



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή: Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα: Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Μελέτη επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών σε τυριά τυρογάλακτος”



Συγγραφέας: Στέλλα Μπέκα

Αριθμός Μητρώου: 17201

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ευσταθία Τσάκαλη

ΑΘΗΝΑ-2022



University of West Attica

School of Food Science

Department of Food Science and Technology

Diploma Thesis: Survival study of pathogenic microorganisms in
whey cheeses

Student Name: Stella Beka

Registration Number: 17201

Supervisor: Efstathia Tsakali

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή: Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα: Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/Α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΕΥΣΤΑΘΙΑ ΤΣΑΚΑΛΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ	
2	ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΟΥΛΟΥΡΗΣ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ	
3	ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

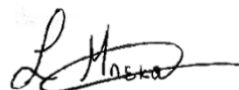
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Στέλλα Μπέκα του Άγγελου, με αριθμό μητρώου 17201 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Μπέκα Στέλλα



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1.Γενικά στοιχεία για το τυρί.....	9
1.2.Ορισμοί τυριού.....	9
1.3.Ταξινόμηση τυριών.....	10
2.ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	13
2.1.Ορός γάλακτος-Τυρόγαλα.....	13
2.2.Τι είναι τα τυριά τυρογάλακτος.....	15
2.3.Είδη τυριών τυρογάλακτος.....	16
2.3.1.Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος.....	17
2.3.2.Ξένα τυριά τυρογάλακτος.....	20
2.4.Παραγωγή τυριών τυρογάλακτος.....	22
2.4.1.Τεχνολογία παρασκευής τυριών τυρογάλακτος.....	22
3.ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΥΡΙΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	29
3.1.Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τυριά τυρογάλακτος.....	30
3.1.1. Enterobacteriaceae	30
3.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	31
3.1.1.2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	36
3.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.1.3. <i>Bacillus cereus</i>	41

3.1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	50
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
4.1. Στόχος.....	54
4.2. Δείγματα-Δειγματοληψία.....	54
4.3. Ομογενοποίηση-Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων.....	55
4.4. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος-Διανομή σε τρυβλία.....	56
4.5. Εμβολιασμός.....	59
4.6. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών.....	60
4.7. Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών έπειτα από 2 μήνες.....	62
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ορός του γάλακτος ή τυρόγαλα είναι το υδάτινο μέρος, το οποίο απομένει έπειτα από την παρασκευή του τυριού και ενώ χαρακτηρίζεται ως υποπροϊόν της τυροκομίας μπορεί έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία να επαναχρησιμοποιηθεί με σκοπό να παραχθούν τα τυριά τυρογάλακτος. Η παρασκευή των τυριών τυρογάλακτος πραγματοποιείται σε όλο τον κόσμο και σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και η Μυζήθρα, το Ανθότυρο, η Ξινομυζήθρα Κρήτης και το Μανούρι.

Τα τυριά τυρογάλακτος είναι τυριά με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και χαμηλή οξύτητα. Η τεχνολογία παρασκευής τους διαφέρει ανάλογα με το είδος του τυριού, που επιθυμείται να παραχθεί και το κοινό τους στοιχείο είναι ότι δέχονται έντονη θερμική επεξεργασία, καθώς το τυρόγαλα θερμαίνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 85°C. Ωστόσο, έχουν και πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά τόσο ως προς τη χημική τους σύσταση όσο και ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Τα τυριά τυρογάλακτος λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε υγρασία αλλά και λόγω του υψηλού τους pH αποτελούν ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν στα τυριά τυρογάλακτος, συνήθως λόγω κακών πρακτικών υγιεινής είναι η *Escherichia coli*, η *Yersinia enterocolitica*, ο *Staphylococcus aureus*, ο *Bacillus cereus* και η *Listeria monocytogenes*. Όμως, η ύπαρξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είτε στη φυσική χλωρίδα των τυριών είτε ως πρόσθετη καλλιέργεια, επιφέρει πολλά πλεονεκτήματα στα τυριά και συγκεκριμένα στα τυριά τυρογάλακτος, καθώς δρουν ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η ύπαρξη και έπειτα η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, που υπάρχουν σε διάφορα δείγματα Ελληνικών τυριών τυρογάλακτος. Η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος ήταν ραγδαία σε όλα τα δείγματα κάτι το οποίο θα μπορούσε να επιφέρει πολλά θετικά αποτελέσματα ως προς την ασφάλεια των τυριών.

ABSTRACT

Whey is the aqueous portion of milk which remains after cheese-making and while it is characterized as a by-product of cheese-making may afterwards processing be reused for the production of whey cheeses. The production of whey cheeses takes place all over the world and Myzithra, Anthotyro, Xinomizithra of Crete and Manouri also belong to this category.

Whey cheeses are cheeses with high moisture content and high acidity. The technology of their preparation differs depending on the type of cheese which is desired to be produced and their common data is that they receive intense heat treatment as whey is heated to temperatures above 85°C. However they also have lots of different characteristics both in terms of their chemical composition and in terms of their organoleptic characteristics.

Whey cheeses due to their high moisture content but also due to their high pH are an excellent substrate for the growth of many pathogenic microorganisms. The pathogenic microorganisms that can grow in whey cheeses are usually *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. However the existence of lactic acid bacteria either in the natural flora of cheeses or as an additional culture brings many advantages to cheeses and in particular to whey cheeses, as they act competitively against pathogenic microorganisms.

In the present research work was studied the existence and then the development of lactic acid bacteria, which are present in various samples of Greek whey cheeses. The increase in the lactic acid bacterial population was rapidly in all samples which could have many positive effects on the safety of the cheeses.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Γενικά στοιχεία για το τυρί

Η ιστορία του τυριού ξεκινάει από την αρχαιότητα και συγκεκριμένα περίπου 8000 χρόνια πριν στη «Γόνιμη Ημισέληνο» μεταξύ του Τίγρη και του ποταμού Ευφράτη στο Ιράκ κατά τη διάρκεια της «Αγροτικής Επανάστασης» όπου εξημερώθηκαν τα πρώτα μηρυκαστικά και συγκεκριμένα η κατσίκα και το πρόβατο. Η αναγνώριση της θρεπτικής αξίας του γάλακτος καθώς και των προϊόντων του ήταν μεγάλη και τα τρόφιμα αυτά υιοθετήθηκαν στο καθημερινό διαιτολόγιο εκατοντάδων ανθρώπων. Έπειτα από χίλια χρόνια εξημερώθηκε η άγρια αγελάδα στη Βόρεια Ευρώπη και τα ζώα αυτά ήταν τα πρώτα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το κρέας τους και το γάλα τους [Fox et al., 2017]. Ωστόσο, για χιλιάδες χρόνια η τυροκομία ήταν οικιακής μορφής, ενώ η πρώτη βιομηχανία τυριού δημιουργήθηκε στις ΗΠΑ το 1851. Αρχικά, η διάδοση της τεχνολογίας των τυριών πραγματοποιούνταν από τον ένα πολιτισμό στον άλλον. Με την πάροδο των χρόνων ο κλάδος σημείωσε σημαντική ανάπτυξη, η οποία οφείλεται κυρίως στην εξέλιξη τόσο της επιστήμης όσο και της τεχνολογίας [Ζερφυρίδης, 2001].

1.2.Ορισμοί τυριού

Τα τυροκομικά προϊόντα κατατάσσονται στα είδη των ζυμωμένων γαλάτων και καταλαμβάνουν σημαντική θέση στις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών, καθώς εμπλουτίζουν τον ανθρώπινο οργανισμό με θρεπτικά συστατικά και συμβάλλουν σε μία υγιεινή και ισορροπημένη διατροφή.

Σύμφωνα με το άρθρο 83 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών το τυρί ορίζεται ως *«το προϊόν, το οποίο παράγεται από γάλα και αποτελεί προϊόν ωρίμανσης του πήγματος, το οποίο είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και το οποίο παρασκευάζεται με τη βοήθεια πτυιάς ή άλλων ενζύμων, που δρουν ανάλογα σε γάλα ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγματα αυτών»*. Ακόμα, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius το *«τυρί είναι το προϊόν, το οποίο μπορεί να προκύψει από ωρίμανση ή μη με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η υφή του σε μαλακιά, ημίσκληρη, σκληρή ή*

πολύ σκληρή». Στον ορισμό επισημαίνεται ότι η περιεκτικότητα του τυριού σε καζεΐνη πρέπει να είναι υψηλότερη από των πρώτων υλών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του. Επίσης, το γενικό standard του Codex Alimentarius επισημαίνει ότι για την παρασκευή των τυριών επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν και διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας, οι οποίοι θα συμβάλλουν στη διαμόρφωση του τελικού προϊόντος [Κεχαγιάς & Τσάκαλη,2020].

Η πιο διαδεδομένη κατηγορία τυριών είναι εκείνα που παρασκευάζονται από γάλα, το οποίο πήζει με τη βοήθεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων. Από το σχηματισμό του πήγματος απομακρύνεται το τυρόγαλα, δηλαδή η υδατική φάση στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό ανάλογα με το είδος του τυριού, το οποίο επιθυμείται να παραχθεί. Για την παρασκευή σκληρών τυριών η απομάκρυνση του τυρογάλακτος γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα μαλακά. Επίσης, όσον αφορά το τυρόπηγμα, μπορεί να υποστεί ωρίμανση, ανάλογα με το είδος του τυριού ή και όχι και να καταναλωθεί ως φρέσκο. Τέλος, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης πραγματοποιούνται βιο- και φυσικοχημικές μεταβολές, οι οποίες οφείλονται σε ένζυμα [Κεχαγιάς & Τσάκαλη,2020].

1.3.Ταξινόμηση τυριών

Η ταξινόμηση των τυριών σε επιμέρους κατηγορίες χαρακτηρίζεται πολύπλοκη λόγω της μεγάλης ποικιλίας τους. Ωστόσο, σύμφωνα με το γενικό standard του Codex Alimentarius η βασική τους διάκριση γίνεται με βάση τρία χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα [Κεχαγιάς & Τσάκαλη,2020]:

α) τη σκληρότητα με κριτήριο την υγρασία:

- Πολύ σκληρό → % υγρασία <51
- Σκληρό → % υγρασία 49-56
- Ημισκληρο → % υγρασία 54-69
- Μαλακό → % υγρασία >67

β) τη λιπαρότητα με κριτήριο τη λιποπεριεκτικότητα:

- Πολύ λιπαρό → % λιποπεριεκτικότητα ≥ 60
- Πλήρους λιπαρότητας → % λιποπεριεκτικότητα ≥ 45 και < 60

- Μέσης λιπαρότητας → % λιποπεριεκτικότητα ≥ 25 και < 45
- Μερικώς αποβουτυρωμένο → % λιποπεριεκτικότητα ≥ 10 και < 25
- Αποβουτυρωμένο → % λιποπεριεκτικότητα < 10

γ) τον τρόπο ωρίμανσης:

- Ωριμανσθέν
- Ωριμανσθέν με μύκητες
- Μη ωριμανσθέν/φρέσκο
- Σε άλμη/ωρίμανση και συντήρηση σε άλμη

Στον παρακάτω πίνακα ταξινομούνται διάφορα είδη τυριών με βάση τη σκληρότητά τους και άλλα χαρακτηριστικά [Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2020] :

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των τυριών σε κατηγορίες [Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2020]

Κατηγορίες	Υγρασία Μέγιστη (%)	Ονομασία τυριού	Παρατηρήσεις
Πολύ σκληρά	32	Parmigiano-Reggiano, Romano, Asiago	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Σκληρά	38	Κεφαλοτύρι, Κασέρι, Γραβιέρα, Cheddar, Colby, Cacciocavallo, Gruyere	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Ημίσκληρα	46	Emmental, Edam, Gouda, Brick, Provolone, Roquefort, Gorgonzola	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Μαλακά	58	Φέτα, Τελεμές, Κοπανιστή, Mozzarella, Scarmorza	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση

Τυριά από τυρόγαλα	70	Μυζήθρα, Μανούρι, Μανουρομυζήθρα, Ανθότυρος	Παρασκευάζονται μετά από αναθέρμανση του τυρογάλακτος με ή χωρίς προσθήκη προγάλακτος
Τυρί κρέμα	60±5	Cream cheese(Neufchatel)	Παρασκευάζεται από μίγμα κρέμας και αποβουτυρωμένου γάλακτος-συνήθως δεν είναι προϊόν ωρίμανσης
Ανακατεργασμένα τυριά ή λυωμένα τυριά ή τυριά τρόφιμα	47-71	Processed cheeses, cheese foods	Παρασκευάζονται μετά από ανάμιξη και λιώσιμο περισσότερων ειδών τυριών. Επιτρέπεται και η προσθήκη και άλλων τροφίμων σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο του 49%
Τυριά που αλείφονται	75	Cheese spreads	Παρασκευάζονται όπως και τα cheese foods με λιγότερο συνήθως λίπος από αυτά

2. ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

2.1. Ορός γάλακτος-Τυρόγαλα

Ο ορός του γάλακτος (τυρόγαλα) είναι το υδάτινο μέρος του γάλακτος, το οποίο απομένει, έπειτα από την πήξη του και την απομάκρυνση του τυροπήγματος κατά τη διεργασία της τυροκόμησης. Παράχθηκε πρώτη φορά γύρω στο 5000 π.Χ. στην περιοχή της Μεσοποταμίας, όταν ο Kanana ανακάλυψε ότι με την αποθήκευση γάλακτος σε ασκούς δημιουργείται τυρόπηγμα και ορός γάλακτος. Αργότερα οι νομάδες βοσκοί έβραζαν τον ορό γάλακτος σε χάλκινους βραστήρες, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας στερεής θρεπτικής τροφής [Pintado et al., 2001]. Πλέον, παράγονται σε παγκόσμια κλίμακα περίπου 120 εκατομμύρια τόνοι τυρογάλακτος, όπου αξιοποιούνται περίπου μόνο το 55%. Η Ελλάδα υπολογίζεται ότι παράγει μέσα σε ένα χρόνο περίπου 700.000 τόνους τυρογάλακτος και το μεγαλύτερο ποσοστό της προέρχεται από πρόβειο και αίγιο γάλα [Ανυφαντάκης, 2004].

Το τυρόγαλα είναι ένα κίτρινο-πράσινο θολό υγρό (λόγω της ριβοφλαβίνης B2 την οποία περιέχει), το οποίο είναι απαλλαγμένο από τις πρωτεΐνες του γάλακτος-καζεΐνες έπειτα από την καθίζηση και την απομάκρυνσή τους [Ryan & Walsh, 2016]. Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος κρίνεται αναγκαία τόσο λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας αλλά και λόγω της μόλυνσης, που προκαλεί στο περιβάλλον εξαιτίας της διοχέτευσής του στις αποχετεύσεις από τις διάφορες βιομηχανίες [Ζερφυρίδης, 2001]. Συγκεκριμένα, ένα γαλακτοκομείο, το οποίο παράγει καθημερινά 100 τόνους γάλακτος παράγει ταυτόχρονα περίπου την ίδια ποσότητα βιολογικών αποβλήτων [Siso, 1996].

Ανάλογα με τη μέθοδο, η οποία λαμβάνεται αλλά και με βάση το pH του, το τυρόγαλα διακρίνεται σε [Ανυφαντάκης, 2004]:

- Γλυκό τυρόγαλα ή τυρόγαλα πυτιάς (sweet whey)

Είναι υποπροϊόν της τυροκομίας και λαμβάνεται είτε από την πήξη του γάλακτος με πυτιά, είτε από την παρασκευή καζεΐνης με προσθήκη πυτιάς. Το pH του κυμαίνεται από 5,9-6,6 ενώ η οξύτητα του από 0,10-0,20% σε γαλακτικό οξύ.

- Μετρίως όξινο τυρόγαλα
Το pH του κυμαίνεται από 5,0-5,8 ενώ η οξύτητα του από 0,20-0,40% σε γαλακτικό οξύ.
- Όξινο τυρόγαλα (acid whey)
Λαμβάνεται έπειτα από την οξίνιση του τυρογάλακτος με την προσθήκη ανόργανων οξέων κατά την παραγωγή της καζεΐνης ή με βιολογική οξίνιση κατά την παραγωγή φρέσκων τυριών. Το pH του κυμαίνεται από 4,3-4,6, ενώ η οξύτητα του από 0,40-0,60% σε γαλακτικό οξύ.

Το τυρόγαλα, το οποίο χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς στα τρόφιμα είναι αυτό, που η λήψη του γίνεται έπειτα από την παραγωγή τυριών με προσθήκη πυτιάς ή με βιολογική οξίνιση. Από την άλλη το τυρόγαλα, το οποίο χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων είναι αυτό, που προέρχεται έπειτα από τη ξήρανση κατά την παραγωγή της καζεΐνης [Ανυφαντάκης, 2004].

Το τυρόγαλα αντιπροσωπεύει το 85-95% του όγκου του γάλακτος ενώ παράλληλα διατηρεί το 55% των θρεπτικών συστατικών του. Τα κυριότερα συστατικά τόσο του γλυκού όσο και του όξινου τυρογάλακτος είναι το νερό, η λακτόζη, οι διάφορες ανόργανες ύλες και οι πρωτεΐνες του ορού. Το τυρόγαλα αποτελείται από 92-95% (w/w) νερό και 5-8% (w/w) ξηρά ουσία, από την οποία το μεγαλύτερο μέρος της είναι η λακτόζη σε ποσοστό 60-80%, το 10-20% πρωτεΐνες και το υπόλοιπο είναι βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, ανόργανα συστατικά, λίπος και γαλακτικό οξύ [Ryan & Walsh, 2016-Siso, 1996]. Ωστόσο, η αναλογία των συστατικών του εξαρτάται τόσο από το είδος του τυριού(φέτα, κεφαλοτύρι, γραβιέρα) από το οποίο προκύπτει όσο και από την τεχνολογία, η οποία εφαρμόζεται κατά την επεξεργασία του. Ακόμα, παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη σύστασή του είναι ο βαθμός διαίρεση του τυροπήγματος, ο τρόπος πήξης του, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος πριν από την πήξη του, η βιολογική οξίνιση και η θερμοκρασία αναθέρμανσης. Τέλος, για το ίδιο τυρί το πρόβειο τυρόγαλα είναι πλουσιότερο σε λίπος και πρωτεΐνες από ότι το αγελαδινό και πιο πλούσιο σε λίπος είναι το τυρόγαλα, το οποίο παρασκευάζεται από σκληρά τυριά από ότι από μαλακά [Ανυφαντάκης, 2004].

Πίνακας 2: Σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών τυριών πρόβειου και αγελαδινού γάλακτος [Ανυφαντάκης, 2004]

Συστατικά %	Λευκό τυρί άλμης		Κεφαλοτύρι		Γραβιέρα	
	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινή	Πρόβεια
Ξηρή ουσία	6,44	7,87	6,55	8,10	6,90	8,74
Νερό	93,56	92,13	93,45	91,90	93,10	91,23
Λίπος	0,32	0,39	0,40	0,80	0,60	1,26
Πρωτεΐνες	0,82	1,61	0,80	1,55	0,90	1,52
Λακτόζη	4,80	5,33	4,85	5,25	4,90	5,27
Γαλακτ. Οξύ	0,12	0,14	0,11	0,14	0,12	0,14
Ανόργ.άλατα	0,50	0,60	0,50	0,50	0,50	0,50

2.2.Τι είναι τα τυριά τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα χαρακτηρίζεται ως υποπροϊόν της τυροκομίας, ωστόσο μπορεί έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία να επαναχρησιμοποιηθεί με σκοπό να παραχθούν τα τυριά τυρογάλακτος και αυτό οφείλεται στις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, τις οποίες περιέχει [Ζερφυρίδης, 2001].

Κατά τον Codex Alimentarius [Codex Alimentarius,1971] τα τυριά τυρογάλακτος είναι μαλακά, ημιστερεά ή στερεά προϊόντα, τα οποία παράγονται με δύο τρόπους:

α) με πήξη των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος με θέρμανση, με ή χωρίς την προσθήκη οξέος

β) με συμπύκνωση του ορού γάλακτος

Στη διαδικασία παραγωγής μπορεί να προστεθεί γάλα, κρέμα γάλακτος ή και άλλες πρώτες ύλες προέλευσης γάλακτος, πριν ή μετά τη συμπύκνωση ή την πήξη.

Ακόμα, σύμφωνα με το άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014] «ως τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση ορίζονται τα τυριά, τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς την προσθήκη :

α) γάλακτος (πρόσγαλα)

β) γάλακτος και κρέμα γάλακτος

γ) βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (αλάτι)

τα οποία μπορούν να καταναλωθούν είτε ως νωπά είτε ως ξερά και το ποσοστό υγρασίας τους δεν υπερβαίνει το 70%. Επίσης, σύμφωνα με τον παραπάνω κώδικα γίνεται διαχωρισμός των τυριών τυρογάλακτος (Πίνακας 3) ανάλογα με την ποιότητά τους, με βάση το ποσοστό υγρασίας και λίπους.

Πίνακας 3: Κατηγορίες ποιότητας τυριών τυρογάλακτος [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014]

	Υγρασία Μέγιστη	Λίπος υπολογισμένο σε ξηρή ουσία Ελάχιστο
Εξαιρετική Ποιότητα	60%	70%
Πρώτη Ποιότητα	65%	65%
Δεύτερη Ποιότητα	70%	50%
Μερικώς αποβουτυρωμένα	70%	33,3%(συμπ/νου)- 50% (ή 10% σε τυρί ως έχει)

2.3.Είδη τυριών τυρογάλακτος

Τα τυριά τυρογάλακτος παράγονται σε διάφορα μέρη του κόσμου και το κοινό τους στοιχείο είναι ότι η παρασκευή τους γίνεται με θέρμανση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 85°C. Ωστόσο, έχουν και πολλές διαφορές ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και τη χημική τους σύνθεση, λόγω της διαφορετικής τεχνολογίας που εφαρμόζεται και της πρώτης ύλης, η οποία χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους [Ανυφαντάκης, 2004]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) αναφέρονται τα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία παράγονται σε διάφορα μέρη στον κόσμο.

Πίνακας 4: Τυριά τυρογάλακτος, τα οποία παράγονται σε διάφορες χώρες [Pintado et al.,2001]

Χώρα	Ονομασία τυριού τυρογάλακτος
Νορβηγία	Mysost, Primost, Gjestost
Ελβετία	Schottenziegr, Mascarpone
Πορτογαλία	Requeijao
Ισπανία	Requesón
Γαλλία	Serac, Brousse, Broccio
Γερμανία	Ziger, Schottenzieger
Ελλάδα	Manouri, Myzithra, Anthotyros
Ιταλία	Ricotta
Μάλτα	Cacio-ricotta
Κύπρος	Anari
Ρουμανία	Ziger, Urda
Μακεδονία	Urda
Τυνησία	Klila
Βραζιλία	Requeijao do Norte, Ricotta fresca
Η.Π.Α	Ricotone, Ricotta
Αργεντινή	Ricotta
Λίβανος	Kariche
Ιράκ	Lour

2.3.1.Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος

Τα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία παρασκευάζονται στην Ελλάδα είναι τα εξής:

α) **Μυζήθρα (Mizithra)**

Το τυρί τυρογάλακτος, το οποίο παράγεται στην Ελλάδα σε μεγαλύτερο βαθμό είναι η Μυζήθρα. Είναι ένα τυρί άμορφου σχήματος, λευκού ή υπόλευκου χρώματος, χωρίς επιδερμίδα και οπές, με κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή και ξινή

έως υπόγλυκη γεύση [Ντεβόλε ,2014]. Η παρασκευή της γίνεται από αγελαδινό, αίγαιο ή πρόβειο τυρόγαλα ή από μείγμα τους, με ή χωρίς προσθήκη αγελαδινού, αίγειου ή πρόβειου γάλακτος ή κρέμα τους [Ανυφαντάκης, 1993]. Στο εμπόριο διατίθεται σε δύο μορφές:

- Νωπή Μυζήθρα

Το τελικό προϊόν πρέπει να περιέχει μέγιστη υγρασία 70% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 50%. Η νωπή Μυζήθρα είναι μαλακό τυρί. Χρησιμοποιείται ανάλατη ως επιτραπέζιο τυρί ή αλατίζεται επιφανειακά και συντηρείται σε θερμοκρασία ψυγείου [Κυριακόπουλος, 1995].

- Ξηρή Μυζήθρα

Η ξηρή Μυζήθρα παράγεται από νωπή με αλάτισμα και ωρίμανση. Το τελικό προϊόν πρέπει να έχει υγρασία, η οποία να μην υπερβαίνει το 40% ενώ η λιποπεριεκτικότητα του πρέπει να είναι τουλάχιστον 50% επί ξηρού. Η ξηρή Μυζήθρα είναι σκληρό τυρί. Συνηθίζεται να χρησιμοποιείται τριμμένη και συντηρείται σε δροσερό περιβάλλον για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την νωπή [Κυριακόπουλος, 1995].

β) Ξυνομυζήθρα Κρήτης (Xynomizithra)

Η ονομασία «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) για το τυρί τυρογάλακτος, το οποίο παράγεται παραδοσιακά στην Κρήτη, από τυρόγαλα πρόβειο ή αίγαιο ή μείγμα αυτών. Το γάλα, το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή της Ξυνομυζήθρας απαιτείται να προέρχεται από την περιοχή της Κρήτη, η οποία οριοθετείται από τα διοικητικά όρια των Νομών Χανίων, Ρεθύμνης, Ηρακλείου και Λασιθίου [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014].

Η Ξυνομυζήθρα Κρήτης είναι ένα τυρί με άμορφη μάζα, μαλακή δομή, γεύση ξινή έως υπόγλυκη, χρώματος λευκού-υπόλευκου, υφή κοκκώδης έως αλοιφώδης, ενώ δεν έχει επιδερμίδα και οπές. Ακόμα, το τελικό προϊόν πρέπει να περιέχει μέγιστη υγρασία 55% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45% [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014].

γ) Μανούρι (Manouri)

Η ονομασία «Μανούρι» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) για το τυρί τυρογάλακτος, το οποίο παράγεται παραδοσιακά στη Θεσσαλία και στην κεντρική και δυτική Μακεδονία από τυρόγαλα πρόβειο ή αίγαιο ή μείγμα αυτών, στο οποίο επιτρέπεται να προστεθεί πρόβειο ή αίγαιο γάλα ή κρέμα τους [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014].

Το Μανούρι θεωρείται από τα τυριά τυρογάλακτος το υψηλότερο ποιοτικά και διατίθεται στο εμπόριο σε νωπή κατάσταση. Σύμφωνα με το άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών είναι ένα *«μαλακό τυρί με συμπαγή δομή, κυλινδρικό σχήμα, χωρίς οπές και επιδερμίδα, λευκού χρώματος με ευχάριστη γλυκιά γεύση και χαρακτηριστικό άρωμα»*. Ακόμα, έχει μέγιστη υγρασία κατά βάρος 60% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 70% [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014]. Το Μανούρι σε σύγκριση με τον Ανθότυρο είναι πιο κρεμώδες και πιο συνεκτικό, καθώς περιέχει διπλάσια ποσότητα προσγάλατος και κρέμας επομένως και λίπος και λιγότερη υγρασία [Ζερφυρίδης, 2001].

δ) Ανθότυρο (Anthotyro)

Ο Ανθότυρος είναι ένα είδος Μυζήθρας, το οποίο παρασκευαζόταν αρχικά μόνο στην Κρήτη από τυρόγαλα κεφαλοτυριού, το οποίο παραγόταν από αίγαιο και πρόβειο γάλα, με προσθήκη μικρής ποσότητας αίγειου ή πρόβειου γάλακτος. Πλέον η παρασκευή του Ανθότυρου πραγματοποιείται σε ολόκληρο τον Ελλαδικό χώρο από αιγοπρόβειο τυρόγαλα, με ή χωρίς την προσθήκη αιγοπρόβειου γάλακτος ή κρέμας γάλακτος. Ο Ανθότυρος διατίθεται στο εμπόριο σε δύο μορφές είτε ως νωπός είτε ως ξηρός. Επίσης, παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο παρασκευάζεται η Μυζήθρα με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται πρόβειο ή αίγαιο τυρόγαλα, το οποίο προέρχεται από σκληρά τυριά και είναι πλουσιότερο σε λιπαρά. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο Ανθότυρος σε σύγκριση με τη Μυζήθρα να έχει καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά [Ανυφαντάκης, 2004].

Όσον αφορά το τελικό προϊόν, ο νωπός και ο ξηρός Ανθότυρος πρέπει να περιέχει υγρασία, η οποία να μην ξεπερνάει το 70% και το 40% αντίστοιχα. Η ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα και των δύο τυριών πρέπει να είναι 65% επί ξηρού.

Ακόμα, ο νωπός Ανθότυρος είναι μαλακό τυρί λευκού έως υπόλευκου χρώματος ενώ ο ξηρός σκληρό τυρί υπόλευκου χρώματος, όμως και τα δύο έχουν συμπαγή δομή, χωρίς οπές και σφαιρικό σχήμα [Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014]

2.3.2. Ξένα τυριά τυρογάλακτος

Τα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα Ελληνικά τυριά τύπου Μυζήθρας, παράγονται σε πολλές χώρες μερικά από τα οποία είναι:

α) Ρικότα (Ricotta)

Το πιο γνωστό τυρί τυρογάλακτος, του οποίου η παραγωγή ξεκίνησε στην Ιταλία και πλέον έχει επεκταθεί και σε άλλες χώρες της Νοτίου Ευρώπης καθώς και στην Αμερική είναι το τυρί Ricotta. Η Ρικότα είναι ένα τυρί με μαλακή δομή, ελαφρώς ξινή γεύση, κοκκώδης υφή ενώ το χρώμα της είναι λευκό. [Asensio et al, 2014] . Για την παραγωγή της χρησιμοποιείται τυρόγαλα από σκληρά τυριά, όπως Pecorino, Mozzarella και Provolone, ενώ το λίπος δεν αφαιρείται καθόλου. Εφόσον καταναλωθεί ως φρέσκο τυρί γίνεται προσθήκη πλήρους γάλακτος, ενώ σε αντίθετη περίπτωση για να συντηρηθεί προστίθεται άπαχο γάλα και ξηραίνεται. Επίσης, στην Αμερική γίνεται προσθήκη άπαχου γάλακτος ή 5-10% πλήρες. Ακόμα, το χρησιμοποιούμενο τυρόγαλα για την παρασκευή της Ρικότα, πρέπει να μην είναι πολύ γλυκό ή όξινο και η περιεκτικότητά του σε γαλακτικό οξύ να είναι έως 0,20%. Στο εμπόριο διατίθεται σε δύο μορφές, νωπή αλλά και ξηρή ως τριμμένο τυρί. Η νωπή Ρικότα πρέπει να περιέχει υγρασία 68-73% και λίπος 4-10%, ενώ η ξηρή 60% και 5,2% αντίστοιχα. Τέλος, τη Ρικότα μπορείς να το συναντήσεις και με τις εξής ονομασίες Broccio, Serac, Recuit, Brocotte, Mejette και Ceracee [Ανυφαντάκης, 1993].

β) Αναρή (Anari)

Η Αναρή είναι ένα τυρί τυρογάλακτος, το οποίο παράγεται παραδοσιακά στην Κύπρο από πρόβειο, αίγιο και αγελαδινό τυρόγαλα με προσθήκη πρόβειου, αίγιου και αγελαδινού γάλακτος. Η Αναρή χαρακτηρίζεται ως υποπροϊόν της παρασκευής του χαλουμιού και η υφή της είναι μαλακιά, έχει

λευκό χρώμα και ήπια γλυκιά γεύση καρυδιού. Ακόμα, διατίθεται στο εμπόριο σε δύο μορφές είτε ως νωπή (αλατισμένη ή ανάλατη) είτε ως ξηρή. Η νωπή Αναρή έχει λιποπεριεκτικότητα κατά μέσο όρο 21,7% και υγρασία 65,4%, ενώ η ξηρή έχει λιποπεριεκτικότητα 34,9% και υγρασία 33,8% [Papademas & Bintsis, 2018].

γ) Mysost

Το Mysost είναι ένα τυρί τυρογάλακτος, του οποίου η παρασκευή πραγματοποιείται στις Σκανδιναβικές χώρες καθώς και σε ορισμένες βιομηχανίες στις Ηνωμένες Πολιτείες. Για την παραγωγή του χρησιμοποιείται αποκλειστικά αγελαδινό γάλα, ενώ όμοιο τυρί από αίγιο γάλα ονομάζεται Gjetost. Στο τυρόγαλα επιτρέπεται να προστεθεί μικρή ποσότητα περίπου 10% βουτυρογάλακτος ή πλήρους γάλακτος με αποτέλεσμα το τελικό τυρί να γίνεται πλουσιότερο σε λίπος και πιο μαλακό και να ονομάζεται Flotost ή Primost. Ακόμα, ένα βασικό χαρακτηριστικό του Mysost είναι ότι περιλαμβάνει εκτός από τα υπόλοιπα συστατικά του τυρογάλακτος (πρωτεΐνη, λίπος, ανόργανα συστατικά) και καραμελλοποιημένη λακτόζη. Το Mysost έχει ήπια γλυκιά γεύση, βουτυρώδης υφή και το χρώμα του είναι ελαφρώς καφέ. Τέλος, η υγρασία του τελικού προϊόντος είναι περίπου 13% ενώ προτιμάται να μην είναι άνω του 18% και η λιποπεριεκτικότητά του είναι συνήθως 10-20%, κατά προτίμηση όχι μικρότερη από 33% [Ανυφαντάκης, 1993].

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) αναγράφεται η ενδεικτική χημική σύσταση των τυριών τυρογάλακτος:

Πίνακας 5: Ενδεικτική χημική σύσταση τυριών τυρογάλακτος [Μάντης κ.ά, 2015]

Είδος τυριού	Είδος γάλακτος	pH	Υγρασία %	Λίπος %	Πρωτεΐνες	NaCl
Ricotta	Τυρόγαλα	4,9	73	0,5	11	<0,5

Μυζήθρα (νωπή)	Τυρόγαλα	5,8	65-70	5-10	10-14	1,2
Μανούρι	Τυρόγαλα	5,9	42-50	30-40	10-12	1,4
Ανθότυρος (νωπός)	Τυρόγαλα	5,8	65-70	20-21	10-12	1,0

2.4. Παραγωγή τυριών τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα, το οποίο λαμβάνεται έπειτα από την τυροκόμηση περιέχει υδατοδιαλυτά συστατικά, όπως λακτόζη, ανόργανα συστατικά καθώς και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του ορού, οι οποίες έχουν υψηλότερη βιολογική αξία, σε σύγκριση με την καζεΐνη, που πηγαίνει στο τυρί. Όπως προαναφέρθηκε το τυρόγαλα έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή τυριών τυρογάλακτος. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος μπορούν να ανακτηθούν με τους εξής τρόπους [Ζερφυρίδης, 2001]:

- Θέρμανση και οξίνιση του τυρογάλακτος, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται τυρόπηγμα για την παρασκευή τυριών τύπου Μυζήθρας, Ricotta κ.α.
- Υπερδιήθηση ή αντίστροφη ώσμωση με σκοπό τη συμπύκνωση του τυρογάλακτος, στο οποίο πραγματοποιείται μετουσίωση των πρωτεϊνών ώστε να μπορέσει να ανακατευθεί με το γάλα της τυροκόμησης με σκοπό την αύξηση της αποδόσεως σε τυρί.
- Συμπύκνωση του τυρογάλακτος με θέρμανση έως ότου να ληφθεί πυκνόρρευστος πολτός, με αποτέλεσμα την παραγωγή τυριών τύπου Mysost, τα οποία καταναλώνονται στις χώρες της Σκανδιναβίας.

2.4.1. Τεχνολογία παρασκευής τυριών τυρογάλακτος

Η παρασκευή των τυριών τυρογάλακτος πραγματοποιείται έπειτα από ισχυρή θέρμανση του τυρογάλακτος με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος ή/και κρέμα γάλακτος ή/και χλωριούχου νατρίου. Βασικό στάδιο για την παρασκευή

τους αποτελεί η θέρμανση του τυρογάλακτος σε $T > 85^{\circ}\text{C}$ με προσθήκη συχνά οργανικού οξέος, όπως οξικού ή κιτρικού ή και ανόργανου άλατος. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μετουσίωση και η πήξη των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών του ορού γάλακτος [Μάντης et al., 2015]. Επίσης, τα τυριά τυρογάλακτος διαφοροποιούνται μεταξύ τους λόγω της διαφορετικής σύστασης του τυρογάλακτος αλλά και λόγω της προσθήκης ή όχι σε αυτά προσγάλακτος ή κρέμας κατά τη διαδικασία της παρασκευής τους [Ανυφαντάκης, 2004].

Τα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία παράγονται στη χώρα μας καταναλώνονται κυρίως φρέσκα ή έπειτα από μερική αφυδάτωσή τους. Για την παρασκευή τους ως πρώτη ύλη συνήθως χρησιμοποιείται πρόβειο και αίγιο τυρόγαλα, το οποίο προέρχεται από τυροκομήσεις σκληρών τυριών και φέτας [Πετρίδης, 2013].

Ωστόσο, ανάλογα με το τυρί τυρογάλακτος, το οποίο επιθυμείται να παρασκευαστεί ακολουθείται και η κατάλληλη διαδικασία. Συγκεκριμένα:

Παρασκευή Μυζήθρας

Η Μυζήθρα παρασκευάζεται από τυρόγαλα οποιασδήποτε προέλευσης. Ωστόσο, ποιοτικά υστερεί η Μυζήθρα, που για την παρασκευή της χρησιμοποιείται μη αποβουτυρωμένο τυρόγαλα, το οποίο προέρχεται από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα κατά την παραγωγή σκληρών ή ημίσκληρων τυριών. Βασικό σημείο αποτελεί η διήθηση του τυρογάλακτος σε τσαντίλα με σκοπό την απομάκρυνση των σωματιδίων τυροπήγματος, που αν δεν απομακρυνθούν χάνουν υγρασία, σκληραίνουν και υποβαθμίζουν ποιοτικά τη Μυζήθρα [Σαρηγιαννίδου, 1995]. Ακόμα, η αρχική οξύτητα του τυρογάλακτος θα πρέπει να έχει $\text{pH } 6,3-6,4$ και η ογκομετρούμενη οξύτητα του να ανέρχεται στους $9-11^{\circ}\text{D}$. Σε περίπτωση, που έχει μεγαλύτερες τιμές πραγματοποιείται εξουδετέρωση, με αλκαλική διάλυση, σε περιορισμένη κλίμακα, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της τέφρας στο παραγόμενο προϊόν [Ζερφυριδής, 2001]. Το στάδιο αυτό της ρύθμισης της οξύτητας πρέπει να γίνεται πριν από τη θέρμανση, ιδιαίτερα στην περίπτωση του αγελαδινού γάλακτος, ώστε να ληφθούν καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, επιθυμητό θεωρείται η ογκομετρούμενη οξύτητα του τυρογάλακτος να είναι περίπου $0,15\%$ σε

γαλακτικό οξύ και η διόρθωσή της πραγματοποιείται με την προσθήκη γαλακτικού ή κιτρικού οξέος [Ανυφαντάκης, 2004].

Η έναρξη της θέρμανσης του τυρογάλακτος πρέπει να γίνεται σε φρέσκο τυρόγαλα και η αύξηση της θερμοκρασίας να γίνεται σταδιακά, ώστε να επιτευχθεί η θερμοκρασία των 88-92°C σε 40-45 λεπτά. Ακόμα, η θέρμανση του τυρογάλακτος πραγματοποιείται υπό συνεχή ανάδευση, σε κυκλικούς τυρολέβητες, χωρητικότητας περίπου 1000 λίτρων, με τη χρήση ατμού. Η αλβουμίνη και η γλοβουλίνη (πρωτεΐνες του τυρογάλακτος) κατά τη θέρμανση μετουσιώνονται, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικρών συσσωματωμάτων από τα οποία αποτελείται κυρίως η Μυζήθρα. Τα συσσωματώματα του τυρογάλακτος αρχίζουν να σχηματίζονται όταν η θερμοκρασία πλησιάσει τους 80-82°C, εξαιτίας της αλλοδόμησης των πρωτεϊνών του. Η θέρμανση στο στάδιο αυτό επιταχύνεται έως ότου το τυρόγαλα αποκτήσει T 88-92°C και η ανάδευση επιβραδύνεται μέχρι τελικά να διακοπεί στους 85°C, όπου σχηματίζεται ένα πολύ λεπτό στρώμα πήγματος στην επιφάνεια του τυρογάλακτος [Σαρηγιαννίδου., 1995-Zαγάρη ,2018]. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής συνδυασμούς T/χρόνου [Ζερφυρίδης, 2001] :

- 77°C για 1 ώρα
- 80°C για 30 λεπτά
- 90°C για 5 λεπτά

Το ύψος της θερμοκρασίας και η διάρκεια της θέρμανσης εξαρτώνται τόσο από το είδος του τυρογάλακτος όσο και από το pH. Ωστόσο, συνηθίζεται να προτιμάται ο συνδυασμός μεγάλη θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα προσέχοντας στα 45 λεπτά να έχει επιτευχθεί η τελική θερμοκρασία. Κατά την παραγωγή της νωπής Μυζήθρας, το τυρόγαλα θερμαίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σύγκριση με την ξηρή Μυζήθρα, που είναι υψηλότερες.

Στο τυρόγαλα μπορεί να προστεθεί 5-10% πρόσγαλα, με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας της Μυζήθρας. Ακόμα, επιτρέπεται να προστεθεί κρέμα με σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού, το οποίο επιθυμείται να παραχθεί. Η διαδικασία αυτή γίνεται πριν από την

έναρξη της θέρμανσης ή όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος φτάσει τους 70°C. Ο σχηματισμός του τυροπήγματος και η συγκόλληση των μορίων του επιτυγχάνονται μέσω της προσθήκης γάλακτος, ιδίως όταν το τυρόγαλα προέρχεται από αγελαδινό γάλα [Σαρηγιαννίδου., 1995]. Εφόσον, προστεθεί πρόσγαλα στο τυρόγαλα η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο ή ακόμα και σε περισσότερες δόσεις, ώστε το τυρόγαλα να παραμείνει περισσότερο χρόνο στην επιθυμητή θερμοκρασία και να μετουσιωθεί καλύτερα [Ζερφυρίδης, 2001].

Μετά τη θέρμανση, το τυρόγαλα πρέπει να υποστεί οξίνιση, ώστε το pH να είναι ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Η τιμή pH 5,2 έχει αποδειχθεί ως το άριστο σημείο οξύτητας, το οποίο είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της β-γαλακτοβουλίνης, η οποία αποτελεί το ήμισυ των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Ωστόσο, αναφέρονται και ως άριστα pH οι τιμές 5,5-5,8. Για να επιτευχθεί η ρύθμισή της οξύτητας χρησιμοποιείται κιτρικό ή οξικό οξύ σε διάλυμα 10%. Το κιτρικό οξύ θεωρείται πιο εύχρηστο λόγω του ότι είναι στερεό και χρησιμοποιείται σε μικρότερη ποσότητα σε σύγκριση με το οξικό. Επίσης, όταν χρησιμοποιείται πρόβειο τυρόγαλα η τελική ρύθμιση του pH δεν θεωρείται απαραίτητη, καθώς η συσσωμάτωση πραγματοποιείται και χωρίς αυτήν. Το αποτέλεσμα μάλιστα είναι ακόμα καλύτερο όταν το αρχικό pH του τυρογάλακτος είναι 5,7-5,8. Έτσι οι τυροκόμοι συνηθίζουν ένα μέρος του τυρογάλακτος να το αφήνουν στην άκρη έως ότου ξινίσει και έπειτα το ανακατεύουν με φρέσκο τυρόγαλα προτού αρχίσει η διαδικασία της θέρμανσης [Ζερφυρίδης, 2001].

Στη συνέχεια το τυρόπηγμα, το οποίο σχηματίζεται θερμαίνεται για μερικά λεπτά ακόμη στους 90°C και έπειτα αφήνεται στο καυτό τυρόγαλα για 20 λεπτά με σκοπό τη θρόμβωση της πρωτεΐνης και τη συγκόλληση των κόκκων της, ώστε να αποκτήσει το τυρόπηγμα σκληρότητα και να συλλεχθεί ευκολότερα. Έπειτα, το τυρόπηγμα, το οποίο έχει ανέλθει στην επιφάνεια του τυρογάλακτος συλλέγεται με τρυπητή σπάτουλα ή με τσαντίλα. Ακόμα, μπορεί να γίνει απορροή του τυρογάλακτος, να παραμείνει η Μυζήθρα έως ότου η θερμοκρασία της μειωθεί στους 45°C και στη συνέχεια να προστεθεί καλλιέργεια 1% από γαλακτικά βακτήρια και άλας περιεκτικότητα περίπου 2% [Ζερφυρίδης,

2001]. Ακολούθως, το τυρόπηγμα τοποθετείται προσεκτικά σε τυρόπανα ή καλούπια κωνικού σχήματος, με τρύπες και ανοίγματα ώστε να στραγγιστεί. Επομένως, το μέσο το οποίο χρησιμοποιείται για τη στράγγιση της Μυζήθρας, η οποία διαρκεί 3-5 ώρες, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό σχήμα του τυριού. Στην παρασκευή της νωπής Μυζήθρας η διαδικασία της στράγγισης είναι σύντομη. Η Μυζήθρα αφαιρείται από τα καλούπια την επόμενη ημέρα και αφήνεται σε Τ περίπου 22°C και σχετική υγρασία 80-85%. Εφόσον περάσουν 24 ώρες η Μυζήθρα εμβαπτίζεται ή ψεκάζεται με διάλυμα σορβικού καλίου και τοποθετείται στην τυροτράπεζα [Ανυφαντάκης, 1993-Ζερφυρίδης, 2001].

Το τελικό στάδιο αφορά τη συσκευασία της Μυζήθρας σε cryovac και την τοποθέτηση της σε ψυγείο στους 8°C. Η Μυζήθρα μπορεί να δοθεί στην κατανάλωση και από την επόμενη μέρα της παραγωγής της, με ή χωρίς αλάτι και ενοφθαλμισμένη με ή χωρίς οξυγαλακτική καλλιέργεια. Σε περίπτωση, που προστεθεί καλλιέργεια η κατανάλωσή της μπορεί να παραταθεί για 2 μήνες και η τοποθέτησή της σε ψυγείο στους 4-5°C αυξάνει τη διάρκεια συντήρησης της μέχρι και 6 μήνες. Η Μυζήθρα πολλές φορές συσκευάζεται υπό κενό, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου συντήρησής της [Ζερφυρίδης, 2001].

Για την παρασκευή ξηρής Μυζήθρας, έπειτα από τη στράγγισή της αλατίζεται με χονδρόκοκκο αλάτι 1-2 φορές εντός 24-48 ωρών και τοποθετείται σε καλά αεριζόμενους ψυχρούς θαλάμους, όπου παραμένει μέχρι η υγρασία της να είναι χαμηλότερη από 40%. Στη διάρκεια αυτή, αναπτύσσονται στην επιφάνειά της, πλήθος μικροοργανισμών και κυρίως μύκητες, που απομακρύνονται έπειτα από την ολοκλήρωση της ξήρανσης. Τέλος, η ξηρή Μυζήθρα καλύπτεται με άσπρη παραφίνη ή συσκευάζεται σε πλαστικές σακούλες και είναι έτοιμη προς παράδοση στην αγορά ή αποθηκεύεται για μήνες σε θαλάμους θερμοκρασίας 3-4°C [Σαρηγιαννίδου, 1995- Δημόπουλος, 2013]. Η ξηρή Μυζήθρα μπορεί να καταναλωθεί ως επιτραπέζιο τυρί εφόσον αλατιστεί λίγο, ενώ σε αντίθετη περίπτωση χρησιμοποιείται μόνο ως τριμμένο τυρί στα τρόφιμα [Ζερφυρίδης, 2001].

Παρασκευή Ανθότυρου

Όπως προαναφέρθηκε ο Ανθότυρος είναι ένα είδος Μυζήθρας,

επομένως η τεχνολογία παρασκευής του δεν διαφέρει πολύ με εκείνη της Μυζήθρας, με εξαίρεση το είδος του τυρογάλακτος, το οποίο χρησιμοποιείται, που είναι πρόβειο ή αίγαιο και προέρχεται από την παραγωγή σκληρών τυριών, τα οποία είναι πλούσια σε λίπος. Ακόμα, η παρασκευή του Ανθότυρου από τυρόγαλα, το οποίο προέρχεται από μαλακά τυριά δεν είναι εφικτή, εκτός αν προστεθεί κρέμα ή πλήρες γάλα, τα οποία θα το εμπλουτίσουν με λίπος. Επίσης, ως μέσο οξίνισης κατά την παραγωγή του επιτρέπεται μόνο κιτρικό ή γαλακτικό οξύ και βρώσιμο αλάτι [Ζαγάρη, 2018]. Ο Ανθότυρος έπειτα από το καλούπισμα και το στράγγισμα του τοποθετείται στο ψυγείο και μπορεί να καταναλωθεί ακόμα και από την επόμενη ημέρα. Επίσης, για την αποφυγή απώλειας υγρασίας και την προστασία του από μύκητες, η πώλησή του σε πλαστικές σακούλες υπό αεροστεγή συσκευασία θεωρείται η καταλληλότερη [Ζερφυρίδης, 2001].

Για να παρασκευαστεί Ανθότυρος σε ξηρή μορφή, αλατίζεται αρκετά και αποξηραίνεται, ώστε η υγρασία του να είναι χαμηλότερη από 40% και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως τρίμμα είτε ως επιτραπέζιο τυρί. Η ξήρανση επιτυγχάνεται σε κρύους και καλά αεριζόμενους χώρους με τη βοήθεια δίχτυ, από το οποίο κρέμεται. Ο Ανθότυρος σε υψηλές θερμοκρασίες, χάνει λίπος από τη μάζα του και αποκτά δριμεία γεύση, επομένως υποβαθμίζεται ποιοτικά. Για αυτό το λόγο, η ξήρανση πραγματοποιείται σε χώρους, όπου η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 20°C [Ζαγάρη, 2018]

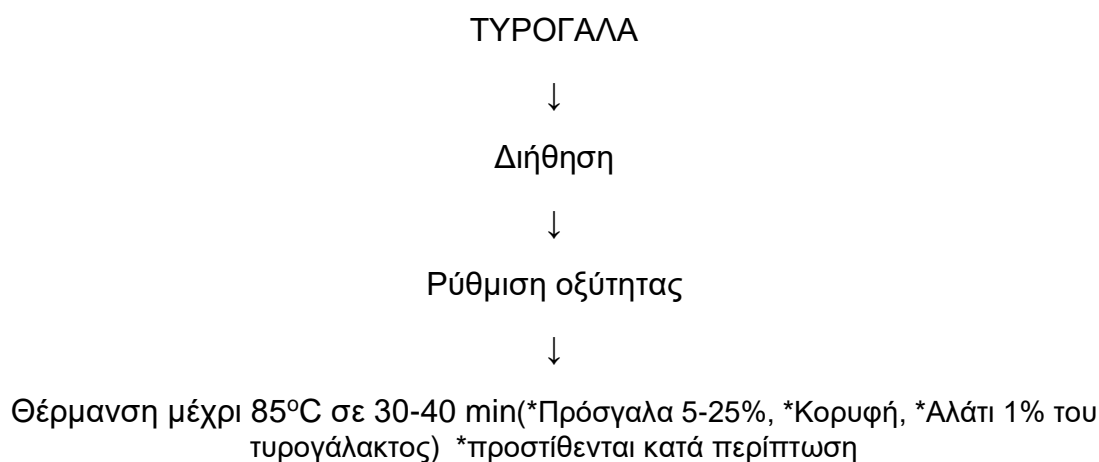
Παρασκευή Μανουριού

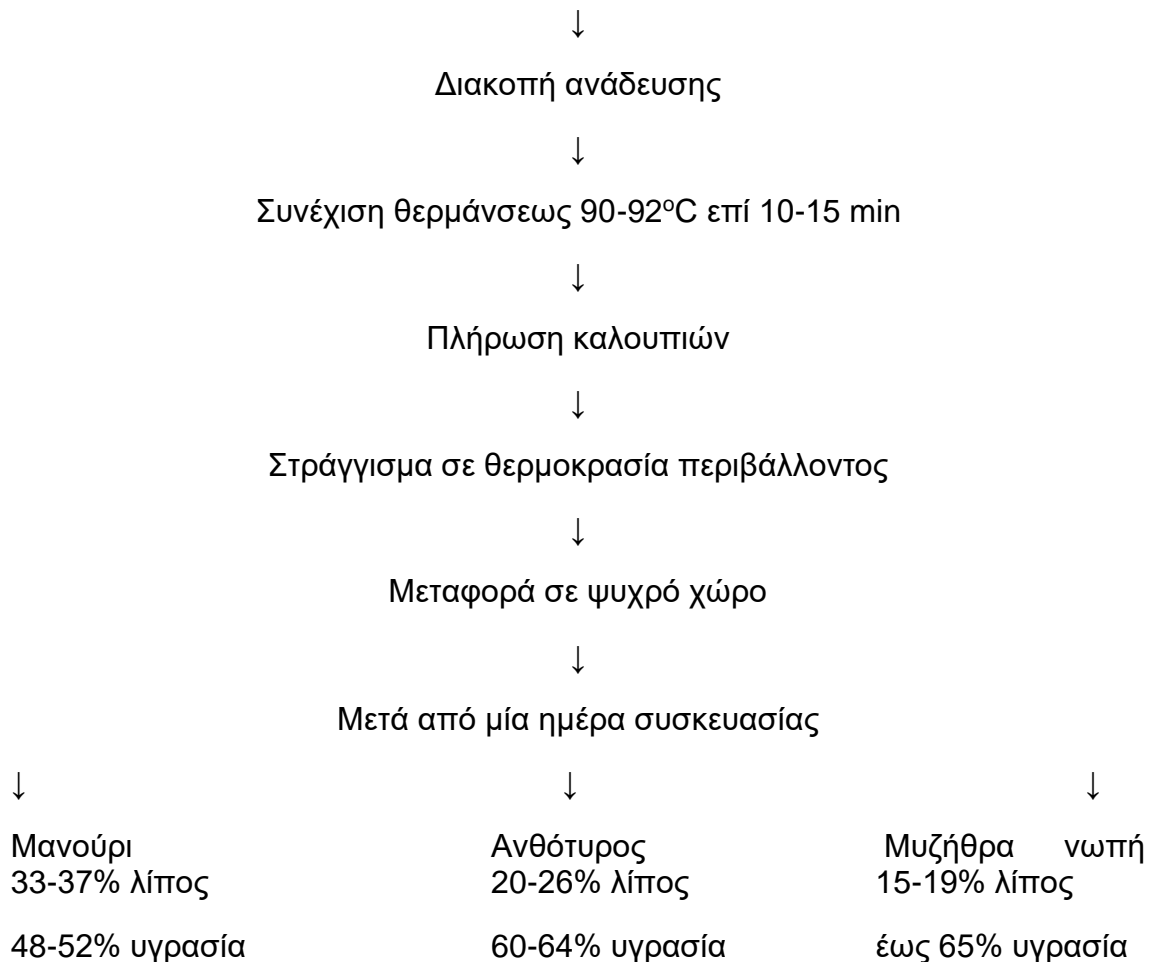
Σήμερα, σε αντίθεση με το παρελθόν η τεχνολογία παρασκευής του Μανουριού είναι ίδια με του Ανθότυρου, ενώ οι διαφορές συνίστανται στις ποσότητες προσγάλακτος και κρέμας, το σχήμα και τη μερική ωρίμανση του. Αποτέλεσμα αυτού είναι το Μανούρι να έχει κυλινδρικό σχήμα και να αφήνεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, με σκοπό να στεγνώσει η επιφάνειά του. Το Μανούρι σε αντίθεση με τον Ανθότυρο μπορεί πριν την παράδοση του να παραφινωθεί [Ζερφυρίδης, 2001].

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνολογία παρασκευής του παραδοσιακού Μανουριού είναι διαφορετική σε σύγκριση με τη σύγχρονη.

Συγκεκριμένα, για την παραγωγή του χρησιμοποιείται τυρόγαλα από αίγιο γάλα με προσθήκη πρόβειου. Επίσης, το αίγιο γάλα πηζετε στους 32°C και όταν σχηματιστεί το τυρόπηγμα κόβεται σε μικρά κομμάτια με τη βοήθεια τυροκόπτη, ώστε να παραμείνει μεγάλο μέρος του λίπους. Έπειτα το τυρόπηγμα αναθερμαίνεται έως ότου η θερμοκρασία του να φτάσει στους 50°C και εξάγεται από το τυρόγαλα. Ακολούθως, όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 70°C γίνεται η προσθήκη προσγάλακτος ή κρέμας όπου και συνεχίζει η ανάδευση του μέχρι το σημείο στο οποίο εμφανίζονται οι θρόμβοι της πρωτεΐνης στους 90°C. Μετά η ανάδευση διακόπτεται και το Μανούρι συλλέγεται και μεταφέρεται σε τσαντίλες ή μεταλλικά καλούπια συγκεκριμένου σχήματος με σκοπό να του προσδώσουν την τελική μορφή. Οι τσαντίλες και τα μεταλλικά καλούπια μεταφέρονται σε μέρος δροσερό με χαμηλή θερμοκρασία έως την επόμενη ημέρα. Τέλος, το Μανούρι έπειτα από μία ημέρα μπορεί να διατεθεί στην κατανάλωση ως νωπό αλατισμένο ή μη είτε να ξηρανθεί σε χαμηλή θερμοκρασία στον ίσκιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραδοσιακή τεχνολογία παρασκευής όχι μόνο του Μανουριού αλλά και γενικότερα των Μυζηθρών παρουσιάζει μειονεκτήματα, με πιο σημαντικά: α) η διάθεσή τους στην κατανάλωση ως νωπά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη διάρκεια ζωής στα οικιακά ψυγεία, που είναι γύρω στις 10 ημέρες β) η αξιοποίηση των αζωτούχων ουσιών του τυρογάλακτος είναι ανεπαρκής [Ανυφαντάκης, 1993-Ζερφυρίδης, 2001].

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) απεικονίζεται η παρασκευή διαφόρων τυριών τυρογάλακτος τύπου μυζήθρας:





Διάγραμμα 1: Διάγραμμα παρασκευής διαφόρων τυριών τύπου μυζήθρας [Ανουφαντάκης, 1993]

3.ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΥΡΙΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως [Κοτζεκίδου, 2009]:

- τη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά
- την ενεργότητα ύδατος (a_w)
- το pH
- τη θερμοκρασία
- το οξυγόνο και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του τροφίμου
- τη σχετική υγρασία
- τη σύνθεση αερίων σε συσκευασία κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) κ.α

Τα τυριά τυρογάλακτος είναι τυριά με υψηλή υγρασία και χαμηλή οξύτητα και

περιεκτικότητα σε αλάτι, τα οποία δεν υφίστανται ωρίμανση. Ακόμα, η θέρμανση του τυρογάλακτος προκαλεί τη θανάτωση ενός μέρους της φυσικής οξυγαλακτικής χλωρίδας, η οποία δρα ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων και έτσι είναι πιο επιρρεπή σε επιμόλυνση. Επομένως, λόγω της αυξημένης υγρασίας αλλά και λόγω του ότι εξακολουθούν να περιέχουν ένα μικρό ποσοστό λακτόζης, αποτελούν ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Έτσι, τα τυριά τυρογάλακτος κρίνονται πιο επικίνδυνα και καθίστανται ακατάλληλα ταχύτερα σε σχέση με τα τυριά, τα οποία επιδέχονται ζύμωση και ωριμάζουν. Για το λόγο αυτό κατά την παρασκευή τους είναι απαραίτητη η τήρηση των κανόνων υγιεινής από το προσωπικό για την αποφυγή επιμολύνσεων, ιδιαίτερα έπειτα από το στάδιο της θέρμανσης του τυρογάλακτος αλλά και κατά τη συντήρησή τους. Τέλος, τόσο η συντήρηση όσο και η διακίνηση των τυριών τυρογάλακτος πρέπει να πραγματοποιείται υπό ψύξη [Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2020- ΕΦΕΤ, 2012].

Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι απασχολούν ιδιαίτερα τον κλάδο της τεχνολογίας τροφίμων είναι οι αλλοιογόνοι, οι οποίοι συντελούν στην ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου αλλά κυρίως οι παθογόνοι, οι οποίοι μεταδίδονται με τα τρόφιμα και μπορούν υπό ορισμένες προϋποθέσεις, να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις.

3.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τυριά τυρογάλακτος

Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι ανευρίσκονται στα τυριά τυρογάλακτος είναι οι εξής:

3.1.1. Enterobacteriaceae

Ως εντεροβακτήρια ή εντεροβακτηριοειδή θεωρούνται όλα τα βακτήρια, τα οποία υπάγονται στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Η οικογένεια των εντεροβακτηριδίων αποτελεί μία ομάδα Gram αρνητικών, μη σπορογόνων ραβδόμορφων βακτηρίων. Περαιτέρω τα εντεροβακτήρια διακρίνονται σε κολοβακτηριοειδή (coliforms) και μη-κολοβακτηριοειδή (non-coliforms) ανάλογα με το αν ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν οξύ και αέριο ή όχι. Συγκεκριμένα:

- Κολοβακτηριοειδή → *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*,

Escherichia

- Μη-κολοβακτηριοειδή → *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Proteus*

Επίσης, τα κολοβακτηριοειδή χωρίζονται σε δύο υποομάδες:

α) τα εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή (fecal coliforms)

β) τα μη-εντερικής προέλευσης ή ολικά κολοβακτηριοειδή (total coliforms)

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή ενδημούν στον εντερικό σωλήνα των ζώων, ωστόσο μπορούν να απομονωθούν και από το περιβάλλον σε αντίθεση με τα εντερικής προέλευσης, τα οποία βρίσκονται αποκλειστικά στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων. Τέλος, τα κολοβακτηριοειδή εντερικής προέλευσης καταστρέφονται με αφυδάτωση, κατάψυξη ή ήπια θερμική επεξεργασία, επομένως η ύπαρξή τους σε επεξεργασμένα τρόφιμα είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης και για αυτό θεωρούνται δείκτες των συνθηκών υγιεινής, που επικρατούν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων [Τυμπής & Πετράκης & Κοντελής, 2016].

3.1.1.1. *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένα βακτήριο Gram αρνητικό, σχήματος ραβδίου, μη σπορογόνο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο και αποτελεί σημαντικό δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των τροφίμων και της μη τήρησης των συνθηκών υγιεινής στο νερό, στα αλιεύματα και σε νωπά και επεξεργασμένα τρόφιμα [Κοτζεκίδου, 2009].

Τα στελέχη της *Escherichia coli* είναι ορολογικά διαφοροποιημένα βάση τριών αντιγόνων: Ο (σωματικά αντιγόνα), Η (αντιγόνα μαστιγίων) και Κ (αντιγόνα κάψας). Τα περισσότερα γένη της *Escherichia coli* είναι αβλαβή παράσιτα επομένως δεν αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, όμως ορισμένα είναι παθογόνα, τα οποία προκαλούν διάρροιες και χρήζουν ιδιαίτερη προσοχή. Τα παθογόνα είδη της *Escherichia coli* κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Εντεροτοξινογόνα (ETEC)
- Εντεροπαθογόνα (EPEC)

- Εντεροδεισδυτικά (EIEC)
- Εντεροπροσκολλητικά (DAEC)
- Εντεροσυσσωρευτικά (EAEC)
- Εντεροαιμορραγικά (EHEC)

Διαπιστώθηκε ότι τα εντεροαιμορραγικά στελέχη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο το 1982 όταν το στέλεχος *E.coli* O157:H7 προκάλεσε κρούσματα αιμορραγικής κολίτιδας. Ακόμα, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη παράγουν βεροτοξίνες ή Shiga τοξίνες και χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η *E.coli* O157:H7 [Κοτζεκίδου, 2009].

Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου είναι οι εξής:

- Θερμοκρασία → Αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος 4-45°C με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Στις θερμοκρασίες παστερίωσης του γάλακτος καταστρέφεται πληθυσμός *E.coli* O157:H7 10⁴ cfu/ ml [Strawn & Danyluk 2010- Κοτζεκίδου, 2009].
- pH → Η *E.coli* O157:H7 έχει ως ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξή της 4-4,5 ενώ το βέλτιστο pH κυμαίνεται μεταξύ 6 και 7. Η έκθεση του μικροοργανισμού σε όξινο περιβάλλον προκαλεί την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής στο όξινο στρες, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα την επιβίωσή του σε όξινο περιβάλλον σε θερμοκρασίες ψύξης. Συγχρόνως, γίνεται ανθεκτικό στην ακτινοβόληση, στη θέρμανση και στα χημικά συντηρητικά [Κοτζεκίδου, 2009- Charimba et al., 2010].
- aw → Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη της *E.coli* O157:H7 είναι 0,95 ενώ η βέλτιστη τιμή είναι 0,995 [Charimba et al., 2010].

Η μετάδοση της *E.coli* O157:H7 μπορεί να γίνει με άμεσο ή έμμεσο τρόπο. Τα τρόφιμα, τα οποία προκαλούν τροφική δηλητηρίαση μέσω του παθογόνου βακτηρίου είναι το κρέας, το οποίο δεν έχει υποστεί επαρκή θερμική επεξεργασία και κυρίως ο βοδινός κιμάς, καθώς και πιο σπάνια το μη ορθά παστεριωμένο γάλα και τα παράγωγά του, τα λαχανικά και οι χυμοί φρούτων. Τα κύρια συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης είναι η διάρροια, η αιμορραγική κολίτιδα και η ναυτία. Ωστόσο, η *E.coli* O157:H7 μπορεί να

προκαλέσει πιο σοβαρές επιπλοκές στην υγεία, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως σε ηλικιωμένους και μικρά παιδιά και περιλαμβάνουν τη νεφρική ανεπάρκεια και την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακόμα, κατά τη μετάδοση του παθογόνου βακτηρίου από τον έναν άνθρωπο σε άλλον η λοιμογόνος δόση είναι μικρότερη από 100 κύτταρα, όμως στα ευαίσθητα άτομα αρκούν μόλις 10 κύτταρα για να νοσήσουν [Κοτζεκίδου, 2009].

Τέλος, ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005 αναφέρει ότι στα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος, τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία επιτρέπεται να υπάρχει πληθυσμός *E.coli* O157:H7 από 100 έως 1000 cfu/g ενώ ο έλεγχος πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της παρασκευής τους.

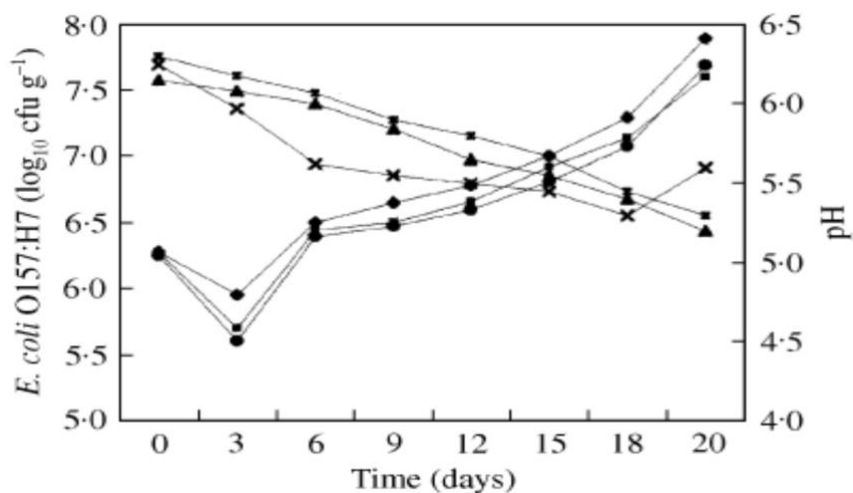
Επίδραση της *E.coli* O157:H7 στα τυριά τυρογάλακτος

Σε έρευνα, η οποία διεξάχθηκε στο Πανεπιστήμιο της Θεσσαλίας (Gonaris et al., 2001) χρησιμοποιήθηκαν τυριά τυρογάλακτος και συγκεκριμένα Μυζήθρα, Ανθότυρο και Μανούρι, τα οποία εμβολιάστηκαν με *E.coli* O157:H7 σε συγκεντρώσεις περίπου $1,8 \times 10^6$ cfu/g και αποθηκεύτηκαν στους 2°C και στους 12°C για 30 και 20 ημέρες αντίστοιχα. Η υγρασία και η λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού στα τρία τυριά τυρογάλακτος ήταν σύμφωνη με τα πρότυπα με εξαίρεση τη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού της Μυζήθρας, η οποία ήταν χαμηλότερη λόγω του ότι ήταν με λιγότερα λιπαρά.

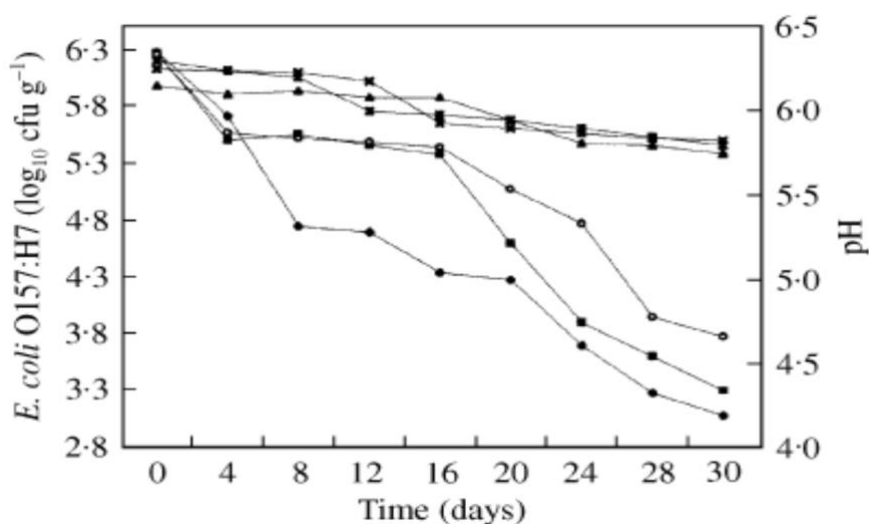
Η υγρασία και η περιεκτικότητα σε λίπος και αλάτι δεν μεταβλήθηκε κατά πολύ μέχρι το τέλος του πειράματος. Τα τυριά τυρογάλακτος παράγονται έπειτα από θέρμανση του τυρογάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες και αποτέλεσμα αυτού είναι να μην επιβιώνει η *E.coli* O157:H7, η οποία θανατώνεται σε θερμοκρασίες παστερίωσης. Ωστόσο, έπειτα από την παρασκευή τους τα τυριά μπορούν να επιμολυνθούν κατά τη διάρκεια της συσκευασίας και αποθήκευσης. Στη συγκεκριμένη έρευνα τα τυριά, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 12°C για 20 ημέρες, την πρώτη ημέρα παρουσίασαν πτώση στον πληθυσμό της *E.coli* O157:H7. Επίσης, η επιβίωση του μικροοργανισμού ήταν μεγαλύτερη στη Μυζήθρα, η οποία είχε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά από τα άλλα τυριά τυρογάλακτος. Η αρχική καθυστέρηση ανάπτυξης της *E.coli* O157:H7 πιθανώς οφείλεται στην προσαρμογή του μικροοργανισμού στις νέες περιβαλλοντικές

συνθήκες των τυριών τυρογάλακτος, καθώς και στη θερμοκρασία αποθήκευσης. Στη συνέχεια οι πληθυσμοί της *E.coli* O157:H7 μέχρι το τέλος της μελέτης αυξήθηκαν κατά πολύ και στα τρία τυριά και το pH μειώθηκε σταδιακά. Οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού ήταν αρκετά υψηλοί ωστόσο δεν παρουσιάστηκε κάποια ένδειξη αλλοίωσης από την πρώτη ημέρα του εμβολιασμού μέχρι τις ημέρες 14, 17 και 18 της αποθήκευσης για τη Μυζήθρα, τον Ανθότυρο και το Μανούρι αντίστοιχα. Δεδομένου ότι δεν ήταν ορατή κάποια αλλοίωση, τα τυριά τυρογάλακτος εφόσον δεν τηρούνται οι συνθήκες υγιεινής μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ακόμα, λόγω της επεξεργασίας που δέχονται τα τυριά τυρογάλακτος κατά τη θέρμανσή τους θανατώνονται και άλλα βακτήρια, όπως βακτήρια του γαλακτικού οξέος, τα οποία έχουν την ικανότητα να δρουν ανταγωνιστικά έναντι της *E.coli* O157:H7.

Όσον αφορά την αποθήκευση των τριών τυριών τυρογάλακτος σε θερμοκρασία 2°C για 30 ημέρες τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί του παθογόνου βακτηρίου καθώς και το pH μειώθηκαν στη Μυζήθρα, στον Ανθότυρο και στο Μανούρι. Επίσης, οι τελικοί πληθυσμοί *E.coli* O157:H7 της Μυζήθρας ήταν χαμηλότεροι από τα άλλα τυριά τυρογάλακτος. Τέλος, δεν υπήρχαν ορατά σημάδια αλλοίωσης στα τυριά τυρογάλακτος κατά τη διάρκεια των 30 ημερών αποθήκευσης στους 2°C. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης απέδειξαν ότι η *E.coli* O157:H7 έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται στους 12°C και να επιβιώνει στους 2°C κατά την αποθήκευση για τη Μυζήθρα, τον Ανθότυρο και το Μανούρι. Επομένως, χρήζεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς η επιμόλυνση με *E.coli* O157:H7 είναι αποτέλεσμα κακών συνθηκών υγιεινής, τόσο λόγω επαφής των τροφίμων, με ακάθαρτα σκεύη και υλικά συσκευασίας όσο και λόγω επαφής με μολυσμένο χειριστή και ως εκ τούτου οι σωστοί χειρισμοί κατά την παραγωγή, καθώς και η εφαρμογή συστήματος ελέγχου HACCP είναι απαραίτητα [Govaris et al., 2001].



Διάγραμμα 2: Μεταβολές στον πληθυσμό της *E.coli* O157:H7 (Ανθότυπος ■, Μανούρι ●, Μυζήθρα ◆) και στο pH (Ανθότυπος ▲, Μυζήθρα ×, Μανούρι *) στους 12°C [Govaris et al., 2001]



Διάγραμμα 3: Μεταβολές στον πληθυσμό της *E.coli* O157:H7 (Ανθότυπος ■, Μανούρι ●, Μυζήθρα ◆) και στο pH (Ανθότυπος ▲, Μυζήθρα ×, Μανούρι *) στους 2°C [Govaris et al., 2001]

3.1.1.2. *Yersinia enterocolitica*

Η *Yersinia enterocolitica* ανήκει στο γένος *Yersinia* της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Είναι ένα βακτήριο Gram αρνητικό, ψυχρότροφο, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο σε σχήμα ραβδίου. Η *Yersinia*

enterocolitica σε θερμοκρασίες μικρότερες των 30°C παρουσιάζει κινητικότητα, ενώ στους 37°C είναι ακίνητη [Ανυφαντάκης, 2004-Κοτζεκίδου, 2009].

Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Yersinia enterocolitica* είναι οι εξής [Κοτζεκίδου, 2009- Latiful et al., 2011] :

- Θερμοκρασία → Αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος από -2°C έως 45°C και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 28-30°C. Ακόμα, λόγω του ότι είναι ψυχρότροφο βακτήριο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης. Η *Yersinia enterocolitica* στις θερμοκρασίες παστερίωσης του γάλακτος καταστρέφεται. Επίσης, καταστρέφεται με θέρμανση στους 60°C για 1-3 λεπτά.
- pH → Η *Yersinia enterocolitica* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε τιμές pH 4,2-9,5 με βέλτιστη τιμή 7 έως 8. Η παρουσία οργανικών οξέων και κυρίως το οξικό οξύ μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού του μικροοργανισμού σε χαμηλό pH.
- aw → Η ελάχιστη τιμή aw, στην οποία είναι δυνατή η ανάπτυξη της *Yersinia enterocolitica* είναι 0,96.
- Συγκέντρωση NaCl → Το βακτήριο δεν αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl μεγαλύτερες από 7%.

Η *Yersinia enterocolitica* είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον και έχει απομονωθεί σε πόσιμο και μη νερό, σε διάφορα ζώα όπως χοίρους, αγελάδες, άλογα και τέλος σε διάφορα τρόφιμα. Όσον αφορά τα τρόφιμα έχει απομονωθεί σε κρέατα, αλιεύματα, λαχανικά αλλά και στο γάλα. Συγκεκριμένα, το γάλα, το οποίο δεν έχει υποστεί επαρκή παστερίωση ή έχει επιμολυνθεί έπειτα, είναι η κύρια αιτία τροφοδηλητηριάσεων από το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο. Ακόμα, η διατήρηση νωπού γάλακτος, στο οποίο έχει αναπτυχθεί το παθογόνο βακτήριο, υπό ψύξη δεν αναστέλλει την ανάπτυξή του, αφού είναι κανό να ανταγωνιστεί τη φυσική του χλωρίδα. Οι ορολογικοί τύποι της *Yersinia enterocolitica*, οι οποίοι συνηθίζουν να προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις στον άνθρωπο είναι τέσσερις και συγκεκριμένα οι O:3 (βιότυπος 4), O:5,27 (βιότυπος 2 ή 3), O:8 (βιότυπος 1B) και O:9 (βιότυπος 2). Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού είναι ότι έχει τη δυνατότητα να παράγει μία θερμοανθεκτική

εντεροτοξίνη, της οποίας η καταστροφή μπορεί να επέλθει έπειτα από θέρμανση στους 100°C για 20 λεπτά, ενώ η παραγωγή της τοξίνης ευνοείται σε $T < 30^{\circ}\text{C}$ και σε pH 7-8. Η τροφική δηλητηρίαση, η οποία προκαλείται από τη *Yersinia enterocolitica* εμφανίζεται ως γαστρεντερίτιδα και τα παιδιά είναι πιο ευαίσθητα να νοσήσουν. Τα συνηθέστερα συμπτώματα είναι πυρετός, διάρροια, εμετός, πονοκέφαλος, κοιλιακοί πόνοι και εμφανίζονται αρκετές ημέρες έπειτα από κατανάλωση τροφίμου, που έχει μολυνθεί [Κοτζεκίδου, 2009- Σαρηγιαννίδου, 1995].

Επίδραση της *Yersinia enterocolitica* στα τυριά τυρογάλακτος

Έρευνα, η οποία διεξάχθηκε στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Σαρηγιαννίδου, 1995) είχε ως σκοπό: α) τη μελέτη της ικανότητας επιβίωσης της *Yersinia enterocolitica* στο στάδιο της θέρμανσης του τυρογάλακτος, καθώς και τη μελέτη της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μικροοργανισμού (τα οποία ενδέχεται να επιβιώνουν κατά τη θέρμανση) σε Μυζήθρα συσκευασμένη υπό κενό, σε συνθήκες συντήρησης 4°C και 10°C για 30 ημέρες β) τη μελέτη της δυνατότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων της *Yersinia enterocolitica* στη Μυζήθρα, έπειτα από τον ενοφθαλμισμό της (μετά από την παρασκευή και στράγγιση της) και την παραμονή της σε T 10°C και 4°C για 30 ημέρες σε αεροστεγή συσκευασία ή μη.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η θερμική επεξεργασία του τυρογάλακτος στους 90°C για 10 λεπτά θανάτωσε τη *Yersinia enterocolitica* επομένως δεν παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός των κυττάρων του μικροοργανισμού κατά τη συντήρηση της Μυζήθρας στους 4°C και 10°C. Όσον αφορά το δεύτερο κομμάτι της έρευνας, τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: Ο πληθυσμός της *Yersinia enterocolitica* στη Μυζήθρα, που συντηρήθηκε σε T 4°C σε συσκευασία κενού για 30 ημέρες αυξήθηκε σημαντικά και ο μεγαλύτερος πληθυσμός, που αριθμήθηκε ήταν 60×10^6 cfu/g ενώ ο μικρότερος 5×10^2 cfu/g. Μάλιστα παρόλο που μεταξύ της 15^{ης} και 30^{ης} ημέρας παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού, αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική καθώς το pH ήταν μεγαλύτερο του 5,6 επομένως ικανό για να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός. Για τη συσκευασία χωρίς κενό τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με μέγιστο πληθυσμό 32×10^7 cfu/g και ελάχιστο 4×10^2 cfu/g. Όσον αφορά τη συντήρηση της Μυζήθρας στους 10°C σε συσκευασία κενού και μη

επί 30 ημέρες η μέγιστη αύξηση του πληθυσμού της *Yersinia enterocolitica* ήταν 15×10^7 cfu/g και 75×10^7 cfu/g αντίστοιχα, ο δε μικρότερος πληθυσμός που αριθμήθηκε ήταν 7×10^2 cfu/g και 20×10^2 cfu/g αντίστοιχα. Τελικά, οι θερμοκρασίες συντήρησης 4°C και 10°C καθώς και η τιμή του pH της Μυζήθρας είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του πληθυσμού της *Yersinia enterocolitica* σε όλους τους πειραματισμούς και επιπλέον δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της συντηρημένης Μυζήθρας σε συσκευασία κενού ή μη [Σαρηγιαννίδου, 1995].

3.1.2. *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στο γένος *Staphylococcus* της οικογένειας Micrococcaceae. Είναι ένα βακτήριο Gram θετικό, σχήματος σφαιρικό έως ωοειδές, το οποίο εμφανίζεται μόνο ή σε ζεύγη ή σε ομάδες, που μοιάζουν με τσαμπί από σταφύλι και είναι προαιρετικά αναερόβιο. Τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* διαφέρουν από εκείνα του γένους *Micrococcus* τόσο στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης όσο και στη δυνατότητά τους να αποικοδομούν τη γλυκόζη αναερόβια. Ακόμα, η διάκριση του *S.aureus* από τους άλλους σταφυλόκοκκους πραγματοποιείται με το τεστ της κοαγκουλάσης ή πηκτάσης. Επίσης, μερικά στελέχη του μικροοργανισμού παράγουν μία ιδιαίτερα θερμοανθεκτική πρωτεϊνική τοξίνη, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση στον άνθρωπο. Ένα μη τοξικό στέλεχος έπειτα από προσβολή από βακτηριοφάγους μπορεί να μετατραπεί σε τοξικό [Κοτζεκίδου, 2009].

Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και την παραγωγή τοξινών είναι οι εξής [Ανυφαντάκης, 2004-Κοτζεκίδου, 2009] :

- Θερμοκρασία → Αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος 7-48°C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 37°C, όμως η εντεροτοξίνη παράγεται από 10-46°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή εντεροτοξίνης είναι 40°C με 45°C.
- pH → Ο μικροοργανισμός έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε εύρος pH 4,0-9,8 ενώ το άριστο εύρος pH είναι 6-7. Ωστόσο, η ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* είναι χαμηλότερη υπό αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με αναερόβιες συνθήκες. Η παραγωγή

των εντεροτοξινών πραγματοποιείται μόνο σε pH μεγαλύτερο του 5.

- aw → Η aw του τροφίμου επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*. Το παθογόνο βακτήριο έχει ως ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος για την ανάπτυξη του 0,86 σε αερόβιες συνθήκες και 0,90 σε αναερόβιες. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί και ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε τιμή aw 0,83. Εντεροτοξίνες παράγει μόνο σε τιμή aw μεγαλύτερη του 0,86.
- NaCl → Σε NaCl 10% αναπτύσσονται τα περισσότερα στελέχη του *Staphylococcus aureus*, ενώ μερικά αναπτύσσονται σε 20%. Ακόμα, η ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του βακτηριού αυξάνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του NaCl.

Ο *Staphylococcus aureus* βρίσκεται στο νερό, στα απόβλητα, στον αέρα, ωστόσο ο φυσικός του βιότοπος είναι το δέρμα, η ρινική κοιλότητα και ο εντερικός σωλήνας των ανθρώπων και των ζώων. Ο μαστός των ζώων γαλακτοπαραγωγής αποτελεί πηγή μόλυνσης του γάλακτος, καθώς οι σταφυλόκοκκοι τον προσβάλλουν και προκαλούν κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα. Επίσης, τα τρόφιμα τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν τροφοτοξίνωση από *Staphylococcus aureus* είναι το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, οι πάστες, οι μαγιονέζες, τα ψάρια καθώς και το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ακόμα, ο σχηματισμός τοξίνης από τον *Staphylococcus aureus* ευνοείται κατά την παραγωγή τυριών, όταν ο πληθυσμός των σταφυλόκοκκων είναι μεγαλύτερος από αυτό των γαλακτικών βακτηρίων. Ωστόσο, τόσο κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όσο και κατά το σχηματισμό της τοξίνης δεν παρατηρούνται στα τρόφιμα μεταβολές στην εμφάνιση και στην οσμή τους κάτι, το οποίο είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο. Η ανεπαρκής ψύξη των τροφίμων είναι η κύρια αιτία τροφοτοξινώσεων από τον μικροοργανισμό και τα συμπτώματα της ασθένειας διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Τα πιο κοινά όμως είναι η ναυτία, ο εμετός, οι κράμπες, ο κεφαλόπονος και η υποθερμία, ενώ το ποσοστό των θανάτων είναι πολύ χαμηλό. Άλλα συμπτώματα είναι το ρίγος, η εφίδρωση, η εξάντληση και οι χαμηλοί σφυγμοί και η ασθένεια διαρκεί 1-2 ημέρες. Επίσης, ο μικροοργανισμός καταστρέφεται στις θερμοκρασίες παστερίωσης του γάλακτος όμως δεν συμβαίνει το ίδιο και

με τις τοξίνες, οι οποίες είναι θερμοάντοχες και επιβιώνουν ακόμα και σε πολύ υψηλές θερμικές επεξεργασίες. Οι σταφυλοκοκκικές τοξινώσεις προκαλούνται από το παθογόνο βακτήριο, εφόσον υπάρχουν στο τρόφιμο 10^6 κύτταρα/g τροφίμου τοξινοπαραγώγου στελέχους και συνήθως δεν είναι θανατηφόρες, ωστόσο έχουν αναφερθεί και αρκετοί θάνατοι έπειτα από κατανάλωση νωπού γάλακτος και τυριών [Ανυφαντάκης, 2004-Κοτζεκίδου, 2009].

Τέλος, ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005, αναφέρει ότι τα μη ωριμασμένα μαλακά τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος, που έχουν υποστεί παστερίωση έχουν ως όριο 100 cfu/g για παρουσία *Staphylococcus aureus* θετικό στην πηκτάση.

Επίδραση του *Staphylococcus aureus* στα τυριά τυρογάλακτος

Σε έρευνα, η οποία διεξάχθηκε στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (Πετρίδης, 2013) χρησιμοποιήθηκαν 25 δείγματα Μανουριού από 5 διαφορετικές βιομηχανίες (βιομηχανία C, βιομηχανία D, βιομηχανία G, βιομηχανία K, βιομηχανία T) με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των σταφυλόκοκκων και ιδιαίτερα του *Staphylococcus aureus* στα συγκεκριμένα τυριά τυρογάλακτος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι όλα τα δείγματα Μανουριού ήταν μολυσμένα με βακτήρια του γένους *Staphylococcus*, άρα οι συνθήκες υγιεινής και καθαριότητας των τυροκομείων δεν ήταν οι ενδεδειγμένες. Όσον αφορά την καταμέτρηση του μέσου όρου πληθυσμού του *Staphylococcus aureus* στα δείγματα Μανουριού ήταν:

- α) για τη βιομηχανία C → 10 cfu/g
- β) για τη βιομηχανία D → 488 cfu/g
- γ) για τη βιομηχανία G → 540 cfu/g
- δ) για τη βιομηχανία K → 36 cfu/g
- ε) για τη βιομηχανία T → 22 cfu/g

Από τα 25 δείγματα Μανουριού τα 11 βρέθηκαν μολυσμένα με τον *Staphylococcus aureus*, ωστόσο οι πληθυσμοί διέφεραν από δείγμα σε δείγμα

[Πετρίδης, 2013].

3.1.3. *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια Bacillaceae και έχει τα εξής χαρακτηριστικά: Είναι ένα βακτήριο Gram θετικό, σχήματος ραβδίου, το οποίο κινείται με μαστίγια, που βρίσκονται περιμετρικά του. Ακόμα, έχει την ικανότητα να σχηματίζει σπόρια, τα οποία έχουν ελλειψοειδές ή κυλινδρικό σχήμα και δεν προκαλούν παραμόρφωση στο μητρικό κύτταρο [Τυμπής & Πετράκης & Κοντελής, 2016].

Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του *Bacillus cereus* είναι οι εξής [Κοτζεκίδου, 2009]:

- Θερμοκρασία → Είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος 4-50°C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι μεταξύ 30°C και 37°C.
- pH → Το παθογόνο βακτήριο αναπτύσσεται σε τιμές pH 4,9-9,3 και η άριστη τιμή είναι 7,2.
- aw → Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού διαφέρει ανάλογα με το υπόστρωμα, στο οποίο αναπτύσσεται ο *Bacillus cereus*. Συγκεκριμένα, η ελάχιστη τιμή aw είναι 0,95 σε υποστρώματα, τα οποία περιέχουν NaCl και 0,85 σε υποστρώματα, τα οποία περιέχουν γλυκερόλη. Σε τιμές ενεργότητας ύδατος 0,98 παρουσία NaCl ή KCl γίνεται εκβλάστηση των σπορίων του, όμως όσο μειώνεται η aw τόσο ελαττώνεται και ο ρυθμός εκβλάστησης των σπορίων του με οριακή τιμή 0,95. Ο *Bacillus cereus* σε τρόφιμα, τα οποία έχουν τιμές ενεργότητας ύδατος $\leq 0,90$ δεν αναπτύσσεται.
- Συγκέντρωση αλάτων → Σε συγκεντώσεις NaCl > 8% ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται.

Ο *Bacillus cereus* είναι αρκετά διαδεδομένος στη φύση και κυρίως στο έδαφος και απαντάται σε ένα πλήθος τροφίμων, όπως κρέας και κρεατοσκευάσματα, πουλερικά, λαχανικά, ζύμες και σε γλυκίσματα με κρέμα. Ο κύριος λόγος, ο οποίος εμφανίζεται στα τρόφιμα είναι η έλλειψη συνθηκών

υγιεινής και ο λανθασμένος τρόπος αποθήκευσης. Επίσης, η τροφική δηλητηρίαση προκαλείται σε τρόφιμα, στα οποία ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ξεπερνάει το 10^7 cfu/g τροφίμου. Ο *Bacillus cereus* κάτω από ορισμένες συνθήκες παράγει τοξίνες, ωστόσο τροφικές δηλητηριάσεις επέρχονται λόγω της εμετικής και της διαρροϊκής εντεροτοξίνης [Τυμπής & Πετράκης & Κοντελής, 2016]. Η πρώτη προκαλείται από ένα μικρό πεπτιδίο σχήματος δακτυλίου, το οποίο ονομάζεται cereulide και σχηματίζεται πριν από την κατάποση στην τροφή, ενώ η δεύτερη προκαλείται, από μία ή περισσότερες εντεροτοξίνες, οι οποίες παράγονται στο λεπτό έντερο από βιώσιμα βακτήρια και σχετίζεται με την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πρωτεΐνη [Erica Tirloni et al., 2017]. Σε θερμοκρασιακό εύρος 15-50°C αναπτύσσονται τα στελέχη, τα οποία είναι ικανά να παράγουν την εμετική τοξίνη με άριστες τιμές 35-40°C. Από την άλλη η διαρροϊκή τοξίνη δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη θέρμανση, ενώ βέλτιστο pH για την ανάπτυξή της είναι οι τιμές 6,0-8,5. Τα συμπτώματα της διαρροϊκής τοξίνης είναι λιγότερα έντονα και εμφανίζονται 8 έως 16 ώρες από τη λήψη μολυσμένης τροφής, ενώ της εμετικής εμφανίζονται σε 1-6 ώρες [Κοτζεκίδου, 2009]. Οι τροφικές δηλητηριάσεις από γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σπάνιες και τα τρόφιμα αυτά επιμολύνονται συνήθως όταν βρίσκονται σε χώρους, όπου ο εξοπλισμός είναι εκτεθειμένος σε σκόνη. Επιπροσθέτως, ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί μεμβράνες, οι όποιες τον προστατεύουν και εφόσον σχηματιστούν σε επιφάνειες, οι οποίες δέχονται θερμική επεξεργασία, ενδέχεται να προκληθεί εκβλάστηση των σπορίων. Προς αποφυγή του παραπάνω η ψύξη του γάλακτος και των προϊόντων του είναι απαραίτητη [Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2020].

Επίδραση του *Bacillus cereus* στα τυριά τυρογάλακτος

Η μόλυνση του νωπού γάλακτος από τα σπόρια του *Bacillus cereus*, που έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κατά την παστερίωση ή και έπειτα, είναι η πιθανότερη αιτία παρουσίας του παθογόνου βακτηρίου στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι τα τυριά τυρογάλακτος. Τα κύτταρα του *Bacillus cereus*, έπειτα από τη βλάστηση των σπορίων, αρχίζουν να αναπτύσσονται, προκαλώντας αλλοίωση στο τρόφιμο ή ακόμα και μία τροφιμογενή νόσο [Tirloni et al., 2017].

Σε έρευνα (Tirloni et al., 2017) χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος αναφοράς το *Bacillus cereus* ATCC 14579 και τρία ανθρωπίνα κλινικά απομονωμένα στελέχη τα *Bacillus cereus* GGu1, *Bacillus cereus* GPe2 και *Bacillus cereus* RCe1, τα οποία προηγουμένως είχαν χαρακτηριστεί για τις λοιμογόνους ικανότητές τους. Αρχικά, τα στελέχη αξιολογήθηκαν: α) ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 5°C έως 55°C και β) για το ποσοστό επιβίωσης των σπορίων σε ένα πλήθος θερμικών επεξεργασιών 65°C, 70°C, 80°C και 90°C για 30, 15, 10 και 3 λεπτά, αντίστοιχα. Έπειτα, δύο δείγματα ορού γάλακτος, από τα οποία παράχθηκαν φρέσκα τυριά τύπου Ρικότα, εμβολιάστηκαν ξεχωριστά με τα σπόρια των στελεχών ATCC 14579 και GPe2 και αποθηκεύτηκαν στους 10°C για 7 ημέρες (το στέλεχος GPe2) και στους 15°C για 5 ημέρες (και τα δύο στελέχη). Ακόμα, ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε και σε φρέσκια Ρικότα έπειτα από την παραγωγή της, η οποία αποθηκεύτηκε στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας/χρόνου [Tirloni et al., 2017].

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κάτω από τους 10°C (με εξαίρεση το στέλεχος GPe2, το οποίο αναπτύχθηκε στους 10°C). Μάλιστα, το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με παλαιότερες έρευνες, αφού η παραγωγή τοξινών σχετίζεται κυρίως με μεσόφιλα στελέχη του μικροοργανισμού. Επίσης, το ποσοστό επιβίωσης των σπορίων μεταξύ των τεσσάρων συνδυασμών θερμοκρασίας/χρόνου διέφερε μεταξύ των στελεχών. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *Bacillus cereus* GPe2 και *Bacillus cereus* ATCC 14579 ήταν πιο ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με τα *Bacillus cereus* GGu1 και *Bacillus cereus* RCe1. Για αυτό το λόγο τα δύο πρώτα επιλέχθηκαν για τις περαιτέρω δοκιμές. Τα δύο στελέχη, τα οποία εξετάστηκαν αναπτύχθηκαν ταχύτατα και όταν εμβολιάστηκαν στον ορό γάλακτος, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της Ρικότας αλλά και στο τελικό προϊόν. Ακόμα, σε όλες τις σειρές δειγμάτων στη θερμοκρασία των 15°C παρατηρήθηκαν υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης και για τα δύο στελέχη. Επίσης, τα δείγματα τα οποία εμβολιάστηκαν με τον μικροοργανισμό στον ορό γάλακτος είχαν υψηλότερες τιμές βακτηριακής πυκνότητας. Το στέλεχος GPe2 στους 10°C παρουσίασε πολύ αργό ρυθμό ανάπτυξης. Όσον αφορά την ικανότητα του

Bacillus cereus να παράγει τη διαρροϊκή τοξίνη σε φρέσκο υπόστρωμα Ρικότας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος GPe2 στα δείγματα, τα οποία συντηρήθηκαν στους 10°C παρήγαγε χαμηλές ποσότητες τοξίνης. Αντίθετα, στα δείγματα τα οποία συντηρήθηκαν στους 15°C και τα δύο στελέχη παρήγαγαν υψηλές ποσότητες τοξίνης, από τη δεύτερη και όλες ημέρα αποθήκευσης. Τελικά έως το τέλος της αποθήκευσης ανιχνεύτηκε υψηλή ποσότητα τοξίνης, ιδιαίτερα στα δείγματα, στα οποία ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στον ορό γάλακτος, από τον οποίο παράχθηκε η Ρικότα [Tirloni et al., 2017].

3.1.4. *Listeria monocytogenes*

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει τα είδη *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, *Listeria weshimeri* και *Listeria innocua* [Ανυφαντάκης, 2004]. Ωστόσο, από όλα αυτά, παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι μόνο τα πρώτα τρία και ιδιαίτερα στην τυροκομία η *Listeria monocytogenes* η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: Είναι ένα βακτήριο Gram θετικό, μη σπορογόνο, σχήματος κοκκοειδές ή ραβδίου, κινητό σε θερμοκρασίες 20-25°C λόγω των περίτριχων βλεφαρίδων, που διαθέτει, ενώ στερείται κίνησης σε θερμοκρασία 37°C. Το βακτήριο είναι προαιρετικά αναερόβιο και αυξάνεται καλύτερα σε συγκεντρώσεις 5-10% CO₂. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι η *Listeria monocytogenes* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο [Κοτζεκίδου, 2009- Τυμπής & Πετράκης & Κοντελής, 2016].

Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* είναι οι εξής [Ανυφαντάκης, 2004-Κοτζεκίδου, 2009]:

- Θερμοκρασία → Αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος 1-45°C, ενώ η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 30°C και 37°C. Ωστόσο, λόγω του ψυχρότροφου χαρακτήρα της είναι ικανή να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες ψύξης (4°C.) Στις θερμοκρασίες παστερίωσης του γάλακτος (72°C για 15 sec ή 63°C για 30 min) το βακτήριο δεν επιβιώνει, επομένως η παρουσία του μικροοργανισμού σε τυριά, τα οποία έχουν παραχθεί από παστεριωμένο γάλα είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσής τους.
- pH → Ευνοϊκό pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι οι τιμές 6-

8. Ωστόσο, το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε όξινο περιβάλλον μέχρι την τιμή 4,1 ενώ η μέγιστη τιμή pH είναι 9,4. Η ελάχιστη τιμή εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, την τιμή ενεργότητας ύδατος, τη συγκέντρωση αλάτων ή ανασταλτικών ουσιών καθώς και από τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος.

- $a_w \rightarrow$ Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε τιμές $a_w \geq 0,97$ και η ελάχιστη τιμή, που είναι ικανός να αναπτυχθεί είναι μέχρι 0,92.
- Συγκέντρωση αλάτων \rightarrow Η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις αλάτων μέχρι και 6,5%, όμως μπορεί να επιβιώσει και σε υψηλότερες τιμές.

Η *Listeria monocytogenes* απαντάται σχεδόν παντού, στα φυτά, στο έδαφος, στα κόπρανα των ζώων, στις αποχετεύσεις, στα απόβλητα αλλά και στο νερό. Η μετάδοση στον άνθρωπο (ζωνόσος) μπορεί να γίνει μέσω της προσβολής του παθογόνου βακτηρίου στα γαλακτοπαραγωγά ζώα, είτε ο μικροοργανισμός μπορεί να επιμολύνει το γάλα και μέσω αυτού τον άνθρωπο (τροφιμογενής νόσος) [Ανυφαντάκης, 2004]. Επιπλέον, η επιμόλυνση στο τρόφιμο μπορεί να προκληθεί λόγω κακής υγιεινής των χώρων στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου αλλά και λόγω μη τήρησης ορθών μέτρων υγιεινής από το προσωπικό. Το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* προκαλεί λιστερίωση, μια σοβαρή λιμώδη τροφιμογενή ασθένεια. Τα τρόφιμα, τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν λιστερίωση είναι κυρίως τα μαλακά τυριά, το νωπό και παστεριωμένο γάλα, τα πουλερικά, τα κατεψυγμένα κρέατα, τα ιχθυηρά και τα νωπά λαχανικά. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι κοινά με εκείνα της μηνιγγίτιδας και συχνά συνοδεύονται από πυρετό, κοιλιακούς πόνους και εμετό. Επίσης, οι ομάδες ανθρώπων με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, οι υπερήλικες και τα νεογνά μπορούν να προσβληθούν από τον μικροοργανισμό ακόμα και αν υπάρχει στο τρόφιμο σε μικρή συγκέντρωση, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους, οι οποίοι είναι πιο ανθεκτικοί. Ακόμα, η λιστερίωση στις εγκυμονούσες γυναίκες μπορεί να προκαλέσει αποβολή και θάνατο του εμβρύου [Κοτζεκίδου, 2009- Τυμπής & Πετράκης & Κοντελής, 2016]. Ο μικροοργανισμός είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος, καθώς τα ποσοστά θανατηφόρου κατάληξης αγγίζουν το

20-30%. Μάλιστα κατά τη δεκαετία του 1980-1990 προκλήθηκαν τρεις μεγάλες εξάρσεις λόγο γαλακτοκομικών προϊόντων με αποτέλεσμα μεγάλο αριθμό θανάτων [Ανυφαντάκης, 2004].

Τέλος, ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005 αναφέρει ότι τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, έχουν ως όριο 100 cfu/g (στα 25 g δείγματος) στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ωστόσο, για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, τα οποία προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς απαιτείται απουσία του παθογόνου στα 25 g δείγματος στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους (μηδενική ανοχή).

Επίδραση της *Listeria Monocytogenes* στα τυριά τυρογάλακτος

Οι περιπτώσεις ανθρώπων, οι οποίοι έχουν μολυνθεί από το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* έπειτα από κατανάλωση μαλακών τυριών, όπως είναι τα τυριά τυρογάλακτος, είναι πολλές. Όμως, το βακτήριο δεν επιβιώνει σε θερμοκρασίες παστερίωσης, επομένως τα ποσοστά τροφικής δηλητηρίασης οφείλονται κυρίως σε επιμολύνσεις λόγω επαφής των τυριών με νωπό γάλα και λόγω κακών πρακτικών υγιεινής κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και συντήρησή τους. Ακόμα, το παθογόνο βακτήριο μπορεί να εισέλθει στις βιομηχανίες και μέσω ανθρώπινων φορέων, δηλαδή να προσκολληθεί στην ενδυμασία, τα παπούτσια και τα χέρια του προσωπικού αλλά και μέσω των οχημάτων, που μεταφέρουν προϊόντα στο εργοστάσιο. Έτσι, τυριά με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, χαμηλή οξύτητα και χαμηλή ως μέτρια περιεκτικότητα σε αλάτι είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, επομένως απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή. Στο νωπό γάλα έπειτα από έρευνα, η *Listeria monocytogenes* ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 2 έως 6% σε διάφορες χώρες συμπεριλαμβανομένων του Καναδά, της Ιταλίας, της Ελβετίας και της Ελλάδας. Στην Ελλάδα ο μικροοργανισμός ανιχνεύτηκε στο 16,2% των δειγμάτων Μυζήθρας, στο 20,8% των δειγμάτων Ανθότυρου και στο 5,8% των δειγμάτων Μανουριού [Papageorgiou et al., 1996-Κατσιμίλη, 2021]

Σε μελέτη, η οποία διεξάχθηκε στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Papageorgiou et al., 1996) χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα τυριά

ορού γάλακτος και συγκεκριμένα Ανθότυρο, Μυζήθρα και Μανούρι, όπου εμβολιάστηκαν το κάθε ένα ξεχωριστά με δύο στελέχη της *Listeria monocytogenes* το *L.monocytogenes* Scott A και *California*, με σκοπό να αναπτυχθεί το βακτήριο σε συγκέντρωση $5,0 \times 10^2$ cfu/g τυριού. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν εννιά παρτίδες τυριού, οι οποίες αρχικά ήταν απαλλαγμένες από το βακτήριο. Στη συγκεκριμένη μελέτη η Μυζήθρα, το Ανθότυρο και το Μανούρι, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σύμφωνα με τα ελληνικά πρότυπα για περιεκτικότητα σε λίπος και υγρασία με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε λίπος της Μυζήθρας, που ήταν χαμηλότερη. Στη συνέχεια τα τυριά αφού εμβολιάστηκαν επωάστηκαν στους 5°C, 12°C και 22°C για 38, 16 και 22 ημέρες αντίστοιχα. Το αρχικό pH της Μυζήθρας, του Ανθότυρου και του Μανουριού ήταν 6,50 6,41 και 6,30 αντίστοιχα. Το λίπος σε ξηρή ουσία ήταν 16,3% στη Μυζήθρα, 71,7% στο Μανούρι και 65,9% στον Ανθότυρο ενώ η περιεκτικότητα σε υγρασία ήταν 68,4 52,2 και 66,9% αντίστοιχα. Ωστόσο, κατά την αποθήκευση το pH των τυριών σε επτά δοκιμές μειώθηκε σταδιακά μεταξύ 5,30 και 4,97. Για το τυρί Μανούρι σε δύο δοκιμές (όταν αποθηκεύτηκε στους 12°C για 16 ημέρες και στους 22°C για 7 ημέρες) οι τιμές του pH παρέμειναν σχετικά σταθερές και πάνω από 6,10.

Όσον αφορά το χρόνο ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στη Μυζήθρα, στον Ανθότυρο και στο Μανούρι, διέφερε ανάλογα με τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ανάπτυξης και για τα δύο στελέχη της *Listeria monocytogenes* στους 5°C κυμάνθηκε μεταξύ 16,16 και 20,16 ώρες και ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν, που παρατηρήθηκε στους 12°C που κυμάνθηκε μεταξύ 5,07 και 5,81 ώρες. Επίσης, ο χρόνος ανάπτυξης στους 22°C ήταν μεταξύ 1,68 και 2,70 ώρες. Ακόμα, οι μέγιστοι πληθυσμοί στους 5°C παρατηρήθηκαν μετά από 24 έως 30 ημέρες και κυμαίνονταν από 7,84 έως 8,62 log cfu/g, ωστόσο στη Μυζήθρα ήταν σημαντικά χαμηλότεροι σε σύγκριση με τον Ανθότυρο και το Μανούρι, ανεξαρτήτως στελέχους. Οι μέγιστοι πληθυσμοί, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στους 12°C, παρατηρήθηκαν μετά από 5 έως 12 ημέρες και ήταν 7,11 έως 8,81 log cfu/g και ήταν σημαντικά χαμηλότεροι στη Μυζήθρα. Τέλος, οι μέγιστοι πληθυσμοί, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στους 22°C, παρατηρήθηκαν σε μόλις 56 έως 72 ώρες και κυμαίνονταν από 6,92 έως

8,59 log cfu/g. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας απέδειξαν την ευκολία με την οποία αναπτύσσεται η *Listeria monocytogenes* στη Μυζήθρα, στον Ανθότυρο και στο Μανούρι ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης. Επομένως, κρίνεται απαραίτητο κατά το χειρισμό και τη συσκευασία των τυριών τυρογάλακτος να τηρούνται όλοι οι κανόνες ορθής υγιεινής προς αποφυγή επιμόλυνσης [Papageorgiou et al, 1996].

Πίνακας 6: Χρόνοι γενεών και μέγιστος πληθυσμός δύο στελεχών *L.monocytogenes* στα τυριά ορού γάλακτος Μυζήθρα, Ανθότυρο και Μανούρι στους 5,12 και 22°C [Papageorgiou et al., 1996]

Storage temperature	<i>L. monocytogenes</i> strain	Cheese	Generation time (h)	Maximum population
			Mean \pm SD	(log CFU/g)
5°C	Scott A	Myzithra	16.16 \pm 2.48	7.97
		Anthotyros	20.16 \pm 4.90	8.32
		Manouri	17.81 \pm 1.75	8.62
	California	Myzithra	16.89 \pm 1.33	7.84
		Anthotyros	18.19 \pm 4.24	8.14
		Manouri	18.48 \pm 3.88	8.07
12°C	Scott A	Myzithra	5.65 \pm 1.36	7.65
		Anthotyros	5.17 \pm 0.86	8.14
		Manouri	5.68 \pm 0.68	8.81
	California	Myzithra	5.35 \pm 0.83	7.11
		Anthotyros	5.07 \pm 0.50	8.69
		Manouri	5.81 \pm 1.32	8.77
22°C	Scott A	Myzithra	1.93 \pm 0.41	8.49
		Anthotyros	1.95 \pm 4.90	8.07
		Manouri	1.79 \pm 0.46	8.59
	California	Myzithra	2.70 \pm 0.61	6.92
		Anthotyros	2.55 \pm 1.00	7.23
		Manouri	1.68 \pm 0.16	8.54

Σε έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Sassari (Spanu et al., 2013) χρησιμοποιήθηκαν από ένα τοπικό τυροκομείο τυριά Ricotta από τρεις διαφορετικές παρτίδες. Τα τυριά χωρίστηκαν σε κατηγορίες και συγκεκριμένα:

α) Δείγματα Ρικότας εμβολιάστηκαν με *Listeria Monocytogenes* και

έπειτα δέχτηκαν θερμική επεξεργασία (HT)

β) Δείγματα Ρικότας εμβολιάστηκαν με *Listeria Monocytogenes* (NC)

γ) Δείγματα Ρικότας εμβολιάστηκαν με στείρο αλατούχο διάλυμα 0,85% (PS)

δ) Δείγματα Ρικότας δεν εμβολιάστηκαν καθόλου (BS)

Τα τυριά εμβολιάστηκαν στο εσωτερικό και στο φλοιό τους με ένα μίγμα από τρία διαφορετικά στελέχη της *Listeria Monocytogenes*, το ένα ήταν το στέλεχος αναφοράς NTCT 10887 ενώ τα άλλα δύο ήταν στελέχη απομονωμένα από το περιβάλλον, που παραγόταν το τυρί. Τα τυριά εμβολιάστηκαν ομοιόμορφα με 2 ml καλλιέργειας *Listeria Monocytogenes* ή με 2 ml στείρο αλατούχο διάλυμα. Για την ανίχνευση και απαρίθμηση της *Listeria Monocytogenes* τα δείγματα τυριού αναλύθηκαν μετά από 6 ώρες και μετά από 2,4 και 6 μήνες και οι χρόνοι δειγματοληψίας ορίστηκαν ως T0, T2, T4 και T6 αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα δείγματα Ρικότας, τα οποία δεν εμβολιάστηκαν καθόλου (BS) σε χρόνο T0 δεν παρουσίασαν ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Από την άλλη τα δείγματα Ρικότας, τα οποία εμβολιάστηκαν με *Listeria Monocytogenes* (NC) στο φλοιό σε χρόνο T0 παρουσίασαν ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε επίπεδα $6.05 \pm 0.49 \log_{10} \text{ cfu/g}$. Μάλιστα, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξήθηκε κατά τους δύο πρώτους μήνες φτάνοντας $8.07 \pm 1.13 \log_{10} \text{ cfu/g}$ και τελικά παρέμεινε σταθερός. Ακόμα, τα δείγματα Ρικότας, τα οποία εμβολιάστηκαν με *Listeria Monocytogenes* και έπειτα δέχτηκαν θερμική επεξεργασία (HT) δεν παρουσίασαν ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σε όλα τα δείγματα τυριού το εσωτερικό τους ήταν αρνητικό στην ανίχνευση του μικροοργανισμού. Όσον αφορά το pH και την τιμή ενεργότητας ύδατος, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν μεταβλήθηκαν κατά πολύ. Συνολικά απομονώθηκαν 115 στελέχη *Listeria Monocytogenes* από 23 θετικά δείγματα. Από το σύνολο των στελεχών, τα 25 ήταν το στέλεχος αναφοράς NTCT 10887, ενώ τα υπόλοιπα ήταν απομονωμένα στελέχη από το περιβάλλον παραγωγής του τυριού, επομένως το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι στελέχη προσαρμοσμένα στο περιβάλλον παρασκευής του τυριού είναι

πιθανότερο να αναπτυχθούν στο προϊόν. Συμπερασματικά η Ricotta είναι ένα τυρί τυρογάλακτος ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria Monocytogenes* σε επίπεδα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο στη δημόσια υγεία, ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι έπειτα από κατάλληλη θερμική επεξεργασία, όπως είναι η παστερίωση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού [Spanu et al., 2013]

Πίνακας 7: Πληθυσμός της *Listeria Monocytogenes* στο εσωτερικό και στο φλοιό της Ρικότας σε χρόνο T [Spanu et al., 2013]

Δείγματα		T0	T2	T4	T6	T12
Φλοιός	NC	6,05±0,49	8,07±1,13	8,18±2,00	8,27±0,72	8,49±0,62
	HT	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	PS	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Εσωτερικό	NC	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	HT	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	PS	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

3.2.Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) είναι μία ομάδα Gram θετικών βακτηρίων, μη σπορογόνα, σχήματος κόκκου ή ραβδίου, αρνητικά στην

καταλάση και προαιρετικά αναερόβια. Ακόμα, στην πλειοψηφία τους στερούνται κίνησης και η αναλογία γουανίνης + κυτοσίνης στο χρωμόσωμά τους δεν ξεπερνάει το 55%. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι μεταξύ 30-40°C και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον [Khalisanni, 2011-Klein et al., 1998]. Περιλαμβάνουν τα γένη:

- *Lactobacillus* (ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά)
- *Lactococcus* (ομοζυμωτικά)
- *Leuconostoc* (ετεροζυμωτικά)
- *Pediococcus* (ομοζυμωτικά)
- *Streptococcus* (ομοζυμωτικά)
- *Enterococcus* (ετεροζυμωτικά)
- *Carnobacterium* (ετεροζυμωτικά)
- *Vagococcus* (ομοζυμωτικά)

Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν τη γλυκόζη και τη λακτόζη ως πηγές άνθρακα με σκοπό την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε υψηλό ποσοστό (85%) σε αντίθεση με τα ετεροζυμωτικά, που εκτός από γαλακτικό οξύ (σε ποσοστό 50%) παράγουν και αιθανόλη, γλυκερόλη, οξικό οξύ και CO₂ [Ρουκά, 2009]. Τα πιο συχνά επιλεγμένα γένη είναι το *Lactococcus* (για το γάλα), το *Lactobacillus* (για το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά, τα δημητριακά), το *Leuconostoc* (για το γάλα και τα λαχανικά), το *Pediococcus* (για τα λαχανικά και το κρέας) και τέλος το *Streptococcus* (για το γάλα) [Settani & Moschetti, 2010]. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια συναντώνται στην αναπνευστική και εντερική οδό του ανθρώπου και των ζώων, στο περιβάλλον, στα νερά των υπονόμων και στα αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά [Pfeiler & Klaenhammer, 2007]. Ακόμα, υπάρχουν στη φυσική χλωρίδα του γάλακτος προερχόμενα από την επιφάνεια του μαστού, τον εξοπλισμό του αρμέγματος καθώς και από το περιβάλλον του εργοστασίου των γαλακτοκομικών προϊόντων. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τυροκομία καθώς ορισμένα γένη συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης, ενώ κάποια άλλα εμπλέκονται στην ωρίμανση του τυριού. Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση ορίζονται ως οξυγαλακτικά βακτήρια εκκινητές (SLAB) και στη δεύτερη ως οξυγαλακτικά βακτήρια μη εκκινητές (NSLAB) [Settani & Moschetti, 2010].

Η ενακτήρια καλλιέργεια είναι ένα μικροβιακό παρασκεύασμα, το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον ένα μικροοργανισμό και η χρήση της σε τρόφιμα χαρακτηρίζεται ως ασφαλής [Bertozzi & Panari, 1993]. Οι καλλιέργειες εκκίνησης (SLAB) προστίθενται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και έχουν ως στόχο την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης. Μέσω της παραγωγής του γαλακτικού οξέος από τα σάκχαρα προκαλούν πτώση του pH και αποτέλεσμα αυτού είναι το τελικό προϊόν να αποκτά καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ως προς τη δομή, τη γεύση, την υφή, το άρωμα και να ευνοείται η μικροβιακή σταθερότητα του τροφίμου [Caplise & Fitzgerald, 1999]. Η ταξινόμηση των καλλιιεργειών εκκίνησης πραγματοποιείται ως εξής [Fox et al., 2017]:

- Μεσόφιλες καλλιέργειες
Οι μεσόφιλες καλλιέργειες έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ~30°C και περιλαμβάνουν κυρίως τα στελέχη *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και/ή *Leuconostoc* sp.
- Θερμόφιλες καλλιέργειες
Οι θερμόφιλες καλλιέργειες έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ~42°C και περιλαμβάνουν κυρίως τα στελέχη *Streptococcus thermophiles* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ή *Lactobacillus helveticus*.

Η ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων μη εκκινητών είναι ιδιαίτερα ετερογενής και περιλαμβάνει κυρίως τα στελέχη *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* κ.α [Settani & Moschetti, 2010]. Τα NSLAB ζυμώνουν τις εξόζες ομοζυμωτικά σε γαλακτικό οξύ και τις πεντόζες ετεροζυμωτικά σε γαλακτικό και οξικό οξύ [Fox et al., 2017]. Ο πληθυσμός των SLAB κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι υψηλός, ωστόσο σταδιακά μειώνεται σε αντίθεση με τα NSLAB, που ενδέχεται να αυξηθεί [Settani & Moschetti, 2010].

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πέρα από την ικανότητά τους να προκαλούν τη ζύμωση των τροφίμων χρησιμοποιούνται και ως μέσο συντήρησης, καθώς

παρεμποδίζουν την ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της μείωσης του pH κατά τη ζύμωση. Επίσης, χαρακτηρίζονται για την αντιμικροβιακή τους δράση, αφού παράγουν διάφορες ενώσεις, οι οποίες συμβάλλουν στην καταπολέμηση της μικροβιακής μόλυνσης. Συγκεκριμένα, παράγουν οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, φαινυλλακτικό οξύ, καπροϊκό οξύ, οξικό οξύ), υπεροξειδίο του υδρογόνου, διακετύλιο, διοξειδίο του άνθρακα, αιθανόλη, ρευτερίνη, ρευτερικυκλίνη και βακτηριοσίνες [Leroy & Vuyst, 2004].

Οι βακτηριοσίνες είναι μικρά πεπτίδια, που παράγονται από ένα πλήθος βακτηρίων, ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη δράση άλλων βακτηρίων. Ωστόσο, εφόσον παραχθούν από θετικά κατά Gram βακτήρια τότε δεν επιδρούν στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και αντίστροφα [Fox et al., 2017]. Ακόμα, είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως και κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες με βάση τη θερμοανθεκτικότητά τους, τη δομή τους και το μοριακό τους βάρος. Οι βακτηριοσίνες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία 2 είναι και οι πιο καλά μελετημένες και έχουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα, το ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή των βακτηριοσινών είναι το pH, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών έχουν κυρίως οι βακτηριοσίνες σακακίνη Α, μεσεντεροσίνη, πεδιοσίνη, νισίνη κ.α. [Metaxopoulos et al., 2003].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1.Στόχος

Το πειραματικό μέρος της εργασίας είχε ως στόχο τη μελέτη της ανταγωνιστικής χλωρίδας και συγκεκριμένα των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, που ενδέχεται να αναπτυχθούν στα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία παράγονται στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, καταμετρήθηκαν οι αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων αρχικά και έπειτα από δύο μήνες, αφού είχαν συντηρηθεί τα τυριά τυρογάλακτος σε συσκευασία Vakuum στους 0-4°C.

4.2.Δείγματα-Δειγματοληψία

Για το σκοπό της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά δείγματα τυριών τυρογάλακτος, τα οποία αφού αγοράστηκαν διατηρήθηκαν υπό ψύξη (4°C) έως την ανάλυσή τους. Τα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία εξετάστηκαν ήταν:

Πίνακας 8: Τυριά τυρογάλακτος, τα οποία αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη

Όνομασία τυριού	pH	Χαρακτηριστικά
C1: Μυζήθρα	5,04	ημ.παραγ. 23.7.21 ημ.συσκευ. 23.9.21 ημ.λήξης 25.7.22
C2:Μυζήθρα	4,66	ημ.παραγ. 29.5.21 ημ.συσκευ. 29.7.21 ημ.λήξης 30.5.22
C3:Ανθότυρο	5,23	ημ.παραγ. 23.11.21 ημ.λήξης 18.12.21
C4:Ανθότυρο	6,4	ημ.συσκευ. 9.11.21 ημ.λήξης 8.1.22

C5:Ανθότυρο	5,21	ημ. παραγ. 15.11.21 ημ. λήξης 15.12.21
C6:Ανθότυρο	5,45	ημ. παραγ. 1.12.21 ημ. λήξης 1.1.22

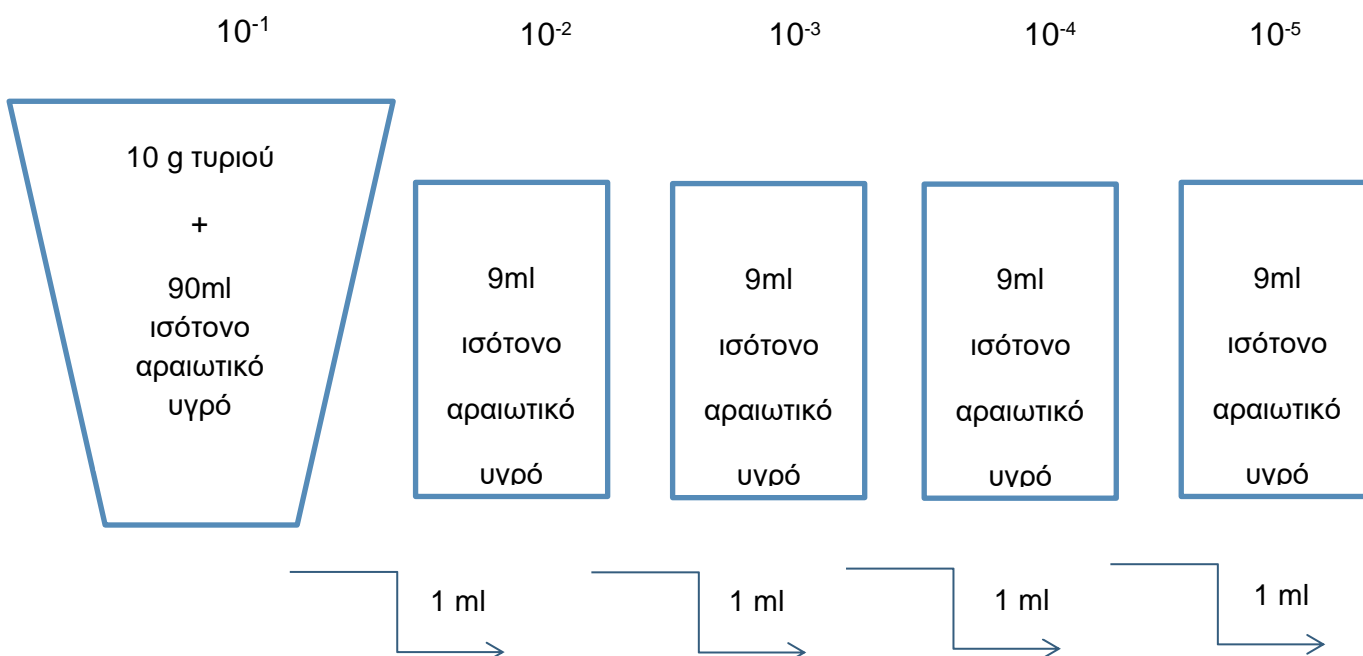
4.3.Ομογενοποίηση-Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

Βασικό βήμα για την απελευθέρωση και στη συνέχεια καταμέτρηση των μικροοργανισμών αποτελεί η ομογενοποίηση των δειγμάτων σε αραιωτικό υγρό, ώστε η κατανομή τους να γίνει όσο το δυνατόν ομοιόμορφα.

Από κάθε δείγμα τυριού τυρογάλακτος πάρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 10 g (το υπόλοιπο μέρος του τυριού συσκευάστηκε υπό κενό και διατηρήθηκε υπό ψύξη στους 0-4°C) με αποστειρωμένη σπάτουλα και μεταφέρθηκαν σε σακούλα stomacher, δηλαδή αποστειρωμένη πλαστική σακούλα κατάλληλη για ομογενοποίηση μικροβιολογικών δειγμάτων. Η σακούλα stomacher τοποθετήθηκε σε ζυγό, ώστε να γίνει με ακρίβεια η μέτρηση. Έπειτα προστέθηκαν 90 ml ισότονου αραιωτικού υγρού και η σακούλα stomacher τοποθετήθηκε στο BagMixer για 30-60 sec έως ότου ομογενοποιηθεί το δείγμα και από εκεί προέκυψε η πρώτη αραιώση 10^{-1} . Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 4 falcons για κάθε δείγμα τυριού, τα οποία πρώτα είχαν αποστειρωθεί στον υγρό κλίβανο και τοποθετήθηκαν σε στατώ. Ο υγρός κλίβανος ή αυτόκαυστο είναι το μέσο, στο οποίο λαμβάνει χώρα η υγρή αποστείρωση των υλικών και του εξοπλισμού με την εφαρμογή υπέρθερμων ατμών, σε υψηλή πίεση. Έπειτα, σε κάθε falcon προστέθηκαν 9 ml ισότονου αραιωτικού υγρού. Με μία αυτόματη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου πάρθηκαν από τη σακούλα stomacher 1ml του ομογενοποιημένου δείγματος, με προσοχή ώστε το άκρο της πιπέτας να μην ακουμπήσει τα τοιχώματα της σακούλας stomacher και μεταφέρθηκαν στο πρώτο falcon με σκοπό την παρασκευή της δεκαδικής αραιώσης 10^{-2} . Για κάθε καινούργια αραιώση τα πλαστικά ρύγχη (tips) της πιπέτας αφαιρούνταν και τοποθετούνταν καινούργια, τα οποία ήταν αποστειρωμένα. Έπειτα τοποθετήθηκε το falcon στο Vortex για μερικά δευτερόλεπτα και με μία πιπέτα μεταφέρθηκαν διαδοχικά στα επόμενα falcons 1

ml του ομογενοποιημένου δείγματος για την παρασκευή των περαιτέρω δεκαδικών αραιώσεων (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Η πορεία φαίνεται στο σχήμα 4.1.

Για την παρασκευή του ισότονου αραιωτικού υγρού η διαδικασία ήταν η εξής: Σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια σιφωνίου 1,25 ml μητρικού διαλύματος και προστέθηκε απιονισμένο νερό έως τη χαραγή. Έπειτα το μείγμα αναδεύθηκε καλά και μεταφέρθηκε σε γυάλινη φιάλη προς διευκόλυνση, όπου με τη βοήθεια πιπέτας προστέθηκαν 9 ml του ισότονου αραιωτικού υγρού σε σωληνάκια. Έπειτα όλα τα σωληνάκια αποστειρώθηκαν στον υγρό κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά.



Σχήμα 4.1 : Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

4.4. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος-Διανομή σε τρυβλία

Ως θρεπτικό υπόστρωμα ή υλικό νοείται κάθε υγρό ή στερεό μέσο, το οποίο είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών λόγω των θρεπτικών συστατικών, που περιέχει. Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να είναι είτε φυσικό πάνω ή μέσα, στο οποίο ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται είτε τεχνητό, το οποίο παρασκευάζεται κατάλληλα ανάλογα με τις θρεπτικές απαιτήσεις του μικροοργανισμού, του οποίου είναι επιθυμητή η ανάπτυξη.

Ακόμα, το θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι στερεό ή υγρό, ωστόσο όλα τα θρεπτικά υλικά αρχικά είναι υγρά και με την προσθήκη ενός στερεοποιητικού παράγοντα γίνονται στερεά. Συνήθως ως στερεοποιητικός παράγοντας χρησιμοποιείται το άγαρ, το οποίο είναι ένας πολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα θαλάσσια φύκη. Επίσης, τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα έχουν το πλεονέκτημα ότι δίνουν τη δυνατότητα απομόνωσης μεμονωμένων αποικιών. Για το σκοπό του πειράματος παρασκευάστηκαν MRS Broth και MRS Agar, τα οποία είναι θρεπτικά υποστρώματα και η πειραματική διαδικασία, η οποία ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- MRS Broth

Το MRS Broth είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και δεν πήζει, επομένως είναι υγρό.

Σε ζυγό τοποθετήθηκε επάνω ποτήρι ζέσεως με σκοπό τη μέτρηση με ακρίβεια 55 gr MRS Broth της εταιρείας Condalab. Ο ζυγός αρχικά μηδενίστηκε με το ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια προστέθηκε προσεκτικά η σκόνη MRS Broth έως ότου η ένδειξη του ζυγού να είναι ίση με την απαιτούμενη ποσότητα. Έπειτα, προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού, το οποίο ογκομετρήθηκε με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου και το μείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου λιώσει. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα το θρεπτικό υπόστρωμα αναδεύονταν καλά με μία γυάλινη ράβδο. Αφού έλιωσε το MRS Broth διανεμήθηκε ομοιόμορφα σε μπουκαλάκια και τελικό βήμα αποτέλεσε η αποστείρωσή τους στον υγρό κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά.

- MRS Agar

Το MRS Agar είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των βακτηρίων και πήζει, επομένως είναι στερεό.

Σε ζυγό τοποθετήθηκε επάνω ποτήρι ζέσεως με σκοπό τη μέτρηση με ακρίβεια 64 gr MRS Agar της εταιρείας labkem. Ο ζυγός αρχικά μηδενίστηκε με το ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια προστέθηκε προσεκτικά η σκόνη MRS Agar έως ότου η ένδειξη του ζυγού να είναι

ίση με την απαιτούμενη ποσότητα. Έπειτα, προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού, το οποίο ογκομετρήθηκε με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου και το μείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου λιώσει. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα το θρεπτικό υπόστρωμα αναδεύεται καλά με μία γυάλινη ράβδο. Αφού έλιωσε διανεμήθηκε ομοιόμορφα σε μπουκαλάκια και τελικό βήμα αποτέλεσε η αποστείρωσή τους στον υγρό κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά.

Το MRS Broth, το οποίο είναι υγρό θρεπτικό υπόστρωμα έπειτα από την αποστείρωσή του διατηρείται, αφού βιδωθούν καλά τα καπάκια, στο ψυγείο έως ότου χρησιμοποιηθεί. Από την άλλη το MRS Agar, το οποίο είναι στερεό θρεπτικό υπόστρωμα πριν τη χρήση του διανέμεται σε κατάλληλους περιέκτες. Κατά την πειραματική διαδικασία πάρθηκαν 10 τρυβλία Petri για κάθε ένα από τα τυριά τυρογάλακτος (2 για κάθε αραίωση), τα οποία ήταν ήδη αποστειρωμένα από τον κατασκευαστή και αριθμήθηκαν κατάλληλα. Η διανομή του MRS Agar στα τρυβλία Petri πραγματοποιήθηκε όταν η θερμοκρασία του ήταν περίπου 45°C και η διαδικασία έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες κοντά σε φλόγα, που δημιουργήθηκε από το λύχνο Bunsen. Τα τρυβλία Petri ανακινήθηκαν με σκοπό το θρεπτικό υλικό να καταλάβει όλη την επιφάνεια του. Τέλος, αφήθηκαν σε ηρεμία μέχρι τη μείωση της θερμοκρασίας των θρεπτικών υποστρωμάτων όπου και στερεοποιήθηκαν.

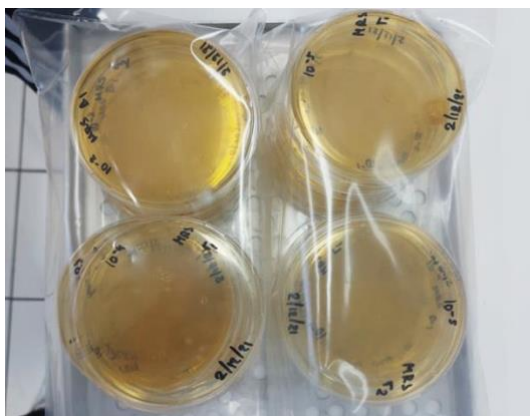


Φωτογραφία 4.1: Στερεοποίηση MRS Agar μέσα σε τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες

4.5.Εμβολιασμός

Εμβολιασμός καλείται η διαδικασία εισαγωγής μικροοργανισμών σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό τη δημιουργία μίας καλλιέργειας.

Αφού στερεοποιήθηκε το MRS Agar στα τρυβλία, εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής επίστρωσης των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, από κάθε δεκαδική αραίωση με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας μεταφέρθηκαν 0,1ml ασηπτικά και τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του στέρεου θρεπτικού υποστρώματος. Έπειτα το επόμενο βήμα ήταν η επιφανειακή επίστρωση με γυάλινη ράβδο, η οποία πρώτα εμβαπτίστηκε σε αιθανόλη και πυρακτώθηκε στη φλόγα του λύχνου Bunsen. Για να μπορέσουν οι μικροοργανισμοί να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν πέρα από το θρεπτικό υπόστρωμα χρειάζονται και σωστές συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού. Επομένως, μετά όλα τα τρυβλία συσκευάστηκαν υπό κενό με σκοπό τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Τέλος, τοποθετηθήκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C.



Φωτογραφία 4.2 : Τοποθέτηση τρυβλίων Petri σε κατάλληλες σακούλες και έπειτα σε συσκευασία υπό κενό με σκοπό τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών

4.6.Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών

Η καταμέτρηση των οξυγαλακτικών αποικιών, πραγματοποιήθηκε στο colony counter. Το colony counter είναι ένα όργανο, που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των αποικιών των βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών και διαθέτει κατάλληλο φωτισμό και μεγεθυντικό φακό για καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Οι αποικίες, οι οποίες αριθμήθηκαν ήταν όλες οποιουδήποτε μεγέθους ενώ τα τρυβλία, τα οποία τελικά επιλέχθηκαν μετά την αρίθμηση ήταν εκείνα της αραιώσης, που περιείχαν 30-300 αποικίες. Τα αποτελέσματα, ήταν τα εξής:

Πίνακας 9: Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
C1	>300 >300	>300 >300	>300 >300	148 109	36 16
C2	>300 >300	>300 >300	78 91	5 8	- 1
C3	>300 >300	>300 >300	156 111	7 26	- 18

C4	>300	>300	>300	113	38
	>300	>300	>300	214	30
C5	>300	>300	>300	>300	180
	>300	>300	>300	>300	400
C6	>300	>300	>300	116	40
	>300	>300	>300	134	51

Ο υπολογισμός του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τον εξής τρόπο:

- Εάν μόνο ένα τρυβλίο είχε μετρήσιμες 30-300 αποικίες, τότε ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάστηκε με τον αντίστροφο της αραιώσης.
- Εάν όλα τα τρυβλία είχαν μετρήσιμες περισσότερες από 300 αποικίες τότε η αρίθμηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τετραγωνισμένης κυκλικής οθόνης. Στην περίπτωση, που υπάρχουν μετρήσιμες περισσότερες από 100 αποικίες ανά cm² τότε ο αριθμός των αποικιών εκφράζεται ως μεγαλύτερο του 6500, επί το συντελεστή της μεγαλύτερης αραιώσης.
- Εάν δύο τρυβλία από την ίδια δεκαδική αραιώση είχαν μετρήσιμες 30-300 αποικίες, τότε υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποικιών και πολλαπλασιάστηκε με τον αντίστροφο της αραιώσης.
- Εάν τέσσερα τρυβλία από δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις είχαν μετρήσιμες 30-300 αποικίες τότε εφαρμόστηκε ο ακόλουθος μαθηματικός τύπος:

$$\text{τύπος: } N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad \text{όπου}$$

Σc = άθροισμα των αποικιών σε όλα τα τρυβλία

V = όγκος ενοφθαλμίσματος

n_1 = αριθμός τρυβλίων της μικρότερης αραιώσης

n_2 = αριθμός τρυβλίων της μεγαλύτερης αραιώσης

d = βαθμός της μικρότερης αραιώσης

Με βάση τα παραπάνω ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος ήταν:

Πίνακας 10: Αριθμός οξυγαλακτικών αποικιών

Δείγμα	Αριθμός οξυγαλακτικών αποικιών
C1	$1,3 \cdot 10^6$ cfu/ml
C2	$8,5 \cdot 10^4$ cfu/ml
C3	$1,3 \cdot 10^5$ cfu/ml
C4	$1,8 \cdot 10^7$ cfu/ml
C5	$2,9 \cdot 10^7$ cfu/ml
C6	$1,6 \cdot 10^7$ cfu/ml



Φωτογραφία 4.3: Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών

4.7.Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών έπειτα από 2 μήνες

Έπειτα από δύο μήνες και αφού τα τυριά τυρογάλακτος διατηρήθηκαν σε συσκευασία κενού στους 0-4°C, αφαιρέθηκαν από εκεί με σκοπό να καταμετρηθούν οι αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το pH των δειγμάτων μετρήθηκε με τη βοήθεια πεχάμετρου, όργανο κατάλληλο για τον προσδιορισμό του pH. Τα αποτελέσματα της μέτρησης ήταν τα εξής:

- C1 → pH=4,28
- C2 → pH=3,90
- C3 → pH=4,59
- C4 → pH=5,10
- C5 → pH=4,65
- C6 → pH=4,90

Η διαδικασία, που ακολούθησε ήταν η ίδια με εξαίρεση τον τρόπο συσκευασίας των τρυβλίων με σκοπό τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Συγκεκριμένα, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε ανοξικό δοχείο, το οποίο είναι κατάλληλο για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.



Φωτογραφία 4.4: Ανοξικό δοχείο

Όσον αφορά τον αριθμό των οξυγαλακτικών αποικιών έπειτα από την καταμέτρησή τους με τη βοήθεια του colony counter τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Πίνακας 11 : Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών μετά από δύο μήνες

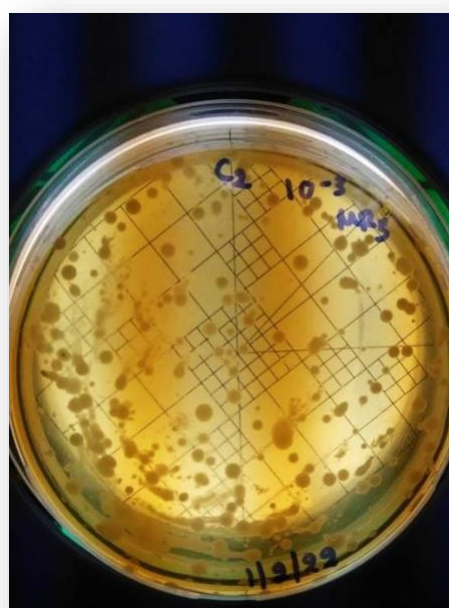
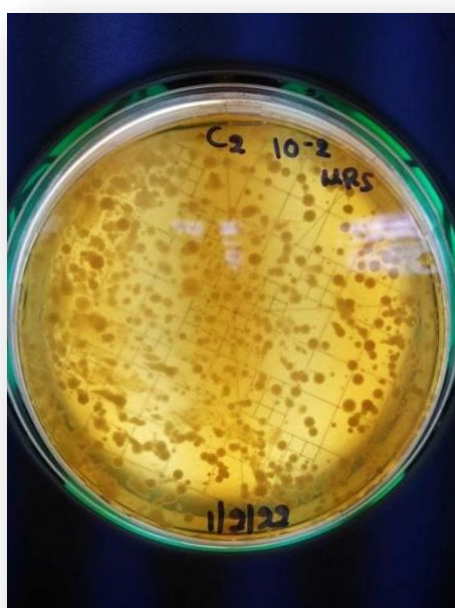
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
C1	>300	>300	>300	>300 >300	>300 163
C2	>300	>300	>300	>300 >300	>300 107 90
C3	>300	>300	>300	>300 >300	>300 30 72
C4	>300	>300	>300	>300 >300	>300 190 250
C5	>300	>300	>300	>300 >300	>300 >300
C6	>300	>300	>300	>300 >300	>300 >300

Ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος σύμφωνα με τη διαδικασία υπολογισμού των οξυγαλακτικών αποικιών ήταν:

Πίνακας 11: Αριθμός οξυγαλακτικών αποικιών έπειτα από δύο μήνες

Δείγμα	Αριθμός οξυγαλακτικών αποικιών έπειτα από δύο μήνες
C1	$1,6 \cdot 10^7$ cfu/ml

C2	$9,9 \cdot 10^6$ cfu/ml
C3	$5,1 \cdot 10^6$ cfu/ml
C4	$2,2 \cdot 10^7$ cfu/ml
C5	$>6,5 \cdot 10^8$ cfu/ml
C6	$>6,5 \cdot 10^8$ cfu/ml



Φωτογραφία 4.5: Καταμέτρηση οξυγαλακτικών αποικιών

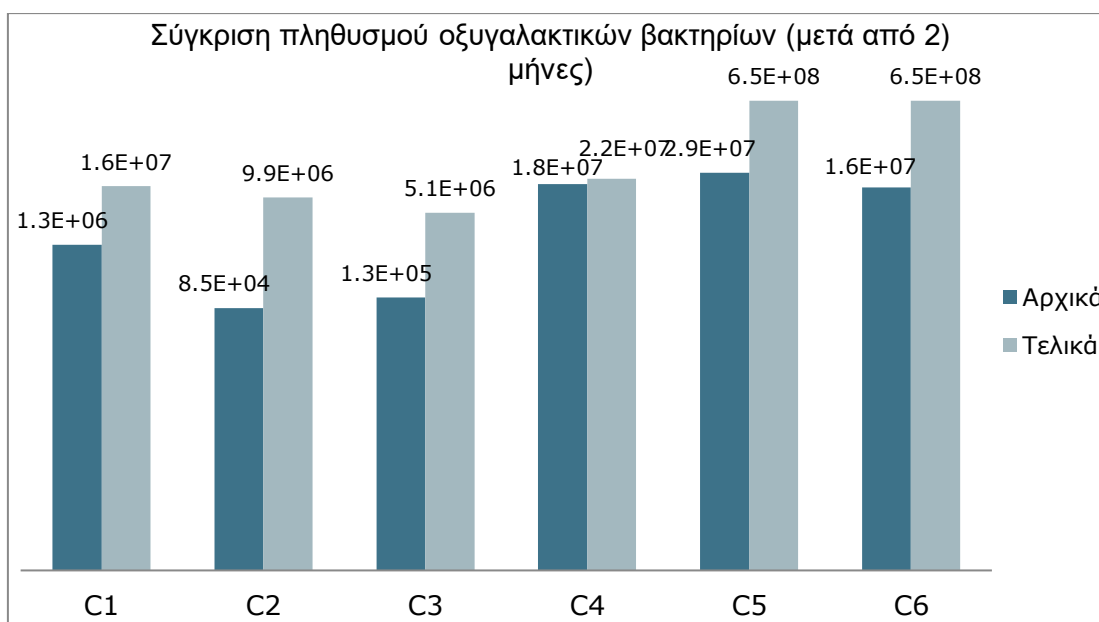
5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων έπειτα από δύο μήνες και αφού είχαν συντηρηθεί τα τυριά τυρογάλακτος σε συσκευασία κενού στους 0-4°C ήταν ραγδαία. Ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων του γαλακτικού

οξύς ήταν σημαντικά μεγαλύτερος για όλα τα δείγματα τυριού στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Πιο αναλυτικά ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα τυριά τυρογάλακτος αρχικά και τελικά ήταν:

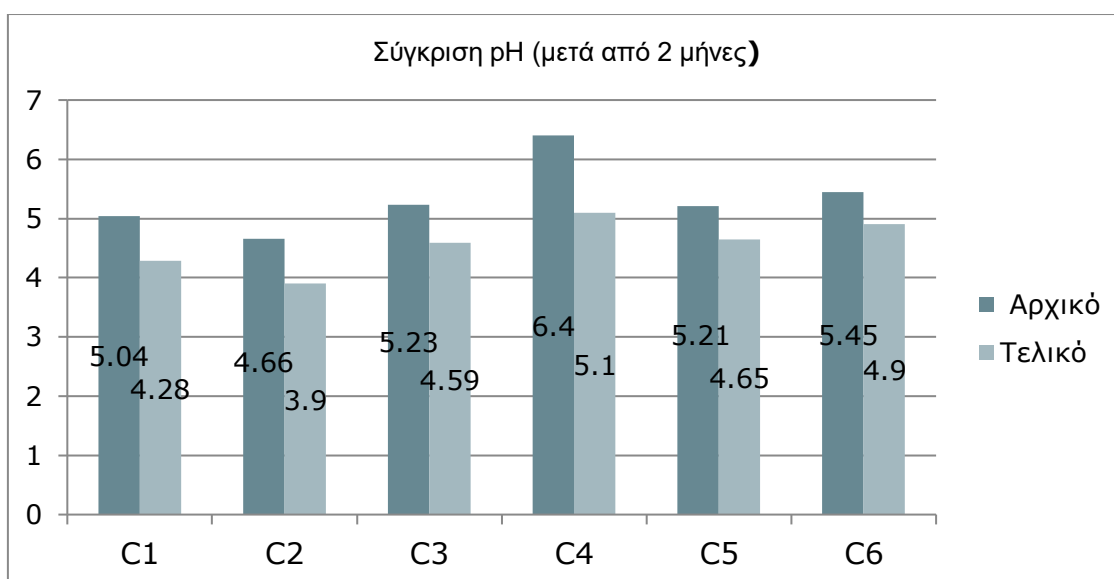
Πίνακας 12: Σύγκριση οξυγαλακτικών αποικιών αρχικά και τελικά

Δείγμα	Αρχικά	Τελικά
C1	$1,3 \cdot 10^6$ cfu/ml	$1,6 \cdot 10^7$ cfu/ml
C2	$8,5 \cdot 10^4$ cfu/ml	$9,9 \cdot 10^6$ cfu/ml
C3	$1,3 \cdot 10^5$ cfu/ml	$5,1 \cdot 10^6$ cfu/ml
C4	$1,8 \cdot 10^7$ cfu/ml	$2,2 \cdot 10^7$ cfu/ml
C5	$2,9 \cdot 10^7$ cfu/ml	$>6,5 \cdot 10^8$ cfu/ml
C6	$1,6 \cdot 10^7$ cfu/ml	$>6,5 \cdot 10^8$ cfu/ml



Διάγραμμα 4 : Σύγκριση του αρχικού και του τελικού πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μάλιστα, το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύεται και από τις τιμές του pH, οι οποίες μειώθηκαν σε όλα τα δείγματα τυριών τυρογάλακτος, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος λόγω της ικανότητάς τους να ζυμώνουν τα σάκχαρα και να παράγουν γαλακτικό οξύ παράλληλα επιφέρουν και μείωση του pH. Η πτώση του pH για τα δείγματα, τα οποία αναλύθηκαν ήταν η εξής:



Διάγραμμα 5 : Σύγκριση του αρχικού pH και του τελικού pH των δειγμάτων

6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τυριά τυρογάλακτος είναι τυριά με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και χαμηλή οξύτητα (pH περίπου 6) και αποτελούν ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Listeria monocytogenes*. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH και αυτό τους καθιστά ιδιαίτερα επικινδύνους. Συγκεκριμένα, οι τιμές του pH για τους παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ενδέχεται να αναπτυχθούν στα τυριά τυρογάλακτος είναι:

- *Escherichia coli* → 4-4,5 με βέλτιστες τιμές ανάπτυξης 6-7
- *Yersinia enterocolitica* → 4,2-9,5 με βέλτιστες τιμές ανάπτυξης 7-8
- *Staphylococcus aureus* → 4-9,8 με βέλτιστες τιμές ανάπτυξης 6-7
- *Bacillus cereus* → 4,9-9,3 με βέλτιστη τιμή ανάπτυξης 7,2
- *Listeria monocytogenes* → 4,1-9,4 με βέλτιστες τιμές ανάπτυξης 6-8

Επίσης, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία εξετάστηκαν αυξήθηκε σημαντικά έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Το δείγμα C2 είχε το μικρότερο αρχικό pH και το μικρότερο αρχικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων και έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας ο πληθυσμός αυξήθηκε κατά πολύ. Το δείγμα C4 είχε το μεγαλύτερο αρχικό pH και η μείωση του έως το τέλος του πειράματος ήταν η μεγαλύτερη, ωστόσο ο αριθμός του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν μεταβλήθηκε κατά πολύ. Ακόμα, τα δείγματα C5 και C6, τα οποία είχαν υψηλούς αρχικούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων έως το τέλος της μελέτης αυξήθηκαν ακόμα περισσότερο με αποτέλεσμα η καταμέτρησή τους να καταστεί δύσκολη.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πέρα από την ικανότητα τους να ζυμώνουν τα σάκχαρα και να παράγουν γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιούνται και ως ανταγωνιστική χλωρίδα στα τυριά, καθώς δρουν έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, που ενδέχεται να αναπτυχθούν. Ακόμα, μέσω της παραγωγής του γαλακτικού οξέος προκαλείται και πτώση του pH. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία το pH μειώθηκε σημαντικά σε τιμές, οι

οποίες είναι ικανές να εμποδίσουν την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων. Επομένως, σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές pH για την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων αλλά και σύμφωνα με το τελικό pH των τυριών τυρογάλακτος, που αναλύθηκαν σε περίπτωση κάποιας επιμόλυνσης θα ήταν δύσκολο να αναπτυχθεί κάποιος μικροοργανισμός από τους παραπάνω. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο, καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε συνάρτηση με τους κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής θα μπορούσαν να προσδώσουν στο τελικό προϊόν πέρα από καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη ασφάλεια.

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Άρθρο Περιοδικού

Asensio Claudia M., Gallucci Nicolas, Oliva María de las Mercedes, Demo Mirta S., Grosso Nelson R. (2014). “*Sensory and bio-chemical preservation of ricotta cheese using natural products*”. International Journal of Food Science and Technology, 49(12), 2692-2702

Bertozzi L., Panari G. (1993). “*Cheese with Appellation d'origine contrôlée (AOC): Factors that affect quality*”. International Dairy Journal, 3(4-6), 297-312

Caplise Elizabeth, Fitzgerald Gerald F. (1999). “*Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*”. International Journal of Food Microbiology, 50(1-2), 131-149

Charimba G., Hugo C.J., Hugo A. (2010), “*The growth, survival and thermal inactivation of Escherichia coli O157:H7 in a traditional South African sausage*”. Meat Science, 85(1), 89 – 95

Govaris A., Koidis P., Papatheodorou K. (2001). “*The fate of Escherichia coli O157:H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12°C*”. Food Microbiology, 18(5), 565-570

Khalisanni Khalid. (2011). “*An overview of lactic acid bacteria*”. International Journal of Biosciences, 1(3), 1-13

Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. (1998). “*Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*”. International journal of food microbiology, 41(2), 103-125

Latiful Bari Md., Anwar Hossain M., Kenji Isshiki, Dike Ukuku. (2011). “*Behavior of Yersinia enterocolitica in Foods*”. Journal of pathogens, 1-13

Leroy Frederic, Vuyst Luc. (2004). “*Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*”. Trends in Food Science & Technology, 15(2), 67-78

Metaxopoulos J., Mataragas M., Drosinos E.H. (2003). “*Bacteriocins of lactic*

acid bacteria and their application on food as biopreservatives. (II)". Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 54(1), 69-77

Papageorgiou Demetrios K., Bori Mina, Mantis Antonios.(1996). "*Growth of Listeria monocytogenes in the Whey Cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during Storage at 5, 12, and 22°C*". Journal of Food Protection, 59(11), 1193-1199

Pfeiler Erika A., Klaenhammer Todd R.. (2007). "*The genomics of lactic acid bacteria*". Trends in Microbiology, 15(12), 546-553

Pintado M. E., Macedo A. C., Malcata F. X..(2001). "*Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses*". Food Science and Technology International, 7(2), 105-116

Ryan Michael P., Walsh Gary. (2016). "*The biotechnological potential of whey*". Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 15, 479-498

Settanni Luca, Moschetti Giancarlo. (2010). "*Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits*". Food Microbiology, 27(6), 691-697

Siso Gonzalez M.I.(1996). "*The biotechnological utilization of cheese whey: a review*". Bioresource Technology, 57(1), 1-11

Spanu C., Spanu V., Pala C., Viridis S., Scarano C., Santis E.P.L. De.(2013). "*Evaluation of a post-lethality treatment against Listeria monocytogenes on Ricotta salata cheese*". Food Control, 30(1), 200-205

Strawn L. K., Danyluk M. D. (2010), "*Fate of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas*". International Journal of Food Microbiology, 138(1-2), 78 – 84

Tirloni Erica, Ghelardi Emilia, Celandroni Francesco, Bernardi Cristian, Casati Riccardo, Rosshaug Per Sand, Simone Stella.(2017). "*Bacillus cereus in fresh ricotta: Comparison of growth and Haemolysin BL production after artificial contamination during production or post processing*". Food Control, 79, 272-278

Βιβλία

- Ανυφαντάκης Εμμανουήλ Μ. (1993). *“Τυροκομία”*. Εκδόσεις Σταμούλης
- Ανυφαντάκης Εμμανουήλ Μ. (2004). *“Τυροκομία: χημεία, φυσικοχημεία, μικροβιολογία”*. Εκδόσεις Σταμούλης
- Ζερφυρίδης Γρηγόρης Κ. (2001). *“Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος: τυροκομία”*. Εκδόσεις Γιαχούδη Γιαπούλη
- Κεχαγιάς Χρήστος, Τσάκαλη Ευσταθία. (2020). *“Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων”*. NewTech Pub. Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών
- Κοτζεκίδου Ρουκά Παρθένα. (2009). *“Μικροβιολογία Τροφίμων και Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων”*. Εκδόσεις Γιαχούδη
- Κυριακόπουλος. (1995). *“Η τυροκομία στην πράξη”*. Εκδόσεις Τρίαινα
- Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φετούρης Δ., Αγγελίδης Α. (2015). *“Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του”*. Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη Α.Ε.
- Τυμπής Δημήτριος, Πετράκης Ελευθέριος, Κοντελής Σπυρίδων. (2016). *“ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ –Μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων”*. Εκδόσεις Δίσιγμα
- Fox Patrick F., Guinee Timothy P., Cogan Timothy M., McSweeney Paul L.H. (2017). *“Fundamentals of Cheese Science”*. Springer Publishing
- Papademas Photis, Bintsis Thomas. (2018). *“Global Cheese Making Technology: Cheese Quality and Characteristics ”*.

Διατάξεις Αρμόδιων Οργανισμών και Φορέων

- ΕΦΕΤ.(2012). *“Γενικός Οδηγός για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις”*. Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ.2073/2005. *“Μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα”*.

Επίσημη Εφημερίδα της Ένωσης

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.(2014). “*Τυροκομικά Προϊόντα*”. Υπουργείο Δικαιοσύνης, Διαφάνειας και Ανθρωπίνων Δικαιωμάτων

Codex Alimentarius.(1971). Codex standard for whey cheese, Codex Stan 284

Διατριβές

Δημόπουλος Ευάγγελος Ηλίας.(2013). “*Παρασκευή και μελέτη τυριών τυρογάλακτος μειωμένης λιποπεριεκτικότητας*”. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών των Τμημάτων Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

Ζαγάρη Γ.Ελένη. (2018). “*Επίδραση του λίπους του τυρογάλακτος επί των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και αποδόσεων τυριών τυρογάλακτος*”. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών των Τμημάτων Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

Κατσιμίλη Μαρία.(2021). “*Listeria Monocytogenes στα τυριά*”. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Σχολή Επιστημών Τροφίμων/ Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Ντεβόλε Χαράλαμπος.(2014). “*Κεφαλογραβιέρα και Μυζήθρα*. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό ίδρυμα Ηπείρου. Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής

Πετρίδης Κωνσταντίνος.(2013). “*Μελέτη της παρουσίας των σταφυλόκοκκων και ειδικότερα του S.aureus στο μανούρι*”. Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων

Σαρηγιαννίδου Δήμητρα Μ.(1995). “*Επιβίωση και συμπεριφορά του B.cereus και της Y.enterocolitica κατά τα στάδια επεξεργασίας και συντήρησης της μυζήθρας*”. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών/Τμήμα Κτηνιατρικής