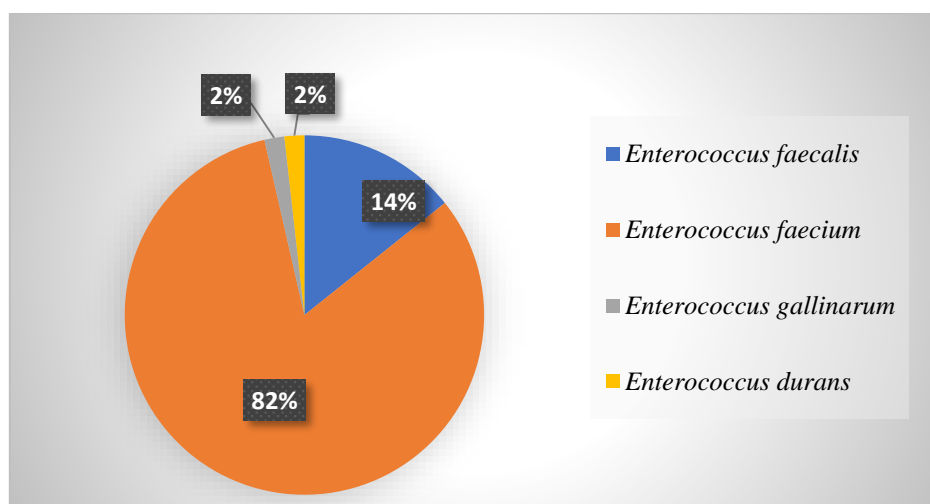


Σχήμα 7: Ποσοστά παρουσίας των γενών των βακτηρίων στις συνολικές απομονώσεις βακτηρίων όλων των δειγμάτων

Όσον αφορά στα βακτήρια του γάλακτος όνου, αυτά ανήκουν κυρίως στα γένη *Enterococcus* (45 %), *Staphylococcus* (14 %), *Enterobacter* (13 %), *Mammaliicoccus* (6 %), *Pediococcus* (4 %) και *Lacticaseibacillus* (3 %). Παράλληλα, σε μικρότερα ποσοστά (1-2 %) ταυτοποιήθηκαν είδη των γενών *Serratia*, *Cellulosimicrobium*, *Leuconostoc*, *Rothia*, *Microbacterium*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Citrobacter*, *Macrococcus*, *Lentilactobacillus* και *Rhodococcus* (Πίνακας 30, Σχήμα 7). Τα κυρίαρχα είδη ήταν τα *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pediococcus acidilactici* καθώς και είδη του συμπλέγματος *Enterobacter cloacae* (*Enterobacter cloacae* complex), όπως το είδος *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter ludwigii*. Πρέπει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των απομονώσεων του γένους *Enterobacter* αποτελούν είδη του συμπλέγματος *Enterobacter*

cloacae (είδη με κοινά χαρακτηριστικά, Mezzatesta *et al.*, 2012) στα οποία ήταν δύσκολη η διάκριση μεταξύ των ειδών.

Πιο συγκεκριμένα για τα 68 LAB που ταυτοποιήθηκαν (54 % των απομονώσεων), αυτά βρέθηκαν να ανήκουν στα γένη *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lacticaseibacillus*, *Leuconostoc* και *Lentilactobacillus*. Σε επίπεδο είδους, ταυτοποιήθηκαν τα είδη *Enterococcus faecium* (67,65 %), *Enterococcus faecalis* (11,76 %), *Pediococcus acidilactici* (5,88 %), *Lacticaseibacillus paracasei* (4,41 %), *Leuconostoc mesenteroides* (1,47 %), *Lacticaseibacillus casei* (1,47 %), *Pediococcus pentosaceus* (1,47 %), *Lentilactobacillus buchneri* (1,47 %), *Enterococcus durans* (1,47 %) και *Enterococcus gallinarum* (1,47 %). Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται η κατανομή των ειδών του κυρίαρχου γένους, του γένους *Enterococcus*.



Σχήμα 8: Κατανομή ειδών του γένους *Enterococcus*

Κύριος αντιπρόσωπος των εντερόκοκκων αποτελεί το είδος *Enterococcus faecium* (82 % των εντερόκοκκων), ο οποίος ταυτοποιήθηκε στις 46 από τις συνολικά 124 απομονώσεις. Έπειτα ακολουθούν τα είδη *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gallinarum* και *Enterococcus durans* με ποσοστό συμμετοχής στους εντερόκοκκους όλων των δειγμάτων 14, 2 και 2 %, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι στο δείγμα 7, οι 27 από τις 28 απομονώσεις (96,4 %) ταυτοποιήθηκαν ως *Enterococcus faecium* (Πίνακας 30). Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει τόσο παθογόνους όσο και ωφέλιμους μικροοργανισμούς, οι οποίοι απαντώνται ευρέως στο περιβάλλον. Αποτελούν κυρίως μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων και των ζώων αλλά βρίσκονται επίσης σε φυτά, έντομα και στο έδαφος (Birolo *et al.*, 2001). Ορισμένα στελέχη του *Enterococcus* spp. προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις στον άνθρωπο, όπως βακτηριαιμία και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος (Rózańska *et al.*, 2019). Ωστόσο, υπάρχουν

και στελέχη που είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένα σε διάφορα συστήματα τροφίμων και συμμετέχουν στις ζυμώσεις γαλακτοκομικών προϊόντων και προϊόντων κρέατος, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων αυτών. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι κάποια στελέχη παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως οι βακτηριοσίνες. Μέχρι σήμερα, το γένος *Enterococcus* δεν έχει ακόμη αναγνωρισθεί ως ασφαλές (Generally Recognized as Safe, GRAS) αλλά ορισμένα στελέχη χρησιμοποιούνται είτε ως προβιοτικά (π.χ. *Enterococcus faecium* M74, *Enterococcus faecium* SF-68, *Enterococcus durans* KLDS 6.0930, *Enterococcus faecium* PR88) είτε στην παραγωγή πρόσθετων ζωοτροφών για την πρόληψη της διάρροιας ή τη βελτίωση της ανάπτυξης στα ζώα (Hanchi *et al.* 2018; Liu *et al.*, 2016; Bhardwaj *et al.*, 2008). Συνεπώς, η έντονη παρουσία των εντερόκοκκων στο δείγμα 7 αποτελεί είτε δείκτη κακής υγιεινής είτε πλεονέκτημα στην παραγωγή προϊόντων που έχουν ενδιαφέρον τόσο από τεχνολογικής όσο και από την άποψη της υγείας του ανθρώπου.

Εκτός από τα είδη του γένους *Enterococcus* στα δείγματα ταυτοποιήθηκαν και τα είδη *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* και *Lentilactobacillus buchneri* τα οποία συσχετίζονται με τις διαδικασίες παραγωγής και ζύμωσης των τροφίμων (π.χ. γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος και λαχανικά) και χρησιμοποιούνται ευρέως ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες στις βιομηχανίες τροφίμων (Das & Goyal, 2011; Heintl & Grabherr, 2017).

Όσον αφορά τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι Aspri *et al.* (2016a) αναφέρουν ότι το 74 % των απομονώσεων των LAB από 11 δείγματα νωπού γάλακτος όνου βρέθηκαν να ανήκουν, μέσω culture-dependent μεθόδων, στο γένος *Enterococcus* με κυρίαρχα είδη τα είδη *Enterococcus faecium* (44 % των εντερόκοκκων) και *Enterococcus faecalis* (17 % των εντερόκοκκων). Ανιχνεύθηκαν ακόμα είδη των γενών *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Lactocaseibacillus* (24, 1 και 1% των συνολικών απομονώσεων, αντίστοιχα), με μοναδικούς εκπροσώπους τα είδη *Streptococcus gallolyticus*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Lactocaseibacillus paracasei*, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Carminati *et al.* 2014, μέσω culture-dependent μεθόδων, οι οποίοι σε νωπά δείγματα γάλακτος όνου ταυτοποίησαν LAB που ανήκουν στα γένη *Enterococcus*, *Streptococcus* και *Pediococcus*. Το γένος *Enterococcus*, και συγκεκριμένα το είδος *Enterococcus faecium*, ήταν το κυρίαρχο (28 από τις 55 απομονώσεις). Στη μελέτη των Soto del Rio *et al.* (2016), μέσω culture-dependent μεθόδων, τα είδη των LAB που ταυτοποιήθηκαν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ήταν τα *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* και *Carnobacterium maltaromaticum*, ενώ λιγότερο άφθονα ήταν είδη του γένους *Leuconostoc*, *Enterococcus* και *Streptococcus*.

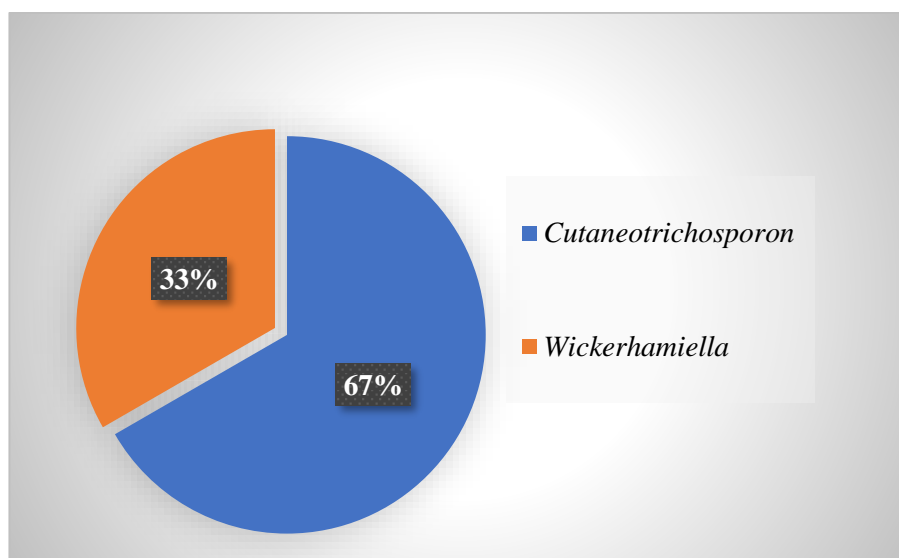
Επιπλέον, στα δείγματα βρέθηκαν είδη των γενών *Staphylococcus*, *Mammaliicoccus*, *Enterobacter*, *Macrococcus*, *Citrobacter*, *Rothia*, *Agrobacterium*, *Serratia* και *Cellulosimicrobium*, τα οποία περιλαμβάνουν παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα στελέχη, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα αλλά και τα φυτά. Η παρουσία ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στο νωπό γάλα όνου, όπως των ειδών *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp. και *Streptococcus* spp αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία (Cavallarin *et al.*, 2015; Pilla *et al.*, 2010; Sarno *et al.*, 2012; Conte & Passantino, 2009). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι οι Giacometti *et al.* (2016) και οι Cavallarin *et al.* (2015), μέσω culture-dependent μεθόδων, και οι Soto del Rio *et al.* (2017), μέσω culture-independent μεθόδων, αναφέρουν ότι στο νωπό γάλα όνου είδη του γένους *Pseudomonas* απαντώνται σε υψηλούς πληθυσμούς και αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του μικροβιώματος του συγκεκριμένου είδους γάλακτος. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη δεν ταυτοποιήθηκαν καθόλου στελέχη *Pseudomonas* spp. μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρω ότι στόχος της παρούσας μελέτης δεν ήταν η απομόνωση ψευδομονάδων αλλά μικροοργανισμών με ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον, και συγκεκριμένα LAB. Συνεπώς, η παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών στην πλειοψηφία των δειγμάτων της συγκεκριμένης μελέτης αλλά και η εμφάνισή τους σε παρόμοιες μελέτες τονίζουν την ανάγκη για παστερίωση του γάλακτος καθώς και την θέσπιση αυστηρών μέτρων υγιεινής κατά την παραγωγή, επεξεργασία και διακίνηση του γάλακτος, έτσι ώστε το τελικό προϊόν να είναι ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση. Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί ότι το είδος *Kocuria varinas* που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 7, χρησιμοποιείται κατά την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων κρέατος (Toldra, 2011) καθώς επίσης και ότι στελέχη του γένους *Rhodococcus*, που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 6, εμφανίζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, σχετικά με τη βιοαποκατάσταση και την επεξεργασία βιομηχανικών λυμάτων, λόγω της ικανότητάς τους να αποικοδομούν χημικούς ρύπους (Part *et al.*, 2010). Τέλος, το είδος *Staphylococcus delphini*, που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 3, αποτελεί συνηθισμένο αποικιστή της ρινικής κοιλότητας των όνων (Gharsa *et al.*, 2015).

4.4.5 Ταυτοποίηση ζυμών μέσω αλληλούχησης της ITS περιοχής

Ομοίως με τα βακτήρια, τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των ζυμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 31 και το Σχήμα 9.

Πίνακας 31: Ταυτοποίηση ζυμών σε επίπεδο γένους/είδους

Είδος	Δείγμα							Συνολικές απομονώσεις ανά είδος
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	1		1					2
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>							2	2
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i>							2	2
Συνολικές απομονώσεις ανά δείγμα	1	0	1	0	0	0	4	6



Σχήμα 9: Ποσοστά παρουσίας των γενών των ζυμών στις συνολικές απομονώσεις ζυμών όλων των δειγμάτων

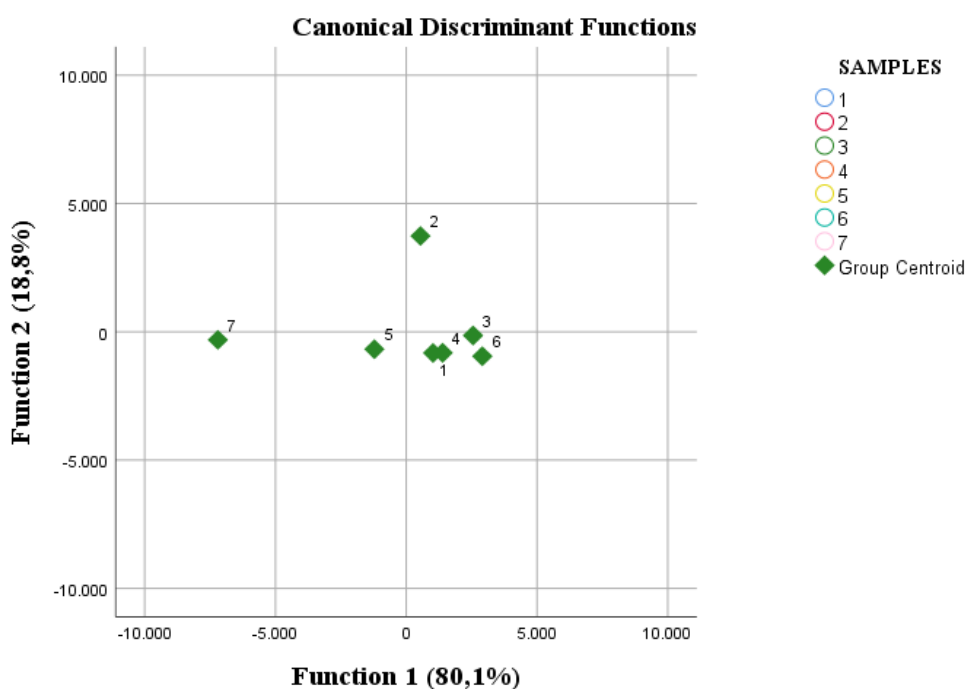
Στην παρούσα μελέτη τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα γένη *Cutaneotrichosporon* (67 %) και *Wickerhamiella* (33 %). Κανένα από τα απομονωμένα στελέχη δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον στη βιομηχανία τροφίμων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Αντιθέτως, ορισμένα στελέχη των παραπάνω γενών μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία (Peter *et al.*, 2019; Bracharz *et al.*, 2017; Maciel *et al.*, 2019; El Helou & Palavecino, 2017).

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη συγκεκριμένη μικροβιακή ομάδα, πέραν των καταμετρήσεων του μικροβιακού φορτίου, είναι ελάχιστα. Ωστόσο, στην μελέτη των Randazzo *et al.* (2016) μέσω κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης σε συνδυασμό με μοριακές τεχνικές (αλληλούχηση της ITS περιοχής) βρέθηκε ότι το 72 % των στελεχών των ζυμών ανήκε στο

είδος *Kluyveromyces lactis*. Τα υπόλοιπα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon moniliforme* και *Candida parapsilosis*.

4.4.6 Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε Discriminant Analysis με βάση τα ποσοστά των ταυτοποιηθέντων βακτηρίων και ζυμών σε επίπεδο γένους, ανά δείγμα (Σχήμα 10). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα μαζί. Το Function 1 περιγράφει το 80,1 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 ($p < 0,001$). Το Function 2 περιγράφει το 18,8 % των δειγμάτων με Wilk's Lambda=0,000 ($p < 0,001$). Εισάγοντας τις μεταβλητές με τη μέθοδο StepWise το μοντέλο αποδέχεται μόνο την συνεισφορά των γενών *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Mammaliococcus*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus*, *Lacticaseibacillus* και *Pediococcus*.



Σχήμα 10: Διαχωριστική ανάλυση ως προς τα ταυτοποιηθέντα στελέχη σε επίπεδο γένους

Στο Σχήμα 10 τα δείγματα 1 και 4 παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στο μικροβιακό προφίλ τους. Η ομοιότητα αυτή πιθανώς ωφελείται στο γεγονός ότι σχεδόν το 50 % των απομονώσεων ανήκουν στο γένος *Enterococcus* καθώς ακόμα και στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών του γένους *Staphylococcus*. Επίσης, τα δείγματα 3, 5 και 6 πλησιάζουν το μικροβιακό προφίλ των δειγμάτων 1 και 4 λόγω των απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν ως *Staphylococci*. Το γένος *Staphylococcus* απουσιάζει (0 απομονώσεις) από το δείγμα 7 για αυτό πιθανώς δεν εμφανίζει ομοιότητες με τα υπόλοιπα δείγματα. Τέλος, στο δείγμα 2 παρόλο που

κάποιες απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν ως *Staphylococci* αυτό είναι απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα δείγματα λόγω του πλούσιου μικροβιακού προφίλ του (πολλοί περισσότεροι μικροοργανισμοί κάποιοι από τους οποίους δεν εμφανίστηκαν σε κανένα άλλο δείγμα).

Συγκρίνοντας την Discriminant Analysis ως προς τις καταμετρήσεις των πληθυσμών με την Discriminant Analysis που βασίζεται στα ποσοστά των ταυτοποιηθέντων βακτηρίων και ζυμών συμπεραίνουμε πως και στις δύο αναλύσεις το δείγμα 7 παρουσιάζει διαφορετικό μικροβιακό προφίλ από τα υπόλοιπα δείγματα και ότι τα δείγματα 3 και 6 εμφανίζουν παρόμοιο μικροβιακό προφίλ. Ακόμα τα δείγματα 1 και 5 παρουσιάζουν ομοιότητες με τα δείγματα 3 και 6. Ωστόσο, διαφορετικά είναι τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων για τα δείγματα 4 και 2. Συγκεκριμένα στην Discriminant Analysis ως προς τις καταμετρήσεις των πληθυσμών το δείγμα 4 διαφέρει από τα υπόλοιπα ενώ το δείγμα 2 παρουσιάζει ομοιότητες με τα δείγματα 3, 6 και 5. Αντιθέτως, στην Discriminant Analysis που βασίζεται στα ποσοστά των ταυτοποιηθέντων βακτηρίων και ζυμών το δείγμα 2 διαφέρει από τα υπόλοιπα ενώ το δείγμα 4 παρουσιάζει ομοιότητες με τα δείγματα 1, 3, 5 και 6.

4.5 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

4.5.1 Βακτήρια

Τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για τα βακτήρια, μέσω των οποίων αποδεικνύεται η μεγάλη βιοποικιλότητα του συγκεκριμένου οικοσυστήματος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 11. Η περιοχή V1-V3 που ενισχύθηκε για τον σκοπό της παρούσας μελέτης μας δίνει την δυνατότητα της ταξινόμησης των βακτηρίων σε επίπεδο είδους (Johnson *et al.*, 2019). Ωστόσο τόσο τα βακτήρια όσο και οι ζύμες/μύκητες αξιολογήθηκαν μέχρι το επίπεδο του γένους λόγω της υψηλότερης βεβαιότητας των αποτελεσμάτων.

Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 117 γένη βακτηρίων. Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών των δειγμάτων νωπού γάλακτος όνου ανήκουν στα φύλα Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, και Bacteroidetes. Πιο συγκεκριμένα, τα κυρίαρχα γένη, με τα ποσοστά σχετικής αφθονίας να ποικίλλουν μεταξύ των δειγμάτων, είναι τα *Acinetobacter* ($16,99 \pm 21,17$ %), *Pseudomonas* ($15,26 \pm 20,88$ %), *Staphylococcus* ($11,51 \pm 18,48$ %), *Rothia* ($9,70 \pm 17,07$ %), *Microbacterium* ($4,58 \pm 6,65$ %), *Rhodococcus* ($4,28 \pm 7,09$ %), *Enterococcus* ($4,27 \pm 5,28$ %), *Agrobacterium* ($3,55 \pm 5,52$ %), *Macroccoccus* ($3,30 \pm 5,12$ %) και *Chryseobacterium* ($2,31 \pm 3,29$ %).

Σχετικά με τα δείγματα 1 και 4, παρόλο που στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ταυτοποίηση LAB, τα κυρίαρχα γένη ήταν τα *Pseudomonas* (31,16 και 60,32 %, αντίστοιχα)

και *Acinetobacter* (17,75 και 26,63 %, αντίστοιχα). Σε χαμηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν ακόμα τα γένη *Chryseobacterium* (7,88 %), *Microbacterium* (6,87 %), *Agrobacterium* (6,05 %), *Arthrobacter* (4,19 %) και *Staphylococcus* (3,59 %) στο δείγμα 1, ενώ στο δείγμα 4 ανιχνεύθηκαν τα γένη *Staphylococcus* (4,28 %) και *Rothia* (3,29 %). Η κλασσική μικροβιολογική ανάλυση συμφωνεί με τα υψηλά ποσοστά των γενών *Staphylococcus* και *Agrobacterium* στο δείγμα 1 και *Staphylococcus* στο δείγμα 4, ενώ δεν συμφωνεί στην ταυτοποίηση των υπόλοιπων γένων, τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν μέσω αυτής της ανάλυσης.

Στο δείγμα 2 κυριάρχησε το γένος *Acinetobacter* (63,82 %), αλλά εντοπίστηκαν σε σημαντικά ποσοστά και τα γένη *Rothia* (10,82 %), *Staphylococcus* (8,47 %), *Macrococcus* (8,44 %) και *Pseudomonas* (4,47 %). Μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν τα γένη *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rothia*, *Microbacterium*, *Citrobacter* και *Macrococcus*, τα οποία βρέθηκαν και μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης με εξαίρεση τα γένη *Bacillus* και *Citrobacter*.

Στο δείγμα 3, κυρίαρχα ήταν τα γένη *Staphylococcus* (56,27 %) και *Agrobacterium* (16,20 %). Ακόμα, ανιχνεύθηκαν και τα γένη *Pseudomonas*, *Serratia*, *Brevundimonas* και *Enterococcus* σε ποσοστά σχετικής αφθονίας 5,93, 3,99, 3,40 και 3,04 %, αντίστοιχα. Τα γένη *Staphylococcus*, *Serratia* και *Enterococcus* ταυτοποιήθηκαν και μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης, όπου αποτέλεσαν το 50 % των απομονώσεων.

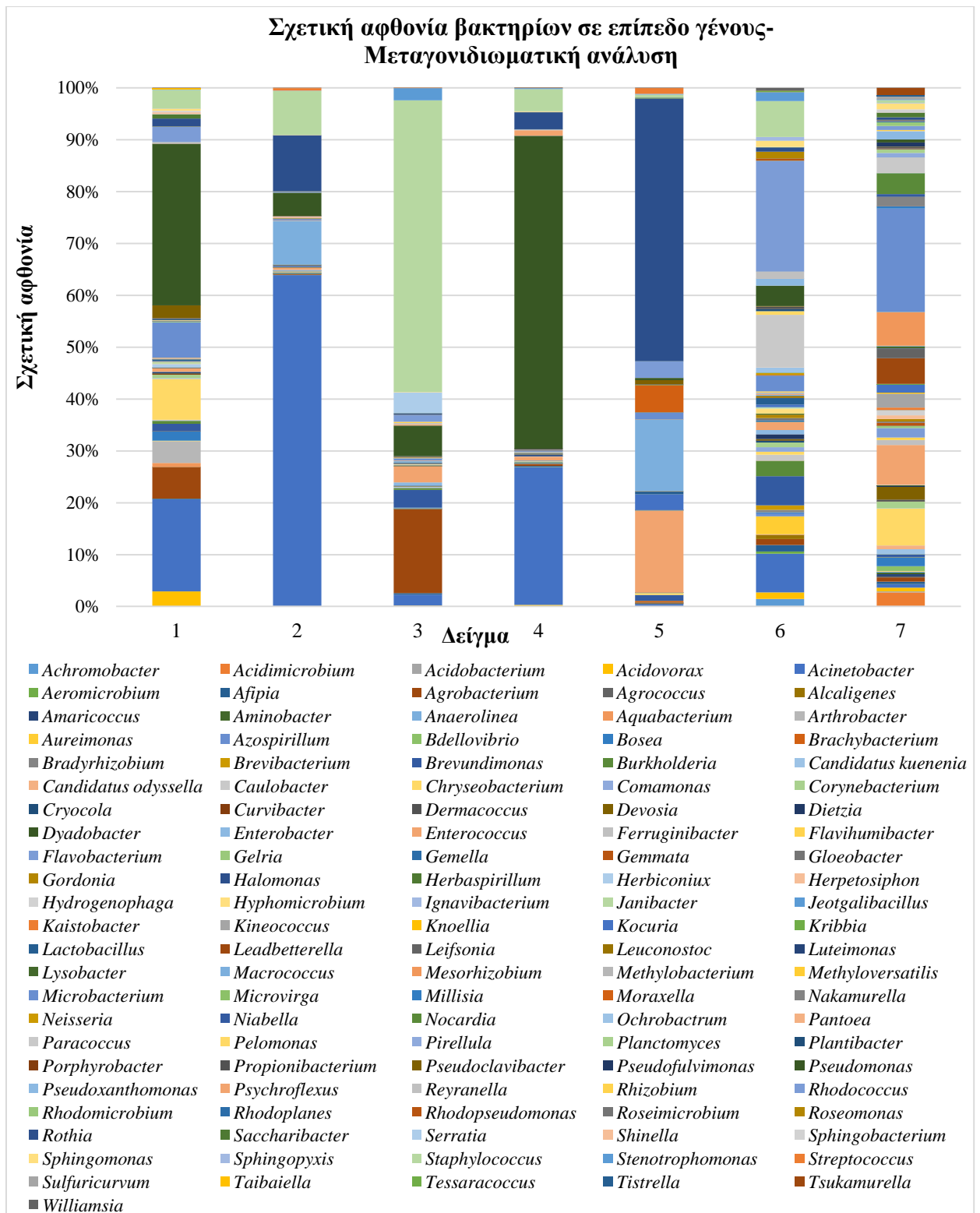
Σχετικά με το δείγμα 5, σε αυτό επικράτησαν τα γένη *Rothia* (50,66 %), *Enterococcus* (15,83 %) και *Macrococcus* (13,72 %). Στο συγκεκριμένο δείγμα, η σχετική αφθονία του γένους *Moraxella* ήταν πολύ μεγαλύτερη (5,20 %) από των υπόλοιπων δειγμάτων (0,02-0,11 %). Τα αποτελέσματα της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης συμφωνούν με τα υψηλά ποσοστά σχετικής αφθονίας του γένους *Enterococcus*, και στην ταυτοποίηση ακόμα των γενών *Microbacterium* και *Staphylococcus*.

Το δείγμα 6 παρουσιάζει ένα πολύ πλούσιο μικροβιακό οικοσύστημα. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός πως στο δείγμα 6 κυρίαρχα ήταν τα γένη *Rhodococcus* (21,40 %) και *Paracoccus* (10,15 %), τα οποία στα υπόλοιπα δείγματα βρέθηκαν κατά μέσο όρο με ποσοστό σχετικής αφθονίας της τάξεως του $1,42 \pm 1,25$ % και $0,53 \pm 1,05$ %, αντίστοιχα. Σε υψηλά ποσοστά βρέθηκαν ακόμα τα γένη *Acinetobacter* (7,48 %), *Staphylococcus* (6,93 %), *Brevundimonas* (5,62 %), *Pseudomonas* (3,96 %), *Aureimonas* (3,47 %), *Microbacterium* (3,04 %) και *Burkholderia* (3,01 %). Τα αποτελέσματα της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης συμφωνούν στην παρουσία των γενών *Rhodococcus*, *Staphylococcus* και *Enterococcus* στο δείγμα 6.

Τέλος, στο δείγμα 7 μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν μικροοργανισμοί του γένους *Enterococcus* (96,4 %) και *Kocuria* (3,6 %) ενώ μέσω της

μεταγονιδιωματικής ανάλυσης το δείγμα 7 παρουσίασε πιο σύνθετο μικροβιακό προφίλ. Πιο αναλυτικά, τα γένη με υψηλά ποσοστά σχετικής αφθονίας ήταν τα γένη *Microbacterium* (19,93 %), *Enterococcus* (7,69 %), *Chryseobacterium* (7,12 %), *Mesorhizobium* (6,44 %), *Leadbetterella* (4,94 %) και *Nocardia* (4,06 %).

Σχετικά με τα LAB, αυτά σημείωσαν διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, με το μέσο όρο του ποσοστού σχετικής αφθονίας τους να παίρνει τιμή $4,62 \pm 5,59$ %. Τα γένη των LAB που βρέθηκαν στα δείγματα νοπού γάλακτος όνου ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* και *Streptococcus*. Αναλυτικότερα για κάθε δείγμα, στα δείγματα 1, 2 και 4 τα ποσοστά σχετικής αφθονίας ήταν μικρότερα από των υπόλοιπων δειγμάτων και πιο συγκεκριμένα 0,92, 0,97 και 0,91 %, αντίστοιχα. Κυρίαρχο γένος LAB στα δείγματα 1 και 4, ήταν το γένος *Enterococcus*, ενώ στο δείγμα 2 τα γένη *Enterococcus* και *Streptococcus*. Στο δείγμα 3 και 6 τα ποσοστά σχετικής αφθονίας των LAB ανέρχονταν στο 3,24 % και 3,15 %, αντίστοιχα. Ακόμα, κυρίαρχο γένος LAB στο δείγμα 3 ήταν το γένος *Enterococcus* και στο δείγμα 6 τα γένη *Enterococcus* και *Lactobacillus*. Στο δείγμα 7, με ποσοστό σχετικής αφθονίας 7,78 %, το κυρίαρχο γένος των LAB ήταν το γένος *Enterococcus*. Τέλος, στο δείγμα 5, στο οποίο μετρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό σχετικής αφθονίας (17,55 %) των LAB, κυρίαρχο γένος LAB ήταν το γένος *Enterococcus*. Τεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμα το γένος *Microbacterium*, το οποίο ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά στα δείγματα 1 (6,87 %) και 7 (19,93 %), καθώς και τα γένη *Propionibacterium* και *Macroccoccus*. Όσον αφορά το γένος *Macroccoccus*, και συγκεκριμένα το είδος *Macroccoccus caseolyticus*, το οποίο χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης στην παραγωγή τυριών λόγω της λιπολυτικής και πρωτεολυτικής δραστηριότητάς του, ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά στα δείγματα 2 (8,44 %) και 5 (13,72 %).



Σχήμα 11: Ποσοστό σχετικής αφθονίας βακτηρίων των δειγμάτων σε επίπεδο γένους, σύμφωνα με τη μεταγονιδιοματική ανάλυση αλληλούχησης της περιοχής V1-V3 του 16S rRNA γονιδίου

Παρά το όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για το γάλα όνου, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την εφαρμογή μίας σύγχρονης τεχνολογίας για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας του

συγκεκριμένου είδους γάλακτος, όπως είναι η μεταγονιδιωματική ανάλυση, είναι περιορισμένα. Ωστόσο, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στην Ιταλία οι Soto del Rio *et al.* (2017) μελετώντας τη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων του γάλακτος όνου μέσω αλληλούχησης υψηλής απόδοσης (HTS) βρήκαν ότι όλες οι αναγνώσεις (reads) αλληλουχιών των δειγμάτων ταξινομήθηκαν σε πέντε φύλα, και συγκεκριμένα στα Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria και Verrucomicrobia. Τα κυρίαρχη γένη που βρέθηκαν, τα οποία είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ήταν τα γένη *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Citrobacter* και *Sphingobacterium*. Ακόμα, το γένος *Pseudomonas* ήταν το μόνο γένος με υψηλά ποσοστά αναγνώσεων των αλληλουχιών σε όλα σχεδόν τα υπό μελέτη δείγματα. Σύμφωνα με τα κυρίαρχα γένη *Pseudomonas* και *Acinetobacter* είναι και η παρούσα μελέτη. Σχετικά με τα LAB που βρέθηκαν στην μελέτη των Soto del Rio *et al.* (2017), αυτά ανήκαν στα γένη *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Carnobacterium* και αντιστοιχούσαν κατά μέσο όρο στο 2,55% των συνολικών αναγνώσεων ανά δείγμα. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό σχετικής αφθονίας των LAB ήταν μεγαλύτερο καθώς επίσης δεν ανιχνεύθηκαν τα γένη *Lactococcus* και *Carnobacterium*. Σε παρόμοια αποτελέσματα με τους προηγούμενους κατέληξαν και οι Russo *et al.*, 2020 οι οποίοι σε νωπό γάλα όνου από όνους σε φάρμα στην Ιταλία ταξινόμησαν όλες τις αναγνώσεις σε πέντε διαφορετικά φύλα, με κυρίαρχο το φύλο Proteobacteria (περίπου 70%), ακολουθούμενο από το φύλο Bacteroidetes (< 20 %), και σε μικρότερο βαθμό από τα φύλα Firmicutes, Actinobacteria και Verrucomicrobia. Αναλυτικότερα οι Russo *et al.* (2020) βρήκαν υψηλή σχετική φθονία αρνητικών κατά Gram ψυχοτρόφων μικροοργανισμών, με το γένος *Pseudomonas* να αποτελεί το κυρίαρχο γένος (> 45 %). Τα υπόλοιπα βακτήρια συσχετίστηκαν με είδη που ανήκουν στα γένη *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Citrobacter*, *Delftia* και *Azospirillum*. Επιπλέον, σε ποσοστό < 5 % των συνολικών αναγνώσεων βρέθηκαν LAB με το γένος *Lactococcus* να είναι το πιο άφθονο (2,7 %) ακολουθούμενο από είδη του γένους *Streptococcus* (1 %) και *Enterococcus* (0,5 %). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν τα ίδια γένη LAB αλλά σε διαφορετικά ποσοστά σχετικής αφθονίας.

Στην μελέτη των Papademas *et al.* (2020) οι βακτηριακές κοινότητες του νωπού γάλακτος όνου σε φάρμες στην Κύπρο αποτελούνταν κυρίως από μικροοργανισμούς του φύλου Proteobacteria, ενώ μικροοργανισμοί των φύλων Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria και Verrucomicrobia εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες σχετικές αφθονίες. Πιο συγκεκριμένα, τα κυρίαρχα γένη που εντοπίστηκαν ήταν τα γένη *Sphingomonas*, *Mesorhizobium* και *Pseudomonas*. Εντοπίστηκαν ακόμα βακτήρια των γενών *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Clostridium* και *Flavobacterium* με διαφορετική

σχετική αφθονία στο κάθε δείγμα. Τα προαναφερθέντα γένη εκτός των *Ralstonia* και *Clostridium* ταυτοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Σχετικά με τα LAB, η παρουσία τους, και συγκεκριμένα των γενών *Lactobacillus* και *Streptococcus*, παρουσίασε τιμή μέσης σχετικής αφθονίας της τάξης του 2,42 %.

Οι Luoyizha *et al.* (2020) μελετώντας το μικροβίωμα του γάλακτος όνου σε δύο διαφορετικές περιοχές της Κίνας (Ανατολική και Δυτική Κίνα) συμπέραναν ότι τα κυριότερα φύλα που εντοπίστηκαν και στις δύο ομάδες ήταν τα φύλα *Acinetobacter*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* και *Bacteroidetes* αλλά με διαφορετικά ποσοστά αφθονίας για κάθε φύλο σε κάθε ομάδα. Σε επίπεδο γένους, στα δείγματα της Δυτικής Κίνας τα γένη *Macrococcus*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Lactococcus* και *Rothia* ήταν τα πιο άφθονα ενώ στα δείγματα της Ανατολικής Κίνας ήταν τα γένη *Streptococcus*, *Pseudoclavibacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* και *Chryseobacterium*. Οι διαφορές αυτές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες όπως το περιβάλλον εκτροφής των ζώων είτε η φυλή τους. Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν όλα τα γένη που αναφέρθηκαν παραπάνω με εξαίρεση το γένος *Lactococcus*. Όσον αφορά τα LAB, η αφθονία τους ήταν 1,56 και 6,21 % για τα δείγματα από την Δυτική και Ανατολική Κίνα, αντίστοιχα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα LAB που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν μόνο στα γένη *Lactococcus* και *Enterococcus*.

4.5.2 Ζύμες/Μύκητες

Τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για τις ζύμες/μύκητες παρουσιάζονται στο Σχήμα 12. Έπειτα από την ενίσχυση της περιοχής ITS των δειγμάτων, ανιχνεύθηκαν γένη τα οποία ανήκουν κυρίως στα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota*. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για τις ζύμες/μύκητες στα δείγματα νοπού γάλακτος όνου έδειξαν ότι, μεταξύ των 100 γενών που ανιχνεύθηκαν, τα κυρίαρχα γένη ήταν τα γένη *Trichosporon* ($9,68 \pm 20,52$ %), *Alternaria* ($8,67 \pm 9,06$ %), *Cladosporium* ($8,35 \pm 7,06$ %), *Udeniomyces* ($8,18 \pm 18,58$ %), *Filobasidium* ($6,75 \pm 7,76$ %), *Penicillium* ($6,14 \pm 5,76$ %), *Fusarium* ($5,08 \pm 5,83$ %), *Cryptococcus* ($4,82 \pm 4,60$ %), *Debaryomyces* ($4,71 \pm 5,84$ %) και *Acremonium* ($4,66 \pm 9,27$ %).

Πιο συγκεκριμένα, στο δείγμα 1 τα γένη με τα υψηλότερα ποσοστά σχετικής αφθονίας ήταν τα γένη *Filobasidium* (24,13 %), *Cryptococcus* (15,15 %), *Cladosporium* (12,55 %) και *Catenaria* (10,17 %), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν ακόμα τα γένη *Cystofilobasidium* (6,97 %), *Alternaria* (4,91 %), *Sporobolomyces* (4,78 %), *Udeniomyces* (3,3 %) και *Debaryomyces* (3,05 %). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό σχετικής

αφθονίας του γένους *Catenaria* (10,17 %), ήταν πολύ υψηλότερο από των υπόλοιπων δειγμάτων, στα οποία κατά μέσο όρο ήταν $0,25 \pm 0,35$ %.

Στο δείγμα 2 ανιχνεύθηκαν κυρίως τα γένη *Debaryomyces* (18,44 %), *Fusarium* (14,57 %), *Rhodotorula* (10,55 %) και *Alternaria* (10,41 %). Το γένος *Rhodotorula* στο συγκεκριμένο δείγμα βρέθηκε σε υψηλότερα ποσοστά, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα ($0,87 \pm 0,96$ %). Επίσης, σε ποσοστά σχετικής αφθονίας της τάξεως του 3,00-5,64 % βρέθηκαν τα γένη *Aureobasidium*, *Filobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium* και *Trichosporon*.

Στο δείγμα 3 τα κυρίαρχα γένη ήταν τα γένη *Kluveromyces*, *Minimedusa*, *Penicillium*, *Eurotium* και *Filobasidium* με ποσοστά σχετικής αφθονίας 13,17, 11,99, 11,63, 11,21 και 9,13 %, αντίστοιχα. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν τα γένη *Cladosporium*, *Debaryomyces* και *Phoma* σε σημαντικά ποσοστά σχετικής αφθονίας της τάξεως του 5,00-6,00 %. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι τα γένη *Kluveromyces*, *Minimedusa* και *Phoma* καταλαμβάνουν ένα σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας του δείγματος 3, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα το ποσοστό σχετικής αφθονίας των παραπάνω γενών δεν ξεπερνάει το 1% για κάθε δείγμα.

Στο δείγμα 4 το μεγαλύτερο ποσοστό σχετικής αφθονίας (53,60 %) αντιστοιχεί σε μικροοργανισμούς του γένους *Udeniomyces*. Ωστόσο, σε σημαντικά ποσοστά βρέθηκαν ακόμα τα γένη *Penicillium* (15,95 %), *Cryptococcus* (6,86 %), *Cystofilobasidium* (4,76 %), *Cladosporium* (4,68 %) και *Sporobolomyces* (4,45 %).

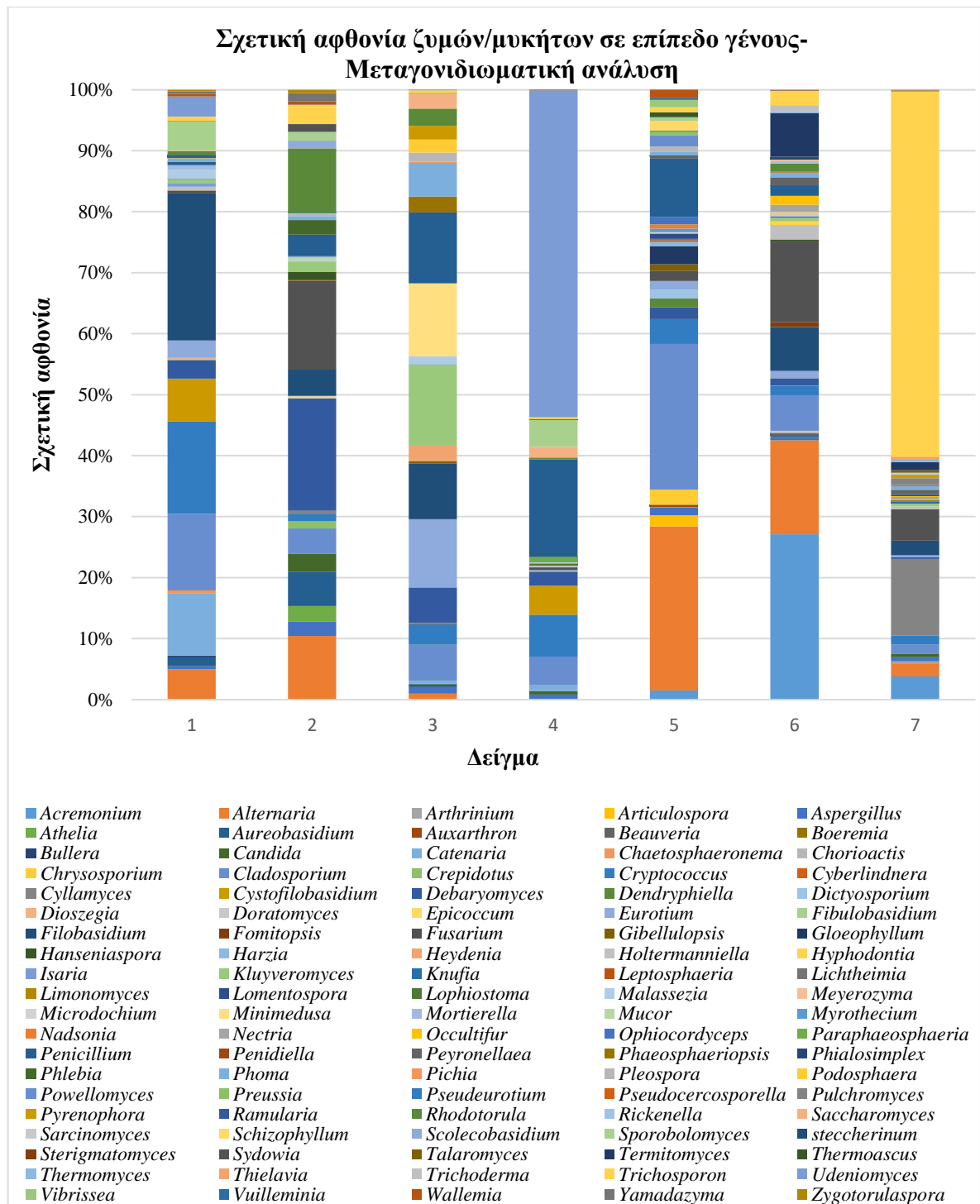
Στο δείγμα 5 επικράτησαν τα γένη *Alternaria* (26,95 %) και *Cladosporium* (23,86 %), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν τα γένη *Penicillium* (9,58 %) και *Cryptococcus* (4,06 %).

Όσον αφορά στο δείγμα 6, σε αυτό τα κυρίαρχα γένη ήταν τα γένη *Acremonium* (27,13 %), *Alternaria* (15,39 %) και *Fusarium* (13,32 %). Ακόμα, βρέθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά τα γένη *Filobasidium* (7,19 %), *Termitomyces* (7,18 %) και *Cladosporium* (5,80 %). Το ποσοστό σχετικής αφθονίας του γένους *Acremonium*, που αποτελεί το κυρίαρχο γένος στο δείγμα 6, στα υπόλοιπα δείγματα είναι κατά μέσο όρο $0,91 \pm 1,41$ %.

Τέλος, το κυρίαρχο γένος στο δείγμα 7, με ποσοστό σχετικής αφθονίας 59,90 %, αποτελεί το γένος *Trichosporon*, ενώ ταυτόχρονα βρέθηκαν τα γένη *Cyllumyces* και *Fusarium* σε υψηλά ποσοστά (12,56 και 5,07 %, αντίστοιχα). Τα γένη *Cutaneotrichosporon* και *Wickerhamiella*, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης, δεν βρέθηκαν σε κανένα δείγμα μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.

Το μικροβίωμα του γάλακτος όνου αποτελείται από ζύμες/μύκητες με ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα νωπού γάλακτος όνου βρέθηκαν μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος *Aureobasidium* και συγκεκριμένα το είδος *Aureobasidium pullulans*, στελέχη του οποίου (π.χ *A. pullulans* ATCC 201253) παράγουν

εξωπολυσακχαρίτες που έχουν εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς όπως σε βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και καλλυντικών (Oğuzhan & Yangilar, 2013; West, 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό σχετικής αφθονίας του συγκεκριμένου είδους ήταν 1,44 και 5,64 % στο δείγμα 1 και 2, αντίστοιχα. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν και είδη των γενών *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* και *Termitomyces*. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είδη των παραπάνω γενών, όπως τα είδη *Saccharomyces bayanus*, *Rhodotorula glutinis*, *Kluyveromyces lactis* και *Debaryomyces hansenii*, χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων για την παραγωγή προϊόντων διατροφής, λόγω των ιδιαίτερων φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων τους. Παραδείγματα τέτοιων ιδιοτήτων αποτελούν η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, καροτενοειδών, ακεταλδεύδης και ενζύμων αλλά και η αντοχή στην υψηλή αλατοπεριεκτικότητα (Arevalo-Villena *et al.*, 2016; Frisvard, 1999; Hernández-Almanza *et al.*, 2013; Wrent *et al.*, 2014; AlMatar & Makky, 2015; Ghorai *et al.*, 2009). Παρόλα αυτά στα περισσότερα δείγματα ανιχνεύθηκαν, σε διαφορετικά ποσοστά σχετικής αφθονίας, ακόμα και γένη ζυμών/μυκήτων τα οποία περιλαμβάνουν είδη με αρνητικές επιδράσεις είτε στην ανθρώπινη υγεία είτε στην ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Τέτοια γένη ζυμών/μυκήτων αποτελούν τα γένη *Schizophyllum*, *Pyrenophora*, *Podosphaera*, *Eurotium*, *Alternaria*, *Aspergillus* και *Fusarium* (Michel *et al.*, 2016; Donini *et al.*, 2000; Kilian & Steiner, 2003; Hocking, 2014; Gupta, 2000).



Σχήμα 12: Ποσοστό σχετικής αφθονίας ζυμών/μυκήτων των δειγμάτων σε επίπεδο γένους, σύμφωνα με τη μεταγονιδιοματική ανάλυση αλληλούχησης της περιοχής ITS

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη του γάλακτος όνου μέσω της διερεύνησης του μικροβιώματος δειγμάτων από όλες τις γαλακτοπαραγωγές φάρμες όνων της Ελλάδας και ταυτόχρονα της μελέτης της ποιότητας και των πιθανών διατροφικών ωφελειών του συγκεκριμένου είδους γάλακτος. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική ανάλυση, κλασική μικροβιολογική ανάλυση, μεταγονιδιωματική ανάλυση, προσδιορισμός των λιπαρών οξέων και ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος, αποτελώντας την πρώτη μελέτη στην χώρα που εφαρμόστηκαν οι προαναφερθείσες αναλύσεις σε όλο τον γαλακτοπαραγωγό πληθυσμό όνων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης πάνω από το 50 % των απομονώσεων ταυτοποιήθηκαν ως LAB (*Enterococcus*, *Lactocaseibacillus*, *Pediococcus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*), με κυρίαρχο εκπρόσωπο τους το είδος *Enterococcus faecium*. Μεγάλο ποσοστό συμμετοχής στην διαμόρφωση του μικροβιώματος του γάλακτος όνου, εκτός από το γένος *Enterococcus*, καταλαμβάνουν και τα γένη *Staphylococcus* και *Enterobacter*. Ωστόσο, η παρουσία μικροοργανισμών του γένους *Staphylococcus* αλλά και άλλων παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων στελεχών των γενών *Mammaliicoccus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Rothia*, *Serratia* και *Cellulosimicrobium* τονίζει την αναγκαιότητα της εφαρμογής των κατάλληλων μέτρων υγιεινής και της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος με σκοπό την παραγωγή ενός τελικού ασφαλούς προϊόντος. Όσον αφορά τις ζύμες, στα δείγματα ταυτοποιήθηκαν μόνο τα εξής τρία είδη ζυμών *Cutaneotrichosporon curvatum*, *Wickerhamiella pararugosa* και *Cutaneotrichosporon cutaneum*.

Τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αναδεικνύουν το πλούσιο μικροβιακό προφίλ του συγκεκριμένου είδους γάλακτος καθώς και την παρουσία των LAB. Έτσι, το μικροβίωμα του γάλακτος όνου αποτελείται κυρίως από βακτήρια που σχετίζονται και με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος και από βακτήρια που απαντώνται συνήθως στο έδαφος, το νερό και τα φυτά. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση επιβεβαιώνει την παρουσία των ανεπιθύμητων γενών *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Rothia* και *Serratia* καθώς επίσης συμφωνεί και με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση στην απουσία των γενών *Listeria*, *Salmonella* και *Escherichia*, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ακόμα το γένος *Bacillus*, το οποίο στην κλασική μικροβιολογική ανάλυση ταυτοποιήθηκε σε ένα μόνο δείγμα. Ακόμα, η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε πληθώρα ζυμών/μυκήτων, με την πλειοψηφία αυτών να ταξινομούνται στα φύλα Basidiomycota και Ascomycota, με τα ποσοστά αφθονίας τους να διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων. Μεταξύ των ζυμών/μυκήτων ανιχνεύθηκαν γένη που παρουσιάζουν ιδιαίτερο

τεχνολογικό ενδιαφέρον, όπως το γένος *Kluyveromyces*, αλλά και γένη ανεπιθύμητα από τις βιομηχανίες τροφίμων, όπως το γένος *Candida*.

Από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του προφίλ των ΛΟ καθώς και της φυσικοχημικής ανάλυσης επιβεβαιώνονται τα διατροφικά οφέλη του γάλακτος όνου. Το προφίλ των λιπιδίων των δειγμάτων (υψηλός λόγος ακόρεστων/κορεσμένα ΛΟ, υψηλή περιεκτικότητα σε ω-6 ΛΟ, χαμηλή αναλογία των ω-6/ω-3 ΛΟ, χαμηλή περιεκτικότητα σε μικρής αλύσου ΛΟ) το καθιστά κατάλληλο για τη βρεφική διατροφή αλλά και για χρήση ως λειτουργική τροφή στη διατροφή των ενηλίκων. Επιπλέον, η χαμηλή λιποπεριεκτικότητα ενισχύει την χρήση του συγκεκριμένου είδους γάλακτος στις υποαλλεργικές δίαιτες.

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης του αντιοξειδωτικού συστήματος, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων σχετικά με το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο, δεδομένου ότι αυτό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η διατροφή, η κατάσταση υγείας των ζώων και ο χειρισμός των δειγμάτων.

Μελλοντικά θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν μέσω της κλασσικής μικροβιολογικής ανάλυσης, έτσι ώστε να αναδειχθούν στελέχη τα οποία δύνανται να χρησιμοποιηθούν είτε στην παραγωγή προϊόντων με βάση το γάλα όνου είτε γενικότερα στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή λειτουργικών προϊόντων με βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ενδιαφέρουσα θα ήταν ακόμα η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των ειδών γάλακτος, συγκρίνοντάς τη με αυτή του γάλακτος όνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξένη Βιβλιογραφία:

1. AbdElatif, S., Elsayed, M., Bahout, A., Bayoumi, M. (2016). 'Studies on Beneficial Yeasts Isolated from Some Egyptian Dairy Products', *Zagazig Veterinary Journal*, 44(1), pp. 75-84.
2. Alichanidis, E., Moatsou, G., & Polychroniadou, A. (2016). Composition and Properties of Non-cow Milk and Products. *Non-Bovine Milk and Milk Products*, 81–116. doi:10.1016/b978-0-12-803361-6.00005-3.
3. AlMatar, M., & Makky, E. A. (2016). *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. *3 Biotech*, 6(1), 4.
4. Andrei, Sanda & Matei, S. & Fit, Nicodim & Cernea, C. & Maria, Ciupe & Bogdan, Sidonia & Groza, I.S.. (2011). Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. *Romanian Biotechnological Letters*.
5. Arce-Amezquita, P. M., F. A. Beltrán-Morales, G. A. Manríquez-Rivera, M. E. Cota-Almanza, A. Quian-Torres, and R. G. Peralta-Olachea. 2019. Nutritional value of conventional, wild and organically produced fruits and vegetables available in Baja California Sur markets. *Terra Latinoamericana* 37: 401-406.
6. Arevalo-Villena, M., Briones-Perez, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Biotechnological application of yeasts in food science: Starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1360–1372.
7. Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2016a). Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, 73, 81–90.
8. Aspri, M., Nicole Economou, E. & Photis Papademas, Ph. (2016b): Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects, *Food Reviews International*.
9. Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D., Zhou, W., & Zheng, X. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(8), 597–609.
10. Baltazar, Diogo and Marto, Joana and Berger, Thordis and Pinto, Pedro and Ribeiro, Helena Margarida (2017) The antiageing efficacy of donkey milk in combination with pomegranate extract and UV protection: A traditional ingredient in a modern formulation. Monographic special issue: *Cosmetic Active Ingredients - H&PC Today - Household and Personal Care Today*, 12 (2). pp. 30-32.
11. Barłowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., & Król, J. (2011). Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 291–302.
12. Beghelli D, Lupidi G, Damiano S, Cavallucci C, Bistoni O and De Cosmo A. Rapid Assay to Evaluate the Total Antioxidant Capacity in Donkey Milk and in more Common Animal Milk for Human Consumption. *Austin Food Sci.* 2016; 1(1): 1003.
13. Beghelli D, Lupidi G, Damiano S, Cavallucci C, Bistoni O and De Cosmo A. Rapid Assay to Evaluate the Total Antioxidant Capacity in Donkey Milk and in more Common Animal Milk for Human Consumption. *Austin Food Sci.* 2016; 1(1): 1003.
14. Beresford, T.P. (2003). Dairy Processing || Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality, 448–469.
15. Bhardwaj, A., Kumari, P., Nayan, V., Tanvi, Sonali, Legha, R.A., Gautam, U., Pal, Y., Tripathi, H. and Tripathi, B.N. (2019). Estimation of Antioxidant Potential of

- Indigenous Halari and French Poitu Donkey Milk by using the Total Antioxidant Capacity and Ferric Reducing Antioxidant Power Essay, *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 38(4): 307-310
16. Bhardwaj, A., Kumari, P., Nayan, V., Tanvi, Sonali, Legha, R.A., Gautam, U., Pal, Y., Tripathi, H. & Tripathi, B.N. (2019). Estimation of Antioxidant Potential of Indigenous Halari and French Poitu Donkey Milk by using the Total Antioxidant Capacity and Ferric Reducing Antioxidant Power Essay. *Asian Journal Of Dairy and Food Research*. (38):307-310.
 17. Bhardwaj, A., Malik, R. K., & Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian journal of microbiology*, 48(3), 317–325.
 18. Bhosale, S.S., Kahate, P.A., Kamble, K., Thakare, V.M. & Gubbawar, S.G. (2009). Effect of Lactation on Physico-Chemical Properties of Local Goat Milk. *Veterinary World*, Vol.2(1): 17-19.
 19. Bilung, L. M., Pui, C. F., Su'ut, L., & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. *Disease Markers*, 2018, 1–9.
 20. Birollo, G. A., Reinheimer, J. A., & Vinderola, C. G. (2001). Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology*, 18(6).
 21. Blaya, J.; Barzideh, Z.; LaPointe, G. (2017). Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment 1. *Journal of Dairy Science*, 3611-3629.
 22. Boligon AA, Machado MM, Athayde ML (2014) Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med chem* 4: 517-522.
 23. Bracharz, F., Beukhout, T., Mehlmer, N. et al. Opportunities and challenges in the development of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a new cell factory for custom tailored microbial oils. *Microb Cell Fact* 16, 178 (2017).
 24. Branco, S. (2011). Fungal Diversity – An Overview. *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*.
 25. Bučević-Popović, V., Delaš, I., Međugorac, S., Pavela-Vrančić, M., & Kulišić-Bilušić, T. (2014). Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 394–401.
 26. Bučević-Popović, V., Delaš, I., Međugorac, S., Pavela-Vrančić, M., & Kulišić-Bilušić, T. (2014). Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), 394–401.
 27. Büchl, N. R., & Seiler, H. (2011). YEASTS AND MOLDS | Yeasts in Milk and Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 744–753.
 28. Bukin, Y., Galachyants, Y., Morozov, I. et al. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data* 6, 190007 (2019).
 29. Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8.
 30. Carminati, D., & Tidona, F. (2017). Nutritional Value and Potential Health Benefits of Donkey Milk. *Nutrients in Dairy and Their Implications on Health and Disease*, 407–414.
 31. Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M. E., Rossetti, L., Meucci, A., & Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Letters in Applied Microbiology*, 59(3), 299–305.
 32. Cavallarín, L., Giribaldi, M., Soto-Del Rio, M. de los D., Valle, E., Barbarino, G., Gennero, M. S., & Civera, T. (2015). A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in North Western Italy. *Food Control*, 50, 230–235.
 33. Chauhan, N. S. (2019). Metagenome analysis and interpretation. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, 139–160.

34. Chiofalo, B., Paolo Polidori, P. & Silvia Vincenzetti, S. (2015). Milk Production and Characteristics of the Milk of the Jenny. *Current Donkey Production & Functionality*. 5: 1-11.
35. Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188–201.
36. Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 29–43.
37. Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science*, 89(3).
38. Colabella, C., Corte, L., Roscini, L., Bassetti, M., Tascini, C., Mellor, J. C., ... Cardinali, G. (2018). NGS barcode sequencing in taxonomy and diagnostics, an application in “Candida” pathogenic yeasts with a metagenomic perspective. *IMA Fungus*, 9(1), 91–111.
39. Conte, F. & Passantino, A. (2009). Guidelines for physical, chemical and hygienic quality and safety control of donkey’s milk. *Milchwissenschaft* 2009, 64, 85–88.
40. Coppola R, Salimei E, Succi M, et al. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*.;52(1):55-60.
41. Das, D., & Goyal, A. (2011). Lactic Acid Bacteria in Food Industry. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, 757–772.
42. De Filippis, F., Laiola, M., Blaiotta, G., & Ercolini, D. (2017). Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17).
43. De Filippis, F., Parente, E., & Ercolini, D. (2018). Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 589–608
44. Derdak, R., Pop, O.L., Sakoui, S., Muresan, C., Vodnar, D.C., Addoum, B., Suharoschi, R., Vulturar, R., Soukri, A. & El Khalfi, B. (2020). Donkey Milk Bioactive Proteins and Peptides, Health and Food Applications – A review. Preprints 2020.
45. Devi. S., Ghandi., K., Rana. S., Arora., S & Kapila, S. (2018). Donkey Milk: A Very Recent Nutritional 'Pharmafood". *Indian Dairyman*.72-77.
46. Donelli, G., Vuotto, C., & Mastromarino, P. (2013). Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 24(0).
47. Donini, P., Cooke, R. J., & Reeves, J. C. (2000). Molecular Markers in Variety and Seed Testing. *Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium, Proceedings of the International Symposium on Plant Genetic Engineering*, 27–34.
48. El Helou, G., & Palavecino, E. (2017). *Candida pararugosa*: First Reported Bloodstream Infection in an Adult. *Cureus*, 9(5).
49. Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3148–3155.
50. Estévez, M., Padilla, P., Carvalho, L., Martín, L., Carrapiso, A., & Delgado, J. (2019). Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins. *Redox Biology*, 101277.
51. FAO. (2018). Milk Facts. Διαθέσιμο στο <http://www.fao.org/3/I9966EN/i9966en.pdf> [Τελευταία ανάκτηση 15/10/2020].
52. FAO. (2020). Gateway to dairy production and products. Διαθέσιμο στο <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/> [Τελευταία ανάκτηση 15/10/2020].

53. Faye, B. (2016). Food Security and the Role of Local Communities in Non-cow Milk Production. *Non-Bovine Milk and Milk Products*, 1–13.
54. Fijan S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>.
55. Fleet, G.H. (1990). A Review: Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*.68, 199-211.
56. Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339–354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6.
57. Franz, C. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 105–122.
58. Frisvad, J. C. (2014). PENICILLIUM | *Penicillium/Penicillia* in Food Production. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 14–18.
59. Fröhlich-Wyder, Marie-Therese (2003). Yeasts in Food || Yeasts in dairy products. 209–237.
60. Fry, J.C. (2004). Chapter 8: Culture-Dependent Microbiology. *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Alan T. Bull. ASM Press, Washington, D.C.
61. Gastaldi D, Bertino E, Monti G, Baro C, Fabris C, Lezo A, Medana C, Baiocchi C, Mussap M, Galvano F, Conti A. Donkey's milk detailed lipid composition. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010 Jan 1;2:537-46.
62. Gemechu, T. (2015). “Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation.” *Australian Journal of French Studies* 9: 170-175.
63. Gethins, L., Rea, M. C., Stanton, C., Ross, R. P., Kilcawley, K., O’Sullivan, M., ... Morrissey, J. P. (2016). Acquisition of the yeast *Kluyveromyces marxianus* from unpasteurised milk by a kefir grain enhances kefir quality. *FEMS Microbiology Letters*, 363(16).
64. Gharsa, H., Slama, KB., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Klibi, N., Zarazaga, M., Boudabous, A. & Torres C. (2015). Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Vet J*; 47(4):463-6.
65. Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42(5-6), 577–587.
66. Giacometti, F., Bardasi, L., Merialdi, G., Morbarigazzi, M., Federici, S., Piva, S., & Serraino, A. (2016). Shelf life of donkey milk subjected to different treatment and storage conditions. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4291–4299.
67. Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 391–398.
68. Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, 6.
69. Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 32(1), 169–174.
70. Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Apr;13(2):121-128.
71. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.

72. Hegde, N. G. (2019). Buffalo Husbandry for Sustainable Development of Small Farmers in India and other Developing Countries. *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*, 3(1), 1-20.
73. Heintl S, Grabherr R. Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri*-A show case. *J Biotechnol*. 2017 Sep 10;257:61-69.
74. Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72.
75. Hiett, K. L., & Seal, B. S. (2009). Use of Repetitive Element Palindromic PCR (rep-PCR) for the Epidemiologic Discrimination of Foodborne Pathogens. *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, 49–58.
76. Hiraoka, S., Yang, C., & Iwasaki, W. (2016). Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. *Microbes and Environments*, 31(3), 204–212.
77. Hocking, A. D. (2014). SPOILAGE PROBLEMS | Problems Caused by Fungi. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 471–481.
78. Hollister, E. B., Brooks, J. P., & Gentry, T. J. (2015). Nucleic Acid-Based Methods of Analysis. *Environmental Microbiology*, 271–305.
79. Holloway A. (2014). Donkey milk: Ancient elixir of life experiences modern-day resurgence Διαθέσιμο στο <https://www.ancient-origins.net/news-general/donkey-milk-ancient-elixir-life-experiences-modern-day-resurgence-002502>. [Τελευταία ανάκτηση 18/10/2020].
80. Holzapfel, Wilhelm & Haberer, Petra & Geisen, Rolf & Björkroth, Katri & Schillinger, Ulrich. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*.
81. Horbańczuk, O. K., Kurek, M. A., Atanasov, A. G., Brnčić, M., & Rimac Brnčić, S. (2019). The Effect of Natural Antioxidants on Quality and Shelf Life of Beef and Beef Products. *Food technology and biotechnology*, 57(4), 439–447.
82. Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40(1), 87–109.
83. Jacob JJ, Veerarahavan B, & Vasudevan K. (2019). Metagenomic next-generation sequencing in clinical microbiology. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 37(2):133-140.
84. Jany, J.-L., & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25(7), 839–848.
85. Jiang J, Bjoerck L, Fondén R, Emanuelson M. Occurrence of conjugated cis-9,trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J Dairy Sci*. 1996 Mar;79(3):438-45.
86. Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, BY. et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* 10, 5029 (2019)
87. Joint FAO/WHO Working Group Report (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ontario, Canada.
88. Kelly, M. L., Kolver, E. S., Bauman, D. E., Van Amburgh, M. E., & Muller, L. D. (1998). Effect of Intake of Pasture on Concentrations of Conjugated Linoleic Acid in Milk of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1630–16367.
89. Khalid., K. (2011) An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1:1-13.

90. Khan IT, Bule M, Ullah R, Nadeem M, Asif S, Niaz K (2019b) The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food, *Veterinary World*, 12(1): 12-33.
91. Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019a). Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1).
92. Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts: BI*, 5(3), 123–127 <https://doi.org/10.15171/bi.2015.20>.
93. Kilian, M., & Steiner, U. (2003). DISEASE | Bactericides and Fungicides. *Encyclopedia of Rose Science*, 190–198.
94. Koutb, Mostafa & Khider, Manal & Ali, Esam & Husein, Nemmat. (2016). Antimicrobial Activity of Donkey Milk against Dermatofungal Fungi and Foodborne Bacteria. *International Journal of Biomedical Materials Research*. 4. 11-17.
95. Laupland, K. B., & Valiquette, L. (2013). The Changing Culture of the Microbiology Laboratory. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 24(3), 125–128.
96. Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, 41–67.
97. Li, L., Liu, X. & Guo, H. The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. *Food Sci Biotechnol* 27, 393–400 (2018).
98. Li, L., Liu, X., & Guo, H. (2017). *The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. Food Science and Biotechnology*.
99. Li, W., Pickard, M. D., & Beta, T. (2007). Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran. *Food Chemistry*, 104(3), 1080–1086.
100. Lindmark-Månsson, H., & Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1).
101. Liu, F., Li, B., Du, J., Yu, S., Li, W., Evivie, S. E., Ding X., Min Xu, X. & Huo, G. (2016). Complete genome sequence of *Enterococcus durans* KLDS6.0930, a strain with probiotic properties. *Journal of Biotechnology*, 217, 49–50.
102. Longodor, Adina & Vioara, Mireşan & Codea, Răzvan & Răducu, Camelia & Andronie, Luisa & Marchis, Zamfir & Balta, Igori & Mariş, Codruţa & Coroian, Aurelia. (2019). Antioxidant capacity in donkey milk (*equus asinus*) depending on lactation. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XXIII. 182-186.
103. Longodor, Adina & Vioara, Mireşan & Codea, Răzvan & Răducu, Camelia & Andronie, Luisa & Marchis, Zamfir & Balta, Igori & Mariş, Codruţa & Coroian, Aurelia. (2019). Antioxidant capacity in donkey milk (*equus asinus*) depending on lactation. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XXIII. 182-186.
104. Lopez-Brea, S. G., Gómez-Torres, N., & Arribas, M. Á. (2017). Spore-forming bacteria in dairy products. *Microbiology in Dairy Processing*, 11–36.
105. Luoyizha, W., Wu, X., Zhang, M., Guo, X., Li, H. & Liao, X. (2020). Compared analysis of microbial diversity in donkey milk from Xinjiang and Shandong of China through High-throughput sequencing, *Food Research International*
106. M. Kumar, R. Kumar, A. Sharma & V.K. Jain (2007) Investigations on Prevalence and Oxidative Stress Aspects of Mastitis in Buffaloes, *Italian Journal of Animal Science*, 6:sup2, 978-979.
107. Maciel, Natalia & Johann, Susana & Brandao, Luciana & Kucharikova, Sona & Gontijo de Morais, Camila & Oliveira, Alexandre & Freitas, Gustavo & Borelli, Beatriz & Pellizzari, Franciane & Santos, Daniel & Van Dijck, Patrick & Rosa, Carlos. (2019). Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

114. Madhusudan, N. C., Ramachandra, C. T., Udaykumar, N., Sharnagouda, N., Nagraj, N. & Jagjivan, R. (2017). Composition, Characteristics, Nutritional value and Health Benefits of Donkey Milk-A Review. Dairy Science & Technology, EDP sciences/Springer.
108. Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., Manouras, A., Aspri, M., Nikolopoulou, A., Giannopoulou, A. & Arvanitoyannis, I. S. (2015). Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. International Journal of Dairy Technology, 69(1), 143–146.
109. Marcelino, J. (2013). Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes.
110. Marletta, D., Tidona, F. & Bordonaro, S. (2016). Donkey Milk Proteins: Digestibility and Nutritional Significance. Isabel Gigli. Milk Proteins- From Structure to Biological Properties and Health Aspects. 10: 200-209.
111. Martemucci, G. & D'Alessandro, A.G. (2012). Fat content, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition. Lipids Health Disease 11: 113.
112. Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. Journal of Dairy Science, 101(1), 861–870.
113. Martin, N. H., Trmčić, A., Hsieh, T.-H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. Frontiers in Microbiology, 7.
114. Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R. & Salari, F. (2018). Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. Journal of Equine Veterinary Science 65: 33-37.
115. Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R., & Salari, F. (2017). Nutritional and Nutraceutical Quality of Donkey Milk. Journal of Equine Veterinary Science, 65, 33–37.
116. Martini, M., Altomonte, I., Manica, E., & Salari, F. (2015). Changes in donkey milk lipids in relation to season and lactation. Journal of Food Composition and Analysis, 41, 30–34.
117. Mehta, S. K., & Gowder, S. J. T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress.
118. Mercenier, A., Pavan, S., & Pot, B. (2003). Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects. Current Pharmaceutical Design, 9(2), 175–191.
119. Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). Enterobacter cloacaecomplex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiology, 7(7), 887–902.
120. Michel, J., Maubon, D., Varoquaux, D.A., Boulze, C., Normand, A.C., Righini, C.A., Piarroux, R., Dessi, P. & Ranque, S. (2016). Schizophyllum commune : an emergent or misdiagnosed fungal pathogen in rhinology? , Medical Mycology, Volume 54, Issue 3, 301–309
121. Microbe notes. (2019). Pour Plate Technique- Procedure, Advantages, Limitations Διαθέσιμο στο:<https://microbenotes.com/pour-plate-technique-procedure-significance-advantages-limitations/> [Τελευταία ανάκτηση 8/11/2020].
122. Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal Escherichia coliform for humans, poultry and wild birds. FEMS Microbiology Letters, 277(1), 98–106.
123. Neviani, E., Carminati, D., Veaux, M., Hermier, J. & Giraffa, G. Characterization of lactobacillus helveticus strains resistant to lysozyme. Le Lait. 1991, 71(1), 65–73.

124. Nigro, O. D., & Steward, G. F. (2015). Differential specificity of selective culture media for enumeration of pathogenic vibrios: Advantages and limitations of multi-plating methods. *Journal of Microbiological Methods*, 111, 24–30. doi:10.1016/j.mimet.2015.01.014
125. Nita, M & Grzybowski, A. "The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 3164734, 23 pages, 2016.
126. Novac CS, Andrei S. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. *Pathogens*. 2020; 9(11):882
127. Novac, C.S. & Andrei, S. (2020). The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. *Pathogens*. 9, 882.
128. Oğuzhan, P., & Yangilar, F. (2013). Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science*, 4, 57-63.
129. Papademas, P., Aspri, M., Mariou, M., Dowd, S. E., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2019). Conventional and omics approaches shed light on Halitzia cheese, a long-forgotten white-brined cheese from Cyprus. *International Dairy Journal*.
130. Papademas, P., Kamilari, E., Aspri, M., Anagnostopoulos, D., Mousikos, P., Kamilaris, A., & Tsaltas, D. (2020). Investigation of the Cyprus donkey milk bacterial diversity by 16SrDNA high-throughput sequencing in a Cyprus donkey farm. *Journal of dairy science*.
131. Park, S. D., Uh, Y., Jang, I. H., Yoon, K. J., Kim, H. M., & Bae, Y. J. (2010). *Rhodococcus erythropolis* septicaemia in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 252–255.
132. Perin, L. M., Pereira, J. G., Bersot, L. S., & Nero, L. A. (2019). The Microbiology of Raw Milk. *Raw Milk*, 45–64.
133. Peter G, Mounier J, Garnier L, Soos D & Dlauchy D. *Cutaneotrichosporon suis* sp. nov., a lipolytic yeast species from food and food-related environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019 Aug;69(8):2367-2371 Pilla R, Daprà V, Zecconi A, Piccinini R. Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *J Dairy Res*. 2010.
134. Polidori, P., Beghelli, D., Mariani, P., & Vincenzetti, S. (2009). Donkey milk production: state of the art. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup2), 677–683.
135. Prasad, B. (2020). Nutritional and Health Benefits of Donkey Milk. *J Food Science and Nutrition Therapy* 6(1).
136. Purdel, N.C., Margina, D. & Ilie, M. (2014). *Annual Research & Review in Biology*, Vol.: 4, Issue.: 12, 2015-2026.
137. Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2-3), 81–94.
138. Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698.
139. Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic J, de Bruijn FJ. (2004) Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk, G.A.; de Bruijn, F.J.; Head, I.M.; Akkermans, A.D.; van Elsas, J.D. (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Chapter 5.3.2, pp. 1-33.

140. Rampadarath, S., Puchooa, D., & Bal, S. (2015). Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 412–417.
141. Randazzo, Cinzia & Restuccia, Cristina & Mancini, Andrea & Muccilli, Serena & Gatti, Monica & Caggia, Cinzia. (2016). Ragusana Donkey Milk as a Source of Lactic Acid Bacteria and Yeast Strains of Dairy Technological Interest. *International Journal of Dairy Science & Processing*. 38-46.
142. Rausch, P., Rühlemann, M., Hermes, B.M. et al. (2019). Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome* 7, 133.
143. Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klemková, T. (2017). Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 22(11), 1988.
144. Rezene Y, Tesfaye K, Clare M, Male A, Gepts P (2018) Rep-PCR Genomic Fingerprinting Revealed Genetic Diversity and Population Structure among Ethiopian Isolates of *Pseudocercospora griseola* Pathogen of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Plant Pathol Microbiol* 9: 463.
145. Róžańska, H., Lewtak-Piłat, A., Kubajka, M., & Weiner, M. (2019). Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance. *Journal of veterinary research*, 63(1), 93–97.
146. Russo, P., Fiocco, D., Albenzio, M., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). Microbial Populations of Fresh and Cold Stored Donkey Milk by High-Throughput Sequencing Provide Indication for A Correct Management of This High-Value Product. *Applied Sciences*, 10(7), 2314.
147. Salimei, E., & Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24(2), 130–142.
148. Salimei, Elisabetta & Fantuz, Francesco & Coppola, Raffaele & Chiofalo, Biagina & Polidori, Paolo & Varisco, Giorgio. (2004). Composition and characteristics of ass'milk.
149. Šarić, L. Ć., Šarić, B. M., Mandić, A. I., Torbica, A. M., Tomić, J. M., Cvetković, D. D., & Okanović, Đ. G. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, 25(2), 142–146.
150. Sarno, E., Santoro, A. M. L., Di Palo, R., & Costanzo, N. (2012). Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. *Italian Journal of Animal Science*, 11(3).
151. Schwarez J. (2017). Leave the Donkey Milk to the Donkeys. Διαθέσιμο στο <https://www.mcgill.ca/oss/article/health-history/leave-donkey-milk-donkeys>. [Τελευταία ανάκτηση 18/10/2020].
152. Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6)
153. Shalaby, A. & Shanab, S.M.M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528–539.
154. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., & Leitner, G. (2014). Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3449–3455.
155. Soto del Rio, M. de los D., Andrighetto, C., Dalmasso, A., Lombardi, A., Civera, T., & Bottero, M. T. (2016). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from donkey milk. *Journal of Dairy Research*, 83(03), 383–386.

156. Soto del Rio, M. de los D., Dalmasso, A., Civera, T., & Bottero, M. T. (2017). Characterization of bacterial communities of donkey milk by high-throughput sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 67–72.
157. Spinnler, H.-E., & Gripon, J.-C. (2004). Surface mould-ripened cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 157–174.
158. Statista. (2019). Major producers of cow milk worldwide in 2019, by country. Διαθέσιμο στο: <https://www.statista.com/statistics/268191/cow-milk-production-worldwide-top-producers/>
159. Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.-Q., & Yang, J. (2011). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 993–1003.
160. Suscovic, J., Kos, B., Beganovic, G., Pavunc, A.L., Habjanic, Ks. & Matosic, S (2010). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 296–307.
161. Tabanelli, G., Verardo, V., Pasini, F., Cavina, P., Lanciotti, R., Caboni, M. F., Montanari, C. (2016). Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 120–129. doi:10.3168/jds.2015-10084.
162. Tang, Y.-W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E., & Persing, D. H. (1998). Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Aerobic Pathogenic Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3674–3679.
163. Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1), 3.
164. Toldra, F. (2011). Improving the sensory quality of cured and fermented meat products. *Processed Meats*, 508–526.
165. Tsiplakou, E., Kotrotsios, V., Hadjigeorgiou, I., & Zervas, G. (2010). Differences in sheep and goats milk fatty acid profile between conventional and organic farming systems. *Journal of Dairy Research*, 77(03), 343–349
166. Tsiplakou, E., Mitsiopoulou, C., Mavrommatis, A., Karaiskou, C., Chronopoulou, E. G., Mavridis, G., ... Zervas, G. (2017). Effect of under- and overfeeding on sheep and goat milk and plasma enzymes activities related to oxidation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), e288–e298.
167. Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992.
168. Uniacke-Lowe, T., & Fox, P. F. (2011). Milk | Equid Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 518–529.
169. Velázquez-Ordoñez, V., Valladares-Carranza, B., Tenorio-Borroto, E., Talavera-Rojas, M., Antonio Varela-Guerrero, J., Acosta-Dibarrat, J., ... Pareja, L. (2019). Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. *Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time*.
170. Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., ... Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32–44.
171. Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. (2014). Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19(1), 17–29. doi:10.1007/s00792-014-0704-3.
172. Vincenzetti S, Amici A, Pucciarelli S, Vita A, Micozzi D, et al. (2012) A Proteomic Study on Donkey Milk. *Biochem Anal Biochem* 1:109.

173. West, T. P. (2000). Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253. *Journal of Basic Microbiology*, 40(5-6), 397–401
174. Wang, J., Lei, B., Yan, J., Li, J., Zhou, X., Ren, F., & Guo, H. (2019). Donkey milk oligosaccharides influence the growth-related characteristics of intestinal cells and induce G2/M growth arrest via the p38 pathway in HT-29 cells. *Food & Function*.
175. Wrent, P., Rivas, E. M., Gil de Prado, E., Peinado, J. M., & de Silóniz, M. I. (2014). *Debaryomyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 563–570.
176. Yang, F.L. & Li, X.S. & He, B.X. & Yang, X.L. & Li, G.H. & Liu, P. & Huang, Q.H. & Pan, X.M. & Li, J.. (2011). Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk. *African Journal of Biotechnology*.
177. Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., ... Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645.
178. Yu Li, Di Chen, Jing Li, Xue-Xi Zhang, Cun-Fang Wang & Jian-Min Wang (2018) Changes in superoxide dismutase activity postpartum from Laoshan goat milk and factors influencing its stability during processing, *Italian Journal of Animal Science*, 17:4, 835-844.
179. Zhang, X.-Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M.-L., & Ren, F.-Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 19(12), 1191–1195.
180. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020 Apr;70(4):2782-2858.
181. Zhenjiang Ding, Qichao Wei, Chunjiang Zhang, Hong Zhang, Feng Huang, Influence of oxidation on heat shock protein 27 translocation, caspase-3 and calpain activities and myofibrils degradation in postmortem beef muscles, *Food Chemistry*, 10.1016/j.foodchem.2020.127914, 340, (127914), (2021).
182. Zigo, F., Elecko, J., Vasil, M., Ondrasovicova, S., Farkasova, Z., Malova, J., ... Timkovicova-Lackova, P. (2019). The occurrence of mastitis and its effect on the milk malondialdehyde concentrations and blood enzymatic antioxidants in dairy cows. *Veterinárni Medicína*, 64(No. 10), 423–432.
183. Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Denić, M., Kocić, G., & Jovanović, T. (2015). Antioxidants and Antioxidant Capacity of Human Milk / Antioksidansi i antioksidativni kapacitet humanog mLeKa. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 32(2), 115–125.

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

184. Γύπας, Φ., & Μέντης, Α. Φ. (2014). Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου – μεταγονιδιωματική 59: (2).
185. Καμινारीδης, Σ. & Μοάτσου. Γκ. (2009). Γαλακτοκομία. Έμβρυο.
186. Μάντης Α. Ι. (2018). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Αφοί Κυριακίδη Εκδόσεις Α.Ε.
187. Μηνιώτη, Α.Σ. 2009. Διδακτορική διατριβή: Ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και εφαρμογή στο ελαιόλαδο.

188. Οικονομόπουλος, Ι. no date. Τροφιμογενείς λοιμώξεις. Διαθέσιμο στο: https://www.aua.gr/biosafetyoffoods/salmonella_gr.html. [Τελευταία ανάκτηση 5/11/2020].
189. Παλαιολόγου, Δ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις Γενετικής του ανθρώπου” – Στον υπολογιστή και στον πάγκο. Κεφάλαιο 8: Ηλεκτροφόρηση DNA. Διαθέσιμο στο: <https://www.openbook.gr/ergastiriakes-askiseis-genetikis-tou-anthrwpou/>
190. Σαμολάδα, Μ. & Κουτσομάνης, Κ. 2014. Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας. ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ. Εργαστήριο 6^ο: Τεχνικές χρώσεων - Χρώση Gram.

6.3 Ιστοσελίδες

191. latte.history.gr
192. eody.gov.trofimogeni-nosimata.gr
193. aua.biosafetyoffoods.microbies.gr
194. Natural.History.Notebooks.gr

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χρώση Gram

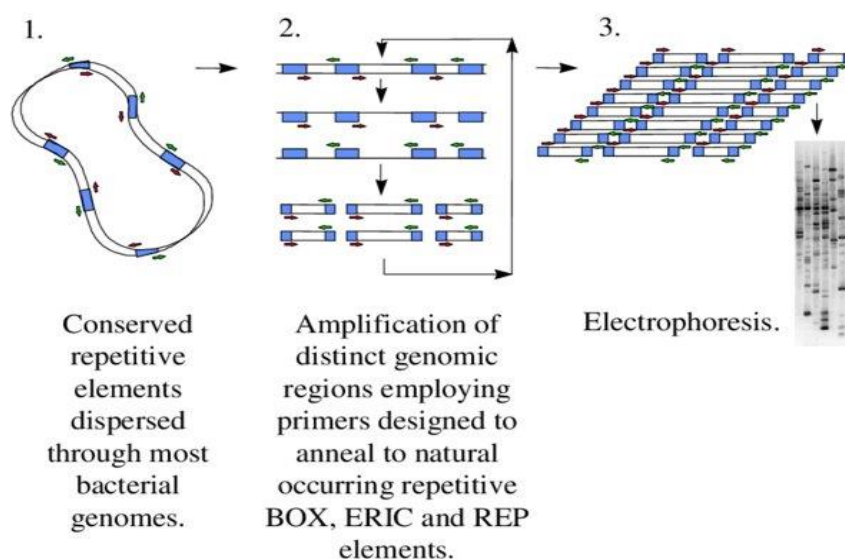
Η χρώση Gram επινοήθηκε από το Δανό ιατρό Hans Christian Joachim Gram το 1884 και είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική χρώσης των βακτηρίων. Μετά το πέρας της διαδικασίας της χρώσης τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram θετικά βακτήρια (ιώδη) και Gram αρνητικά βακτήρια (κόκκινα). Ο διαφορετικός αυτός χρωματισμός οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικά κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από πολλές στοιβάδες πεπτιδογλυκανίου και χαρακτηρίζεται από απουσία εξωτερικής μεμβράνης. Έτσι, με την επίδραση της αιθανόλης, συστέλλονται οι πόροι του παχέος στρώματος του πεπτιδογλυκανίου και το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου συγκρατείται στο κύτταρο και εμφανίζεται ιώδες. Αντίθετα το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων περιλαμβάνει μία λεπτή στρώση πεπτιδογλυκανίου, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ μίας εξωτερικής και μίας εσωτερικής μεμβράνης. Με την επίδραση της αιθανόλης, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται προκαλώντας την αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και την αύξηση της διαπερατότητας της. Ως αποτέλεσμα το σύμπλοκο της χρωστικής μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί αποχρωματίζοντας το κύτταρο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται με τη δεύτερη χρωστική αποκτώντας έτσι κόκκινο χρώμα (Σαμολάδα & Κουτσουμάνης, 2014).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη χρώση Gram είναι η εξής:

1. Προετοιμασία δειγμάτων: Μεταφορά 1,5 mL από την υγρή καλλιέργεια σε erpendorf. Φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 3 min στους 25 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Μεταφορά 20 μl από το ίζημα σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλή εξάπλωση.
2. Χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet, Sigma) για 1 min και έκπλυση με απιονισμένο νερό.
3. Χρώση με ιώδιο (Lugol, Sigma) για 1 min και έκπλυση με απιονισμένο νερό.
4. Αποχρωματισμός με αιθανόλη και κατευθείαν έκπλυση με απιονισμένο νερό.
5. Προσθήκη σαφρανίνης (Safranin, Sigma), αναμονή για 1 min και έκπλυση με απιονισμένο νερό.

rep-PCR

Κατά την τεχνική Repetitive Sequence Based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) γίνεται ενίσχυση τμημάτων του DNA που βρίσκονται μεταξύ συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, διασκορπισμένων κατά μήκος του βακτηριακού γονιδιώματος (Rampadarath *et al.*, 2015) (Εικόνα 18). Στη συνέχεια, τα ενισχυμένα θραύσματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μέσω της οποίας δημιουργείται ένα χαρακτηριστικό γενετικό αποτύπωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση ακόμα και σε επίπεδο στελεχούς (Hiatt & Siel, 2009). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι παρόλο που οι εκκινητές της rep-PCR αναπτύχθηκαν για τις επαναλαμβανόμενες συντηρημένες αλληλουχίες των προκαρυωτικών γονιδιωμάτων, έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία και σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα (Rezene *et al.*, 2018). Οι μέθοδοι rep-PCR που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι: REP-PCR (repetitive extragenic palindromic), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus), BOX-PCR, και (GTG)₅-PCR (Mohapatra *et al.*, 2007).



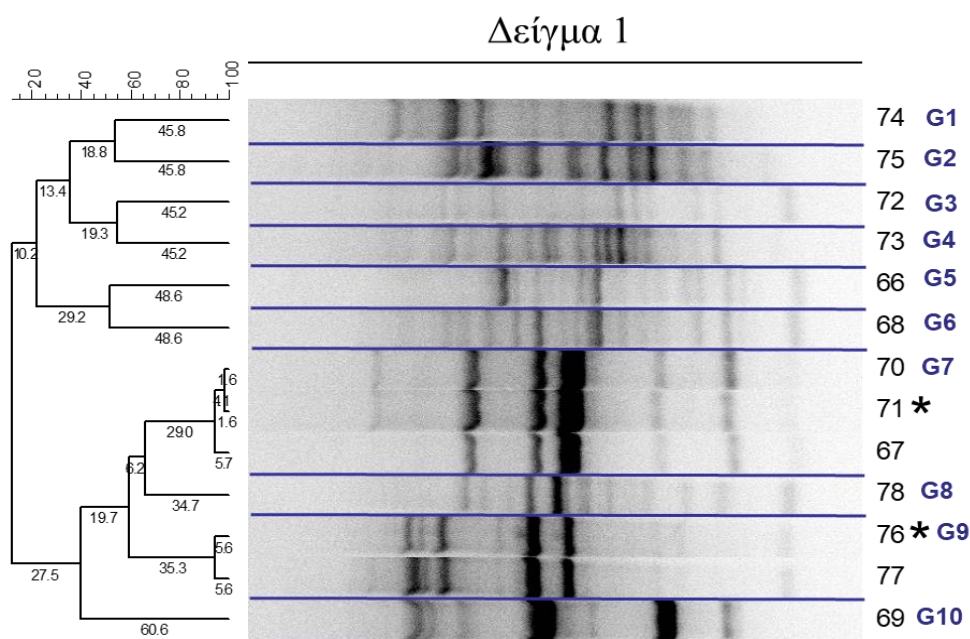
Εικόνα 18: Τεχνική της rep-PCR (Πηγή: Rademaker *et al.*, 2004)

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική ηλεκτροφόρησης. Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στην κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων υπό από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Μέσα σε ένα

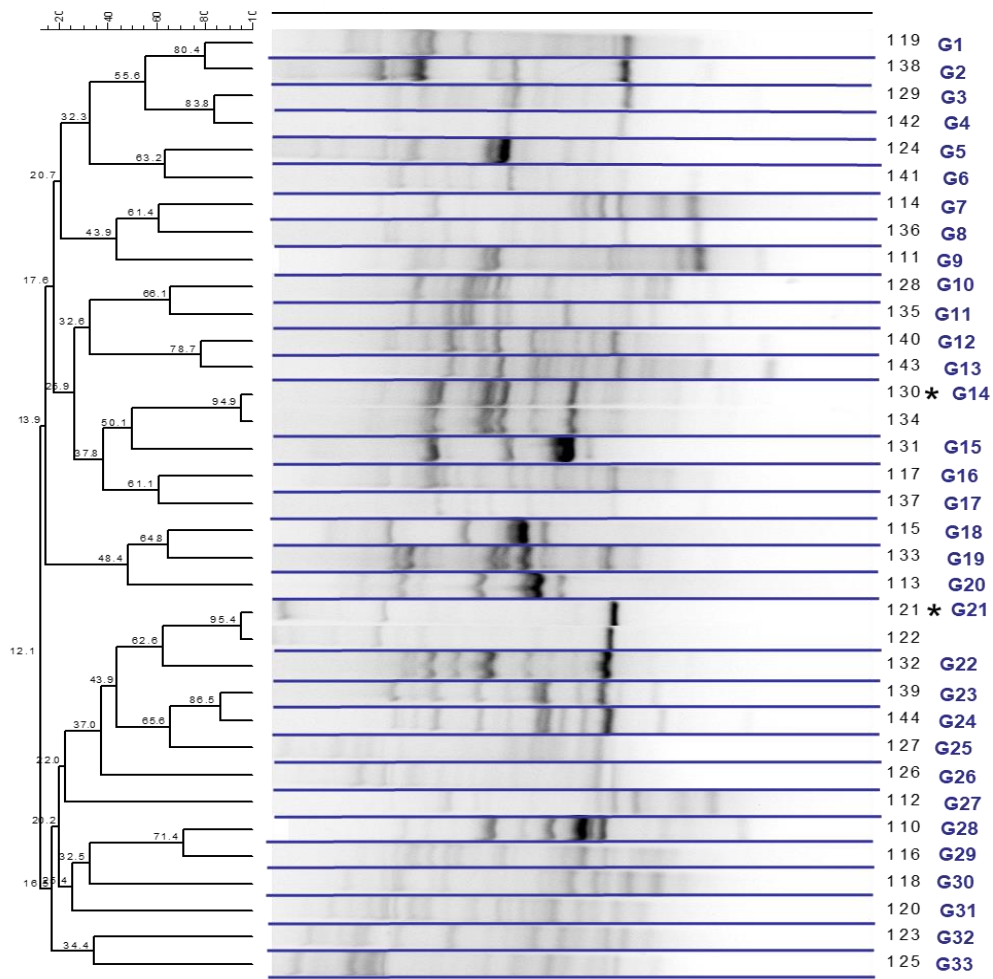
ηλεκτρικό πεδίο τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τον ένα ή τον άλλο πόλο με διαφορετικές ταχύτητες, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, τα μόρια DNA, τα οποία είναι φορτισμένα αρνητικά σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων του φωσφοδιεστερικού σκελετού, κινούνται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Για την οπτικοποίησή τους είναι απαραίτητη η χρήση χρωστικών. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που χρησιμοποιείται ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Με την έκθεση των μορίων DNA σε υπεριώδη ακτινοβολία, αυτά φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζει το βρωμιούχο αιθίδιο όταν ενσωματώνεται στην έλικα του DNA (Παλαιολόγου, 2015).

Δενδρογράμματα *rep*-PCR ανά δείγμα για τις βακτηριακές απομονώσεις



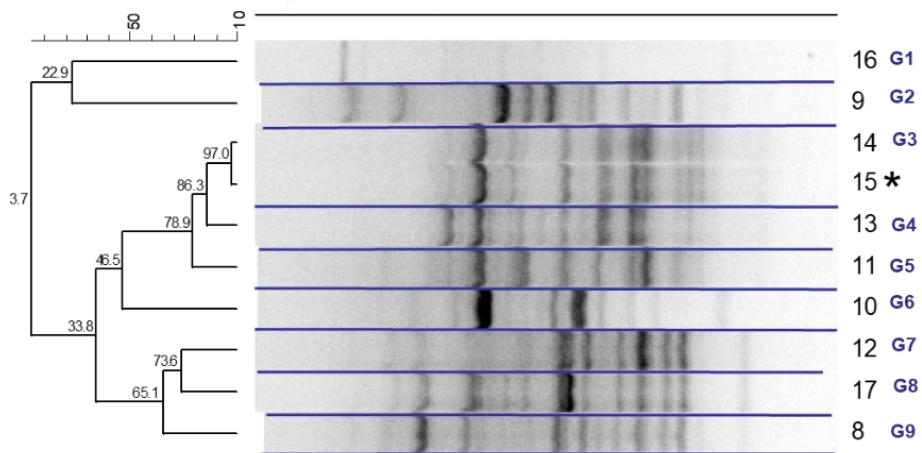
Εικόνα 19: Δενδρογράμμα δείγματος 1

Δείγμα 2

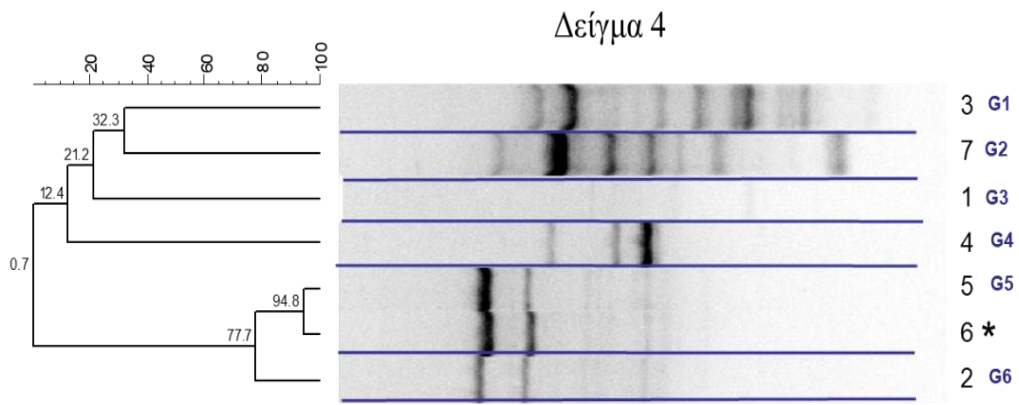


Εικόνα 20: Δενδρογράμμα δείγματος 2

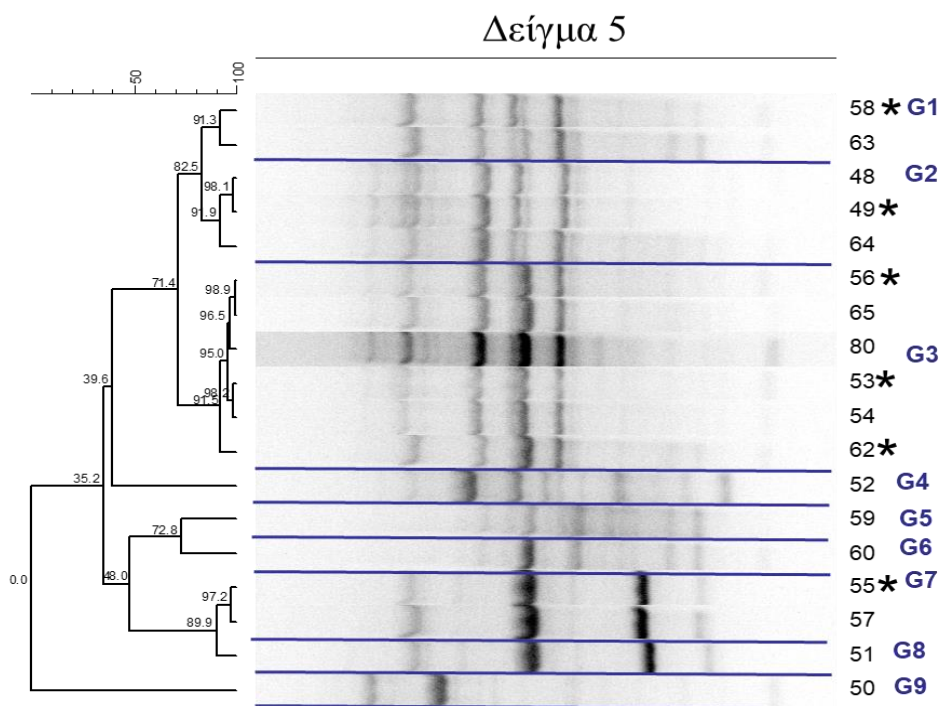
Δείγμα 3



Εικόνα 21: Δενδρογράμμα δείγματος 3

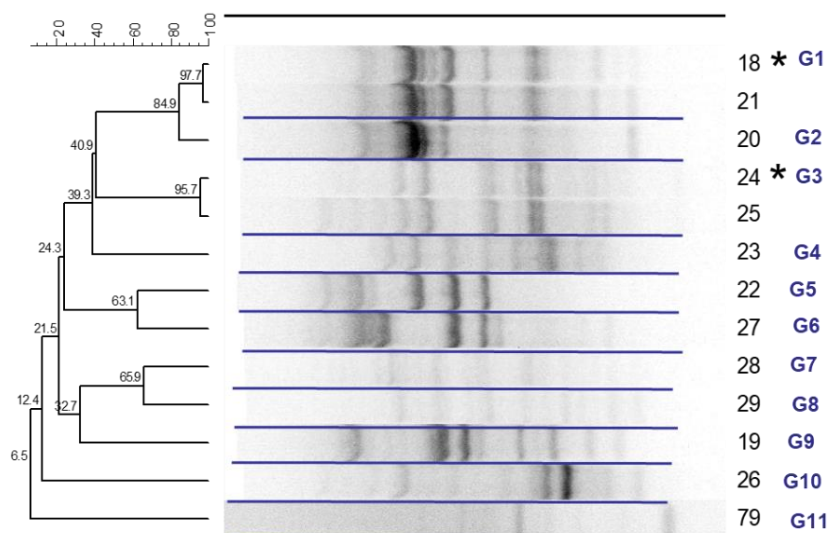


Εικόνα 22: Δενδρόγραμμα δείγματος 4



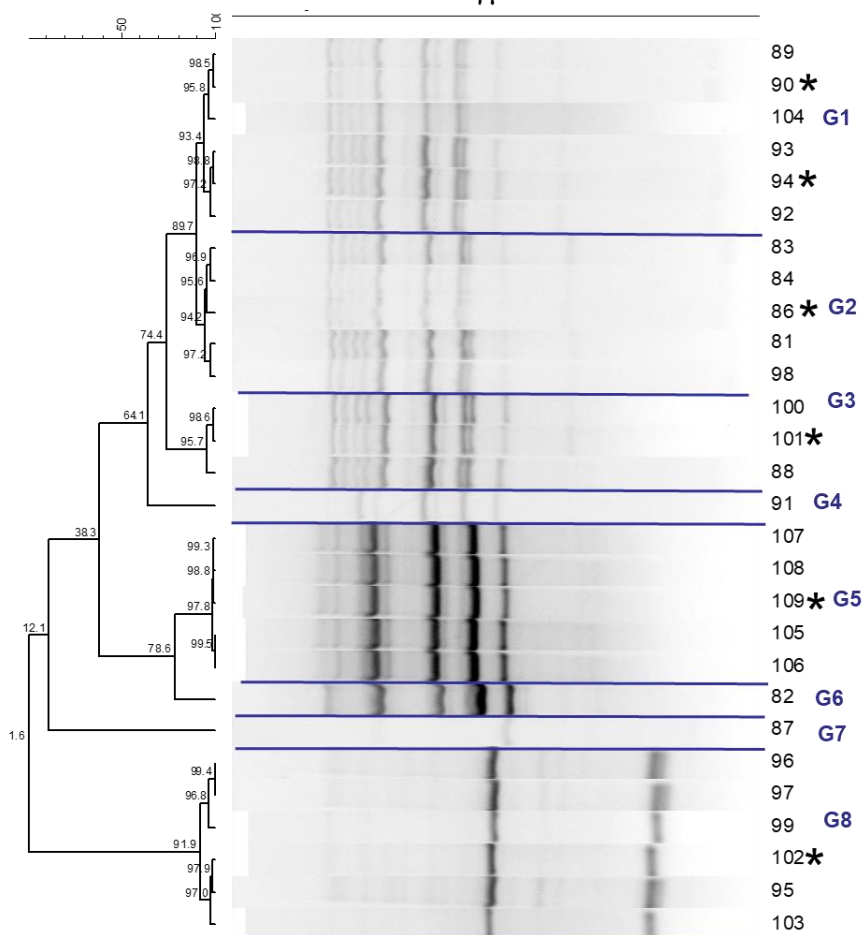
Εικόνα 23: Δενδρόγραμμα δείγματος 5

Δείγμα 6



Εικόνα 24: Δενδρόγραμμα δείγματος 6

Δείγμα 7



Εικόνα 25: Δενδρόγραμμα δείγματος 7