



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση μικροβιώματος, προσδιορισμός προφίλ λιπαρών οξέων και
ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος αίγειου γάλακτος από Ελληνικές
φάρμες



Παναγιώτα Η. Κυριακάκη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2021**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση μικροβιώματος, προσδιορισμός προφίλ λιπαρών οξέων και
ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος αίγειου γάλακτος από Ελληνικές
φάρμες

“Microbiome research, determination of fatty acid profile and analysis of
antioxidant system of goat milk from Greek farms”

Παναγιώτα Η. Κυριακάκη

Εξεταστική Επιτροπή:

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Ελένη Τσιπλάκου, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αναστάσιος Ακτύπης, Λέκτορας ΓΠΑ

Διερεύνηση μικροβιώματος, προσδιορισμός προφίλ λιπαρών οξέων και ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος αίγειου γάλακτος από Ελληνικές φάρμες

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων: Γαλακτοκομία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην Ελλάδα, η εκτροφή αιγοπροβάτων θεωρείται ένας από τους δυναμικότερους κλάδους της αγροτικής οικονομίας τόσο από άποψη απασχόλησης όσο και συνολικού εισοδήματος. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των εκτρεφόμενων αιγών αντιστοιχεί περίπου στο 31% του πληθυσμού της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.), καταδεικνύοντας τη σημαντικότητα του κλάδου. Το αίγιο γάλα αποτελεί ένα ιδιαίτερα θρεπτικό τρόφιμο για τους ανθρώπους, ειδικά για αυτούς που παρουσιάζουν ευαισθησία στο γάλα άλλων ζώων, ενώ υποστηρίζεται ότι έχει πιθανές ευεργετικές ιδιότητες στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 22 δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος που προήλθαν από φάρμες διαφορετικών περιοχών της Ελλάδας. Σκοπός της μελέτης ήταν (Α) η διερεύνηση του μικροβιώματος του νωπού αίγειου γάλακτος από φάρμες στην Ελλάδα μέσω κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης, σύγχρονων μοριακών μεθόδων και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης και (Β) ο προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων και η ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος του νωπού αίγειου γάλακτος. Βασικό στοιχείο πρωτοτυπίας της παρούσας ερευνητικής μελέτης αποτέλεσε ο συνδυασμός της κλασικής μικροβιολογικής και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης που επέτρεψε την πλήρη περιγραφή του μικροβιώματος του ελληνικού αίγειου γάλακτος. Ακόμη, βάσει βιβλιογραφίας, η ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε φυτά, φρούτα ή φυτικά εκχυλίσματα, και λιγότερο σε βιολογικά υγρά όπως το γάλα, ενώ οι σύγχρονες μοριακές αναλύσεις αφορούν κυρίως στο αγελαδινό γάλα, που είναι και το πλέον διαδεδομένο είδος γάλακτος. Για τον σκοπό της μελέτης, τα δείγματα αρχικά υποβλήθηκαν σε κλασική μικροβιολογική ανάλυση χρησιμοποιώντας επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης με σκοπό την καταμέτρηση πληθυσμών συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων [οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), ζύμες, εντεροβακτήρια και ψυχρότροφα βακτήρια]. Στη συνέχεια, τα πιθανά LAB και οι πιθανές ζύμες ομαδοποιήθηκαν με τη *ger*-PCR και τελικώς ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA ή της περιοχής ITS, αντίστοιχα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού DNA και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μεταγονιδιωματική ανάλυση αλληλούχησης αμπλικονίων προκειμένου να αξιολογηθεί η ποικιλομορφία τους σε βακτήρια και ζύμες/μύκητες. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών/μυκήτων βασίστηκε στην ενίσχυση και αλληλούχηση της περιοχής V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA και της περιοχής ITS1-ITS2, αντίστοιχα. Επιπλέον, στα δείγματα πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική ανάλυση, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε το προφίλ των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας ιονισμού φλόγας (FID). Τέλος, έγινε ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος των δειγμάτων που αφορούσε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP, ABTS, DPPH), τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (LPO, GR, GSH-Px, SOD, CAT) και τους οξειδωτικούς δείκτες (MDA, PC) του γάλακτος. Όσον αφορά στα αποτελέσματα (μέση τιμή) της καταμέτρησης των μικροβιακών πληθυσμών στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα, υψηλοί βρέθηκαν οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) (PCA 30°C), των πιθανών μεσόφιλων κόκκων

(M17 30°C) και των ψυχρότροφων (PCA 4°C) ($\approx 5,0, 4,6$ και $4,0 \log \text{ cfu/ml}$, αντίστοιχα). Η ταυτοποίηση των βακτηρίων μέσω της 16S-PCR και των ζυμών μέσω της ITS-PCR ανέδειξε την κυριαρχία των γενών LAB *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Leuconostoc* και των γενών *Candida* και *Saccharomyces*, αντίστοιχα. Τέλος, η μεταγονιδιωματική ανάλυση ανέδειξε τη μικροβιακή ποικιλομορφία μεταξύ των δειγμάτων, καθώς ανιχνεύθηκε πληθώρα γενών βακτηρίων (122) και ζυμών/μυκήτων (191). Κυρίαρχα γένη βακτηρίων, μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, αποτέλεσαν τα γένη LAB *Lactococcus* και *Streptococcus*, καθώς και το γένος *Pseudomonas*, ενώ κυρίαρχα γένη ζυμών/μυκήτων αποτέλεσαν τα γένη *Cryptococcus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* και *Trichosporon*. Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προφίλ των λιπαρών οξέων (Λ.Ο.) έδειξαν ότι μεταξύ των κορεσμένων Λ.Ο. (SFA) υψηλό ποσοστό κατέλαβαν τα Λ.Ο. μικρής ($C_{8:0}$ και $C_{10:0}$) και μεσαίας αλύσου ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$ και $C_{16:0}$), με το παλμιτικό ($C_{16:0}$) να αποτελεί το κυρίαρχο Λ.Ο. ($\approx 26\%$). Επιπλέον, μεταξύ των μονοακόρεστων Λ.Ο. (MUFA) κυριάρχησε το ελαϊκό ($C_{18:1 \text{ cis}9}$) ($\approx 20\%$), ενώ μεταξύ των πολυακόρεστων Λ.Ο. (PUFA) το λινελαϊκό οξύ ($C_{18:2 \text{ n}6c}$) ($\approx 2,5\%$). Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος και συγκεκριμένα η συγκέντρωση των προϊόντων της οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (MDA και PC, αντίστοιχα) παρουσίασε διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, δίνοντας μία εικόνα για την οξειδωτική σταθερότητα κάθε δείγματος γάλακτος και συνεπώς της ποιότητάς τους.

Επιστημονική περιοχή: Ποιότητα γάλακτος

Λέξεις κλειδιά: αίγιο γάλα, κλασική μικροβιολογική ανάλυση, μεταγονιδιωματική ανάλυση, προφίλ λιπαρών οξέων, αντιοξειδωτικό σύστημα

Microbiome research, determination of fatty acid profile and analysis of antioxidant system of goat milk from Greek farms

MSc in Current Food Technology: Dairy Science

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Dairy Research

ABSTRACT

In Greece, sheep and goat breeding is considered one of the most dynamic sectors of the agricultural economy both in terms of employment and total income. In particular, the population of farmed goats corresponds to about 31% of the population of the European Union (E.U.), demonstrating the importance of this sector. Goat milk is a highly nutritious food for humans, especially those who are sensitive to the milk of other animals, and it is claimed to have potentially beneficial properties in the treatment of various diseases. In the present study, 22 raw goat milk samples from farms in different regions of Greece were analyzed. The aim of the study was (A) to investigate the microbiome of raw goat milk from Greek farms through classical microbiological analysis, modern molecular methods and metagenomic analysis and (B) to determine the fatty acid profile and analyze the antioxidant system of raw goat milk. The original element of the present research study was the combination of classical microbiological and metagenomic analysis that allowed the complete description of the Greek goat milk microbiome. Moreover, according to the literature, the analysis of the antioxidant system has been carried out mainly in plants, fruits, or plant extracts, and less in biological fluids such as milk, while modern molecular analyzes mainly concern cow's milk, which is the most common type of milk. For the study, the samples were initially subjected to classical microbiological analysis using selective nutrient substrates and growth conditions to count populations of specific microbial groups (LAB, yeasts, enterobacteriaceae and psychrotrophs). The presumptive LAB and presumptive yeasts were then grouped by rep-PCR and finally identified at species level by 16S rRNA and ITS region sequencing, respectively. Subsequently, the samples were subjected to metagenomic amplicon-based analysis by the isolation of the total DNA of the samples to evaluate their diversity in bacteria and yeasts/fungi. The identification of bacteria and yeasts/fungi was based on the amplification of the V1-V3 region of the 16S rRNA and the ITS1-ITS2 region, respectively. In addition, physicochemical analysis was performed on the samples, while at the same time the fatty acids profile was determined by the method of Flame-ionization detection gas chromatography (FID). Finally, the antioxidant system of the samples was analyzed, regarding the total antioxidant capacity (FRAP, ABTS, DPPH), the activity of antioxidant enzymes (LPO, GR, GSH-Px, SOD, CAT) and the oxidative biomarkers (MDA, PC) of milk. Regarding the counts results (average value) of microbial populations on the substrates used, the population of Total Mesophilic Flora (PCA 30°C), presumptive mesophilic cocci (M17 30°C) and psychrotrophs (PCA 4°C) were found to be high (5.0, 4.6 and 4.0 log cfu / ml, respectively). Identification of bacteria by 16S-PCR and yeasts by ITS-PCR showed the dominance of the LAB genera *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* and the genera *Candida* and *Saccharomyces*, respectively. Finally, metagenomic analysis revealed the microbial diversity among the samples, as a variety of bacterial genera (122) and yeasts/fungi genera (191) were detected. The predominant genera of bacteria, through metagenomic analysis, were the LAB genera *Lactococcus* and *Streptococcus*, as well as the genera *Pseudomonas*, while the

predominant yeasts/fungi genera were the genera *Cryptococcus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Trichosporon*. On the other hand, the results of the fatty acid profile analysis (F.A.) showed that among the saturated F.A. (SFA) the short-chain F.A. (C_{8:0} and C_{10:0}) and medium-chain F.A. (C_{12:0}, C_{14:0} and C_{16:0}) were in high percentage with the palmitic (C_{16:0}) being the dominant F.A. (≈ 26%). Furthermore, among the monounsaturated F.A. (MUFA) the oleic (C_{18:1 cis9}) was the dominant F.A. (≈ 20%), while among the polyunsaturated F.A. (PUFA) the linoleic acid (C_{18:2 n6c}) was the dominant one (≈ 2.5%). On the other hand, the analysis of the antioxidant system and specifically the concentration of lipid and protein oxidation products (MDA and PC, respectively) showed variations between the samples, giving an idea of the milk samples oxidative stability and therefore their quality.

Scientific area: Milk quality

Keywords: goat milk, classical microbiological analysis, metagenomic analysis, fatty acid profile, antioxidant system

Δήλωση έργου

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΥΡΙΑΚΑΚΗ δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών του Προγράμματος «Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων: Γαλακτοκομία» του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

.....
(ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ)

.....
(ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ)
(Ημέρα, μήνας, έτος)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη σημαντική και ουσιαστική συνεισφορά τους στην εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Έφη Τσακαλίδου τόσο για την πληθωρική συμμετοχή της στην επιλογή, διαμόρφωση και τελική απόδοση του θέματος όσο και για τη συνολική συνεισφορά της στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας και το πολύτιμο έργο της στην επιστημονική κοινότητα. Την ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω υπό την επίβλεψή της τη μεταπτυχιακή μου μελέτη και να συνεργαστώ με την ερευνητική της ομάδα, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που έλαβα καθ' όλη την περίοδο συνεργασίας μας.
- Την Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Ελένη Τσιπλάκου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω, ακόμη μία φορά, μέρος των πειραμάτων μου στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής καθώς και για την επιστημονική καθοδήγησή της στην ανάλυση των λιπαρών οξέων και του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις της που συνέβαλαν στην τελική δομή της παρούσας εργασίας.
- Τον Λέκτορα κ. Αναστάσιο Ακτύπη τόσο για την πολύτιμη βοήθειά του στη διαμόρφωση της τελικής δομής της παρούσας εργασίας όσο και για τις γνώσεις που μας μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών του μεταπτυχιακού μου.
- Τη Δρ. Μαρία Κάζου και τον Δρ. Αλέξανδρο Μαυρομάτη για την ευχάριστη συνεργασία μας, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν καθώς και για τη βοήθειά τους στην πορεία του πειραματισμού, των εργαστηριακών αναλύσεων και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.
- Τη συμφοιτήτρια, συνάδελφο και φίλη μου Μαριάννα Λαγονίκου με την οποία συνεργαστήκαμε κατά τη διάρκεια του πειραματισμού και των εργαστηριακών αναλύσεων. Η βοήθεια και η συνεχής συμπαράστασή της ήταν πολύτιμη.
- Την οικογένειά μου, τους γονείς μου Ηλία και Αρετή και την αδερφή μου Ελένη για τη συμπαράστασή τους στην προσπάθειά μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών 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»

Λίστα συντομογραφιών

ABTS = 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)

AI = Atherogenicity Index, Αθηρωματικός δείκτης

a_w = water activity, ενεργότητα νερού

BSA = Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη βόειου ορού

CAT = Catalase, Καταλάση

CDNB = 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο

CLA = Conjugated Linoleic Acid, Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ

DGGE = Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αποδιατακτικής διαβάθμισης

DNA = Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DNPB = 2,4-dinitrophenylhydrazine, 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη

DPPH = 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic Acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EFSA = European Food Safety Authority, Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων

EtBr = Ethidium Bromide, Βρωμιούχο αιθίδιο

FID = Flame Ionization Detector, Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power, Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου

GSH-Px = Glutathione Peroxidase, Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GR = Glutathione Reductase, Αναγωγάση της γλουταθειόνης

GSH = Glutathione reduced, Ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης

GSSG = Glutathione oxidized, Οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης

GST = Glutathione S-Transferase, Μεταφοράση της γλουταθειόνης

HDL = High-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας

IL-6 = Interleukin-6, Ιντερλευκίνη-6

IL-10 = Interleukin-10, Ιντερλευκίνη-10

ITS = Internal Transcribed Spacer, Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή

KAA = Kanamycin Aesculin Azide Agar

LAB = Lactic Acid Bacteria, Οξυγαλακτικά βακτήρια

LCFA = Long Chain Fatty Acids, Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα

LDL = Low-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

LPO = Lactoperoxidase, Λακτοϋπεροξειδάση

LSU = Large subunit, Μεγάλη υπομονάδα

MCFA = Medium Chain Fatty Acids, Μέσης αλύσου λιπαρά οξέα

MCT = Medium Chain Triglycerides, Τριγλυκερίδια μέσης αλύσου

MDA = Malondialdehyde, Μηλονική αλδεΐδη

MRS = de Man, Rogosa and Sharpe

MUFA = Monounsaturated Fatty Acids, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

NADPH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide 2'-Phosphate (reduced), Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμιδική αδενίνη (ανηγμένη μορφή)

NADP⁺ = Nicotinamide Adenine Dinucleotide 2'-Phosphate (oxidized), Φωσφορική δινουκλεοτιδική νικοτιναμιδική αδενίνη (οξειδωμένη μορφή)

NGS = Next Generation Sequencing, Αλληλούχηση επόμενης γενιάς

NSLAB = Non-Starter Lactic Acid Bacteria, Μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια

OD = Optical Density, Οπτική πυκνότητα

PBS = Phosphate Buffered Saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PC = Protein Carbonyls, Πρωτεϊνικά καρβονύλια

PCA = Υπόστρωμα Plate Count Agar

PCR = Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PUFA = Polyunsaturated Fatty Acids, Πολυάκορεστα λιπαρά οξέα

rep-PCR = Repetitive Element Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων

RNA = Ribonucleic acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ

ROS = Reactive Oxygen Species, Δραστικές μορφές οξυγόνου

rRNA = ribosomal RNA, ριβοσωμικό RNA

SCFA = Short Chain Fatty Acid, Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα

SDS = Sodium Dodecyl Sulphate, Δωδεκασουλφονικό νάτριο

SFA = Saturated Fatty Acids, Κορεσμένα λιπαρά οξέα

SLAB = Starter Lactic Acid Bacteria, Εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια

SOD = Superoxide Dismutase, Δισμουτάση του υπεροξειδίου

SSCP = Single-Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδα

SSU = Small subunit, Μικρή υπομονάδα

TAE = Tris-acetate-EDTA

TBA = Thiobarbituric Acid, Θειοβαρβιτουρικό οξύ

TCA = Trichloroacetic Acid, Τριχλωροξικό οξύ

TE = Tris-EDTA

TNF α = Tumor Necrosis Factor α , Παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-S-triazine, 2,4,6, τριπυριδυλο-S -τριαζίνη

UNFA = Unsaturated Fatty Acids, Ακόρεστα λιπαρά οξέα

VRBGA = Violet Red Bile Glucose Agar

XOD = Xanthine oxidase, Οξειδάση ξανθίνης

YGC = Yeast Glucose Chloramphenicol

ΕΛΣΤΑΤ = Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία

OMX = Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

*Αφιερώνεται στην αγαπημένη μου γιαγιά, Χαραλαμπία,
που έφυγε από τη ζωή τον Μάρτιο του 2021.*

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	15
1.1. Ιστορική αναδρομή	15
1.2. Η αιγοτροφία στην Ελλάδα και η οικονομική σημασία της.....	18
1.3. Το αίγαιο γάλα	20
1.3.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	20
1.3.2. Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	24
1.3.3. Θρεπτική αξία και πιθανές ευεργετικές ιδιότητες	27
1.4. Το μικροβίωμα του νωπού αίγειου γάλακτος	33
1.4.1. Προ-τεχνολογικοί μικροοργανισμοί.....	34
1.4.1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια	34
1.4.1.2. Άλλα γένη βακτηρίων	37
1.4.1.2.1. Το γένος <i>Propionibacterium</i>	37
1.4.1.2.2. Το γένος <i>Corynebacterium</i>	38
1.4.2. Προβιοτικά	38
1.4.2.1. Το γένος <i>Lactobacillus</i>	39
1.4.2.2. Το γένος <i>Bifidobacterium</i>	39
1.4.3. Ζύμες και μύκητες	40
1.4.4. Αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς.....	42
1.5. Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης.....	49
1.5.1. Μέθοδοι εξαρτώμενες καλλιέργειας (culture-dependent).....	49
1.5.2. Μέθοδοι ανεξάρτητες καλλιέργειας (culture-independent)	50
2. Σκοπός της μελέτης.....	55
3. Υλικά και μέθοδοι.....	56
3.1. Προέλευση των δειγμάτων	56
3.2. Προσδιορισμός του pH και της σύστασης του αίγειου γάλακτος	60
3.3. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στο αίγαιο γάλα.....	61
3.3.1. Εκχύλιση του λίπους του γάλακτος.....	61
3.3.2. Μεθυλεστεροποίηση του λίπους του γάλακτος.....	61
3.3.3. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του αίγειου γάλακτος με αέρια χρωματογραφία	62
3.4. Ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος.....	63

3.4.1.	Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	64
3.4.2.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	68
3.4.3.	Οξειδωτικοί δείκτες	72
3.5.	Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών	74
3.6.	Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών.....	77
3.7.	Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών.....	78
3.7.1.	Απομόνωση DNA από βακτήρια.....	78
3.7.2.	Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR.....	80
3.7.3.	Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA	83
3.7.4.	Απομόνωση DNA από ζύμες.....	86
3.7.5.	Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR	88
3.7.6.	Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS	89
3.8.	Μεταγονιδιωματική ανάλυση	90
3.8.1.	Απομόνωση ολικού DNA.....	90
3.9.	Στατιστική ανάλυση.....	93
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	94
4.1.	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	94
4.2.	Το προφίλ των λιπαρών οξέων του αίγειου γάλακτος.....	97
4.3.	Το αντιοξειδωτικό σύστημα του αίγειου γάλακτος	110
4.4.	Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών	117
4.5.	Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών.....	129
4.6.	Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών.....	133
4.6.1.	Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων και ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR.	133
4.6.2.	Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA και ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS	139
4.7.	Μεταγονιδιωματική Ανάλυση	156
4.7.1.	Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για τα βακτήρια	157
4.7.2.	Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για ζύμες/μύκητες.....	165
4.7.3.	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων μεταγονιδιωματικής	172
5.	Συμπεράσματα	174

6. Βιβλιογραφία.....	175
7. Παράρτημα.....	197
7.1. Χρώση κατά Gram.....	197
7.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	197
7.3. Μέθοδος <i>rep</i> -PCR.....	198
7.4. Δενδρογράμματα <i>rep</i> -PCR των στελεχών των βακτηρίων για κάθε δείγμα..	198
7.5. Δενδρογράμματα <i>rep</i> -PCR των στελεχών των ζυμών για κάθε δείγμα.....	205
7.6. Ποσοστά κάλυψης και ομοιότητας των ταυτοποιημένων βακτηρίων	207
7.7. Ποσοστά κάλυψης και ομοιότητας των ταυτοποιημένων ζυμών	212
7.8. Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης	214

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορική αναδρομή

Η αίγα, με βάση ζωοαρχαιολογικά ευρήματα, φαίνεται να κατοικιδιοποιήθηκε γύρω στο 8.000 π.Χ. (Ρογδάκης, 2006), αποτελώντας το πρώτο ζώο εκτροφής που εξημερώθηκε (Boyazoglu *et al.*, 2005). Σύμφωνα με τη Roets (2020) αποτελεί ένα ζώο ιδανικό για κατοικιδιοποίηση καθώς παρουσιάζει υψηλό ποσοστό γονιμότητας, ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, προσαρμόζεται εύκολα σε διάφορα περιβάλλοντα καταναλώνοντας ζωοτροφές μη ανταγωνιστικές με τη διατροφή του ανθρώπου, ενώ ταυτόχρονα είναι υπάκουη, μη επιθετική και μετακινείται σε αγέλες. Η αίγα είναι συνυφασμένη με την ιστορία και την παράδοση διαφόρων περιοχών του κόσμου, ενώ η μακροχρόνια σχέση της με τον άνθρωπο την έχει καταστήσει σύνηθες αντικείμενο, σε μύθους, λαογραφίες και παραμύθια.

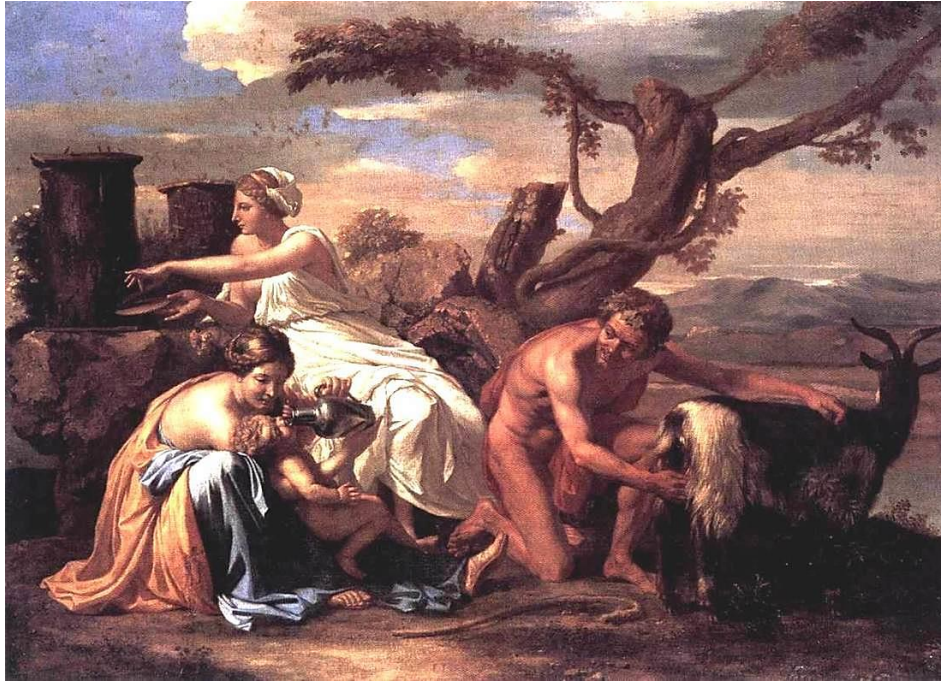
Αρχικά στη Σκωτία, με βάση αρχαιολογικά ευρήματα, οι αίγες φαίνεται ότι αποτελούσαν σύμβολο της γονιμότητας αλλά και της επιθετικότητας. Από την άλλη πλευρά, η Νορβηγική μυθολογία αναφέρει πως μια αίγα που τρεφόταν με το δέντρο Υγκντράσιλ, παρήγαγε υδρόμελο (αντί για γάλα), το οποίο καταναλωνόταν στις μεγάλες γιορτές των Θεών. Ακόμη, στη Γερμανία, ένας βωμός που ήταν αφιερωμένος στη θεά Matronae είχε στο πίσω μέρος του μια αίγα με τρία σώματα, δείχνοντας τη σπουδαία θέση την οποία κατείχε. Κατά την Αναγέννηση, οι χοροί ήταν συχνά βασισμένοι σε ζώα και πουλιά. Έτσι, οι πιο ήρεμοι χοροί μιμούσαν τη συμπεριφορά των πουλιών όπως των παγωνιών, ενώ ο γαλλικός χορός «καπριόλ», μιμούταν τη συμπεριφορά των αιγών.

Σύμφωνα με τους Boyazoglu *et al.* (2005), η αίγα ήταν επίσης ζώο ιερό για τους Σουμέριους και τους Βαβυλώνιους θεούς Marduk και Ningirsu, ενώ στην Αίγυπτο ο θεός Όσιρις, αναπαρίσταται μερικές φορές με τη μορφή αίγας. Ακόμη, ο Φαραώ Τουταγχαμών διέταξε να τοποθετηθούν στον τάφο του 22 αγγεία από το αγαπημένο του αίγειο τυρί, ώστε να τρέφεται ο ίδιος κατά τη διάρκεια του ταξιδιού του προς τον Κάτω Κόσμο, αλλά και για να προσφέρει μερικά από τα αγγεία αυτά ως δώρα στους Θεούς (Boyazoglu *et al.*, 2005).

Σύμφωνα με την Ελληνική μυθολογία, η αίγα ήταν ιερό σύμβολο για τον Θεό της βλάστησης και της αμπέλου, τον Διόνυσο. Έτσι, τα έργα της Ελληνικής τραγωδίας ήταν βασισμένα στα φεστιβάλ που διοργανώνονταν για να γιορτάσουν τον Διόνυσο και τη συγκομιδή. Η λέξη «τραγωδία» προέρχεται από τις λέξεις «τράγος» και «ωδή» δηλαδή τραγούδι από αίγες, και αναφέρεται είτε στο βραβείο, μια αίγα που απονεμήθηκε στους δραματουργούς των οποίων τα έργα κέρδισαν τους πρώτους διαγωνισμούς, ή στο φόρεμα (δέρματα αιγών) των ερμηνευτών, ή στην αίγα που θυσιάστηκε στις πρώτες ιεροτελεστίες από τις οποίες αναπτύχθηκε η τραγωδία (Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάννικα, 1993).

Όσον αφορά τα μεσαιωνικά χρόνια, οι Ρωμαιοκαθολικοί ιερείς προσπαθώντας να οδηγήσουν τους ειδωλόλατρες στον Χριστιανισμό, χρησιμοποίησαν τις αίγες ως στολίδι στο εξωτερικό των εκκλησιών αφού έμοιαζαν με «διαβολικά» πλάσματα. Οι ειδωλόλατρες αισθάνονταν ευχαρίστηση να επισκέπτονται ένα τέτοιο μέρος που ήταν γεμάτο από πλάσματα τόσο οικεία σε αυτούς. Με την πάροδο του χρόνου όμως, καθώς υιοθετήθηκε η νέα πίστη, αυτά τα πλάσματα χρησιμοποιήθηκαν για να υποδηλώσουν το κακό και χρησιμοποιήθηκαν για να απεικονίσουν τα τέρατα που θα συναντούσαν οι οπαδοί στην κόλαση για τις αμαρτίες τους (Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάννικα, 1993).

Σύμφωνα με τη Ρωμαϊκή μυθολογία, ο Φάυνος ήταν ο θεός των κοπαδιών και των βοσκών, με κέρατα, πόδια και ουρά αίγας και λατρευόταν στον Παλατίνο λόφο της Ρώμης. Ο Φάυνος αντιστοιχεί στον θεό Πάνα της Ελληνικής μυθολογίας, ο οποίος απεικονιζόταν έχοντας κάτω άκρα τράγου, και ήταν προστάτης των κτηνοτρόφων, των κυνηγών, των αλιέων και των ποιμένων. Επιπρόσθετα, στην Ελληνική και Ρωμαϊκή μυθολογία, η Ρέα, η μητέρα του Δία, προκειμένου να γλιτώσει τον γιο της από τον κανιβαλικό πατέρα του, τον Κρόνο, τον έκρυψε στο Ιδαίο Άντρο (σπήλαιο του όρος Ίδη στην Κρήτη) έχοντας ως τροφό μία αίγα, την Αμάλθεια. Η Αμάλθεια έδινε το γάλα της στον μικρό Δία για να τον βοηθήσει στην ανάπτυξή του, ώστε αυτός μεγαλώνοντας να διεκδικήσει την εξουσία (Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάννικα, 1993) (Εικόνα 1.1.1.).



Εικόνα 1.1.1.: Η αίγα Αμάλθεια τρέφει με το γάλα της τον μικρό Δία

Στον Βορειοδυτικό Ειρηνικό, όπου έμεναν οι πρώτες φυλές των Τσίμισιων, η αίγα αποτελούσε ένα κομμάτι της πίστης τους. Ακόμα και οι Εσκιμώοι είχαν τραγούδια και ποιήματα για να επικαλεστούν το πνεύμα της αίγας. Όσον αφορά τον λιβανέζικο μύθο "Little Mangy One", αναφέρει πως μια μικρή αίγα σώζει τους δύο αδελφούς της από την κοιλιά μιας ύαινας. Η ευφυΐα της αίγας απεικονίζεται και στο "Two Close Calls" όπου μια αίγα ξεπερνά τόσο το τσακάλι όσο και το λιοντάρι (Bushnaq, 1986).

Στη Νότιο Αφρική υπάρχουν διάφορες παραδόσεις σχετικά με τις αίγες και τα προϊόντα τους. Στα μέσα του 1800 μ.Χ., οι Πέντι κατείχαν μεγάλα κοπάδια αιγών ως πηγή πλούτου, σχετίζοντάς τα με τα βοοειδή. Πιο αναλυτικά, οι Πέντι αξιολογούσαν τις αίγες τους ως εξής: «1 βόδι = 5 πρόβατα ή 10 αίγες, 1 αγελάδα = 7 πρόβατα ή 14 αίγες». Σε αυτές τις κοινωνίες, οι αίγες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται συχνά σε τελετές και θυσίες (Quin, 1959). Όσον αφορά τη λαογραφία, μια Νιγηριανή ιστορία περιγράφει πώς εξημερώθηκε η αίγα. Η ιστορία της Yoruba, όπως ονομάζεται, αναφέρει ότι τα ζώα έπιναν νερό από μια κοινή λίμνη, την οποία καθάριζαν μία φορά το χρόνο. Όμως, η πονηρή αίγα απέφευγε τον καθαρισμό της προκαλώντας έτσι την οργή μιας λεοπάρδαλης, η οποία και της επιτέθηκε. Η αίγα έτρεξε γρήγορα για να γλιτώσει στο χωριό όπου διέμεναν οι άνθρωποι και έκτοτε έζησε εκεί με αυτούς.

Επιπρόσθετα, σε όλες σχεδόν τις Νοτιοαφρικανικές γλώσσες, «αίγα» σημαίνει «το ερωτόν ζώο» ή «αυτό που θέτει μια ερώτηση», επειδή η αίγα, εδώ και αιώνες, χρησιμοποιείται από τις φυλές της Νότιας Αφρικής για να επικοινωνήσει με τους θεούς και τα προγονικά πνεύματα (Mutwa, 1996). Το χρώμα, το φύλο και η ηλικία μιας αίγας που σφάζονται για πολιτιστικούς σκοπούς διαφέρουν από φυλή σε φυλή. Έτσι, για παράδειγμα, οι Ζουλού θεωρούν ότι μια μαύρη αίγα έχει την πιο ισχυρή μαγεία, μια κοκκινοκαφέ αποτρέπει τη σύγκρουση και την αιματοχυσία, μια άσπρη ευλογεί τη γαμήλια τελετή, μια ασπρόμαυρη χρησιμοποιείται στην ημέρα των ευχαριστιών για τις επιθυμίες που έχουν πραγματοποιηθεί, και μια κοκκινόλευκη στην ημέρα των ευχαριστιών για τον τερματισμό συγκρούσεων (Mutwa, 1996).

Με βάση τα προαναφερθέντα, οι αίγες φαίνεται ότι κατείχαν, και κατέχουν ακόμα, σπουδαία θέση στη ζωή αρκετών λαών γεγονός που υποδεικνύεται μέσα από τις αναφορές τους στην ιστορία και τον πολιτισμό τους, καθώς και μέσα από την απεικόνισή τους σε πολλά αντικείμενα ή τη χρήση τους στις ιεροτελεστίες ακόμη και μέχρι σήμερα.

1.2. Η αιγοτροφία στην Ελλάδα και η οικονομική σημασία της

Η αίγα ανήκει στην τάξη των αρτιοδακτύλων, την οικογένεια Bovidae, την υποοικογένεια Caprinae, και το γένος Capra. Οι κυριότερες ξένες φυλές αιγών γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης είναι οι Ελβετικές φυλές Saanen και Toggenburg, η Γαλλική Alpine, η φυλή Δαμασκού (Damascus) και η φυλή Μάλτας (Maltese), ενώ από τις εγχώριες ξεχωρίζει η αίγα Σκοπέλου (Ρογδάκης, 2006). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η Εγχώρια Ελληνική φυλή της αίγας παρόλο που παρουσιάζει χαμηλότερη γαλακτοπαραγωγή σε σχέση με τις άλλες φυλές, παράγει γάλα πλουσιότερο σε λίπος και πρωτεΐνες.



Εικόνα 1.2.1.: Η Εγχώρια Ελληνική φυλή της αίγας (αριστερά) και η αίγα Σκοπέλου (δεξιά) (<http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php>)

Στην Ελλάδα η εκτροφή των αιγοπροβάτων θεωρείται ένας από τους δυναμικότερους κλάδους της αγροτικής οικονομίας, τόσο από άποψη απασχόλησης όσο και συνολικού εισοδήματος (Sossidou *et al.*, 2013). Ακόμη, σύμφωνα με τους Ragkos *et al.* (2016), η αιγοτροφία λαμβάνει την πρώτη θέση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ). Η ανάπτυξη της αιγοτροφίας οφείλεται στις ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες που επιτρέπουν τη βόσκηση για μεγάλες χρονικές περιόδους, σε συνδυασμό με τις εδαφολογικές συνθήκες της Μεσογειακής λεκάνης που χαρακτηρίζονται ως ακατάλληλες για την εκτροφή άλλων παραγωγικών ζώων, καθώς και της ανθεκτικότητας των εκτρεφόμενων αιγών στις συνθήκες αυτές.

Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία (ΕΛΣΤΑΤ, 2019), ο αριθμός των αιγών στην Ελλάδα ανέρχεται σε 3.580.042 ζώα, εκ των οποίων το 59% αντιπροσωπεύει αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης. Παράλληλα, το 40% των αιγών εκτρέφεται στις περιφέρειες της Κρήτης, της Δυτικής Ελλάδας και της Κεντρικής Μακεδονίας. Ο πληθυσμός των αιγών στην Ελλάδα αντιστοιχεί περίπου στο 31% του συνολικού πληθυσμού των αιγών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ποσοστό που καταδεικνύει τη σημαντικότητα του κλάδου τόσο σε Εθνικό όσο και Ευρωπαϊκό επίπεδο (Rossi, 2017). Επιπλέον, σύμφωνα με την ΕΛΣΤΑΤ (2019), ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων που εκτρέφουν αίγες ανέρχεται σε 64.286, εκ των οποίων το 47% αφορά σε μικρές εκμεταλλεύσεις με 1-9 αίγες, ενώ το 34% των εκμεταλλεύσεων βρίσκεται στις περιφέρειες της Κρήτης και της Δυτικής Μακεδονίας. Τέλος, σημειώνεται ότι ο μέσος όρος των αιγών ανά εκμετάλλευση είναι 55,7.

Οι αίγες εκτρέφονται σε όλες τις περιοχές της χώρας, αλλά εξαιτίας του ανάγλυφου της Ελλάδας που χαρακτηρίζεται από ορεινές περιοχές και μεγάλο αριθμό νησιών, η πλειονότητα (90%) εκτρέφεται στις «λιγότερο ευνοημένες περιοχές» (LFA, Less Favored Areas), όπως ορίζεται στην οδηγία 75/268/ΕΟΚ (Hatzigeorgiou *et al.*, 1998). Διαδραματίζουν έτσι ένα σημαντικό κοινωνικοοικονομικό και οικολογικό ρόλο, με τη συμβολή τους στη διατήρηση του περιβάλλοντος (Sossidou *et al.*, 2013). Εκτιμάται ότι τα αιγοπρόβατα χρησιμοποιούν ετησίως 10,5 εκατομμύρια τόνους ξηρής βλάστησης από αγριότοπους της Ελλάδας και συμβάλλουν στο 45% της ακαθάριστης αξίας της ζωικής παραγωγής ή το 15% της ακαθάριστης αξίας της γεωργικής παραγωγής. Αυτά τα ζώα ανήκουν σε φυλές διπλής κατεύθυνσης (παραγωγή γάλακτος και κρέατος). Είναι χαρακτηριστικό ότι μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών η Ελλάδα κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτοπαραγωγών ενήλικων αιγοπροβάτων και συγκεκριμένα σχεδόν το 95%

του συνόλου (Hatzigeorgiou *et al.*, 1998). Το 90% των αιγών εκτρέφεται εκτατικά καλύπτοντας το μεγαλύτερο μέρος των διατροφικών αναγκών τους με τη βόσκηση, με αποτέλεσμα η ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος να επηρεάζεται από τη χημική σύσταση της βοσκήσιμης ύλης και συνεπώς να ποικίλει ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της χλωρίδας του κάθε τόπου (Steinshamn *et al.*, 2014).

Επιπρόσθετα, η Ελλάδα αποτελεί τη μοναδική ανεπτυγμένη χώρα στον κόσμο, στην οποία η ετήσια ποσότητα παραγωγής του αιγοπρόβειου γάλακτος ξεπερνά αυτήν του αγελαδινού (De Rancourt *et al.*, 2006). Από αυτό, το 90% του πρόβειου και το 80% του αίγειου γάλακτος χρησιμοποιείται στην παρασκευή τυριών, ειδικά για την παραγωγή Φέτας, αλλά και για την παραγωγή γιαουρτιού. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι το παραγόμενο αιγοπρόβειο γάλα καλύπτει τις ανάγκες της Ελληνικής αγοράς, με ελάχιστες εισαγωγές που δεν επηρεάζουν την αγορά.

1.3. Το αίγειο γάλα

1.3.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Οι τιμές των βασικών φυσικών ιδιοτήτων του αίγειου γάλακτος παρατίθενται στον Πίνακα 1.3.1.1.

Πίνακας 1.3.1.1.: Οι βασικές φυσικές ιδιότητες του αίγειου γάλακτος (Park *et al.*, 2007)

Ιδιότητα	Τιμή
Ειδικό βάρος (πυκνότητα, kg/L)	1,029-1,039
Ιξώδες (cP)	2,12
Επιφανειακή τάση (Dynes/cm)	52,0
Αγωγιμότητα ($\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$)	0,0043-0,0139
Δείκτης διάθλασης	1,450±0,39
Σημείο πήξης ($^{\circ}\text{C}$)	0,540-0,573
Οξύτητα (γαλακτικό οξύ %)	0,14-0,23
pH	6,50-6,80

Αναφορικά με τις χημικές ιδιότητες, η σύσταση του αίγειου γάλακτος δεν διαφέρει πολύ από εκείνη του αγελαδινού. Ωστόσο, η ακριβής σύνθεσή του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες μερικοί από τους οποίους είναι: η φυλή, η ατομικότητα του ζώου, η

διατροφή, το περιβάλλον, η γαλακτική περίοδος, η κατάσταση της υγείας του κ.α. (Slađanac, 2010). Κύριο συστατικό του αίγειου γάλακτος αποτελεί η λακτόζη και ακολουθούν το λίπος και οι πρωτεΐνες (Πίνακας 1.3.1.2.). Οι βιταμίνες και τα ανόργανα συστατικά που περιέχονται στο αίγειο γάλα παρατίθενται στο Κεφάλαιο 1.3.2.

Πίνακας 1.3.1.2: Τα εύρη των τιμών των κύριων συστατικών του αίγειου, του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος (Barłowska et al., 2011; Alichanidis et al., 2016)

Συστατικά	Αίγειο % (g/kg)	Αγελαδινό % (g/kg)	Πρόβειο % (g/kg)
Πρωτεΐνη	2,38-5,1	2,54-5,0	3,35-6,6
Λίπος	2,5-7,8	2,5-6,0	4,1-9,3
Λακτόζη	3,9-6,3	3,6-5,5	3,7-5,5
Ολικά Στερεά	11,9-16,3	10,5-13,7	15,2-19,3

Όσον αφορά τους υδατάνθρακες, κύριο υδατάνθρακα του γάλακτος αποτελεί ο δισακχαρίτης λακτόζη, το ποσοστό του οποίου στο αίγειο γάλα δεν διαφέρει σημαντικά από αυτό στο αγελαδινό. Επιπλέον, στην κατηγορία των υδατανθράκων ανήκουν και οι ετερο-ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από 3 έως 15 μονοσακχαρίτες που συνδέονται ομοιοπολικά μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Σε σύγκριση με το αγελαδινό και το πρόβειο, οι ολιγοσακχαρίτες στο αίγειο γάλα έχουν παρόμοιο προφίλ με το ανθρώπινο, με αποτέλεσμα να μπορεί να θεωρηθεί ως μία φυσική πηγή ολιγοσακχαριτών για τα βρέφη (Sousa et al., 2019). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι φουκοζυλιωμένοι ολιγοσακχαρίτες (fucosylated oligosaccharides), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο κλάσμα ολιγοσακχαριτών (60-80%) στο ανθρώπινο γάλα, καθώς και οι σιαλυλο-ολιγοσακχαρίτες (sialyloligosaccharides) (10-15%) στο ανθρώπινο γάλα (Orczyk-Pawłłowicz & Lis-Kuberka, 2020), υπάρχουν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αίγειο γάλα από ότι στο γάλα άλλων μηρυκαστικών (Martinez-Ferez et al., 2006; Meyrand et al., 2013). Η παρουσία των φουκοζυλιωμένων ολιγοσακχαριτών και των σιαλυλο-ολιγοσακχαριτών στο αίγειο γάλα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι αυτοί είναι ωφέλιμοι για την υγεία του ανθρώπου (Oliveira et al., 2015) (Κεφάλαιο 1.3.2.). Τέλος, στο αίγειο γάλα απαντώνται 40 ολιγοσακχαρίτες, η ποσότητα των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 250-300 mg/L. Η ποσότητα αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη του ανθρώπινου γάλακτος που κυμαίνεται μεταξύ 5-20 g/L (Ayechu-Muruzabal et al.,

2018), αλλά περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο αγελαδινό και περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο πρόβειο γάλα (Sousa *et al.*, 2019).

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, οι κύριες πρωτεΐνες του αίγειου γάλακτος είναι η β-καζεΐνη, η κ-καζεΐνη, η α_{s2} -καζεΐνη, η β-λακτογλοβουλίνη, η α-λακταλβουμίνη και η α_{s1} καζεΐνη (Jenness, 1980; Clark & Mora García, 2017). Το αίγειο γάλα περιέχει τα ίδια κλάσματα καζεϊνών (α_{s1} , α_{s2} , β, κ) με το αγελαδινό, αλλά σε διαφορετικές αναλογίες. Η κύρια καζεΐνη του αίγειου γάλακτος είναι η β, ενώ του αγελαδινού η α_{s1} . Η α_{s2} -καζεΐνη είναι υψηλότερη στο αίγειο γάλα, αλλά το άθροισμα της α_{s1} και της α_{s2} στο αίγειο γάλα είναι χαμηλότερο από το κλάσμα της α_{s1} στο αγελαδινό (Yadav *et al.*, 2016) (Πίνακας 1.3.1.3.).

Πίνακας 1.3.1.3.: Τα κλάσματα της καζεΐνης στο αίγειο, αγελαδινό και πρόβειο γάλα (Pellegrini et al., 1994; Clark & Sherbon, 2000; Alichanidis et al., 2016)

	Αίγειο	Αγελαδινό	Πρόβειο
Συνολική καζεΐνη (g/kg)	2,3-3,8	2,4-2,8	4,1-6,6
α_{s1} -καζεΐνη (% συνολικής)	4-26	31-58	7-40
α_{s2} -καζεΐνη (% συνολικής)	5-25	5-19	11-25
β-καζεΐνη (% συνολικής)	34-64	28-41	34-62
κ-καζεΐνη (% συνολικής)	10-24	9-24	7-23

Σύμφωνα με τους Clark & Sherbon (2000), η υψηλή περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος και καζεΐνη οδηγεί σε καλύτερες ιδιότητες πήξης και απόδοσης σε τυρί. Συγκεκριμένα, η α_{s1} -καζεΐνη αποτελεί ένα δομικό συστατικό του καζεϊνικού μικκυλίου και συμμετέχει στον σχηματισμό του τυροπήγματος. Έτσι, τυρόπηγμα από αίγειο γάλα τείνει να είναι λιγότερο συνεκτικό από αυτό του αγελαδινού γάλακτος, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του αίγειου γάλακτος σε α_{s1} -καζεΐνη (Clark & Mora García, 2017), και να έχει μικρότερο χρόνο πήξης (Pazzola, 2019). Ακόμη, οι Ambrosoli *et al.* (1988) μελέτησαν τις ιδιότητες πήξης (χρόνος πήξης, ρυθμός σχηματισμού τυροπήγματος και σταθερότητα τυροπήγματος) σε δείγματα αίγειου γάλακτος με χαμηλή και υψηλή περιεκτικότητα σε α_{s1} -καζεΐνη αντίστοιχα, και παρατήρησαν ότι όταν το γάλα είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε α_{s1} -καζεΐνη τότε ο χρόνος πήξης του ήταν μικρότερος, ενώ η υψηλή περιεκτικότητα σε α_{s1} -καζεΐνη οδηγούσε στην παραγωγή συνεκτικότερων τυροπηγμάτων.

Από την άλλη πλευρά, και όσον αφορά το λίπος, τα λιπαρά οξέα του αίγειου γάλακτος διαφέρουν από αυτά του αγελαδινού. Συγκεκριμένα, το αίγιο γάλα εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά σε βουτυρικό (C_{4:0}), καπροϊκό (C_{6:0}), καπριλικό (C_{8:0}), καπρικό (C_{10:0}), λαουρικό (C_{12:0}), μυριστικό (C_{14:0}), παλμιτικό (C_{16:0}), λινελαϊκό (C_{18:2}), αλλά χαμηλότερα σε στεατικό (C_{18:0}) (Yadav *et al.*, 2016). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το άθροισμα των λιπαρών οξέων C_{10:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} και C_{18:1} στο αίγιο γάλα καταλαμβάνει ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των συνολικών λιπαρών οξέων (Park *et al.*, 2007), όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.3.1.4.

*Πίνακας 1.3.1.4: Η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή των κύριων λιπαρών οξέων (% των συνολικών μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων) του λίπους του αίγειου, του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος (Amigo & Fontecha, 2011; Barłowska *et al.*, 2011; Bauman *et al.*, 2011; Devle *et al.*, 2012; Hilali *et al.*, 2011; Jensen, 2002; Jensen *et al.*, 1967; Lindmark Månsson, 2008; Park *et al.*, 2007; Pestana *et al.*, 2015; Póti *et al.*, 2015; Ramos & Juarez, 2011; Thanh & Suksombat, 2015)*

Λιπαρά οξέα	Αίγιο	Αγελαδινό	Πρόβειο
Κορεσμένα			
C _{4:0} (βουτυρικό)	1,7-2,4	3,1-4,4	2,7-3,9
C _{6:0} (καπροϊκό)	1,8-3,2	1,7-2,9	2,1-3,4
C _{8:0} (καπριλικό)	2,3-3,1	1,0-1,9	1,7-3,3
C _{10:0} (καπρικό)	8,2-11,0	1,9-4,0	5,2-9,7
C _{12:0} (λαουρικό)	3,6-6,2	2,6-5,0	3,3-4,9
C _{14:0} (μυριστικό)	7,3-16,3	9,1-11,9	9,3-10,7
C _{16:0} (παλμιτικό)	22,0-37,9	23,6-31,4	21,3-28,2
C _{18:0} (στεατικό)	5,5-13,2	10,4-14,60	8,1-10,5
Μονοακόρεστα			
C _{16:1} (παλμιτελαϊκό)	1,0-2,8	0,9-2,2	0,7-1,6
C _{18:1} (ελαϊκό)	14,7-27,7	14,9-22,0	15,3-21,9
Πολυακόρεστα			
C _{18:2} (λινελαϊκό)	2,4-4,3	1,0-1,7	1,9-2,5
Συζευγμένο C _{18:2}	0,3-1,2	0,8-1,5	0,6-1,0
C _{18:3} (λινολενικό)	0,2-0,9	0,9-1,2	0,5-1,0

1.3.2. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Παρά το γεγονός ότι η παρουσία του οξυγόνου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα, σε συνδυασμό με την ικανότητά του να δέχεται μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής. Ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στους αερόβιους οργανισμούς και παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στη μεταγωγή του σήματος, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αποτελεσματικά αμυντικά συστήματα απομάκρυνσης των εν λόγω ενώσεων, ώστε να μπορούν να αντεπεξέρχονται στην οξειδωτική πίεση που δέχονται περιοδικά (Γαλάρης, 2015).

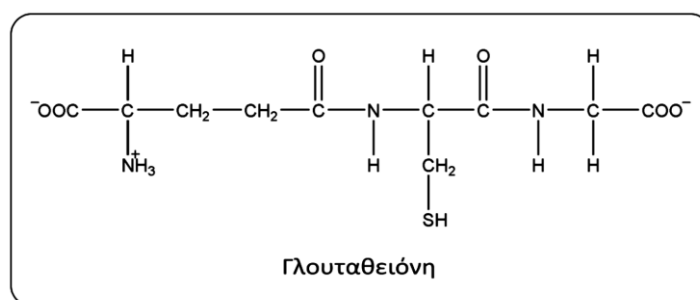
Η ανεξέλεγκτη παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, το οποίο στους ανθρώπους συνδέεται με διάφορες ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης καθώς και διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις (Khan *et al.*, 2019a). Τα κύτταρα διαθέτουν μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες είναι ικανές να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες, όταν αυτές σχηματίζονται και αρχίζουν να δρουν ανεξέλεγκτα. Τα συγκεκριμένα μόρια καλούνται συνήθως «εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών» (free radical scavengers) ή απλώς «αντιοξειδωτικά». Πρόκειται για ενώσεις που είτε είναι ενδογενείς είτε λαμβάνονται μέσω της τροφής, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι η α -τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Mehta & Gowder, 2015).

Σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες αντιοξειδωτικές ενώσεις, στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες συμβάλλουν και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Συγκεκριμένα, το γάλα περιέχει ένζυμα, τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Πίνακας 1.3.2.1.), με αποτέλεσμα να μπορεί να είναι ευεργετικό για την άμυνα των καταναλωτών στο οξειδωτικό στρες.

Πίνακας 1.3.2.1.: Δραστικές μορφές οξυγόνου (Γαλάρης, 2015)

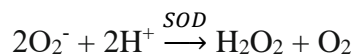
Ένωση	Όνομα
<i>Ελεύθερες ρίζες</i>	
$O_2^{\cdot-}$	ανιόν υπεροξειδίου
HO_2^{\cdot}	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
RO^{\cdot}	ρίζα αλκοξειδίου
ROO^{\cdot}	ρίζα υπεροξειδίου
NO_2^{\cdot} και NO^{\cdot}	διοξείδιο και μονοξείδιο του αζώτου
<i>Μη-ελεύθερες ρίζες</i>	
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υδροϋπεροξείδια
1O_2	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ
$ONOO^{\cdot}$	περοξυνιτρικό

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που απαντώνται στο γάλα είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GSH-Px), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR), η μεταφοράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-Transferase, GSTs), η καταλάση (Catalase, CAT) και η λακτο-ϋπεροξειδάση (Lactoperoxidase, LPO) (Khan *et al.*, 2019b).

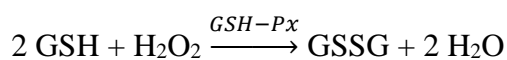
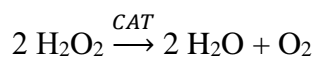


Εικόνα 2.3.2.1.: Η χημική δομή του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (αποτελείται από τα αμινοξέα Γλουταμινικό, Κυστεΐνη και Γλυκίνη)

Η GSH-Px, η CAT και η SOD δρουν προστατευτικά για τα κύτταρα έναντι των ελεύθερων ριζών (Grażyna *et al.*, 2017). Αρχικά, η SOD καταλύει την μετατροπή των ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Khan *et al.*, 2019a), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η CAT, η GSH-Px και άλλοι αναγωγικοί παράγοντες μετατρέπουν το H_2O_2 που σχηματίζεται από το O_2^- σε H_2O (Khan *et al.* 2019b). Η GSH-Px βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στο γάλα, ενώ είναι φορέας περίπου του 30% του σεληνίου που υπάρχει σε αυτό (Grażyna *et al.*, 2017).



Όπου:

GSH = ανηγμένη L-γλουταθειόνη (reduced L-glutathione)

GSSG = οξειδωμένη L-γλουταθειόνη (oxidized L-glutathione)

Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με τους Khan *et al.* (2019b), η GR μετατρέπει το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (δηλαδή την οξειδωμένη γλουταθειόνη με τους δισουλφιδικούς δεσμούς -S-S-) που σχηματίζεται από τη δράση της GSH-Px, σε μορφή σουλφυδρυλίου, το οποίο στη συνέχεια δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Όσον αφορά την GSTs, αποτελεί ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποτοξίνωση των τοξικών ουσιών και των μεταβολιτών στο σώμα, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα από τα, επιβλαβή για τον άνθρωπο, δραστικά ηλεκτρονιόφιλα (π.χ. μόρια με εποξειδικές ομάδες, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α.) (Townsend & Tew, 2003).



Όπου:

$\beta\text{-NADPH}$ = β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide 2'-Phosphate, Reduced

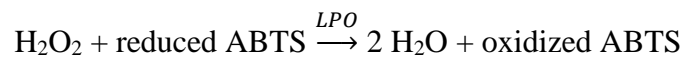
$\beta\text{-NADP}^+$ = β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide 2'-Phosphate, Oxidized



Όπου:

CDNB = 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

Τέλος, η LPO καταλύει τις αντιδράσεις οξείδωσης διαφόρων ενώσεων (αρωματικά οξέα, αρωματικές αμίνες, θειοκυανικά, φαινόλες και ασκορβικό οξύ) όπου το H₂O₂ είναι ο δέκτης υδρογόνου. Η LPO έχει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες επιδράσεις καθώς οξειδώνει τα θειοκυανικά (SCN⁻) στο γάλα που προέρχονται κυρίως από τις ζωοτροφές σε θειώδες κυάνιο (OSCN⁻) (πολύ τοξικό για ορισμένα βακτηρίδια), ενώ παράλληλα είναι εξαιρετικά ανθεκτική στα γαστρικά υγρά και παραμένει βιολογικά ενεργή στον γαστρεντερικό σωλήνα (Grażyna *et al.*, 2017).



Όπου:

ABTS = 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)

1.3.3. Θρεπτική αξία και πιθανές ευεργετικές ιδιότητες

Το αίγιο γάλα αποτελεί ένα ιδιαίτερα θρεπτικό τρόφιμο για τους ανθρώπους, ειδικά για αυτούς που είναι ευαίσθητοι στο γάλα άλλων ζώων (Getaneh *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τον Park (1994), το αίγιο γάλα προτείνεται ως υποκατάστατο σε ασθενείς που είναι αλλεργικοί στο αγελαδινό γάλα, καθώς το 40-100% των ασθενών που εμφανίζουν αλλεργίες στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, ανέχεται το αίγιο γάλα.

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.3.1., τα βασικά θρεπτικά συστατικά του αίγιου γάλακτος μοιάζουν με αυτά του αγελαδινού. Και τα δύο είδη γάλακτος περιέχουν σημαντικά υψηλότερη πρωτεΐνη και τέφρα, αλλά λιγότερη λακτόζη σε σχέση με το ανθρώπινο γάλα (Yadav *et al.*, 2016). Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, μη πρωτεϊνικής φύσης άζωτο και φωσφορικά άλατα προσδίδουν μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα, σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, η οποία φαίνεται να είναι χρήσιμη για τη θεραπεία γαστρικών ελκών (Park, 1994).

Όσον αφορά τις βιταμίνες, το αίγιο γάλα έχει πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη B₁ (θειαμίνη) σε σχέση με το αγελαδινό. Αντιθέτως, συνήθως περιέχει 25% περισσότερη βιταμίνη B₆ και 47% περισσότερη βιταμίνη A από το αγελαδινό γάλα. Η υψηλότερη περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος σε βιταμίνη A οφείλεται στο ότι οι αίγες, σε αντίθεση με τις αγελάδες, μετατρέπουν στο πεπτικό τους σύστημα όλο το β-καροτένιο της τροφής τους σε βιταμίνη A, η οποία μεταφέρεται στο γάλα. Για αυτό τον λόγο, το χρώμα του αίγιου γάλακτος είναι πάντα πιο λευκό από αυτό του αγελαδινού (Slađanac *et al.*, 2010).

Ακόμη, το αίγιο γάλα περιέχει μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία, όπως ασβέστιο (Ca), νάτριο (Na), μαγνήσιο (Mg), φώσφορο (P), κάλιο (K) και ψευδάργυρο (Zn), μαγγάνιο (Mn), σελήνιο (Se), κοβάλτιο (Co), χαλκό (Cu), σίδηρο (Fe) αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Yadav *et al.* (2016), το αίγιο γάλα περιέχει υψηλότερα ποσοστά Ca, Mg και P σε σύγκριση με το αγελαδινό και το ανθρώπινο, αλλά λιγότερα βιταμίνης D, βιταμίνης B₁₂ και φολικού οξέος. Συγκεκριμένα, περιέχει περίπου 13% περισσότερο Ca ανά μερίδα σε σχέση με το αγελαδινό, αποτελώντας μια καλή πηγή ασβεστίου. Τέλος, περιέχει περίπου 134% περισσότερη βιταμίνη K (Getaneh *et al.*, 2016). Στον Πίνακα 1.3.3.1. παρουσιάζονται συγκριτικά τα κύρια ανόργανα συστατικά και οι κύριες βιταμίνες του αίγιου, του αγελαδινού και ανθρώπινου γάλακτος.

Πίνακας 1.3.3.1.: Συγκριτική απεικόνιση των κυρίων ανόργανων συστατικών και βιταμινών του αίγειου, του αγελαδινού και του ανθρώπινου γάλακτος (Chandan *et al.*, 1992)

	Αίγειο (mg/100ml)	Αγελαδινό (mg/100ml)	Ανθρώπινο (mg/100ml)
Ανόργανα στοιχεία			
Na	34,0	50,0	14,0
K	180,0	150,0	58,0
Ca	129,0	120,0	34,0
Mg	20,0	12,0	3,0
P	106,0	95,0	14,0
Fe	0,04-0,1	0,05	0,07
Cl	130,00	95,0	42,0
Βιταμίνες			
Ρετινόλη-A (IU)	185,0	126,0	241,0
Θειαμίνη-B ₁	0,05	0,04	0,014
Ριβοφλαβίνη-B ₂	0,14	0,16	0,04
Παντοθενικό οξύ-B ₅	0,31	0,314	-
Νιασίνη-B ₃	0,28	0,08	0,18
Φολικό οξύ-B ₉ (mg/L)	6,0	50,0	56,0
Κοβαλαμίνη-B ₁₂	0,05	0,14	0,14
Βιοτίνη	2,00	2,00	0,70
Ασκορβικό οξύ-C	1,50	1,50	1,00
Βιταμίνη D	0,06	0,03	0,025

Από τη βιβλιογραφία διαπιστώνεται πως υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες προσπαθούν να προσεγγίσουν τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες του αίγειου γάλακτος. Μερικές από τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία παρατίθενται παρακάτω.

Πεπτικότητα

Το αίγειο γάλα, σε σχέση με το αγελαδινό ή το ανθρώπινο, έχει υψηλότερη πεπτικότητα, αλκαλικότητα και ρυθμιστική ικανότητα (Yadav *et al.*, 2016). Η καλύτερη πεπτικότητα του αίγειου γάλακτος πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα λιποσφαίριά του είναι

μικρότερα σε σύγκριση με του αγελαδινού. Συγκεκριμένα, το μέσο μέγεθος των λιποσφαιρίων του είναι 2μm με αποτέλεσμα καλύτερη διασπορά και πιο ομοιογενές μείγμα λίπους στο γάλα (Getaneh *et al.*, 2016). Το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρίων καθιστά μεγαλύτερη τη συνολική επιφάνειά τους, διευκολύνοντας τη δράση των ενζύμων. Ακόμη, το υψηλό ποσοστό λιπαρών οξέων μικρής και μεσαίας αλύσου στο αίγαιο γάλα συμβάλλει στην ευκολότερη και ταχύτερη πέψη του λίπους του γάλακτος, καθώς η λιπάση υδρολύει το λίπος ευκολότερα σε σχέση με τα λιπαρά οξέα μεγάλης αλύσου (Park, 1994). Σύμφωνα με τους Getaneh *et al.* (2016), τα περισσότερα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα που περιέχονται στο αίγαιο γάλα, έχουν μοναδικά οφέλη σε σύνδρομα δυσαπορρόφησης, στη χυλουρία, στη στεατόρροια, στην υπερλιποπρωτεϊναιμία και σε περιπτώσεις εντερικών εκτομών, αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, παιδικής επιληψίας και χολόλιθων. Ακόμη, τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα αναστέλλουν ή περιορίζουν την εναπόθεση χοληστερόλης και συμβάλλουν στη φυσιολογική ανάπτυξη των βρεφών. Η πεπτικότητα επίσης επηρεάζεται και από τα επίπεδα της α_{s1} -καζεΐνης. Όσο περισσότερη α_{s1} -καζεΐνη έχει το γάλα τόσο περισσότερο διαρκεί η πέψη του γάλακτος, καθώς η α_{s1} -καζεΐνη υδρολύεται πλήρως μόνο από τα ένζυμα του δωδεκαδάκτυλου. Τέλος, το αίγαιο γάλα δεν περιέχει την πρωτεΐνη αγλουτινίνη, η οποία προάγει τη συσσώρευση των λιποσφαιρίων (Yadav *et al.*, 2016).

Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Χαρακτηριστικό του αίγειου γάλακτος αποτελεί η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου λακτοϋπεροξειδάση (LPO) (1,5-9,28 units/mL), σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη (0,14-3,46 units/mL στο πρόβειο, 1,4-2,7 units/mL στο αγελαδινό, 0,06-0,97 units/mL στο ανθρώπινο) (Özer, 2014, Koksall *et al.*, 2016), το οποίο είναι δραστικό έναντι ορισμένων βακτηρίων, όπως τα βακτήρια που προκαλούν χολέρα (*Vibrio cholerae*), τυφοειδή πυρετό (*Salmonella typhi*), πνευμονία (*Klebsiella pneumoniae*), δυσεντερία (*Shigella dysenteriae*) και τροφική δηλητηρίαση (*Staphylococcus aureus*) (Yadav *et al.*, 2016).

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται κυρίως σε θειούχα αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, φωσφορικά άλατα, βιταμίνες A και E, καροτενοειδή, Zn, Se, ενζυμικά αντιοξειδωτικά (SOD, CAT, GSH-Px), καθώς και σε ολιγοσακχαρίτες και πεπτίδια που παράγονται κατά τη ζύμωση και ωρίμανση των τυριών (Khan *et al.*, 2019a).

Παρεμπόδιση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου

Οι δύο σημαντικότερες φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου είναι η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn. Δύο μελέτες στην Ισπανία αξιολόγησαν τα αποτελέσματα των ολιγοσακχαριτών που απομονώθηκαν από αίγιο γάλα και χορηγήθηκαν σε αρουραίους, στους οποίους είχε προκληθεί κολίτιδα (Lara-Villoslada *et al.*, 2006, Daddaoua *et al.*, 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ολιγοσακχαρίτες του αίγιου γάλακτος έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, ενώ παράλληλα μειώνουν τα κλινικά συμπτώματα (διάρροια και αιματηρά κόπρανα). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Haenlein (2004), το μαλακό τυρόπηγμα του αίγιου γάλακτος συνιστάται για τους ανθρώπους που πάσχουν από γαστρεντερικές διαταραχές, ενώ η υψηλή ρυθμιστική ικανότητά του φαίνεται να είναι χρήσιμη στη θεραπεία γαστρικών ελκών (Park, 1994).

Καρδιαγγειακά νοσήματα

Όπως προαναφέρθηκε, το αίγιο γάλα είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και τριγλυκερίδια μέσης αλύσου (Medium Chain Triglycerides, MCT). Λόγω του ισορροπημένου προφίλ των λιπαρών οξέων, το αίγιο γάλα βοηθά στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, των καρδιακών προσβολών, των εγκεφαλικών επεισοδίων και άλλων καρδιακών επιπλοκών (Lad *et al.*, 2017). Ακόμη, έχει βρεθεί σε αρουραίους ότι τα μέσης αλύσου λιπαρά οξέα του αίγιου γάλακτος έχουν αντιαθηρογόνο δράση καθώς αναστέλλουν ή περιορίζουν την εναπόθεση χοληστερόλης στο αγγειακό τους τοίχωμα (Yadav *et al.*, 2016). Τέλος, η υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη K βοηθά στη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Lad *et al.*, 2017).

Μείωση αλλεργιών γάλακτος

Η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα είναι μια συχνή ασθένεια για τα βρέφη και τα παιδιά, κατά την οποία ο οργανισμός ξεκινά να παράγει αντισώματα IgE έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών (αλλεργιογόνων) του αγελαδινού γάλακτος. Η α_{s1} -καζεΐνη και η β -λακτογλοβουλίνη αποτελούν σημαντικά αλλεργιογόνα του αγελαδινού γάλακτος. Σε αντίθεση με την α_{s1} -καζεΐνη, οι αλλεργικές ιδιότητες της β -λακτογλοβουλίνης μπορούν εν μέρει να εξαλειφθούν με ειδικούς χειρισμούς, όπως η παρατεταμένη θέρμανση. Τα επίπεδα της α_{s1} -καζεΐνης στο αίγιο γάλα είναι κατά 89% χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα της στο αγελαδινό γάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται λιγότερο αλλεργιογόνο από το αγελαδινό και να συνδράμει θετικά σε περιπτώσεις κολικών, πεπτικών

διαταραχών, ασθμάτων και εκζεμάτων (McCullough, 2003). Για τον παραπάνω λόγο, το αίγιο γάλα έχει προταθεί ως εναλλακτικό είδος γάλακτος σε άτομα που εμφανίζουν αλλεργίες στο αγελαδινό, πιθανόν εξαιτίας της χαμηλότερης περιεκτικότητάς του σε α_{s1} -καζεΐνη (Yadav *et al.*, 2016).

Μείωση της δυσανεξίας στη λακτόζη

Το αίγιο γάλα, όπως το αγελαδινό και το ανθρώπινο, περιέχει λακτόζη. Παρόλου που δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες, από πολλούς θεωρείται ότι άτομα που εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη μπορούν να καταναλώνουν αίγιο γάλα, πιθανόν εξαιτίας της υψηλότερης πεπτικότητάς του, αλλά και της χαμηλής του περιεκτικότητας σε α_{s1} -καζεΐνη η οποία, όπως προαναφέρθηκε, καθιστά ταχύτερη την πέψη του στο δωδεκαδάκτυλο, με αποτέλεσμα ο συνολικός χρόνος παραμονής του σε αυτόν να είναι αρκετά μικρότερος από αυτόν του αγελαδινού. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τη δυσανεξία στη λακτόζη και την αλλεργία στις πρωτεΐνες του γάλακτος είναι σχεδόν πανομοιότυπα (Yadav *et al.*, 2016).

Ανοσορυθμιστική δράση

Οι Jirillo *et al.* (2010) διερεύνησαν την επίδραση του αίγιου γάλακτος σε υγιή ανθρώπινα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος *in vitro* και βρήκαν ότι το αίγιο γάλα ήταν ικανό να επάγει την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα του αίματος, καθώς και να προκαλεί παραγωγή κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF- α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Η απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου θα μπορούσε να έχει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες για τον καταναλωτή και αντιβακτηριακή δράση αποτρέποντας τις λοιμώξεις. Όσον αφορά την παραγωγή κυτταροκινών, ο παράγοντας TNF- α έχει προ-φλεγμονώδη δράση, η IL-6 είναι ένα αντιδραστήριο οξειδίας φάσης και αυξητικός παράγοντας για τα β -λεμφοκύτταρα, ενώ η IL-10 είναι μια αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη. Η συντονισμένη απελευθέρωση των παραπάνω κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Getaneh *et al.* (2016), το αίγιο γάλα είναι πλούσιο σε Se, ένα θρεπτικό ιχνοστοιχείο που ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ταυτόχρονα, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε οξειδάση της ξανθίνης, ένα ένζυμο το οποίο συμμετέχει σε πολλές παθολογικές

καταστάσεις, όπως η ισχαιμία, το εγκεφαλικό, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αιμορραγικό σοκ, η αθηροσκλήρωση και η δρεπανοκυτταρική αναιμία, λόγω παραγωγής ελεύθερης ρίζας υπεροξειδίου.

Αντικαρκινογόνος δράση

Σύμφωνα με τους Jirillo *et al.* (2010), το αίγιο γάλα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (Conjugated Linoleic Acid, CLA, C₁₈H₃₂O₂), το οποίο έχει συσχετιστεί με αντικαρκινογόνες ιδιότητες κατά του καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου σε ζωικά μοντέλα, καθώς και σε *in vitro* μοντέλα μελανώματος στον άνθρωπο, ορθοκολικού καρκίνου και καρκίνου του μαστού.

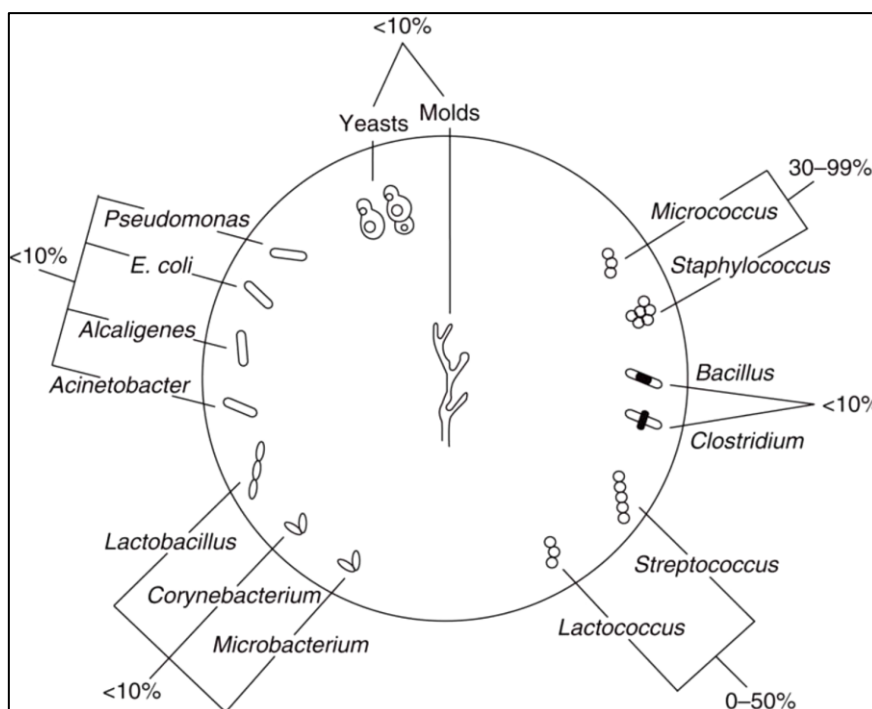
Πρεβιοτική δράση

Το αίγιο γάλα, όπως και το ανθρώπινο, περιέχει υψηλότερα επίπεδα ολιγοσακχαριτών σε σύγκριση με το αγελαδινό και το πρόβειο. Οι ολιγοσακχαρίτες δρουν ως πρεβιοτικά στο έντερο και βελτιώνουν την υγεία του πεπτικού συστήματος, καθώς προάγουν την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* στον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα βακτήρια αυτά είναι ωφέλιμα για την υγεία καθώς συμμετέχουν στην ανοσοδιέγερση, την πρόληψη παθογόνων λοιμώξεων, τη μείωση της χοληστερόλης, τη βελτίωση της δυσανεξίας της λακτόζης και τέλος εμφανίζουν αντικαρκινογόνο δράση (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

1.4. Το μικροβίωμα του νωπού αίγιου γάλακτος

Η υψηλή περιεκτικότητα του γάλακτος σε θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα και απαραίτητα αμινοξέα, σε συνδυασμό με το ουδέτερο pH και την υψηλή ενεργότητα νερού (a_w), παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών (Quigley *et al.*, 2013). Οι μικροοργανισμοί αυτοί εισέρχονται στο γάλα από διάφορες πηγές και έχουν διαφορετικούς ρόλους. Ορισμένοι υπηρετούν τη ζύμωση του γάλακτος σε γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. τα γένη βακτηρίων *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Propionibacterium* και ορισμένα γένη μυκήτων), άλλοι προάγουν την υγεία (π.χ. *lactobacilli* και *bifidobacteria*), άλλοι προκαλούν αλλοιώσεις (π.χ. τα γένη βακτηρίων *Pseudomonas*, *Clostridium* και *Bacillus* και άλλοι σπορογόνοι ή θερμοάντοχοι μικροοργανισμοί), ενώ άλλοι είναι παθογόνοι και προκαλούν ασθένειες [π.χ. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shiga*

toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Campylobacter* καθώς και ορισμένοι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες (π.χ. μύκητες του γένους *Aspergillus*)] (Mohamed *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.4.1.: Διαφορετικές μορφολογικές ομάδες μικροοργανισμών που βρίσκονται συνήθως στο νωπό γάλα (Hassan & Frank, 2011)

Στις ακόλουθες ενότητες θα παρουσιαστούν οι βασικές κατηγορίες των μικροοργανισμών που απαντώνται στο νωπό γάλα, που αφορούν τους προτεχνολογικούς και τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, τις ζύμες, τους μύκητες, τους αλλοιωγόνους και τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

1.4.1. Προ-τεχνολογικοί μικροοργανισμοί

1.4.1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που ζυμώνουν τη λακτόζη κυρίως προς γαλακτικό οξύ και συνιστούν τον κυρίαρχο πληθυσμό βακτηρίων στο νωπό αγελαδινό, αίγιο, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα (Quigley *et al.*, 2013). Η παρουσία τους στο νωπό γάλα οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος του μαστού και της θηλής των γαλακτοφόρων ζώων, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να έχουν

προέλθει και από μια ποικιλία άλλων πηγών, όπως ο εξοπλισμός της άμελης, ο αέρας, το νερό, η τροφή, το γρασίδι, το έδαφος κ.α. (Quigley *et al.*, 2013). Τα LAB ευθύνονται για την πτώση του pH (οξύνιση) σε διάφορα τρόφιμα, καθώς παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης των υδατανθράκων. Η οξύνιση αποτελεί μια σημαντική διεργασία για την παρασκευή προϊόντων, όπως το γιαούρτι, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης διαφόρων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Έτσι, τα LAB χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες (starter lactic acid bacteria, SLAB) στη βιομηχανία τροφίμων σε μια ποικιλία προϊόντων που αφορούν ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, ψαριού, φρούτων, λαχανικών και δημητριακών. Τα κύρια γένη LAB που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*. Ακόμη, τα LAB χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) καθώς συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης, της υφής και της θρεπτικής αξίας των ζυμωμένων τροφίμων, μέσω της παραγωγής αρωματικών συστατικών. Επιπλέον, είδη του γένους *Lactobacillus*, ως επί το πλείστον, χρησιμοποιούνται και ως προβιοτικές καλλιέργειες μέσω της προαγωγής θεραπευτικών αποτελεσμάτων (Bintsis, 2018; De Angelis & Gobbetti, 2011; Salminen *et al.*, 2011; Walstra *et al.*, 2006) (Ενότητα 1.4.2.). Τέλος, τα LAB παρεμποδίζουν την εμφάνιση αλλοιώσεων, όπως την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων στο γιαούρτι ή την επιφάνεια σκληρών τυριών, καθώς και τη δράση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της παραγωγής βακτηριοσινών, όπως η λακτισίνη, η πεντιοσίνη κ.α. (χρήση ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες) (Bintsis, 2018).

Αρχικά, το γένος *Lactococcus* αποτελείται από 21 είδη και 6 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Στο νοπό γάλα ανιχνεύεται το είδος *Lactococcus lactis* (συγκεκριμένα τα υποείδη *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* και *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), το οποίο χρησιμοποιείται και ως εναρκτήρια καλλιέργεια στην παραγωγή πολλών ειδών τυριών, κρέμας ή βουτύρου (Kim, 2014).

Από την άλλη πλευρά, το γένος *Lactobacillus* πρόσφατα αναθεωρήθηκε ταξινομικά περιλαμβάνοντας 23 νέα γένη (Zhang *et al.*, 2020). Σύμφωνα με τους Quigley *et al.* (2013), οι γαλακτοβάκιλλοι που έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη γαλακτοκομική βιομηχανία ανήκουν στα είδη *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλα είδη

γαλακτοβάκιλλων που ανιχνεύονται στο νωπό γάλα που ανήκουν στην ομάδα των NSLAB, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι τα είδη *Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* και *Limosilactobacillus fermentum*. Άλλα είδη που ανήκουν στα NSLAB είναι τα *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Latilactobacillus curvatus*, *Latilactobacillus sakei*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lentilactobacillus buchneri* και *Lactobacillus gasseri* (Quingley *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020).

Όσον αφορά στο γένος *Streptococcus*, αποτελείται από 157 είδη και 29 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Αν και τα περισσότερα είδη στρεπτόκοκκων χαρακτηρίζονται ως παθογόνα (Κεφάλαιο 1.4.4.), ο *Streptococcus thermophilus* είναι γενικά αναγνωρισμένος ως ασφαλής (Generally Recognized As Safe, GRAS) και συχνά απαντάται στο νωπό γάλα (Quingley *et al.*, 2013). Ο *S. thermophilus*, σε συνδυασμό με τον *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, χρησιμοποιείται στην παρασκευή της γιαούρτης και της Φέτας. Ένα ακόμη είδος στρεπτόκοκκου που ανιχνεύεται στο γάλα αποτελεί ο *Streptococcus macedonicus*, ο οποίος απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Tsakalidou *et al.* (1998) από το Ελληνικό τυρί Κασέρι και αργότερα κατατάχθηκε ως υποείδος του *Streptococcus gallolyticus* (Schlegel *et al.*, 2003).

Το γένος *Leuconostoc* αποτελείται από 27 είδη και 8 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Στο νωπό γάλα ανευρίσκονται κυρίως τα είδη *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* και *Leuconostoc lactis*, τα οποία λόγω των αρωματικών ουσιών που παράγουν, χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μιας ποικιλίας ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Holland & Liu, 2011).

Το γένος *Pediococcus* αποτελείται από 15 είδη (<https://www.bacterio.net/>) εκ των οποίων μόνο στελέχη των ειδών *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* σχετίζονται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα είδη αυτά διαδραματίζουν ρόλο στην ωρίμαση ορισμένων τυριών, όπως το Cheddar (Holland *et al.*, 2011).

Τέλος, το γένος *Enterococcus* αποτελείται από 70 είδη και 2 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Η παρουσία ορισμένων ειδών εντερόκοκκων στα τρόφιμα συνδέεται συχνά με την εμφάνιση αλλοιώσεων σε αυτά καθώς και με την πρόκληση

λοιμώξεων στον άνθρωπο (Κεφάλαιο 1.4.4.). Ωστόσο επιλεγμένα στελέχη εντεροκόκκων που βρίσκονται στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τα *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* και *Enterococcus durans*, χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπληρωματικές καλλιέργειες για την παραγωγή ορισμένων τυριών λόγω της αξιοσημείωτης πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δράσης, ενώ ταυτόχρονα έχουν την ικανότητα παραγωγής βακτηριοσινών (Cocolin *et al.*, 2007; Quigley *et al.*, 2013).

Στον Πίνακα 1.4.1.1.1. παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα είδη των LAB που βρίσκονται στο νωπό γάλα.

Πίνακας 2.4.1.1.1.: Τα σημαντικότερα είδη LAB του νωπού γάλακτος (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009)

Κόκκοι	Γαλακτοβάκιλλοι
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>
<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Lentilactobacillus kefir</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>L. brevis</i>
<i>E. durans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>Leuconostoc citrovorum</i>)	
<i>Leuc. lactis</i>	

1.4.1.2. Άλλα γένη βακτηρίων

1.4.1.2.1. Το γένος *Propionibacterium*

Κύριο χαρακτηριστικό των προπιονικών βακτηρίων είναι η ικανότητά τους να αποδομούν το γαλακτικό οξύ προς προπιονικό οξύ, οξικό οξύ και CO₂. Το γένος *Propionibacterium* αποτελείται από 22 είδη και 7 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Τυπικοί αντιπρόσωποι του γένους *Propionibacterium* αποτελούν τα είδη *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii*, *Propionibacterium*

acidipropionici, *Propionibacterium jensenii* και *Propionibacterium thoenii*, που χρησιμοποιούνται ως εναρκτηήριες καλλιέργειες κατά την παρασκευή τυριών Ελβετικού τύπου, επειδή το CO₂ που παράγουν σχηματίζει μεγάλες και λείες οπές στα τυριά αυτά (Thierry *et al.*, 2011).

1.4.1.2.2. Το γένος *Corynebacterium*

Το γένος *Corynebacterium* αποτελείται από 176 είδη και 13 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Τα μη παθογόνα είδη του γένους *Corynebacterium* που απομονώνονται συχνά από το νωπό γάλα ή από προϊόντα νωπού γάλακτος είναι τα *Corynebacterium glutamicum* και *Corynebacterium variabile* (γνωστοί παραγωγοί αμινοξέων), ενώ τα είδη *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense*, *Corynebacterium ammoniagenes* και *Corynebacterium stationis* ανιχνεύονται στην επιφάνεια τυριών που έχουν ωριμάσει με επίχρισμα (smear-ripened chesses) και συμβάλλουν στη γεύση τους (Hahne *et al.*, 2018).

1.4.2. Προβιοτικά

Ετυμολογικά ο όρος προβιοτικά προέρχεται από το λατινικό πρόθεμα «προ» και την αρχαία ελληνική λέξη «βίος» που σημαίνει «υπέρ της ζωής» (Florou-Paneri *et al.*, 2013). Σύμφωνα με τον ορισμό που θεσπίστηκε από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) το 2001, τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν ένα όφελος υγείας στον άνθρωπο» (Hill *et al.*, 2014). Ο πληθυσμός των προβιοτικών μικροοργανισμών πρέπει να βρίσκεται κατ' ελάχιστο μεταξύ 10⁶ και 10⁸ cfu/g εντερικού περιεχομένου, προκειμένου να επιδράσει στο περιβάλλον του. Οι, κατά προτίμηση, θέσεις αποικισμού των εντερικών γαλακτοβακίλλων και των *Bifidobacteria* φαίνεται να είναι ο τελικός ειλεός και το παχύ έντερο του ανθρώπου, αντίστοιχα. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μέσω μηχανισμών, όπως η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, ο ανταγωνισμός έναντι των παθογόνων και ο ανταγωνισμός για θέσεις προσκόλλησης, μπορούν να επιτύχουν την εξισορρόπηση της εντερικής χλωρίδας μετά από την εμφάνιση διαταραχών, όπως η ιογενής διάρροια (Walstra *et al.*, 2006). Επιπλέον, πολλές μελέτες υπογραμμίζουν τον σπουδαίο ρόλο των προβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό και συγκεκριμένα στο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της

επαγωγής της ομοιόστασής του, στην εμφάνιση αλλεργιών μέσω της μείωσης της παραγωγής ανοσοσφαιρίνης E, σε εντερικές παθήσεις, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, καθώς και σε καρδιαγγειακές παθήσεις μέσω της αντιυπερτασικής τους δράσης, της μείωσης των επιπέδων της LDL στο αίμα και της βελτίωσης του λόγου LDL/HDL κ.α. (Pascal *et al.*, 2018; Thakur *et al.*, 2016; Thushara *et al.*, 2016).

1.4.2.1. Το γένος *Lactobacillus*

Στο γένος *Lactobacillus*, καθώς και σε άλλα γένη που προήλθαν από αυτό μετά την αναθεώρηση της ταξινόμησής τους (*Lacticaseibacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Ligilactobacillus*) (Ενότητα 1.4.1.1.), ανήκουν τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια, ενώ ορισμένα είδη περιλαμβάνονται στο γένος *Bifidobacterium* (Kongo & Malcata, 2016). Στους προβιοτικούς γαλακτοβάκιλλους περιλαμβάνονται στελέχη των ειδών *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Ligilactobacillus salivarius* και *L. crispatus* (De Angelis & Gobbetti, 2011; Salminen *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2020).

1.4.2.2. Το γένος *Bifidobacterium*

Βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1899 από τον Henry Tissier στο Ινστιτούτο Pasteur από κόπρανα βρεφών που θήλαζαν. Αρχικά τα βακτήρια αυτά ταξινομήθηκαν στο γένος *Lactobacillus* ενώ αργότερα τα δύο γένη διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους (Shah, 2011). Σήμερα, το γένος *Bifidobacterium* αποτελείται από 95 είδη και 18 υποείδη (<https://www.bacterio.net/>). Τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* θεωρείται ότι προάγουν την υγεία και συνήθως η δράση τους συνδέεται με το γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων. Επίσης, ανιχνεύονται συχνά στο νωπό γάλα παρότι πολλά στελέχη του γένους αυτού έχουν αυστηρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και είναι αυστηρώς αναερόβια (Quigley *et al.*, 2013). Λόγω των προβιοτικών τους ιδιοτήτων, είδη του γένους *Bifidobacterium* (π.χ. *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*) χρησιμοποιούνται στην παραγωγή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων (Salminen *et al.*, 2011).

1.4.3. Ζύμες και μύκητες

Στο νωπό γάλα ανιχνεύεται ένα ευρύ φάσμα ζυμών και μυκήτων. Η πλειοψηφία των ζυμών που αναπτύσσονται στο γάλα χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα το γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα η ανάπτυξή τους να προκαλεί αύξηση του pH. Η επίδραση των ζυμών στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να είναι ωφέλιμη ή επιβλαβής. Ορισμένα είδη ζυμών (π.χ. *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* κ.α.) (Simova *et al.*, 2002) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή παραδοσιακών τυριών και ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το Κεφίρ και το Κούμις, όπου μέσω της παραγωγής αιθανόλης και CO₂, προσδίδουν άρωμα στο τελικό προϊόν (Büchl & Seiler, 2011). Ωστόσο, η παρουσία ζυμών στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ανεπιθύμητη στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις. Για παράδειγμα, τα είδη *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Y. lipolytica* και *Candida* spp. μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι, η κρέμα, το βούτυρο και το τυρί (Hassan & Frank, 2011).

Οι ζύμες που έχουν απομονωθεί από νωπό γάλα ανήκουν στα γένη *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Trichosporon* και *Kluyveromyces*, τα κυριότερα είδη των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.3.1 (Büchl & Seiler, 2011; Quigley *et al.*, 2013).

Πίνακας 1.4.3.1.: Τα κυριότερα είδη των ζυμών που έχουν απομονωθεί από νοπό γάλα (Büchl & Seiler, 2011; Quigley et al., 2013)

<i>Γένος</i>	<i>Είδος</i>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>
	<i>inconspicua</i>
	<i>sake</i>
	<i>intermedia</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>
	<i>farinosa</i>
	<i>membranifaciens</i>
	<i>anomala</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginosa</i>
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>curvatus</i>
	<i>carnescens</i>
	<i>victoriae</i>
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>
	<i>catenulate</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>cutaneum</i>
	<i>lactis</i>
	<i>beigelii</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>
	<i>lactis</i>

Όσον αφορά τους μύκητες, εκτός από ορισμένα είδη του γένους *Penicillium*, όπως τα είδη *Penicillium roqueforti* και *Penicillium camemberti*) που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των τυριών Roquefort και Camembert, αντίστοιχα, υπάρχουν αρκετά είδη μυκήτων που μπορεί να επιμολύνουν το γάλα, εξαιτίας της ευρείας διασποράς τους στο περιβάλλον υπό μορφή σπορίων. Οι αλλοιωγόνοι μύκητες αναπτύσσονται κυρίως σε χαμηλή θερμοκρασία και ενεργότητα νερού. Μύκητες υπάρχουν στον αέρα, το νερό και το έδαφος και βρίσκονται συχνά στον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων με αποτέλεσμα την επιμόλυνση αυτών (Sørhaug, 2011).

Τα πιο συχνά απομονωμένα γένη από το νωπό γάλα είναι τα *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Engyodontium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Verticillium* και *Eurotium* (Delavenne *et al.*, 2011; Garnier *et al.*, 2017; Lavoie *et al.*, 2011; Vacheyrou *et al.*, 2011). Οι μύκητες, ως υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, αναπτύσσονται επιφανειακά στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τέλος, ορισμένα είδη μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* παράγουν αφλατοξίνες, η παρουσία των οποίων στο γάλα είναι αποτέλεσμα κατανάλωσης ζωοτροφών μολυσμένων με αφλατοξίνες από τα ζώα (Sørhaug, 2011).

1.4.4. Αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς

Η αλλοίωση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών, αλλά και αλλαγών στην υφή και την εμφάνισή τους. Μία σημαντική κατηγορία αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αποτελούν τα ψυχρότροφα, τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν κατά τη διάρκεια της συντήρησης του γάλακτος υπό ψύξη και να οδηγήσουν σε υποβάθμιση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής του. Συγκεκριμένα, τα ψυχρότροφα, παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεάσες και λιπάσες που υδρολύουν τις πρωτεΐνες και το λίπος του γάλακτος, οδηγώντας ταυτόχρονα στην ανάπτυξη ανεπιθύμητης γεύσης (Saad *et al.*, 2013). Στην κατηγορία των ψυχρότροφων βακτηρίων περιλαμβάνονται κυρίως ραβδόμορφα Gram αρνητικά βακτήρια (π.χ. *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*), αλλά και ορισμένα στελέχη Gram θετικών βακτηρίων (πχ. σποριογόνα *Bacillus*, *Clostridium*), τα κύρια γένη των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.4.1. Τέλος, στην κατηγορία αυτή ανήκουν και ορισμένα είδη LAB, καθώς και ζυμών ή μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Erkmen & Bozoglu, 2016).

Πίνακας 1.4.4.1.: Τα κυριότερα γένη των ψυχρότροφων βακτηρίων που μπορούν να βρεθούν στο γάλα (Erkmen & Bozoglu, 2016; Ribeiro Júnior et al., 2018; Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009; Μάντης et al., 2015)

Gram αρνητικά γένη	Gram θετικά γένη
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i> (σποριογόνα)
<i>Achromobacter</i>	<i>Clostridium</i> (σποριογόνα)
<i>Acinetobacter</i>	<i>Raenibacillus</i> (σποριογόνα)
<i>Aeromonas</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Microbacterium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Aerococcus</i>
<i>Psychrobacter</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Arthrobacter</i>

Όταν οι θερμοκρασίες αποθήκευσης είναι αρκετά υψηλές για την ανάπτυξη των ψυχρότροφων βακτηρίων, αλλοιώσεις στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να προκύψουν από την ανάπτυξη ορισμένων ειδών LAB που ανήκουν στα γένη *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* (Erkmen & Bozoglu, 2016), όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.4.4.2.

Πίνακας 1.4.4.2.: Ορισμένα είδη αλλοιώσεων του γάλακτος που προκύπτουν από τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών (Erkmen & Bozoglu, 2016)

Αλλοίωση	Αλλοιωγόνα βακτήρια	Ένζυμα	Μεταβολικό προϊόν
Πρωτεόλυση	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>B. cereus</i>	Πρωτεϊνάσες, γαλακτικό οξύ	Πεπτίδια, αμινοξέα
Γεύση αλκοόλης	Yeasts	Αλκοολική αφυδρογονάση	Αιθανόλη
Πικρή γεύση	Psychrotrophic bacteria, <i>Bacillus</i>	Πρωτεϊνάσες, Λιπάσες	Πικρά πεπτίδια
Γεύση ψαριού	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Πρωτεϊνάσες	Προϊόντα με γεύση ψαριού
Φρουτώδης γεύση	<i>P. fragi</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P.</i> <i>notatum</i> , <i>C. butyricum</i>	Εστεράσες	Αιθυλεστέρες, λακτόνες
Γεύση καραμέλας και βύνης	<i>L. lactis</i> var. <i>maltigenes</i>	Οξειδάσες	3-Μεθυλοβουτανόλη
Σήψη	<i>P. putrefaciens</i> , <i>Clostridium</i>	Πρωτεϊνάσες	Πεπτόνες, αμινοξέα
Ταγγή γεύση	<i>Lipolytic bacteria</i>	Λιπάσες	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
Ινώδης υφή	LAB	Πολυμεράσες	Εξωπολυσακχαρίτες
Όξινη γεύση	<i>L. lactis</i>	Λακτάσες	Λακτάσες

Όξινη γεύση στους 10-40°C	LAB, coliforms, <i>Enterococcus</i>	Λακτάσες	Γαλακτικό, οξικό οξύ
Όξινη γεύση στους 37-50°C	<i>Lactobacillus</i> <i>thermophilus</i> , <i>S.</i> <i>thermophilus</i>	Λακτάσες	Γαλακτικό, οξικό οξύ

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.4.3., ορισμένα είδη ζυμών, όπως τα είδη *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *D. hansenii* και *Y. lipolytica*, μπορούν να δημιουργήσουν αλλοιώσεις σε όξινα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι, ενώ είδη του γένους *Candida* μπορούν να δημιουργήσουν πικρές γεύσεις και αλλοιώσεις στην υφή (αέρινη υφή - gassy texture) στα προϊόντα αυτά. Επιπλέον, ορισμένοι μύκητες, όπως είδη των γενών *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* και *Aspergillus*, αναπτύσσονται στην επιφάνεια των γιαουρτιών προσδίδοντας πικρή γεύση στο προϊόν (Hassan & Frank, 2011). Τέλος, ορισμένα από τα είδη των παθογόνων μικροοργανισμών που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, όπως τα είδη *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* και *Bacillus cereus*, θεωρούνται ψυχρότροφα, καθώς μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες <8°C (Stepaniak, 2011).

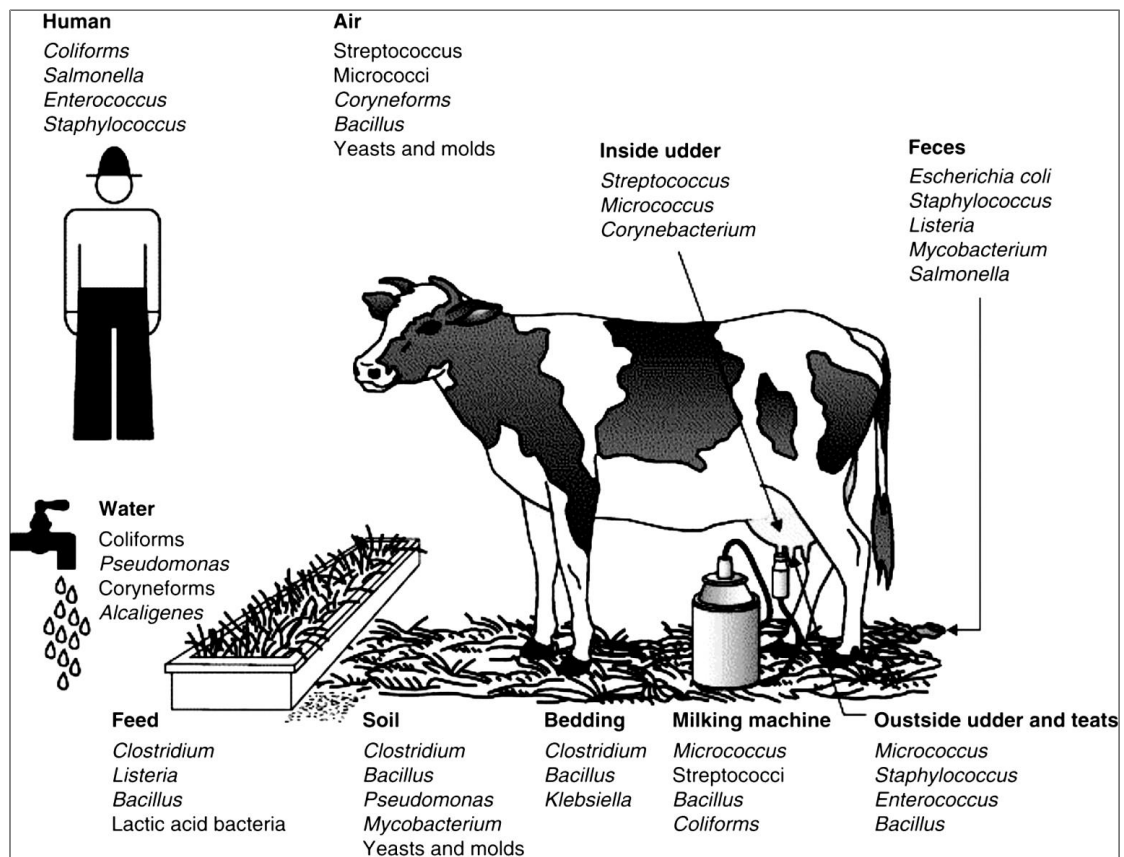
Η κατανάλωση νωπού γάλακτος, μολυσμένου με παθογόνους μικροοργανισμούς, μπορεί να οδηγήσει πολλές φορές σε σοβαρές ασθένειες (Quigley *et al.*, 2013). Παρόλο που ο κίνδυνος μόλυνσης με παθογόνα έχει ελαχιστοποιηθεί με την εφαρμογή σύγχρονων πρακτικών στην παραγωγή και την επεξεργασία του γάλακτος, τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί κρούσματα νόσων από παθογόνα, όπως τα είδη *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Y. enterocolitica* και *Escherichia coli* O157:H7 (Hassan & Frank, 2011). Τα κυριότερα είδη των παθογόνων μικροοργανισμών που ανιχνεύονται στο νωπό γάλα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.4.3., ενώ στην Εικόνα 1.4.4.1 φαίνονται οι πηγές μόλυνσής του.

Πίνακας 1.4.4.3.: Τα κυριότερα είδη των παθογόνων μικροοργανισμών που απαντώνται στο νοπό γάλα (Verraes *et al.*, 2015; Mohamed *et al.*, 2017; Saad *et al.*, 2013; Pisano *et al.*, 2019) και οι ασθένειες που προκαλούν

Μικροοργανισμός	Ασθένεια
<i>Listeria monocytogenes</i>	Λιστερίωση (αποβολές στον άνθρωπο, τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή, μηνιγγίτιδα και συμπτώματα γρίπης) (Ryser, 2011)
<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	Βρουκέλλωση (αποβολές στα βοοειδή και μελιταίος πυρετός στον άνθρωπο, αντίστοιχα) (Garin-Bastuji, 2011)
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Καμπυλοβακτηρίωση (γαντρεντερίτιδα) (Whyte <i>et al.</i> , 2011)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Φυματίωση (έλκος, φλεγμονή εντέρου, απώλεια βάρους, διάρροια, κόπωση) (Dalton & Hill, 2011)
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>	Τροφική δηλητηρίαση (λόγω τοξινών), Αεριογόνος γάγγραινα, Αλλαντίαση (<i>C. botulinum</i>) (Aureli <i>et al.</i> , 2011; Hassan & Frank, 2011)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Διφθερίτιδα, Ενδοκαρδίτιδα, Μηνιγγίτιδα (Govan, 2012)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ευκαιριακές λοιμώξεις (Govan, 2012)
<i>Coxiella burnetii</i>	Πυρετός Q (Heydel & Willems, 2011)
<i>Bacillus cereus</i>	Τροφική δηλητηρίαση (λόγω εντεροτοξινών) (Hassan & Frank, 2011)

<i>Leptospira interrogans</i>	Λεπτοσπείρωση (Hassan & Frank, 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Τροφική δηλητηρίαση (λόγω εντεροτιξινών) (Asperger & Zangerl, 2011)
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Ουρολοίμωξη, Περιτονίτιδα, Λοιμώξεις των χοληφόρων, Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα (Govan, 2012)
<i>Helicobacter pylori</i>	Πεπτικό έλκος, καρκίνος στομάχου, δυσπεψία χωρίς έλκος (Govan, 2012)
<i>Streptococcus</i> <i>zooepidemicus</i> , <i>S.</i> <i>agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i>	Οστρακιά (<i>S. pyogenes</i>), Μαστίτιδα (<i>S.</i> <i>agalactiae</i>), Πνευμονία (<i>S. zooepidemicus</i>) (Hassan & Frank, 2011)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 και <i>Shiga-toxin Escherichia</i> <i>coli</i> (STEC)	Ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο (<i>Escherichia</i> <i>coli</i> O157:H7), Τροφική δηλητηρίαση (STEC) (Hassan & Frank, 2011)
<i>Salmonella</i> spp.	Σαλμονέλωση (Hassan & Frank, 2011)
<i>Shigella</i> spp.	Σιγκέλλωση (δυσεντερία) (Villalobo, 2011)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Εντερικές λοιμώξεις (εντεροκολίτιδα στα μικρά παιδιά, μεσεντερική λεμφαδενίτιδα στα μεγαλύτερα παιδιά και τους εφήβους) (Barton, 2011)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Πνευμονία, Λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, Γαστρεντερίτιδα, Μαστίτιδα (Hassan & Frank, 2011)

<i>Enterobacter</i> spp.	Γαστρεντερίτιδα (Cooney <i>et al.</i> , 2011)
<i>Serratia marcescens</i>	Μαστίτιδα (Hassan & Frank, 2011)
<i>Proteus mirabilis</i>	Λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (Hassan & Frank, 2011)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Τοξοπλάσμωση (Hassan & Frank, 2011)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Κρυπτοσποριδίωση (κυρίως διάρροια) (Hassan & Frank, 2011)



Εικόνα 1.4.4.1: Οι πηγές μόλυνσης του νωπού γάλακτος σε μία γαλακτοκομική μονάδα (Hassan & Frank, 2011)

1.5. Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης

1.5.1. Μέθοδοι εξαρτώμενες καλλιέργειας (culture-dependent)

Οι μέθοδοι εξαρτώμενες καλλιέργειας (culture-dependent) βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες ανάπτυξης. Μέχρι τη δεκαετία του 1990, οι μέθοδοι εξαρτώμενες καλλιέργειας ήταν οι μόνες διαθέσιμες μέθοδοι για τη διερεύνηση του μικροβιώματος ενός οικοσυστήματος, ενώ μέχρι και σήμερα αποτελεί τη μοναδική μέθοδο απομόνωσης καθαρών καλλιιεργειών. Το βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν στα συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα και τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται εργαστηριακά (Hiraoka *et al.*, 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μέθοδοι αυτές έχουν σταδιακά συμπληρωθεί με μοριακές τεχνικές βασιζόμενες στην PCR, όπως η rep-PCR. Η μέθοδος rep-PCR (Repetitive Element Polymerase Chain Reaction) βασίζεται στην ενίσχυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που βρίσκονται διασκορπισμένες στους δύο κλώνους του πυρηνικού DNA του ευκαρυωτικού γονιδιώματος, καθώς και του DNA του προκαρυωτικού γονιδιώματος, με τη χρήση εκκινητή που φέρει παλίνδρομη αλληλουχία. Αρχικά, η ανακάλυψη rep αλληλουχιών έγινε στα γονιδιώματα στελεχών *E. coli* και *Salmonella* (Versalovic *et al.*, 1991). Οι εκκινητές rep έχουν μήκος 33 έως 40 bp και δημιουργούν 500 έως 1.000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Οι περιοχές μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διαφέρουν ως προς το μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, με αποτέλεσμα να παράγονται τμήματα διαφορετικών μεγεθών για κάθε στέλεχος, και συνεπώς να προκύπτουν διαφορετικά ηλεκτροφορητικά προφίλ, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους/υποείδους ή ακόμη και στελέχους (Hiatt & Seal, 2009). Τις περισσότερες φορές όμως χρειάζεται να πραγματοποιηθεί η ταξινόμηση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών και με άλλες μοριακές μεθόδους.

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων ως επί το πλείστον χρησιμοποιείται το γονίδιο 16S rRNA, το οποίο βρίσκεται στη μικρή υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA σε όλα τα είδη βακτηρίων και αποτελείται από περίπου 1600 νουκλεοτίδια. Αντίθετα, για την ταυτοποίηση των ζυμών συνηθέστερα χρησιμοποιείται η περιοχή ITS. Τέλος,

σημειώνεται ότι στη 16S-PCR και την ITS-PCR γίνεται αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου 16S και την περιοχής ITS, αντίστοιχα.

1.5.2. Μέθοδοι ανεξάρτητες καλλιέργειας (culture-independent)

Στις μεθόδους ανεξάρτητες καλλιέργειας (culture-independent) υπάγεται μια πληθώρα μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην άμεση εξαγωγή του ολικού DNA/RNA από το δείγμα (χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια) και ενίσχυσή του με PCR, στοχεύοντας ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή μια μεταβλητή περιοχή ενός επιλεγμένου γονιδίου (Pogacic *et al.*, 2010). Στη συνέχεια, προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχηση και η ταυτοποίηση των προϊόντων της PCR, χρησιμοποιούνται συνήθως διάφορες τεχνικές φυσικού διαχωρισμού, όπως η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές πηκτές διαβάθμισης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), η ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) κ.α. (Nguyen *et al.*, 2013; Panigrahi *et al.*, 2019). Η τεχνική της DGGE επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA που διαφέρουν σε ένα νουκλεοτίδιο (Nguyen *et al.*, 2013), ενώ η τεχνική της SSCP στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (nondenaturing gel) (Panigrahi *et al.*, 2019). Μία συνήθη μέθοδο, πέραν των τεχνικών του φυσικού διαχωρισμού, αποτελεί και η κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης με τη χρήση ενός φορέα κλωνοποίησης (π.χ. πλασμίδια).

Όμως, με την έλευση της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) η ανάγκη κλωνοποίησης του DNA εξαλείφθηκε. Σύμφωνα με τους Cuadros-Orellana *et al.*, (2013), η εταιρεία «454 Life Sciences» το 2004 δημιούργησε την πρώτη εμπορική πλατφόρμα NGS με βάση την πυρο-αλληλούχηση (pyrosequencing). Λίγο αργότερα, η Solexa δημιούργησε την πλατφόρμα Genome Analyzer και η Applied Biosystems την SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection). Η εξέλιξη των εργαλείων της βιοπληροφορικής και η πρόσφατη εισαγωγή τεχνικών NGS επιτρέπουν τον προσδιορισμό αλληλουχιών DNA με υψηλή απόδοση (High-throughput sequencing) αλλά και με χαμηλό κόστος. Με την NGS τα θραύσματα του DNA μπορούν να ταξινομηθούν και να ενισχυθούν στην ίδια συσκευή αλληλούχησης με δυνατότητα ανάγνωσης χιλιάδων έως εκατοντάδων δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων (bp) ανά δείγμα (Sekse *et al.*, 2017). Την τελευταία δεκαετία η NGS χρησιμοποιείται εκτενώς στη μεταγονιδιωματική ανάλυση.

Από τις τεχνολογίες NGS, τόσο η πλατφόρμα 454/Roche όσο η Illumina/Solexa εφαρμόζονται στη μεταγονιδιωματική ανάλυση, με την Illumina να είναι η επικρατέστερη. Η τεχνολογία Illumina/Solexa ακινητοποιεί τυχαία θραύσματα του DNA σε μία επιφάνεια (flow cell surface) και στη συνέχεια γίνεται ενίσχυση στερεής φάσης (solid-phase amplification) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται συστάδες πανομοιότυπων θραυσμάτων DNA και να επιτυγχάνονται πυκνότητες της τάξης των δέκα εκατομμυρίων συστάδων μορίων ανά τετραγωνικό εκατοστό. Τέλος, η αλληλούχηση με την τεχνολογία Illumina/Solexa γίνεται με τη χρήση αναστρέψιμων τερματιστών με μία διαδικασία αλληλούχησης κατά τη σύνθεση (sequencing-by-synthesis, SBS). Η τεχνολογία SBS χρησιμοποιεί τέσσερα νουκλεοτίδια με φθορίζουσα σήμανση για να αλληλουχήσει παράλληλα τις δεκάδες εκατομμύρια συστάδες (Technology Spotlight: Illumina® Sequencing, 2010; Thomas *et al.*, 2012).

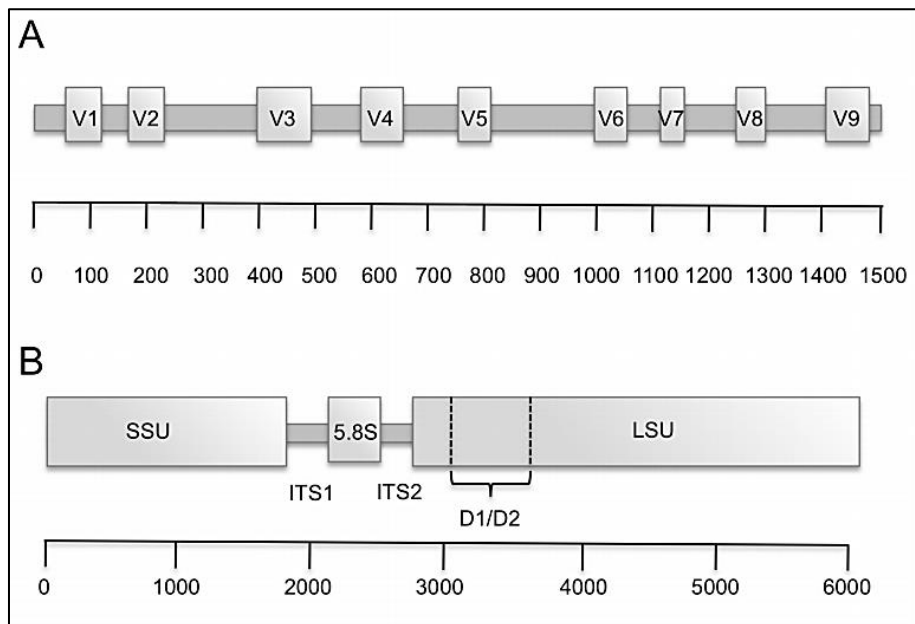
Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποτελεί πλέον ένα απαραίτητο ερευνητικό εργαλείο για την κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας, εξέλιξης και ποικιλότητας (Thomas *et al.*, 2012). Η τεχνική της μεταγονιδιωματικής περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Handelsman *et al.* (1998) όταν χρησιμοποίησε τον όρο σε μία μελέτη σχετική με τη μικροχλωρίδα του εδάφους. Ως μεταγονιδιωματική ορίζεται η μελέτη του μεταγονιδιώματος, δηλαδή του ολικού γονιδιωματικού DNA ενός περιβαλλοντικού δείγματος. Η μεταγονιδιωματική επιτρέπει τη βαθύτερη κατανόηση του οικολογικού ρόλου, του μεταβολικού προφίλ, και της εξελικτικής ιστορίας των μικροοργανισμών ενός δεδομένου οικοσυστήματος μέσω της απευθείας ανάλυσης του DNA, χωρίς να έχει προηγηθεί η καλλιέργεια των μικροοργανισμών αυτών (Kim *et al.*, 2013). Συνδυαστικά με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση, άλλες ωμικές προσεγγίσεις, όπως η μεταγραφωμική, η μεταπρωτεωμική ή η μεταβολωμική μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό τη μελέτη της έκφρασης διαφόρων γονιδίων και των παραγόμενων μεταβολιτών (Wilmes & Bond, 2006; Gilbert *et al.*, 2010a). Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η μεταγονιδιωματική ανάλυση, ωστόσο, αδυνατεί να διαχωρίσει τους νεκρούς και από τους ζωντανούς μικροοργανισμούς (De Filippis *et al.*, 2017).

Δύο προσεγγίσεις μεταγονιδιωματικής ανάλυσης εφαρμόζονται ευρέως για τη μελέτη της μικροβιακής οικολογίας: (A) η αλληλούχηση αμπλικονίων (amplicon-based metagenomics) και (B) η μαζική παράλληλη αλληλούχηση (shotgun metagenomics). Αυτές σε συνδυασμό με την εφαρμογή εργαλείων βιοπληροφορικής, διευρύνουν σημαντικά τη δυνατότητα άντλησης ενός μεγάλου εύρους πληροφοριών από πολύπλοκα

οικοσυστήματα. Στη μεταγονιδιωματική ανάλυση η ταυτοποίηση μπορεί να γίνει είτε με σύγκριση του ποσοστού ομοιότητας των γονιδίων με άλλα γονίδια που είναι ήδη καταχωρημένα σε βάσεις δεδομένων (π.χ. BLAST), είτε με πρόβλεψη των γονιδίων μέσω προγραμμάτων (π.χ. GeneMark), χωρίς την ύπαρξη ομόλογων σε βάσεις δεδομένων (Kunin *et al.*, 2008). Πεδίο εφαρμογής της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αποτελούν τόσο οι περιβαλλοντικές μελέτες όσο και η έρευνα βιολογικών δεικτών. Παραδείγματα ορισμένων επιστημών όπου εφαρμόζεται αποτελούν η γεωργία, τα τρόφιμα, τα φαρμακευτικά προϊόντα και η εγκληματολογία (Hiraoka *et al.*, 2016).

Η αλληλούχηση αμπλικονίων γίνεται με τη χρήση συντηρημένων περιοχών-στόχων ως φυλογενετικών δεικτών, όπως τμήματα του γονιδίου 16S rRNA ή της ενδομεταγραφόμενης περιοχής ITS για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών/μυκήτων, αντίστοιχα (Ενότητα 1.5.1.) (Sekse *et al.*, 2017).

Το γονίδιο 16S rRNA εκτός από τις συντηρημένες περιοχές περιλαμβάνει και εννέα μεταβλητές περιοχές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμησή τους (Εικόνα 1.5.1.1.) (Bukin *et al.*, 2019). Οι περιοχές, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οι V1-V3 και V3-V4 (Zheng *et al.*, 2015). Από την άλλη πλευρά, για την ταυτοποίηση των ζυμών χρησιμοποιούνται κυρίως οι περιοχές ITS (Internal Transcribed Spacer) και συγκεκριμένα οι περιοχές ITS1 και ITS2 που βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων 18S (μικρή υπομονάδα ή small subunit, SSU) και 28s (μεγάλη υπομονάδα ή large subunit, LSU) που κωδικοποιούν rRNA, ενώ ενδιάμεσα των δύο περιοχών παρεμβάλλεται η υπομονάδα 5.8s (Εικόνα 1.5.1.1.) (Cuadros-Orellana *et al.*, 2013).

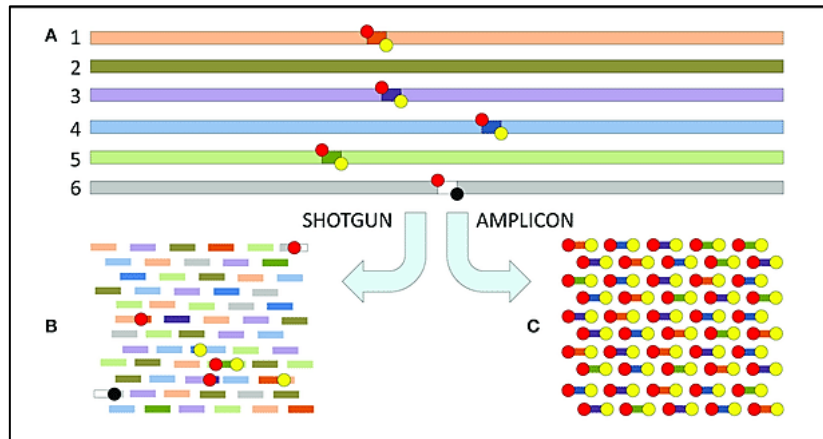


Εικόνα 1.5.2.1.: A. Το γονίδιο 16S rRNA και B. Οι περιοχές ITS που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών, αντίστοιχα (Bokulich & Mills, 2012)

Η χρήση του 16S rRNA γονιδίου ως φυλογενετικού δείκτη έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική και οικονομική τακτική για τη μικροβιολογική ανάλυση ενός δείγματος. Στα πλεονεκτήματα της αλληλούχησης αμπλικονίων συγκαταλέγονται η διάθεση πολλών και περιεκτικών βάσεων δεδομένων αναφοράς (reference databases), η ευκολότερη ανάλυση μέσω των εργαλείων της βιοπληροφορικής και η δυνατότητα ανίχνευσης σπάνιων ταξινομικών βαθμίδων (Stefanini & Cavalieri, 2018). Ωστόσο, τα πρωτόκολλα φυλογενετικών δεικτών που βασίζονται σε PCR είναι ευάλωτα σε σφάλματα αλληλούχησης, ενώ παράλληλα η ταξινόμηση αρκετών μικροοργανισμών γίνεται με αξιοπιστία μόνο σε επίπεδο γένους παρέχοντας μόνο περιορισμένες λειτουργικές πληροφορίες. Οι περιορισμοί αυτοί έχουν δημιουργήσει ανησυχίες σχετικά με την ακρίβεια της αλληλούχησης αμπλικονίων με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πιο αξιόπιστων μεθόδων (Rausch *et al.*, 2019), όπως η μαζική παράλληλη αλληλούχηση.

Η μαζική παράλληλη αλληλούχηση, σε αντίθεση με την αλληλούχηση αμπλικονίων, δεν γίνεται με τη χρήση περιοχών-στόχων αλλά με τη χρήση ολόκληρου του DNA του δείγματος. Για το λόγο αυτόν, προσφέρει το πλεονέκτημα της ταξινόμησης βακτηρίων σε επίπεδο είδους και στελέχους, δίνοντας παράλληλα λειτουργικές πληροφορίες για τη σχέση βακτηρίου-ξενιστή και επιτρέποντας την ταξινόμηση νέων μικροοργανισμών που έως τώρα ήταν άγνωστοι στους ερευνητές. Ωστόσο, η αβεβαιότητα που υπάρχει για την

ακριβή αναγνώριση των μικροοργανισμών σε επίπεδο είδους και στελέχους (Tu *et al.*, 2014) σε συνδυασμό με το σχετικά υψηλό κόστος και τα πιο αναπτυγμένα εργαλεία βιοπληροφορικής που απαιτεί έχουν περιορίσει τη χρήση της για μικροβιολογικές αναλύσεις σε ευρεία κλίμακα (Rausch *et al.*, 2019).



Εικόνα 1.5.2.1.: Η προσέγγιση της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης (*shotgun metagenomics*) (B), σε αντίθεση με την αλληλούχηση αμπλικονίων (*amplicon-based metagenomics*) (C)

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν (Α) η διερεύνηση του μικροβιώματος του νωπού αίγειου γάλακτος από Ελληνικές φάρμες μέσω κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης, σύγχρονων μοριακών μεθόδων και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης και (Β) ο προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων και η ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος του νωπού αίγειου γάλακτος.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Προέλευση των δειγμάτων

Τα 22 δείγματα του νοπού αίγειου γάλακτος που αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη προήλθαν από φάρμες διαφόρων περιοχών της Ελλάδας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1.1. Συγκεκριμένα, οι κτηνοτρόφοι κάθε φάρμας συνέλλεγαν 1 L γάλακτος, 0,5 L από την πρωινή και 0,5 L από τη βραδινή άμελξη σε μπουκάλια νερού, τα οποία στέλνονταν υπό ψύξη στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία ψύξης (4°C) έως ότου πραγματοποιηθεί η κλασική μικροβιολογική ανάλυση (εντός 24 ωρών).

Πίνακας 3.1.1: Προέλευση των δειγμάτων νοπού αίγειου γάλακτος, εκτρεφόμενη φυλή και αριθμός αιγών κάθε φάρμας και διάστημα μεταξύ τοκετού και λήψης του δείγματος

Φάρμα	Περιοχή	Φυλή	Αριθμός ζώων	Διάστημα μεταξύ τοκετού και λήψης δείγματος γάλακτος (μήνες)
1	Βοιωτία	Ετερόχθονη (Εγγώρια Αίγα-Murciana, Alpine, Saanen)	350	4
2	Εύβοια	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	600	4
3	Αττική	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	200	4
4	Κεφαλονιά	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	300	3
5	Αρκαδία	Μίξη αυτόχθονων (Εγγώρια Αίγα-Σκοπέλου)	1300	4
6	Λακωνία	Μίξη αυτόχθονης με ετερόχθονη (μίξη Εγγώριας Αίγας με Saanen, Alpine)	280	2

7	Ηράκλειο	Μίξη αυτόχθονης με ετερόχθονη (μίξη με Saanen, Alpine)	150	4
8	Φωκίδα	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	130	5
9	Κορινθία	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	250	2-4
10	Νάξος	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	700-1000	5
11	Λέσβος	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	89	2-3
12	Λάρισα	Αυτόχθονη (Εγγώρια Αίγα)	140	2
13	Λάρισα	Murciana	130	2
14	Ηλεία	Ετερόχθονη (μίξη ντόπιας με Murciana, Alpine, Saanen)	100	3-7

15	Σκόπελος	Αυτόχθονη (Σκοπέλου)	200	3-6
16	Αιτωλία-Ακαρνανία	Αυτόχθονη (Εγχώρια Αίγα)	60	4
17	Ιωάννινα	Μίξη Εγχώριας Αίγας με Damascus	250	3-4
18	Ξάνθη	Μίξη ετερόχθονων (μίξη Damascus με Anglonubian)	200	3-4
19	Μεσσηνία	Μίξη αυτόχθονης με ετερόχθονη (μίξη με Σκοπέλου, Murciana, Damascus)	75	3-6
20	Πιερία	Αυτόχθονη (Εγχώρια Αίγα)	140	4
21	Χανιά	Αυτόχθονη (Εγχώρια Αίγα)	300	3-5
22	Χανιά	Μίξη αυτόχθονης με ετερόχθονη (μίξη με Alpine)	450	3-5

Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρις ότου προσδιοριστεί η σύστασή τους. Τέλος, ποσότητα γάλακτος από κάθε δείγμα αποθηκευόταν στους -40°C και στους -80°C προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση των λιπαρών οξέων και του αντιοξειδωτικού συστήματος, αντίστοιχα.

3.2. Προσδιορισμός του pH και της σύστασης του αίγειου γάλακτος

Η μέτρηση του pH των δειγμάτων του αίγειου γάλακτος γινόταν με τη χρήση ψηφιακού πεχαμέτρου 827 pH lab (Metrohm, Herisau, Switzerland) την ημέρα παραλαβής του κάθε δείγματος, ενώ η σύστασή τους (λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη, ολικά στερεά και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους) προσδιορίστηκε με τη συσκευή Milkoscan Foss FT120 (Εικόνα 3.2.1) στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σημειώνεται ότι ο προσδιορισμός του pH των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε δύο φορές σε κάθε ένα από αυτά, ενώ η συσκευή Milkoscan πραγματοποιεί διπλή μέτρηση σε κάθε δείγμα και στο τέλος καταγράφει τον μέσο όρο αυτών.



Εικόνα 3.2.1.: Η συσκευή Milkoscan Foss FT120

(<http://blankingdesign.com/design/science-medical-products/foss-milkoscan-ft120/>)

Η αρχή λειτουργίας της συσκευής αυτής βασίζεται στην υπέρυθη φασματοσκοπία (IR), όπου οι διάφορες ομάδες συστατικών απορροφούν την ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος της περιοχής του υπέρυθρου. Η συσκευή μπορεί να μετρήσει μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα κάθε δείγμα γάλακτος και να υπολογίσει τα ποσοστά του λίπους, της πρωτεΐνης, της λακτόζης, των ολικών στερεών και του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους.

3.3. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στο αίγαιο γάλα

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στα δείγματα του αίγειου γάλακτος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.3.1. Εκχύλιση του λίπους του γάλακτος

Για την παραλαβή του λίπους του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Jiang *et al.* (1996). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon τοποθετούνται 8,5 ml γάλακτος στους 37°C, 15 ml ισοπροπανόλης (C_3H_8O) και 11,25 ml εξανίου (C_6H_{14}), τα οποία αναδεύονται σε αναδευτήρα (vortex) για 3 min. Κατόπιν τοποθετούνται για φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 5 min στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, όπου παρατηρείται διαχωρισμός δύο φάσεων, παραλαμβάνονται 10 ml από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon. Στον παλιό σωλήνα προστίθενται 11,25 ml εξανίου και μετά από φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, συλλέγονται εκ νέου 10 ml από το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Στη συνέχεια, στις συλλεχθείσες υπερκείμενες φάσεις (30 ml) προστίθενται 7,5 ml διαλύματος θειικού νατρίου (Na_2SO_4) 0,47 M ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Μετά από 5 min αφού επέλθει διαχωρισμός των φάσεων, συλλέγονται 20 ml από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Το ποτήρι ζέσεως μεταφέρεται σε κλίβανο στους 30°C για περίπου 20 ώρες και μετά την εξάτμιση του εξανίου γίνεται η παραλαβή του λίπους.

3.3.2. Μεθυλεστεροποίηση του λίπους του γάλακτος

Για τη μεθυλεστεροποίηση του λίπους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Kelly *et al.* (1998). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 40 mg λίπους, 2 ml εξανίου και 40 μl οξικού μεθυλεστέρα (methyl acetate, $C_3H_6O_2$), και ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex). Στη συνέχεια προστίθενται 40 μl αντιδραστηρίου που παρασκευάζεται με την εξής αναλογία: 1,75 ml μεθανόλης (CH_4O) και 0,4 ml μεθυλικού νατρίου (sodium methylate, CH_3ONa) 5,4 M. Αφού αναδευτούν καλά, αφήνονται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 60 μl διαλύματος οξαλικού οξέος που παρασκευάζεται διαλύοντας 1 g οξαλικού οξέος ($C_2H_2O_4$) σε 30 ml διαιθυλαιθέρα ($C_4H_{10}O$). Κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση σε συνθήκες

5.000 rpm/ 5 min/ 4°C. Σε γυάλινο φιαλίδιο vial (Εικόνα 3.3.2.1.), προστίθενται 90 μl από το υπερκείμενο και 10 μl εσωτερικού πρότυπου διαλύματος (standard) που παρασκευάζεται από το λιπαρό οξύ C_{23:0} το οποίο δεν απαντάται στο γάλα. Τέλος, τα vials σφραγίζονται με το ειδικό καπάκι και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν στον αέριο χρωματογράφο.



Εικόνα 3.3.2.1.: Το γυάλινο φιαλίδιο vial πριν τη σφράγιση του με το ειδικό καπάκι

3.3.3. Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του αίγειου γάλακτος με αέρια χρωματογραφία

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

Κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος ταυτοποιήθηκε με βάση το πρότυπο των 37 γνωστών μεθυλεστέρων (FAME) (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) και ποσοτικοποιήθηκε με βάση το εσωτερικό πρότυπο. Επιπλέον, για την περαιτέρω ανίχνευση κάποιων σημαντικών λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα λιπαρά οξέα σε μορφή μεθυλεστέρων, όπως το C_{18:2} cis-9, trans-11 και το C_{18:2} trans-10, cis-12 (ισομερή του CLA), καθώς και το C_{18:1} trans-11 (βασσενικό οξύ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Τέλος, τα λιπαρά οξέα εκφράστηκαν ως επί % των συνολικών λιπαρών οξέων του δείγματος.

Για την ευκολότερη αλλά και σαφέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων κρίθηκε σκόπιμη η ομαδοποίηση των λιπαρών οξέων, σύμφωνα με τους Tsiplakou *et al.* (2008), ως εξής:

- Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA) = $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{11:0}$
- Μέσης αλύσου λιπαρά οξέα (MCFA) = $C_{12:0} + C_{14:0} + C_{15:0} + C_{16:0}$
- Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (LCFA) = $C_{17:0} + C_{18:0} + C_{22:0}$
- Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) = $C_{18:2n-6t} + C_{18:2n-6c} + C_{18:3n-3} + C_{20:3n-3} + C_{18:2$

c9,t11

- Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) = $C_{14:1} + C_{16:1} + C_{17:1} + C_{18:1 \text{ trans}} + C_{18:1 \text{ t11}} + C_{18:1 \text{ c9}}$

- Ακόρεστα λιπαρά οξέα (UNFA) = PUFA + MUFA
- Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) = SCFA + MCFA + LCFA
- Κορεσμένα/Ακόρεστα (SFA/UNFA) = $(SCFA + MCFA + LCFA) / (PUFA + MUFA)$

Τέλος, ο αθηρωματικός δείκτης (Atherogenicity Index, AI) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $(C_{12:0} + 4 * C_{14:0} + C_{16:0}) / PUFA + MUFA$, όπως περιγράφεται από τους Ulbricht & Southgate (1991).

3.4. Ανάλυση αντιοξειδωτικού συστήματος

Η ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος στα δείγματα του αίγιου γάλακτος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι αναλύσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς και ο προσδιορισμός των οξειδωτικών δεικτών περιγράφεται αναλυτικά από τους Tsiplakou *et al.* (2017). Για τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο GENESYS 180 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) (Εικόνα 3.4.1.).



Εικόνα 4.4.1.: Το φασματοφωτόμετρο GENESYS 180 UV-Vis Spectrophotometer που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος

3.4.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Για την ανάλυση της δραστηριότητας των περισσότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων (LPO, GR, GSH-Px, SOD) απαιτείται η χρήση αποκορυφωμένου γάλακτος. Για τον σκοπό αυτό, ποσότητα 1,5 ml γάλακτος, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 14.000 g και στους 4°C προκειμένου να διαχωριστεί το λίπος του γάλακτος, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνθηκε. Κατόπιν έγινε έντονη ανάδευση για 2 min σε συσκευή vortex, ώστε να αναμειχθούν εκ νέου ο ορός με τις καζεΐνες και το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος. Εν συνεχεία το αποκορυφωμένο δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να ακολουθήσει η ανίχνευση των ενζύμων.

1. Λακτοϋπεροξειδάση (Lactoperoxidase, LPO)

Αντιδραστήρια:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) (100 mM) (Alfa Aesar), pH=5,5
- ii. 2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS)
- iii. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (0,024%) (Sigma-Aldrich)

Διαδικασία:

20 μl αποκορυφωμένου γάλακτος προστίθενται σε 980 μl working solution που αποτελείται από 714 μl διαλύματος KH_2PO_4 , 233 μl διαλύματος ABTS και 33 μl διαλύματος H_2O_2 .

Συνθήκες:

Θερμοκρασία (°C)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS (nm)	Χρόνος (s)
25	5,5	1	436	180

Δραστικότητα:
$$\text{Units/ml} = (\Delta A/\text{min}) / (29,3 * V_{\text{δείγματος(ml)}})$$

2. Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR)

Αντιδραστήρια:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) (100 mM) (Alfa Aesar) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (3,4 mM), pH=7,6
- ii. L-Γλουταθειόνη (oxidized, GSSG) (30 mM) (Sigma-Aldrich)
- iii. β -NADPH (0,8 mM) (Panreac ITW Companies)
- iv. Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) (1% w/v) (Alfa Aesar)

Διαδικασία:

100 μl αποκορυφωμένου γάλακτος προστίθενται σε 900 μl working solution που αποτελείται από 500 μl διαλύματος KH_2PO_4 και EDTA, 33 μl διαλύματος GSSG, 117 μl διαλύματος β -NADPH, 33 μl διαλύματος BSA και 217 μl δις-αποσταγμένου νερού (double distilled water, dd H_2O).

Συνθήκες:

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

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

3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GSH-Px)

Αντιδραστήρια:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH₂PO₄) (100 mM) (Alfa Aesar) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) (1 mM) (Panreac ITW Companies), pH=7
- ii. L-Γλουταθειόνη (reduced, GSH) (75 mM) (Alfa Aesar)
- iii. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (0,047% v/v) (Sigma-Aldrich, CO, USA)
- iv. β-NADPH (10mM) (Alfa Aesar)
- v. Αναγωγή της γλουταθειόνης (from baker's yeast *S.cerevisiae*) (GRD) (Sigma-Aldrich)

Διαδικασία:

30 μl αποκορυφωμένου γάλακτος προστίθενται σε 650 μl working solution που αποτελείται από 519 μl ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ και EDTA, 8 μl διαλύματος GSH, 30 μl διαλύματος H₂O₂, 12 μl διαλύματος β-NADPH και 1 μl διαλύματος GRD.

Συνθήκες:

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

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

4. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD)

Αντιδραστήρια:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) (216 mM) (Alfa Aesar), pH=7,8
- ii. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) (10,7 mM) (Panreac ITW Companies),
- iii. Κυτόχρωμα C (1,1 mM) (Sigma-Aldrich)
- iv. Διάλυμα ξανθίνης (0,108 mM) (Alfa Aesar),
- v. Ενζυμικό διάλυμα οξειδάσης ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XOD) (0,05 units/ml dd H_2O) (Sigma-Aldrich)

Διαδικασία:

10 μl αποκορυφωμένου γάλακτος προστίθενται σε 957 μl reaction cocktail που αποτελείται από KH_2PO_4 , EDTA, κυτόχρωμα C και διάλυμα ξανθίνης, ενώ πριν από τη μέτρηση της απορρόφησης προστίθενται ακόμη 33 μl διαλύματος XOD. Σημειώνεται ότι πριν γίνει η μέτρηση των δειγμάτων του γάλακτος προηγείται η μέτρηση της απορρόφησης της κυψελίδας «no inhibition» (χωρίς αναστολή), η οποία περιέχει 934 μl reaction cocktail, 33 μl dd H_2O και 33 μl διαλύματος XOD.

Συνθήκες:

Θερμοκρασία (°C)	pH	Μήκος οπτικής διαδρομής	ABS (nm)	Χρόνος (s)
25	7,8	1	550	300

Δραστηκότητα: $\text{Units/ml} = \% \text{ αναστολή} / (50 * V_{\text{δείγματος(ml)}})$, όπου:

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

5. Καταλάση (Catalase, CAT)

Αντιδραστήρια:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) (50 mM) (Alfa Aesar), pH=7
- ii. Διάλυμα υπεροξειδάσης (800-1.200 units/mg)

- iii. Φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (150 mM) (Alfa Aesar)
- iv. 4-αμινο-αντιπυρίνη (2,25 mM)
- v. 3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζολοσουλφονικό οξύ (2 mM)
- vi. Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (200 mM)
Η απορρόφηση του H₂O₂ μετράται σε UV στα 240nm.
- vii. Τερματικό διάλυμα αζιδίου του νατρίου (Sodium Azide) (15 mM)

Διαδικασία:

Στο σωληνάριο erpendorf προστίθενται 75 μl μη αποκορυφωμένου γάλακτος και 25 μl διαλύματος H₂O₂, ενώ στο σωληνάριο erpendorf του μάρτυρα 75 μl ρυθμιστικού διαλύματος KH₂PO₄ (pH=7) και 25 μl διαλύματος H₂O₂. Ακολουθεί επώαση για 4 min και προσθήκη 900 μl τερματικού διαλύματος αζιδίου του νατρίου. 10 μl μεταφέρονται σε ένα νέο erpendorf και προστίθενται 990 μl διαλύματος που αποτελείται από διάλυμα υπεροξειδάσης, KH₂PO₄ (150 mM), 4-αμινο-αντιπυρίνης (2,25 mM) και 3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζολοσουλφονικού οξέος (2 mM). Ακολουθεί επώαση για 12 min και φυγοκέντρηση σε συνθήκες 8.000 rpm/ 2 min/ 28°C. Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρεται στην κυψελίδα ώστε να γίνει η μέτρηση της απορρόφησή του.

Συνθήκες:

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

Δραστικότητα:
$$\text{Units/ml} = (\text{ABS}_{\text{blank}} - \text{ABS}_{\text{sample}}) * 1 * 100 / (4 * 0,075)$$

3.4.2. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

Η απομόνωση του αντιοξειδωτικού περιεχομένου του γάλακτος βασίζεται στους Li *et al.* (2007).

1. Μέθοδος FRAP

Η FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου) αποτελεί μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το 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. Κατά την αναγωγή του Fe(III) σε Fe(II), παρουσία TPTZ, σχηματίζεται ένα χρωματισμένο σύμπλοκο που απορροφά σε μήκος κύματος 593 nm.

Παρασκευή διαλυμάτων:

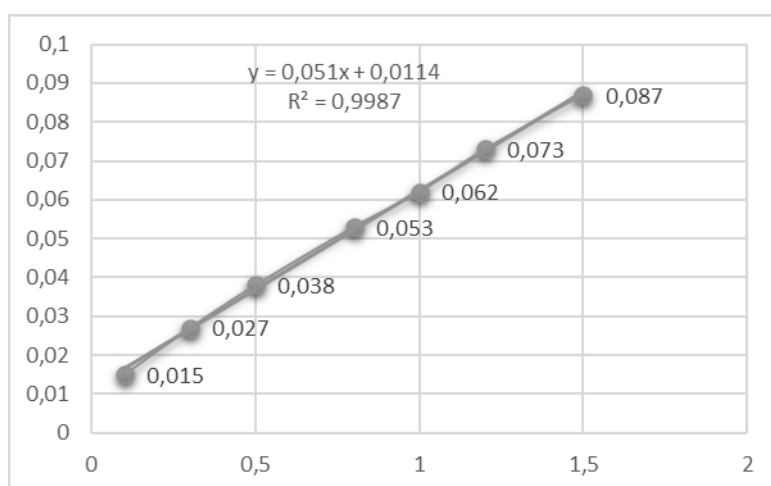
- A. 300 mM CH₃COONa * 3 H₂O (pH = 3,6)
- B. 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) (C₁₈H₁₂N₆) (Sigma-Aldrich) + 40 mM HCl
- C. 20 mM FeCl₃ (Alfa Aesar) * 6 H₂O

Παρασκευάζεται το διάλυμα FRAP με την αναλογία των παραπάνω διαλυμάτων ως εξής: A:B:C→10:1:1. Το διάλυμα ακολουθώς επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 37°C.

Διαδικασία:

100 μl γάλακτος προστίθενται σε 900 μl διαλύματος FRAP και αφήνονται στους 37°C για 4 min. Στη συνέχεια, η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 593 nm. Ως πρότυπο χρησιμοποιείται διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 1 mM.

μM ασκορβικού οξέος	0,1	0,3	0,5	0,8	1	1,2	1,5
ABS ασκορβικού οξέος	0,015	0,027	0,038	0,053	0,062	0,073	0,087

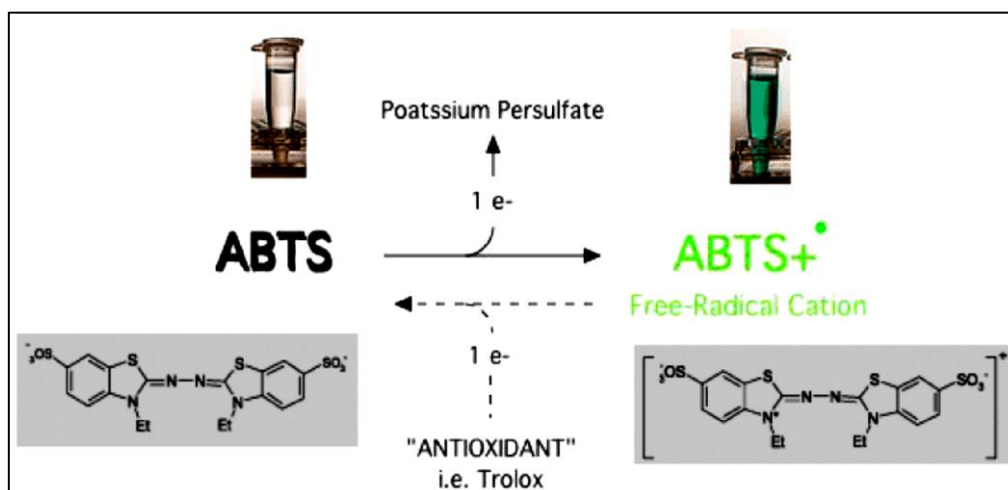


Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε μM με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Τιμή FRAP } (\mu\text{M}) = (\text{ABS}_{\text{sample}} - 0,0114) / 0,051$$

2. Μέθοδος ABTS

Το ABTS παρουσία υπερθειικού καλίου ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Με την προσθήκη αντιοξειδωτικού η ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ανάγεται και αποχρωματίζεται (Εικόνα 3.4.2.1.). Εν συνεχεία, προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης στα 734 nm του διαλύματος της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



Εικόνα 3.4.2.1.: Η χημική αντίδραση της ABTS (Boligon et al., 2014)

Παρασκευή διαλυμάτων:

- A. 2,2'-Azino-bis-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$) (7 mM) (Alfa Aesar)
- B. Υπερθειικό κάλιο ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (2,45 mM) (Sigma-Aldrich)
- C. Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) (0,005 M) (pH = 7,4)

Διαδικασία:

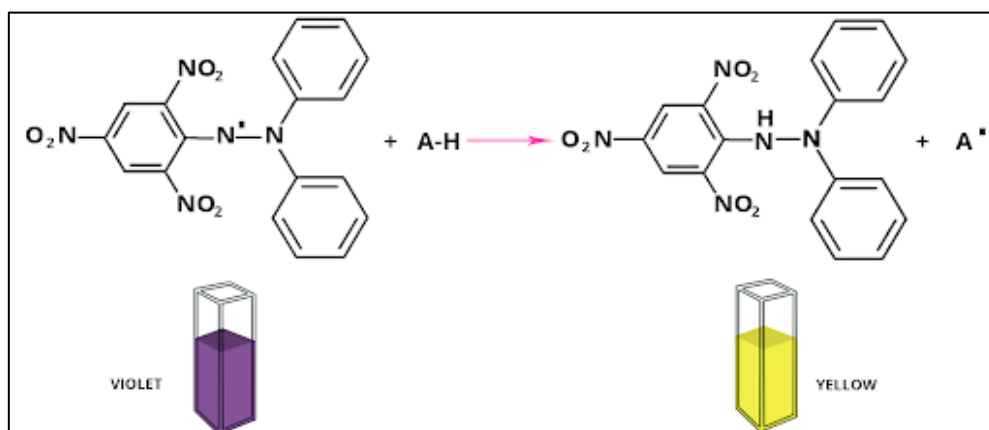
Το stock solution της ABTS παρασκευάζεται διαλύοντας 3,84 mg ABTS σε 1 ml νερού και στη συνέχεια προστίθεται σε 1 ml διαλύματος $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Το διάλυμα αυτό επωάζεται

στο σκοτάδι για 12-16 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ακολούθως, παρασκευάζεται το working solution, διαλύοντας το stock solution της ABTS χρησιμοποιώντας PBS μέχρι η απορρόφηση στα 734 nm να είναι $0,7 \pm 0,005$. Για τη μέτρηση των δειγμάτων, 10 μl γάλακτος προστίθενται σε 990 μl ABTS working solution, ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm έναντι αυτής του διαλύματος αναφοράς (PBS). Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε αναστολή % με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

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

3. Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Η σταθερή ρίζα DPPH[•] αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται) μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) (Εικόνα 3.4.2.2.). Εν συνεχεία, προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης στα 515 nm του διαλύματος της ρίζας DPPH μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



Εικόνα 3.4.2.2.: Η χημική αντίδραση της DPPH

(<http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>)

Παρασκευή διαλυμάτων:

- A. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (C₁₈H₁₂N₅O₆) (0,6 mM) (Sigma-Aldrich)
- B. Μεθανόλη (CH₃OH)

Διαδικασία:

Το διάλυμα της DPPH παρασκευάζεται διαλύοντας 23,8 mg DPPH σε 100 ml διαλύματος μεθανόλης και ακολουθεί αραιώση 1/10. Για τη μέτρηση της απορρόφησης, 20 μl γάλακτος προστίθεται σε 980 μl αραιωμένου διαλύματος DPPH, γίνεται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση απορρόφησης στα 515 nm. Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε αναστολή % με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

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

3.4.3. Οξειδωτικοί δείκτες

1. Μέθοδος μηλονικής αλδεϋδης (Malondialdehyde, MDA)

Η μηλονική αλδεϋδη αντιδρά με το θειοβαρβουτουρικό οξύ σχηματίζοντας ένα προϊόν με δύο μόρια θειοβαρβουτουρικού οξέος, με αποτέλεσμα το διάλυμα να χρωματίζεται ροζ και να απορροφά στα 532 nm (Dasgupta & Klein, 2014).

Παρασκευή διαλυμάτων:

- i. 1% Ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4) (Panreac ITW Companies)
- ii. 0,6 % Θειοβαρβουτουρικό οξύ (TBA) (Sigma-Aldrich)

Διαδικασία:

1 ml μη αποκορυφωμένου γάλακτος προστίθενται σε διάλυμα που αποτελείται από 7 ml διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος και 2 ml διαλύματος TBA. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 100°C για 60 min. Όταν τα δείγματα απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, η απορρόφησή τους μετρήθηκε στα 532 nm. Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε μM με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = (\text{ABS}/155) * 1000$$

2. Μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Protein Carbonyls, PC)

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων οξειδωμένων πρωτεϊνών με την 2,4- δινιτροφαινυλο-υδραζίνη προς σχηματισμό υδραζονών με χαρακτηριστική απορρόφηση στα 375 nm (Dasgupta & Klein, 2014).

Αντιδραστήρια:

- i. 2,4- δινιτροφαινυλο-υδραζίνη (DNPH) (10 mM) (Sigma-Aldrich) σε HCl (2,5 N).
- ii. Διάλυμα ουρίας (5 M) (pH = 2,3)
- iii. Τριγλωροξικό οξύ (TCA) 20% (Sigma-Aldrich)
- iv. Τριγλωροξικό οξύ (TCA) 10%
- v. Διάλυμα αιθανόλης : οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) (Merck KGaA)

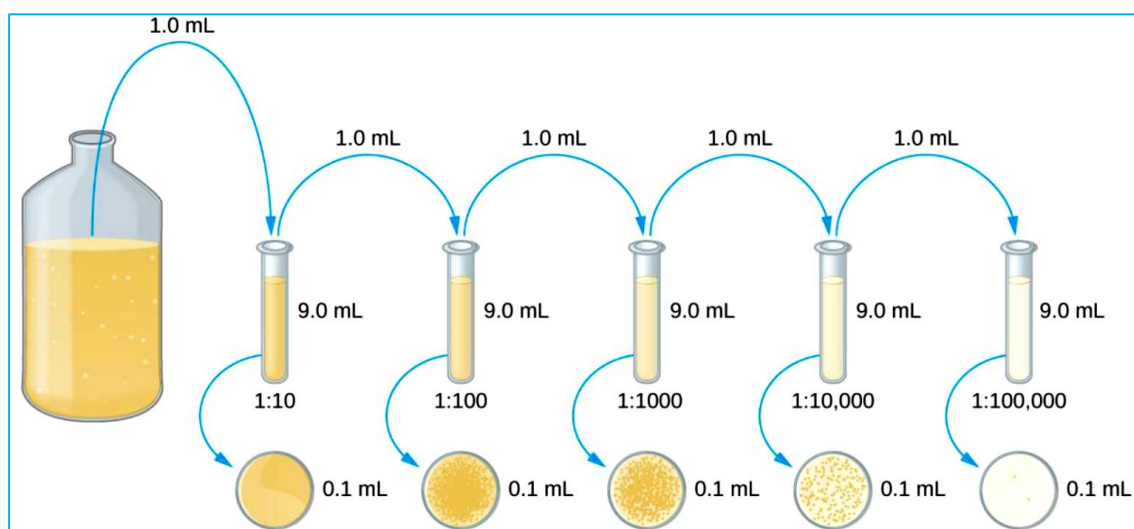
Διαδικασία:

50 μl διαλύματος TCA 20% προστίθενται σε 50 μl μη αποκορυφωμένου γάλακτος, ακολουθεί σύντομο vortex, επώαση στον πάγο για 15 min και φυγοκέντρηση στις 15.000 g/ 5 min/ 22°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μl διαλύματος DNPH σε HCl 2,5N για τα δείγματα ή 500 μl διαλύματος HCl 2,5N για τον μάρτυρα, και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, με σύντομο vortex κάθε 15 min. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στις 15.000 g/ 5 min/ 22°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθεται 1 mL διαλύματος TCA 10%, ακολουθεί σύντομο vortex και φυγοκέντρηση στις 15.000 g/ 5 min/ 22°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, στο ίζημα προστίθεται 1 mL διαλύματος αιθανόλης: οξικού αιθυλεστέρα και ακολουθεί σύντομο vortex και φυγοκέντρηση στις 15.000 g/ 5 min/ 22°C. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθεται στο ίζημα 1 mL διαλύματος ουρίας, ακολουθεί σύντομο vortex και επώαση στους 37°C για 15 min. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 15.000 g/ 3 min/ 22°C, και η απορρόφηση μετράται στα 375 nm. Οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων μετατρέπονται σε πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml) με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$PC \text{ (nmol/ml)} = ABS * 45,45$$

3.5. Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών

Η κλασική μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων του αίγειου γάλακτος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών εντός 24 ωρών από την ημέρα παραλαβής τους. Αρχικά, τα δείγματα του νωπού αίγειου γάλακτος υπέκειντο σε 6-7 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (Εικόνα 3.5.1.), υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν 9 mL διαλύματος Ringer (0.9% w/v NaCl).



Εικόνα 3.5.1.: Η διαδικασία των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων

(https://mediasrv.aua.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH154/lab2_sampling.pdf)

Για κάθε δεκαδική αραιώση χρησιμοποιήθηκε ένα τρυβλίο. Ακολούθησε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και σε συγκεκριμένες συνθήκες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5.1.

Πίνακας 3.5.1.: Τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα, οι ομάδες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αυτά, η θερμοκρασία, οι ημέρες επώσης, ο αερισμός και η τεχνική εμβολιασμού που ακολουθήθηκε

Θρεπτικό υπόστρωμα	Ομάδα Μικροοργανισμών	Θερμοκρασία επώσης (°C)	Ημέρες επώσης	Αερισμός	Τεχνική εμβολιασμού
MRS agar (Conda)	Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι	30	2	Αναερόβιες (διπλή στρώση)	Ενσωμάτωση (1 ml) + Κυκλοεξαμίδιο (1:1000)
MRS agar (Conda)	Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι	42	2	Αναερόβιες (διπλή στρώση)	Ενσωμάτωση (1 ml) + Κυκλοεξαμίδιο (1:1000)
M17 agar (Biokar)	Μεσόφιλοι κόκκοι	30	2	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση (1 ml) + Κυκλοεξαμίδιο (1:1000)
M17 agar (Biokar)	Θερμόφιλοι κόκκοι	42	2	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση (1 ml) + Κυκλοεξαμίδιο (1:1000)

Rogosa agar (Biokar)	NSLAB	30	3-5	Αναερόβιες (διπλή στρώση)	Ενσωμάτωση (1 ml)
KAA agar (Merk)	Εντερόκοκκοι	37	1	Μικροαερόφιλες	Επιφανειακή εξάπλωση (0,1 ml)
VRBGA (Lab M)	Εντεροβακτήρια	37	1	Αναερόβιες (διπλή στρώση)	Ενσωμάτωση (1 ml)
PCA (Lab M)	Ολική μεσόφιλη χλωρίδα	30	4	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση (1 ml)
PCA (Lab M)	Ψυχρότροφα	4	10	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση (1 ml)
YGC agar (Conda)	Ζύμες	25	3-5	Μικροαερόφιλες	Επιφανειακή εξάπλωση (0,1 ml)

Μετά από την επώαση των τρυβλίων στις συνθήκες που φαίνονται στον Πίνακα 3.5.1., έγινε καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών βάσει του αριθμού αποικιών που αναπτύχθηκαν σε αυτά. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν για απαρίθμηση περιείχαν <300 αποικίες και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε log cfu/ml.

3.6. Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών

Από τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των θερμοφίλων και μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων και κόκκων, των NSLAB και των ζυμών/μυκήτων (MRS 42°C και 30°C, M17 42°C και 30°C, Rogosa και YGC, αντίστοιχα) ακολούθησε παρατήρηση των αποικιών στο στερεοσκόπιο και επιλέχθηκαν αποικίες με διαφορετική μορφολογία (μέγεθος, σχήμα και χρώμα). Στη συνέχεια, οι αποικίες μεταφέρθηκαν σε μικροφιαλίδια τύπου vial (CRYO.STM) που περιείχαν 600 μl Nutrient Broth (Biokar, France) και 200 μl γλυκερόλη, με σκοπό τη συντήρησή τους στους -80°C.

Για τον καθαρισμό των αποικιών επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές αποικίες βάσει της μορφολογίας τους. Οι επιλεγμένες αποικίες αφού αποψύχθηκαν μεταφέρθηκαν από τα vials σε δοκιμαστικούς σωλήνες με το κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (5 mL). Σημειώνεται πως για τον καθαρισμό των αποικιών χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες επώασης και τα ίδια υποστρώματα από τα οποία απομονώθηκε η κάθε αποικία, ενώ ως υγρά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα υλικά χωρίς την προσθήκη άγαρ. Μετά την ανάπτυξή τους, εξαπλώθηκαν σε τρυβλίο με την τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) και τη χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου μιας χρήσης, ώστε να προκύψουν μεμονωμένες αποικίες. Έτσι, εάν οι αποικίες που παρατηρούνταν στο στερεοσκόπιο ήταν ομοιόμορφες ως προς το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα, τότε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου η μεμονωμένη αποικία μεταφερόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση Gram (Παράρτημα 7.1) και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού (x100). Για τη λήψη των ψηφιακών φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SigmaScan Pro 5. Τέλος, από κάθε υγρή καλλιέργεια που περιείχε την καθαρή αποικία μεταφέρθηκαν 200 μl σε αποστειρωμένα vials και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.7. Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών

3.7.1. Απομόνωση DNA από βακτήρια

Η απομόνωση DNA από τα κύτταρα των βακτηρίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Pitcher *et al.* (1989) μερικώς τροποποιημένο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στηρίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου GES το οποίο περιέχει θειοκυανιούχο γουανιδίνη (guanidinium thiocyanate), ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα πρωτεϊνών, με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA, καθώς επίσης και στη χρήση των ενζύμων λυσοζύμη και μουτανολυσίνη, υπεύθυνων για τη λύση των κυττάρων τόσο των Gram θετικών (όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια) όσο και των Gram αρνητικών. Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό MRS ή M17 και επώαστηκαν στους 42 ή 30°C για 24-48 ώρες. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

- Παραλαβή κυττάρων από 5 mL καλλιέργειας σε σωληνάρια τύπου erpendorf και φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm/2min/20°C.
- Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (Phosphate-buffered saline, PBS) (0,8% w/v NaCl, 0,02% w/v KCl, 0,144% w/v Na₂HPO₄, 0,024% w/v KH₂PO₄, pH 7,4), με σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm/2 min/ 20°C.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml PBS και επώαση στους 65°C για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 9.000 rpm/1 min/20°C και πλήρους απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 100 μl λυσοζύμης (50 mg/ml, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Munich, Germany) διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8), 10 μl μουτανολυσίνης (5 U/μl, Sigma-Aldrich) και 10 μl RNAάσης (RNase, Sigma-Aldrich). Εν συνεχεία έγινε επώαση στους 37°C για 30 min με περιοδική ανάδευση των μικροφιαλιδίων ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποικοδόμησης του DNA, ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε με ήπιες κινήσεις.
- Μεταφορά των μικροφιαλιδίων σε απαγωγό και προσθήκη 0,5 ml αντιδραστηρίου GES (60g Guanidium thiocyanate, 0,5 mol/L EDTA, 10% v/v Sarkosyl) σε κάθε μικροφιαλίδιο, ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 10 min. Προσθήκη 0,25 ml

παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 mol/L) και μετά από ήπια ανάδευση, παραμονή των μικροφιαλιδίων στον πάγο για 10 min. Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου, ήπια ανάδευση ώστε να αναμειχθούν οι δύο φάσεις και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm/15min/4°C.

- Προσεκτική μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό μικροφιαλίδιο και αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 2-3 φορές.
- Προσθήκη 0,54 του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση μέχρι να κατακρημνιστεί το DNA.
- Φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm/2min/4°C και απόχυση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70%) ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα. Φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm/3min/4°C και απόχυση υπερκειμένου. Το πλύσιμο με την αιθανόλη επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές.
- Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με τη χρήση πιπέτας και τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 37°C για 2-3 min ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη, χωρίς όμως να στεγνώσει το DNA.
- Διαλυτοποίηση του DNA σε 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE και ήπια ανάδευση.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37°C για 1-2 h και μεταφορά αυτών στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

Μέτρηση της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητάς του DNA σε φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 Read First UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) με τη χρήση του προγράμματος Q5000 V6.0.3. Η φωτομέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 260 nm και υπολογίσθηκε αυτόματα η συγκέντρωση (ng/μl) από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.). Ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με παράλληλη μέτρηση στα μήκη κύματος 280 nm και 260 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Όταν ο λόγος των O.D. A_{260}/A_{280} είναι 1,8-2 nm τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Ένας ακόμη δείκτης καθαρότητας είναι ο λόγος A_{260}/A_{230} που αφορά τα σάκχαρα και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8-2,2 nm για δείγματα υψηλής καθαρότητας. Αποκλίσεις από τις παραπάνω τιμές οφείλονται στην ύπαρξη πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων προσμίξεων, και δημιουργούν δυσκολίες στην μετέπειτα

ενίσχυση του DNA. Τα δείγματα μετά τη μέτρηση τοποθετήθηκαν στους 4°C μέχρι να υποβληθούν σε rep-PCR. Τέλος, τα δείγματα μετά τη φωτομέτρηση αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό ώστε η τελική συγκέντρωση σε DNA να είναι ίση με 50 ng/μl με σκοπό να ακολουθήσει η ομαδοποίησή τους με τη μέθοδο rep-PCR.



Εικόνα 3.7.1.1.: Το φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 Read First UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA)

3.7.2. Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων με τη μέθοδο rep-PCR

Για την ομαδοποίηση των στελεχών εφαρμόστηκε η τεχνική της rep-PCR στον θερμικό κυκλοποιητή MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) (Εικόνα 3.7.2.1).



Εικόνα 3.7.2.1.: Ο θερμικός κυκλοποιητής MiniAmp Thermal Cycler

Πίνακας 3.7.2.1.: Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινήτης της *rep-PCR* για τα βακτήρια

Αντιδραστήριο	OneTaq-quick load	DNA	Primer	BSA	<u>Τελικός</u>
	2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	template (50ng) + ddH ₂ O	Boxair (10pmol/μl)	(20 mg/ml)	<u>όγκος</u>
Ποσότητα ανά αντίδραση	12,5 μl	11 μl	1 μl	0,5 μl	<u>25 μl</u>

Η αλληλουχία του εκκινήτη Boxair είναι:

5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'

Συνθήκες αντίδρασης

- 2 min στους 92°C
- 30 κύκλοι
 - ✓ 30 s στους 92°C
 - ✓ 2 min στους 40°C

- ✓ 3 min στους 72°C
- Παραμονή για 15 min στους 72°C
- Παραμονή στους 10°C

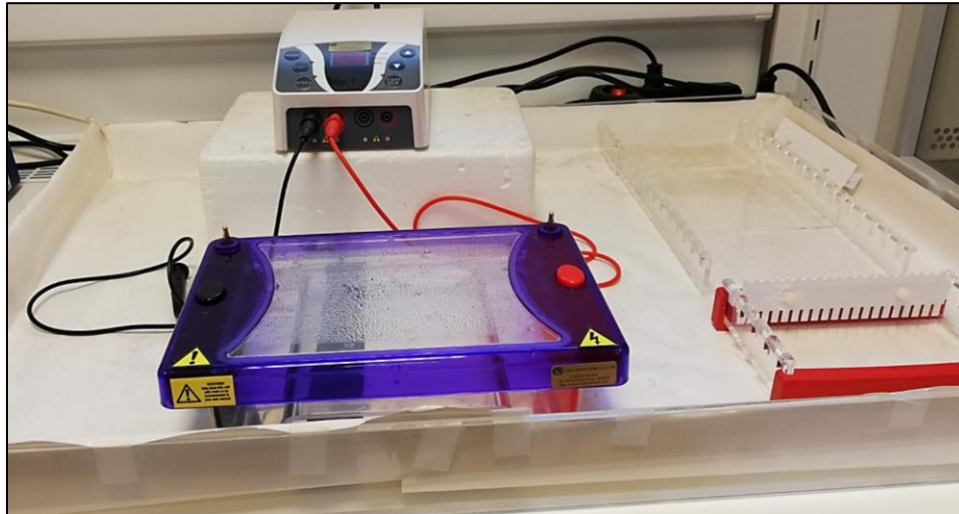
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για να παρατηρηθεί το προφίλ των ζωνών που δίνει κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της *rep*-PCR σε πηκτή αγαρόζης, με εφαρμογή σταθερής τάσης 60 V για 140 min. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 1,56 g σκόνης αγαρόζης και 120 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1xTAE (running buffer) (1,3% w/v)
- 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- Για την παρασκευή του μάρτυρα (marker) χρησιμοποιήθηκαν 5 μl “1 kb plus DNA Ladder” (0,5 μg/μL), 5 μl “10x BlueJuice Gel Loading Buffer” (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) και 40 μl TE.

Σημειώνεται ότι οι ποσότητες που φορτώθηκαν σε κάθε πηγαδάκι ήταν 18 μl για το κάθε δείγμα και 10 μl για τον μάρτυρα μοριακών μαζών. Ο μάρτυρας περιέχει κλάσματα DNA γνωστού μοριακού βάρους και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του μεγέθους του DNA των εξεταζόμενων δειγμάτων, η οποία γίνεται αντιστοιχίζοντας την εμφανιζόμενη ζώνη του εξεταζόμενου DNA με τη ζώνη του μάρτυρα που βρίσκεται στο ίδιο ύψος.

Για να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή GelDoc-It Imager (Ultra-Violet Products, UK), η οποία διαθέτει λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. Όταν η πηκτή εκτεθεί στην υπεριώδη ακτινοβολία τα τμήματα του DNA που ενισχύονται διακρίνονται ως φωτεινές ζώνες λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου. Στη συσκευή περιέχεται ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου καταγράφονται οι εικόνες της ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του προγράμματος VisionWorks.



Εικόνα 3.7.2.2.: Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης

Επεξεργασία των εικόνων της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics

Για την ομαδοποίηση των στελεχών των βακτηρίων ακολούθησε επεξεργασία των εικόνων της ηλεκτροφόρησης στο πρόγραμμα BioNumerics v.6.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium). Το πρόγραμμα αυτό συγκρίνει τα ηλεκτροφορητικά προφίλ των στελεχών μεταξύ τους, αλλά και με το μάρτυρα, και με βάση τα ποσοστά ομοιότητάς τους, τα ομαδοποιεί σε ένα δενδρόγραμμα. Έτσι, στελέχη με ποσοστά ομοιότητας >90% θεωρήθηκε ότι αποτελούν μία ομάδα.

3.7.3. Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA

Πριν ξεκινήσει η προετοιμασία των δειγμάτων για την 16S-PCR, το DNA αραιώθηκε και μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων ώστε η συγκέντρωσή του να είναι ίση με 200 ng/μl.

Πίνακας 3.7.3.1.: Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητές της 16S PCR

Αντιδραστήριο	OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	DNA template (200ng) + ddH ₂ O	Primers 16S F & 16S R (10pmol/μl)	BSA (20 mg/ml)	<u>Τελικός</u> <u>όγκος</u>
Ποσότητα ανά αντίδραση	25 μl	22,5 μl	1 μl 16S F 1 μl 16S R	0,5 μl	<u>50 μl</u>

Η αλληλουχία του εκκινητή 16S F (Ntougias *et al.*, 2006) είναι:

5' – GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG – 3'

Η αλληλουχία του εκκινητή 16S R είναι:

5' – AGAAAGGAGGTGATCCAGCC – 3'

Συνθήκες αντίδρασης

- 3 min στους 94°C
- 30 κύκλοι
 - ✓ 30 s στους 94°C
 - ✓ 30 s στους 56°C
 - ✓ 80 s στους 72°C
- Παραμονή για 5 min στους 72°C
- Παραμονή στους 10°C ∞

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης με εφαρμογή σταθερής τάσης 100V για 30 min για τον έλεγχο του μεγέθους και της καθαρότητας του προϊόντος της αντίδρασης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρθηκε στη συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Takara Bio USA, Inc.) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, του ρυθμιστικού διαλύματος και των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού βάρους για να παραμείνει μόνο το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών.

Το πρωτόκολλο καθαρισμού περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Προσθήκη 50 μl dd H₂O ώστε ο συνολικός όγκος του προϊόντος της PCR να είναι 100 μl
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος πρόσδεσης NT1 (binding buffer) στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR
- Μεταφορά του διαλύματος (300 μl) στη στήλη, για πρόσδεση του DNA σε αυτή, φυγοκέντρηση (11.000g/ 1min/ 20°C) και απόρριψη του διηθήματος
- Προσθήκη 700 μl αλκοολούχου διαλύματος NT3 στη στήλη, φυγοκέντρηση (11.000g/ 1min/ 20°C) και απόρριψη του διηθήματος
- Επανάληψη φυγοκέντρησης (11.000g/ 1min/ 20°C) ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του NT3
- Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό φιαλίδιο των 1,5 ml και παραμονή σε κλίβανο στους 37°C για 2 min για να εξατμιστεί η αιθανόλη
- Προσθήκη 25 μl διαλύματος έκλυσης NE στη στήλη, παραμονή για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000g/ 1min/ 20°C)
- Επανατοποθέτηση του διαλύματος έκλυσης NE από το φιαλίδιο στη στήλη, παραμονή για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000g/ 1min/ 20°C)
- Στο διήθημα περιέχεται πλέον το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20°C

Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων μετά την PCR

Η συγκέντρωση του DNA στα καθαρισμένα δείγματα μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων της Quawell και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο. Εν συνεχεία, η ταυτοποίηση των στελεχών μετά την αλληλούχηση του 16S

rRNA γονιδίου, πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων Nucleotide collection (nt), χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.7.4. Απομόνωση DNA από ζύμες

Για την απομόνωση του DNA των ζυμών, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Kopsahelis *et al.* (2009), μερικώς τροποποιημένο. Η απομόνωση DNA των κυττάρων των ζυμών στηρίζεται στη χρήση του γλυκοζιτικού ενζύμου λυτικάση υπεύθυνου για τη λύση των κυττάρων, καθώς και του διαλύματος δωδεκασουλφονικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS), ενός παράγοντα που αποδιατάσσει πρωτεΐνες με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα ζυμών που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό που περιείχε Yeast Extract και γλυκόζη (0,5% w/v Yeast Extract και 2% w/v γλυκόζη) και επώαστηκαν στους 25°C για 24-48 ώρες. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

- Παραλαβή κυττάρων από 5 mL καλλιέργειας σε σωληνάρια τύπου erpendorf και φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm/5min/20°C.
- Απόχυση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL αποστειρωμένου νερού. Ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση 12.500 rpm/5min/20°C. Απόχυση και δεύτερη επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,5 mL αποστειρωμένου νερού και ανάδευση σε συσκευή vortex. Επώαση στους 65°C για 10 min και ξανά φυγοκέντρηση. Το στάδιο αυτό αφορά στον καθαρισμό των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό.
- Απόχυση του υπερκειμένου και φυγοκέντρηση στις 12.500 rpm/1min/20°C. Παραλαβή υπερκειμένου με τη χρήση πιπέτας. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 M σορβιτόλης (D-Sorbitol, Serva, Heidelberg, Germany) και 0,1M Na₂EDTA (AppliChem, Darmstadt, Germany), pH 7,5.
- Προσθήκη 200 μL λυτικάσης (*Lyticase Arthobacter luteus*, L4025, SigmaAldrich, Steinheim, Germany) και 10 μL RNAάσης, ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση για 1 h στους 37°C (ανάδευση κάθε 10 min). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.500

rpm/5min/20°C, απόχυση του υπερκειμένου, φυγοκέντρωση στις 12.500 rpm/1min/20°C και παραλαβή του υπερκειμένου με τη χρήση πιπέτας.

- Ανασύσταση του ιζήματος σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και 20mM EDTA (pH 7,4), καθώς και 50 μL SDS 20% w/v. Ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 65°C για 30 min. Στο σημείο αυτό ολοκληρώνεται η λύση του κυττάρου.
- Προσθήκη 0,2 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (SigmaAldrich, Steinheim, Germany) 7,5M και ήπια ανάδευση. Παραμονή των δειγμάτων για 1h σε πάγο.
- Φυγοκέντρωση στις 12.500 rpm/10min/4°C. Μεταφορά όλου του υπερκειμένου σε καθαρό σωληνάριο τύπου erpendorf. Το βήμα επαναλαμβάνεται ολόκληρο για δεύτερη φορά.
- Προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης 100% v/v (Merck, Darmstadt, Germany), ανάδευση με το χέρι και παραμονή για 5 min στον πάγο. Το DNA είναι αδιάλυτο σε οργανικό διαλύτη με αποτέλεσμα στο σημείο αυτό να γίνεται η κατακρήμνισή του.
- Φυγοκέντρωση υπό ψύξη στις 12.500 rpm/10min/4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου και με τη χρήση πιπέτας.
- Πλύση του ιζήματος με 700 μL παγωμένης αιθανόλης (70% v/v), ανάδευση με το χέρι και φυγοκέντρωση υπό ψύξη στις 8.000 rpm/5min/4°C. Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με απόχυση και χρήση πιπέτας. Επανάληψη ολόκληρου του βήματος για δεύτερη φορά.
- Τοποθέτηση των σωληνάρων τύπου erpendorf στους 37°C για 1-2 min για να εξατμιστεί η εναπομείνουσα αιθανόλη, προσέχοντας να μην στεγνώσει το ίζημα.
- Διαλυτοποίηση του DNA σε 25 μL διαλύματος TE και ήπια ανάδευση. Παραμονή στους 37°C για 1-2h.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.

Μετά την απομόνωση, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων, με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των βακτηρίων (Ενότητα 3.6.1).

3.7.5. Ομαδοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR

Τα δείγματα DNA των ζυμών που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε ενίσχυση των τμημάτων του γενετικού υλικού μέσω rep-PCR στον θερμικό κυκλοποιητή MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific).

Πίνακας 3.7.5.1.: Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινήτης της rep-PCR για τις ζύμες

Αντιδραστήριο	OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	DNA template (50ng) + ddH ₂ O	Primer (GTG) ₅ (10pmol/μl)	BSA (10 mg/ml)	<u>Τελικός όγκος</u>
Ποσότητα ανά αντίδραση	12,5 μl	10,5 μl	1 μl	1 μl	<u>25 μl</u>

Η αλληλουχία του εκκινήτη (GTG)₅ είναι:



Συνθήκες αντίδρασης rep-PCR

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

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της rep-PCR σε πηκτική αгарόζης με εφαρμογή σταθερής τάσης 60 V για 140 min, φωτογράφιση της πηκτικής αгарόζης και επεξεργασία των εικόνων της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics

v.6.1 (Applied Maths, Keistraat, Belgium) για την ομαδοποίηση των στελεχών των ζυμών (όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 3.7.2.).

3.7.6. Ταυτοποίηση στελεχών ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS

Τα απομονωμένα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Korabecna *et al.* (2007). Προτού ξεκινήσει η προετοιμασία των δειγμάτων για την ITS-PCR, το DNA αραιώθηκε και μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων ώστε η συγκέντρωσή του να είναι ίση με 200 ng/μl.

Πίνακας 3.7.6.1.: Αντιδραστήρια, ποσότητες & εκκινητές της ITS-PCR για τις ζύμες

Αντιδραστήριο	OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolabs, UK)	DNA template (200ng) + ddH ₂ O	Primers ITS1 & ITS4 (10pmol/μl)	BSA (10 mg/ml)	<u>Τελικός</u> <u>όγκος</u>
Ποσότητα ανά αντίδραση	25 μl	22 μl	1 μl ITS1 1 μl ITS4	1 μl	<u>50 μl</u>

Η αλληλουχία του εκκινητή ITS1 είναι:

5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'

Η αλληλουχία του εκκινητή ITS4 είναι:

5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

Συνθήκες αντίδρασης

- 4 min στους 94°C
- 35 κύκλοι
 - ✓ 1 min στους 94°C

- ✓ 2 min στους 55,5°C
- ✓ 2 min στους 72°C
- Παραμονή για 10 min στους 72°C

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης, με εφαρμογή σταθερής τάσης 100V για 30 min για τον έλεγχο του μεγέθους και της καθαρότητας του προϊόντος της αντίδρασης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αγαρόζης μεταφέρθηκε στη συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

Τέλος, μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, τα δείγματα αποστέλλονται για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο ώστε στη συνέχεια να γίνει η ταυτοποίησή τους (Κεφάλαιο 3.7.3.).

3.8. Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Στα 22 δείγματα του νωπού αίγιου γάλακτος πραγματοποιήθηκε μεταγονιδιωματική ανάλυση αλληλούχησης αμπλικονίων με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών που ενισχύουν την περιοχή V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA και την περιοχή ITS1-ITS2 των βακτηρίων και ζυμών/μυκήτων, αντίστοιχα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ολικού DNA των δειγμάτων, προκειμένου να επιτευχθεί η απαραίτητη ελάχιστη συγκέντρωση του DNA (2 ng/μL) και ο ελάχιστος τελικός όγκος του (20-30 μL). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR του γονιδίου 16S rRNA σε όλα τα δείγματα DNA με σκοπό την αξιολόγηση της ύπαρξης παρεμποδιστών σε αυτά.

3.8.1. Απομόνωση ολικού DNA

Η απομόνωση του ολικού DNA των δειγμάτων του νωπού αίγιου γάλακτος έγινε με τη βοήθεια του DNeasy PowerFood Microbial Kit, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

- Προσθήκη 1,8 ml νωπού γάλακτος σε περιέκτη συλλογής των 2 ml (παρέχεται από το kit) και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.

- Απομάκρυνση του λίπους που βρίσκεται επιφανειακά, απόχυση του υπερκειμένου υγρού και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απομάκρυνση του λίπους που βρίσκεται επιφανειακά, απομάκρυνση του υπερκειμένου υγρού με πιπέτα και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου υγρού με πιπέτα και προσθήκη 450 μl διαλύματος MBL (55°C). Ακολουθεί vortex.
- Μεταφορά των επαναιωρημένων κυττάρων σε ένα PowerBead Tube.
- Χρήση του Bead beater, μίας συσκευής μηχανικής λύσης των κυττάρων, σε συνθήκες 5.500 rpm για 2 κύκλους διάρκειας 18 s.
- Φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου υγρού (≈400 μL) σε έναν καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 ml και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C. Το βήμα επαναλαμβάνεται.
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος IRS, σύντομο vortex και επώαση στους 2-8°C για 5 min.
- Φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C και μεταφορά του υπερκειμένου υγρού (≈450 μl) σε έναν καθαρό περιέκτη συλλογής 2 ml. Το βήμα επαναλαμβάνεται.
- Προσθήκη 900 μl διαλύματος MR (55°C) και vortex.
- Φόρτωση 650 μl του υπερκειμένου υγρού σε μία στήλη (MB Spin Column) και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απόχυση του υγρού και επανάληψη του προηγούμενου βήματος μέχρι όλο το υπερκείμενο να έχει περάσει από τη στήλη.
- Τοποθέτηση της στήλης σε έναν καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 ml.
- Προσθήκη 650 μl διαλύματος PW και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απόχυση του υγρού, προσθήκη 650 μl της αιθανόλης (παρέχεται από το kit) και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απόχυση του υγρού και φυγοκέντρηση 13.000 g/2 min/20°C.
- Τοποθέτηση της στήλης σε έναν καθαρό περιέκτη συλλογής των 2 ml και παραμονή στους 37°C για 3 min.
- Προσθήκη 25 μl dd H₂O (70°C) στο κέντρο της στήλης, επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.

- Επανευδάτωση της στήλης με τα 25 μl dd H₂O του προηγούμενου βήματος, παραμονή για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 13.000 g/1 min/20°C.
- Απόρριψη της στήλης και ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Μέτρηση της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του DNA

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων με τη χρήση του προγράμματος Q5000 V6.0.3, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 3.7.1.

3.8.2. Αλληλούχηση γονιδίου 16S rRNA και περιοχής ITS

Πριν σταλούν τα δείγματα DNA για μεταγονιδιωματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε 16S-PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας του DNA ως προς την ύπαρξη παρεμποδιστών (Κεφάλαιο 3.7.3.).

Στη συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση αμπλικονίων (bTEFAP®) στο Molecular Research LP (MR DNA, Shallowater, Texas, USA) με χρήση της πλατφόρμας Illumina MiSeq, όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Papademas *et al.* (2019). Περιληπτικά, η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλομορφίας βασίστηκε στην ενίσχυση των περιοχών υψηλής μεταβλητότητας V1-V3 του γονιδίου του 16S rRNA χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 27F (5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') και 519R (5'-GTN TTA CNG CGG CKG CTG-3'), ενώ η ταυτοποίηση των ζυμών/μυκήτων βασίστηκε στην ενίσχυση της περιοχής ITS1-ITS2 χρησιμοποιώντας με τους εκκινητές ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') και ITS2R (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'). Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) στις εξής συνθήκες: 94°C για 3 min, 30 κύκλοι σε θερμοκρασίες 94°C για 30 s, 53°C για 40 s και 72°C για 1 min, ενώ το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε στους 72°C για 5 min. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε, επίσης, σύμφωνα με τους Papademas *et al.*, (2019). Οι λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational taxonomic units, OTUs) προσδιορίστηκαν μετά την αφαίρεση των OTUs που

αντιπροσωπεύονται από έναν κλώνο της βιβλιοθήκης (singletons). Η ομαδοποίηση βασίστηκε σε ποσοστό διαφοράς 3% μεταξύ των αλληλουχιών (διαχωρισμός των κλώνων σε επίπεδο γένους) και ποσοστό ομοιότητας 97% (Papademas *et al.*, 2019).

3.9. Στατιστική ανάλυση

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης ήταν το SPSS v.26.0 (International Business Machines Corporation, IBM). Προκειμένου να εφαρμοστεί η διαχωριστική ανάλυση (discriminant analysis), τα 22 δείγματα του νωπού αίγιου γάλακτος ομαδοποιήθηκαν με βάση την περιοχή προέλευσής τους σε τέσσερις ομάδες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.9.1.

Πίνακας 3.9.1.: Ομαδοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση

	Όνομασία ομάδας	Κωδικοί δειγμάτων
Ομάδα 1	Στερεά Ελλάδα	1, 2, 3, 8, 16
Ομάδα 2	Βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Ήπειρος, Μακεδονία, Θράκη)	12, 13, 17, 18, 20
Ομάδα 3	Πελοπόννησος	5, 6, 9, 14, 19
Ομάδα 4	Νησιωτικές περιοχές (Κεφαλονιά, Κρήτη, Νάξος, Λέσβος, Σκόπελος)	4, 7, 10, 11, 15, 21, 22

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των βακτηρίων και ζυμών/μυκήτων της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης των δειγμάτων της παρούσας μελέτης, αυτά εκφράστηκαν ως % σχετική αφθονία και μεταφορτώθηκαν στη διαδικτυακή πλατφόρμα του MetaboAnalyst με σκοπό τη στατιστική τους ανάλυση.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH καθώς και των κυρίων συστατικών (λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη, ολικά στερεά και στερεά άνευ λίπους) των δειγμάτων του νοπού αίγειου γάλακτος.

Πίνακας 4.1.1.: Οι τιμές του pH και τα ποσοστά (%) των κυρίων συστατικών των δειγμάτων του νοπού αίγειου γάλακτος (ανάλυση Milkoscan¹)

Δείγμα	pH	Λίπος (% w/w)	Πρωτεΐνη (% w/w)	Λακτόζη (% w/w)	Ολικά Στερεά (% w/w)	Στερεά Άνευ Λίπους (% w/w)
1	6,71	2,69	4,13	4,49	12,00	9,23
2	6,68	5,94	3,70	4,56	14,83	8,88
3	6,36	6,70	4,38	4,23	16,13	9,24
4	6,67	7,40	3,84	4,59	16,57	9,06
5	6,58	4,94	3,79	4,37	13,72	8,77
6	6,68	4,13	3,07	4,53	12,17	8,19
7	6,69	4,03	3,31	4,44	12,26	8,34
8	6,45	6,10	4,46	4,59	16,00	9,69
9	6,60	4,87	3,53	4,71	13,70	8,84
10	6,65	4,44	3,94	4,74	13,82	9,30
11	6,63	4,99	3,24	4,60	13,33	8,44
12	6,75	4,47	3,74	4,39	13,20	8,74
13	6,65	5,35	3,36	4,74	13,98	8,71

14	6,72	6,17	2,98	4,29	13,84	7,85
15	6,49	4,97	3,67	4,46	13,70	8,74
16	6,71	3,19	3,01	4,36	10,94	7,95
17	6,65	4,53	3,46	4,19	12,70	8,25
18	6,63	3,59	3,28	4,57	11,92	8,45
19	6,67	4,10	3,26	4,05	11,83	7,89
20	6,46	3,73	3,20	4,39	11,78	8,18
21	6,56	5,22	3,49	4,44	13,71	8,53
22	6,57	5,34	3,52	4,34	13,77	8,47
Εύρη τιμών	6,36-6,75	2,69-7,40	2,98-4,46	4,05-4,74	10,94-16,57	7,85-9,69
Μέσος όρος	6,62	4,86	3,56	4,46	13,45	8,62
(± τυπική απόκλιση)	(± 0,10)	(± 1,12)	(±0,40)	(±0,17)	(±1,45)	(±0,48)

¹: διπλή μέτρηση των συστατικών του δείγματος μέσω του Milkoscan και καταγραφή του μέσου όρου

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.1.1., το pH των 22 δειγμάτων του αίγειου γάλακτος κυμαινόταν από 6,36 έως 6,75. Όσον αφορά στα κύρια συστατικά του γάλακτος, το λίπος κυμαινόταν από 2,69 έως 7,40% w/w, η πρωτεΐνη από 2,98 έως 4,46% w/w, η λακτόζη από 4,05 έως 4,74% w/w, τα ολικά στερεά από 10,94 έως 16,57% w/w και τα στερεά άνευ λίπους από 7,85 έως 9,69% w/w (Πίνακας 4.1.1.). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τους Park *et al.* (2007), το pH του αίγειου γάλακτος κυμαίνεται από 6,50 έως 6,80, ενώ το λίπος κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 7,8%, η πρωτεΐνη 2,38 και 5,1%, η λακτόζη 3,9 και 6,3% και τα ολικά στερεά 11,9 και 16,3% (Barłowska *et al.*, 2011; Alichanidis *et al.*, 2016). Οι ελάχιστες αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ των τιμών των δειγμάτων και των τιμών από τις συγκεκριμένες βιβλιογραφικές αναφορές είναι αμελητέες καθώς το γάλα αποτελεί βιολογική έκκριση και ως εκ τούτου επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων που επιδρούν στη σύστασή του. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι γενετικοί (π.χ. φυλή), φυσιολογικοί (π.χ. στάδιο γαλακτικής περιόδου) και περιβαλλοντικοί (π.χ. διατροφή, κλίμα, μέθοδος άμελξης).

4.2. Το προφίλ των λιπαρών οξέων του αίγειου γάλακτος

Τα τελευταία χρόνια το καταναλωτικό κοινό έχει στρέψει το ενδιαφέρον του στην κατανάλωση προϊόντων με χαμηλό ποσοστό SFA και υψηλό ποσοστό MUFA και PUFA καθώς και με χαμηλό λόγο ω6/ω3. Ο λόγος ω6/ω3 έχει τροποποιηθεί από 1:1 σε 10-20:1, ή υψηλότερα, γεγονός το οποίο εξηγεί μερικώς την αύξηση των σύγχρονων ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, η παχυσαρκία και ο διαβήτης (Djordjevic *et al.*, 2019). Το αίγιο γάλα, όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.3., αποτελεί ένα τέτοιο προϊόν καθώς είναι πλούσιο σε MUFA και PUFA ενώ παράλληλα χαρακτηρίζεται από χαμηλό λόγο ω6/ω3.

Στους Πίνακες 4.2.1. και 4.2.2. παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του προφίλ των SFA και UNFA αντίστοιχα, στα 22 δείγματα του αίγειου γάλακτος της παρούσας μελέτης. Στον Πίνακα 4.2.3. παρουσιάζονται ομαδοποιημένα τα παραπάνω αποτελέσματα (SCFA, MCFA, LCFA, MUFA, PUFA, SFA, UNFA, ω6, ω3) καθώς και ορισμένοι λόγοι μεταξύ τους (SFA/UNFA, ω6/ω3, AI), ενώ στον Πίνακα 4.2.4. παρουσιάζονται οι δείκτες ενεργότητας της Δ^9 αφυδρογονάσης του γάλακτος ($C_{14:1}/C_{14:0}$, $C_{16:1}/C_{16:0}$, $C_{18:1\ c9}/C_{18:0}$, $C_{18:2\ c9,11}/C_{18:1\ 11}$), οι οποίοι θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Πίνακας 3.2.1.: Το προφίλ των SFA (% , gr λιπαρών οξέων/100 gr ολικών λιπαρών οξέων) των 22 δειγμάτων του αίγειου γάλακτος

Δείγμα	SCFA ¹					MCFA ²				LCFA ³		
	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C11:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C22:0
1	2,75	2,89	3,26	11,43	0,00	5,68	11,92	0,78	26,84	0,46	9,74	0,00
2	3,62	3,17	3,08	8,53	0,00	2,83	7,67	0,47	23,68	0,60	21,05	0,00
3	3,37	3,10	3,17	9,23	0,00	3,41	8,57	0,64	24,10	0,63	16,45	0,18
4	3,65	2,60	2,17	5,85	0,00	1,80	5,84	0,49	23,54	0,40	20,29	0,00
5	3,28	3,15	3,35	10,32	0,00	3,71	9,21	0,48	26,59	0,39	10,66	0,00
6	3,59	3,08	3,04	8,20	0,00	3,05	7,31	0,53	24,46	0,56	16,80	0,00
7	0,00	0,00	0,86	10,83	0,00	4,95	10,60	0,91	26,67	0,65	13,25	0,00
8	3,41	2,95	2,94	8,66	0,00	3,34	8,60	0,41	25,07	0,46	16,87	0,00
9	0,00	0,00	0,00	8,20	0,00	3,60	8,74	0,62	29,96	0,69	24,50	0,00
10	3,37	3,16	3,27	10,09	0,00	3,71	9,04	0,66	26,28	0,47	15,45	0,00
11	3,06	3,25	3,74	11,77	0,00	4,54	9,58	0,71	25,24	0,54	11,22	0,00
12	3,11	3,10	3,51	11,48	0,00	5,26	10,48	1,32	24,74	0,77	9,84	0,00
13	1,89	2,90	3,72	13,26	0,16	6,23	11,35	1,00	27,12	0,60	8,21	0,00
14	1,76	2,75	3,49	11,89	0,16	4,74	10,54	1,03	26,36	0,68	11,60	0,00

15	2,98	3,13	3,48	11,25	0,00	4,53	10,10	0,67	26,55	0,52	13,60	0,00
16	0,00	0,00	0,62	12,52	0,00	6,28	12,81	0,92	31,25	0,56	11,46	0,00
17	3,37	3,42	3,76	11,00	0,00	3,95	8,66	1,07	22,98	0,74	14,76	0,00
18	2,83	3,04	3,49	12,24	0,00	5,40	12,01	0,78	29,87	0,45	7,27	0,00
19	0,00	0,00	0,00	11,15	0,00	5,02	12,04	0,87	32,04	0,58	13,11	0,00
20	3,05	2,98	3,14	9,78	0,00	3,67	9,66	0,79	26,64	0,54	12,91	0,00
21	0,00	0,00	0,00	7,10	0,00	3,23	8,46	0,81	25,76	0,66	16,82	0,00
22	2,90	2,72	2,90	8,87	0,00	3,65	8,05	0,74	23,38	0,59	13,73	0,00
Εύρη τιμών	0,00- 3,65	0,00- 3,42	0,00- 3,76	5,85- 13,26	0,00- 0,16	1,80- 6,28	5,84- 12,81	0,41- 1,32	22,98- 32,04	0,39- 0,77	7,27- 24,50	0,00- 0,18
Μέσος όρος (± τυπική απόκλιση)	2,36 (±1,36)	2,34 (±1,28)	2,59 (±1,30)	10,17 (±1,85)	0,01 (±0,05)	4,21 (±1,12)	9,60 (±1,71)	0,76 (±0,22)	26,32 (±2,46)	0,57 (±0,10)	14,07 (±4,16)	0,01 (±0,04)

¹SCFA: Short Chain Fatty Acid (Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα)

²MCFA: Medium Chain Fatty Acid (Μέσης αλύσου λιπαρά οξέα)

³LCFA: Long Chain Fatty Acid (Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα)

Πίνακας 4.2.2.: Το προφίλ των UNFA (% gr λιπαρών οξέων/100 gr ολικών λιπαρών οξέων) των 22 δειγμάτων του αίγιου γάλακτος

Δείγμα	MUFA ¹						PUFA ²				
	C _{14:1}	C _{16:1}	C _{17:1}	Σ C _{18:1 t}	C _{18:1 t11}	C _{18:1 e9}	C _{18:2n-6t}	C _{18:2n-6c}	C _{18:3n-3}	C _{18:2 e9,t11}	C _{20:3n-3}
1	0,17	0,57	0,24	0,26	0,56	19,51	0,00	1,82	0,59	0,31	0,23
2	0,27	0,35	0,18	0,52	2,31	17,43	0,00	2,96	0,66	0,44	0,17
3	0,42	0,43	0,21	0,42	1,59	19,36	0,18	2,72	1,17	0,46	0,21
4	0,23	0,53	0,00	2,04	2,97	24,52	0,14	1,56	0,50	0,87	0,00
5	0,25	0,51	0,17	0,35	0,72	22,38	0,21	2,97	0,79	0,34	0,17
6	0,26	0,47	0,25	0,62	2,20	20,95	0,00	3,42	0,51	0,48	0,22
7	0,45	0,61	0,34	0,00	1,29	24,18	0,28	2,45	0,66	0,72	0,28
8	0,22	0,46	0,18	0,62	1,72	19,83	0,00	3,27	0,42	0,39	0,18
9	0,31	0,26	0,00	0,00	1,20	17,21	0,00	3,05	1,24	0,42	0,00
10	0,29	0,47	0,19	0,00	0,74	19,46	0,00	2,25	0,47	0,42	0,20
11	0,31	0,51	0,33	0,31	1,30	19,63	0,00	2,59	0,67	0,50	0,20
12	0,59	0,57	0,41	0,18	0,68	20,49	0,00	2,09	0,83	0,32	0,24
13	0,37	0,70	0,35	0,24	0,63	18,08	0,13	1,83	0,67	0,34	0,23
14	0,43	0,46	0,31	0,30	1,44	17,98	0,39	1,92	1,10	0,53	0,13

15	0,25	0,44	0,17	0,33	1,08	17,25	0,16	2,56	0,63	0,34	0,00
16	0,39	0,44	0,00	0,32	1,12	17,53	0,00	2,87	0,53	0,38	0,00
17	0,42	0,35	0,22	0,36	1,56	18,12	0,33	2,44	1,99	0,50	0,00
18	0,29	0,62	0,23	0,20	0,47	17,12	0,00	2,70	0,44	0,29	0,26
19	0,40	0,56	0,26	0,52	1,84	17,03	0,22	2,65	0,99	0,70	0,00
20	0,41	0,52	0,23	0,33	1,16	21,42	0,00	1,85	0,32	0,44	0,16
21	0,38	0,77	0,37	0,44	1,16	29,75	0,21	2,74	0,58	0,52	0,26
22	0,36	0,68	0,32	0,35	0,92	26,19	0,19	2,22	0,54	0,49	0,22
Εύρη τιμών	0,17- 0,59	0,26- 0,77	0,00- 0,41	0,00- 2,04	0,47- 2,97	17,03- 29,75	0,00- 0,39	1,56- 3,42	0,32- 1,99	0,29- 0,87	0,00- 0,28
Μέσος όρος (± τυπική απόκλιση)	0,34 (±0,10)	0,51 (±0,12)	0,23 (±0,11)	0,39 (±0,40)	1,30 (±0,61)	20,25 (±3,28)	0,11 (±0,12)	2,50 (±0,49)	0,74 (±0,36)	0,46 (±0,14)	0,15 (±0,10)

¹MUFA: Monounsaturated Fatty Acids (Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα)

²PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids (Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

Πίνακας 4.2.3.: Ομαδοποιημένη παρουσίαση των αποτελεσμάτων του προφίλ των λιπαρών οξέων των 22 δειγμάτων του αίγιου γάλακτος (SCFA, MCFA, LCFA, MUFA, PUFA, SFA, UNFA, ω6, ω3) (% gr λιπαρών οξέων/100 gr ολικών λιπαρών οξέων) και ορισμένων λόγων μεταξύ τους (SFA/UNFA, ω6/ω3, AI)

Δείγμα	SCFA ¹	MCFA ²	LCFA ³	MUFA ⁴	PUFA ⁵	SFA ⁶	UNFA ⁷	ω6	ω3	SFA/ UNFA ⁸	ω6/ω3	AI ⁹
1	20,33	45,22	10,20	21,30	2,95	75,75	24,25	1,82	0,82	3,12	2,22	3,31
2	18,40	34,65	21,65	21,06	4,24	74,70	25,30	2,96	0,84	2,95	3,55	2,26
3	18,86	36,72	17,26	22,44	4,73	72,83	27,17	2,90	1,37	2,68	2,11	2,27
4	14,27	31,67	20,69	30,29	3,07	66,64	33,36	1,70	0,50	2,00	3,36	1,46
5	20,09	39,99	11,05	24,37	4,49	71,13	28,87	3,18	0,97	2,46	3,30	2,33
6	17,91	35,35	17,36	24,74	4,63	70,63	29,37	3,42	0,73	2,40	4,66	1,93
7	11,69	43,14	13,90	26,88	4,39	68,73	31,27	2,72	0,94	2,20	2,88	2,37
8	17,96	37,43	17,33	23,03	4,26	72,71	27,29	3,27	0,60	2,66	5,43	2,30
9	8,20	42,92	25,20	18,98	4,71	76,32	23,68	3,05	1,24	3,22	2,45	2,89
10	19,89	39,69	15,92	21,16	3,33	75,50	24,50	2,25	0,66	3,08	3,38	2,70
11	21,82	40,07	11,76	22,40	3,96	73,65	26,35	2,59	0,87	2,79	2,99	2,58
12	21,20	41,80	10,61	22,91	3,48	73,61	26,39	2,09	1,07	2,79	1,96	2,73
13	21,92	45,70	8,81	20,36	3,21	76,43	23,57	1,96	0,90	3,24	2,18	3,34

14	20,06	42,67	12,29	20,91	4,07	75,02	24,98	2,31	1,22	3,00	1,89	2,93
15	20,84	41,85	14,11	19,52	3,68	76,80	23,20	2,72	0,63	3,31	4,34	3,08
16	13,15	51,27	12,02	19,80	3,77	76,43	23,57	2,87	0,53	3,24	5,45	3,77
17	21,55	36,65	15,50	21,03	5,26	73,70	26,30	2,77	1,99	2,80	1,39	2,34
18	21,60	48,05	7,71	18,93	3,70	77,37	22,63	2,70	0,71	3,42	3,83	3,68
19	11,15	49,98	13,70	20,62	4,55	74,83	25,17	2,87	0,99	2,97	2,91	3,39
20	18,95	40,75	13,45	24,08	2,77	73,15	26,85	1,85	0,48	2,72	3,86	2,57
21	7,10	38,26	17,48	32,86	4,30	62,84	37,16	2,95	0,84	1,69	3,50	1,69
22	17,39	35,81	14,33	28,81	3,66	67,53	32,47	2,41	0,76	2,08	3,16	1,82
Εύρη τιμών	7,10- 21,92	31,67- 51,27	7,71- 25,20	18,93- 32,86	2,77- 5,26	62,84- 77,37	22,63- 37,16	1,70- 3,42	0,48- 1,99	1,69- 3,42	1,39- 5,45	1,46- 3,77
Μέσος όρος (± τυπική απόκλιση)	17,47 (±4,40)	40,89 (±4,93)	14,65 (±4,18)	23,02 (±3,64)	3,97 (±0,64)	73,01 (±3,66)	26,99 (±3,66)	2,61 (±0,48)	0,89 (±0,34)	2,77 (±0,45)	3,22 (±1,07)	2,62 (±0,62)

¹SCFA: Short Chain Fatty Acid (Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα)

²MCFA: Medium Chain Fatty Acid (Μέσης αλύσου λιπαρά οξέα)

³LCFA: Long Chain Fatty Acid (Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα)

⁴MUFA: Monounsaturated Fatty Acids (Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁵PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids (Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁶SFA: Saturated Fatty Acids (Κορεσμένα λιπαρά οξέα)

⁷UNFA: Unsaturated Fatty Acids (Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁸SFA/UNFA: Saturated Fatty Acids/Unsaturated Fatty Acids (Κορεσμένα λιπαρά οξέα/Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁹AI: Atherogenicity Index (Αθηρωματικός δείκτης)

Πίνακας 4.2.4.: Οι δείκτες ενεργότητας της Δ⁹ αφυδρογονάσης των 22 δειγμάτων του αίγιου γάλακτος

Δείγμα	C _{14:1} /C _{14:0}	C _{16:1} /C _{16:0}	C _{18:1 ε9} /C _{18:0}	C _{18:2 ε9,τ11} /C _{18:1 τ11}
1	0,014	0,021	2,00	0,55
2	0,035	0,015	0,83	0,19
3	0,049	0,018	1,18	0,29
4	0,039	0,022	1,21	0,29
5	0,027	0,019	2,10	0,48
6	0,035	0,019	1,25	0,22
7	0,043	0,023	1,83	0,56
8	0,026	0,018	1,18	0,23
9	0,036	0,009	0,70	0,35
10	0,033	0,018	1,26	0,57
11	0,032	0,020	1,75	0,38
12	0,056	0,023	2,08	0,48
13	0,033	0,026	2,20	0,55
14	0,041	0,017	1,55	0,37
15	0,025	0,017	1,27	0,31

16	0,030	0,014	1,53	0,34
17	0,048	0,015	1,23	0,32
18	0,024	0,021	2,36	0,62
19	0,033	0,018	1,30	0,38
20	0,043	0,020	1,66	0,38
21	0,045	0,030	1,77	0,45
22	0,045	0,029	1,91	0,54
Εύρη τιμών	0,014- 0,056	0,009- 0,030	0,70- 2,36	0,19- 0,62
Μέσος όρος (\pm τυπική απόκλιση)	0,036 ($\pm 0,010$)	0,020 ($\pm 0,005$)	1,55 ($\pm 0,44$)	0,40 ($\pm 0,12$)

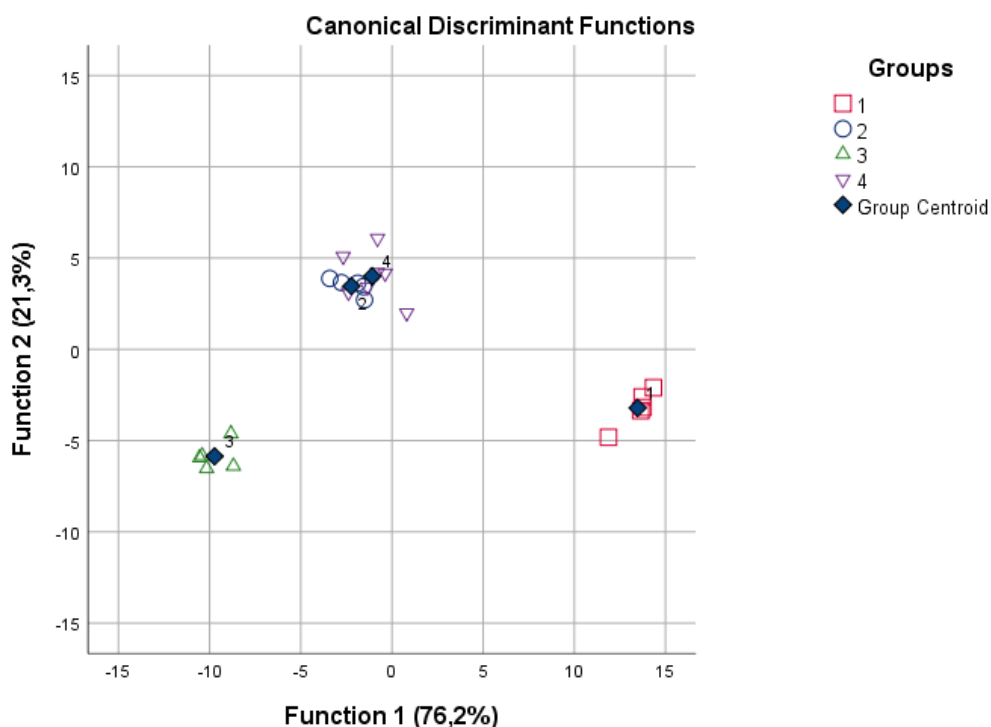
Αρχικά, σύμφωνα με τους Djordjevic *et al.* (2019), τα λιπαρά οξέα που ευθύνονται για το χαρακτηριστικό άρωμα του αίγειου γάλακτος είναι το καπροϊκό (C_{6:0}), το καπριλικό (C_{8:0}) και το καπρικό (C_{10:0}), το μέσο ποσοστό των οποίων στο σύνολο των λιπαρών οξέων στα δείγματα της παρούσας μελέτης ήταν $2,34 \pm 1,28\%$, $2,59 \pm 1,30\%$ και $10,17 \pm 1,85\%$, αντίστοιχα (Πίνακας 4.2.1.). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του αίγειου γάλακτος αποτελεί το υψηλό άθροισμα των ποσοστών των ακόλουθων λιπαρών οξέων: καπρικό (C_{10:0}), μυριστικό (C_{14:0}), παλμιτικό (C_{16:0}) και στεατικό (C_{18:0}), το οποίο στα δείγματα της παρούσας μελέτης ξεπέρασε το 60% των συνολικών λιπαρών οξέων (Πίνακας 4.2.1.). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι το παλμιτικό (C_{16:0}) αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ του λίπους του γάλακτος, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τα δείγματα της παρούσας μελέτης αφού το παλμιτικό καταλάμβανε μέσο ποσοστό της τάξης του $26,32 \pm 2,46\%$ των συνολικών λιπαρών οξέων.

Επιπλέον, στο αίγιο γάλα παρατηρείται χαμηλός λόγος (<0,5) λαουρικό/καπρικό (C_{12:0}/C_{10:0}) σε αντίθεση με τον μεγαλύτερο λόγο (>1) στο αγελαδινό και το πρόβειο γάλα. Ακόμη, το αίγιο γάλα, όπως και το πρόβειο, είναι πλουσιότερο σε CLA από το αγελαδινό καθώς η εκτροφή των μικρών μηρυκαστικών γίνεται συνήθως υπό ημιεκτατικές συνθήκες και συνεπώς η διατροφή τους περιλαμβάνει βοσκήσιμη ύλη. Τέλος, μεταξύ των MUFA το ελαϊκό (C_{18:1 cis9}) αποτελεί το αφθονότερο λιπαρό οξύ (Djordjevic *et al.*, 2019), γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τα δείγματα της παρούσας μελέτης αφού το ελαϊκό καταλάμβανε μέσο ποσοστό της τάξης του $20,25 \pm 3,28\%$ των συνολικών λιπαρών οξέων.

Σημαντικότερο παράγοντα τροποποίησης του προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα αποτελεί η διατροφή, η οποία ασκεί επίδραση στους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στη μεγάλη κοιλία και συνεπώς στη διαδικασία της βιοϋδρογόνωσης των ακόρεστων ισομερών του C₁₈. Κατά τη βιοϋδρογόνωση, μια διαδικασία που τελείται σε διαδοχικά στάδια και από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, τα UNFA και ειδικότερα το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ μετατρέπονται σε SFA (Chilliard *et al.*, 2007). Το στεατικό (C_{18:0}) αποτελεί το κύριο τελικό προϊόν της βιοϋδρογόνωσης των UNFA, αλλά συχνά δημιουργούνται και ενδιάμεσα ισομερή όπως το CLA καθώς και τα trans-10 και trans-11 ισομερή του C_{18:1}, τα οποία διαφεύγουν από τη μεγάλη κοιλία και ανιχνεύονται ως τελικά προϊόντα στο γάλα και το κρέας. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο φυσιολογικός ρόλος της βιοϋδρογόνωσης αφορά στην τοξική δράση των UNFA έναντι των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών (Flachowsky, 2004).

Σύμφωνα με τους Tsiplakou *et al.* (2010), η πλειοψηφία του C_{18:2 c9, t11} (CLA) στο λίπος του γάλακτος είναι ενδογενούς προέλευσης καθώς συντίθεται από το βασσενικό (C_{18:1 trans-11}) μέσω του ενζύμου Δ⁹ αφυδρογονάσης. Έτσι, όπως είναι αναμενόμενο, στα δείγματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ του CLA και του βασσενικού. Όσον αφορά τους δείκτες ενεργότητας της Δ⁹ αφυδρογονάσης (Πίνακας 4.2.4.), καλύτερο δείκτη αποτελεί ο λόγος C_{14:1} / C_{14:0}, επειδή όλο το C_{14:0} του λίπους του γάλακτος παράγεται από τη *de novo* σύνθεση στον μαστικό αδένα, ενώ τα άλλα υποστρώματα, το C_{16:0} και το C_{18:0}, μπορούν να απορροφηθούν από το έντερο. Επιπλέον, οι λόγοι C_{14:1} / C_{14:0} και C_{16:1} / C_{16:0} είναι χαμηλότεροι (0,036 και 0,020 κατά μέσο όρο αντίστοιχα) από τους άλλους δύο λόγους καθώς μόνο ένα μικρό μέρος των C_{14:0} και C_{16:0} αφυδρογονώνεται σε C_{14:1} και C_{16:1}, αντίστοιχα. Αντίθετα, ο λόγος C_{18:1} / C_{18:0} είναι υψηλότερος (1,55 κατά μέσο όρο) καθώς το C_{18:0} αποτελεί το προτιμότερο υπόστρωμα της Δ⁹ αφυδρογονάσης στον μαστικό αδένα.

Λόγω της σημαντικής επίδρασης της διατροφής στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος, η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μελετών δεν αποτελεί κύριο πυλώνα της παρούσας μελέτης. Στα αποτελέσματα του προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες (Σχήμα 4.2.1.). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα. Το ποσοστό των δειγμάτων που ταξινομήθηκε με επιτυχία στη σωστή ομάδα ήταν 100%. Η μεταβλητή που συνεισέφερε περισσότερο στον διαχωρισμό των ομάδων ήταν η μεταβλητή C_{22:0} και δευτερευόντως οι μεταβλητές C_{18:2n-6c} και C_{16:1}. Η λειτουργία (function) 1 περιγράφει το 76,2% των δειγμάτων, ενώ η λειτουργία 2 το 21,3%. Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική για τη λειτουργία 1 με τιμή Wilks' lambda (λ) < 0,001 (P<0,01) και για τη λειτουργία 2 με τιμή Wilks' lambda (λ) = 0,012 (p=0,048). Με βάση τα αποτελέσματα (Σχήμα 4.2.1.) φαίνεται ότι υπάρχει μια τάση διαφοροποίησης στο προφίλ των λιπαρών οξέων των ομάδων 2 και 4 σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο υψηλότερο ποσοστό που εμφανίζουν οι ομάδες 2 και 4 σε C_{16:1} αλλά και στο χαμηλότερο ποσοστό σε C_{18:2n-6c} σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Η ομάδα 1 διαφοροποιήθηκε από την ομάδα 3 λόγω της ύπαρξης του δείγματος 3 που αποτελεί το μοναδικό δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε το C_{22:0}.



Σχήμα 4.2.1.: Διαχωριστική απεικόνιση του προφίλ των λιπαρών οξέων του νοπού αίγιου γάλακτος των τεσσάρων ομάδων (1, 2, 3 και 4)

Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων στο γάλα των μηρυκαστικών επηρεάζεται κυρίως από τη διατροφή και συνεπώς μπορεί να τροποποιείται ανάλογα με τη σύσταση της χορηγηθείσας τροφής (Tsiplakou *et al.*, 2010), στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων εφαρμόστηκε επιπρόσθετα η στατιστική μέθοδος t-test προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των δύο συστημάτων εκτροφής (συμβατικού και βιολογικού) στο προφίλ τους. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως τα βιολογικά συστήματα εκτροφής δεν είναι επαρκώς καθορισμένα διατροφικά με αποτέλεσμα να διαφέρουν ακόμη και εντός της ίδιας χώρας (Tsiplakou *et al.*, 2010). Τα δείγματα που προήλθαν από φάρμες βιολογικού συστήματος εκτροφής ήταν τα δείγματα 5, 11, 12, 13, 15 και 17, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα προήλθαν από φάρμες συμβατικού συστήματος εκτροφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό των SFA ήταν κατά μέσο όρο 5,18% στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο στο βιολογικό σε σχέση με το συμβατικό σύστημα εκτροφής ($21,24 \pm 0,69\%$ και $16,06 \pm 4,52\%$, αντίστοιχα) με $t_{16,725}=4,444$ και $p<0,001$. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στα ποσοστά των $C_{6:0}$, $C_{8:0}$ και $C_{12:0}$ που ήταν κατά 1,13, 1,38 και 1,85% στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα στο βιολογικό σε

σχέση με το συμβατικό σύστημα εκτροφής ($3,16 \pm 0,17\%$ και $2,03 \pm 1,42\%$, $3,59 \pm 0,17\%$ και $2,21 \pm 1,38\%$, $11,51 \pm 0,99\%$ και $9,66 \pm 1,92\%$, αντίστοιχα) με $t_{16,122}=3,124$ και $p=0,006$, $t_{16,151}=3,907$ και $p=0,001$, $t_{20}= 2,234$ και $p=0,037$, αντίστοιχα. Ωστόσο, μεταξύ των δύο συστημάτων εκτροφής δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο προφίλ των λιπαρών οξέων, τους δείκτες ενεργότητας της Δ^9 αφυδρογονάσης και τον αθηρωματικό δείκτη, οι οποίες θα επέτρεπαν τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με τη θρεπτική αξία, από πλευράς λιπαρών οξέων, του γάλακτος.

Όπως αναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια τόσο η επιστημονική κοινότητα όσο και το καταναλωτικό κοινό έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στα PUFA λόγω των ευεργετικών επιδράσεών τους στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών (Abdelhamid *et al.*, 2018; Ander *et al.*, 2003; Köhler-Forsberg & Benros, 2018; Yang *et al.*, 2019). Όμως, τα PUFA είναι επιρρεπή στην οξειδωση με αποτέλεσμα να σχηματίζονται υπεροξειδία, πολυμερή, αλδεΐδες και κετόνες που προκαλούν βλάβες σε επίπεδο κυττάρων και ιστών, καθώς και παραγωγή ελεύθερων ριζών με όλες τις δυσμενείς συνέπειές τους. Για τον λόγο αυτό, η κατανάλωση αντιοξειδωτικών ουσιών κρίνεται απαραίτητη.

4.3. Το αντιοξειδωτικό σύστημα του αίγιου γάλακτος

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μελέτες του αντιοξειδωτικού συστήματος των ζώων αφορούν κυρίως μη παραγωγικά ζώα και ιδιαίτερα αρουραίους (Almaghrabi, 2015; Żebrowska *et al.*, 2019), ενώ όσες έχουν γίνει σε μηρυκαστικά ζώα αφορούν συγκεκριμένη διατροφική επέμβαση (Schogor *et al.*, 2013; Tsiplakou *et al.*, 2017) ή επιμόλυνση με παράσιτα (Aktas *et al.*, 2017; Esmailnejad *et al.*, 2012).

Στα δείγματα της παρούσας μελέτης έγινε εκτίμηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (LPO, GR, SOD, GSH-Px και CAT), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP, ABTS και DPPH) και των οξειδωτικών δεικτών που αποτελούν τα προϊόντα οξειδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (PC και MDA αντίστοιχα). Στον Πίνακα 4.3.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων στα 22 δείγματα του νωπού αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 4.3.1.: Δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Units/ml), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα [FRAP (μM ascorbic acid), ABTS και DPPH (αναστολή %)] και οξειδωτικοί δείκτες [PC (nmol/ml), MDA (μM)] στα 22 δείγματα του νοπού αίγειου γάλακτος

Δείγμα	LPO ¹	GR ²	SOD ³	GSH-Px ⁴	CAT ⁵	FRAP ⁶	ABTS ⁷	DPPH ⁸	PC ⁹	MDA ¹⁰
1	0,604	0,093	118,90	0,453	10,33	1,84	26,05	68,28	5,50	0,084
2	0,498	0,066	111,98	0,516	8,17	1,56	19,41	67,56	5,50	0,123
3	0,314	0,150	94,19	0,426	9,83	2,11	26,45	65,28	6,09	0,129
4	0,634	0,089	125,84	0,522	8,00	1,38	25,78	66,88	6,27	0,058
5	0,432	0,093	119,62	0,344	9,83	1,56	28,67	66,05	4,23	0,077
6	0,957	0,058	117,54	0,357	11,17	1,45	23,52	65,03	4,93	0,090
7	0,554	0,065	99,02	0,354	12,33	2,00	18,07	69,19	4,82	0,174
8	0,556	0,042	82,41	0,483	11,67	1,28	19,66	64,75	5,75	0,161
9	0,330	0,023	92,40	0,214	11,50	1,60	19,26	67,45	5,95	-
10	0,782	0,069	122,23	0,401	12,33	1,57	20,81	66,92	5,95	0,116
11	0,785	0,027	78,55	0,389	12,17	2,13	11,82	66,10	5,68	0,090
12	0,670	0,131	128,05	0,267	12,33	1,94	21,69	64,79	7,27	0,148
13	0,637	0,150	95,74	0,468	11,17	1,49	16,39	67,67	5,77	0,123
14	0,709	0,110	140,20	0,162	10,50	1,78	16,58	66,61	4,32	0,097

15	0,699	0,137	130,37	0,231	10,83	1,60	24,36	65,07	6,04	0,148
16	0,744	0,098	137,40	0,139	11,67	1,37	18,33	65,42	5,23	0,129
17	0,708	0,134	152,69	0,335	10,67	1,91	19,53	64,18	4,27	0,168
18	0,874	0,088	132,31	0,349	11,17	1,46	16,28	67,44	4,91	0,161
19	0,349	0,172	137,24	0,150	10,67	2,15	25,07	63,92	3,77	0,135
20	0,626	0,092	143,43	0,205	11,50	2,10	26,66	63,94	2,50	0,123
21	0,203	0,105	78,13	0,253	9,00	1,31	28,49	63,66	3,68	0,155
22	0,102	0,119	108,70	0,349	10,00	1,36	20,75	64,18	2,73	0,148
Εύρη τιμών	0,102- 0,957	0,023- 0,172	78,13- 152,69	0,139- 0,522	8,00- 12,33	1,28- 2,15	11,82- 28,67	63,66- 69,19	2,50- 7,27	0,058- 0,174
Μέσος όρος (± τυπική απόκλιση)	0,580 (± 0,212)	0,096 (±0,039)	115,77 (±21,46)	0,335 (±0,116)	10,77 (±1,22)	1,68 (±0,29)	21,53 (±4,40)	65,93 (±1,55)	5,05 (±1,15)	0,120 (±0,040)

¹LPO: Lactoperoxidase (Λακτοϋπεροξειδάση)

²GR: Glutathione Reductase (Αναγωγή της γλουταθειόνης)

³SOD: Superoxide Dismutase (Δισμουτάση του υπεροξειδίου)

⁴GSH-Px: Glutathione Peroxidase (Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)

⁵CAT: Catalase (Καταλάση)

⁶FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power (Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου)

⁷ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)

⁸DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

⁹PC: Protein Carbonyls (Πρωτεϊνικά καρβονύλια)

¹⁰MDA: Malondialdehyde (Μηλονική αλδεΐδη)

Αρχικά, η δραστηριότητα της SOD κυμάνθηκε από 78,13 έως 152,69 Units/ml με μέσο όρο 115,77 Units/ml. Η SOD αποτελεί τη σημαντικότερη αμυντική γραμμή του οργανισμού έναντι των ελεύθερων ριζών των ανιόντων του υπεροξειδίου. Ο φυσιολογικός ρόλος της είναι η εξουδετέρωση των ιόντων $O_2^{\cdot-}$ και η προστασία των διαφόρων ιστών από την τοξικότητα που προκαλούν, καταλύοντας τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 . Το H_2O_2 που προκύπτει από τη δράση του ενζύμου αποτελεί υπόστρωμα για την CAT ή/και την GSH-Px. Η δραστηριότητα της CAT κυμάνθηκε από 8,00 έως 12,33 Units/ml με μέσο όρο 10,77 Units/ml και της GSH-Px από 0,139 έως 0,522 Units/ml με μέσο όρο 0,335 Units/ml. Η CAT, η GSH-Px και άλλοι αναγωγικοί παράγοντες μετατρέπουν το H_2O_2 που σχηματίζεται από το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O (Khan *et al.* 2019b). Συγκεκριμένα, η CAT μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 , ενώ η GSH-Px μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την GSH, η οποία οξειδώνεται σε GSSG (Khan *et al.*, 2019a). Στη συνέχεια, η GSSG ανάγεται σε GSH με τη δράση του ενζύμου GR με το NADPH ως συνένζυμο. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η δράση της GSH-Px εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του Se καθώς φέρει στο ενεργό κέντρο κυστεΐνη συνδεδεμένη με Se (σεληνοκυστεΐνη) αντί για S. Όσον αφορά στη δραστηριότητα της GR, αυτή κυμάνθηκε από 0,023 έως 0,172 Units/ml με μέσο όρο 0,096 Units/ml. Από την άλλη πλευρά, η LPO αποτελεί το κύριο ένζυμο του γάλακτος με πλούσιες αντιμικροβιακές ιδιότητες που αποδίδονται στην παραγωγή υποθειοκυανικού ανιόντος ($OSCN^-$) από την οξείδωση των θειοκυανιούχων ιόντων (SCN^-) παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων H_2O_2 (Koksal *et al.*, 2016). Η LPO προέρχεται από τον μαστό του ζώου καθώς συντίθεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αδενοκυψελίδων και τα ουδετερόφιλα (Isobe *et al.*, 2011). Η δραστηριότητα της LPO μεταξύ των δειγμάτων της παρούσας μελέτης κυμάνθηκε από 0,102 έως 0,957 Units/ml με μέσο όρο 0,580 Units/ml. Σύμφωνα με τον/την Özer (2014), η δραστηριότητα της LPO στο αίγιο γάλα κυμαίνεται από 0,04 έως 9,28 Units/ml.

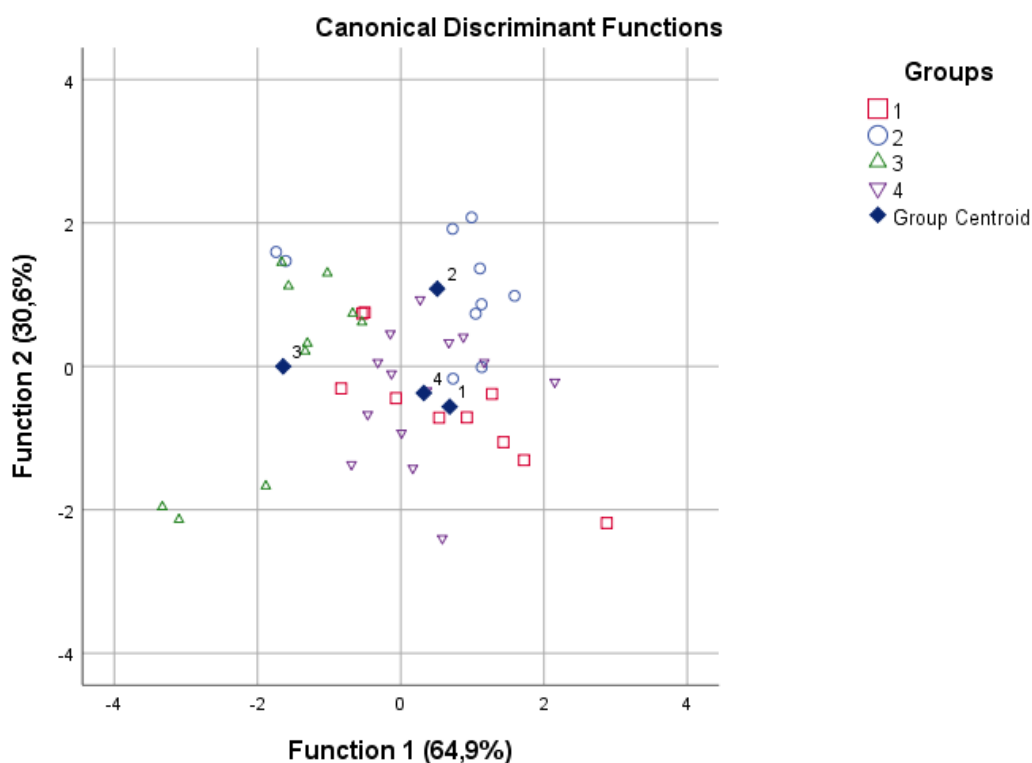
Από την άλλη πλευρά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα όλων των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Για τη απόκτηση πληρέστερων αποτελεσμάτων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μετρήθηκε με τρεις μεθόδους (FRAP, ABTS και DPPH). Αρχικά, η μέθοδος FRAP υποεκτιμά το επίπεδο των κύριων εξωγενών αντιοξειδωτικών σε σύγκριση με τη μέθοδο ABTS. Οι κύριοι συντελεστές της FRAP στα βιολογικά δείγματα των θηλαστικών είναι το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, η χολερυθρίνη και το ασκορβικό οξύ, ενώ η συγκεκριμένη μέθοδος δε μετρά τα αντιοξειδωτικά που φέρουν

την ομάδα -SH (sulfhydryl group), όπως η γλουταθειόνη και η αλβουμίνη (Cecchini & Fazio, 2020). Η μέθοδος ABTS έχει μικρότερη ευαισθησία από τη μέθοδο FRAP και μετρά κυρίως την αλβουμίνη και σε μικρότερο βαθμό το ουρικό οξύ. Από την άλλη πλευρά, η DPPH αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται σπανίως σε βιολογικά δείγματα, καθώς οι οργανικές ενώσεις κατακρημνίζονται στο αλκοολικό μέσο πριν προσδιοριστούν φωτομετρικά. Ωστόσο, η μέθοδος DPPH πιθανώς μετρά την έλλειψη αντιοξειδωτικών ουσιών μη πρωτεϊνικής φύσης στα δείγματα, συμπληρώνοντας με αυτόν τον τρόπο τις άλλες δύο μεθόδους (Cecchini & Fazio, 2020). Επομένως, δεδομένου ότι δεν υπάρχει βέλτιστος προσδιορισμός για την αξιολόγηση του συνολικού αντιοξειδωτικού δυναμικού των βιολογικών δειγμάτων, η συνδυαστική χρήση των παραπάνω μεθόδων συνιστάται για τη λήψη ακριβέστερων αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.3.1., η FRAP στα δείγματα της παρούσας μελέτης κυμάνθηκε από 1,28 έως 2,15 Units/ml με μέσο όρο 1,68 Units/ml, η ABTS από 11,82 έως 28,67 Units/ml με μέσο όρο 21,53 Units/ml, ενώ η DPPH από 63,66 έως 69,19 Units/ml με μέσο όρο 65,93 Units/ml.

Το οξειδωτικό στρες στο περιβάλλον του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εξαιρετικά ενεργών και ασταθών λιπιδικών υπεροξειδίων. Η αποσύνθεση αυτών καταλήγει στον σχηματισμό της MDA, μιας δραστικής αλδεϋδης. Οι κυριότερες πρόδρομες ενώσεις της MDA είναι τα 1,3-δισ-υδροϋπεροξειδία του λινολενικού οξέος, τα υδρο-ϋπεροξυδικυκλο-ενδο-ϋπεροξειδία του λινολενικού και αραχιδονικού οξέος και τα υδρο-ϋπεροξυεπιδιοξειδία του λινολενικού οξέος (Frankel & Neff, 1983). Η MDA, φυσικό προϊόν του καταβολισμού των PUFA, αποτελεί τον πιο αξιόπιστο δείκτη της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Grotto *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 1997). Η συγκέντρωση της MDA στα δείγματα της παρούσας μελέτης κυμάνθηκε από 0,058 έως 0,174 mM με μέσο όρο 0,120 mM. Από την άλλη πλευρά τα PC αποτελούν αξιόπιστο δείκτη της οξειδωσης των πρωτεϊνών, διότι τα καρβονύλια είναι σταθερές ομάδες. Σημειώνεται ότι οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες και συνεπώς χάνουν τη φυσιολογική τους λειτουργία. Η συγκέντρωση των PC στα δείγματα της παρούσας μελέτης κυμάνθηκε από 2,50 έως 7,27 nmol/ml με μέσο όρο 5,05 nmol/ml.

Στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού συστήματος του γάλακτος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες (Σχήμα 4.3.1.). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν

ανεξάρτητα. Το ποσοστό των δειγμάτων που ταξινομήθηκε με επιτυχία στη σωστή ομάδα ήταν 63,6%. Οι μεταβλητές οι οποίες συνεισέφεραν περισσότερο στον διαχωρισμό των ομάδων ήταν η MDA και η GSH-Px. Η λειτουργία (function) 1 περιγράφει το 64,9% των δειγμάτων, ενώ η λειτουργία 2 το 30,6%. Η ταξινόμηση ήταν μη στατιστικώς σημαντική ($P > 0,05$) για τη λειτουργία 1 με τιμή Wilks' lambda (λ) = 0,351 ($p = 0,157$) και για τη λειτουργία 2 με τιμή Wilks' lambda (λ) = 0,663 ($p = 0,677$). Η τιμή Wilks' lambda (λ) = 0,663 κρίνεται υψηλή με αποτελέσματα η ανάλυση να μην επιτρέπει τη εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την οξειδωτική σταθερότητα του γάλακτος λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων και συνεπώς των φαρμών. Εισάγοντας τις μεταβλητές με βάση τη μέθοδο stepwise το μοντέλο αποδέχεται μόνο τη συνεισφορά της MDA.



Σχήμα 4.3.1.: Διαχωριστική απεικόνιση του αντιοξειδωτικού συστήματος του νωπού αίγειου γάλακτος των τεσσάρων ομάδων (1, 2, 3 και 4)

4.4. Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών

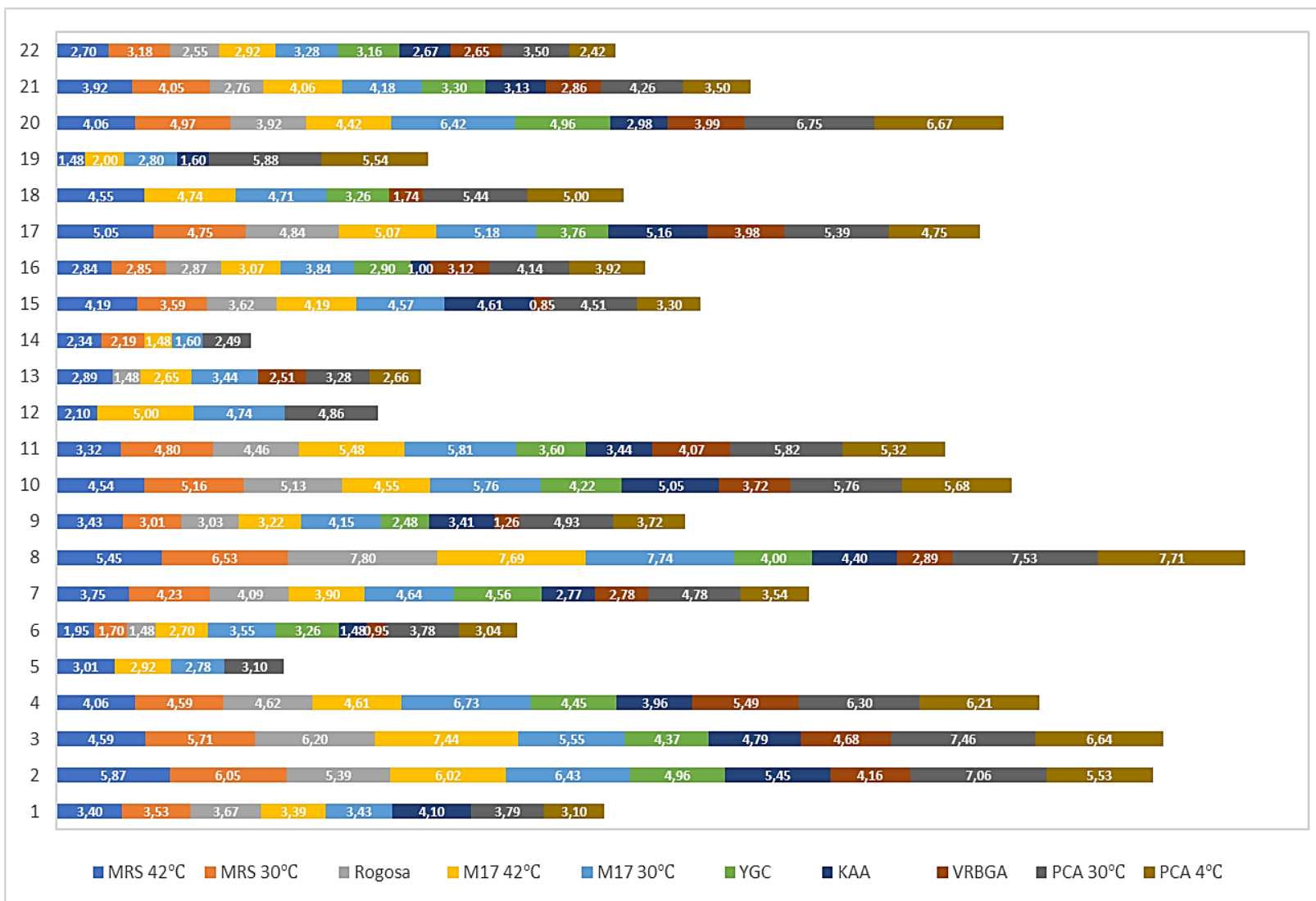
Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν σε κάθε επιλεκτικό υπόστρωμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.1. και στο Σχήμα 4.4.1.

Πίνακας 4.4.1.: Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν σε κάθε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα εκφρασμένοι σε log cfu/ml

Δείγμα	MRS 42°C	MRS 30°C	Rogosa	M17 42°C	M17 30°C	YGC	KAA	VRBGA	PCA 30°C	PCA 4°C
1	3,40	3,53	3,67	3,39	3,43	N/D ¹	4,10	N/D ¹	3,79	3,10
2	5,87	6,05	5,39	6,02	6,43	4,96	5,45	4,16	7,06	5,53
3	4,59	5,71	6,20	7,44	5,55	4,37	4,79	4,68	7,46	6,64
4	4,06	4,59	4,62	4,61	6,73	4,45	3,96	5,49	6,30	6,21
5	3,01	N/D ¹	N/D ¹	2,92	2,78	N/D ¹	N/D ¹	N/D ¹	3,10	N/D ¹
6	1,95	1,70	1,48	2,70	3,55	3,26	1,48	0,95	3,78	3,04
7	3,75	4,23	4,09	3,90	4,64	4,56	2,77	2,78	4,78	3,54
8	5,45	6,53	7,80	7,69	7,74	4,00	4,40	2,89	7,53	7,71
9	3,43	3,01	3,03	3,22	4,15	2,48	3,41	1,26	4,93	3,72
10	4,54	5,16	5,13	4,55	5,76	4,22	5,05	3,72	5,76	5,68
11	3,32	4,80	4,46	5,48	5,81	3,60	3,44	4,07	5,82	5,32
12	2,10	N/D ¹	N/D ¹	5,00	4,74	N/D ¹	N/D ¹	0	4,86	N/D ¹
13	2,89	N/D ¹	1,48	2,65	3,44	N/D ¹	N/D ¹	2,51	3,28	2,66
14	2,34	2,19	N/D ¹	1,48	1,60	N/D ¹	N/D ¹	N/D ¹	2,49	N/D ¹
15	4,19	3,59	3,62	4,19	4,57	N/D ¹	4,61	0,85	4,51	3,30

16	2,84	2,85	2,87	3,07	3,84	2,90	1,00	3,12	4,14	3,92
17	5,05	4,75	4,84	5,07	5,18	3,76	5,16	3,98	5,39	4,75
18	4,55	N/D ¹	N/D ¹	4,74	4,71	3,26	N/D ¹	1,74	5,44	5,00
19	1,48	N/D ¹	N/D ¹	2,00	2,80	N/D ¹	1,60	N/D ¹	5,88	5,54
20	4,06	4,97	3,92	4,42	6,42	4,96	2,98	3,99	6,75	6,67
21	3,92	4,05	2,76	4,06	4,18	3,30	3,13	2,86	4,26	3,50
22	2,70	3,18	2,55	2,92	3,28	3,16	2,67	2,65	3,50	2,42
Εύρη τιμών	1,48- 5,87	0,00- 6,53	0,00- 7,80	1,48- 7,69	1,60- 7,74	0,00- 4,96	0,00- 5,45	0,00- 5,49	2,49- 7,53	0,00- 7,71
Μέσος όρος (± τυπική απόκλιση)	3,61 (± 1,12)	3,22 (± 2,09)	3,09 (± 2,18)	4,16 (± 1,55)	4,61 (± 1,46)	2,60 (± 1,88)	2,73 (±1,87)	2,35 (±1,70)	5,04 (±1,40)	4,01 (±2,12)

¹ N/D: not detected (δεν εντοπίστηκαν μικροβιακοί πληθυσμοί)



Σχήμα 4.4.1.: Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν σε κάθε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα ανα δείγμα εκφρασμένοι σε log cfu/ml

Αρχικά, όσον αφορά στα LAB, ο πληθυσμός που καταμετρήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης των θερμοφίλων και μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων (MRS στους 42 και 30°C, αντίστοιχα) των δειγμάτων του γάλακτος κυμαινόταν από 1,48 έως 6,53 log cfu/ml. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών των θερμοφίλων και των μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων. Ωστόσο, στα δείγματα 3, 8 και 11 παρατηρήθηκε υψηλότερος πληθυσμός μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων κατά 1-1,5 λογάριθμο, ενώ στα δείγματα 5, 12, 13, 18 και 19 ανιχνεύθηκαν μόνο θερμοφιλοί πληθυσμοί γαλακτοβακίλλων και καθόλου μεσόφιλοι (Πίνακας 4.4.1. και Σχήμα 4.4.1.). Από την άλλη πλευρά, ο πληθυσμός των θερμοφίλων και μεσόφιλων κόκκων (M17 στους 42 και 30°C αντίστοιχα) κυμάνθηκε από 1,48 έως 7,74 log cfu/ml (Πίνακας 4.4.1.). Ομοίως, στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών των θερμοφίλων και των μεσόφιλων κόκκων. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα 3 στο οποίο παρατηρήθηκε υψηλότερος πληθυσμός θερμοφίλων κόκκων κατά 2 λογαρίθμους και τα δείγματα 4, 10 και 20 στα οποία παρατηρήθηκε υψηλότερος πληθυσμός μεσόφιλων κόκκων κατά 1-2 λογαρίθμους (Πίνακας 4.4.1. και Σχήμα 4.4.1.). Αναφορικά με τους εντερόκοκκους (KAA), ο πληθυσμός τους κυμαινόταν από 1,00 έως 5,45 log cfu/ml, ενώ στα δείγματα 5, 12, 13, 14 και 18 δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μικροβιολογική ομάδα (Πίνακας 4.4.1. και Σχήμα 4.4.1.). Τέλος, όσον αφορά τα NSLAB (Rogosa), ο πληθυσμός τους κυμαινόταν από 1,48 έως 7,80 log cfu/ml, ενώ στα δείγματα 5, 12, 14, 18 και 19 δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μικροβιολογική ομάδα (Πίνακας 4.4.1. και Σχήμα 4.4.1.).

Επιπλέον, ο πληθυσμός των ζυμών και των μυκήτων (YGC) που ανιχνεύθηκε στα 15 από τα 22 δείγματα, δηλαδή στο 58% των δειγμάτων, κυμαινόταν από 2,48 έως 4,96 log cfu/ml, ενώ στα δείγματα 1, 5, 12, 13, 14, 15 και 19 δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μικροβιολογική ομάδα (Πίνακας 4.4.1. και Σχήμα 4.4.1.).

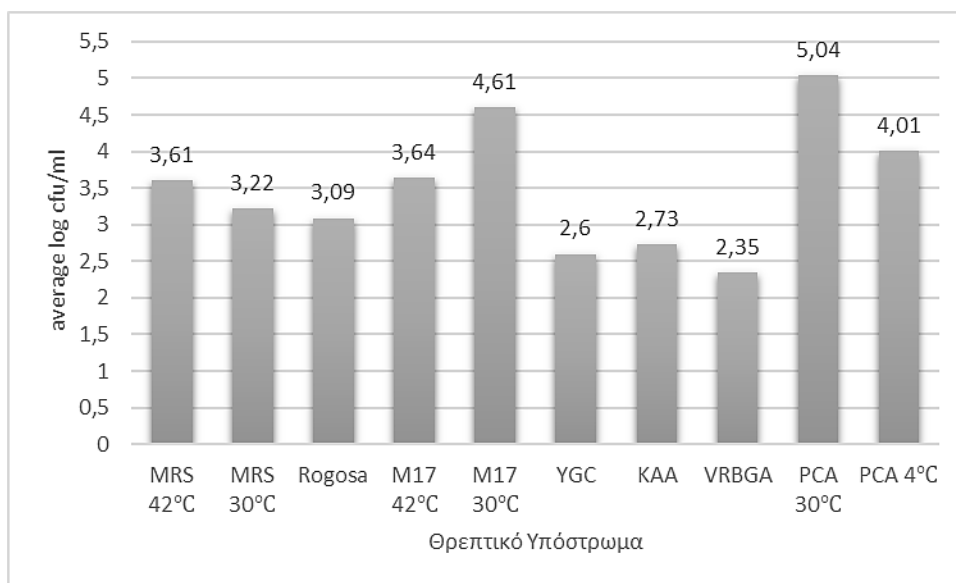
Από την άλλη πλευρά, ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων (VRBGA) κυμαινόταν από 0,00 (τιμή που προκύπτει από τον λογάριθμο του 1 cfu/ml) έως 5,49 log cfu/ml, ενώ στα δείγματα 1, 5, 14 και 19 δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μικροβιολογική ομάδα (Πίνακας 4.4.1.). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία των εντεροβακτηρίων στο γάλα αποτελεί ένδειξη μη τήρησης των κανόνων υγιεινής κατά την άμελξη Sobeih *et al.* (2020).

Τα μικροβιολογικά κριτήρια για το νωπο αίγιο γάλα αναφέρονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αρ. 853/2004, Τμήμα ΙΧ, Κεφάλαιο ΙΙΙ, Παράγραφος 3 και 4. Σύμφωνα με αυτόν, οι μικροβιακοί πληθυσμοί (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, ΟΜΧ) (PCA 30°C) πρέπει να είναι $\leq 1.500.000$ cfu/ml, ενώ όταν αυτό προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων από νωπό γάλα με διαδικασία, η οποία δεν απαιτεί θερμική επεξεργασία, τότε πρέπει να είναι ≤ 500.000 cfu/ml. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία των δειγμάτων και συγκεκριμένα στο 77% αυτών, η ΟΜΧ (PCA 30°C) κυμαινόταν μεταξύ $10^2 - 10^5$ cfu/ml, ενώ στο υπόλοιπο 23% των δειγμάτων (δείγμα 2, 3, 4, 8 και 20) ξεπερνούσε το νομοθετικό όριο των 1.500.000 cfu/ml. Ο ελάχιστος και ο μέγιστος πληθυσμός που καταμετρήθηκε ήταν 2,49 (δείγμα 14) και 7,53 (δείγμα 8) log cfu/ml, αντίστοιχα (Πίνακας 4.4.1.). Η καταμέτρηση του συνόλου των μεσόφιλων βακτηρίων αποτελεί την πιο συνηθισμένη μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων δίνοντας μια γενική εικόνα της μικροβιολογικής κατάστασης του προϊόντος, καθώς η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που συναντώνται στη φύση ανήκουν στην κατηγορία των μεσόφιλων.

Τέλος, ο πληθυσμός των ψυχρότροφων (PCA 4°C) κυμαινόταν από 2,42 (δείγμα 22) έως 7,71 (δείγμα 8) log cfu/ml, ενώ στα δείγματα 5, 12 και 14 δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μικροβιολογική ομάδα (Πίνακας 4.4.1.).

Σύμφωνα με τους Millogo *et al.* (2010), οι διαφορές που εντοπίζονται στο μικροβιακό φορτίο των νωπών δειγμάτων αίγιου γάλακτος μεταξύ των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων σχετίζονται με εξωγενείς παράγοντες, όπως η γεωγραφική τους θέση, οι συνθήκες υγιεινής κατά το χειρισμό του γάλακτος, ο εξοπλισμός της άμελης και η διαδικασία που ακολουθείται (πχ. πλύσιμο του μαστού, αντισηψία κ.α.) καθώς και η εποχή συλλογής των δειγμάτων. Επιπλέον, η συλλογή του γάλακτος στο 50% των δειγμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε μέσω άμελης με το χέρι, γεγονός που ευνοεί τη μετάδοση των μικροοργανισμών στο γάλα. Τέλος, σε περίπτωση που το ζώο παρουσιάζει μαστίτιδα τότε τα επίπεδα των μικροβίων είναι αυξημένα.

Στο Γράφημα 4.4.1. παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μικροβιακών πληθυσμών που καταμετρήθηκαν ανά θρεπτικό υπόστρωμα στα 22 δείγματα του νωπού αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης.



Γράφημα 4.4.1.: Οι μέσοι όροι των μικροβιακών πληθυσμών (εκφρασμένοι σε log cfu/ml) ανά θρεπτικό υπόστρωμα στα 22 δείγματα που νοπού αίγιου γάλακτος

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα περισσότερα δείγματα που δεν καταμετρήθηκαν πληθυσμοί ζυμών δεν καταμετρήθηκαν επίσης πληθυσμοί εντεροβακτηρίων (δείγματα 1, 5, 12, 14 και 19). Εξάιρεση αποτελούν τα δείγματα 13 και 15 στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηρίων. Επιπλέον, στα δείγματα 5, 12, 13, 14 και 18 ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντερόκοκκων. Το γένος *Enterococcus* ανήκει στα LAB και εκτός από τα εν δυνάμει παθογόνα στελέχη που περιλαμβάνει, ορισμένα στελέχη του έχει αναφερθεί ότι παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες όπως οι βακτηριοσίνες, ενώ άλλα έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά (Hanchi *et al.*, 2018).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στην πλειοψηφία των δειγμάτων ο πληθυσμός των ψυχρότροφων ήταν υψηλός. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί εύκολα διότι τα δείγματα του γάλακτος στάλθηκαν από τον κάθε παραγωγό προς το εργαστήριο Γαλακτοκομίας υπό ψύξη και η αποστολή τους διήρκεσε αρκετές ώρες. Οι Oliveira *et al.* (2015) αναφέρουν ότι μετά την πάροδο 48 ωρών από την αποθήκευση του γάλακτος στα σιλό αρκετών γαλακτοκομείων της Νοτιοδυτικής Σκωτίας, οι μέσοι πληθυσμοί ψυχρότροφων βακτηρίων αυξήθηκαν κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους (από 5,11 σε 7,11 log cfu/ml). Εξάιρεση αποτελούν τα δείγματα 1, 2, 7, 15, 17, 21, 22, καθώς και τα δείγματα 5, 12 και 14 στα οποία δεν καταγράφηκαν πληθυσμοί ψυχρότροφων.

Στον Πίνακα 4.4.2. παρουσιάζονται ορισμένες μελέτες που έχουν γίνει σε δείγματα νοπού αίγειου γάλακτος διαφόρων περιοχών και αφορούν στην εκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών που υπάρχουν σε αυτά.

Πίνακας 4.4.2.: Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που προσδιορίστηκαν σε δείγματα νοπού αίγειου γάλακτος διαφόρων περιοχών

Περιοχή	Μικροβιακοί πληθυσμοί (log cfu/ml)	Βιβλιογραφική πηγή
Σαρδηνία	LAB 4-7 Εντερόκοκκοι 3-5	Pisano <i>et al.</i> (2019)
Νότια Αφρική (in vitro)	OMX 2,37 Εντεροβακτήρια δεν ανιχνεύθηκαν	Makete <i>et al.</i> (2016)
Βραζιλία	LAB 3,93	de Almeida Júnior <i>et al.</i> (2015)
Ισπανία	OMX 6 Μεσόφιλα LAB 6 Γαλακτοβάκιλλοι 3-4 Εντερόκοκκοι 3-4 Εντεροβακτήρια 4 Ζύμες 4 Μύκητες 4	Picon <i>et al.</i> (2015)
Βραζιλία	LAB 3,07-3,89	Perin & Nero (2014)
Γαλλία	OMX 5,5 Κόκκοι 5,4 Γαλακτοβάκιλλοι 3,9 Εντερόκοκκοι 4,5 Λακτόκοκκοι 5,0 <i>Leuconostoc</i> 4,7	Delavenne <i>et al.</i> (2012)

	Εντερόκοκκοι/ Πεδιόκοκκοι/ Γαλακτοβάκιλλοι 4,5 Ζύμες/Μύκητες 4,7 Ψυχροανθεκτικά στελέχη LAB 4,1	
Γαλλία	Ζύμες/Μύκητες 4,4	Delavenne <i>et al.</i> (2011)
Ελλάδα (εκτατικό σύστημα)	OMX 7,56 Εντεροβακτήρια 6,26	Morgan <i>et al.</i> (2003)
Πορτογαλία (εκτατικό σύστημα)	OMX 7,6 Εντεροβακτήρια 6,4	Morgan <i>et al.</i> (2003)
Γαλλία (εντατικό σύστημα)	OMX 5,03 Εντεροβακτήρια 2,15	Morgan <i>et al.</i> (2003)

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.4.2., διαπιστώνεται ότι παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας μελέτης παρουσίασαν και οι Pisano *et al.* (2019). Συγκεκριμένα οι εν λόγω ερευνητές ανέλυσαν 67 δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος από διαφορετικές περιοχές της Σαρδηνίας και βρήκαν ότι ο συνολικός πληθυσμός των LAB στα δείγματα αυτά κυμαινόταν από 4 έως 7 log cfu/ml, ενώ ειδικότερα των εντερόκοκκων από 3 έως 5 log cfu/ml. Επιπλέον, ο πληθυσμός των κόκκων ήταν υψηλότερος από αυτόν των γαλακτοβακίλλων.

Παρόμοιοι πληθυσμοί LAB αναφέρονται από τους Perin & Nero (2014) και τους de Almeida Júnior *et al.* (2015) σε δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος στην περιοχή της Βραζιλίας. Πιο αναλυτικά, οι Perin & Nero (2014) ανέλυσαν 22 δείγματα και βρήκαν ότι οι μέσοι πληθυσμοί των LAB στα δείγματά τους κυμαίνονται από 3,07 έως 3,89 log cfu/ml. Επιπλέον, χαρακτήρισαν την πλειονότητα των LAB ως κόκκους, μια ομάδα που περιγράφεται ως το κυρίαρχο συστατικό του μικροβιώματος του νωπού γάλακτος. Όμοια

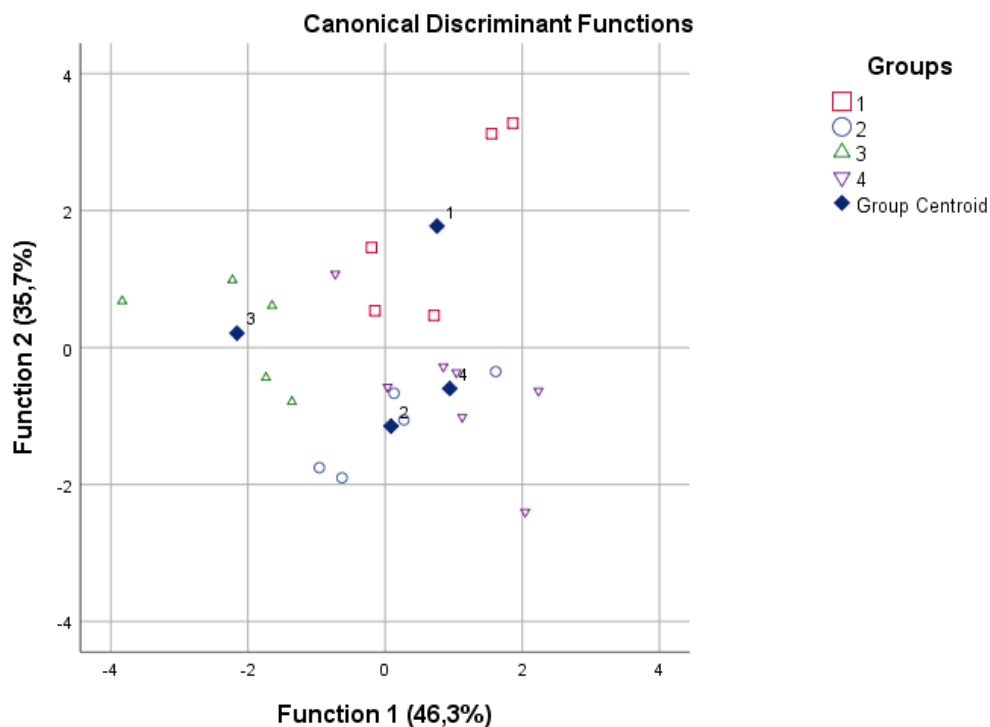
αποτελέσματα για τους πληθυσμούς των LAB είχαν και οι de Almeida Júnior *et al.* (2015) οι οποίοι ανέλυσαν 42 δείγματα και κατέγραψαν μέσο όρο LAB ίσο με 3,93 log cfu/ml.

Από την άλλη πλευρά, στην περιοχή της Ισπανίας, οι Picon *et al.* (2015) μελέτησαν 11 δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος και βρήκαν ότι η OMX και ο πληθυσμός των μεσόφιλων LAB ήταν 6 log cfu/ml, ο πληθυσμός των γαλακτοβακίλλων και των εντερόκοκκων 3-4 log cfu/ml και τέλος των εντεροβακτηρίων και των ζυμών 4 log cfu/ml. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εμφανίζουν διαφορές με αυτά των Picon *et al.* (2015). Συγκεκριμένα, ο μέσος πληθυσμός των μεσόφιλων LAB στα 22 δείγματα του νωπού αίγειου γάλακτος που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν χαμηλότερος κατά 2,5 λογαρίθμους, ενώ των εντεροβακτηρίων και των ζυμών χαμηλότερος κατά 1,5 λογάριθμο.

Στην περιοχή της Γαλλίας, οι Delavenne *et al.* (2011) μελέτησαν 9 δείγματα νωπού αίγειου γάλακτος και παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των ζυμών ήταν 4,4 log cfu/ml. Σε μία ακόμη μελέτη με αντίστοιχο αριθμό δειγμάτων οι Delavenne *et al.* (2012) βρήκαν ότι η OMX ήταν ίση με 5,5 log cfu/ml, ο πληθυσμός των ζυμών ίσος με 4,7 log cfu/ml, ο πληθυσμός των κόκκων ίσος με 5,4 log cfu/ml, ο πληθυσμός των γαλακτοβακίλλων ίσος με 3,9 log cfu/ml, ενώ ο πληθυσμός των εντερόκοκκων ίσος με 4,5 log cfu/ml. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές με τα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των ζυμών ήταν κατά 2 λογαρίθμους χαμηλότερος σε σχέση με τους πληθυσμούς που καταγράφηκαν από τους Delavenne *et al.* (2011) και τους Delavenne *et al.* (2012), ο πληθυσμός των κόκκων και των γαλακτοβακίλλων κατά 1 και 0,5 λογάριθμο, αντίστοιχα, χαμηλότερος, ενώ ο πληθυσμός των εντερόκοκκων κατά σχεδόν 2 λογαρίθμους χαμηλότερος.

Τέλος, όσον αφορά στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της καταμέτρησης των μικροβιακών πληθυσμών (log cfu/ml) του νωπού αίγειου γάλακτος στα χρησιμοποιούμενα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες (Σχήμα 4.4.2.). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα. Το ποσοστό των δειγμάτων που ταξινομήθηκε με επιτυχία στη σωστή ομάδα ήταν 86,4%. Όλες οι μεταβλητές (θρεπτικά υποστρώματα) συνεισέφεραν σημαντικά στον διαχωρισμό των ομάδων. Η λειτουργία (function) 1 περιγράφει το 46,3% των δειγμάτων με Wilks' Lambda (λ) = 0,088 ($p=0,277$),

ενώ η λειτουργία 2 το 35,7% με Wilks' Lambda (λ) = 0,246 ($p=0,353$). Η ταξινόμηση ήταν μη στατιστικώς σημαντική ($P>0,05$) και για τις δύο λειτουργίες. Εισάγοντας τις μεταβλητές με βάση τη μέθοδο stepwise το μοντέλο αποδέχεται μόνο τη συνεισφορά του υποστρώματος Rogosa. Με βάση τα αποτελέσματα (Σχήμα 4.4.2.) φαίνεται ότι υπάρχει μια τάση διαφοροποίησης των μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύχθηκαν στα χρησιμοποιούμενα επιλεκτικά υποστρώματα στις ομάδες 1 και 3 τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων γίνεται εύκολα αντιληπτή με τη σύγκριση των μέσων όρων των καταγεγραμμένων μικροβιακών πληθυσμών στα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, όλοι οι καταγεγραμμένοι μικροβιακοί πληθυσμοί στα δείγματα της ομάδας 1 ήταν κατά 2-4 log cfu/ml υψηλότεροι σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της ομάδας 3. Ωστόσο, η παρατήρηση αρκετών μηδενικών τιμών στην ομάδα 3 και ο μικρός αριθμός δειγμάτων γάλακτος δεν οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, οι μικροβιακοί πληθυσμοί που καταγράφηκαν στις ομάδες 2 και 4 διέφεραν λιγότερο μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στην ομάδα 4 παρατηρήθηκαν μεγαλύτεροι πληθυσμοί κατά 1,5-2 log cfu/ml στα υποστρώματα MRS 30°C, Rogosa και KAA.



Σχήμα 4.4.2.: Διαχωριστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της καταμέτρησης των μικροβιακών πληθυσμών ($\log \text{cfu/ml}$) του νοπού αίγειου γάλακτος των τεσσάρων ομάδων (1, 2, 3 και 4) στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα

4.5. Απομόνωση και καθαρισμός αποικιών

Από τα τρυβλία που αναπτύχθηκαν, απομονώθηκαν συνολικά 202 αποικίες βακτηρίων και 43 ζυμών (Πίνακας 4.5.1). Μετά από τη χρώση Gram, οι αποικίες των βακτηρίων και των ζυμών που αναλύθηκαν με *ger*-PCR με σκοπό να ομαδοποιηθούν ήταν 155 και 36, αντίστοιχα (Πίνακας 4.5.2.). Μετά την ομαδοποίηση (Ενότητα 4.6.1. και 4.6.3.), επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές αποικίες από κάθε ομάδα και ταυτοποιήθηκαν μέσω της αλληλούχησης του γονιδίου του 16S rRNA και της περιοχής ITS για τα βακτήρια και τις ζύμες, αντίστοιχα (Ενότητα 4.6.2 και 4.6.4.)

Πίνακας 4.5.1.: Αριθμός των αρχικά απομονωμένων αποικιών βακτηρίων (MRS, Rogosa και M17) και ζυμών (YGC) από τα 22 δείγματα του νοπού αίγειου γάλακτος

Δείγμα	MRS 30 και 42 °C	Rogosa	M17 30 και 42 °C	YGC	Απομονώσεις βακτηρίων ανά δείγμα	Απομονώσεις ζυμών ανά δείγμα	Συνολικές απομονώσεις ανά δείγμα
1	8	3	6	0	17	0	17
2	8	2	7	7	17	7	24
3	7	3	4	4	14	4	18
4	6	3	5	7	14	7	21
5	1	0	4	0	5	0	5
6	4	1	6	3	11	3	14
7	5	2	6	2	13	2	15
8	4	1	6	3	11	3	14
9	4	2	4	1	10	1	11
10	3	2	3	2	8	2	10
11	2	2	2	1	6	1	7

12	1	0	4	0	5	0	5
13	1	1	4	0	6	0	6
14	2	0	3	0	5	0	5
15	6	1	4	0	11	0	11
16	4	2	3	4	9	4	13
17	4	2	5	2	11	2	13
18	2	0	4	1	6	1	7
19	1	0	1	0	2	0	2
20	5	1	2	2	8	2	10
21	3	2	2	3	7	3	10
22	2	1	3	1	6	1	7
Συνολικές απομονώσεις ανά υπόστρωμα	83	31	88	43	202	43	245

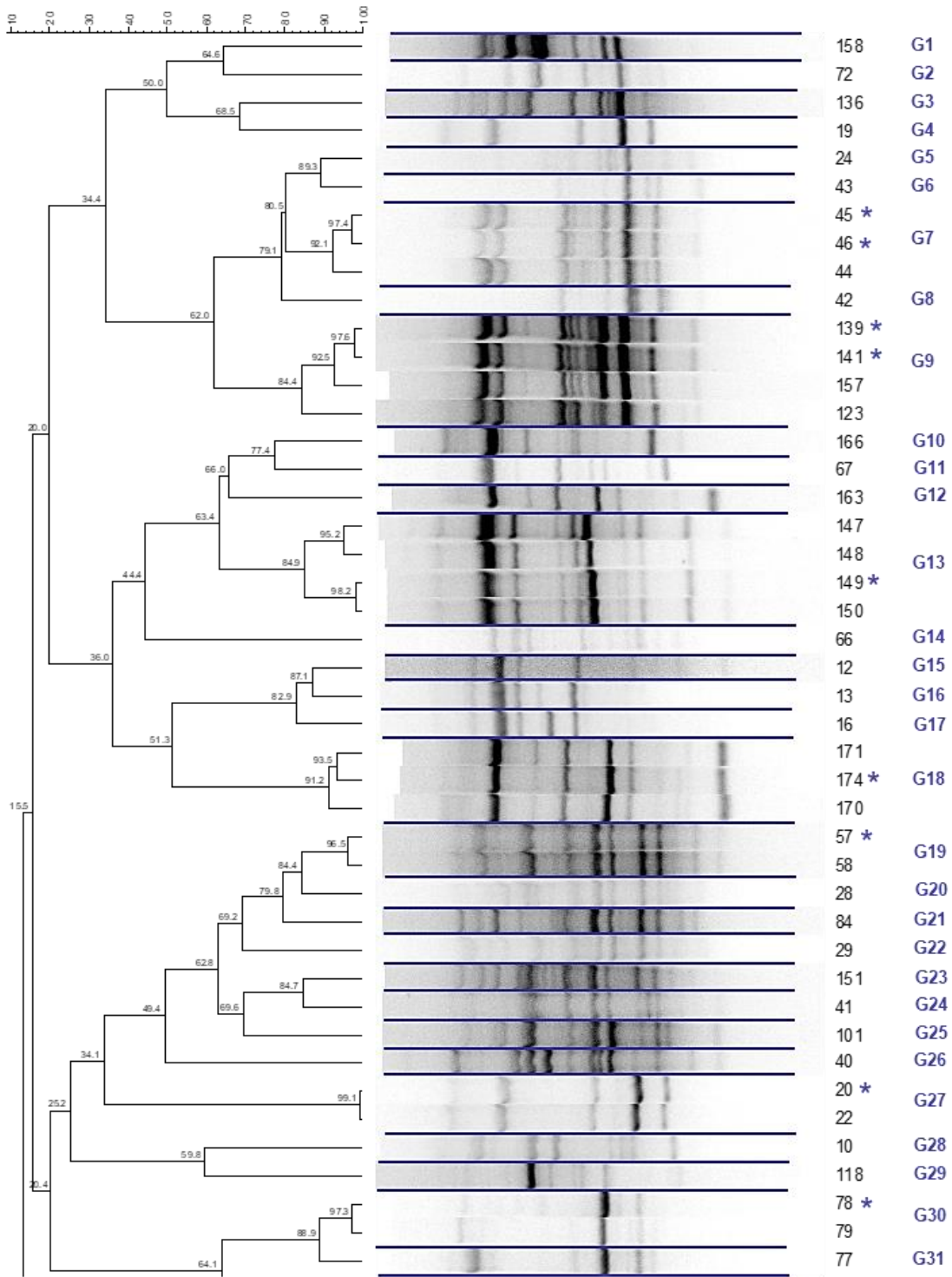
Πίνακας 4.5.2.: Αριθμός αποικιών βακτηρίων και ζυμών ανά δείγμα μετά από τη χρώση Gram που αναλύθηκαν με *rep-PCR*

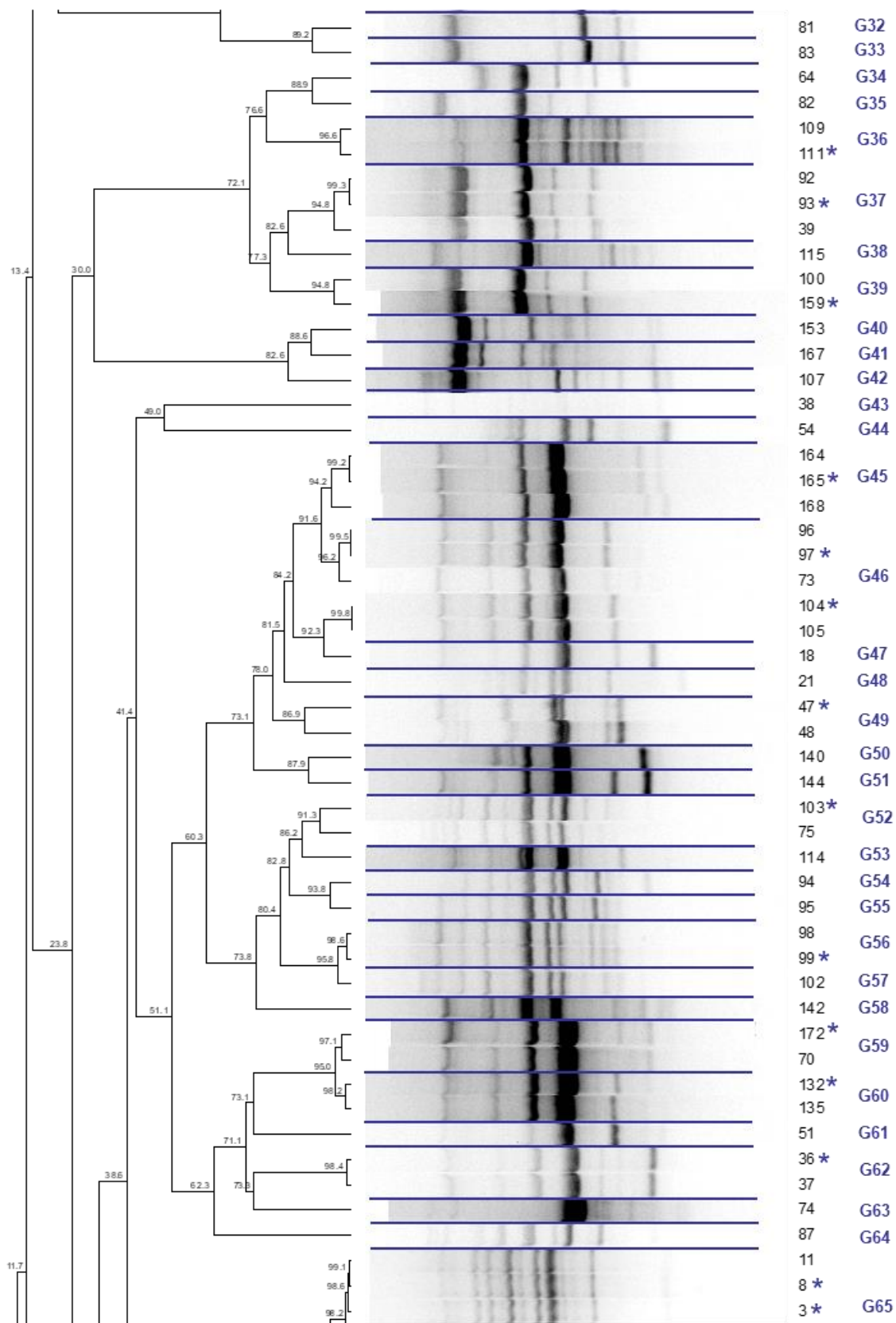
Δείγμα	Βακτήρια	Ζύμες
1	8	1
2	18	3
3	12	3
4	14	5
5	4	0
6	4	3
7	7	1
8	10	1
9	7	2
10	8	1
11	6	1
12	3	1
13	2	2
14	1	1
15	10	0
16	7	4
17	9	1
18	5	0
19	2	0
20	8	0
21	6	4
22	4	2
Σύνολο	155	36

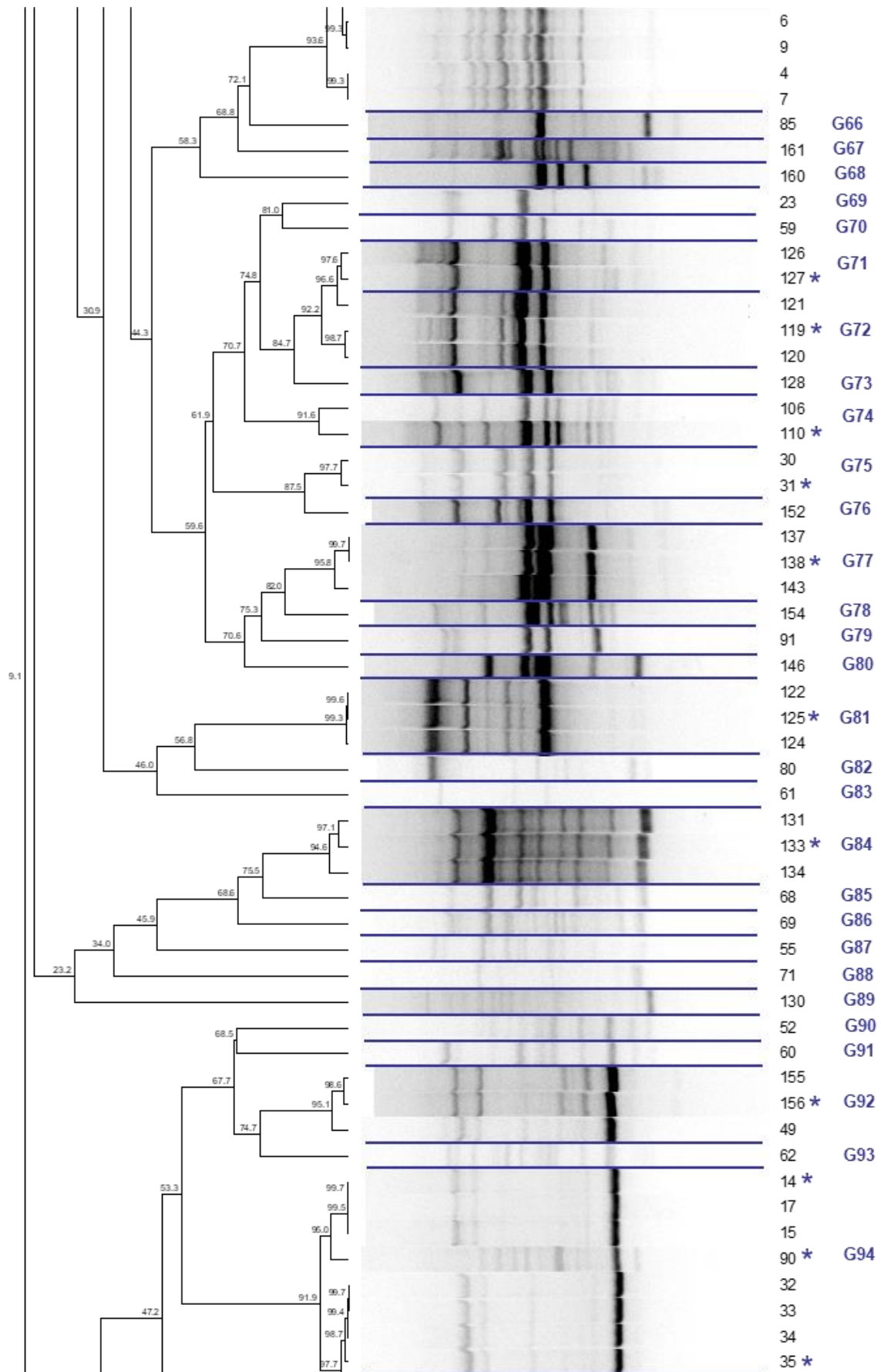
4.6. Ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών

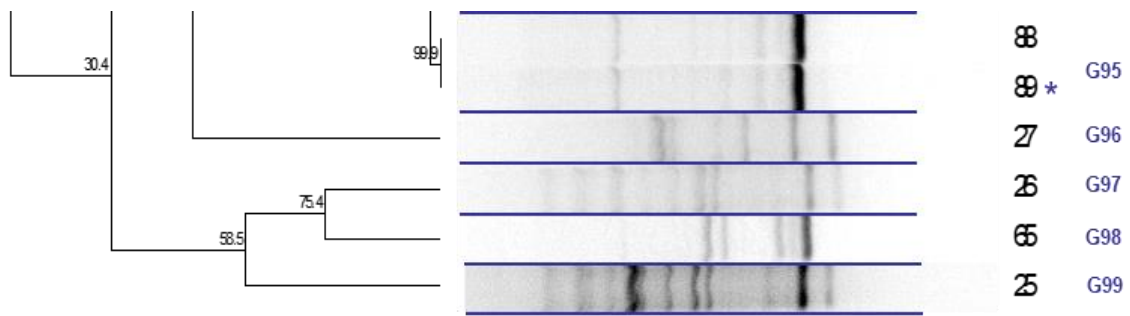
4.6.1. Ομαδοποίηση στελεχών βακτηρίων και ζυμών με τη μέθοδο rep-PCR

Μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου της rep-PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αгарόζης. Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων και των ζυμών έγινε επεξεργασία των εικόνων της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα BioNumerics v.6.1 και τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ (Ενότητα 3.7.2. και 3.7.5.). Μετά την ομαδοποίηση, τα 155 βακτήρια κατατάχτηκαν σε 99 ομάδες (Εικόνα 4.6.1.1.) και οι 36 ζύμες κατατάχτηκαν σε 31 ομάδες (Εικόνα 4.6.1.2.). Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 1-3 βακτήρια ή μία ζύμη, αντίστοιχα, από κάθε ομάδα για να πραγματοποιηθεί 16S-PCR ή ITS-PCR στα βακτήρια και τις ζύμες, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι τα συνολικά δενδρογράμματα που περιλαμβάνουν όλα τα δείγματα της παρούσας μελέτης έγιναν ώστε να απλοποιηθεί η ομαδοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών και κατ' επέκταση η διαδικασία ταυτοποίησής τους. Τα δενδρογράμματα rep-PCR των στελεχών των βακτηρίων και των ζυμών του κάθε δείγματος, παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 7.4. και 7.5., αντίστοιχα.

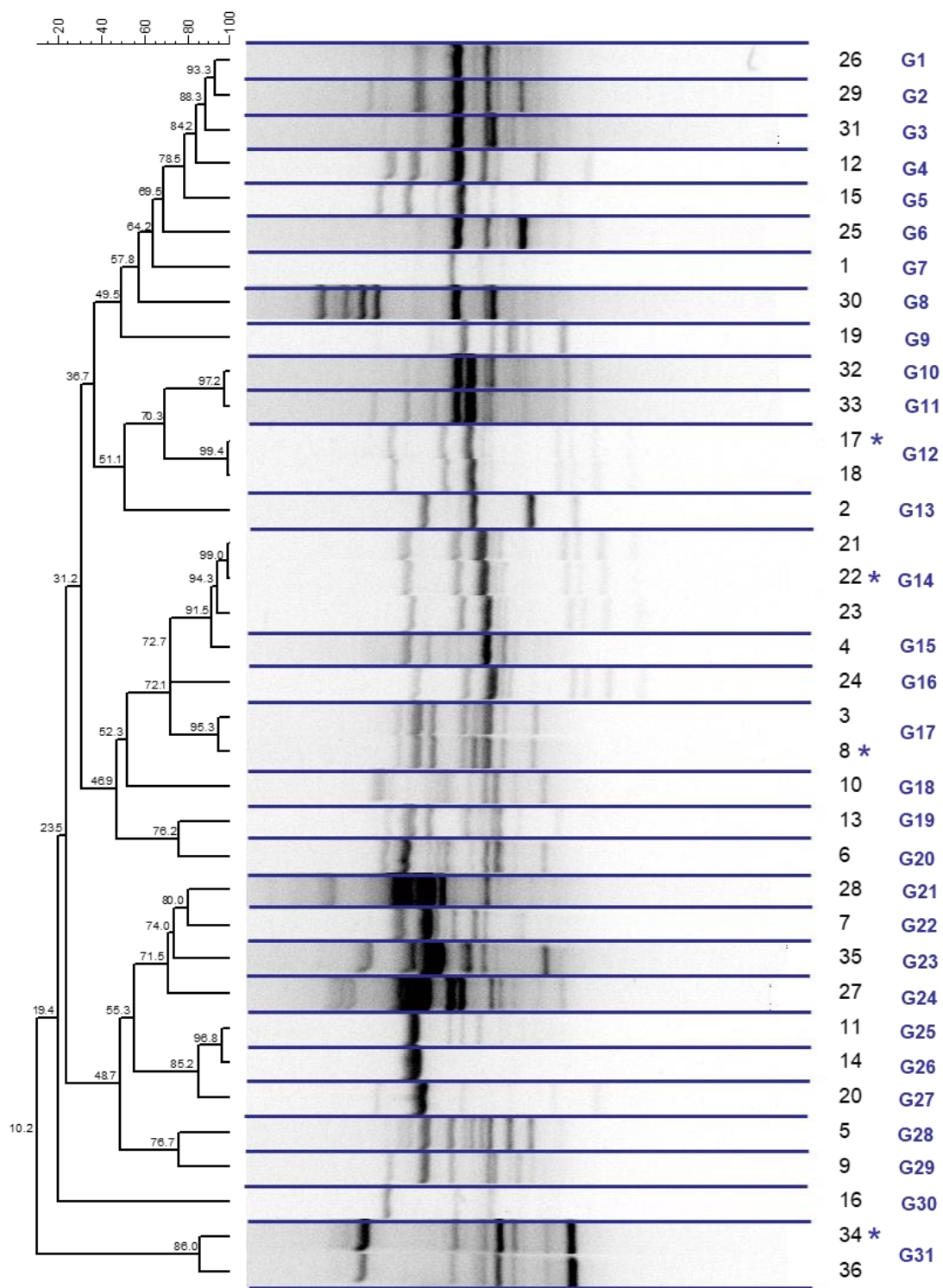








Εικόνα 4.6.1.5. Δενδρόγραμμα *rep-PCR* των στελεχών των βακτηρίων (με μπλε γραμμή διαχωρίζονται οι ομάδες και με αστερίσκο επισημαίνονται τα στελέχη που επελέγησαν για *16S-PCR*)



Εικόνα 4.6.1.2. Δενδρόγραμμα *rep*-PCR των στελεχών των ζυμών (με μπλε γραμμή διαχωρίζονται οι ομάδες και με αστερίσκο επισημαίνονται τα στελέχη που επελέγησαν για *ITS*-PCR)

4.6.2. Ταυτοποίηση στελεχών βακτηρίων με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA και ζυμών με τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS

Μετά την ολοκλήρωση της 16S-PCR και της ITS-PCR για τα βακτήρια και τις ζύμες, αντίστοιχα, έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης. Στη συνέχεια, έγινε ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο (Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, πρώην Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης). Τέλος, η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BLAST (Ενότητα 3.7.3. και 3.7.6.). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των βακτηρίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6.2.1. και στο Σχήμα 4.6.2.1., ενώ των ζυμών στον Πίνακα 4.6.2.3. και στο Σχήμα 4.6.2.2. Τα ποσοστά (%) κάλυψης (query coverage) και ομοιότητας (percentage identity) των βακτηρίων και των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα παρουσιάζονται στα Παραρτήματα 7.6. και 7.7, αντίστοιχα.

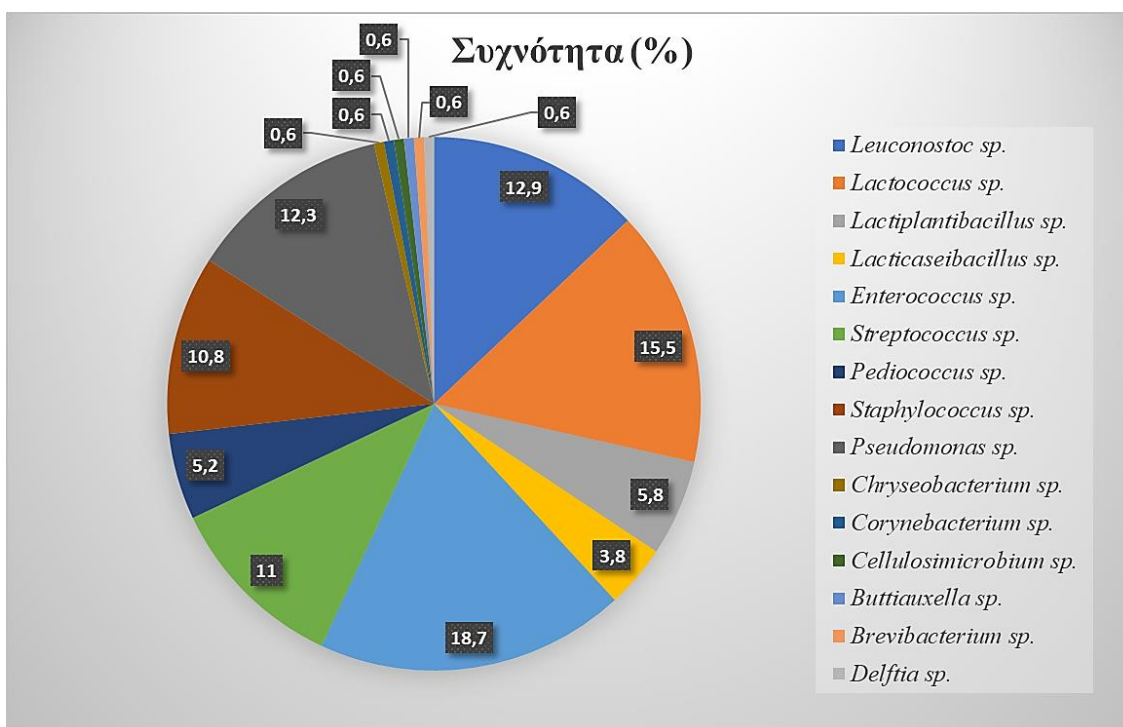
Πίνακας 4.6.2.1: Ταυτοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο γένους ή είδους μετά την αλληλούχηση του γονιδίου 16S-rRNA και κατανομή τους στα 22 δείγματα του νοπού αίγιου γάλακτος

Είδος	Δείγμα																						Συνολικές απομονώσεις	Συχνότητα απομόνωσης (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22			
<i>Brevibacterium</i> sp.						1																	1	0,6	
<i>Buttiauxella</i> sp.				1																			1	0,6	
<i>Cellulosimicrobium</i> sp.				1																			1	0,6	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>																							1	0,6	
<i>Corynebacterium casei</i>	1																						1	0,6	
<i>Delftia</i> sp.							1																1	0,6	
<i>Enterococcus durans</i>									1	1	2	1											1	6	3,9
<i>Enterococcus faecalis</i>									1									3					4	2,6	
<i>Enterococcus faecium</i>		2	2		1			1		3	1				6		1		1				18	11,6	
<i>Enterococcus</i> sp.																							1	0,6	

<i>Lacticaseibacillus casei</i>						1															1	0,6		
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>						2								3								5	3,2	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>				5										1		2			1			9	5,8	
<i>Lactococcus garvieae</i>		3				1																4	2,6	
<i>Lactococcus lactis</i>		1	2	1		1	2			2	2					2	3				3	1	20	12,9
<i>Leuconostoc lactis</i>								5															5	3,2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		3	4	3						3									2				15	9,7
<i>Pediococcus pentosaceus</i>														3							2	3	8	5,2
<i>Pseudomonas sp.</i>		6	2	2		1	2			1		2				1		1		1			19	12,3
<i>Staphylococcus aureus</i>					2													1			1		4	2,6
<i>Staphylococcus chromogenes</i>													1										1	0,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	1		1																		3	1,9
<i>Staphylococcus equorum</i>						1																	1	0,6

<i>Staphylococcus lugdunensis</i>														1										1	0,6	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>														1		1									2	1,3
<i>Staphylococcus simulans</i>																		4							4	2,6
<i>Staphylococcus warneri</i>				1																					1	0,6
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	7	1																							8	5,2
<i>Streptococcus parauberis</i>		1	1					1	2	1										1					7	4,5
<i>Streptococcus</i> sp.								1			1														2	1,3
Συνολικές απομονώσεις	8	18	12	14	4	4	7	10	7	8	6	3	2	1	10	7	9	5	2	8	6	4		155	100	
Συχνότητα απομόνωσης (%)	5,2	11,6	7,7	9,0	2,6	2,6	4,5	6,5	4,5	5,2	3,9	1,9	1,3	0,6	6,5	4,5	5,8	3,2	1,3	5,2	3,9	2,6		100		

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.6.2.1., κυρίαρχα γένη βακτηρίων στα 22 δείγματα του νωπού αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν τα γένη *Enterococcus* (18,7% των συνολικών απομονώσεων), *Lactococcus* (15,5% των συνολικών απομονώσεων), *Leuconostoc* (12,9% των συνολικών απομονώσεων), *Pseudomonas* (12,3% των συνολικών απομονώσεων), *Streptococcus* (11% των συνολικών απομονώσεων) και *Staphylococcus* (10,8% των συνολικών απομονώσεων). Επιπλέον τα γένη *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* και *Pediococcus* ανιχνεύτηκαν σε ποσοστά 5,8%, 3,8% και 5,2% των συνολικών απομονώσεων, αντίστοιχα. Τέλος, σε ποσοστό <1% των συνολικών απομονώσεων (δηλαδή σε μία από τις 155 απομονώσεις) ανιχνεύτηκαν τα γένη *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Buttiauxella*, *Brevibacterium* και *Delftia*.



Σχήμα 4.6.2.1: Συχνότητα εμφάνισης (%) των ταυτοποιημένων γενών βακτηρίων μετά την αλληλούχηση του γονιδίου 16S-rRNA στο σύνολο των δειγμάτων

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Tormo *et al.*, 2015), τα γένη *Lactococcus*, και συγκεκριμένα το είδος *L. lactis*, καθώς και τα γένη *Enterococcus* και *Leuconostoc* αποτελούν τα κυρίαρχα γένη που βρίσκονται στο γάλα. Όσον αφορά στα δείγματα της παρούσας μελέτης και στα γένη LAB που ανιχνεύθηκαν σε αυτά, αρχικά στο γένος *Lactococcus*,

ταυτοποιήθηκαν τα είδη *L. lactis* και *Lactococcus garvieae*. Το είδος *L. lactis* χρησιμοποιείται ως εναρκτήριο καλλιέργεια στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων και είναι επίσης ευρέως γνωστό για την παραγωγή της βακτηριοσίνης νισίνη, ενώ το είδος *L. garvieae* αποτελεί το μόνο παθογόνο είδος του γένους *Lactococcus* και είναι υπεύθυνο για την πρόκληση σηψαιμίας και μαστίτιδας. Όμως, την τελευταία δεκαετία το είδος *L. garvieae* έχει συνδεθεί με την παραγωγή νέων ειδών βακτηριοσινών όπως η garvicin ML, η garvieacin Q, η garvicin A και η garvicin KS (Abdelfatah & Mahboub, 2018). Τα είδη *Leuc. mesenteroides* και *Leuc. lactis* ανήκουν στην κατηγορία των ετεροζυμωτικών LAB και χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και τυριά, μέσω της ζύμωσης του κιτρικού προς παραγωγή διακετυλίου (άρωμα) (Holland & Liu, 2011).

Επιπλέον, τα είδη *L. plantarum*, *L. casei* και *L. paracasei* ανήκουν στην ομάδα των NSLAB. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα είδη *L. casei* και *L. paracasei* ανήκουν στην ίδια ομάδα (*L. casei* group) εμφανίζοντας ποσοστό ομοιότητας 98,7-99,9% με αποτέλεσμα η διάκρισή τους μέσω της αλληλούχησης του γονιδίου 16S να μην είναι κατάλληλη (Kim *et al.*, 2020). Από την άλλη πλευρά, το είδος *S. gallolyticus* αποτελεί μέρος του μικροβιώματος της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών, ενώ το είδος *Streptococcus parauberis* που απομονώνεται συχνά από το νωπό γάλα ανήκει στην ομάδα των πυογόνων στρεπτόκοκκων (pyogenic species group) και είναι υπεύθυνο για την πρόκληση μαστίτιδας στα βοοειδή (Gobbetti & Calasso, 2014). Τέλος, το είδος *P. pentosaceus* διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη συντήρηση των τροφίμων καθώς παράγει πεδιοσίνες που δρουν έναντι ορισμένων ειδών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως των ειδών *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* και *Clostridium botulinum* (Balakrishnan & Agrawal, 2012).

Όσον αφορά στους εντερόκοκκους, εντός φυσιολογικών ορίων, αποτελούν μέρος του μικροβιώματος όλων των ειδών του νωπού γάλακτος ενώ εάν βρίσκονται σε αυξημένους πληθυσμούς υποδηλώνουν κακές συνθήκες υγιεινής κατά τον χειρισμό των ζώων και του γάλακτος. Οι εντερόκοκκοι, ως LAB, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο ως καλλιέργειες εκκίνησης και ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στη ζύμωση διαφόρων τροφίμων. Τα πιο κοινά και με τη μεγαλύτερη σημασία για τη γαλακτοβιομηχανία είδη που ανιχνεύονται στο νωπό γάλα είναι τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium*. Επιπλέον, στελέχη των

ειδών *E. faecium*, *E. faecalis* και *E. durans* χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικό επίπεδο ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παραγωγή διαφόρων τυριών (Giraffa, 2003). Πέραν της χρήσης τους ως καλλιέργειες, οι εντερόκοκκοι μπορούν να ασκήσουν προστατευτική δράση έναντι ορισμένων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, αλλά και προβιοτική δράση. Συγκεκριμένα, οι Nami *et al.* (2019) διερεύνησαν τις προβιοτικές ιδιότητες του γένους *Enterococcus* σε γαλακτοκομικά προϊόντα (γιαούρτι, τυρί και τυρόπηγμα) και συμπέραναν ότι ορισμένα στελέχη του είδους *E. durans* (ES11, ES20 και ES32) αποτελούν ασφαλή προβιοτικά στελέχη με τη δυνατότητα να προκαλούν μείωση της χοληστερόλης. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Perin & Nero (2014), ορισμένα στελέχη των ειδών *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* και *Enterococcus hirae*, καθώς και του είδους *L. lactis* έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του τροφιμογενούς παθογόνου στελέχους *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Αναφορικά με το γένος *Staphylococcus*, το είδος *S. aureus* ανιχνεύεται συχνά στο νοπό γάλα αποτελώντας το κύριο αίτιο κλινικής μαστίτιδας σε μικρά μηρυκαστικά και βοοειδή με αποτέλεσμα οι εκτροφές αιγοπροβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης να υφίστανται σοβαρές οικονομικές απώλειες λόγω ενδομαστικών λοιμώξεων που αυτό προκαλεί. Επιπλέον, η μόλυνση του αιγοπρόβειου γάλακτος με το είδος *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση, καθώς πολλά παραδοσιακά αιγοπρόβεια γαλακτοκομικά προϊόντα δεν υποβάλλονται σε παστερίωση (Merz *et al.*, 2016). Η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση οφείλεται στην παραγωγή εντεροτοξινών, οι οποίες μπορούν να διατηρήσουν τη βιολογική τους δράση και μετά την παστερίωση (Dai *et al.*, 2018). Επιπλέον, οι non-aureus σταφυλόκοκκοι (non-aureus staphylococci, NAS), οι οποίοι βρίσκονται επίσης συχνά στο γάλα και τις θηλές των μηρυκαστικών αποτελούν αίτιο υποκλινικής μαστίτιδας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν είδη που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα της παρούσας μελέτης, όπως τα είδη *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. equorum*, *S. chromogenes* και *S. simulans* (Traversari *et al.*, 2019).

Επιπλέον, μετά τη συλλογή του γάλακτος και υπό θερμοκρασίες ψύξης αναπτύσσονται πληθυσμοί ψυχρότροφων βακτηρίων, οι οποίοι αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών στις θερμοκρασίες αυτές (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). Τα εξωκυτταρικά ένζυμα που αυτά παράγουν, κυρίως πρωτεάσες και λιπάσες, προκαλούν αλλοιώσεις στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο αριθμός των ψυχρότροφων που αναπτύσσεται εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τον χρόνο ψύξης. Στην περίπτωση που οι

συνθήκες υγιεινής είναι κατάλληλες, τα ψυχρότροφα συνήθως αποτελούν <10% του συνόλου των μικροοργανισμών, ενώ σε αντίθετη περίπτωση εμφανίζονται σε ποσοστό >75%. Από το γάλα έχουν απομονωθεί πολλά γένη ψυχρότροφων βακτηρίων, είτε Gram αρνητικά (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* και *Flavobacterium*) είτε Gram θετικά (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* και *Lactobacillus*), με το γένος *Pseudomonas* να αποτελεί το συχνότερα απομονωμένο γένος ψυχρότροφων βακτηρίων του νοπού γάλακτος (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007).

Όσον αφορά τα γένη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μόνο μία φορά στα δείγματα της παρούσας μελέτης, αρχικά το γένος *Buttiauxella* που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 4 ανήκει στην ομάδα των εντεροβακτηρίων (Masiello *et al.*, 2016), ενώ το γένος *Cellulosimicrobium* που ταυτοποιήθηκε στο ίδιο δείγμα έχει ανιχνευθεί σε κόπρανα βοοειδών και προβάτων (Tan *et al.*, 2013). Το είδος *Corynebacterium casei* που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 1 καθώς και το γένος *Brevibacterium* που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 6 σχετίζονται με τη χαρακτηριστική γεύση, το άρωμα και το χρώμα των τυριών που ωριμάζουν με επίχρισμα (smear-ripened chesses) (Hahne *et al.*, 2018; Quigley *et al.*, 2013). Από την άλλη πλευρά, το είδος *Chryseobacterium indologenes*, που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 20, αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο είδος στη φύση και έχει απομονωθεί από πηγές όπως το έδαφος, τα φυτά, τα τρόφιμα και το νερό (Sud *et al.*, 2020). Στο νερό και το έδαφος έχει ανιχνευθεί επιπλέον και το γένος *Delftia* (McNeill *et al.*, 2015), το οποίο ταυτοποιήθηκε στο δείγμα 7.

Στον Πίνακα 4.6.2.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών της βιβλιογραφίας που αφορούν στα είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα νοπού αίγιου γάλακτος από διάφορες περιοχές.

Πίνακας 4.6.2.2.: Συχνότητα εμφάνισης (%) των απομονωμένων ειδών και γενών βακτηρίων από δείγματα νοπού αίγειου γάλακτος ενδεικτικών μελετών της βιβλιογραφίας

Περιοχή	Μικροοργανισμοί	Βιβλιογραφική πηγή
Κίνα	<p>✓ <u>LAB</u></p> <p><i>Lactococcus lactis</i> (0,25%), <i>Lactobacillus helveticus</i> (0,07%), <i>Weissella paramesenteroides</i> (0,04%), <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (0,02%), <i>Lacticaseibacillus casei</i> (0,01%), <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> (0,01%), <i>Enterococcus faecalis</i> (0,01%), <i>Lactococcus chungangensis</i> (0,01%), <i>Ligilactobacillus pobuzihii</i> (0,01%), <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> (0,01%), <i>Lactobacillus gasseri</i> (0,009%), <i>Lactobacillus iners</i> (0,009%), <i>Bifidobacterium merycicum</i> (0,006%), <i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i> (0,005%), <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (0,004%), <i>Ligilactobacillus ruminis</i> (0,001%), <i>Companilactobacillus versmoldensis</i> (0,0003%)</p>	Huang <i>et al.</i> (2019)
Σαρδηνία	<p>✓ <u>LAB</u></p> <p>Κύρια είδη: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (15,6%) και <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (14,5%) Άλλα είδη: <i>Lactococcus raffinolactis</i>, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>Pediococcus pentosaceus</i>, <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>, <i>Latilactobacillus curvatus</i>, <i>Levilactobacillus brevis</i>, <i>Enterococcus faecium</i>, <i>Enterococcus faecalis</i></p>	Pisano <i>et al.</i> (2019)
Γαλλία	<p>✓ <u>Τα κύρια LAB</u></p> <p><i>Lactococcus lactis</i> (60%) [<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (78%) και <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (22%)], <i>Enterococcus faecalis</i> (25%), <i>Enterococcus faecium</i> (14%), <i>Aerococcus viridans</i> (0,05%), <i>Streptococcus parauberis</i> (0,05%)</p>	Tormo <i>et al.</i> (2015)

Γαλλία	<p>✓ <u>Βακτήρια</u></p> <p><i>Enterococcus faecalis</i> (33%), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (10%), <i>Acinetobacter baumannii</i> (9%), <i>Lacticaseibacillus casei</i> (7%), <i>Kocuria</i> sp. (7%), <i>Pseudomonas putida</i> (6%), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (5%), <i>Microbacterium oxydans</i> (4%), <i>Chryseobacterium indologenes</i> (2%), <i>Exiguobacterium</i> sp. (2%), <i>Lactococcus lactis</i> (1%), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1%), <i>Staphylococcus simulans</i> (1%), <i>Corynebacterium variabile</i> (1%), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1%), <i>Pantoea agglomerans</i> (1%), <i>Brevibacterium stationis</i> (1%), <i>Citrobacter freundii</i> (1%), <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> (1%), <i>Salinicoccus</i> sp. (1%), <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> (1%), <i>Micrococcus</i> sp. (1%), <i>Delftia acidovorans</i> (1%), <i>Lactococcus garvieae</i> (0,4%), <i>Staphylococcus caprae</i> (0,4%), <i>Streptococcus mitis</i> (0,4%), <i>Arthrobacter</i> sp. (0,4%), <i>Bacillus cereus</i> (0,4%),</p>	Callon <i>et al.</i> (2007)
--------	---	-----------------------------

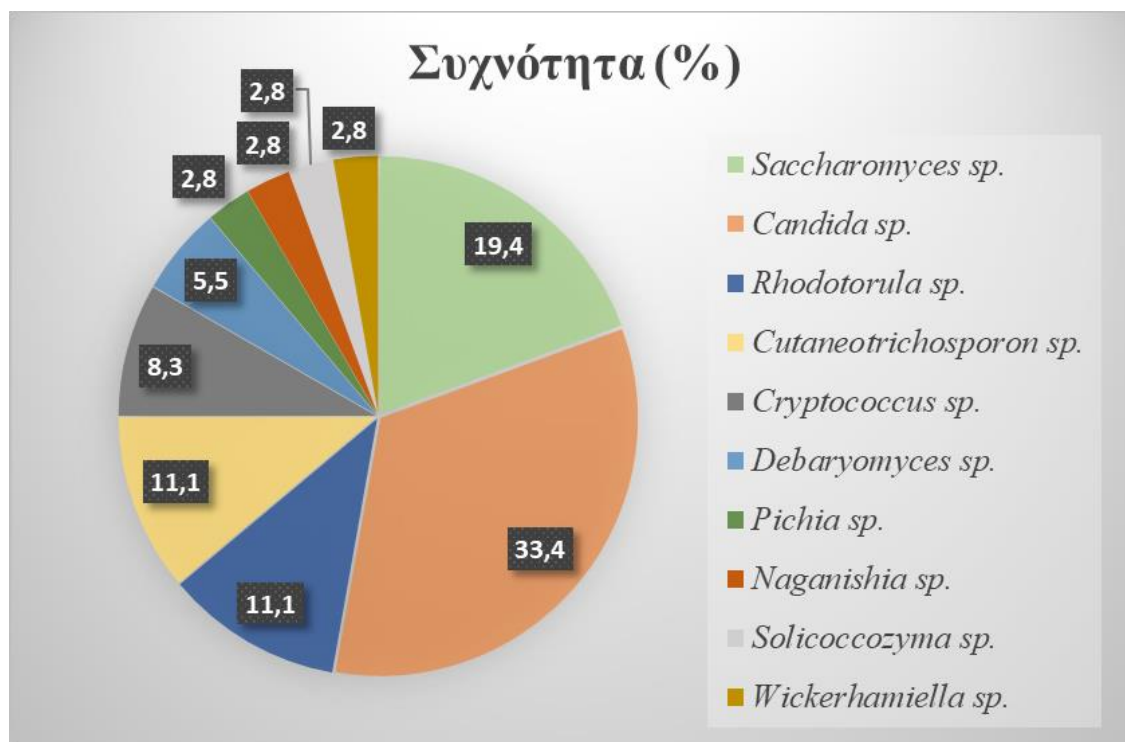
Όσον αφορά στις ζύμες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το νωπό γάλα υποστηρίζει την ανάπτυξη αυτών αν και συνήθως ανιχνεύονται σε ασήμαντους αριθμούς πιθανώς λόγω του ανταγωνισμού τους με τα ψυχρότροφα βακτήρια για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά ή λόγω αναστολής της ανάπτυξής τους από διάφορους μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα βακτήρια (Viljoen, 2001). Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών των ζυμών κάθε δείγματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6.2.3.

Πίνακας 4.6.2.3.: Ταυτοποίηση ζυμών μετά την αλληλούχηση της περιοχής ITS σε επίπεδο είδους και κατανομή τους στα 22 δείγματα του νοπού αίγειου γάλακτος

Είδος	Δείγμα																					Συνολικές απομονώσεις	Συχνότητα απομόνωσης (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			22
<i>Candida zeylanoides</i>		1	1	1					1												1	1	6	16,7
<i>Candida parapsilosis</i>																2	1				2	1	6	16,7
<i>Cryptococcus albidus</i>		1				2																	3	8,3
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>								1			1			1		1							4	11,1
<i>Debaryomyces hansenii</i>			1					1															2	5,6
<i>Naganishia adeliensis</i>		1																					1	2,8
<i>Pichia fermentans</i>			1																				1	2,8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				2		1										1							4	11,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1			2					1			1	1								1		7	19,4
<i>Solicoccozyma aeria</i>													1										1	2,8
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>										1													1	2,8

Συνολικές απομονώσεις	1	3	3	5	0	3	1	1	2	1	1	1	2	1	0	4	1	0	0	0	4	2	36	100
Συχνότητα απομόνωσης (%)	2,8	8,3	8,3	13,9	0	8,3	2,8	2,8	5,6	2,8	2,8	2,8	5,6	2,8	0	11,1	2,8	0	0	0	11,1	5,6	100	

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.6.2.2., τα κύρια γένη ζυμών που ανιχνεύθηκαν στα 22 δείγματα της παρούσας μελέτης ήταν τα γένη *Candida* (33,4% των συνολικών απομονώσεων), *Saccharomyces* (19,4% των συνολικών απομονώσεων), *Rhodotorula* (11,1% των συνολικών απομονώσεων), *Cutaneotrichosporon* (11,1% των συνολικών απομονώσεων), *Cryptococcus* (8,3% των συνολικών απομονώσεων) και *Debaryomyces* (5,5% των συνολικών απομονώσεων). Επιπλέον, σε ποσοστό 2,8% των συνολικών απομονώσεων δηλαδή σε μία από τις 43 απομονώσεις ανιχνεύθηκαν τα γένη *Pichia*, *Naganishia*, *Solicoccozyma* και *Wickerhamiella* (Σχήμα 4.6.2.2.).



Σχήμα 4.6.2.2.: Συχνότητα εμφάνισης (%) των ταυτοποιημένων γενών ζυμών μετά την αλληλούχηση της περιοχής ITS στο σύνολο των δειγμάτων

Είδη του γένους *Saccharomyces* απομονώνονται από διάφορα οικοσυστήματα όπως το έδαφος, τα τρόφιμα και τα ποτά. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, αποτελεί ένα ασφαλές είδος (EFSA, 2007) που απομονώνεται συχνά από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στελέχη του είδους *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα ζωοτροφών στα σιτηρέσια των μηρυκαστικών ζώων ή ως μικροβιακά συμπληρώματα στη ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων (Grilli *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν περιγράψει τα ευεργετικά αποτελέσματα της

συμπλήρωσής του σε σιτηρέσια μηρυκαστικών στην απόδοση του γάλακτος (Desnoyers *et al.*, 2009; De Ondarza *et al.*, 2010) ή τη σύνθεση του γάλακτος και κυρίως το ποσοστό του λίπους (Moallem *et al.*, 2009; DeVries & Chevaux, 2014). Επιπλέον, ορισμένα στελέχη του είδους αυτού μπορούν να τροποποιούν με ευνοϊκό τρόπο την ισορροπία των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). Τέλος, το είδος *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται και ως προβιοτικό από τον άνθρωπο (Munoz *et al.*, 2005).

Τα είδη του γένους *Candida* βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και απομονώνονται συχνά από το γάλα (Spanamberg *et al.*, 2009). Το είδος *Candida zeylanoides* συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης και της υφής κατά τη διάρκεια της ωρίμασης τυριών [π.χ. Ιταλικό κατσικίσιο τυρί Φόσα (Biagiotti *et al.*, 2018)] και στην παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το Κεφίρ και το Κούμις, ενώ το είδος *Candida parapsilosis* συνδέεται με την εμφάνιση αλλοιώσεων σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Garnier *et al.*, 2017; Hocking, 2014). Το είδος *Cutaneotrichosporon curvatum* αποτελεί μια ελαιώδη ζύμη με μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, λόγω της αυξανόμενης ζήτησης μικροβιακών λιπιδίων ως πρώτης ύλης για την παραγωγή βιώσιμων και ανανεώσιμων καυσίμων και εκλεπτυσμένων χημικών, και μπορεί να απομονωθεί από τρόφιμα, όπως το νοπό γάλα και το μαρούλι, ή από θαλάσσια ιζήματα (Hofmeyer *et al.*, 2016).

Το γένος *Rhodotorula* αποτελεί ένα κοινό γένος ζυμών που μπορεί να ανιχνευθεί στον αέρα, το έδαφος, το νερό, το γάλα και άλλα προϊόντα. Το είδος *Rhodotorula mucilaginosa* που ανιχνεύθηκε σε ορισμένα από τα δείγματα της παρούσας μελέτης είναι γνωστό παθογόνο για τον άνθρωπο (Wirth & Goldani, 2012). Επιπλέον, το είδος *Cryptococcus albidus* ανιχνεύεται περιστασιακά στο ανθρώπινο δέρμα, τον αέρα ή το χόμα και έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση διαφόρων λοιμώξεων, όπως η κερατίτιδα, η πνευμονία, η εγκεφαλίτιδα και η κρυπτοκοκκίαση (Aghaei Gharehbolagh *et al.*, 2017).

Ακόμη, σύμφωνα με τους Panelli *et al.* (2014), το είδος *Debaryomyces hansenii* είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και τα τρόφιμα. Παρόλο που ανιχνεύεται σπάνια στο νοπό αγελαδινό γάλα, εντούτοις στα τυριά [π.χ. Τσένταρ (Ferreira & Viljoen, 2003)] εμβολιάζεται συχνά καθώς ορισμένα στελέχη έχουν θετική επίδραση στην ωρίμαση των τυριών μέσω της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δράσης και δρουν προστατευτικά έναντι μολυσματικών παραγόντων (Lavoie *et al.*, 2011).

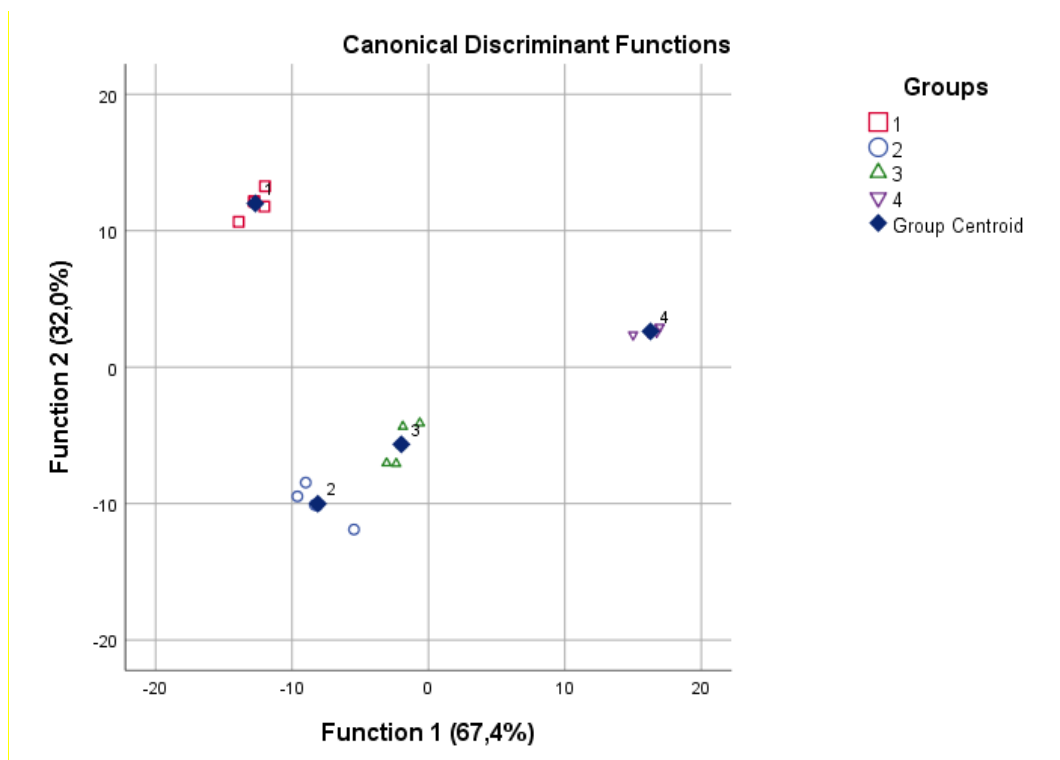
Όσον αφορά στα είδη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μόνο μία φορά στα δείγματα της παρούσας μελέτης, το είδος *Pichia fermentans* (δείγμα 3) που ανιχνεύεται στο νωπό γάλα και σε τυριά νωπού γάλακτος αποτελεί ένα πιθανό προβιοτικό είδος. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Chen *et al.* (2010) το στέλεχος *P. fermentans* BY5 θεωρείται ένα πιθανό προβιοτικό καθώς μπορεί να αφομοιώνει τη χοληστερόλη στο έντερο. Από την άλλη πλευρά, το είδος *Naganishia adeliensis* (δείγμα 2), το οποίο ενοχοποιείται για περιστασιακές λοιμώξεις (Dylag *et al.*, 2020), μαζί με το είδος *Solicoccozyma aeria* (δείγμα 13) έχουν αναφερθεί από τους Mokhtarnejad *et al.* (2016) ως τα κυρίαρχα είδη του φύλου των βασιδιομυκήτων των ζυμών που απομονώθηκαν από δείγματα χόματος στο Εθνικό Πάρκο της Λίμνης Ουρμιά στο Ιράν. Τέλος, το είδος *Wickerhamiella pararugosa* (δείγμα 10) εντοπίζεται στα ζώα και τους ανθρώπους σε διάφορα όργανα και βιολογικά υγρά συνήθως ως σαπρόφυτο (Piatti *et al.*, 2021).

Σε σύγκριση με τους βακτηριακούς πληθυσμούς λίγοι ερευνητές έχουν μελετήσει τους πληθυσμούς των ζυμών στο νωπό γάλα, παρόλο που η γνώση αυτών των πληθυσμών μπορεί να αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη στη διατήρηση υψηλού επιπέδου πρακτικών υγιεινής καθώς και την παρακολούθηση ορισμένων πληθυσμών με τεχνολογικό ενδιαφέρον για τον κλάδο της τυροκομίας. Συγκεκριμένα, οι Delavenne *et al.* (2011) σε μελέτη τους στο νωπό αγελαδινό, αίγιο και πρόβειο γάλα στη Γαλλία βρήκαν ότι οι απομονωμένες ζύμες ανήκαν στα γένη *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Malassezia*, *Pichia*, *Rhodotorula* και *Trichosporon*. Επιπλέον, στο αίγιο γάλα ο μέγιστος αριθμός διαφορετικών ειδών ζυμών που καταγράφηκε σε ένα δείγμα ήταν 4, σε αντίθεση με το αγελαδινό και το πρόβειο γάλα που έφτασαν τα 15 και 6 διαφορετικά είδη, αντίστοιχα. Όμοια ήταν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς ο μέγιστος αριθμός διαφορετικών ειδών ζυμών που ανιχνεύθηκε εντός του ίδιου δείγματος ήταν 3 (δείγματα 2, 3, 4, 16, 21). Ακόμη, στα δείγματα της παρούσας μελέτης δεν ανιχνεύθηκαν ορισμένα είδη ζυμών που αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία όπως τα είδη *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* κ.α., γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στους χαμηλούς πληθυσμούς που αυτά υπάρχουν.

Από την άλλη πλευρά, οι Callon *et al.* (2006) σε μελέτη τους στο νωπό αγελαδινό τυρί Salers στη Γαλλία βρήκαν ότι τα κύρια είδη ζυμών που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα του τυριού αυτού ήταν τα είδη *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida zeylanoides* και *Debaryomyces hansenii*, ενώ σε ορισμένα δείγματα ανιχνεύθηκαν και τα είδη *Candida parapsilosis*, *Candida silvae*, *Candida intermedia*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces unisporus* και *Pichia guilliermondii*. Τέλος οι Callon *et al.* (2007) σε μελέτη τους σε δείγματα ναυπού αίγειου γάλακτος στη Γαλλία απομόνωσαν και ταυτοποίησαν τα παρακάτω είδη ζυμών στις αντίστοιχες συχνότητες: *Rhodotorula glutinis* (22%), *Trichosporon beigeli* (15%), *Debaryomyces hansenii* (15%), *Cryptococcus magnus* (11%), *Cryptococcus curvatus* (11%), *Rhodotorula minuta* (9%), *Candida intermedia* (9%), *Kluyveromyces lactis* (2%), *Candida inconspicua* (2%) και *Candida pararugosa* (4%).

Στα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των μικροβιακών πληθυσμών στα 22 δείγματα του ναυπού αίγειου γάλακτος (αριθμός απομονώσεων κάθε γένους) εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες (Σχήμα 4.6.2.3.). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα. Το ποσοστό των δειγμάτων που ταξινομήθηκε με επιτυχία στη σωστή ομάδα ήταν 100%. Οι μεταβλητές (γένη) που συνεισέφεραν σημαντικότερα στον διαχωρισμό των ομάδων ήταν οι *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Corynebacterium*. Η λειτουργία (function) 1 περιγράφει το 67,4% των δειγμάτων με Wilks' Lambda (λ) < 0,001 ($p < 0,001$), ενώ η λειτουργία 2 το 32,0% με Wilks' Lambda (λ) = 0,005 ($p = 0,007$). Η ταξινόμηση ήταν στατιστικώς σημαντική ($P < 0,05$) και για τις δύο λειτουργίες. Με βάση τα αποτελέσματα (Σχήμα 4.6.2.3.) φαίνεται ότι υπάρχει μια τάση διαφοροποίησης στα γένη, στα οποία ανήκουν οι μικροβιακοί πληθυσμοί που απομονώθηκαν από τις ομάδες 1 και 4 σε σχέση με τις ομάδες 2 και 3, οι οποίες διαφέρουν σε μικρότερο βαθμό μεταξύ τους. Η ομάδα 1 πιθανόν διαχωρίστηκε από τις υπόλοιπες ομάδες λόγω των πολύ υψηλών αριθμών απομονώσεων από τα γένη *Leuconostoc* και *Streptococcus*. Επιπλέον η ομάδα 1 αποτελεί τη μόνη ομάδα στην οποία ταυτοποιήθηκε το γένος *Corynebacterium* (δείγμα 1). Τέλος, η ομάδα 4 διαφοροποιήθηκε από τις υπόλοιπες ομάδες εξαιτίας της εμφάνισης περισσότερων απομονώσεων (έως και τριπλάσιες) από τα γένη *Lactiplantibacillus*, *Lactococcus* και *Enterococcus* σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.



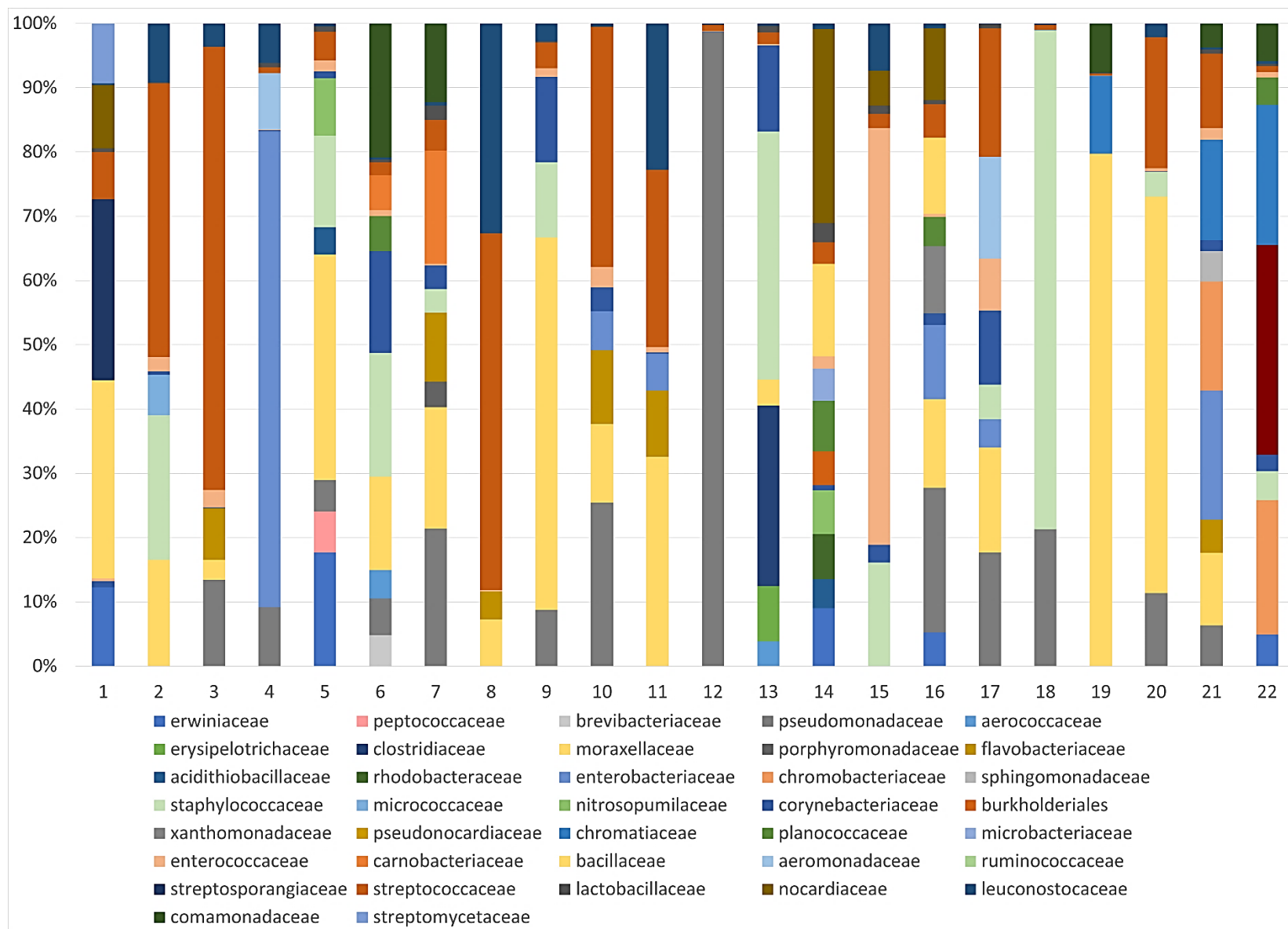
Σχήμα 4.6.2.3.: Διαχωριστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ταυτοποίησης των μικροβιακών πληθυσμών (σε επίπεδο γένους) του νοπού αίγειου γάλακτος των τεσσάρων ομάδων (1, 2, 3 και 4)

4.7. Μεταγονιδιωματική Ανάλυση

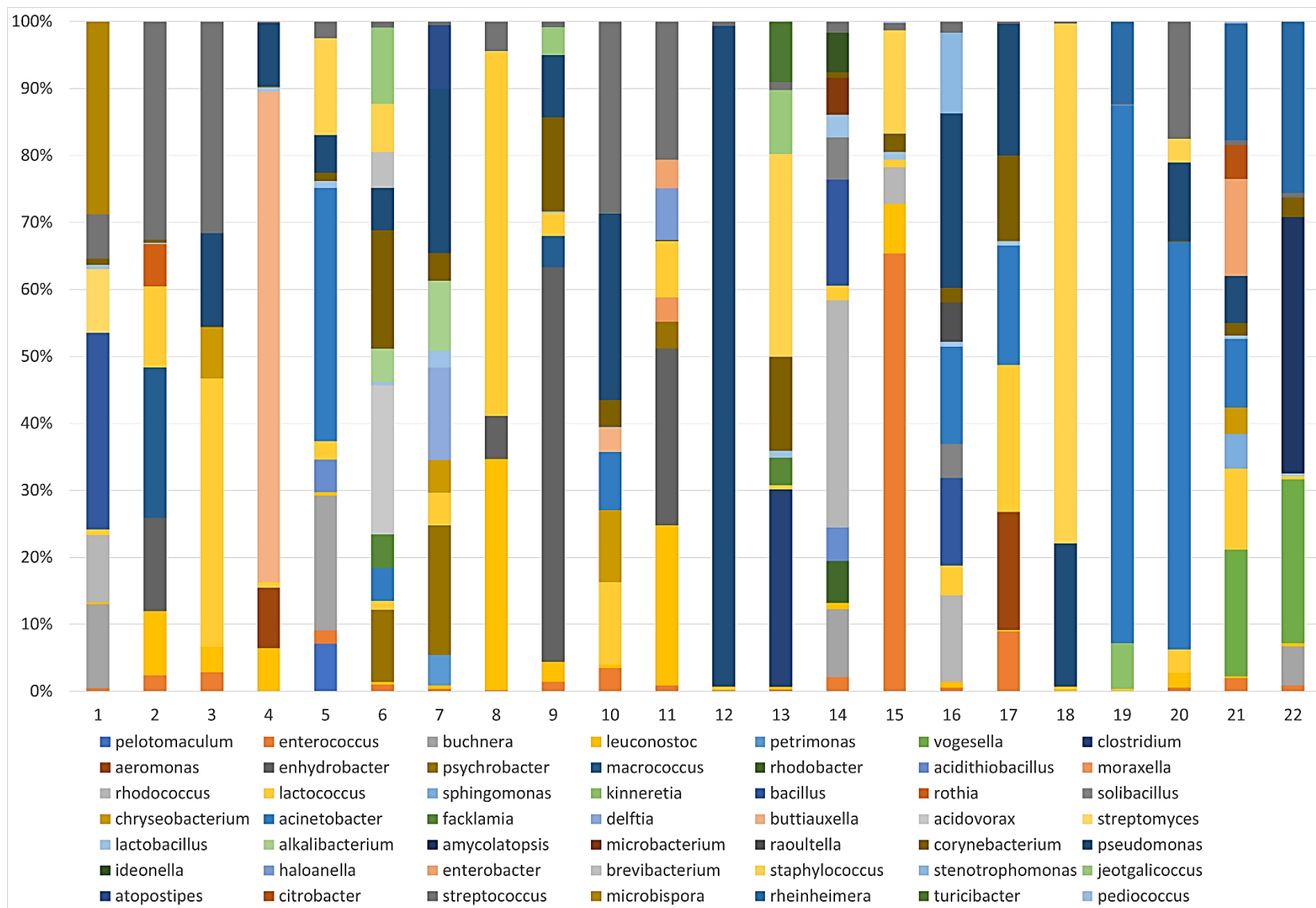
Σύμφωνα με τους Blaaid *et al.* (2013), η περιοχή ITS1-ITS2 των ζυμών/μυκήτων παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησής τους σε επίπεδο γένους αλλά συχνά και σε επίπεδο είδους. Επιπρόσθετα, αναφορικά με τα βακτήρια, παρόλο που η περιοχή V1 – V3 του γονιδίου 16S rRNA προσφέρει τη δυνατότητα ταυτοποίησής τους σε επίπεδο είδους (Johnson *et al.*, 2019), λόγω της υψηλής ομοιότητας συγγενικών ταξινομικών βαθμίδων, και συνεπώς για μία ακριβέστερη ταυτοποίηση, τόσο τα βακτήρια όσο και οι ζύμες/μύκητες αξιολογήθηκαν σε επίπεδο γένους και όχι είδους.

4.7.1. Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για τα βακτήρια

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των βακτηρίων στα δείγματα της παρούσας μελέτης στηρίχτηκε στην ενίσχυση της περιοχής V1-V3 του γονιδίου 16S-rRNA. Συνολικά, τα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν σε 11 φύλα με κυρίαρχα τα φύλα *Proteobacteria*, *Firmicutes* και *Actinobacteria* [σχετική αφθονία (relative abundance) 45, 40 και 11% κατά μέσο όρο, αντίστοιχα]. Στα Σχήματα 4.7.1.1. και 4.7.1.2. παρουσιάζεται η σχετική αφθονία των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα αυτά σε επίπεδο οικογένειας και γένους αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι στα Σχήματα αυτά αναπαρίστανται μόνο οι οικογένειες και τα γένη των βακτηρίων με σχετική αφθονία >3% στο δείγμα. Στο Παράρτημα 7.8. παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι οικογένειες (75) και τα γένη (122) των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 4.7.1.2.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο οικογένειας. Στο σχήμα αναπαρίστανται μόνο οι οικογένειες με σχετική αφθονία >3% σε τουλάχιστον ένα δείγμα.



Σχήμα 4.7.1.2.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγειου γάλακτος σε επίπεδο γένους. Στο σχήμα αναπαρίστανται μόνο τα γένη με σχετική αφθονία >3% σε τουλάχιστον ένα δείγμα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, μεταξύ των φύλων *Firmicutes* και *Proteobacteria*, κυριάρχησαν οι οικογένειες *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Leuconostocaceae* και *Enterococcaceae* (μέση σχετική αφθονία 14, 9, 4, και 4%, αντίστοιχα) καθώς και οι οικογένειες *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* και *Enterobacteriaceae* (μέση σχετική αφθονία 15, 11 και 5%, αντίστοιχα), αντίστοιχα. Σε επίπεδο γένους μεταξύ των LAB κυριάρχησαν τα γένη *Lactococcus* και *Streptococcus*, καθώς και το γένος *Pseudomonas* (μέση σχετική αφθονία 7, 6 και 11%, αντίστοιχα). Στον Πίνακα 4.7.1.1. παρουσιάζονται τα γένη των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση με σχετική αφθονία στο σύνολο των δειγμάτων μεγαλύτερη από 1%.

Πίνακας 4.7.1.1.: Τα γένη των βακτηρίων με μέση σχετική αφθονία >1% (κατά φθίνουσα σειρά) στο σύνολο των δειγμάτων της παρούσας μελέτης

Σχετική αφθονία	1 – 4%	5 – 9%	≥ 10%
	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i>	
	<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	
	<i>Buttiauxella</i>	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Corynebacterium</i>		
	<i>Rhodococcus</i>		
	<i>Bacillus</i>		
	<i>Rheinheimera</i>		
	<i>Buchnera</i>		
	<i>Clostridium</i>		
	<i>Chryseobacterium</i>		
	<i>Psychrobacter</i>		
	<i>Vogesella</i>		
	<i>Amycolatopsis</i>		
	<i>Macrococcus</i>		
	<i>Jeotgalicoccus</i>		
	<i>Aeromonas</i>		
	<i>Microbispora</i>		

Αρχικά, όσον αφορά στα LAB, το γένος *Lactococcus* επικράτησε στα δείγματα 3, 8 και 17 (σχετική αφθονία 37, 51 και 18%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 2, 10 και 21 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (10-11%). Το γένος *Streptococcus* επικράτησε στα δείγματα 2 και 10 (σχετική αφθονία 29 και 25%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 3, 11 και 20 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (30, 18 και 15%, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, τα γένη των LAB *Lactobacillus*, *Enterococcus* και *Leuconostoc* ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερη σχετική αφθονία σε σύγκριση με τα δύο προαναφερθέντα γένη. Αναλυτικότερα, το γένος *Lactobacillus* ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία της τάξης του 0,46% κατά μέσο όρο, με τη μέγιστη (2,3%) και την ελάχιστη (0,003%) να ανιχνεύονται στα δείγματα 14 και 3, αντίστοιχα. Το γένος *Enterococcus* κυριάρχησε μόνο στο δείγμα 15 με σχετική αφθονία 54%, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία της τάξης του 1,2% κατά μέσο όρο. Από την άλλη πλευρά, το γένος *Leuconostoc* ανιχνεύθηκε σε υψηλή σχετική αφθονία μόνο στα δείγματα 8 και 11 (32 και 21%, αντίστοιχα), ενώ στα υπόλοιπα δείγματα ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία της τάξης του 1,6% κατά μέσο όρο. Τέλος, το γένος *Pseudomonas* κυριάρχησε στα δείγματα 7, 12 και 16 (σχετική αφθονία 18, 90 και 17%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 3, 10, 17, 18 και 20 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (13, 24, 16, 21 και 10%, αντίστοιχα).

Επιπλέον, αξιοσημείωτη ήταν η κυριαρχία συγκεκριμένων γενών σε ορισμένα από τα δείγματα της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν αντίθετη με την πολύ χαμηλή τους αφθονία (0,0-2,7%) στα υπόλοιπα δείγματα. Πιο αναλυτικά, στο δείγμα 4 κυριάρχησε το γένος *Buttiauxella* (σχετική αφθονία 66%), στα δείγματα 9 και 11, το γένος *Enhydrobacter* (σχετική αφθονία 45 και 24%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 5, 19 και 20 το γένος *Acinetobacter* (σχετική αφθονία 26, 73 και 53%, αντίστοιχα). Τέλος, στο δείγμα 22 κυριάρχησε το γένος *Amycolatopsis* (σχετική αφθονία 25%), ενώ αξιοσημείωτη ήταν επίσης η παρουσία των γενών *Rheinheimera* (σχετική αφθονία 14 και 17%) και *Vogesella* (σχετική αφθονία 15 και 16%) στα δείγματα 21 και 22, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης και της ταυτοποίησης των βακτηρίων μετά την αλληλούχηση του γονιδίου 16S-rRNA (Κεφάλαιο 4.6.2.) τα γένη *Enterococcus* και *Leuconostoc* αποτέλεσαν κυρίαρχα γένη μεταξύ των δειγμάτων του νωπού αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης, σε αντίθεση με τη χαμηλή σχετική αφθονία τους στην πλειοψηφία των δειγμάτων, όπως προκύπτει από τα

αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής. Λαμβάνοντας υπόψιν την ομαδοποίηση των δειγμάτων (Πίνακας 4.2.3.) και το Σχήμα 4.7.1.2. συμπεραίνεται ότι στην Ομάδα 1 (Στερεά Ελλάδα) και συγκεκριμένα στα δείγματα 2, 3 και 8 κυριάρχησαν τα LAB (σχετική αφθονία 51, 73 και 87%, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση καθώς το 61, 75 και 80%, αντίστοιχα, των απομονώσεων στα δείγματα αυτά ταυτοποιήθηκε ως LAB. Όσον αφορά στα δείγματα 1 και 16 τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων διέφεραν μεταξύ τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης το 88% των απομονώσεων του δείγματος 1 άνηκε στο γένος *Streptococcus*, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης όπου το γένος *Streptococcus* ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία 4% και κυριάρχησαν τα γένη *Microbispora* και *Bacillus* (σχετική αφθονία 19%). Τέλος, στο δείγμα 16 μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης το 71% των απομονώσεων ταυτοποιήθηκε ως LAB, ενώ με βάση τη μεταγονιδιωματική ανάλυση τα LAB ανιχνεύθηκαν σε σχετική αφθονία 5%.

Από την άλλη πλευρά στην Ομάδα 2 (Βόρεια Ελλάδα) κυριάρχησαν γένη, τα οποία δεν ανήκουν στην κατηγορία των LAB. Τα δείγματα 12 και 13 παρόλο που προήλθαν από την ίδια φάρμα παρουσίασαν διαφορές στο βακτηριακό τους προφίλ. Συγκεκριμένα στο δείγμα 12, όπως προαναφέρθηκε, κυριάρχησε το γένος *Pseudomonas* (σχετική αφθονία 90%), ενώ στο δείγμα 13 κυριάρχησαν τα γένη *Staphylococcus* και *Clostridium* (σχετική αφθονία 23 και 22% αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης καθώς το 66% των απομονώσεων του δείγματος 12 ταυτοποιήθηκε ως *Pseudomonas*, ενώ στο δείγμα 13 ανιχνεύθηκε μόνο το γένος *Staphylococcus*. Το δείγμα 17 παρουσίασε την πιο ομοιόμορφη κατανομή στη σχετική αφθονία των γενών που ταυτοποιήθηκαν, ενώ στα δείγματα 18 και 20 κυριάρχησαν τα γένη *Staphylococcus* και *Acinetobacter* (σχετική αφθονία 75 και 53%, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης συμφωνούν με αυτά της μεταγονιδιωματικής με εξαίρεση το δείγμα 20, στο οποίο δεν ταυτοποιήθηκε το γένος *Acinetobacter*. Ωστόσο, το συγκεκριμένο γένος δεν ανήκει στα LAB και επομένως δεν αποτελούσε στόχο απομόνωσης της εν λόγω μελέτης.

Στην Ομάδα 3 (Πελοπόννησος) τα δείγματα διέφεραν αρκετά μεταξύ τους και η πλειοψηφία των γενών εμφανίστηκε σε χαμηλή σχετική αφθονία. Αρχικά, στα δείγματα 5 και 6 το 75 και 50%, αντίστοιχα, των απομονώσεων από την κλασική μικροβιολογική

ανάλυση ταυτοποιήθηκε ως *Staphylococcus* και LAB, αντίστοιχα, σε αντίθεση με την ποικιλομορφία των γενών που προέκυψε από τη μεταγονιδιωματική ανάλυση των ίδιων δειγμάτων. Με βάση τη μεταγονιδιωματική ανάλυση, στο δείγμα 5 κυριάρχησε το γένος *Acinetobacter* (σχετική αφθονία 26%), ενώ στο δείγμα 6 κυριάρχησε το γένος *Corynebacterium* (σχετική αφθονία 12%). Ακόμη, στο δείγμα 9 όλες οι απομονώσεις μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης χαρακτηρίστηκαν ως LAB, σε αντίθεση με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση όπου τα LAB ανιχνεύθηκαν σε σχετική αφθονία 7% και κυριάρχησε το γένος *Enhydrobacter* (σχετική αφθονία 45%). Ομοίως, στο δείγμα 14 η μία και μοναδική απομόνωση από την κλασική μικροβιολογική ανάλυση ταυτοποιήθηκε ως *Staphylococcus*, ενώ με βάση τη μεταγονιδιωματική ανάλυση κυρίαρχο γένος αποτέλεσε το γένος *Rhodococcus* (σχετική αφθονία 24%). Τέλος, στο δείγμα 19 κυριάρχησε το γένος *Acinetobacter* (σχετική αφθονία 73%), το οποίο όμως δεν ταυτοποιήθηκε κατά τη κλασική μικροβιολογική ανάλυση.

Τέλος, στην Ομάδα 4 (Νησιωτικές περιοχές) τα δείγματα παρουσίασαν επίσης ποικιλομορφία στα γένη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν τόσο κατά την κλασική μικροβιολογική όσο και τη μεταγονιδιωματική ανάλυση. Αρχικά, στα δείγματα 4 και 7 κατά την κλασική μικροβιολογική ανάλυση κυριάρχησαν τα LAB (64 και 71% των απομονώσεων, αντίστοιχα), ενώ κατά τη μεταγονιδιωματική ανάλυση κυρίαρχα ήταν τα γένη *Buttiauxella* και *Pseudomonas* αντίστοιχα (σχετική αφθονία 66 και 71% αντίστοιχα). Όσον αφορά στα δείγματα 10 και 11, κατά την κλασική μικροβιολογική ανάλυση κυριάρχησε το γένος *Enterococcus* (50% των απομονώσεων) και στα δύο δείγματα, ενώ κατά τη μεταγονιδιωματική ανάλυση κυριάρχησαν τα γένη *Streptococcus* και *Enhydrobacter* αντίστοιχα (σχετική αφθονία 25 και 24%, αντίστοιχα). Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι στο δείγμα 11 ανιχνεύθηκε το γένος *Leuconostoc* με σχετική αφθονία 21%, το οποίο όμως δεν ταυτοποιήθηκε κατά την κλασική μικροβιολογική ανάλυση. Επιπλέον, αναφορικά με το δείγμα 15, τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων βρίσκονται σε συμφωνία καθώς σύμφωνα με αυτά κυρίαρχο γένος ήταν το γένος *Enterococcus* (το 50% των απομονώσεων της κλασικής μικροβιολογικής και σχετική αφθονία 54% στη μεταγονιδιωματική ανάλυση). Τέλος, τα δείγματα 21 και 22 τα οποία προήλθαν από την ίδια φάρμα παρουσίασαν παρόμοιο βακτηριακό προφίλ μεταξύ τους τόσο κατά την κλασική μικροβιολογική όσο και κατά τη μεταγονιδιωματική ανάλυση. Ωστόσο, η κλασική μικροβιολογική ανάλυση έδειξε την κυριαρχία των LAB (>80% των απομονώσεων) σε αντίθεση με τη μεταγονιδιωματική η

όποια ανέδειξε την κυριαρχία των γενών *Amycolatopsis*, *Rheinheimera* και *Vogesella*, όπως αναφέρθηκε στην αρχή της ενότητας.

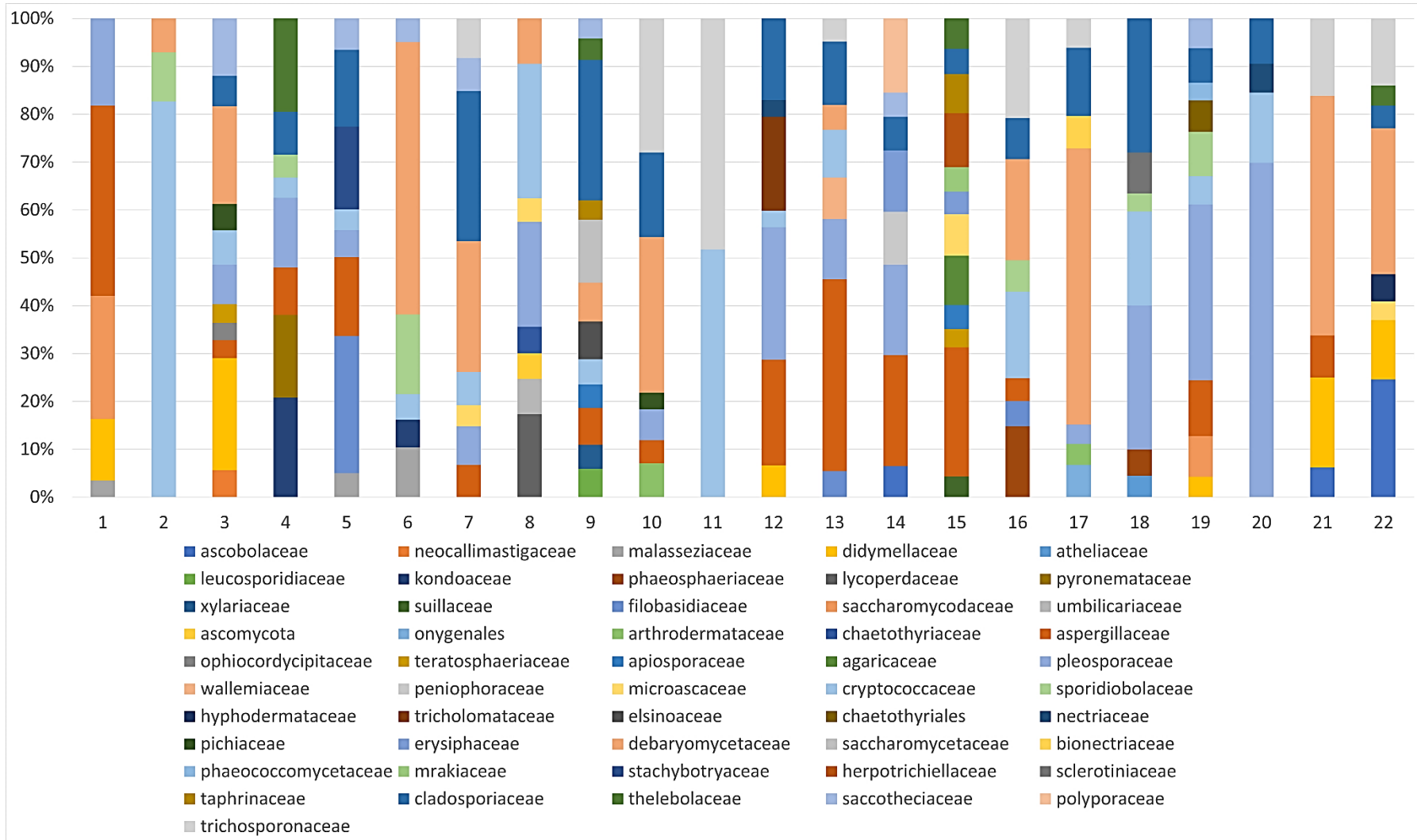
Είναι γνωστό ότι η μικροβιακή σύσταση του γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με τη διατροφή και τη φυλή του ζώου, την εποχή, τη γεωγραφική περιοχή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες κ.α. (Kamilari *et al.*, 2020). Επιπλέον, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η μικροβιακή ποικιλομορφία του νοπού αίγειου γάλακτος δεν έχει ακόμη μελετηθεί εις βάθος χρησιμοποιώντας τεχνολογίες NGS. Οι Li *et al.* (2017) μελέτησαν το μικροβίωμα του γάλακτος 3 διαφορετικών μηρυκαστικών ζώων (με βάση την περιοχή V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA), συμπεριλαμβανομένου των αιγών και βρήκαν ότι σε αυτό κυριάρχησαν βακτήρια των φύλων *Firmicutes* και *Proteobacteria*. Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς, το υψηλό ποσοστό του φύλου *Firmicutes* στο αίγειο γάλα αποδίδεται στην κυριαρχία αυτού στον γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών. Σε επίπεδο γένους τα αποτελέσματα έδειξαν την κυριαρχία του γένους *Bacillus*, το οποίο περιλαμβάνει σημαντικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν την παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και τοξινών στα προϊόντα, ενώ ακολούθησαν τα γένη *Serratia*, *Staphylococcus* και *Pseudomonas*. Η υψηλή αφθονία του γένους *Pseudomonas* στο αίγειο γάλα επιβεβαιώνεται επίσης από τη μελέτη των McInnis *et al.* (2015). Επιπλέον, το γένος *Acinetobacter*, το οποίο ανιχνεύθηκε σε υψηλή σχετική αφθονία στα δείγματα της παρούσας μελέτης, ανευρίσκεται συχνά στο νοπό γάλα με κύριες πηγές προέλευσής του να αποτελούν το νερό που παραμένει στις μηχανές άμελης μετά τον καθαρισμό τους, ο ανεπαρκής καθαρισμός του εξοπλισμού άμελης, οι ακάθαρτοι μαστοί και θηλές του ζώου, καθώς και οι χειρισμοί κατά τη μεταφορά και αποθήκευση του γάλακτος (Saad *et al.*, 2018). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Ramos & Nascimento (2019) το είδος *Acinetobacter baumannii* αποτελεί σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο για τον άνθρωπο και ευθύνεται για την πρόκληση νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Από την άλλη πλευρά, οι Papademas *et al.* (2019) μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αλληλούχησης αμπλικονίων μελέτησαν τόσο τη μικροβιακή σύσταση του Κυπριακού τυριού Χαλίτζι όσο και του νοπού αίγειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του. Αναφορικά με το βακτηριακό προφίλ του γάλακτος, κυριάρχες ήταν οι οικογένειες *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae* και *Enterobacteriaceae* ενώ σε επίπεδο γένους κυριάρχησαν τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Pseudomonas*. Τέλος, οι Zhang *et al.* (2017), σε αντίστοιχη μελέτη τους στο αίγειο γάλα στην

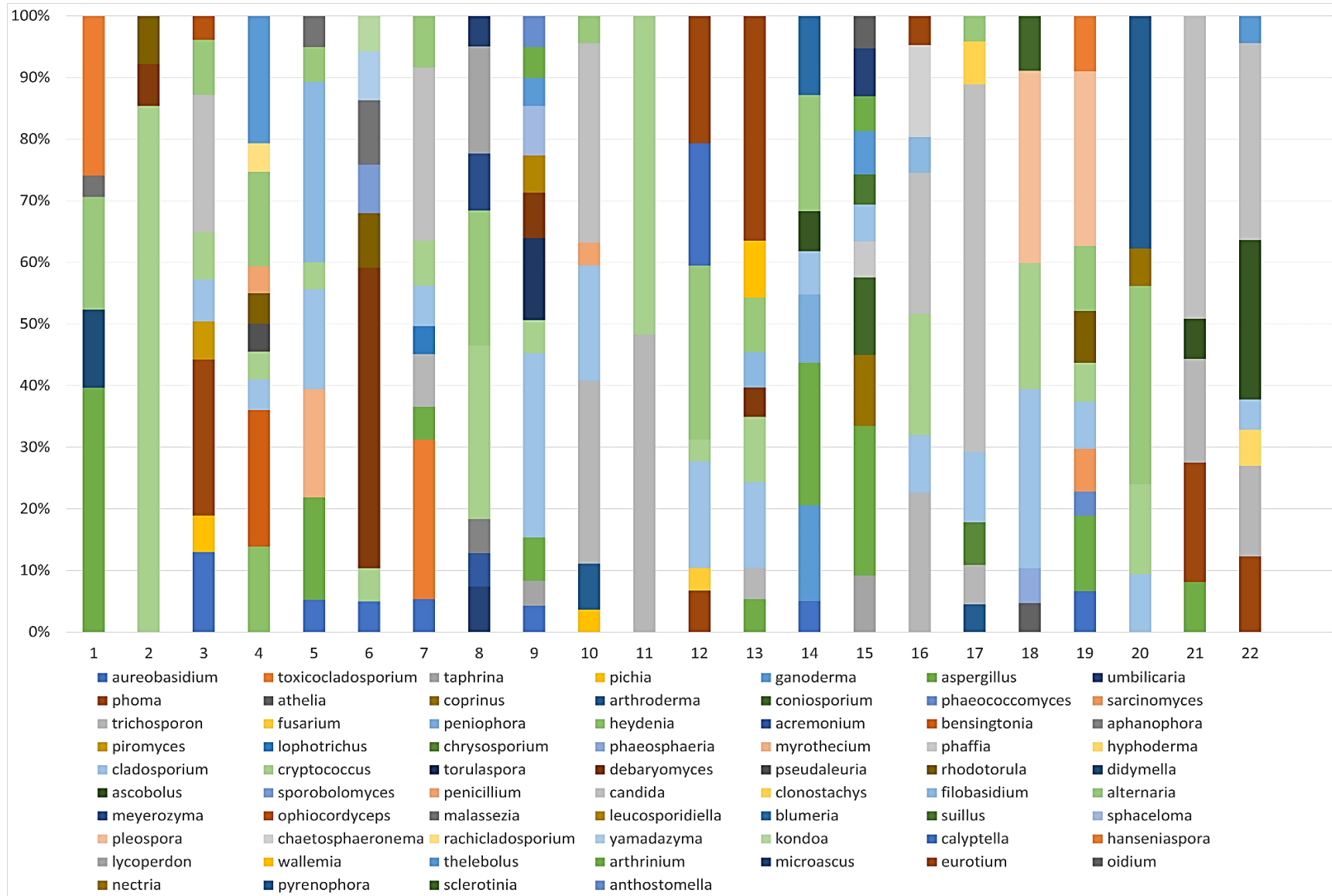
περιοχή Guanzhong της Κίνας, συμπέραναν την κυριαρχία των φύλων *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Actinobacteria* με επικρατέστερα τα γένη *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* και *Stenotrophomonas* (με βάση την περιοχή V3 και V4 του γονιδίου 16S rRNA).

4.7.2. Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για ζύμες/μύκητες

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ζυμών και των μυκήτων στα δείγματα της παρούσας μελέτης στηρίχτηκε στην ενίσχυση της περιοχής ITS1-ITS2. Συνολικά, οι ζύμες/μύκητες που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν σε 6 φύλα με κυρίαρχα τα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota* [σχετική αφθονία (relative abundance) 70 και 29% κατά μέσο όρο αντίστοιχα]. Στα Σχήματα 4.7.2.1. και 4.7.2.2. παρουσιάζεται η σχετική αφθονία των ζυμών και των μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα αυτά σε επίπεδο οικογένειας και γένους αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι στα Σχήματα αυτά αναπαρίστανται μόνο οι οικογένειες και τα γένη των ζυμών/μυκήτων με σχετική αφθονία >3% στο δείγμα. Στο Παράρτημα 7.8. παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι οικογένειες (118) και τα γένη (191) των ζυμών/μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 4.7.2.1.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των ζυμών/μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο οικογένειας. Στο σχήμα αναπαρίστανται μόνο οι οικογένειες με σχετική αφθονία >3% σε τουλάχιστον ένα δείγμα.



Σχήμα 4.7.2.2.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των ζυμών/μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο γένους. Στο σχήμα αναπαρίστανται μόνο τα γένη με σχετική αφθονία >3% σε τουλάχιστον ένα δείγμα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, τα δείγματα του αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης παρουσίασαν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς το προφίλ των ζυμών/μυκήτων τους. Μεταξύ των φύλων *Ascomycota* και *Basidiomycota*, κυριάρχησαν οι οικογένειες *Debaryomycetaceae*, *Pleosporaceae*, *Cryptococcaceae*, *Cladosporiaceae*, *Aspergillaceae* (μέση σχετική αφθονία 13, 12, 11, 9 και 9%, αντίστοιχα) καθώς και η οικογένεια *Trichosporonaceae* (μέση σχετική αφθονία 6%), αντίστοιχα, ενώ σε επίπεδο γένους κυριάρχησαν τα γένη *Cryptococcus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* και *Trichosporon* (μέση σχετική αφθονία 11, 9, 8, 8, 6 και 6%, αντίστοιχα). Στον Πίνακα 4.7.2.1. παρουσιάζονται τα γένη των ζυμών/μυκήτων με σχετική αφθονία στο σύνολο των δειγμάτων μεγαλύτερη από 1% που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση.

Πίνακας 4.7.2.1.: Τα γένη των ζυμών/μυκήτων με μέση σχετική αφθονία >1% (κατά φθίνουσα σειρά) στο σύνολο των δειγμάτων της παρούσας μελέτης

Σχετική αφθονία	1 – 4%	5 – 9%	≥ 10%
	<i>Phoma</i>	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Debaryomyces</i>	<i>Cladosporium</i>	
	<i>Pleospora</i>	<i>Alternaria</i>	
	<i>Eurotium</i>	<i>Aspergillus</i>	
	<i>Aureobasidium</i>	<i>Trichosporon</i>	
	<i>Pyrenophora</i>		
	<i>Ascobolus</i>		
	<i>Filobasidium</i>		
	<i>Thelebolus</i>		
	<i>Hanseniaspora</i>		
	<i>Rhodotorula</i>		
	<i>Malassezia</i>		
	<i>Toxicocladosporium</i>		

Όσον αφορά στα κυρίαρχα γένη των δειγμάτων, αρχικά το γένος *Cryptococcus* επικράτησε στα δείγματα 2, 8 και 11 (σχετική αφθονία 74, 26 και 46%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 16, 18 και 20 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (13-18%). Το γένος *Candida* επικράτησε στα δείγματα 7, 10, 16, 17, 21 και 22 (σχετική αφθονία 26, 28, 15, 46, 42 και 26%, αντίστοιχα), ενώ στο δείγμα 3 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή

σχετική αφθονία (19%). Από την άλλη πλευρά, το γένος *Cladosporium* κυριάρχησε στο δείγμα 9 (σχετική αφθονία 25%), ενώ στα δείγματα 5, 10, 12, 13 και 18 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (10-26%). Το γένος *Alternaria* επικράτησε στο δείγμα 12 (σχετική αφθονία 26%), ενώ στα δείγματα 1, 4, 8, 14 και 20 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (12-31%). Το γένος *Aspergillus* επικράτησε στα δείγματα 1, 14 και 15 (σχετική αφθονία 34, 21 και 17%, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα 14 και 15 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (17-21%). Τέλος, το γένος *Trichosporon* παρόλο που δεν επικράτησε κατά την κλασική μικροβιολογική ανάλυση σε κάποιο δείγμα, εντούτοις ανιχνεύθηκε σε υψηλή σχετική αφθονία (12-43%) στα δείγματα 10, 11, 16, 21 και 22.

Επιπλέον, αξιοσημείωτη ήταν η κυριαρχία συγκεκριμένων γενών σε ορισμένα από τα δείγματα της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν αντίθετη με την πολύ χαμηλή σχετική τους αφθονία στα υπόλοιπα δείγματα. Πιο αναλυτικά, στο δείγμα 3 κυριάρχησε το γένος *Phoma* (σχετική αφθονία 21%), ενώ στα δείγματα 12, 21 και 22 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (6-17%) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα, στα οποία ανιχνεύθηκε σε χαμηλή σχετική αφθονία (0,7% κατά μέσο όρο). Επιπλέον στο δείγμα 5 κυριάρχησε το γένος *Filobasidium* (σχετική αφθονία 26%), στα δείγματα 18 και 19 το γένος *Pleospora* (σχετική αφθονία 28 και 25%, αντίστοιχα), στα δείγματα 12 και 13 το γένος *Eurotium* (σχετική αφθονία 19 και 26%, αντίστοιχα), στο δείγμα 20 το γένος *Pyrenophora* (σχετική αφθονία 37%), ενώ στα υπόλοιπα δείγματα τα γένη αυτά ανιχνεύθηκαν σε χαμηλή σχετική αφθονία (0,1-0,5% κατά μέσο όρο).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης και της ταυτοποίησης των βακτηρίων μετά την αλληλούχηση της περιοχής ITS (Κεφάλαιο 4.6.2.) κυρίαρχα γένη μεταξύ των δειγμάτων του νωπού αίγιου γάλακτος της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν τα γένη *Candida*, *Saccharomyces* και *Cryptococcus*. Σημειώνεται ότι στο γένος *Cryptococcus* περιλαμβάνονται και οι αποικίες που βρέθηκαν ότι ανήκουν στο γένος *Cutaneotrichosporon* (παλαιά και νέα ονοματολογία, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, η μεταγονιδιωματική ανάλυση των ίδιων δειγμάτων ανέδειξε την κυριαρχία των γενών *Cryptococcus* και *Candida*, ενώ το γένος *Saccharomyces* ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία <0,5%. Σημειώνεται ότι με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση είχαν απομονωθεί και τελικώς ταυτοποιηθεί ελάχιστα γένη ζυμών, ενώ σε μερικά από τα δείγματα δεν απομονώθηκε καμία αποικία. Αντιθέτως, με τη μεταγονιδιωματική

ανάλυση των ίδιων δειγμάτων του γάλακτος ανιχνεύθηκε πληθώρα γενών ζυμών και μυκήτων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7.2.2.

Πιο αναλυτικά, λαμβάνοντας υπόψιν την ομαδοποίηση των δειγμάτων (Πίνακας 4.2.3.) και το Σχήμα 4.7.2.2. συμπεραίνεται ότι στην Ομάδα 1 (Στερεά Ελλάδα) κυριάρχησαν τα γένη *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* και *Cryptococcus*. Συγκεκριμένα το γένος *Cryptococcus* επικράτησε στα δείγματα 2 και 8 (σχετική αφθονία 74 και 26%, αντίστοιχα), ενώ στο δείγμα 8 ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλή σχετική αφθονία (20%) το γένος *Alternaria*. Από την άλλη πλευρά στο δείγμα 1 επικράτησε το γένος *Aspergillus* (σχετική αφθονία 34%), ενώ σε υψηλή σχετική αφθονία (22 και 16%, αντίστοιχα) ανιχνεύθηκαν επίσης τα γένη *Hanseniaspora* και *Alternaria*. Τέλος, στο δείγμα 3 επικράτησαν τα γένη *Phoma* και *Candida* (σχετική αφθονία 21 και 19%, αντίστοιχα), ενώ στο δείγμα 16 κυριάρχησε το γένος *Candida* (σχετική αφθονία 15%) και ακολούθησαν τα γένη *Trichosporon* και *Cryptococcus* (σχετική αφθονία 13-14%). Σημειώνεται ότι τα γένη *Aspergillus*, *Hanseniaspora*, *Alternaria*, *Phoma* και *Trichosporon* δεν ανιχνεύθηκαν με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση, ενώ το γένος *Cryptococcus* ανιχνεύθηκε μόνο σε δύο από τα δείγματα της Ομάδας 1 (δείγμα 2 και 16). Από την άλλη πλευρά, το γένος *Candida* ανιχνεύθηκε και με τις δύο μεθόδους στα δείγματα 3 και 16.

Στην Ομάδα 2 (Βόρεια Ελλάδα) στην πλειοψηφία των δειγμάτων κυριάρχησαν τα γένη *Alternaria*, *Cladosporium* και *Cryptococcus*. Τα δείγματα 12 και 13 τα οποία προήλθαν από την ίδια φάρμα παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ στις ζύμες και τους μύκητες που ανιχνεύθηκαν σε αυτά, με κυρίαρχο το γένος *Eurotium* (σχετική αφθονία 19 και 26%, αντίστοιχα). Χαρακτηριστική ήταν η υψηλή σχετική αφθονία (19%) του γένους *Calypotella* στο δείγμα 12, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα της παρούσας μελέτης (<0,1%). Στο δείγμα 17 κυριάρχησε το γένος *Candida* (σχετική αφθονία 46%), ενώ στα δείγματα 18 και 20 επικράτησαν αντίστοιχα τα γένη *Pleospora*, *Cladosporium* και *Cryptococcus* (σχετική αφθονία 28, 26 και 18%, αντίστοιχα) και τα γένη *Pyrenophora* και *Alternaria* (σχετική αφθονία 37 και 31%, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης στα δείγματα 18 και 20 δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου γένη ζυμών, ενώ στα δείγματα 12 και 13 δεν ανιχνεύθηκαν τα γένη που ταυτοποιήθηκαν μέσω της μεταγονιδιωμιατικής ανάλυσης. Τέλος, όσον αφορά στο δείγμα 17 η μία και μοναδική απομόνωση ανήκε στο γένος *Candida*, το οποίο σύμφωνα με τα

αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αποτέλεσε επίσης το κυρίαρχο γένος του δείγματος αυτού.

Στην Ομάδα 3 (Πελοπόννησος) τα δείγματα διέφεραν αρκετά μεταξύ τους και η πλειοψηφία των γενών εμφανίστηκε σε χαμηλή σχετική αφθονία. Αρχικά, στο δείγμα 5 κυριάρχησε το γένος *Filobasidium* (σχετική αφθονία 26%), ενώ τα γένη *Aspergillus*, *Cladosporium* και *Myrothecium* ανιχνεύθηκαν σε υψηλή σχετική αφθονία (14-15%). Στα δείγματα 6 και 9 επικράτησαν τα γένη *Debaryomyces* και *Cladosporium* (σχετική αφθονία 41 και 25%, αντίστοιχα), ενώ στο δείγμα 14 κυριάρχησε το γένος *Aspergillus* (σχετική αφθονία 21%) και ακολούθησε το γένος *Alternaria* (σχετική αφθονία 17%). Τέλος, στο δείγμα 19 κυριάρχησε το γένος *Pleospora* (σχετική αφθονία 25%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης στα δείγματα 5 και 19 δεν ανιχνεύθηκαν ζύμες. Επιπλέον, στο δείγμα 6 δεν ανιχνεύθηκε το γένος *Debaryomyces* το οποίο αποτέλεσε το κυρίαρχο γένος του δείγματος αυτού με βάση τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Ομοίως, στα δείγματα 9 και 14 ταυτοποιήθηκαν μόνο τα γένη *Candida* και *Saccharomyces* και το γένος *Cryptococcus* αντίστοιχα, τα οποία με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση ανιχνεύθηκαν σε σχετική αφθονία <1%.

Τέλος, στην Ομάδα 4 (Νησιωτικές περιοχές) τα δείγματα παρουσίασαν επίσης ποικιλομορφία στα γένη των ζυμών και των μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν. Εξάιρεση αποτελούν τα δείγματα 21 και 22, τα οποία προήλθαν από την ίδια φάρμα και παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ, με το γένος *Candida* να κυριαρχεί και στα δύο δείγματα (σχετική αφθονία 42 και 26%, αντίστοιχα). Στο δείγμα 4 επικράτησε το γένος *Bensingtonia* (σχετική αφθονία 17%) ενώ ακολούθησαν τα γένη *Thelebolus* και *Alternaria* (σχετική αφθονία 16 και 12%, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, στο δείγμα 7 κυριάρχησε το γένος *Candida* και ακολούθησε το γένος *Toxicocladosporium* (σχετική αφθονία 26 και 24%, αντίστοιχα). Στο δείγμα 10 κυριάρχησαν τα γένη *Candida* και *Trichosporon* (σχετική αφθονία 28 και 26%, αντίστοιχα), ενώ το δείγμα 11 ήταν αυτό το οποίο παρουσίασε τη μικρότερη ποικιλομορφία στα γένη των ζυμών και των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν καθώς τα γένη *Cryptococcus* και *Trichosporon* επικράτησαν με υψηλή σχετική αφθονία (46 και 43%, αντίστοιχα). Τέλος, στο δείγμα 15 ανιχνεύθηκε πληθώρα γενών με κυρίαρχο το γένος *Aspergillus* (σχετική αφθονία 17%). Αναφορικά με τα δείγματα 21 και 22, τα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής και της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης είναι σε συμφωνία καθώς και οι δύο αναλύσεις ανέδειξαν την κυριαρχία του γένους *Candida*. Από την άλλη πλευρά, στα δείγματα 4, 7 και 10

παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων καθώς σύμφωνα με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση στα δείγματα αυτά κυριάρχησαν τα γένη *Saccharomyces* και *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, και *Wickerhamiella*, αντίστοιχα. Τέλος, στο δείγμα 15 με την κλασική μικροβιολογική ανάλυση δεν ανιχνεύθηκαν ζύμες.

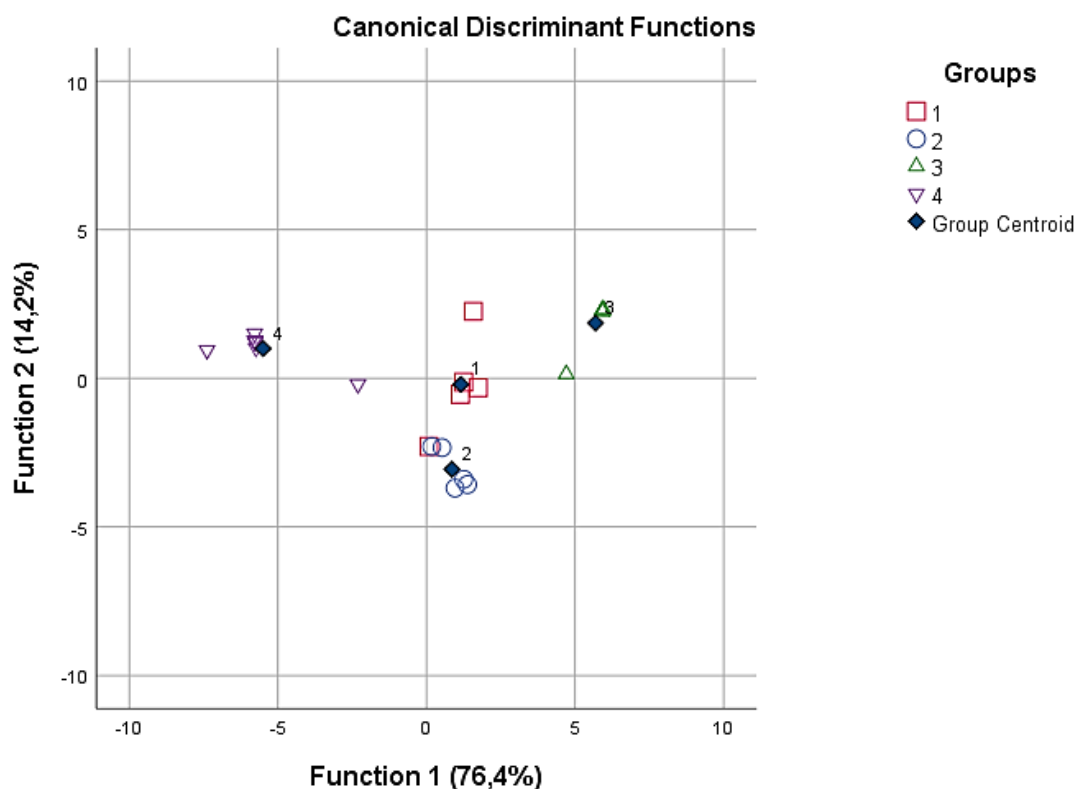
Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ένα βασικό μειονέκτημα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης αποτελεί η αδυναμία ανάπτυξης των περισσότερων μικροοργανισμών στα συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα και τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται εργαστηριακά. Αντίστοιχα, ένα μειονέκτημα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης είναι η αδυναμία διαχωρισμού ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Οι δύο προαναφερθέντες λόγοι μπορούν να εξηγήσουν την πληθώρα των γενών ζυμών/μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική, σε αντίθεση με την απουσία των γενών αυτών στα αποτελέσματα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης. Βιβλιογραφικά, η μελέτη των ζυμών/μυκήτων στα γαλακτοκομικά προϊόντα μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο παρά τη συνεισφορά τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων.

Έτσι, μόνο μία δημοσίευση βρέθηκε να μελετά τις ζύμες και τους μύκητες του αίγειου γάλακτος, αυτή των Papademas *et al.* (2019). Σύμφωνα με τους εν λόγω ερευνητές, κυρίαρχες οικογένειες στο αίγειο γάλα ήταν οι οικογένειες *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycodaceae* και *Debaryomycetaceae*, ενώ σε επίπεδο γένους κυριάρχησαν τα γένη *Kluveromyces* και *Debaryomyces*.

4.7.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων μεταγονιδιωματικής

Στα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (ποσοστά σχετικών αφθονιών) όλων των γενών βακτηρίων και ζυμών/μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν στα 22 δείγματα του νωπού αίγειου γάλακτος εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα των μεταβλητών να ταξινομηθούν στις τέσσερις ομάδες (Σχήμα 4.7.3.1.). Όλες οι μεταβλητές εισήχθησαν ανεξάρτητα. Το ποσοστό των δειγμάτων που ταξινομήθηκε με επιτυχία στη σωστή ομάδα ήταν 95,5%. Η λειτουργία (function) 1 περιγράφει το 76,4% των δειγμάτων με Wilks' Lambda (λ) = 0,002 ($p=0,121$), ενώ η λειτουργία 2 το 14,2% με Wilks' Lambda (λ) = 0,055 ($p=0,548$). Η ταξινόμηση κρίθηκε μη στατιστικώς σημαντική και για τις δύο λειτουργίες, αφού η τιμή

p-value ήταν μεγαλύτερη από 0,05, και συνεπώς δεν υπήρξε σημαντικός διαχωρισμός μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Ωστόσο, στο Σχήμα 4.7.3.1. παρατηρείται μια τάση διαχωρισμού των ομάδων 3 και 4 από τις άλλες δύο ομάδες. Τέλος, εισάγοντας τις μεταβλητές με βάση τη μέθοδο stepwise το μοντέλο αποδέχθηκε μόνο τη συνεισφορά των γενών *Malassezia* και *Cladosporium*, τα οποία ανήκουν στο βασίλειο των ζυμών/μυκήτων.



Σχήμα 4.7.3.1.: Διαχωριστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (σε επίπεδο γένους) του νοπού αίγιου γάλακτος των τεσσάρων ομάδων (1, 2, 3 και 4)

5. Συμπεράσματα

- Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη που αφορά στο νοπό αίγιο γάλα από φάρμες στην Ελλάδα με ταυτόχρονη χρήση κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης και μεταγονιδιωματικής ανάλυσης αλληλούχησης αμπλικονίων, επιτρέποντας την εις βάθος απεικόνιση της μικροβιακής του ποικιλομορφίας
- Στην Ομάδα 3 (Πελοπόννησος) καταμετρήθηκαν οι χαμηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί στα υπό μελέτη υποστρώματα/συνθήκες ανάπτυξης
- Στην Ομάδα 1 (Στερεά Ελλάδα) κυριάρχησαν τα LAB (*Lactococcus*, *Leuconostoc* και *Streptococcus*), ενώ αξιοσημείωτη ήταν επίσης η κυριαρχία του γένους *Candida* στα δείγματα της Κρήτης (21 και 22) και με τις δύο μεθόδους ανάλυσης που εφαρμόστηκαν
- Μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκε πληθώρα γενών βακτηρίων και ζυμών/μυκήτων, τα οποία δεν είχαν ταυτοποιηθεί μέσω της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης
- Κυρίαρχα Λ.Ο στο αίγιο γάλα αποτέλεσαν τα SFA (SCFA και MCFA) με το C_{16:0} να καταλαμβάνει το υψηλότερο ποσοστό, ενώ μεταξύ των MUFA και PUFA κυριάρχησαν το C_{18:1 cis9} και το C_{18:2 n6c}, αντίστοιχα
- Οι οξειδωτικοί δείκτες (MDA και PC) παρουσίασαν διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων, δίνοντας μία εικόνα για την οξειδωτική σταθερότητα κάθε δείγματος γάλακτος και συνεπώς της ποιότητάς τους

6. Βιβλιογραφία

1. Abdelfatah, E. N., & Mahboub, H. H. H. (2018). Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 201–207. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.11.002
2. Abdelhamid, A. S., Martin, N., Bridges, C., Brainard, J. S., Wang, X., Brown, T. J., ... Hooper, L. (2018). Polyunsaturated fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd012345.pub2
3. Aghaei Gharehbolagh, S., Nasimi, M., Agha Kuchak Afshari, S., Ghasemi, Z., Rezaie, S. (2017). First case of superficial infection due to *Naganishia albida* (formerly *Cryptococcus albidus*) in Iran: A review of the literature. *Current Medical Mycology Jun*;3(2):33-37. doi: 10.18869/acadpub.cmm.3.2.33
4. Aktas, M. S., Kandemir, F. M., Kirbas, A., Hanedan, B., & Aydin, M. A. (2017). Evaluation of oxidative stress in sheep infected with *Psoroptes ovis* using total antioxidant capacity, total oxidant status, and malondialdehyde level. *Journal of Veterinary Research*, 61(2), 197–201. doi:10.1515/jvetres-2017-0025
5. 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
6. Almaghrabi, O. A. (2015). Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 227–231. doi:10.1016/j.sjbs.2014.12.008
7. Ambrosoli, R., di Stasio, L., & Mazzocco, P. (1988). Content of α s1-Casein and Coagulation Properties in Goat Milk. *Journal of Dairy Science*, 71(1), 24–28. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(88)79520-x
8. Amigo, L., & Fontecha, J. (2011). Milk | Goat Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 484–493. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00313-7
9. Ander, B. P., Dupasquier, C. M., Prociuk, M. A., & Pierce, G. N. (2003). Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental and clinical cardiology*, 8(4), 164–172. PMID: 19649216; PMCID: PMC2719153.
10. Asperger, H., & Zangerl, P. (2011). Pathogens in Milk | *Staphylococcus aureus* – Dairy. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 111–116. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00538-0

11. Aureli, P., Franciosa, G., & Scalfaro, C. (2011). Pathogens in Milk | *Clostridium* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 47–53. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00391-5
12. Ayechu-Muruzabal, V., van Stigt, A. H., Mank, M., Willemsen, L. E. M., Stahl, B., Garsen, J., & van't Land, B. (2018). Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development. *Frontiers in Pediatrics*, 6. doi: 10.3389/fped.2018.00239
13. Balakrishnan, G., & Agrawal, R. (2012). Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4138–4142. doi: 10.1007/s13197-012-0891-9
14. Barłowska, J., Sz wajkowska, 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. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x
15. Barton, M. D. (2011). Pathogens in Milk | *Yersinia enterocolitica*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 117–123. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00398-8
16. Bauman, D. E., McGuire, M. A., & Harvatine, K. J. (2011). MAMMARY GLAND, MILK BIOSYNTHESIS AND SECRETION | Milk Fat. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 352–358. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00292-2
17. Biagiotti, C., Ciani, M., Canonico, L., & Comitini, F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*. doi:10.1007/s00217-018-3104-6
18. Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4): 665-684. doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665
19. Blaaid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 218–224. doi:10.1111/1755-0998.12065
20. Bokulich, N. & Mills, D. (2012). Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports*, 45(7), 377–389. doi: 10.5483/bmbrep.2012.45.7.148
21. Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med chem* 4: 517-522. doi: 10.4172/2161-0444.1000188

22. Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, I., & Morand-Fehr, P. (2005). The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 13–23. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.06.003
23. Büchl, N. R., & Seiler, H. (2011). YEASTS AND MOLDS | Yeasts in Milk and Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 744–753. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00498-2
24. Bukin, Y., Galachyants, Y., Morozov, I., Bukin, S., Zakharenko, A., Zemskaya, T. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data* 6, 190007. doi: 10.1038/sdata.2019.7
25. Bumgarner, R. (2013). Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. *Current Protocols in Molecular Biology*. doi:10.1002/0471142727.mb2201s101
26. Bushnaq Inea (1986). *Arab Folktales: Pantheon fairy tale & folklore library*, Pantheon Books. ISBN:9780394501048
27. Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., & Montel, M.-C. (2006). Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(2), 172–180. doi: 10.1016/j.syapm.2005.07.008
28. Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., & Montel, M.-C. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(7), 547–560. doi: 10.1016/j.syapm.2007.05.004
29. Cecchini, S., & Fazio, F. (2020). Assessment of Total Antioxidant Capacity in Serum of Healthy and Stressed Hens. *Animals*, 10(11), 2019. doi:10.3390/ani10112019
30. Chandan, R. C. Attaie, R. and Shahani, K. M. (1992). Nutritional aspects of goat milk and its products. In: *Proceedings of 5th Int. Conf. on Goats*, vol. II, pp. 399-420
31. Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., & Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 5–26. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.019
32. Chen, L.-S., Ma, Y., Maubois, J.-L., He, S.-H., Chen, L.-J., & Li, H.-M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Science & Technology*, 90(5), 537–548. doi: 10.1051/dst/2010001

33. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080
34. Clark, S., & Mora García, M. B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10026–10044. doi: 10.3168/jds.2017-13287
35. Clark, S., & Sherbon, J. W. (2000). Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, 38(2), 123–134. doi: 10.1016/s0921-4488(00)00154-1
36. COCOLIN, L., FOSCHINO, R., COMI, G., & GRAZIAFORTINA, M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*, 24(7-8), 752–758. doi: 10.1016/j.fm.2007.03.001
37. Cooney, S., Iversen, C., Healy, B., O'Brien, S., & Fanning, S. (2011). Pathogens in Milk | *Enterobacter* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 72–80. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00522-7
38. Cuadros-Orellana, S., Leite, L.R., Smith, A., Medeiros, J.D., Badotti, F., Fonseca, P.L.C., Vaz, A.B., Oliveira, G., Góes-Neto, A. (2013). Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: A Decade in Review. *Fungal Genomics & Biology*, 03(02). doi: 10.4172/2165-8056.1000110
39. Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martinez Ferez, A., Guadix, E., Sanchez-DeMedina, F., Zarzuelo, A., Suarez, M.D., Boza, J.J. and Martinez-Augustin, O. (2006). Goat milk oligosaccharides are 21anti-inflammatory in rats with hapten induced colitis. *Journal of Nutrition*, 136: 672-676. doi: 10.1093/jn/136.3.672
40. Dai, J., Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., Wang, J., Ding, Y., Zhang, S., Yang, X., Lei, T., Xue, L., Wu, H. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China. *Front. Microbiol.* 10:641. doi: 10.3389/fmicb.2019.00641
41. Dalton, J., & Hill, C. (2011). Pathogens in Milk | *Mycobacterium* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 87–92. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00520-3
42. Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*, 19–40. doi: 10.1016/b978-0-12-405872-9.00002-1

43. De Almeida Júnior, W. L. G., Ferrari, Í. da S., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M., & Dias, F. S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96–103. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.013
44. De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 78–90. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00259-4
45. De Filippis F., Parente E. and Ercolini D. (2017). Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial Biotechnology*. 10(1): 91-102. doi: 10.1111/1751-7915.12421
46. Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 247–251. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029
47. Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., & Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 185–190. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003
48. De Ondarza, M. B., Sniffen, C. J., Dussert, L., Chevaux, E., Sullivan, J., & Walker, N. (2010). CASE STUDY: Multiple-Study Analysis of the Effect of Live Yeast on Milk Yield, Milk Component Content and Yield, and Feed Efficiency. *The Professional Animal Scientist*, 26(6), 661–666. doi: 10.15232/s1080-7446(15)30664-1
49. De Rancourt, M., Fois, N., Lavín, M. P., Tchakérian, E., & Vallerand, F. (2006). Mediterranean sheep and goats production: An uncertain future. *Small Ruminant Research*, 62(3), 167–179. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.08.012
50. Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., & Sauvant, D. (2009). Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1620–1632. doi: 10.3168/jds.2008-1414
51. Devle, H., Vetti, I., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G., & Ekeberg, D. (2012). A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), 1036–1043. doi: 10.1002/ejlt.201100333

52. DeVries, T. J., & Chevaux, E. (2014). Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6499–6510. doi: 10.3168/jds.2014-8226
53. Djordjevic, J., Ledina, T., Baltic, M.Z., Trbovic, D., Babic, M., Bulajic, S. Fatty acid profile of milk. The 60th International Meat Industry Conference MEATCON2019. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 333 (2019) 012057. doi:10.1088/1755-1315/333/1/012057
54. Dylag, M., Colon-Reyes, R. J., & Kozubowski, L. (2020). Titan cell formation is unique to *Cryptococcus* species complex. *Virulence*, 11(1), 719–729. doi: 10.1080/21505594.2020.1772657
55. EFSA. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587. doi: 10.2903/j.efsa.2007.587
56. Erkmén, O. & Bozoglu, T.F. (2016). Spoilage of Milk and Milk Products. *Food Microbiology: Principles into Practice*, First Edition, 307–336. John Wiley & Sons, Ltd. Published 2016 by John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781119237860.ch19
57. Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., Dalir-Naghadeh, B., & Malekinejad, H. (2012). Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in goats naturally infected with *Babesia ovis*. *Acta Parasitologica*, 57(3). doi:10.2478/s11686-012-0038-1
58. Ferreira, A. & Viljoen, B.C. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 131–140. doi:10.1016/s0168-1605(03)00252-6
59. Flachowsky, G. (2004). *Rumen Microbiology*: Burk A Dehority (Ed.), Nottingham University Press, Nottingham, NG11 OAX, UK, 2003, Hardcover, ISBN 1-897676-99-9, £ 40, 372 pp. *Animal Feed Science and Technology*, 113
60. Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. doi: 10.5772/47766
61. Frankel, E. N., & Neff, W. E. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 754(3), 264–270. doi:10.1016/0005-2760(83)90141-8
62. Garin-Bastuji, B. (2011). Pathogens in Milk | *Brucella* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 31–39. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00389-7

63. Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5(3), 42. doi: 10.3390/microorganisms5030042
64. Getaneh G, Mebrat A, Wubie A, Kendie H (2016) Review on Goat Milk Composition and Its Nutritive Value. *J Nutr Health Sci* 3(4): 401. doi: 10.15744/2393-9060.3.401
65. Gilbert, J.A., Meyer, F., Antonopoulos, D., Balaji, P., Brown, C.T., Brown, C.T., Desai, N., Eisen, J.A., Evers, D., Field, D., et al. (2010a). Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. *Stand. Genomic Sci.* 3, 243–248. doi: 10.4056/sigs.1433550
66. Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215–222. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00183-1
67. Gobbetti, M., & Calasso, M. (2014). *STREPTOCOCCUS* | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 535–553. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00324-4
68. Govan, J.R.W. (2012). Pseudomonads and non-fermenters, Book: *Medical Microbiology – A guide to microbial infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory diagnosis and control*, 18th edition. Elsevier, ISBN: 9780702040894
69. Grażyna, C., Hanna, C., Adam, A., & Magdalena, B. M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 165–178. doi: 10.1111/1471-0307.12359
70. Grilli, E., Tormo, H., Fustini, M., Deneufbour, C., Losio, M., Formigoni, A., Durand, F., Durandet, H. (2016). Is raw milk microbiota influenced by the use of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as ruminant feed additive?. *International Journal of Dairy Science*, 11 (3), pp.124-129. doi: 10.3923/ijds.2016.124.129. HAL id: hal-01601365
71. 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. doi:10.1590/s0100-40422009000100032
72. Haenlein, G. F. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163. doi: 10.1016/j.smallrumres.2003.08.010
73. Hahne, J., Kloster, T., Rathmann, S., Weber, M., & Lipski, A. (2018). Isolation and characterization of *Corynebacterium* spp. from bulk tank raw cow's milk of

- different dairy farms in Germany. PLOS ONE, 13(4), e0194365. doi: 10.1371/journal.pone.0194365
74. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791
75. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245–R249. doi: 10.1016/s1074-5521(98)90108-9
76. Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M. (2007). Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162–7168. doi: 10.1128/aem.00866-07
77. Hassan, A. N., & Frank, J. F. (2011). MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH MILK. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 447–457. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00309-5
78. Hatzigeorgiou, I., Vallerand, F., Tsimpoukas, K., Zervas, G., The socio-economics of sheep and goat farming in Greece, and the implications for future rural development, LSIRD BRAY Conference, December 1998
79. Heydel, C., & Willems, H. (2011). Pathogens in Milk | *Coxiella burnetii*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 54–59. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00392-7
80. Hiatt, 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. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4_5
81. Hilali, M., El-Mayda, E., & Rischkowsky, B. (2011). Characteristics and utilization of sheep and goat milk in the Middle East. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 92–101. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.029
82. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
83. Hiraoka, S., Yang, C., & Iwasaki, W. (2016). Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. *Microbes and Environments*, 31(3), 204–212. doi: 10.1264/jsme2.me16024

84. Hocking, A. D. (2014). SPOILAGE PROBLEMS | Problems Caused by Fungi. Encyclopedia of Food Microbiology, 471–481. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00315-3
85. Hofmeyer, T., Hackenschmidt, S., Nadler, F., Thürmer, A., Daniel, R., & Kabisch, J. (2016). Draft Genome Sequence of *Cutaneotrichosporon curvatus* DSM 101032 (Formerly *Cryptococcus curvatus*), an Oleaginous Yeast Producing Polyunsaturated Fatty Acids. Genome Announcements, 4(3). doi: 10.1128/genomea.00362-16
86. Holland, R., Crow, V., & Curry, B. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Pediococcus* spp. Encyclopedia of Dairy Sciences, 149–152. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00269-7
87. Holland, R., & Liu, S.-Q. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Leuconostoc* spp. Encyclopedia of Dairy Sciences, 138–142. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00267-3
88. Huang, F., Liu, S., Zhou, X., Wang, P., He, R., Zhou, Z., Zou, C. (2019). High-throughput sequencing analysis of bacterial diversity in goat milk. doi:10.1101/751149
89. Isobe, N., Kubota, H., Yamasaki, A., & Yoshimura, Y. (2011). Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows. Journal of Dairy Science, 94(8), 3868–3874. doi:10.3168/jds.2010-4133
90. Jenness, R. (1980). Composition and Characteristics of Goat Milk: Review 1968–1979. Journal of Dairy Science, 63(10), 1605–1630. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(80)83125-0
91. Jensen, R. G. (2002). The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. Journal of Dairy Science, 85(2), 295–350. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(02)74079-4
92. Jensen, R. G., Quinn, J. G., Carpenter, D. L., & Sampugna, J. (1967). Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Milk Fatty Acids: A Review. Journal of Dairy Science, 50(2), 119–126. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(67)87375-2
93. Jiang J, Bjoerck L, Fonden R, Emanuelson M, 1996. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-ocladecadienoic acid in bovine milk: effects of feeds and dietary regimen. J. of Dairy Sci. 79, 438-445. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76383-X.
94. Jirillo, F., Martemucci, G., D’Alessandro, A.G., Panaro, M.A., Cianciulli, A., Superbo, M., Jirillo, E. and Magrone, T. (2010). Ability of goat milk to modulate healthy human peripheral blood lymphomonocyte and polymorphonuclear cell

- function: In-vitro effects and clinical implications. *Current Pharmaceutical Design*, 16: 870-876. doi: 10.2174/138161210790883534.
95. Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., et al. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strainlevel microbiome analysis. *Nat. Commun.* 10, 5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1
96. Kamilari, E., Anagnostopoulos, D.A., Papademas, P., Efthymiou, M., Tretiak, S., Tsaltas, D. (2020). Snapshot of Cyprus Raw Goat Milk Bacterial Diversity via 16S rDNA High-Throughput Sequencing; Impact of Cold Storage Conditions. *Fermentation* 2020, 6, 100; doi:10.3390/fermentation6040100
97. Kelly ML, Berry JR, Dwyer DA, Griinari JM, Chouinard PY, Van Amburgh ME, Bauman DE, 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128, 881-885. doi: 10.1093/jn/128.5.881.
98. 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). doi: 10.1186/s12944-019-0969-8
99. 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. doi: 10.14202/vetworld.2019.12-33
100. Kim, E., Yang, S.-M., Cho, E.-J., & Kim, H.-Y. (2020). Novel real-time PCR assay for *Lactobacillus casei* group species using comparative genomics. *Food Microbiology*, 103485. doi: 10.1016/j.fm.2020.103485
101. Kim, M., & Chun, J. (2014). 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *New Approaches to Prokaryotic Systematics*, 61–74. doi: 10.1016/bs.mim.2014.08.001
102. Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Chun, J., and Yi, H. (2013). Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. *Genomics Inform.* 11, 102–113. doi: 10.5808/GI.2013.11.3.102
103. Kim, W. (2014). The genus *Lactococcus*. *Lactic Acid Bacteria*, 429–443. doi: 10.1002/9781118655252.ch26
104. Köhler-Forsberg, O., & Benros, M. E. (2018). Efficacy of Anti-Inflammatory Treatment in Depression. *Inflammation and Immunity in Depression*, 525–538. doi:10.1016/b978-0-12-811073-7.00030-1

105. Koksal, Z., Gulcin, I., & Ozdemir, H. (2016). An Important Milk Enzyme: Lactoperoxidase. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. doi: 10.5772/64416
106. Kongo, J. M., & Malcata, F. X. (2016). Acidophilus Milk. *Encyclopedia of Food and Health*, 6–14. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00002-7
107. Kopsahelis, N., Nisiotou, A., Kourkoutas, Y., Panas, P., Nychas, G. J.-E., & Kanellaki, M. (2009). Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range. *Bioresource Technology*, 100(20), 4854–4862. doi: 10.1016/j.biortech.2009.05.011
108. Korabečná, M. (2007). The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.)*, 783-787.
109. Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., & Hugenholtz, P. (2008). A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 557–578. doi: 10.1128/mmbr.00009-08
110. Lad, S.S., Aparnathi, K.D., Mehta, B., and Velpula, S. 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(5): 1781-1792. doi: 10.20546/ijcmas.2017.605.194
111. Lara-Villoslada, F., Debras, E., Nieto, A., Concha, A., Galvez, J., Lopez-Huertas, E., Boza, J., Obled, C. and Xaus, J. (2006). Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulphate induced colitis. *Clinical Nutrition*, 25: 477-488. doi: 10.1016/j.clnu.2005.11.004
112. Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2011). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 455–468. doi: 10.1007/s13594-011-0051-4
113. Li, Z., Wright, A.-D. G., Yang, Y., Si, H., & Li, G. (2017). Unique Bacteria Community Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/srep40950
114. 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.024
115. Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 52(1), 1821. doi: 10.3402/fnr.v52i0.1821

116. Makete, G., Aiyegoro, O. A., & Thantsha, M. S. (2016). Isolation, Identification and Screening of Potential Probiotic Bacteria in Milk from South African Saanen Goats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(3), 246–254. doi: 10.1007/s12602-016-9247-5
117. Martinez-Ferez, A., Guadix, A., & Guadix, E. (2006). Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, 276(1-2), 23–30. doi: 10.1016/j.memsci.2005.09.027
118. Masiello, S. N., Martin, N. H., Trmčić, A., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2016). Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 130–140. doi: 10.3168/jds.2015-9728
119. McCullough, F. S. W. (2003). Nutritional evaluation of goat's milk. *British Food Journal*, 105(4/5), 239–251. doi: 10.1108/00070700310477031
120. McInnis, E. A., Kalanetra, K. M., Mills, D. A. & Maga, E. A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology* 46, 121–131. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.021
121. McNeill, R.M., DeFoor, W.M., Goller C.C., Ott, L.E. (2015). *Delftia* spp. Elicit a Pro-inflammatory Response in Monocytes. *Journal of Young Investigators*.
122. Mehta, S. K., & Gowder, S. J. T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. doi: 10.5772/61884
123. Merz, A., Stephan, R., & Johler, S. (2016). *Staphylococcus aureus* Isolates from Goat and Sheep Milk Seem to Be Closely Related and Differ from Isolates Detected from Bovine Milk. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00319
124. Meyrand, M., Dallas, D. C., Caillat, H., Bouvier, F., Martin, P., & Barile, B. (2013). Comparison of milk oligosaccharides between goats with and without the genetic ability to synthesize α 1-casein. *Small Ruminant Research*, 113, 411–420. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.03.014
125. Millogo, V., Svennersten Sjaunja, K., Ouédraogo, G. A., & Agenäs, S. (2010). Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control*, 21(7), 1070–1074. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.12.029
126. Moallem, U., Lehrer, H., Livshitz, L., Zachut, M., & Yakoby, S. (2009). The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 343–351. doi: 10.3168/jds.2007-0839

127. Mohamed AF, Fourreh AE, Okieh AA, Said CN, Mérito A, *et al.* (2017). Evaluation of Microbiological Quality of Raw Milk from Farmers and Dairy Producers in Six Districts of Djibouti. *J Food Microbiol Saf Hyg* 2: 124. doi: 10.4172/2476-2059.1000124
128. Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., Di Mauro, S., Onofri, A., Buzzini, P., & Turchetti, B. (2016). Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles*, 20(6), 915–928. doi: 10.1007/s00792-016-0883-1
129. Morgan, F., Massouras, T., Barbosa, M., Roseiro, L., Ravasco, F., Kandarakis, I., Bonnin, V., Fistakoris, M., Anifantakis, E., Jaubert, G., Raynal-Ljutovac, K. (2003). Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research*, 47(1), 39–49. doi: 10.1016/s0921-4488(02)00252-3
130. Munoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Perez, M. J., Sanchez-Somolinos, M., Rincon, C., Hortal, J., Pelaez, T. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 40(11), 1625–1634. doi: 10.1086/429916
131. Mutwa, Credo (1996). *Zulu Shaman*. Destiny Books. ISBN 0-89281-129-3.
132. Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., Hejazi, M.A. (2019). Probiotic Properties of Enterococcus Isolated From Artisanal Dairy Products. *Front. Microbiol.* 10:300. doi: 10.3389/fmicb.2019.00300
133. Nguyen, D. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., De Bruyne, K., Le, B. T., & Vandamme, P. (2013). A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Food Research International*, 50(1), 232–240. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.029
134. Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R., & Grandjean, P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43(7), 1209–1214. doi:10.1093/clinchem/43.7.1209
135. Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2006). Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology*, 157(4), 376–385. doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.010

136. Oliveira, D. L., Wilbey, R. A., Grandison, A. S., & Roseiro, L. B. (2015). Milk oligosaccharides: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 305–321. doi: 10.1111/1471-0307.12209
137. Oliveira, G. B. de, Favarin, L., Luchese, R. H., & McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 313–321. doi: 10.1590/s1517-838246220130963
138. Orczyk-Pawiłowicz, M., & Lis-Kuberka, J. (2020). The Impact of Dietary Fucosylated Oligosaccharides and Glycoproteins of Human Milk on Infant Well-Being. *Nutrients*, 12(4), 1105. doi: 10.3390/nu12041105
139. Özer, B. (2014). NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Lactoperoxidase and Lactoferrin. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 930–935. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00241-x
140. Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C., & Feligini, M. (2014). Updating on the fungal composition in Sardinian sheep's milk by culture-independent methods. *Journal of Dairy Research*, 81(02), 233–237. doi: 10.1017/s0022029914000090
141. Panigrahi, S., Velraj, P., & Subba Rao, T. (2019). Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 359–385. doi: 10.1016/b978-0-12-814849-5.00021-6
142. 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*. doi:10.1016/j.idairyj.2019.06.010
143. Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88–113. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.013
144. Pascal, M., Perez-Gordo, M., Caballero, T., Escribese, M. M., Lopez Longo, M. N., Luengo, O., Manso, L., Matheu, V., Seoane, E., Zamorano, M., Labrador, M., Mayorga, C. (2018). Microbiome and Allergic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01584
145. Pazzola, M. (2019). Coagulation Traits of Sheep and Goat Milk. *Animals*, 9(8), 540. doi: 10.3390/ani9080540
146. Pellegrini, O., Remeuf, F., Rivemale, M. (1994). Évolution des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres de coagulation du lait de brebis collecté dans la région de Roquefort. *Le Lait*, INRA Editions, 74 (6), pp.425-442. (hal-00929409)

147. Perin, L., & Nero, L. (2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*, 14(1), 36. doi: 10.1186/1471-2180-14-36
148. Pestana, J.M., Gennari, A., Wissmann Monteiro, B., Neutzling Lehn, D. and Volken de Souza, C.F. (2015). Effects of Pasteurization and Ultra-High Temperature Processes on Proximate Composition and Fatty Acid Profile in Bovine Milk. *American Journal of Food Technology*, 10: 265-272. doi: 10.3923/ajft.2015.265.272
149. Piatti, G., Feltrin, S., Fellini, E., Barbero, V., Ballestrero, A. (2021). Catheter-Related Sepsis by *Candida pararugosa* in an Adult Patient under Chemotherapy Regimen, *Case Reports in Infectious Diseases*, vol. 2021, Article ID 8858157, 3 pages. doi: 10.1155/2021/8858157
150. Picon, A., Garde, S., Ávila, M., & Nuñez, M. (2016). Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *International Dairy Journal*, 58, 14–22. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.09.010
151. Pisano, M. B., Deplano, M., Fadda, M. E., & Cosentino, S. (2019). Microbiota of Sardinian Goat's Milk and Preliminary Characterization of Prevalent LAB Species for Starter or Adjunct Cultures Development. *BioMed Research International*, 2019, 1–7. doi: 10.1155/2019/6131404
152. Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–156. doi: 10.1111/j.1472-765x.1989.tb00262.x
153. Pogacic, Tomislav & Kelava Ugarković, Nikolina & Zamberlin, Šimun & Špehar, Iva & Samarzija, Dubravka. (2010). Methods for Culture-Independent Identification of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products. *Food Technology and Biotechnology*. 48. 3-10.
154. Póti, P., Pajor, F., Bodnár, Á., Penksza, K., & Köles, P. (2015). Effect of micro-alga supplementation on goat and cow milk fatty acid composition. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(2), 259–263. doi: 10.4067/s0718-58392015000200017
155. 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. doi: 10.1111/1574-6976.12030
156. Quin, P.J. 1959. *Foods and Feeding Habits of the Pedi (Landmarks in Ethnography)*, Publisher: Wits University Press.

157. Ragkos, A., Koutsou, S., & Manousidis, T. (2016). In Search of Strategies to Face the Economic Crisis: Evidence from Greek Farms. *South European Society and Politics* 21(3), 319-337. doi: 10.1080/13608746.2016.1164916
158. Ramos, M., & Juarez, M. (2011). Milk | Sheep Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 494–502. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00314-9
159. Ramos, G. & Nascimento, J. (2019). Characterization of *Acinetobacter* spp. from raw goat Milk. *Ciência Rural*. 49. doi: 10.1590/0103-8478cr20190404
160. Rausch, P., Rühlemann, M., Hermes, B.M., Doms, S., Dagan, T., Dierking, K., Domin, H., Fraun, e S., von Frieling, J., Hentschel, U., Heinsen, F.A., Höppner, M., Jahn, M.T., Jaspers, C., Kissoyan, K.A.B., Langfeldt, D., Rehman, A., Reusch, T.B.H., Roeder, T., Schmitz, R.A., Schulenburg, H., Soluch, R., Sommer, F., Stukenbrock, E., Weiland-Bräuer, N., Rosenstiel, P., Franke, A., Bosch, T., Baines, J.F. (2019). Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome* 14;7(1):133. doi: 10.1186/s40168-019-0743-1
161. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1), 57–72. doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.07.009
162. Ribeiro Júnior, J. C., de Oliveira, A. M., Silva, F. de G., Tamanini, R., de Oliveira, A. L. M., & Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 75–83. doi: 10.3168/jds.2017-13069
163. Roets, M. (2020). Goats in the Ancient Near East and Their Relationship with the Mythology, Fairytale and Folklore of These Cultures. *Goats (Capra) - From Ancient to Modern*. doi: 10.5772/intechopen.82531
164. Rossi, R. (2017). The sheep and goat sector in the EU: Main features, challenges and prospects. European Parliamentary Research Service.
165. Ryser, E. T. (2011). Pathogens in Milk | *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 81–86. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00394-0
166. Saad, N.M., Amin, W.F., Mostafa, S.M. (2018). Detection of *Acinetobacter* Species in Milk and Some Dairy Products. *Assiut Vet. Med. J.* Vol. 64 No. 156, 34-40. doi: 10.21608/AVMJ.2018.168683
167. Saad M.F., Nagah, M.H. and Salwa, A.A. (2013). Microbiological Quality Evaluation of Raw Goat's Milk in Egypt. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. October 2013, 2(10), 1837-1848. ISSN: 2277–4998

168. Salminen, S., Kenifel, W., & Ouwehand, A. C. (2011). Bacteria, Beneficial | Probiotics, Applications in Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 412–419. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00048-0
169. Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 53(3), 631–645. doi: 10.1099/ijs.0.02361-0
170. Schogor, A. L. B., Palin, M.-F., dos Santos, G. T., Benchaar, C., Lacasse, P., & Petit, H. V. (2013). Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in the blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *British Journal of Nutrition*, 110(10), 1743–1750. doi:10.1017/s0007114513001220
171. Sekse, C., Holst-Jensen, A., Dobrindt, U., Johannessen, G. S., Li, W., Spilsberg, B., & Shi, J. (2017). High Throughput Sequencing for Detection of Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02029
172. Shah, N. P. (2011). BACTERIA, BENEFICIAL | *Bifidobacterium* spp.: Morphology and Physiology. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 381–387. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00043-1
173. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 1–6. doi: 10.1038/sj/jim/7000186
174. Slačanac, V., Božanić, R., Hardi, J., Rezessyné Szabó, J., Lučan, M., & Krstanović, V. (2010). Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 171–189. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00575.x
175. Sobeih, A.M.K., Al-Hawary, I.I., Khalifa, E.M., Ebied, N.A. (2020). Prevalence of Enterobacteriaceae in raw milk and some dairy products. *Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal*, 18 (2), 9-13, doi: 10.21608/kvmj.2020.39992.1009
176. Sørhaug, T. (2011). Yeasts and Molds | Spoilage Molds in Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 780–784. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00366-6

177. Sossidou, E., Ligda, C., Mastranestasis, I., Tsiokos, D., & Samartzi, F. (2013). Sheep and Goat Farming in Greece: Implications and Challenges for the Sustainable Development of Less Favoured Areas. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 46 (2), 446-449.
178. Sousa, Y. R. F., Medeiros, L. B., Pintado, M. M. E., & Queiroga, R. C. R. E. (2019). Goat milk oligosaccharides: composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology*. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.052
179. Spanamberg A., Ramos J. P., Leoncini O., Alves S. H. & Valente P. 2009. High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(2): 133-141. doi: 10.22456/1679-9216.16239
180. Stefanini, I., & Cavalieri, D. (2018). Metagenomic Approaches to Investigate the Contribution of the Vineyard Environment to the Quality of Wine Fermentation: Potentials and Difficulties. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00991
181. Steinshamn, H., Inglingstad, R. A., Ekeberg, D., Mølmann, J., & Jørgensen, M. (2014). Effect of forage type and season on Norwegian dairy goat milk production and quality. *Small Ruminant Research*, 122(1-3), 18–30. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.07.013
182. Stepaniak, L. (2011). Psychrotrophic Bacteria | Other Psychrotrophs. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 384–389. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00442-8
183. Sud, A., Chaudhary, M., Baveja, C.P., Pandey, P.N. (2020). Rare case of meningitis due to an emerging pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *SAGE Open Medical Case Reports Volume 8*: 1–4. doi: 10.1177/2050313X20936098
184. Tan, H., Deng, Q., & Cao, L. (2013). Ruminant feces harbor diverse uncultured symbiotic actinobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 1093–1100. doi: 10.1007/s11274-013-1529-4
185. Thakur, Nishchal & Rokana, Namita & Panwar, Harsh. (2016). Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease. *Journal of Innovative Biology* 2348-6473. 3. 259-270.
186. Thanh, L. P., & Suksombat, W. (2015). Milk Yield, Composition, and Fatty Acid Profile in Dairy Cows Fed a High-concentrate Diet Blended with Oil Mixtures Rich

- in Polyunsaturated Fatty Acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 796–806. doi: 10.5713/ajas.14.0810
187. Thierry, A., Falentin, H., Deutsch, S. M., & Jan, G. (2011). Bacteria, Beneficial | *Propionibacterium* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 403–411. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00047-9
188. Thomas, T., Gilbert, J., and Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3
189. Thushara, R. M., Gangadaran, S., Solati, Z., & Moghadasian, M. H. (2016). Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & Function*, 7(2), 632–642. doi: 10.1039/c5fo01190f
190. Tormo, H., Ali Haimoud Lekhal, D., & Roques, C. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 9–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002
191. Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375. doi: 10.1038/sj.onc.1206940
192. Traversari, J., van den Borne, B. H. P., Dolder, C., Thomann, A., Perreten, V., & Bodmer, M. (2019). Non-aureus Staphylococci Species in the Teat Canal and Milk in Four Commercial Swiss Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi: 10.3389/fvets.2019.00186
193. Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L. A., Kalantzopoulos, G., Schleifer, K.H., Kersters, K. (1998). Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), 519–527. doi: 10.1099/00207713-48-2-519
194. Tsiplakou, E., Kominakis, A., & Zervas, G. (2008). The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Ruminant Research*, 74(1-3), 179–187. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.06.008
195. 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. doi: 10.1017/s0022029910000270

196. Tsiplakou, E., Mitsiopoulou, C., Mavrommatis, A., Karaiskou, C., Chronopoulou, E. G., Mavridis, G., Sotirakoglou, K., Labrou, N.E., 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. doi: 10.1111/jpn.12741
197. Tu, Q., He, Z., & Zhou, J. (2014). Strain/species identification in metagenomes using genome-specific markers. *Nucleic Acids Research*, 42(8), e67–e67. doi: 10.1093/nar/gku138
198. Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992. doi: 10.1016/0140-6736(91)91846-m
199. Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., & Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 253–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033
200. Vaquil, Rekha Rathee. A review on health promoting aspects of goat milk. *Pharma Innovation* 2017;6(12):05-08.
201. Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32–44. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.05.011
202. Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
203. Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 37–44. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00570-0
204. Villalobo, E. (2011). Pathogens in Milk | *Shigella* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 99–103. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00396-4
205. Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T. (2006). *Dairy science and technology*, 2nd edition, CRC Press-Taylor & Francis Group, ISBN 0-8247-2763-0
206. Whyte, P., Haughton, P., O’Brien, S., Fanning, S., O’Mahony, E., & Murphy, M. (2011). Pathogens in Milk | *Campylobacter* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 40–46. doi: 10.1016/b978-0-12-374407-4.00390-3

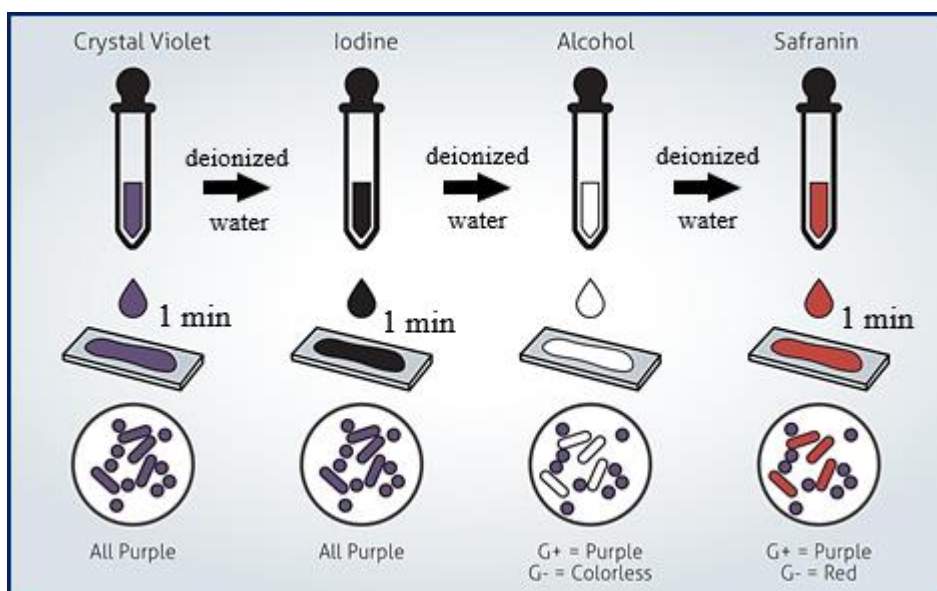
207. Wilmes, P., and Bond, P.L. (2006). Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol.* 14, 92–97. doi: 10.1016/j.tim.2005.12.006
208. Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1–7. doi: 10.1155/2012/465717
209. Yadav, A.K., Singh, J., and Yadav, S.K. (2016). Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research.* (35): 96-102. doi: 10.18805/AJDFR.V35I2.10719
210. Yang, W.-S., Chen, Y.-Y., Chen, P.-C., Hsu, H.-C., Su, T.-C., Lin, H.-J., ... Chien, K.-L. (2019). Association between Plasma N-6 Polyunsaturated Fatty Acids Levels and the Risk of Cardiovascular Disease in a Community-based Cohort Study. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-55686-7
211. Żebrowska, E., Maciejczyk, M., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2019). High Protein Diet Induces Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortex and Hypothalamus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1547. doi:10.3390/ijms20071547
212. Zhang, F., Wang, Z., Lei, F., Wang, B., Jiang, S., Peng, Q., ... Shao, Y. (2017). Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7812–7824. doi:10.3168/jds.2017-13244
213. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O’Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020). 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* Volume 70, Issue 4. doi: 10.1099/ijsem.0.004107
214. Zheng, W., Tsompana, M., Ruscitto, A., Sharma, A., Genco, R., Sun, Y., & Buck, M. J. (2015). An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. *Microbiome*, 3(1). doi: 10.1186/s40168-015-0110-9
215. Γαλάρης, Δ. (2015). Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό Στρες, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα, ISBN: 978-960-603-417-6
216. Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάνικα, 1993, Εκδόσεις Πάπυρος

217. Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία - Έρευνες Ζωικού Κεφαλαίου / 2019
[https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK13/-](https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK13/)
218. Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου, Γ. (2009). Γαλακτοκομία. Αιγάλεω Αττικής, Εκδόσεις: Έμβρυο, ISBN: 978-960-8002-49-4
219. Μάντης, Α., Παπαγεωργίου, Δ., Φλετούρης, Δ., Αγγελίδης, Α. (2015). Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις: Αφοί Κυριακίδη, ISBN: 978-960-602-017-9.
220. Ρογδάκης Εμμανουήλ, 2006, Γενική Ζωοτεχνία, Εκδόσεις Σταμούλη, ISBN: 960-351-674-0

7. Παράρτημα

7.1. Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αναπτύχθηκε το 1884 από τον Δανό ερευνητή Hans Christian Joachim Gram. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων να συγκρατούν το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) κατά την επεξεργασία με διαλύτες. Τα βακτήρια χωρίζονται σε αρνητικά και θετικά κατά Gram. Τα Gram⁺ βακτήρια έχουν τοίχωμα υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνια και χαμηλότερης σε λιπίδια. Το κυτταρικό τοίχωμα χρήεται με την επίδραση του κρυσταλλικού ιώδους. Στη συνέχεια προστίθεται ιώδιο (πχ. lugol iodine solution) το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες, με αποτέλεσμα τη στερέωση της χρώσης. Έπειτα, στο παρασκεύασμα προστίθεται ένας διαλύτης, η αιθανόλη (ethanol), ο οποίος απομακρύνει τη στιβάδα των λιπιδίων από τα Gram⁻ βακτήρια διευκολύνοντας τη διάχυση της αρχικής χρώσης στο περιβάλλον. Αντίθετα, ο διαλύτης αφυδατώνει το κυτταρικό τοίχωμα των Gram⁺ βακτηρίων, παρεμποδίζοντας τη διάχυση της χρωστικής. Τέλος, στο παρασκεύασμα προστίθεται σαφρανίνη (safranin) ώστε να χρωματιστούν τα Gram⁻ βακτήρια και να είναι δυνατή η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο (Εικόνα 7.1.1.).



Εικόνα 7.1.1.: Σχηματική απεικόνιση της χρώσης κατά Gram (τα θετικά κατά Gram αποκτούν ιώδες χρώμα, ενώ τα αρνητικά κατά Gram ερυθρό)

7.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος

ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο μόριο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Επομένως, μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο τα μόρια του DNA θα κινηθούν προς το θετικό πόλο με ταχύτητα εξαρτώμενη από το μέγεθος του μορίου, με τα μικρότερα να κινούνται ταχύτερα.

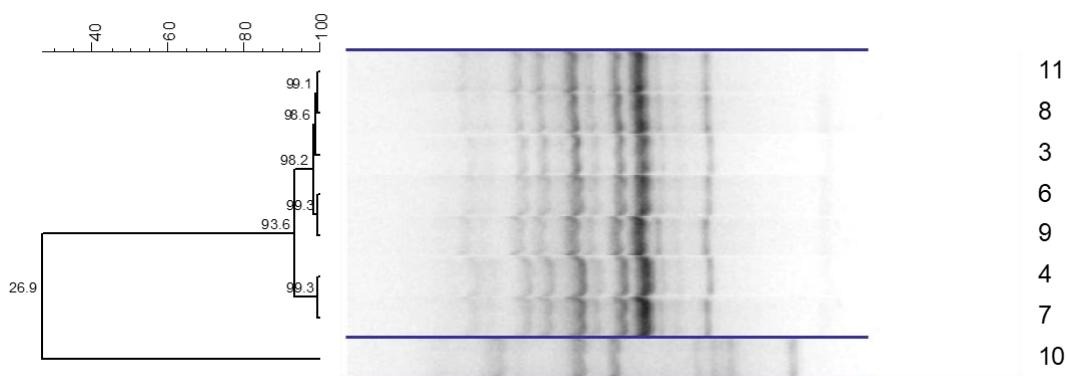
7.3. Μέθοδος rep-PCR

Η μέθοδος rep-PCR (Repetitive Element Polymerase Chain Reaction) βασίζεται στην ενίσχυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που βρίσκονται διασκορπισμένες στους δύο κλώνους του πυρηνικού DNA του ευκαρυωτικού γονιδιώματος, καθώς και του DNA του προκαρυωτικού γονιδιώματος, με τη χρήση εκκινητή που φέρει παλίνδρομη αλληλουχία.

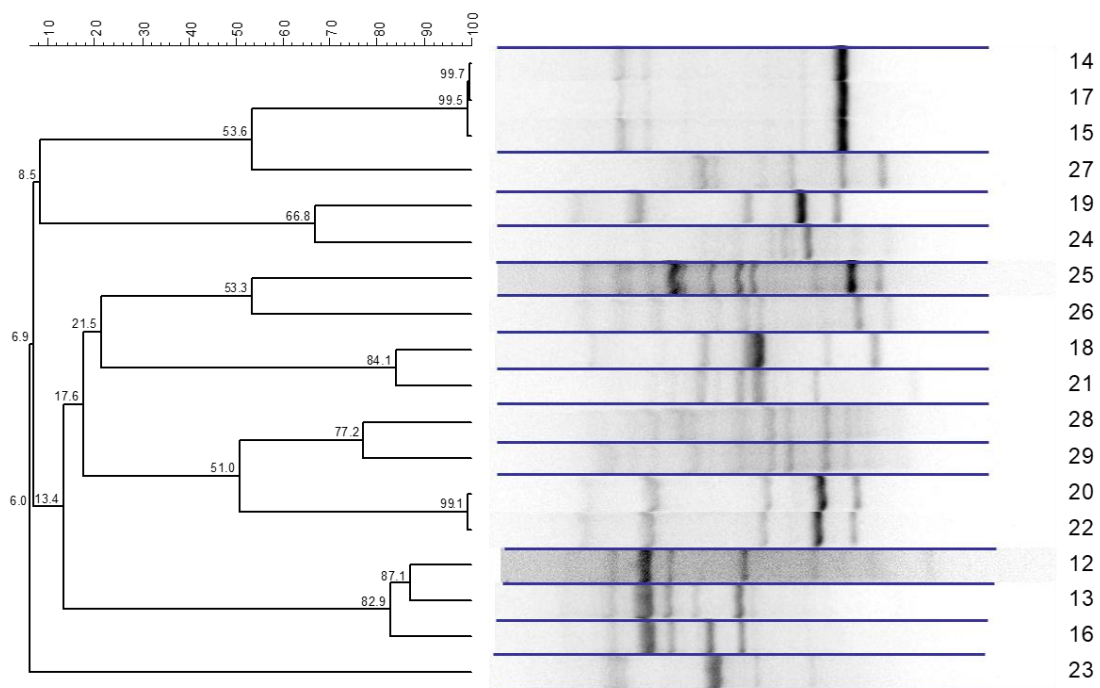
Αρχικά, η ανακάλυψη rep αλληλουχιών έγινε στα γονιδιώματα *E. coli* και *Salmonella* (Versalovic *et al.*, 1991). Οι εκκινητές rep έχουν μήκος 33 έως 40 bp και παρέχουν 500 έως 1.000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Οι περιοχές μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διαφέρουν σε μέγεθος στα διαφορετικά στελέχη, με αποτέλεσμα να παράγονται τμήματα διαφορετικών μεγεθών για κάθε στέλεχος, και συνεπώς να προκύπτουν διαφορετικά ηλεκτροφορητικά προφίλ, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση σε υποείδη και στελέχη (Hiatt & Seal, 2009).

7.4. Δενδρογράμματα rep-PCR των στελεχών των βακτηρίων για κάθε δείγμα

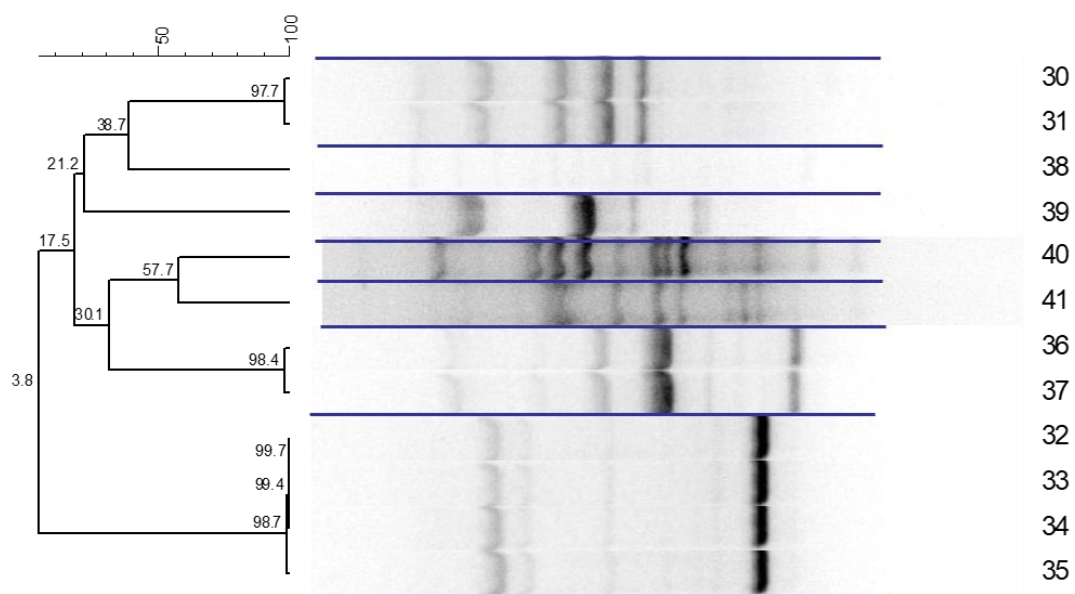
1. Δενδρογράμμα δείγματος 1



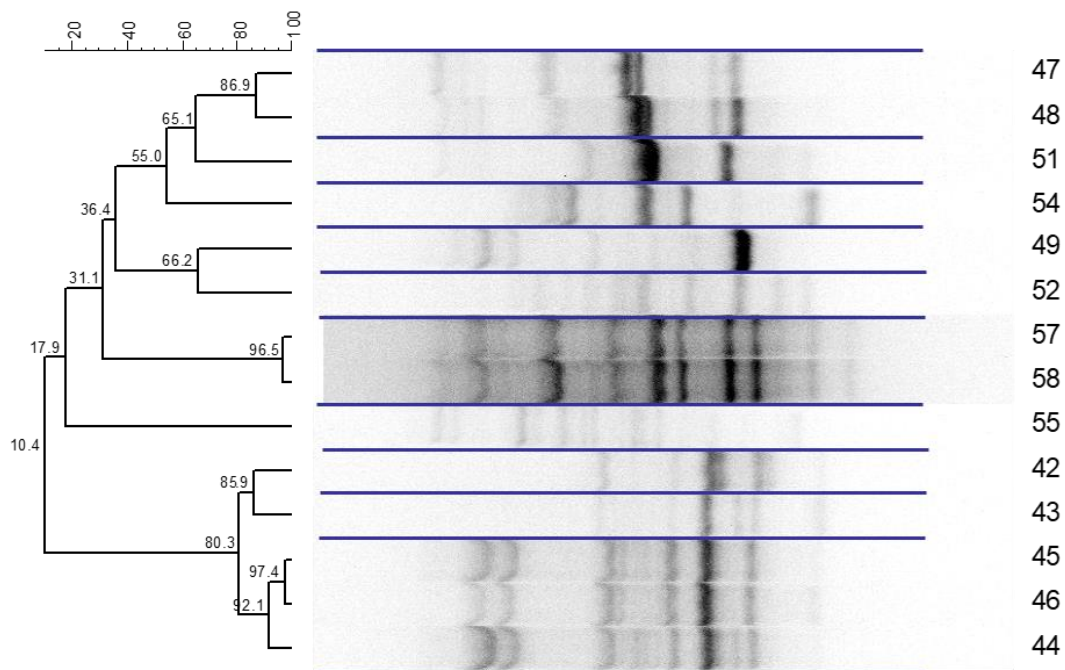
2. Δενδρόγραμμα δείγματος 2



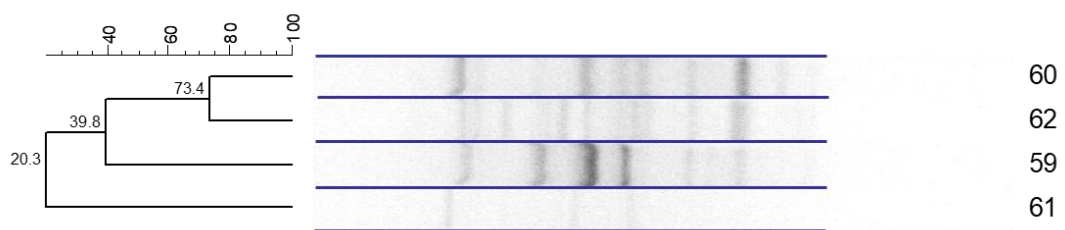
3. Δενδρόγραμμα δείγματος 3



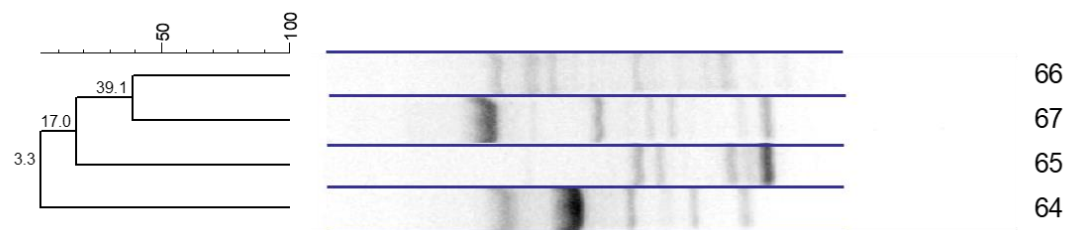
4. Δενδρόγραμμα δείγματος 4



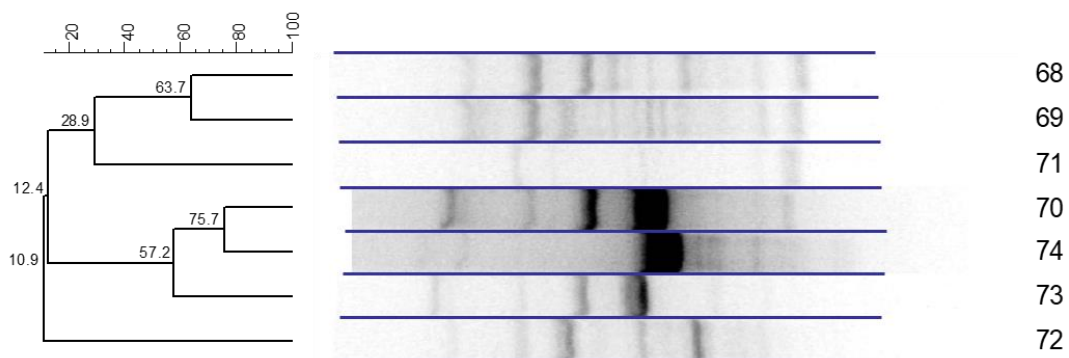
5. Δενδρόγραμμα δείγματος 5



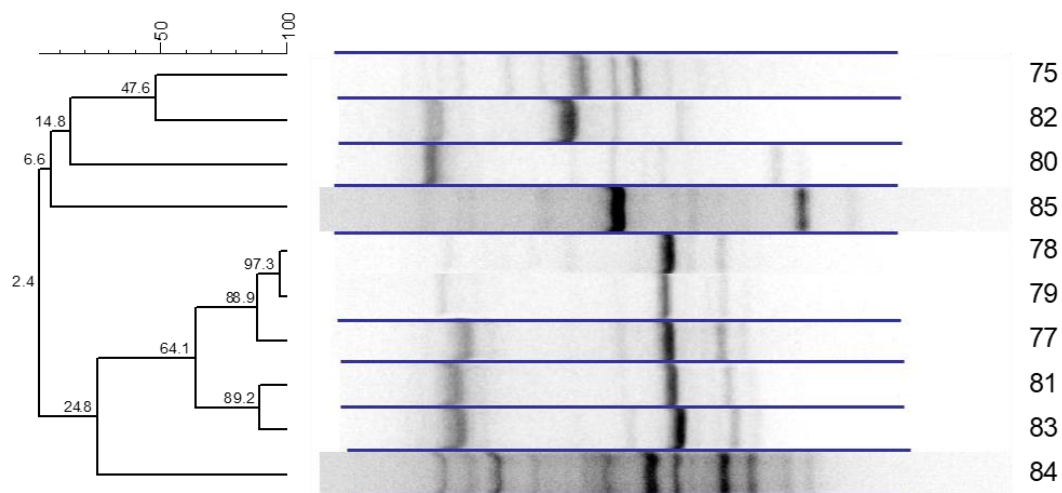
6. Δενδρόγραμμα δείγματος 6



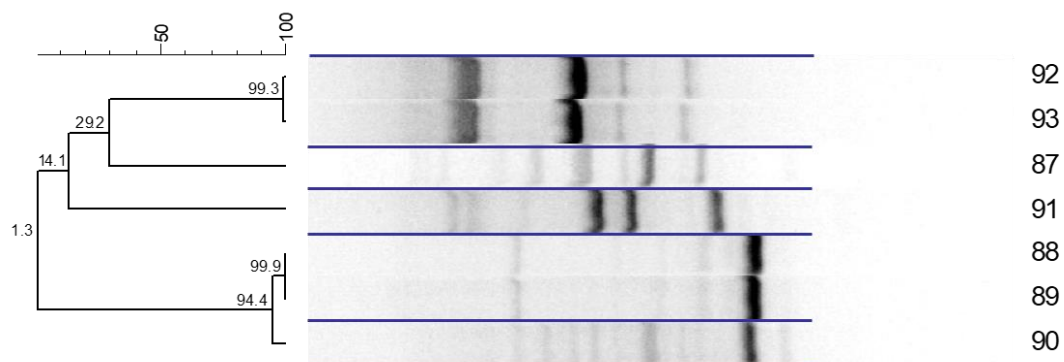
7. Δενδρόγραμμα δείγματος 7



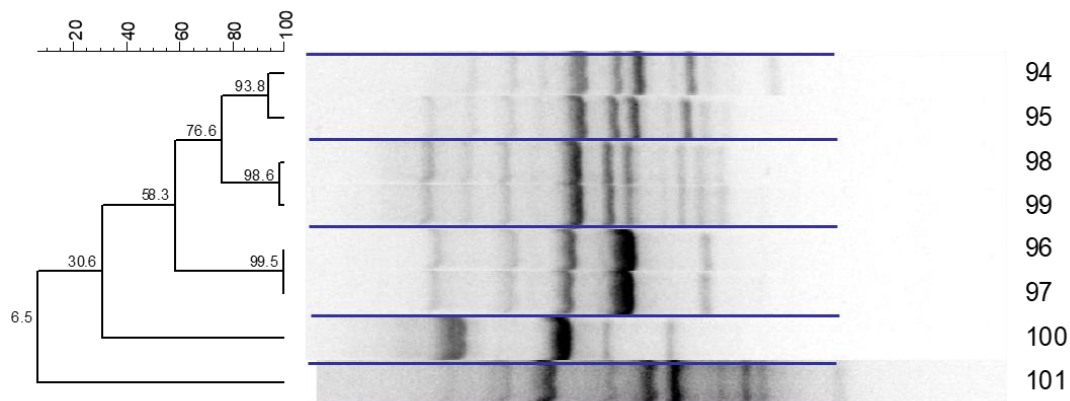
8. Δενδρόγραμμα δείγματος 8



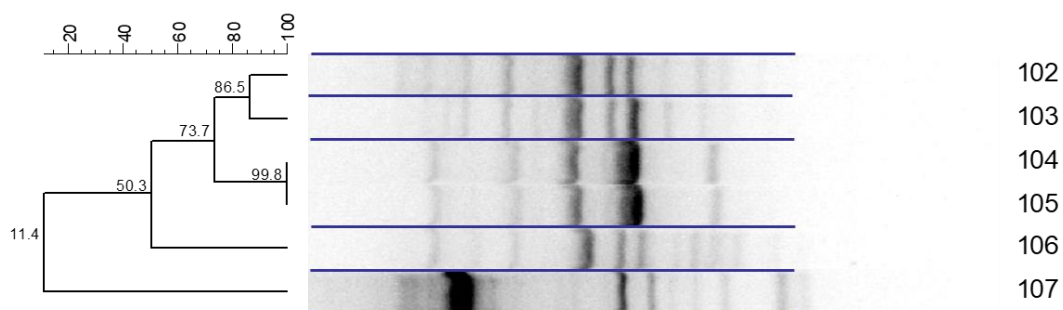
9. Δενδρόγραμμα δείγματος 9



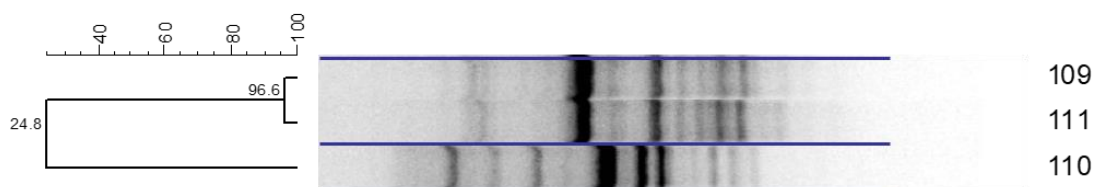
10. Δενδρόγραμμα δείγματος 10



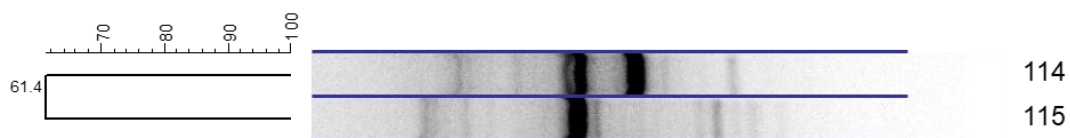
11. Δενδρόγραμμα δείγματος 11



12. Δενδρόγραμμα δείγματος 12



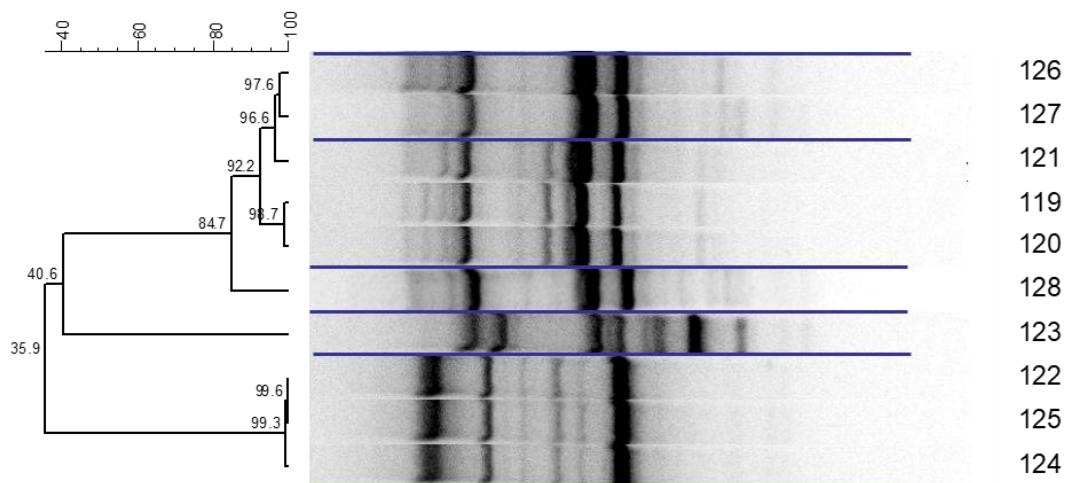
13. Δενδρόγραμμα δείγματος 13



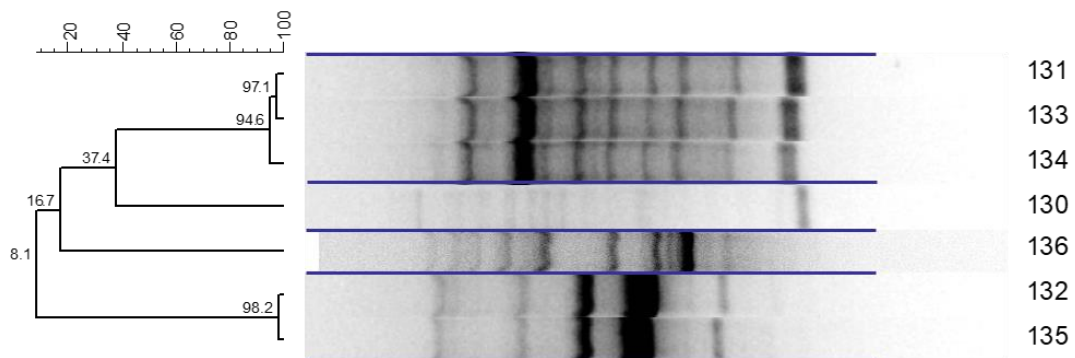
14. Δενδρόγραμμα δείγματος 14



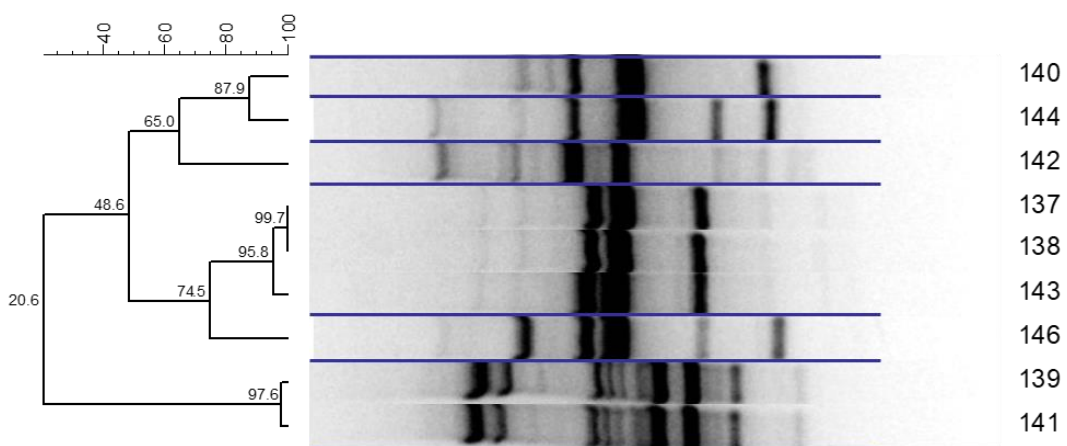
15. Δενδρόγραμμα δείγματος 15



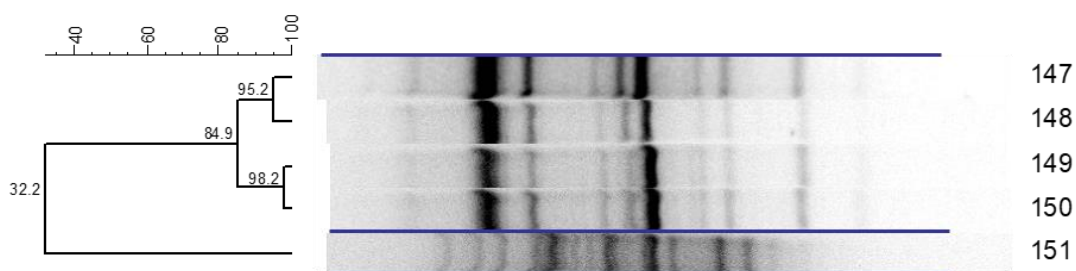
16. Δενδρόγραμμα δείγματος 16



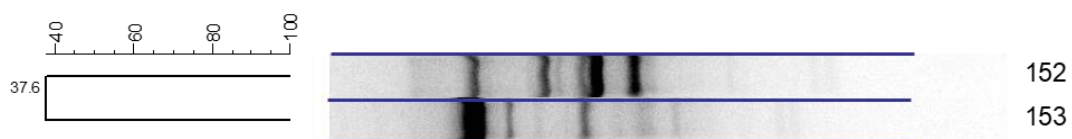
17. Δενδρόγραμμα δείγματος 17



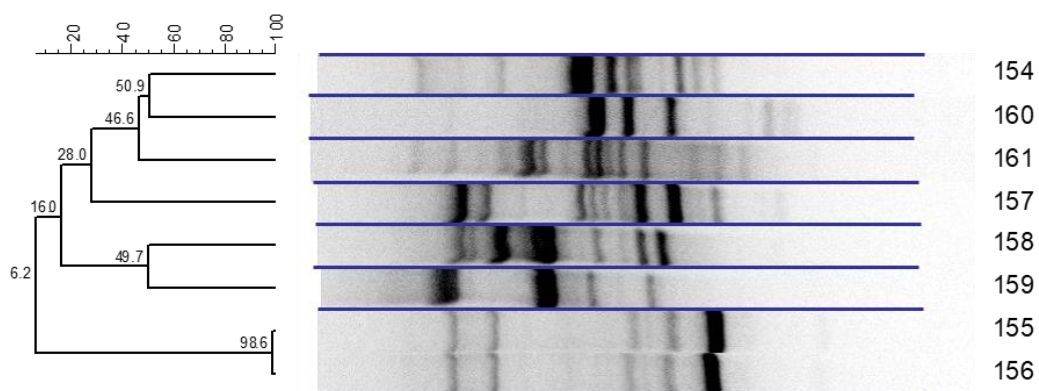
18. Δενδρόγραμμα δείγματος 18



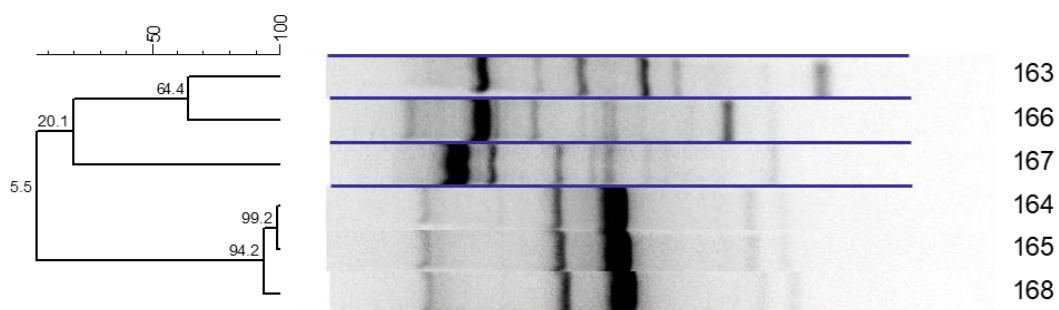
19. Δενδρόγραμμα δείγματος 19



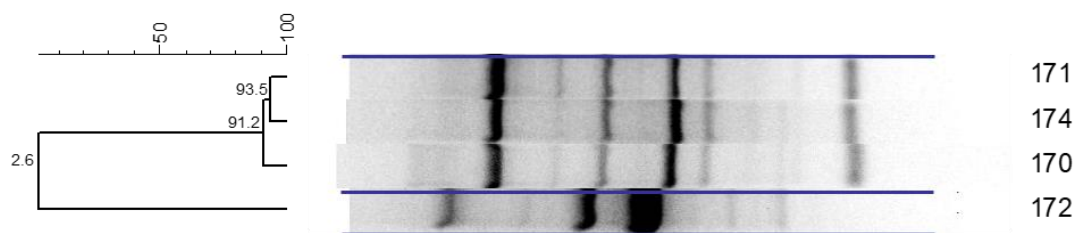
20. Δενδρόγραμμα δείγματος 20



21. Δενδρόγραμμα δείγματος 21



22. Δενδρόγραμμα δείγματος 22

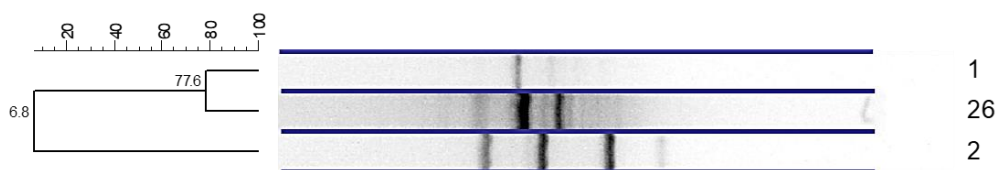


7.5. Δενδρογράμματα rep-PCR των στελεχών των ζυμών για κάθε δείγμα

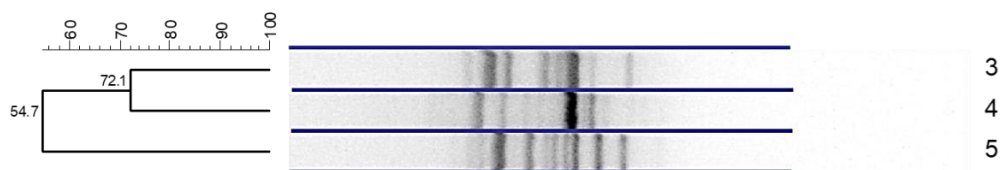
1. Δενδρόγραμμα δείγματος 1



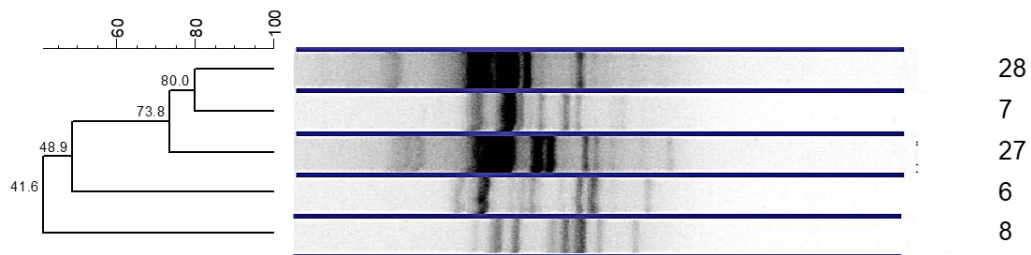
2. Δενδρόγραμμα δείγματος 2



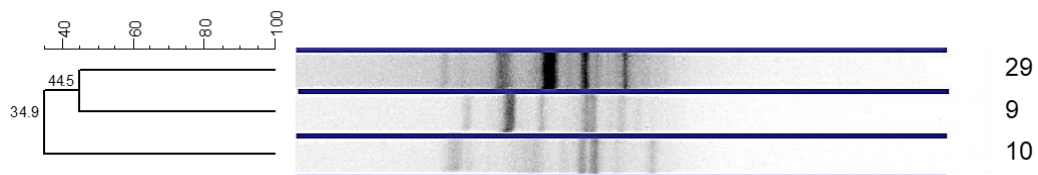
3. Δενδρόγραμμα δείγματος 3



4. Δενδρόγραμμα δείγματος 4



5. Δενδρόγραμμα δείγματος 6



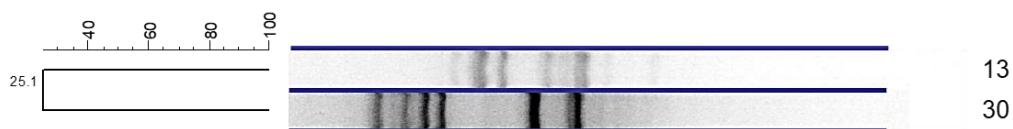
6. Δενδρόγραμμα δείγματος 7



7. Δενδρόγραμμα δείγματος 8



8. Δενδρόγραμμα δείγματος 9



9. Δενδρόγραμμα δείγματος 10



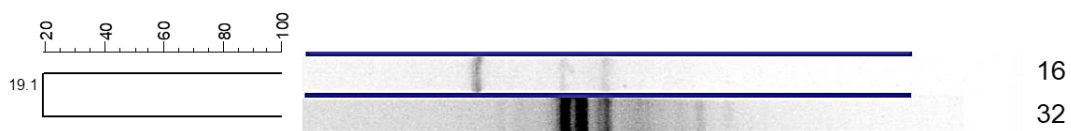
10. Δενδρόγραμμα δείγματος 11



11. Δενδρόγραμμα δείγματος 12



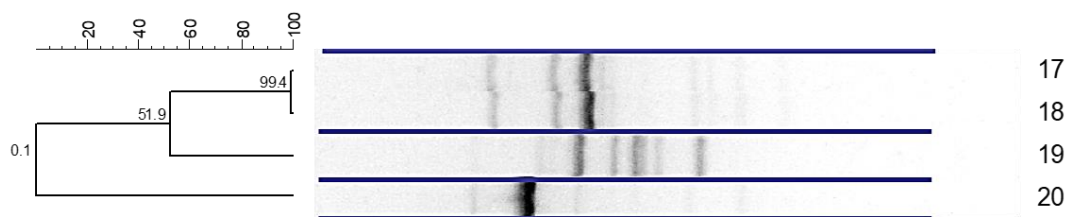
12. Δενδρόγραμμα δείγματος 13



13. Δενδρόγραμμα δείγματος 14



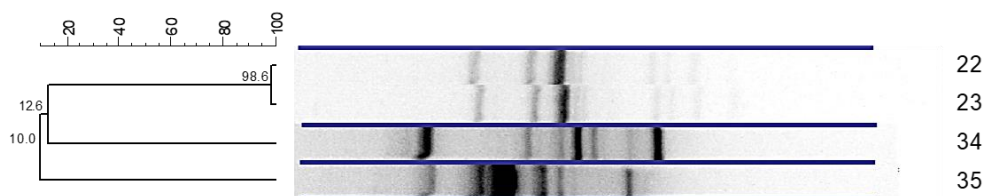
14. Δενδρόγραμμα δείγματος 16



15. Δενδρόγραμμα δείγματος 17



16. Δενδρόγραμμα δείγματος 21



17. Δενδρόγραμμα δείγματος 22



7.6. Ποσοστά κάλυψης και ομοιότητας των ταυτοποιημένων βακτηρίων

Πίνακας 7.6.1.: Τα ποσοστά κάλυψης (*query coverage*) και ομοιότητας (*percentage identity*) των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν για κάθε δείγμα

Δείγμα	Αριθμός αποικίας	Ομάδα	Είδος μικροοργανισμού	Query coverage	Percent identity
1	3	65	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	99%	99,74%
	4				
	6				
	7				
	8				
	9				

	10	28	<i>Corynebacterium casei</i>	100%	98,79%
	11	65	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	99%	99,74%
	12	15	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,84%
	13	16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	99,87%
	14	94	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,48%
	15				
	16	17	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	100%
	17	94	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,48%
	18	47	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,86%
	19	4	<i>Lactococcus garvieae</i>	100%	100%
2	20	27	<i>Lactococcus garvieae</i>	100%	100%
	21	48	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	100%	100%
	22	27	<i>Lactococcus garvieae</i>	100%	100%
	23	69	<i>Streptococcus parauberis</i>	100%	99,85%
	24	5	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,46%
	25	99	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,19%
	26	97	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,46%
	27	96	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,70%
	28	20	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,57%
	29	22	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,46%
	30	75	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,73%
	31				
	32				
	33	94	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,20%
	34				
	35				
3	36	62	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,83%
	37				
	38	43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	100%
	39	37	<i>Streptococcus parauberis</i>	100%	98,33%
	40	26	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	100%
	41	24	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,22%

4	42	8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,61%
	43	6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,47%
	44	7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,74%
	45				
	46				
	47	49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	100%
	48				
	49	92	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	100%
	51	61	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100%
	52	90	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	100%	99,72%
	54	44	<i>Buttiauxella</i> sp.	99%	100%
	55	87	<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	99,50%
	57	19	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	99,59%
	58				
5	59	70	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,72%
	60	91	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99,47%
	61	83	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	99,87%
	62	93	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	100%
	64	34	<i>Lactococcus garvieae</i>	100%	100%
6	65	98	<i>Lactococcus lactis</i>	98%	99,31%
	66	14	<i>Brevibacterium</i> sp.	100%	99,19%
	67	11	<i>Staphylococcus equorum</i>	89%	100%
	68	85	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	100%	99,85%
7	69	86	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	100%	99,86%
	70	59	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100%
	71	88	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	100%	99,32%
	72	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	97,41%
	73	46	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100%
	74	63	<i>Delftia</i> sp.	100%	99,33%
	75	52	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,73%
8	77	31	<i>Leuconostoc lactis</i>	100%	99,73%

	78				
	79	30	<i>Leuconostoc lactis</i>	100%	99,21%
	80	82	<i>Streptococcus</i> sp.	100%	99,57%
	81	32	<i>Leuconostoc lactis</i>	100%	99,49%
	82	35	<i>Streptococcus parauberis</i>	100%	99,87%
	83	33	<i>Leuconostoc lactis</i>	100%	99,48%
	84	21	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	99,72%
	85	66	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	98,63%
	87	64	<i>Enterococcus durans</i>	100%	99,85%
	88				
	89	95	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,10%
9	90	94	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,73%
	91	79	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,53%
	92				
	93	37	<i>Streptococcus parauberis</i>	100%	98,33%
	94	54	<i>Enterococcus durans</i>	100%	99,87%
	95	55	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	99,18%
	96				
10	97	46	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100%
	98				
	99	56	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,42%
	100	39	<i>Streptococcus parauberis</i>	99%	98%
	101	25	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	99,87%
	102	57	<i>Enterococcus durans</i>	100%	99,86%
	103	52	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,73%
11	104				
	105	46	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,60%
	106	74	<i>Enterococcus durans</i>	100%	100%
	107	42	<i>Streptococcus</i> sp.	99%	99,46%
	109	36	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	100%
12	110	74	<i>Enterococcus durans</i>	100%	100%
	111	36	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	100%
13	114	53	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99%	98,93%

	115	38	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	100%	99,58%
14	118	29	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100%	100%
	119				
	120	72	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,27%
	121				
	122	81	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	99,09%
15	123	9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,84%
	124	81	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	99,09%
	125				
	126	71	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,20%
	127				
	128	73	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	100%
	130	89	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100%	100%
	131	84	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	100%	100%
16	132	60	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,19%
	133	84	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	100%	100%
	134				
	135	60	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,19%
	136	3	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	99,59%
	137	77	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,87%
	138				
	139	9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,84%
	140	50	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,85%
17	141	9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,47%
	142	58	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,47%
	143	77	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,87%
	144	51	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,85%
	146	80	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	99,86%
	147				
18	148	13	<i>Staphylococcus simulans</i>	100%	100%
	149				
	150				
	151	23	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	99,32%
19	152	76	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	99,85%

	153	40	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99,72%
	154	78	<i>Enterococcus durans</i>	100%	100%
	155	92	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	99,87%
	156				
20	157	9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100%	99,84%
	158	1	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	100%
	159	39	<i>Streptococcus parauberis</i>	99%	98%
	160	68	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99%	100%
	161	67	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	100%
	163	12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	100%
	164	45	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,47%
165					
21	166	10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	100%
	167	41	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99,84%
	168	45	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,47%
22	170	18	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	100%
	171				
	172	59	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100%
	174	18	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	100%

7.7. Ποσοστά κάλυψης και ομοιότητας των ταυτοποιημένων ζυμών

Πίνακας 7.7.1.: Τα ποσοστά κάλυψης (*query coverage*) και ομοιότητας (*percentage identity*) των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν για κάθε δείγμα

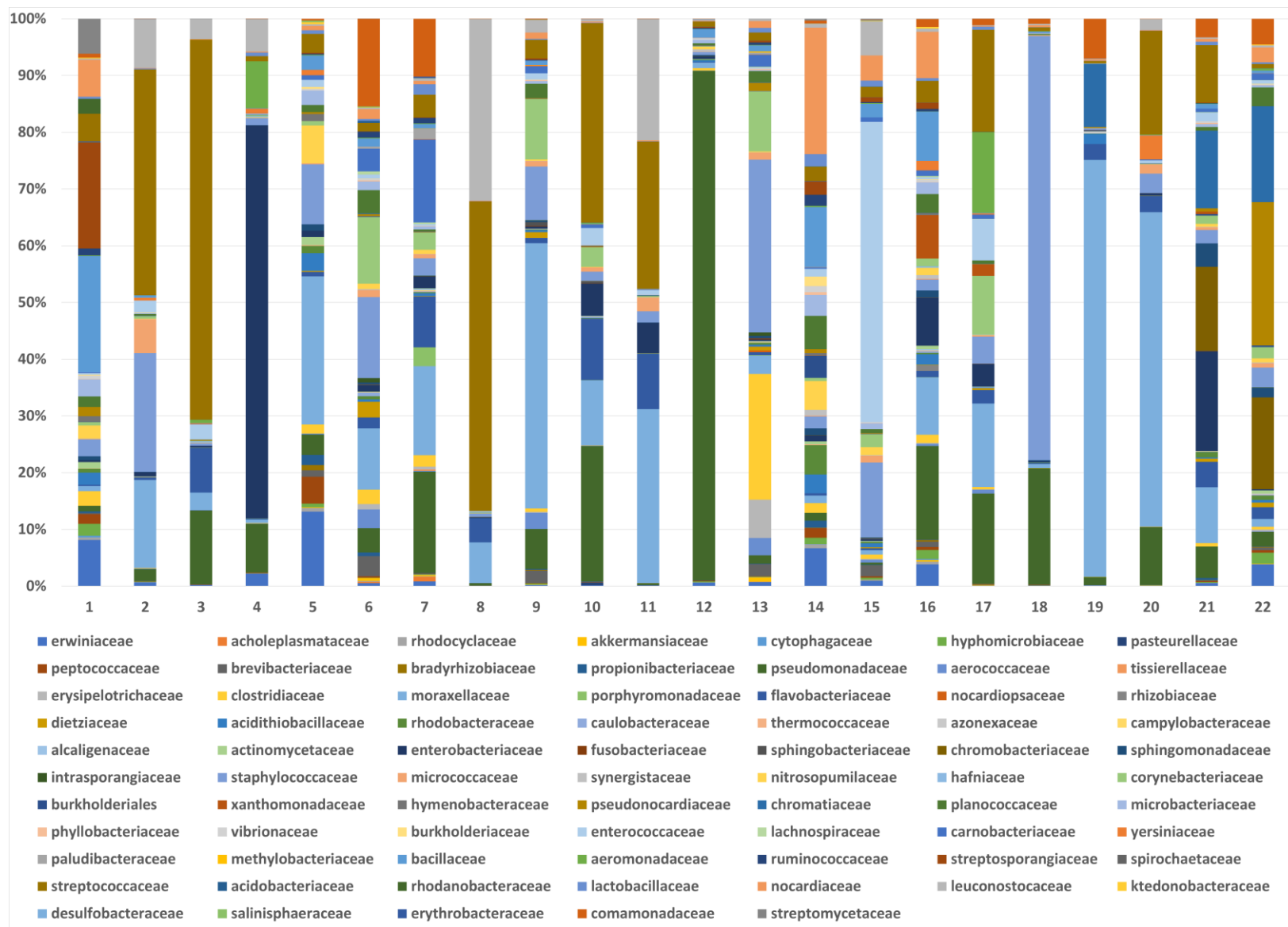
Δείγμα	Αριθμός αποικίας	Ομάδα	Είδος μικροοργανισμού	Query coverage	Percent identity
1	25	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	96,97%
2	1	7	<i>Candida zeylanoides</i>	71%	83,70%
	2	13	<i>Naganishia adeliensis</i>	100%	94,19%

	26	1	<i>Cryptococcus albidus</i>	74%	68,84%
	3	17	<i>Candida zeylanoides</i>	99%	97,39%
3	4	15	<i>Debaryomyces hansenii</i>	85%	100%
	5	28	<i>Pichia fermentans</i>	100%	98,01%
	6	20	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	99,82%
	7	22	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	90,97%
4	8	17	<i>Candida zeylanoides</i>	99%	97,39%
	27	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98%	72,73%
	28	21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	94,44%
5			N/D*		
	9	29	<i>Cryptococcus albidus</i>	100%	100%
6	10	18	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	83%	99,81%
	29	2	<i>Cryptococcus albidus</i>	75%	73,13%
7	11	25	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100%	100%
8	12	4	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	100%	98,76%
	13	19	<i>Candida zeylanoides</i>	100%	100%
9	30	8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	80,24%
10	14	26	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	94%	98,95%
11	15	5	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	100%	98,85%
12	31	3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	93,43%
	16	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	95,71%
13	32	10	<i>Solicoccozyma aeria</i>	70%	72,70%
14	33	11	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	98%	88,79%
15			N/D*		
16	17 18	12	<i>Candida parapsilosis</i>	100%	100%

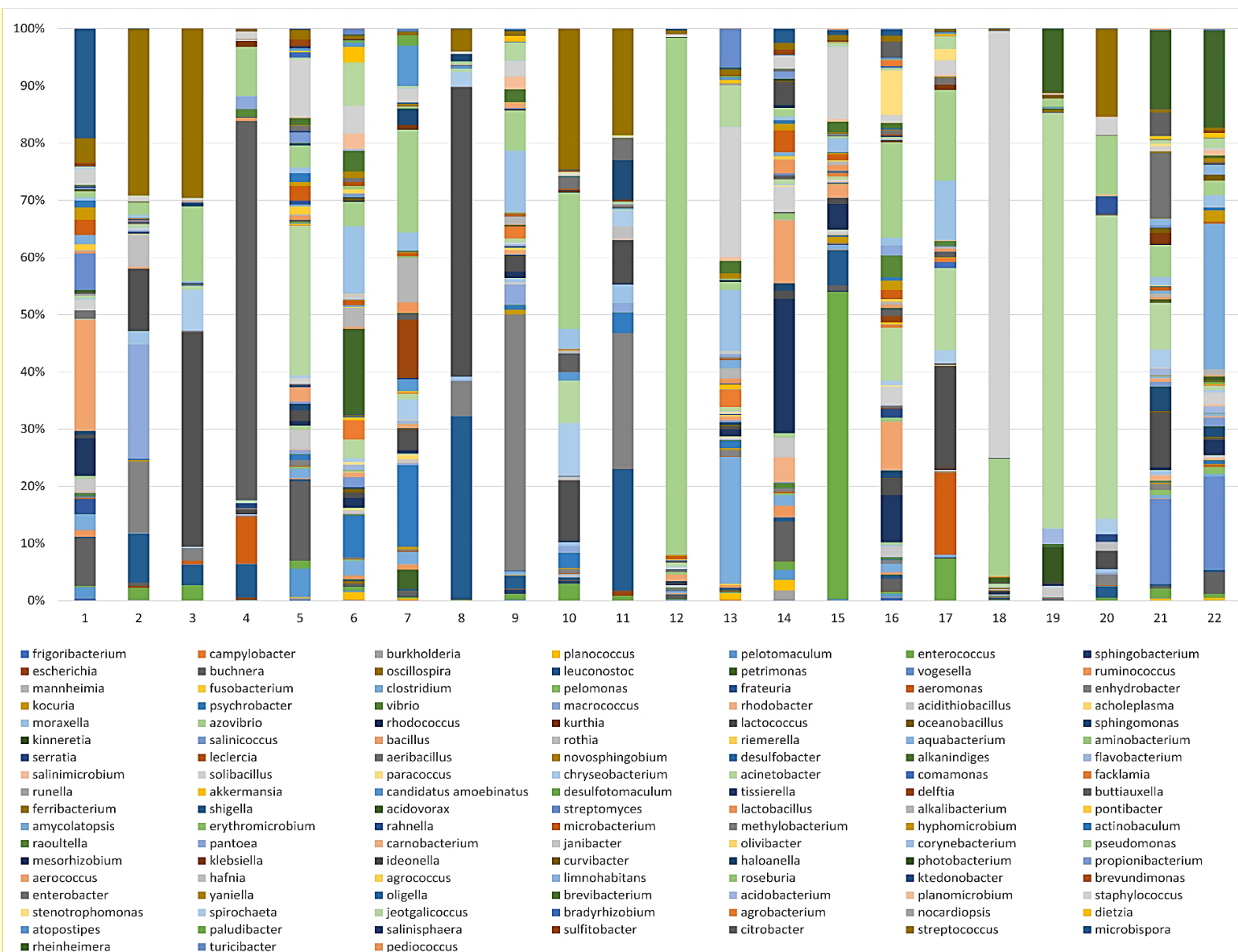
	19	9	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99%	100%
	20	27	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	100%	96,52%
17	21	14	<i>Candida parapsilosis</i>	87%	98,92%
18			N/D*		
19			N/D*		
20			N/D*		
	22	14	<i>Candida parapsilosis</i>	87%	98,92%
	23				
21	34	31	<i>Candida zeylanoides</i>	78%	75,88%
	35	23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	96,97%
22	24	16	<i>Candida parapsilosis</i>	100%	100%
22	36	31	<i>Candida zeylanoides</i>	78%	75,88%

*N/D: not detected (στο συγκεκριμένο δείγμα δεν είχε ανιχνευθεί και συνεπώς ταυτοποιηθεί κανένας μικροοργανισμός)

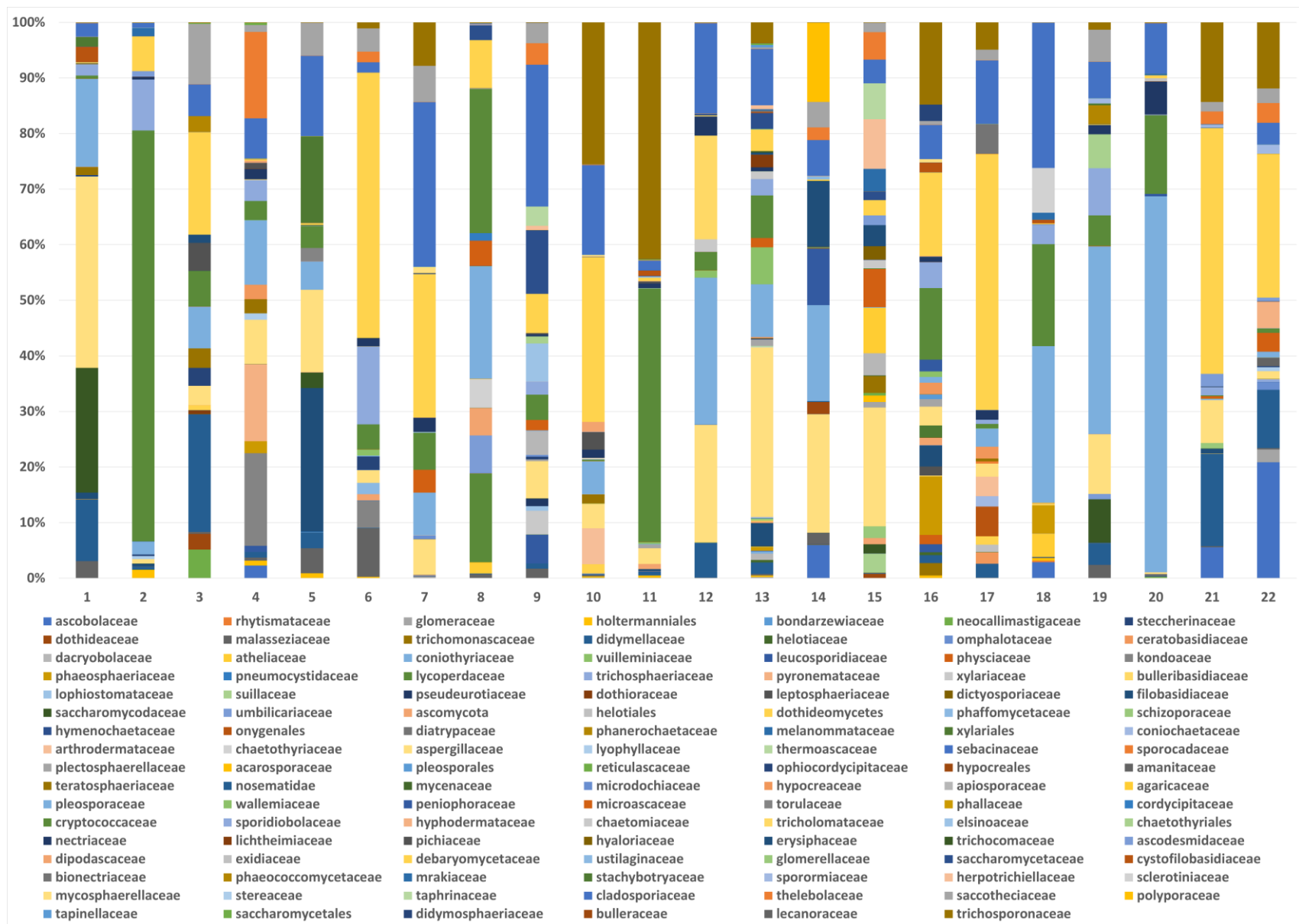
7.8. Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης



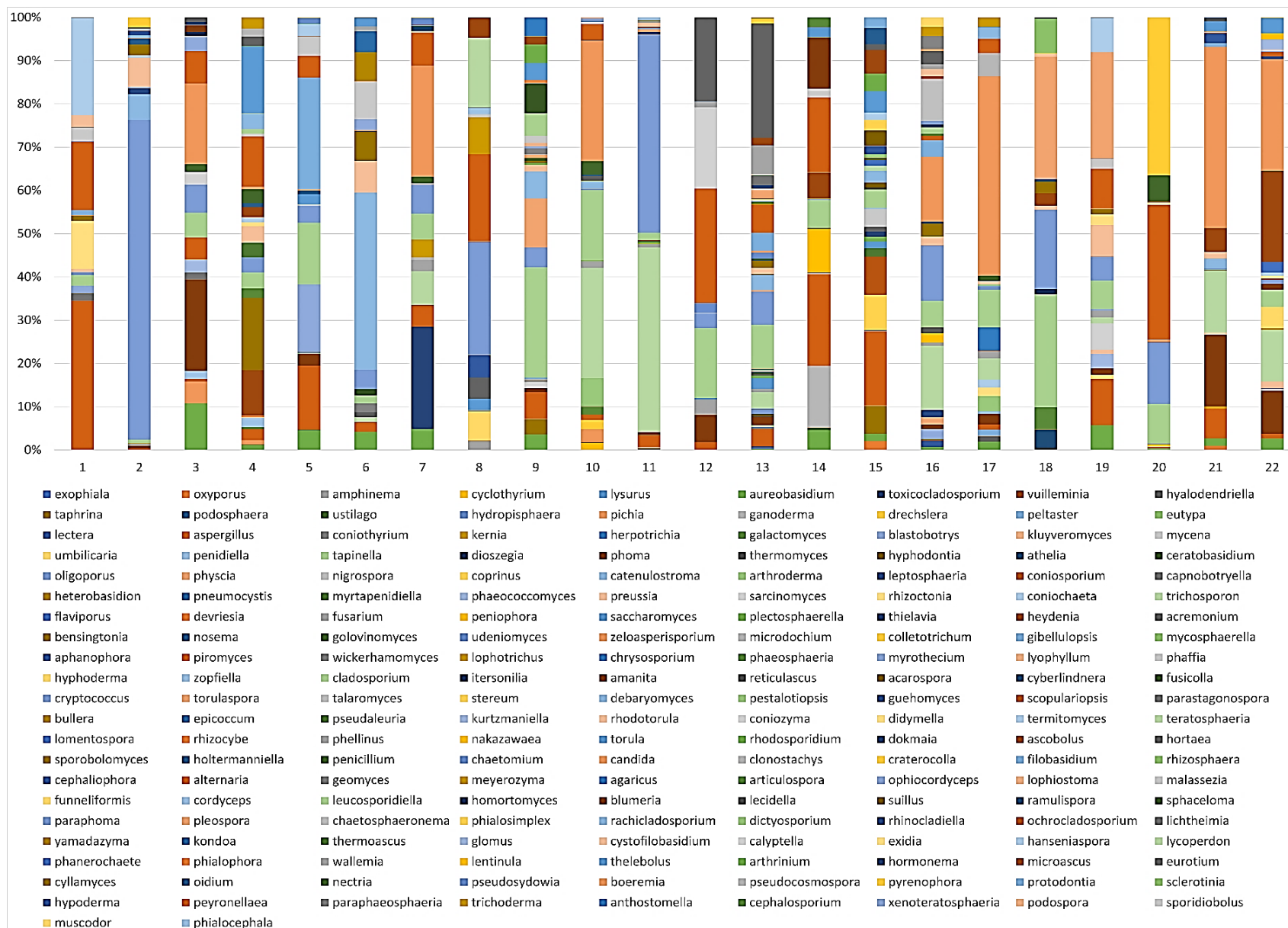
Σχήμα 7.8.1.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο οικογένειας.



Σχήμα 7.8.2.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο γένους.



Σχήμα 7.8.3.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των ζυμών/μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγιου γάλακτος σε επίπεδο οικογένειας.



Σχήμα 7.8.4.: Ποσοστό (%) σχετικής αφθονίας των ζυμών/μυκήτων που ανιχνεύθηκαν με τη μεταγονιδιωμική ανάλυση στα 22 δείγματα του αίγειου γάλακτος σε επίπεδο γένους.