



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Τεχνικές ταυτοποίησης και ταξινόμησης μικροοργανισμών με έμφαση στην ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ελληνικά τυριά τυρογάλακτος»

Αθήνα, Αύγουστος 2023

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ: Μπακίρη Κυριακούλα

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ: Τσάκαλη Ευσταθία



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή Επιστημών Τροφίμων/School of Food Sciences

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων/ Department of Food Science and Technology

MSc OF INNOVATION, QUALITY AND FOOD SAFETY

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Τεχνικές ταυτοποίησης και ταξινόμησης μικροοργανισμών με έμφαση στην ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ελληνικά τυριά τυρογάλακτος»

MSC THESIS

"Techniques for the identification and classification of microorganisms with an emphasis on the identification of lactic acid bacteria in Greek whey cheeses"



Μπακίρη Κυριακούλα / Bakiri Kyriakoula

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Τσάκαλη Ευσταθία/Tsakali Efstathia

## **Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας**

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Τεχνικές ταυτοποίησης και ταξινόμησης μικροοργανισμών με έμφαση στην ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ελληνικά τυριά τυρογάλακτος**» που παρουσιάστηκε από τον ή την **Μπακίρη Κυριακούλα**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

31/08/2023

Όνομα επιβλέποντος

Τσάκαλη Ευσταθία

Ημερομηνία

31/08/2023

Όνομα μέλους επιτροπής

Μπατρίνου Ανθιμία

Ημερομηνία

31/08/2023

Όνομα μέλους επιτροπής

Κοντελής Σπυρίδων

### **Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright**

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Μπακίρη Κυριακούλα

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Bakiri', with a long horizontal stroke extending to the right.

## **Ευχαριστίες**

Με την παρούσα διπλωματική εργασία ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους ανθρώπους, χωρίς τη βοήθεια των οποίων, θα ήταν αδύνατο να καταφέρω το στόχο μου. Έτσι λοιπόν ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Τσάκαλη Ευσταθία για την υποστήριξη και την καθοδήγησή της στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους καθηγητές μου κ. Μπατρίνου Ανθιμία και κ. Κοντελέ Σπυρίδων για την πολύτιμη βοήθεια τους .

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς και τους φίλους και συναδέλφους μου, για τη συμπαράσταση και την υπομονή τους καθ' όλη τη διαδρομή των σπουδών μου.

## Περίληψη

Οι ανακαλύψεις που έγιναν από τη σύγχρονη επιστήμη και τεχνολογία έχουν αποκαλύψει τις ευεργετικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και άλλων συστατικών. Με τη βιομηχανία τροφίμων να επεκτείνεται παγκοσμίως, υπάρχει μεγάλος ανταγωνισμός μεταξύ συστατικών με βάση τον ορό γάλακτος και άλλων επιλογών. Η συνεχώς εξελισσόμενη αγορά τροφίμων, η οποία προσπαθεί να καλύψει τις προτιμήσεις των καταναλωτών τόσο για την υγεία όσο και για τη γεύση, έχει δημιουργήσει νέες αγορές όπως τα λειτουργικά τρόφιμα. Αυτό είχε επίσης ως αποτέλεσμα ευκαιρίες για την παραγωγή τυριών υψηλής ποιότητας με βάση τον ορό γάλακτος, τα οποία έχουν μεγάλες δυνατότητες να προσθέσουν αξία στη βιομηχανία. Παράλληλα παρόμοιες πρόοδοι έχουν σημειωθεί και στις τεχνολογίες επεξεργασίας του ορού γάλακτος.

Ως πρωταρχικό στόχο η τυροκόμηση θέτει την παράταση της διάρκειας ζωής και η ασφάλεια των τυριών τυρογάλακτος καθώς και τη διατήρηση των θρεπτικών συστατικών του γάλακτος. Αυτά καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση της υγρασίας, του pH και της αλατοπεριεκτικότητας και κατ' επέκταση επηρεάζουν την σύνθεση και την εξέλιξη της μικροχλωρίδας. Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια και μη, τα οποία πολλαπλασιάζονται, συμβάλλοντας στις βιοχημικές δραστηριότητες της ωρίμανσης του τυριού, στην ανάπτυξη γευστικών χαρακτηριστικών καθώς σχετίζονται με την προστασία του καταναλωτή. Σημαντικό ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιεκτικότητα των προϊόντων αυτών σε οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria - LAB), αφενός γιατί ενδεχόμενα χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων και στον τομέα της υγείας αφετέρου δε γιατί η διατήρηση της ονομασίας προέλευσης διέπεται από αυστηρούς διεθνείς κανόνες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η παρουσίαση μιας μεθοδολογίας που περιλαμβάνει την δυνατότητα ταυτοποίησης και ταξινόμησης της μικροβιολογίας των τυριών που υπάρχουν στα ελληνικά τυριά τυρογάλακτος δίνοντας έμφαση στα οξυγαλακτικά βακτήρια με την χρήση διάφορων μεθόδων όπως την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και την Ηλεκτροφόρηση του DNA. Η σωστή ταξινόμηση και ταυτοποίηση αυτών των μικροοργανισμών

μπορεί να βοηθήσει στην εξασφάλιση της ποιότητας του τυριού και στην προστασία της δημόσιας υγείας.

## **Abstract**

Discoveries made by modern science and technology have revealed the beneficial properties of whey proteins and other ingredients. With the food industry expanding globally, there is a lot of competition between whey-based ingredients and other options. The ever-evolving food market, which strives to meet consumer preferences for both health and taste, has created new markets such as functional foods. This has also resulted in opportunities for the production of high-quality whey-based cheeses, which have great potential to add value to the industry. At the same time, similar advances have been made in whey processing technologies.

The primary goal of cheese making is to extend the shelf life and safety of the cheeses, as well as to preserve the nutrients of the milk. These are largely determined by the composition of moisture, pH and salinity and consequently affect the composition and evolution of the microflora. The dominant microflora throughout the ripening period consists of lactic acid bacteria and non-lactic acid bacteria, which multiply, contributing to the biochemical activities of cheese ripening, to the development of taste characteristics as they relate to the protection of the consumer. The content of these products in lactic acid bacteria (Lactic Acid Bacteria - LAB) is also of great interest, on the one hand because they may be used in food technology and in the health sector, and on the other hand because the preservation of the designation of origin is governed by strict international rules.

The purpose of this thesis is to present a methodology that includes the possibility of identifying and classifying the microbiology of the cheeses present in the Greek whey cheeses, emphasizing the lactic acid bacteria using various methods such as polymerase chain reaction (PCR) and DNA electrophoresis . Correct classification and identification of these microorganisms can help ensure cheese quality and protect public health.



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	4
Περίληψη .....	5
Abstract .....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	11
1.1 Ιστορική ανασκόπηση.....	11
1.1.1 Τυροβιομηχανία .....	11
1.2.1 Ορός γάλακτος ή τυρόγαλα.....	12
1.2 Ορός γάλακτος.....	14
1.2.1 Ορισμός .....	14
1.2.2 Βιολογική σύσταση.....	14
1.2.3 Χημική σύσταση .....	15
1.3 Παρασκευή ορού γάλακτος.....	15
1.4 Θρεπτική αξία των πρωτεϊνών ορού γάλακτος.....	16
1.4.1 Βιοδραστικότητα .....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	18
2.1 Γενικά .....	18
2.1.1 Μανούρι, ΠΟΠ .....	18
2.1.1.1 Παρασκευή .....	19
2.1.2 Μυζήθρα.....	19
2.1.2.1 Παρασκευή .....	20
2.1.3 Ξινομυζήθρα Κρήτης, ΠΟΠ .....	20
2.1.3.1 Παρασκευή .....	21
2.1.4 Ανθότυρος.....	22
2.1.5 Ξινοτύρι (Κλωτσοτύρι, γκίζα, αρτύμη ή πρέντζα) .....	23
2.2 Πρόσθετα .....	23
2.3 Μικροβιολογικά κριτήρια.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΥΡΙΟΥ .....	25
3.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια-Lactic Acid Bacteria .....	25
3.2 Παράμετροι ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	27
3.2.1 Ενεργότητα ύδατος (aw) .....	28
3.2.2 Περιεκτικότητα NaCl.....	28
3.2.3 ΡΗ και οργανικά οξέα.....	29

3.2.4 Θερμοκρασία ωρίμανσης.....	29
3.2.5 Δυναμικό οξειδοαναγωγής.....	29
3.2.6 Νιτρικά άλατα.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	32
4.1 Κατηγορίες τεχνικών.....	32
4.1.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.....	32
4.1.2 Μοριακός χαρακτηρισμός.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-Μελέτη ταυτοποίησης βακτηρίων σε ελληνικά μαλακά άσπρα τυριά με 16SRNA αλληλούχιση .....	40
1.Επιλογή δειγμάτων.....	40
2.Εκχύλιση DNA .....	40
3. PCR.....	41
4.Ηλεκτροφόρηση DNA .....	43
5. Αλληλούχιση δειγμάτων.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	47
Τελικός πίνακας αποτελεσμάτων ταυτοποίησης μέσω αλληλούχισης 16S RNA .....	67
<i>Enterococcus saigonensis</i> .....	67
<i>Cuniculiplasma divulgatum</i> .....	68
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> .....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Παρασκευή τυριού από τυρόγαλα.....	11
Εικόνα 2. Παρασκευή τυρογάλακτος.....	13
Εικόνα 3. Ορός γάλακτος.....	14
Εικόνα 4. Μανούρι.....	19
Εικόνα 5. Μυζήθρα.....	20
Εικόνα 6. Ξινομυζήθρα.....	21
Εικόνα 7. Ανθότυρος.....	22
Εικόνα 8. Ξυνοτύρι.....	23
Εικόνα 9. Το σχήμα του συμπλόκου ριβοσώματος και του γονιδίου 16S rRNA. Τα λευκά και γκρι πλαίσια υποδεικνύουν διατηρημένες περιοχές και υπερμεταβλητές περιοχές αντίστοιχα. Τα έντονα βέλη	

εμφανίζονται κατά προσέγγιση θέσεις των καθολικών εκκινητών στην αλληλουχία γονιδίων 16S rRNA του <i>Escherichia coli</i> . ■ : διατηρημένες περιοχές, ■ : υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9).....	33
Εικόνα 10. Σχηματικό διάγραμμα της κίνησης της ζώνης DNA σε γέλη PFGE και τα αντίστοιχα μοτίβα ζωνών PFGE που παράγονται. Α) Παλμικός-περιοδικός αναπροσανατολισμός του DNA σε γέλη PFGE. Β) Μοτίβα ζωνών PFGE. Γ) Δενδρόγραμμα κατασκευασμένο με βάση τα μοτίβα ζωνών PFGE, οι MRSA 011, MRSA 380 και MRSA 747 θεωρούνται στενά συνδεδεμένα στελέχη, καθώς έχουν μικρότερη από 3 διαφορές ζώνης στα πρότυπα ζωνών. Αντίθετα, τα MRSA 347 και MRSA 320 έχουν περισσότερες από επτά ζώνες διαφοράς μεταξύ τους και θεωρούνται μη συγγενικά στελέχη. (Hui-min Neoh, 2019).....	38
Εικόνα 11. Η αντίδραση PCR υφίσταται μια σειρά κύκλων θερμοκρασίας που προκαλούν τη μετουσίωση του DNA, την ανόπτηση με τους εκκινητές και στη συνέχεια την επέκταση με την πολυμεράση Taq. ....	42
Εικόνα 12. PCR προϊόντα (amplicons) .....	43
Εικόνα 13. Πρότυπα μοριακά βάρη μορίων DNA (DNA ladder) .....	44
Εικόνα 14. Φόρτωση δειγμάτων στο gel στην συσκευή ηλεκτροφόρησης .....	45
Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο .....	47
Εικόνα 16. <i>Enterococcus</i> .....	67
Εικόνα 17. Υπερδομή του στελέχους S5T. (α) Σύμπλεγμα κυττάρων, τα οποία εμφανίζονται μάλλον πλειομορφικά όταν παρασκευάζονται ως κύτταρα πλήρους τοποθέτησης και με αντίθεση PtC-σκιάς (αιχμή βέλους, κατεύθυνση σκιάς, βέλος, δακτυλιοειδές κελί). Όταν παρατηρούνται σε εξαιρετικά λεπτές τομές (b, c), τα κύτταρα περιβάλλονται από μία μονάδα μεμβράνης (cm) και γενικά παρουσιάζουν ένα πυκνά συσκευασμένο κυτταρόπλασμα χωρίς διακριτά εγκλείσματα. ....	69
Εικόνα 18. <i>Limosilactobacillus fermentum</i> .....	70

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ιστορική ανασκόπηση

#### 1.1.1 Τυροβιομηχανία

Η τυροκομία στην Ελλάδα ξεκίνησε στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα και έχει παράδοση αιώνων. Λόγω της θρεπτικής αξίας του τυριού, οι αρχαίοι Έλληνες το θεωρούσαν ως θεϊκή εφεύρεση και δώρο. Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, διάφοροι τύποι τυριών εξελίχθηκαν με αποτέλεσμα ο αριθμός των μονάδων παραγωγής να αναπτύσσεται και πολλές βιομηχανίες να στρέφονται προς τον κλάδο της τυροκομίας. Ακόμη οικογενειακές επιχειρήσεις και τυροκομικές μονάδες ανά περιοχή να αναπτύσσουν ξεχωριστή μοναδική παράδοση στην τυροκομία. (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011). Η ποσότητα του ορού γάλακτος που παράγεται αυξάνεται με ρυθμό συγκρίσιμο με εκείνον της παραγωγής γάλακτος, με αμφότερες να παρουσιάζουν αύξηση άνω του 2% ετησίως (FAO, 2006). Αυτή η αυξημένη ποσότητα γάλακτος διοχετεύεται στην παραγωγή μεγαλύτερων όγκων τυριού, καζεΐνης/καζεΐνικού άλατος και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων.



*Εικόνα 1. Παρασκευή τυριού από τυρόγαλα.*

Σήμερα υπάρχουν πάνω από 1000 ποικιλίες τυριών παγκοσμίως, κάθε μία με μοναδική μορφή και γεύση. Για τη δημιουργία των περισσότερων τύπων τυριών, τέσσερα κύρια συστατικά - γάλα, πυτιά, μικροοργανισμοί και αλάτι - χρησιμοποιούνται τυπικά και υποβάλλονται σε αρκετά κοινά στάδια όπως πήξη, αφαίρεση ορού γάλακτος, παραγωγή οξέος, προσθήκη αλατιού και, τέλος,

αφήνοντας χρόνο για ωρίμανση. Οι διαφορές στους συνδυασμούς συστατικών και στις μεθόδους επεξεργασίας ευθύνονται για την ανάπτυξη διαφόρων τύπων τυριών ενώ παράγοντες όπως η θερμοκρασία κατά το μαγείρεμα και ο χειρισμός του τυροπήγματος έχουν αντίκτυπο στο τελικό προϊόν. Επίσης οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο τυρί είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία των ξεχωριστών χαρακτηριστικών κάθε ποικιλίας. Στην πραγματικότητα, διαδραματίζουν ζωτικό και ουσιαστικό ρόλο στον καθορισμό των μοναδικών ιδιοτήτων κάθε τύπου τυριού.

Παραδοσιακά τυριά που παρασκευάζονται σήμερα σε όλη την Ελλάδα αναγράφουν στις ετικέτες τους, την ονομασία ΠΟΠ/ΠΓΕ και εγγυώνται συγκεκριμένες οργανοληπτικές ιδιότητες και υποδηλώνουν ότι υπάρχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στο προϊόν. Παρά το γεγονός ότι στην εμφάνιση δείχνουν διαφορετικά, πολλά από αυτά τα τυριά είναι στην πραγματικότητα παραλλαγές του ίδιου τύπου, που χρησιμοποιούν ελαφρώς διαφορετικές μεθόδους επεξεργασίας ή γνωστά με διαφορετικές τοπικές ονομασίες ενώ εξακολουθούν να χρησιμοποιούν τις ίδιες τεχνικές. Από όλες τις ποικιλίες, οι είκοσι έχουν λάβει το καθεστώς ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης). Τα ελληνικά παραδοσιακά τυριά διακρίνονται , ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής τους, ως εξής: τυριά σε άλμη· μαλακά τυριά · ημίσκληρα τυριά· σκληρά τυριά · τυριά ορού γάλακτος. (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011)

### 1.2.1 Ορός γάλακτος ή τυρόγαλα

Ο ορός γάλακτος ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 3000 χρόνια και αναγνωρίστηκε για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες καθώς και για την θρεπτική και την βιολογική λειτουργικότητα των συστατικών του. Όταν ένας έμπορος θέλοντας να ταξιδέψει στην έρημο αποθήκευσε και μετέφερε ποσότητα γάλακτος στα στομάχια των μόσχων. Μέσω της δράσης του φυσικού ενζύμου χυμοσίνη (πυτιά) που βρίσκεται στα στομάχια αυτών, το γάλα έπηξε κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά με αποτέλεσμα την δημιουργία του τυροπήγματος και του ορού γάλακτος (Smithers, 2008).



Εικόνα 2. Παρασκευή τυρογάλακτος.

Ωστόσο, τόσο από τους τυροκόμους όσο και από τους παραγωγούς καζεΐνης, ο ορός γάλακτος θεωρούνταν ένα από τα πιο ρυπογόνα ρεύματα τροφίμων/ παραπροϊόντων (βιοχημική ζήτηση οξυγόνου (BOD) >35.000 ppm, χημική ζήτηση οξυγόνου (COD) >60.000 ppm) εξαιτίας του υψηλού ποσοστού (>75%) λακτόζης στα συνολικά στερεά αυτού. Επομένως αναζητούσαν τρόπους διαχείρισης του όπως ο ψεκασμός του στα χωράφια, η απόρριψη του σε ποτάμια, λίμνες ή τον ωκεανό και η πώληση του για χαμηλή απόδοση ως ζωοτροφή.

Η αξιοποίηση του ορού κρίθηκε αναγκαία αφετέρου λόγω της μόλυνσης που προκαλούσε στο περιβάλλον και αφετέρου δε καθώς αντιπροσωπεύει μια εξαιρετική πηγή λειτουργικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων, λιπιδίων, βιταμινών, μετάλλων και λακτόζης για εκμετάλλευση στις αγροδιατροφικές, βιοτεχνολογικές, ιατρικές και συναφείς αγορές. (Smithers, 2008)

Επί του παρόντος, η ετήσια παραγωγή ορού γάλακτος είναι περίπου 180-190 εκατομμύρια τόνοι, αλλά μόνο το ήμισυ αυτής της ποσότητας (περίπου 90 εκατομμύρια τόνοι ετησίως) υποβάλλεται σε επεξεργασία. Από τον επεξεργασμένο όγκο, το 30% μετατρέπεται σε σκόνη ορού γάλακτος, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για την παρασκευή βρεφικών παρασκευασμάτων. Το 15% εξευγενίζεται και πωλείται ως λακτόζη ή υποπροϊόντα που προέρχονται από αυτήν, ενώ το υπόλοιπο 5% (που ισοδυναμεί με 4,5 εκατομμύρια τόνους ετησίως) χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση ή την απομόνωση πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Εν τω μεταξύ, το άλλο μισό της παραγωγής ορού γάλακτος χρησιμοποιείται απευθείας στην υγρή του μορφή.

Η ετήσια παραγωγή ορού γάλακτος εξακολουθεί να αυξάνεται κάθε χρόνο. Με βάση την έκθεση, Παγκόσμια Αγορά Τυριών 2000-2023, η προβλεπόμενη παγκόσμια παραγωγή τυριού για το έτος 2023 είναι περίπου 26 εκατομμύρια τόνοι. Δεδομένου ότι για κάθε 1 κιλό τυριού παράγονται περίπου 9 λίτρα ορού γάλακτος, η αναμενόμενη παγκόσμια παραγωγή ορού γάλακτος για το 2023 θα ήταν περίπου 230 εκατομμύρια τόνοι. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της εύρεσης καινοτόμων τρόπων επαναχρησιμοποίησης αυτού του υλικού.

## 1.2 Ορός γάλακτος

### 1.2.1 Ορισμός

Ο ορός γάλακτος (ή τυρόγαλα), σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό FAO και WHO ορίζεται ως *«το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά την διάρκεια παρασκευής του τυριού, της καζεΐνης ή παρόμοιων προϊόντων με διαχωρισμό από το τυρόπηγμα μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από γάλα. Η πήξη επιτυγχάνεται μέσω της δράσης, κυρίως, ενζύμων τύπου πυτιάς»*.



Εικόνα 3. Ορός γάλακτος.

### 1.2.2 Βιολογική σύσταση

Ως το υγρό υποπροϊόν της παραγωγής τυριού ή καζεΐνης, το τυρόγαλα, έχει τιμή pH ίση με 5,9-6,6 και αντιπροσωπεύει το 85-95% του όγκου γάλακτος που αξιολογείται στη γαλακτοκομική βιομηχανία. Διατηρεί το 55% της αρχικής περιεκτικότητας σε πρώτες ύλες, που σημαίνει 4,5–5% (w/v) λακτόζη, 0,6–0,8% (w/v) πρωτεΐνες όπως β-λακτοσφαιρίνη, α-γαλακτοαλβουμίνη και

ανοσοσφαιρίνες, 0,4–0,5% (w/v) λίπη και έλαια και 8–10% (w/w αποξηραμένο εκχύλισμα) ανόργανα άλατος. Όταν η διαδικασία πήξης της καζεΐνης προκαλείται από ένζυμα, κατηγοριοποιείται ως γλυκός ορός γάλακτος. Εναλλακτικά, εάν προκύπτει από την παρουσία βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) ή την προσθήκη οργανικών οξέων, είναι γνωστό ως όξινος ορός γάλακτος. (Gabriela Rabaioli Rama, 2019)

### 1.2.3 Χημική σύσταση

Το χρώμα του εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα και τον τύπο του γάλακτος που χρησιμοποιείται. Συνήθως έχει αποχρώσεις κιτρινοπράσινου χρώματος ή μερικές φορές ακόμη και μπλε, συνέπεια της παρουσίας ριφοβλαβίνης (βιταμίνης B2). Μεγάλο μέρος των στερεών του ορού γάλακτος αποτελεί η λακτόζη, ενώ παράλληλα περιέχει και πρωτεΐνες, λιπαρά και διάφορες βιταμίνες. Για την παραγωγή του χρησιμοποιείται οποιοδήποτε είδος γάλακτος, με το πιο σύνηθες το αγελαδινό γάλα και το αιγοπρόβειο. Σε κάθε περίπτωση θα παρουσιάζει κάποιες διαφορές ως προς την περιεκτικότητα του σε διάφορα συστατικά λόγω διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας, χρήσης καλλιέργειας και πυτιάς. Ορισμένες ποικιλίες τυριού ορού γάλακτος προορίζονται για άμεση κατανάλωση κατά τη διαδικασία παραγωγής τους, όπως το μανούρι, ενώ άλλες έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, όπως η Μυζήθρα. Η χημική σύνθεση του τυριού ορού γάλακτος είναι διαφορετική μεταξύ τους, κυρίως λόγω των διαφορών στην πηγή και τον τύπο του ορού γάλακτος που χρησιμοποιείται, καθώς και στις μεθόδους επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται.

### 1.3 Παρασκευή ορού γάλακτος

Πριν πολλά χρόνια, η παραγωγική διαδικασία του τυριού ξεκίνησε με τις πιο απλοποιημένες μεθόδους και εξελίχθηκε σε βιομηχανική κλίμακα. Εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας των τυριών, οι παραγωγικές διαδικασίες διαφοροποιούνται ανάλογα για κάθε είδος. Τα βασικά στάδια παραγωγής είναι η παστερίωση του γάλακτος, η οξίνιση (καλλιέργεια), η πήξη (πυτιά), η αφυδάτωση (τεμαχισμός, στράγγιση), ο διαχωρισμός τυροπήγματος και τυρογάλακτος, η διαμόρφωση (καλούπωμα), η ωρίμανση και το αλάτισμα. Το τυρόγαλα προκύπτει ως παραπροϊόν αυτής της παραγωγικής διαδικασίας που διαχωρίζεται κατά το στάδιο του τεμαχισμού και της στράγγισης του πήγματος.



Για την παραγωγή τυριού ορού γάλακτος, ο ορός γάλακτος, είτε σκέτος είτε αναμεμειγμένος με γάλα, θερμαίνεται με απευθείας θερμότητα, ατμό ή σε δοχεία με επένδυση. Μερικές φορές, προστίθενται άλατα ή οργανικά οξέα πριν από τη θέρμανση. Σε θερμοκρασία μεταξύ 80-85 °C, αρχίζουν να σχηματίζονται τα αρχικά σωματίδια τυροπήγματος. Εάν η θερμοκρασία αυξηθεί στους 85-95°C, το τυρόπηγμα μπορεί να μαγειρευτεί για λίγα λεπτά για να μειωθεί η περιεκτικότητα σε υγρασία και/ή να επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός ροδίσματος. Μετά την αποστράγγιση και τη μορφοποίηση για περίπου 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, το τυρί ορού γάλακτος διατηρείται στους 4°C περίπου. Η τυπική απόδοση μάζας είναι περίπου 6%, αλλά η προσθήκη γάλακτος, αλάτων ασβεστίου και η προ-συμπύκνωση της πρωτεΐνης (χρησιμοποιώντας τεχνικές συμπύκνωσης ή υπερδιήθησης) μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την απόδοση.

#### 1.4 Θρεπτική αξία των πρωτεϊνών ορού γάλακτος.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ιδιαίτερα πολύτιμη για τον οργανισμό, με βιολογική αξία που ξεπερνά άλλες κοινές πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη αυγού κατά 15%. Η βιολογική αξία ενός θρεπτικού συστατικού μετρά πόσο καλά και γρήγορα μπορεί να τη χρησιμοποιήσει ο οργανισμός. Σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες τροφίμων, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος περιέχει μια πλούσια πηγή βασικών αμινοξέων και αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη), τα οποία παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών και της γλυκόζης και του μεταβολισμού των λιπιδίων, συμβάλλοντας δυνητικά στον έλεγχο του βάρους. Είναι επίσης μια ισορροπημένη πηγή θειούχων αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της μεθειονίνης και της κυστεΐνης. Αυτά τα αμινοξέα εξυπηρετούν έναν κρίσιμο ρόλο ως αντιοξειδωτικά, ως πρόδρομοι της ισχυρής ενδοκυτταρικής αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης και στο μεταβολισμό ενός άνθρακα (Smithers, 2008)

##### 1.4.1 Βιοδραστικότητα

Ο ορός γάλακτος περιέχει ένα πλήθος βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών και πεπτιδίων και αυτά και άλλα συστατικά έχουν αποτελέσει τη βάση για τη χρήση ορού γάλακτος σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Εκτός από τις πρωτογενείς πρωτεΐνες ορού γάλακτος όπως η β-λακτοσφαιρίνη, η α-γαλακταλβουμίνη και το γλυκομακροπεπτίδιο, υπάρχουν αρκετές άλλες πρωτεΐνες στον ορό γάλακτος που διαθέτουν ισχυρή βιοδραστικότητα. Όλες οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν

συνδεθεί με διάφορες θρεπτικές και φυσιολογικές επιδράσεις όπως η βελτίωση της σωματικής απόδοσης, η βοήθεια στην αποκατάσταση μετά την άσκηση και η πρόληψη της μυϊκής ατροφίας, η διαχείριση του κορεσμού και του βάρους, η προαγωγή της καρδιαγγειακής υγείας, η καταπολέμηση του καρκίνου, η υποστήριξη της φροντίδας και επισκευής πληγών, η διαχείριση λοιμώξεων και η προώθηση της βρεφικής διατροφής και της υγιούς γήρανσης. Ενώ ορισμένα από αυτά τα οφέλη εξακολουθούν να είναι θεωρητικά, πολλά από αυτά έχουν ερευνηθεί διεξοδικά και επιβεβαιωθεί από πολλά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο. (Smithers, 2008)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

### 2.1 Γενικά

Τα τυριά ορού γάλακτος παράγονται παγκοσμίως με πήξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, συνήθως με παραδοσιακές μεθόδους και σε μικρή κλίμακα. Αυτά τα τυριά καταναλώνονται συνήθως ως επιτραπέζια τυριά λόγω της θρεπτικής τους αξίας, των χαμηλών επιπέδων λιπαρών και αλατιού και των ευχάριστων αισθητηριακών χαρακτηριστικών τους. Στην Ελλάδα, δημοφιλή τυριά ορού γάλακτος όπως ο Ανθότυρος, το Μανούρι και η Μυζήθρα παρασκευάζονται στο εμπόριο από τον ορό γάλακτος φέτας και σκληριών τυριών (Κεφαλοτύρι ή Γραβιέρα).

#### 2.1.1 Μανούρι, ΠΟΠ

Το μανούρι είναι ένα μαλακό τυρί τυρογάλακτος με συμπαγής δομή συνήθως κυλινδρικό με μέγιστη υγρασία 60% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 70%. Έχει ευχάριστη γλυκιά γεύση με χαρακτηριστικό άρωμα (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Αποτελεί ένα από τα παραδοσιακά προϊόντα της Θεσσαλίας και της Κεντρικής και Δυτικής Μακεδονίας, και παρασκευάζεται από ορό γάλακτος που λαμβάνεται κατά την παραγωγή του Μπάτζου, ενός ημίσκληρου τυριού προερχόμενο από αιγοπρόβειο γάλα. έχει πολλές ομοιότητες με τη μυζήθρα, αλλά είναι πιο κρεμώδες και λιγότερο αλμυρό, με λεπτή υφή και ανώτερη οργανοληπτική ποιότητα. (Κ Lioliou, 2001)

Τα τυριά ορού γάλακτος έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε υγρασία και του αρχικού pH πάνω από 6,4, γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα στη μικροβιακή αλλοίωση, ακόμη και όταν φυλάσσονται στο ψυγείο. (Κ Lioliou, 2001)



Εικόνα 4. Μανούρι

#### 2.1.1.1 Παρασκευή

Το τυρόγαλα που προορίζεται για παρασκευή του Μανουριού υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τυχόν κόκκοι πήγματος και στη συνέχεια εμπλουτίζεται με κρέμα πρόβειου ή γίδινου γάλακτος, ώστε να εξασφαλισθεί λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 2,5%. Ακολουθεί θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τους 88-90<sup>0</sup> C εντός 40-45' της ώρας. Όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος φθάσει στους 70-75<sup>0</sup> C περίπου, προστίθεται 1% περίπου χλωριούχο νάτριο και πρόβειο ή γίδινο γάλα ή κρέμα τους, σε αναλογία μέχρι 25%. Στους 80<sup>0</sup> C περίπου, εμφανίζονται οι πρώτες νιφάδες εξαιτίας άλλο δομής των πρωτεϊνών του ορού, οπότε επιβραδύνεται σημαντικά ο ρυθμός ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Η διαδικασία θέρμανσης πραγματοποιείται στο εύρος θερμοκρασίας 88-90<sup>0</sup> C. Στη θερμοκρασία αυτή παραμένει το πήγμα για 15-30' της ώρας και στη συνέχεια μεταφέρεται σε υφασμάτινους σάκους σχήματος κυλίνδρου για στράγγιση. Η στράγγιση διαρκεί 4-5 ώρες. Μετά τη στράγγιση το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους συντήρησης, θερμοκρασίας 4-5<sup>0</sup> C, για παραμονή μέχρι τη διάθεσή του. (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών)

#### 2.1.2 Μυζήθρα

Στα παραδοσιακά ελληνικά τυριά τυρογάλακτος κατατάσσεται επίσης η Μυζήθρα. Ένα μαλακό τυρί άμορφο σχήματος με συμπαγής δομή, συνήθως κυλινδρικό, χωρίς επιδερμίδα και οπές, λευκού ή υπόλευκου χρώματος με ξινή έως υπόγλυκη γεύση και κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή. Έχει μέγιστη υγρασία 55% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα 45% επί ξηρής ουσίας.

Παράγεται από τυρόγαλο προερχόμενο αποκλειστικά από αιγοπρόβειο γάλα που χρησιμοποιείται για την τυροκόμηση γραβιέρας, κεφαλοτύρι ή κεφαλογραβιέρας (διότι έχουν παραπάνω λίπος). Το αιγοπρόβειο τυρόγαλα είναι πλουσιότερο από το αγελαδινό σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες και έτσι η χρησιμοποίησή του για την παραγωγή μυζήθρας είναι απλούστερη και η απόδοσή του μεγαλύτερη. (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011)



Εικόνα 5. Μυζήθρα

#### 2.1.2.1 Παρασκευή

Παρασκευάζεται με θέρμανση, υπό συνεχή ανάδευση του ορού γάλακτος σε μέγιστη θερμοκρασία 88–92 °C εντός 40–45 λεπτών. Για τη βελτίωση της ποιότητας της μυζήθρας, το πλήρες γάλα αναμιγνύεται με ορό γάλακτος σε αναλογία 3-5% όταν η θερμοκρασία του ορού γάλακτος φτάσει τους 65-70 °C. Επιπλέον, κατά τη θέρμανση του ορού γάλακτος, προστίθεται αλάτι σε ποσοστό 1-1,5%. (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011).

#### 2.1.3 Ξινομυζήθρα Κρήτης, ΠΟΠ

Η Ξινομυζήθρα είναι μαλακό τυρί με κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή, με μέγιστη υγρασία 55% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45%. Το γνωστό ως «παραδοσιακό προϊόν της Κρήτης» παρασκευάζεται από τον ορό γάλακτος που περισσεύει κατά την παρασκευή τυριών κεφαλοτύρι και γραβιέρας, τα οποία συνήθως παρασκευάζονται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή συνδυασμό των δύο, όπως ορίζεται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών. Για την παραγωγή της παρασκευάζεται πρώτα η Μυζήθρα, η οποία όταν μαγειρευτεί και

στραγγιστεί στη συνέχεια πιέζεται για μία εβδομάδα. Έπειτα, το τυρί αλατίζεται και τοποθετείται σε βαρέλια τα οποία μεταφέρονται σε χώρους θερμοκρασίας 5-10 °C και περίοδο δύο μηνών για ωρίμανση. (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011)



Εικόνα 6. Ξινομυζήθρα.

#### 2.1.3.1 Παρασκευή

Για την παρασκευή του υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τυχόν κόκκοι πήγματος και στη συνέχεια υποβάλλεται σε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τους 92°C εντός 30 περίπου λεπτών της ώρας. Όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος είναι 68- 70° C, προστίθεται σ' αυτό συνήθως μικρή ποσότητα μέχρι 15% κατά βάρος πλήρους γάλακτος πρόβειου ή γίδινου (πρόσγαλα). Η θέρμανση του τυρογάλακτος γίνεται υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τη θερμοκρασία των 80° C οπότε εμφανίζονται νιφάδες πήγματος. Στο σημείο αυτό επιταχύνεται ο ρυθμός θέρμανσης μέχρι τη θερμοκρασία των 92° C, ενώ παράλληλα επιβραδύνεται πολύ ο ρυθμός ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Στις συνθήκες αυτές δημιουργείται ένα παχύ στρώμα πήγματος στην επιφάνεια του θερμού τυρογάλακτος, το οποίο μετά παραμονή σε ακινησία για 30 περίπου λεπτά μεταφέρεται σε καλούπια και στραγγίζει για 3 έως 5 ώρες. Μετά την στράγγιση προστίθεται στο πήγμα 1,5- 2,0% αλάτι (βρώσιμο χλωριούχο νάτριο) αναμειγνύεται προσεκτικά για να αποκτήσει ομοιογενή σύσταση, τοποθετείται σε υφασμάτινους σάκους και πιέζεται για μια περίπου εβδομάδα κατά τη διάρκεια της οποίας

αυξάνεται η οξύτητά του και αποκτά υπόξινη έως όξινη γεύση. Το πιεσμένο πήγμα τοποθετείται σε βαρέλια με πολύ προσοχή κατά τρόπο ώστε να μην υπάρχουν κενά στη μάζα του και μεταφέρεται σε θαλάμους με θερμοκρασία μικρότερη των 10°C, όπου παραμένει για περίοδο δυο τουλάχιστον μηνών να ωριμάσει και στη συνέχεια διατίθεται στο εμπόριο. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τα βαρέλια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο χώρο ωριμάνσεως με χαλαρά προσαρμοσμένο το κάλυμά τους, ώστε τυχόν η αποβαλλόμενη υγρασία να μπορεί να απομακρυνθεί (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

#### 2.1.4 Ανθότυρος

Ο φρέσκος ανθότυρος είναι μαλακό κρεμώδες τυρί ακριβώς ίδιος στην όψη και την υφή με την μυζήθρα. Διακρίνεται από την φρέσκια μυζήθρα ως προς την γεύση. Έχει μορφή σφαιρικού κώνου με χρώμα λευκό έως υπόλευκο, με συμπαγή υφή (χωρίς οπές). Παρασκευάζεται περίπου όπως το ιταλικό τυρί ρικότα. Περιέχει μικρό σχετικά ποσοστό λιπαρών και καταναλώνεται νωπός ως επιτραπέζιος. Είναι ελληνικό παραδοσιακό τυρί, το οποίο παρασκευάζεται με προσθήκη αιγοπρόβειου γάλακτος η κρέμας γάλακτος σε τυρόγαλα πρόβειο ή κασικίσιο.



Εικόνα 7. Ανθότυρος.

Ο Ανθότυρος είναι ένα παραδοσιακό ελληνικό τυρί ΠΟΠ (προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης) με σχετικά υψηλή (ζυμώσιμη) περιεκτικότητα σε σάκχαρα (δηλαδή λακτόζη), περιεκτικότητα σε λιπαρά τουλάχιστον 18% και περιεκτικότητα σε υγρασία όχι μεγαλύτερη από 70% .

### 2.1.5 Ξινοτύρι (Κλωτσοτύρι, γκίζα, αρτύμη ή πρέντζα)

Το Ξινοτύρι είναι ένα είδος τυριού με ξινή και αλμυρή γεύση, το οποίο παρασκευάζεται από τον ορό γάλακτος που περισσεύει από την παραγωγή βουτύρου. Ο ορός γάλακτος ζεσταίνεται μέχρι να πήξει, και στη συνέχεια το τυρί στραγγίζεται και αλατίζεται. Στη συνέχεια παλαιώνεται για δύο έως τρεις μήνες είτε σε βαρέλια είτε σε δερμάτινες τσάντες ή κονσέρβες. Αυτό το τυρί έχει χαμηλό επίπεδο NSLAB (βακτήρια γαλακτικού οξέος που δεν εκκινούν) και έχει pH μικρότερο από 5,0, με μέση περιεκτικότητα σε υγρασία περίπου 40% και περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο περίπου 1,4%. Το μέσο % λίπους επί ξηράς ουσίας είναι 14,8 (Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011).



Εικόνα 8. Ξινοτύρι.

## 2.2 Πρόσθετα

Σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ 1129/2011 στα τυριά τυρογάλακτος επιτρέπονται τα ακόλουθα πρόσθετα:

- χρωστικές της ομάδας II (quantum satis)
- σорβικό οξύ- сорβικά άλατα E200-203 (1.000 mg/kg) μόνο για τυρί προσσκευασμένο σε φέτες, τυρί σε στρώσεις και τυρί με πρόσθετα τρόφιμα
- νιτρικά άλατα E251-252 (150 mg/kg) μόνο σε τυρογάλα σκληρού, ημίσκληρου και ημιαλακού τυριού



- κονιοποιημένη κυτταρίνη E460 (quantum satis) μόνο σε τριμμένο και σε φέτες τυρί
- οξικό οξύ E269, γαλακτικό οξύ E270, κιτρικό οξύ E330, γλυκονο-δ-λακτόνη E575 (quantum satis).

### 2.3 Μικροβιολογικά κριτήρια

Σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ 1441/2007 για τον μικροβιολογικό έλεγχο των τυριών τυρογάλακτος ισχύει:

- E.coli: 2 από τα 5 δείγματα επιτρέπεται να έχουν αριθμό κυττάρων από 100 έως 1.000 cfu/g
- Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση: 2 από τα 5 δείγματα επιτρέπεται να έχουν αριθμό κυττάρων από 100 έως 1.000 cfu/g και ειδικότερα για τα τυριά τυρογάλακτος που δεν έχουν υποστεί ωρίμανση το εύρος κυμαίνεται από 10 έως 100 cfu/g.

Και οι δύο έλεγχοι πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της παραγωγής τη στιγμή που αναμένεται ο μέγιστος αριθμός του βακτηρίου

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΥΡΙΟΥ

Τα τυριά ορού γάλακτος έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και pH που τα καθιστούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως μούχλα, ζυμομύκητες και βακτήρια. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι σημαντικοί για την παραγωγή και την ωρίμανση όλων των φυσικών τυριών, συμπεριλαμβανομένων των τυριών ορού γάλακτος. Ωστόσο, τα φρέσκα τυριά ορού γάλακτος με το υψηλό pH, την υψηλή υγρασία και τη χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι είναι πολύ ευαίσθητα στη μικροβιακή αλλοίωση από μούχλα, ζυμομύκητες και εντεροβακτηρίδια, ειδικά όταν αποθηκεύονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τη νομοθεσία, οι συσκευασίες των τυριών ορού γάλακτος πρέπει να είναι τυποποιημένες ώστε να προστατεύονται από την παραχάραξη και τις απομιμήσεις.

Όταν αποθηκεύονται σε αερόβιες συνθήκες, τα φρέσκα τυριά ορού γάλακτος συνήθως αλλοιώνονται σε λιγότερο από 7 ημέρες, αλλά η συσκευασία σε κενό αέρος μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους σε 20-30 ημέρες. Επιπλέον, τα μαλακά τυριά και τα τυριά ορού γάλακτος αποτελούν σημαντική ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων λόγω της χαμηλότερης οριακής τους επίδρασης σε σύγκριση με τα σκληρά τυριά, παρουσιάζοντας υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και δυνατότητα επιβίωσης/ανάπτυξης παθογόνων όπως η *Listeria monocytogenes*. Μόλυνση μπορεί επίσης να συμβεί όταν τα τυριά ορού γάλακτος αποθηκεύονται σε ψυγεία λιανικής ή οικιακά, τα οποία μερικές φορές λειτουργούν σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εξάπλωση επιβλαβών βακτηρίων από το ένα τρόφιμο στο άλλο.

### 3.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια-Lactic Acid Bacteria

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι αυτά που παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο ή μοναδικό προϊόν ζύμωσης. Μορφολογικά είναι Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, μικροαερόφιλα, μη κινητά και μη σπορογόνα βακτήρια. Στη βιομηχανία τροφίμων εμφανίζουν ευρεία χρήση στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στο κρέας και στα φυτικά προϊόντα. Επίσης εφαρμόζονται και ως παράγοντες ζύμωσης σε πολλά προϊόντα διατροφής καθώς και σε μια σειρά βιοτεχνολογικών διεργασιών. (Gabriela Rabaioli Rama, 2019)

Ανάλογα με τα προϊόντα της ζύμωσης τα βακτήρια διακρίνονται ως ομοζυμωτικά ή αλλιώς ως εκκινητές (SLAB) , όταν το γαλακτικό οξύ παράγεται 85% περισσότερο από άλλα προϊόντα ζύμωσης, ή ως ετεροζυμωτικά η αλλιώς μη εκκινητές (NSLAB), όταν παράγουν οξικό, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Στην πρώτη περίπτωση, μέσω της λειτουργίας μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ, προωθούν την ταχεία οξίνιση του μέσου ενώ στην δεύτερη περίπτωση αποτελούν παράγοντες μη αρχικών καλλιεργειών, που προορίζονται κυρίως για αυξημένη οργανοληπτική ποιότητα λόγω των γλυκολυτικών, λιπολυτικών και πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων τους, καθώς και την παραγωγή διακετυλίου. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) βελτιώνουν τις αισθητηριακές ιδιότητες, την ασφάλεια, τη διάρκεια ζωής και τη θρεπτική αξία των προϊόντων διατροφής, ανεξάρτητα από τη μορφή τους. (Gabriela Rabaioli Rama, 2019) . Τα LAB είναι επίσης γνωστό ότι έχουν προβιοτικές ιδιότητες, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να προσφέρουν οφέλη για την υγεία στον ξενιστή εάν καταναλωθούν σε κατάλληλες ποσότητες, σύμφωνα με τις οδηγίες του FAO/WHO που δημοσιεύθηκαν το 2002. Ακόμη, επηρεάζουν την ενίσχυση της ανοσίας και την πρόληψη του καρκίνου τη θεραπεία της φλεγμονής των αεραγωγών και ιδιαίτερα ασθένειες που σχετίζονται με το γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) (Gabriela Rabaioli Rama, 2019).

Τα κύρια γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Enterococcus*. Έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες ως ένας τρόπος για την ενίσχυση της γεύσης και της υφής των τροφίμων, καθώς και για τη διατήρησή τους. Ορισμένοι τύποι LAB, όπως ο *Lactobacillus lactis* και ο *Streptococcus thermophilus*, είναι σε θέση να αποτρέψουν την ανάπτυξη επιβλαβών βακτηρίων και την αλλοίωση, επεκτείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής των πρώτων υλών τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει χρήση μεταβολιτών LAB ως φυσικών συντηρητικών σε υλικά συσκευασίας τροφίμων. Η ικανότητα του LAB να αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων οφείλεται στην παραγωγή γαλακτικών και οργανικών οξέων, τα οποία μειώνουν το pH του περιβάλλοντος ανάπτυξης. Αυτό το όξινο περιβάλλον μπορεί να μετατρέψει τα οργανικά οξέα σε λιπίδια που διαχέονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών στο κυτταρόπλασμα. Το LAB παράγει επίσης άλλες ουσίες, όπως ακεταλδεΐδη, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διακετύλιο, διοξείδιο του άνθρακα, πολυσακχαρίτες και βακτηριοσίνες, οι οποίες μπορεί να δρουν ως αντιμικροβιακά. Τα LAB αποτελούν βασική

ομάδα προβιοτικών και πολλοί γαλακτοβάκιλλοι, γαλακτόκοκκοι και bifidobacteria θεωρούνται ωφέλιμα για την υγεία. Αν και οι μηχανισμοί των προβιοτικών επιδράσεων της μικροχλωρίδας του εντέρου δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, τα μέλη των *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* spp. μελετώνται συνήθως ως πιθανά προβιοτικά λόγω της μακράς ιστορίας ασφαλούς χρήσης τους σε διάφορα προϊόντα διατροφής. Στην πραγματικότητα, αρκετά LAB, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, έχουν ταξινομηθεί ως "γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή". (Dheeraj MOHANIA, 2008)

### *Lactococcus*

Οι λακτόκοκκοι είναι ένας τύπος αναερόβιων, θετικών κατά Gram βακτηρίων που μπορούν να παράγουν L(+)-γαλακτικό οξύ από λακτόζη στο νωπό γάλα που έχει ζυμωθεί αυθόρμητα σε θερμοκρασίες περίπου 20-30°C για 10-20 ώρες. Συχνά αναφέρονται ως «μεσόφιλοι γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι». Υπάρχουν εικασίες ότι η πρώτη ανακάλυψη γαλακτικού οξέος στο ξινόγαλο από τον Carl Wilhelm Scheele το 1780 ήταν στην πραγματικότητα το L(+)-γαλακτικό οξύ που παρήχθη από γαλακτόκοκκους. Ο Louis Pasteur αναγνώρισε τη μικροβιακή φύση της γαλακτικής ζύμωσης το 1857 και ο Joseph Lister απέκτησε και περιέγραψε επιστημονικά την πρώτη καθαρή βακτηριακή καλλιέργεια στη γη, η οποία ήταν ο *Lactococcus lactis* (αποκαλούμενος "Bacterium lactis" εκείνη την εποχή).

Οι προηγμένες μοριακές μέθοδοι, ιδιαίτερα αυτές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπως το ger-PCR δακτυλικό αποτύπωμα και ο πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP), καθώς και η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος παλμικού πεδίου (PFGE), εκτιμώνται ιδιαίτερα για τον ακριβή προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό διαφορετικά στελέχη LAB.

### **3.2 Παράμετροι ανάπτυξης μικροοργανισμών**

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών στο τυρί κατά την ωρίμανση επηρεάζεται από διάφορες φυσικές παραμέτρους, όπως η περιεκτικότητα σε νερό, η συγκέντρωση αλατιού και το pH, οι οποίες επηρεάζονται από τη διαδικασία παραγωγής τυριού. (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.1 Ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ )

Για να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών στο τυρί, μια καλή προσέγγιση είναι να μειωθεί η ποσότητα του διαθέσιμου νερού, κάτι που μπορεί να γίνει είτε αφυδατώνοντας το τυρί είτε προσθέτοντας υδατοδιαλυτά συστατικά όπως ζάχαρη ή αλάτι. Καθώς η περιεκτικότητα σε υγρασία του τυριού αυξάνεται, γίνεται πιο ευάλωτο στην αλλοίωση. Το επίπεδο υδάτινης δραστηριότητας του τυριού σχετίζεται με την περιεκτικότητά του σε υγρασία και έχει αντίστροφη σχέση με τη συγκέντρωση ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους όπως το NaCl. (Esteban & Marcos, 1989). Στα αρχικά στάδια της παρασκευής τυριού, η υγρασία είναι πολύ υψηλή ( $a_w \approx 0,99$ ), γεγονός που επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτυχθούν και να εκφραστούν. Μετά τη διαδικασία της αποστράγγισης, του αλάτισματος και της ωρίμανσης του τυριού, η υγρασία μειώνεται στα επίπεδα 0,917-0,988. Αυτή η μείωση της υγρασίας μπορεί να επηρεάσει τη μεταβολική δραστηριότητα και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) έχουν γενικά υψηλότερη υγρασία από άλλα βακτήρια που βρίσκονται στο τυρί. (Brown, 1976).

Κατά την ωρίμανση του τυριού η  $a_w$  μειώνεται λόγω απώλειας νερού κατά την εξάτμιση, το αλάτισμα και την υδρόλυση πρωτεϊνών σε πεπτίδια και αμινοξέα καθώς και των τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Κάθε φορά που ένα πεπτίδιο ή ένας δεσμός εστέρα υδρολύεται, απαιτείται ένα μόριο νερού. Όταν το τυρί ωριμάζει, υπάρχει σημαντική απώλεια υγρασίας, και έτσι το μη δεσμευμένο επίπεδο υγρασίας μειώνεται (Cogan, 2000). Για να ελέγξουμε την απώλεια υγρασίας, μπορούμε να αυξήσουμε τη σχετική υγρασία κατά την ωρίμανση ή να συσκευάσουμε το τυρί σε κερι ή πλαστικό. Μπορεί να υπάρχουν παραλλαγές στις τιμές  $a_w$  σε διαφορετικές ζώνες στο τυρί · για τα αλατισμένα σε άλμη σκληρά και ημίσκληρα τυριά, οι τιμές είναι συνήθως υψηλότερες προς το κέντρο· (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.2 Περιεκτικότητα NaCl

Η επίδραση του αλατιού αντανάκλα στη μείωση  $a_w$  και αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων εκκίνησης και αλλοίωσης. Η απαιτούμενη ποσότητα αλατιού που χρειάζεται στο τυρί εξαρτάται από τις ιδιότητες του τροφίμου, όπως το pH και η περιεκτικότητα σε υγρασία, και κατά γενικό κανόνα είναι αρκετό να προστεθεί 10-100 g/kg. Η ποσότητα άλατος στο τυρί κυμαίνεται συνήθως από 0,7 έως 7 g/100 g, αντιστοιχώντας σε τιμές  $a_w$  μεταξύ 0,99 και 0,95. Υπό τέτοιες

συνθήκες, πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν στο τυρί, πράγμα που δείχνει ότι άλλοι παράγοντες εκτός από το αλάτι συνεισφέρουν στην αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης. Η ποσότητα αλατιού που διαλύεται στην υγρασία του τυριού (δηλ. % S/M) καθορίζει την ανασταλτική δράση του αλατιού, αντί για την πραγματική ποσότητα αλατιού που προστίθεται μέσω ξηρού αλάτισματος ή αλατίσματος άλμης. (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.3 ΡΗ και οργανικά οξέα

Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε έναν ουδέτερο περιβάλλοντα παράγοντα pH, ενώ δεν μπορούν να επιβιώσουν σε χαμηλότερες τιμές pH από 5,0. Λόγω της συσσώρευσης οργανικών οξέων κατά τη διαδικασία παρασκευής του τυρού, το τυρόπηγμα έχει ένα pH που κυμαίνεται μεταξύ 4,5 και 5,3. Τα κύρια οργανικά οξέα που βρίσκονται στο τυρί είναι το γαλακτικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ με τιμές pH 3.08, 4.75 και 4.87, αντίστοιχα. Αν και το τυρόπηγμα περιέχει πολλά είδη οργανικών οξέων, το γαλακτικό οξύ είναι πάντα το πιο κυρίαρχο. Υπάρχει μια εξαίρεση στον κανόνα αυτόν για το ελβετικό τυρί, όπου η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος μπορεί να είναι υψηλότερη από αυτή του γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.4 Θερμοκρασία ωρίμανσης

Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην παρασκευή και ωρίμανση του τυριού είναι είτε μεσόφιλοι είτε θεرمόφιλοι με θερμοκρασία ~30°C ή 42°C, αντίστοιχα. Η διαδικασία ωρίμανσης του τυριού επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται. Ωστόσο, η ιδανική θερμοκρασία αποτελεί συμβιβασμό μεταξύ της ανάγκης για την επιτάχυνση των χημικών αντιδράσεων της ωρίμανσης και της ανάγκης να ελέγχονται οι συνθήκες για την ανάπτυξη των επιθυμητών βακτηρίων. Η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία, αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει αλλαγές στο σώμα και τη γεύση του τυριού, που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητά του. Επιπλέον, η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να διευκολύνει τη διάδοση παθογόνων βακτηριδίων, ενώ η χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να επιβραδύνει τη διαδικασία ωρίμανσης του τυριού. (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.5 Δυναμικό οξειδοαναγωγής

Το πεδίο του δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) αναφέρεται στην ικανότητα ενός χημικού/βιοχημικού συστήματος να οξειδώνει ή να μειώνει. Μια θετική τιμή mV αντιστοιχεί σε

μια οξειδωμένη κατάσταση, ενώ μια αρνητική τιμή mV σημαίνει μειωμένη κατάσταση. Για παράδειγμα, το γάλα έχει Eh περίπου +150 mV ενώ το τυρί έχει Eh περίπου -250 mV. Ο μηχανισμός της μείωσης του Eh στο τυρί δεν είναι εντελώς σαφής, αλλά πιθανότατα σχετίζεται με τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος από τον εκκινητή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και τη μείωση μικρών ποσοτήτων O<sub>2</sub> στο γάλα στο νερό. Αυτό καθιστά το εσωτερικό του τυριού ένα αναερόβιο σύστημα που μπορεί να υποστηρίξει μόνο την ανάπτυξη υποχρεωτικών ή προαιρετικά αναερόβιων μικροβίων. Το Eh μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της μικροβιακής καλλιέργειας, από περίπου +300 mV για τα αερόβια έως λιγότερο από -400 mV για τα αναερόβια. (Brown & Emburger, 1980). Η τιμή του Eh στο τυρί αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τους τύπους των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν σε αυτό. Ως αποτέλεσμα, τα υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, όπως το *Pseudomonas*, το *Brevibacterium*, το *Bacillus* και το *Micrococcus* spp. αποκλείονται από την ανάπτυξη εντός του τυριού. Κατά συνέπεια, τα βακτήρια που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του τυριού κατά κύριο λόγο είναι υποχρεωτικά αερόβια. (Tom P Beresford, 2001)

### 3.2.6 Νιτρικά άλατα

Στην παραγωγή ορισμένων τυριών, όπως τα Edam και Gouda, προστίθενται νιτρικά άλατα ως αλάτι για να αποτραπεί η ανάπτυξη του *Clostridium tyrobutyricum*. Αυτό το βακτήριο μετατρέπει το γαλακτικό οξύ σε βουτυρικό οξύ, H<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>, τα οποία είναι υπεύθυνα για τις μεγάλες τρύπες στο τυρί. Σε αυτά τα τυριά, η συγκέντρωση αλατιού ισορροπεί αργά και η υγρασία είναι υψηλή, οπότε υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης μικροοργανισμών όπως το *C. tyrobutyricum*, οι οποίοι μπορούν να αλλοιώσουν το τυρί. Επομένως, για την αναστολή τους είναι απαραίτητη η προσθήκη νιτρικών αλάτων πριν από την επίτευξη ισορροπίας άλατος.

Κατά τη διαδικασία ωρίμανσης τυριών, τα νιτρικά άλατα μετατρέπονται σε ξανθίνη, μια οξειδάση που προκύπτει φυσικά από το γάλα ή το τυρόπηγμα. Αυτή η μετατροπή έχει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του τυριού. (Nieuwenhoff, 1977). Τα νιτρώδη δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του LAB, αλλά αναστέλλουν τα προπιονιβακτηρίδια που σχηματίζουν τις τρύπες στο τυρί Emmental. Κατά την διαδικασία τυροκομίας, τα νιτρώδη μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα αρωματικά αμινοξέα που βρίσκονται στο τυρί, με αποτέλεσμα την παραγωγή νιτροζαμινών. Πολλές από αυτές τις ουσίες έχουν αποδειχθεί ως καρκινογόνες. Η εν λόγω αντίδραση

επηρεάζεται από το pH, και συνήθως συμβαίνει σε περιβάλλοντα με pH μεταξύ 2-4,5. Σε πιο υψηλά pH, η αντίδραση επιβραδύνεται και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νιτροζαμινών. Η μεγαλύτερη ποσότητα νιτρικού αλατιού που προστίθεται κατά τη διαδικασία τυροκομίας βρίσκεται στο γάλα ή διαχέεται στο αλατιστικό διάλυμα. Όταν το τυρί είναι έτοιμο για κατανάλωση, τα επίπεδα νιτρικών είναι συνήθως πολύ χαμηλότερα από το επιτρεπόμενο επίπεδο των 50 mg/kg, όπως ορίζεται στους ολλανδικούς κανονισμούς. (Tom P Beresford, 2001)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### 4.1 Κατηγορίες τεχνικών

Ο κύριος στόχος της μικροβιολογίας του τυριού είναι να ταξινομηθεί και να ταυτοποιηθεί η μικροχλωρίδα του τυριού και η εξέλιξής της κατά την ωρίμανση. Η ακριβής αναγνώριση και χαρακτηρισμός της χλωρίδας και των συστατικών της είναι σημαντικός για την επιστημονική και πρακτική αξιολόγηση της βιοποικιλότητας. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες ομάδες: (1) μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια των οργανισμών και στη σταθμίαση των χαρακτηριστικών τους, (2) μέθοδοι που συνδυάζουν την καλλιέργεια με μοριακές τεχνικές για τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό τους και (3) μέθοδοι που βασίζονται αποκλειστικά στη χρήση μοριακών τεχνικών για τον χαρακτηρισμό της χλωρίδας. (Tom P Beresford, 2001)

#### 4.1.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός χρησιμεύει στην παρακολούθηση της μικροβιακής χλωρίδας και συγκεκριμένα μόνο των στελεχών που αναπτύσσονται υπό επιλεκτικές συνθήκες. Δείγματα τυριού ομογενοποιούνται και επιστρώνονται σε μια σειρά μέσων, για την επιλογή των απομονωμένων αποικιών και των κατάλληλων συνθηκών. Οι φαινοτυπικοί χαρακτήρες εξαρτώνται από την καλλιέργεια και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. (Tom P Beresford, 2001)

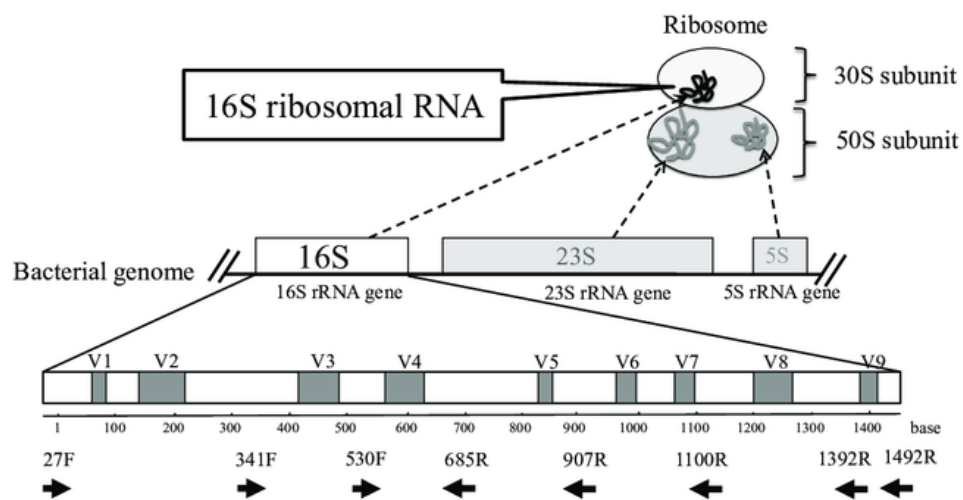
#### 4.1.2 Μοριακός χαρακτηρισμός

Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών περιλαμβάνει συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον χαρακτηρισμό νουκλεϊκού οξέος ή πρωτεϊνών, ανάλυση λιπαρών οξέων και πυρόλυση ολόκληρων κυττάρων. Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών περιλαμβάνει το προφίλ πρωτεΐνης ολόκληρου του κυττάρου, μελέτες ομολογίας ενζύμων και ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλών τύπων. Για να αναλυθούν οι μικροοργανισμοί στην κοινότητα, απαιτείται να καλλιεργηθούν σε διαφορετικά μέσα καλλιέργειας. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει στον έλεγχο μόνο ενός μέρους της συνολικής κοινότητας μικροοργανισμών, καθώς δεν είναι δυνατόν να αναπτυχθούν όλοι οι μικροοργανισμοί σε όλα τα διαφορετικά μέσα καλλιέργειας. (Tom P Beresford, 2001)

## Ριβοσωμικό RNA 16S

Όσον αναφορά την μελέτη των μακρομορίων έχει χρησιμοποιηθεί το γονίδιο 16S rRNA για τη διερεύνηση της εξελικτικής ιστορίας και της συγγένειας των οργανισμών. Συγκεκριμένα, το γονίδιο 16S rRNA στοχεύεται συνήθως σε μελέτες βακτηριακής ποικιλομορφίας λόγω των σταθερών και εξαιρετικά διατηρημένων λειτουργιών του που καθιερώθηκαν νωρίς στην εξέλιξή του.

Το 16S rRNA είναι ένα μόριο που βρίσκεται στο ριβόσωμα των προκαρυωτικών κυττάρων (βακτήρια και αρχαία). Παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης βοηθώντας στη συναρμολόγηση αμινοξέων σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες κατά τη μετάφραση. Το "16S" στο όνομά του αναφέρεται στο κατά προσέγγιση μέγεθος του μορίου rRNA σε μονάδες συντελεστή καθίζησης. Αποτελεί συστατικό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος και εμπλέκεται στην αναγνώριση και σύνδεση του mRNA (αγγελιοφόρος RNA) κατά τη μετάφραση. Χρησιμοποιείται συνήθως στη μοριακή βιολογία και τη μικροβιολογία ως γενετικός δείκτης για την αναγνώριση και ταξινόμηση αρχαιοβακτηρίων. Δεδομένου ότι η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ειδών, λειτουργεί ως χρήσιμο εργαλείο όχι μόνο στη σύγκριση μεταξύ όλων των ειδών βακτηρίων, αλλά δίνει και τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα γονίδια 16S rRNA των αρχαιοβακτηρίων και το γονίδιο 18S rRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων. (Clarridge, 2004)



Εικόνα 9. Το σχήμα του συμπλόκου ριβοσώματος και του γονιδίου 16S rRNA. Τα λευκά και γκρι πλαίσια υποδεικνύουν διατηρημένες περιοχές και υπερμεταβλητές περιοχές αντίστοιχα. Τα έντονα βέλη εμφανίζονται κατά προσέγγιση θέσεις των

καθολικών εκκινητών στην αλληλουχία γονιδίων 16S rRNA του *Escherichia coli*. ■ : διατηρημένες περιοχές, ■ : υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9).

Το γονίδιο 16S rRNA αποτελείται από μια αλληλουχία γονιδίων μήκους περίπου 1.550 bp. Αυτή η αλληλουχία περιέχει τόσο μεταβλητές περιοχές όσο και περιοχές που παραμένουν σταθερές και αμετάβλητες. Λόγω του μεγέθους του γονιδίου, υπάρχουν επαρκείς διαφορετικές μορφές του γονιδίου 16S rRNA, γνωστές ως πολυμορφισμοί. Αυτοί οι πολυμορφισμοί παρέχουν αρκετή ποικιλία για να εκτελεστούν αξιόπιστες μετρήσεις. (Clarridge, 2004)

Συνήθως, για την ενεργοποίηση της αλληλουχίας, χρησιμοποιούνται εκκινητές που ταιριάζουν με τις σταθερές περιοχές στην αρχή του γονιδίου. Αυτοί οι εκκινητές είναι είτε συμπληρωματικοί προς τις αμετάβλητες περιοχές είτε βρίσκονται είτε στη θέση 540 bp είτε στο τέλος της αλληλουχίας 16S rRNA (περίπου στη θέση 1.550 bp). Η ακολουθία που βρίσκεται μεταξύ αυτών των εκκινητών, γνωστή ως μεταβλητή περιοχή, χρησιμοποιείται για τη σύγκριση και την ταξινόμηση διαφορετικών οργανισμών.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, αν και τα μήκη 500 και 1.500 bp αποτελούν κοινές συντεταγμένες για την αλληλουχία και τη σύγκριση, οι ακολουθίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων μπορεί να έχουν διαφορετικά μήκη. (Clarridge, 2004)

Η διαδικασία ανάλυσης και σύγκρισης αλληλουχιών γονιδίου 16S rRNA είναι γνωστή ως "αλληλουχία 16S rRNA" ή "Αλληλουχία 16S rDNA". Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την εξαγωγή του γονιδίου 16S rRNA από ένα δείγμα, την ενίσχυση του χρησιμοποιώντας PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και στη συνέχεια τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ενισχυμένων θραυσμάτων. Οι προκύπτουσες αλληλουχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα και για τη μελέτη της ποικιλομορφίας και της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων.

Συνολικά, το 16S rRNA υπήρξε ένα ουσιαστικό εργαλείο στον τομέα της μικροβιολογίας, επιτρέποντας στους ερευνητές να εξερευνήσουν τον κόσμο των μικροβίων και να κατανοήσουν τις σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος τους.

Η τεχνολογία της μοριακής βιολογίας έχει προσφέρει πολλές προηγμένες τεχνικές για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση μικροοργανισμών σε τρόφιμα. Κατά σειρά τα στάδια είναι τα εξής:

1. Εξαγωγή DNA: Αρχικά, το DNA πρέπει να εξαχθεί από το τυρόπηγμα. Αυτό γίνεται συνήθως χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ εξαγωγής DNA ή με τροποποιημένη μέθοδο εκχύλισης φαινόλης-χλωροφορμίου.
2. Ρύθμιση PCR: Στη συνέχεια, δημιουργείται μια αντίδραση PCR. Η αντίδραση περιέχει το εκχυλισμένο DNA, εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο PSR, πολυμεράση Taq και νουκλεοτίδια.
3. Κύκλος PCR: Η αντίδραση PCR υφίσταται μια σειρά κύκλων θερμοκρασίας που προκαλούν τη μετουσίωση του DNA, την ανόπτηση με τους εκκινητές και στη συνέχεια την επέκταση με την πολυμεράση Taq. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου PSR.
4. Ηλεκτροφόρηση γέλης: Μετά την αντίδραση PCR, το ενισχυμένο DNA οπτικοποιείται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση γέλης. Τα προϊόντα PCR φορτώνονται σε ένα πήκτωμα και υποβάλλονται σε ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο διαχωρίζει τα ενισχυμένα θραύσματα DNA με βάση το μέγεθός τους. Το πήκτωμα στη συνέχεια χρωματίζεται με μια χρωστική για να οπτικοποιηθεί το DNA.
5. Ανάλυση: Τα προκύπτοντα προϊόντα PCR μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν για να προσδιοριστεί η παρουσία ή η απουσία του γονιδίου PSR στο δείγμα τυροπήγατος. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω μεθόδων όπως η αλληλούχιση ή οι τεχνικές υβριδοποίησης.

Με τη χρήση αυτών των τεχνικών, είναι δυνατή η προσδιορισμός της αναλογίας των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή τυριού και η παρακολούθηση της εξέλιξης της μικροβιακής κοινότητας κατά τη διάρκεια της παραγωγής του τυριού.

#### *4.1.2.1 Εκχύλιση του DNA*

Η διαδικασία εκχύλισης DNA στο τυρί ορού γάλακτος ξεκινά με τη συλλογή ενός δείγματος του τυριού ορού γάλακτος, το οποίο είναι το υγρό μέρος του τυριού που διαχωρίζεται κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού. Το δείγμα στη συνέχεια φιλτράρεται για να αφαιρεθούν τυχόν στερεά σωματίδια που ενδέχεται να επηρεάσουν τη διαδικασία εξαγωγής DNA. Στη συνέχεια, ένα χημικό διάλυμα προστίθεται στο φιλτραρισμένο δείγμα για να ανοίξει τα κύτταρα και να απελευθερωθεί το DNA. Αυτό το διάλυμα συνήθως περιέχει ένα απορρυπαντικό για τη διάλυση των κυτταρικών μεμβρανών, ένα άλας για την εξουδετέρωση του φορτίου στο DNA και ένα ένζυμο που ονομάζεται πρωτεάση για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που μπορούν να παρεμβαίνουν στην εξαγωγή του DNA. Το δείγμα στη συνέχεια υποβάλλεται σε μια σειρά βημάτων φυγοκέντρησης, τα οποία περιστρέφουν το δείγμα σε υψηλές ταχύτητες για να διαχωρίσουν το DNA από άλλα κυτταρικά συστατικά. Το DNA στη συνέχεια καθαρίζεται χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως χρωματογραφία στήλης ή καθίζηση, για να αφαιρεθούν τυχόν εναπομείνουσες ακαθαρσίες και να συμπυκνωθεί το DNA.

Τέλος, το καθαρισμένο DNA ποσοτικοποιείται και αναλύεται χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή η ηλεκτροφόρηση γέλης για να προσδιοριστεί η ποιότητα και η ποσότητα του. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς, όπως για τον εντοπισμό των βακτηριακών ειδών που υπάρχουν στο τυρί ορού γάλακτος ή τη δοκιμή για την παρουσία επιβλαβών ρύπων.

#### *4.1.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)*

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA. Είναι μια γρήγορη, απλή και ακριβής μέθοδος για τη διάκριση στενά συγγενών στελεχών γαλακτοβακίλλων. Περιλαμβάνει μια σειρά από κύκλους θερμοκρασίας που προκαλούν τη μετουσίωση των κλώνων του DNA (διαχωρίζονται), την ανόπτηση (σύνδεση μεταξύ τους) και την επιμήκυνση (επέκταση) χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο πολυμεράσης DNA.

Η αντίδραση PCR τυπικά περιλαμβάνει:

- ένα πρότυπο DNA (το DNA που πρόκειται να ενισχυθεί),

- εκκινητές (μικρές αλληλουχίες DNA που συνδέονται με την αλληλουχία DNA στόχο),
- νουκλεοτίδια (τα δομικά στοιχεία του DNA) και
- ένα ένζυμο πολυμεράσης DNA.

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας PCR, το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως γύρω στους 95°C) για να μετουσιωθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι. Αυτό ακολουθείται από ένα στάδιο ψύξης (συνήθως γύρω στους 55°C) για να επιτραπεί στους εκκινητές να ανόπτονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους στο πρότυπο DNA.

Μόλις οι εκκινητές έχουν ανόπτηση, η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά (συνήθως γύρω στους 72°C) για να επιτραπεί στο ένζυμο πολυμεράσης DNA να επιμηκύνει και να επεκτείνει τους εκκινητές, συνθέτοντας νέους κλώνους DNA. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται πολλές φορές (συνήθως 20-40 κύκλοι) για να ενισχυθεί η στοχευόμενη αλληλουχία DNA.

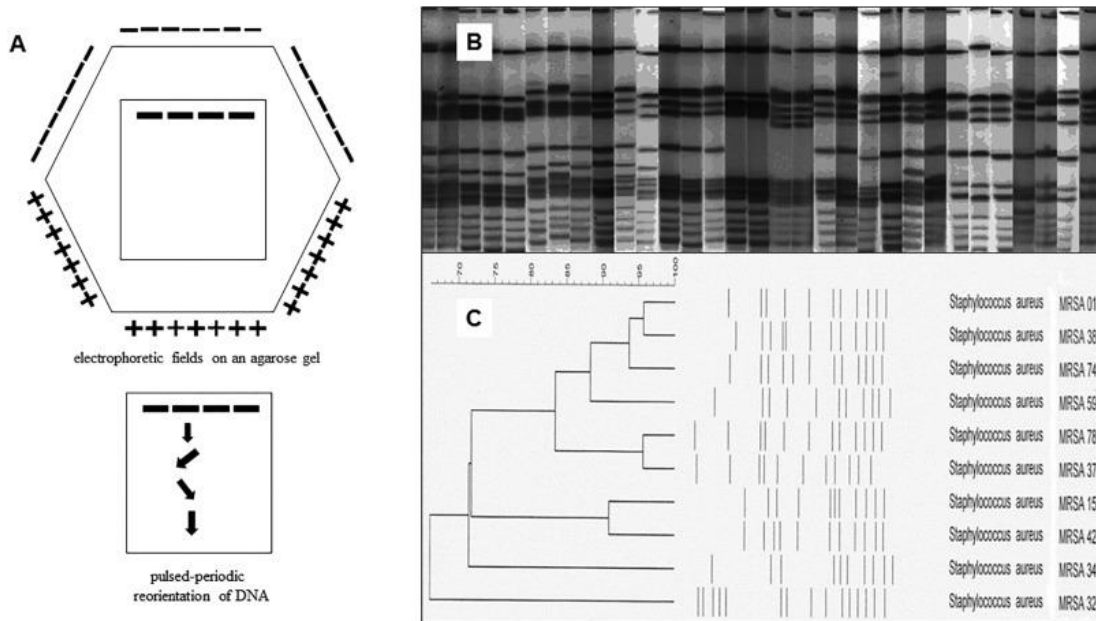
Αφού ολοκληρωθεί η ενίσχυση, τα προϊόντα PCR μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, όπως ηλεκτροφόρηση γέλης ή προσδιορισμό αλληλουχίας DNA, για να προσδιοριστεί η παρουσία ή η απουσία της αλληλουχίας DNA στόχου. Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως σε μια ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των διαγνωστικών δοκιμών, της γενετικής έρευνας και της εγκληματολογικής ανάλυσης.

#### *4.1.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA*

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (PFGE) αποτελεί μια προηγμένη μοριακή τεχνική για την ταυτοποίηση και τυποποίηση βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα διαφοροποιεί μεταξύ στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος LAB, ομαδοποιεί στελέχη μέσα σε ένα είδος, διακρίνει μεταξύ στελεχών διαφορετικών ειδών LAB και προσδιορίζει ακόμη και στελέχη που ανήκουν σε συγκεκριμένα είδη *Lactobacillus*. (Dheeraj MOHANIA, 2008)

Αυτή η τεχνική απαιτεί τη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης για το διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA περιορισμένου ενζύμου ή γονιδιώματος. Η PFGE θεωρείται η "μοριακή προσέγγιση τρίτης γενιάς" για την τυποποίηση βακτηρίων, ενώ η ανάλυση πλασμιδίων ανήκει στην πρώτη και δεύτερη γενιά αυτών των τεχνικών. (Hui-min Neoh, 2019)

Η κίνηση και ο διαχωρισμός των θραυσμάτων του γονιδιώματος στο PFGE βασίζεται στον παλμικό-περιοδικό αναπροσανατολισμό ηλεκτροφορητικών πεδίων σε μια γέλη αγαρόζης. Αυτό επιτρέπει τον διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA διαφόρων μεγεθών, από μερικά kb έως περίπου 4 Mbp, κάτι που επιτρέπει την καλύτερη πληροφόρηση και την κλωνική αντιστοίχιση των δοκιμασμένων βακτηρίων. (Hui-min Neoh, 2019)



Εικόνα 10. Σχηματικό διάγραμμα της κίνησης της ζώνης DNA σε γέλη PFGE και τα αντίστοιχα μοτίβα ζωνών PFGE που παράγονται. Α) Παλμικός-περιοδικός αναπροσανατολισμός του DNA σε γέλη PFGE. Β) Μοτίβα ζωνών PFGE. Γ) Δενδρόγραμμα κατασκευασμένο με βάση τα μοτίβα ζωνών PFGE, οι MRSA 011, MRSA 380 και MRSA 747 θεωρούνται στενά συνδεδεμένα στελέχη, καθώς έχουν μικρότερη από 3 διαφορές ζώνης στα πρότυπα ζωνών. Αντίθετα, τα MRSA 347 και MRSA 320 έχουν περισσότερες από επτά ζώνες διαφοράς μεταξύ τους και θεωρούνται μη συγγενικά στελέχη. (Hui-min Neoh, 2019)

Η ηλεκτροφόρηση DNA είναι μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Η διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός δείγματος DNA σε μια μήτρα γέλης και την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος της γέλης. Τα θραύσματα DNA στη συνέχεια μεταναστεύουν μέσω της γέλης με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, με μικρότερα θραύσματα να κινούνται πιο γρήγορα και πιο μακριά μέσα από το πήκτωμα από τα μεγαλύτερα θραύσματα. Η μήτρα γέλης που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση DNA είναι συνήθως κατασκευασμένη από αγαρόζη, ένα πολυμερές υδατάνθρακα που προέρχεται από φύκια. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με ανάμιξη σκόνης αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση του μείγματος για να διαλυθεί η

αγαρόζη. Το υγρό διάλυμα αγαρόζης στη συνέχεια χύνεται σε δίσκο χύτευσης, όπου στερεοποιείται καθώς ψύχεται. (Hui-min Neoh, 2019)

Για να προετοιμαστεί το δείγμα DNA για ηλεκτροφόρηση, το DNA αναμιγνύεται τυπικά με ένα ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης που περιέχει μια βαφή παρακολούθησης και έναν πιο πυκνό παράγοντα για να βοηθήσει το δείγμα DNA να βυθιστεί στα φρεάτια της γέλης. Το δείγμα DNA στη συνέχεια φορτώνεται σε φρεάτια στο ένα άκρο της γέλης χρησιμοποιώντας μια πιπέτα. Μόλις φορτωθεί το δείγμα DNA, εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα στο πήκτωμα, συνήθως τοποθετώντας το πήκτωμα σε θάλαμο ηλεκτροφόρησης γεμάτο με ρυθμιστικό διάλυμα με ηλεκτρόδια σε κάθε άκρο. Τα θραύσματα DNA στη συνέχεια μεταναστεύουν μέσω της μήτρας γέλης προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με μικρότερα θραύσματα να κινούνται ταχύτερα και μακρύτερα από τα μεγαλύτερα θραύσματα. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα θραύσματα DNA μπορούν να οραματιστούν με χρώση της γέλης με μια φθορίζουσα χρωστική όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων DNA και φθορίζει υπό υπεριώδες φως. Το προκύπτον σχέδιο των θραυσμάτων DNA στο πήκτωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και σύγκριση του μεγέθους και της ποσότητας των δειγμάτων DNA.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-Μελέτη ταυτοποίησης βακτηρίων σε ελληνικά μαλακά άσπρα τυριά με 16SRNA αλληλούχιση

### 1.Επιλογή δειγμάτων

Επιλέχθηκαν μαλακά άσπρα τυριά (3 ανθότυρα και 1 ξινομυζήθρα) από Ελληνικά σουπερ μάρκετ και έγινε δειγματοληψία για μικροβιολογική ανάλυση βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Συγκεκριμένα 25 γρ από κάθε τυρί ομογενοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες με 225 ml αποστειρωμένο ισότονο αραιωτικό υγρό σε σακούλα stomacher για 1 λεπτό. Στην συνέχεια, 1 ml από το εναιώρημα ενσωματώθηκε σε MRS άγαρ σε τρυβλία και έγινε επώαση σε αναερόβιες συνθήκες. Καταμετρήθηκαν οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία και υπολογίστηκε ο αρχικός αριθμός των βιώσιμων βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Σε όλα τα τυριά μετρήθηκαν σχετικά υψηλοί πληθυσμοί ( $10^4$ - $10^8$ ) ζωντανών βακτηρίων. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν 5 αντιπροσωπευτικές αποικίες από τα δείγματα για DNA ανάλυση και αλληλούχιση 16SRNA, όπως φαίνεται στην τελευταία στήλη.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΟΝΟΜΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ	Συσκευασία	ΗΜ/ΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΛΗΞΗΣ	pH (15/12/20 21)	pH (2/2/20 22)	cfu/mL (20/12/20 21)	cfu/mL (2/2/20 2)	Όνομασ ια δειγμάτων (αποικίες)
C2	Ξινομυζήθρα	Αιγοπρόβεια	packed	29/07/20 21	30/05/20 22	3,59	3,90	8,5 x $10^4$	9,9 x $10^6$	C206
C3	Ανθότυρο 1	Αιγοπρόβειο	packed	23/11/20 22	18/12/20 21	5,23	4,59	1,3 x $10^5$	5,1 x $10^6$	C311
C4	Ανθότυρο 2	Αγελαδινό ή αιγοπρόβειο	packed	9/11/20 21	8/1/20 22	6,40	5,10	1,8 x $10^7$	2,2 x $10^7$	C412
C6	Ανθότυρο 3	Αιγοπρόβειο	packed	10/12/20 21	1/1/20 22	5,45	4,90	1,6 x $10^7$	> 6,5 x $10^8$	C405/C4 12

### 2.Εκχύλιση DNA

Έγινε δειγματοληψία με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο από κάθε αποικία σε αποστειρωμένο σωληνάκι Eppendorf με ισότονο αραιωτικό αποστειρωμένο διάλυμα. Το DNA εκχυλίστηκε με αυτόματο εκχυλιστή (automatic extractor) και το kit εκχύλισης Nucleic Acid

Extraction Kit (ZYBIO Corporation, Chongqing, China). Η ποιότητα του εκχυλιζόμενου DNA ελέγχθηκε με φασματοφωτόμετρο υπολογίζοντας τον λόγο OD260/OD280 (Epoch spectrophotometer from Biotek Winooski, Winooski, VT, US).

### 3. PCR

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές (primers) για την ενίσχυση των περιοχών V1-V3 του γονιδίου 16S RNA των βακτηρίων.

sequencing of the 16S V1–V3 hypervariable region

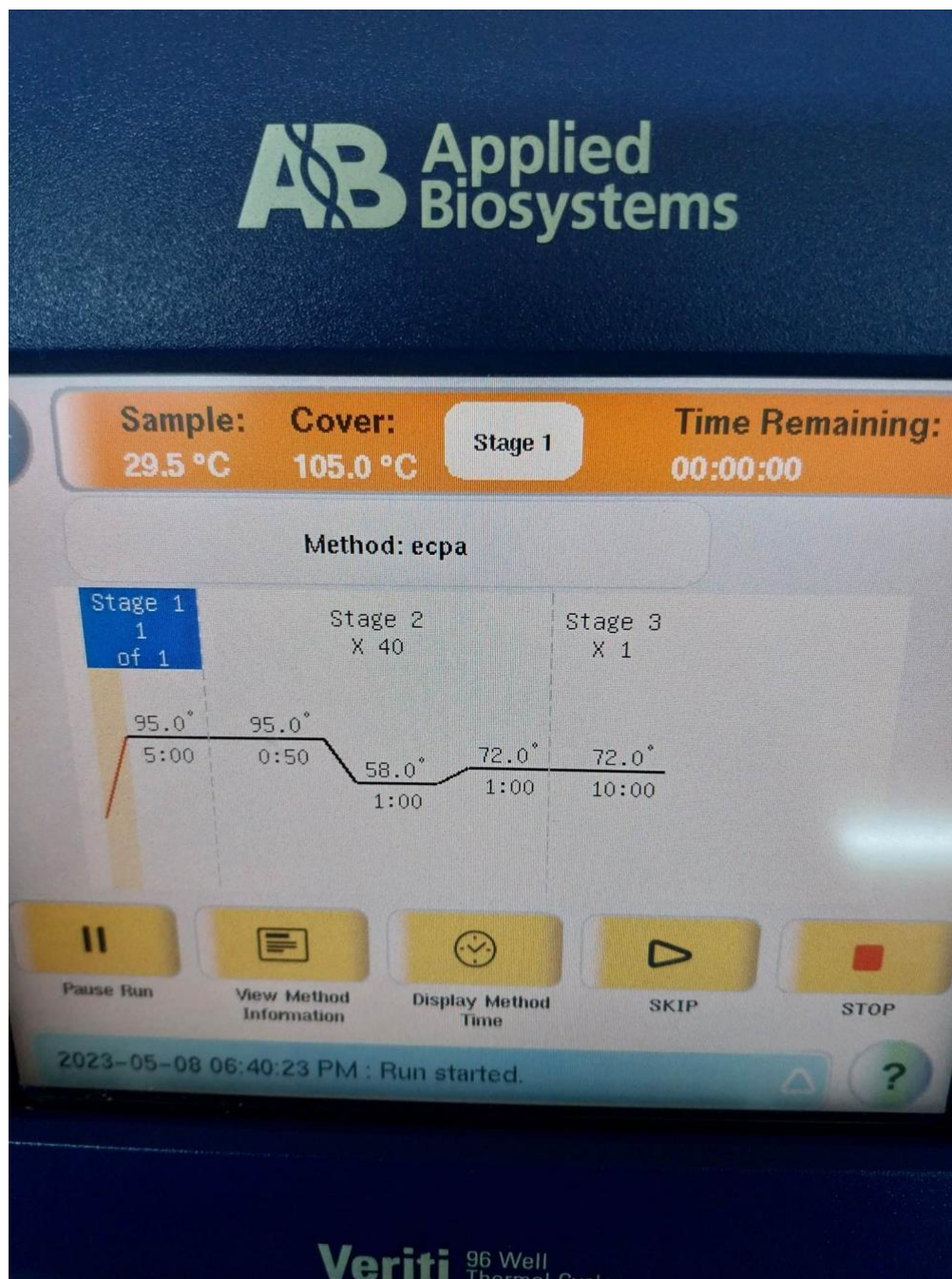
V1 – V3	Illumina_16S_27F (Forward Primer)	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAGTTTGATCMTGG CTCAG
	Illumina_16S_53 4R (Reverse Primer)	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATTACCGCGGCTGCT GG

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR έγινε με τις παρακάτω συνθήκες:

1 κύκλος 5 min στους 95 °C και στην συνέχεια

40 κύκλοι από 0.5 min στους 96 °C, 1min στους 58 °C, και 1min στους 72 °C,

Τελική επιμήκυνση 10 min στους 72 °C.



Εικόνα 11. Η αντίδραση PCR υφίσταται μια σειρά κύκλων θερμοκρασίας που προκαλούν τη μετουσίωση του DNA, την ανόπτηση με τους εκκινητές και στη συνέχεια την επέκταση με την πολυμεράση Taq.

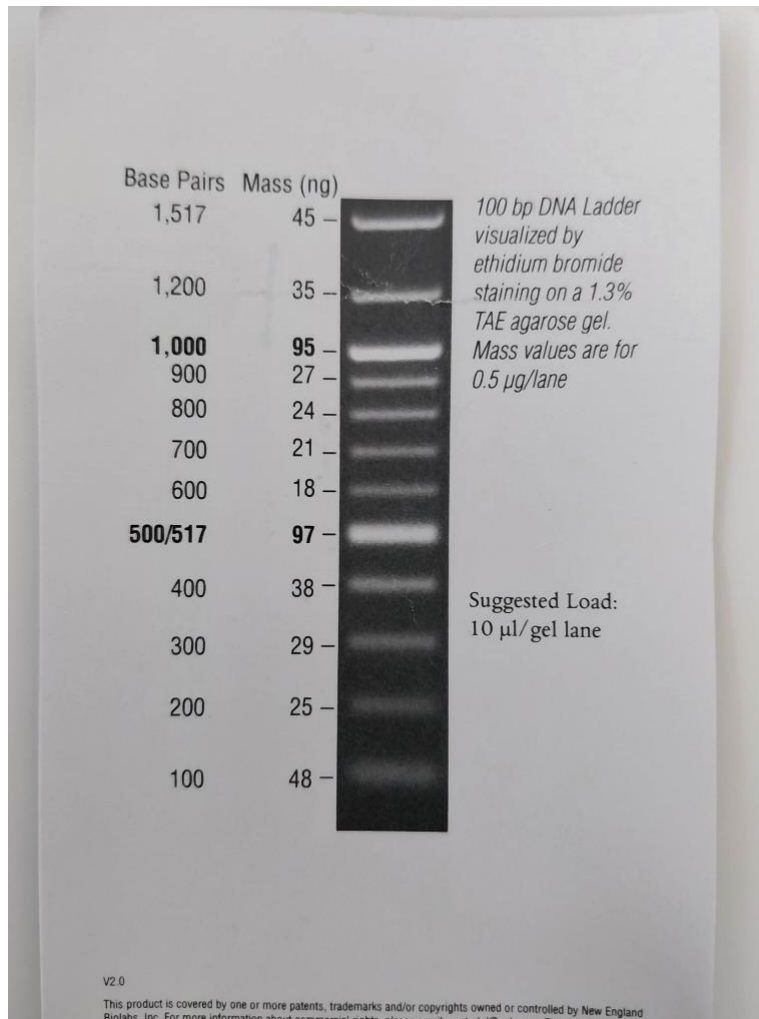
#### 4. Ηλεκτροφόρηση DNA

Τα προϊόντα PCR ελέγχθηκαν σε ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης {2.0% (w/v) agarose gel} με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 g/mL, Sigma, Kanagawa, Japan).

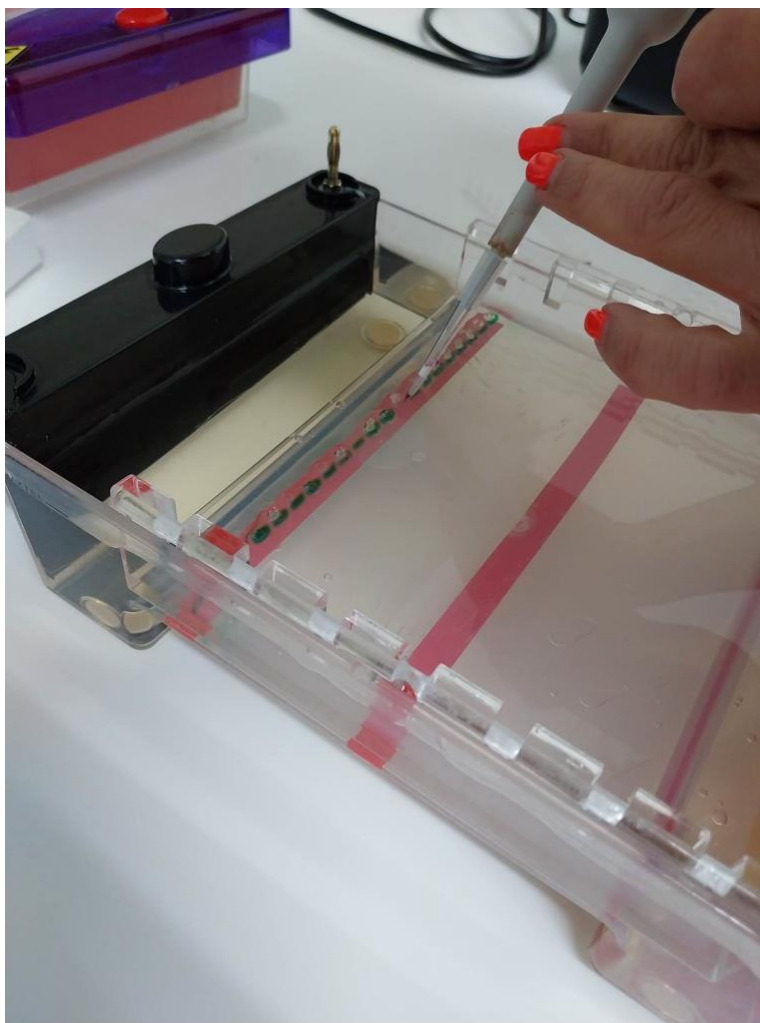


Εικόνα 12. PCR προϊόντα (amplicons)

Χρησιμοποιήθηκε πρότυπο δείγμα με γνωστά μοριακά βάρη μορίων DNA (100 bp-1517bp, DNA ladder, Invitrogen, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση έτρεξε για 1 ώρα στα 120V και έπειτα το gel φωτογραφήθηκε με το σύστημα MiniBIS Pro device (DNR Bio- Imaging Systems Ltd., Neve Yamin, Israel) σε UV ακτινοβολία.



Εικόνα 13. Πρότυπα μοριακά βάρη μορίων DNA (DNA ladder)



Εικόνα 14. Φόρτωση δειγμάτων στο gel στην συσκευή ηλεκτροφόρησης

### 5. Αλληλούχιση δειγμάτων

Τα παρακάτω δείγματα αλληλουχήθηκαν με μέθοδο 16S RNA Sanger (αναλυτής ABI3730xl, CeMIA SA) με χρήση των δύο εκκινήτων.

1	SAMPLE 6 (C405)
2	SAMPLE 7 (C206)
3	SAMPLE 8 (C608)
4	SAMPLE 9 (C311)
5	SAMPLE 10 (C412)

Οι αλληλουχίες που λαμβάνονται σε αρχεία μορφής .fasta εξετάζονται στο σύστημα BLAST (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για το ποσοστό ομοιότητας με αλληλουχίες 16S που έχουν καταχωρηθεί στο σύστημα.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

#### 1. BLAST nucleotides

BLAST® » blastn suite

#### 2. Enter Query Sequence

- Καταχώρηση της αλληλουχίας στο πλαίσιο

#### 3. Choose Search Set

- rRNA/ITS databases
- 16S ribosomal RNA sequences (bacteria and archaea)

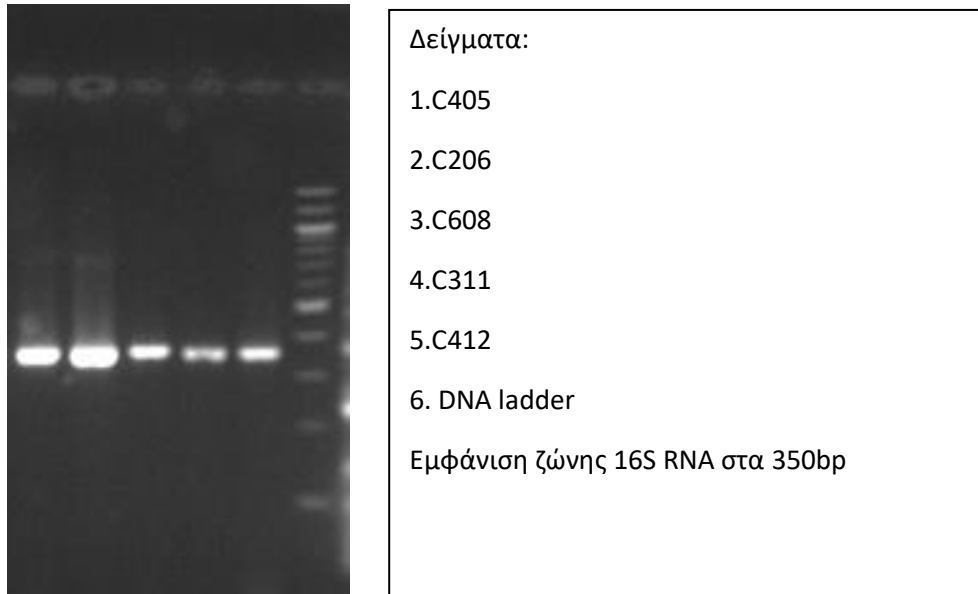
#### 4. Program Selection

- Highly similar sequences (megablast) ή
- Somewhat similar sequences (blastn)

#### 5. BLAST

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση DNA έδειξε ότι όλα τα δείγματα περιέχουν το γονίδιο 16SRNA το οποίο πολλαπλασιάστηκε από τους εκκινητές και έδωσε ορατές ζώνες DNA στα 350 bp, όπως φαίνεται στην παρακάτω φωτογραφία.



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

Στην συνέχεια οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν στο σύστημα BLAST και έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

### ΔΕΙΓΜΑ 1: C405

20200312CS1P1\_C03\_2020-03-17.ab1

Forward primer

```
GGGGSTTSGGRGTGCAACTCCCTAACCATTGTGACGTTACCTATACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGGTTT  
ACCCCCGGGCGCCCTGGGCCCCACCGCGGGCGCCCGGAGGTCACCAAACCTTTGATAATTTATGGCCTCTC  
TGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
```

>20200312CS1P2\_D03\_2020-03-17.ab1

Reverse primer



CRAWCGTTGATGAAGTTTTGACTTATTCAGTACAGAAGACTCAGAGAGGCCATAAATTATCAAGAGTTTGGTGAC  
 CTCCGGCGGGCGCCCGCGGTGGGGCCAGGGGCGCCCGGGGGTAAACCCCGGGGCCCGCCGCGCAAGCAACG  
 GTATAGGTAACGTTCAATGGTTTAGGGAGTTTTGCAACTCTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Select seq NR_14462 0.1	<a href="#">Cuniculiplasma divulgatum strain S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Cuniculiplasma divulgatum</a>	41.0	41.0	12%	0.004	92.59%	1469 <a href="#">NR_14462.0.1</a>
Select seq NR_10394 1.1	<a href="#">Ferropasma acidarmanus Fer1 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	<a href="#">Ferropasma acidarmanus Fer1</a>	41.0	41.0	12%	0.004	92.59%	1471 <a href="#">NR_10394.1.1</a>
Select seq NR_07422 3.1	<a href="#">Thermoplasma volcanium strain GSS1 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	<a href="#">Thermoplasma volcanium</a>	41.0	41.0	12%	0.004	92.59%	1474 <a href="#">NR_07422.3.1</a>
Select seq NR_02823 5.1	<a href="#">Thermoplasma acidophilum strain 122-1B2 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	<a href="#">Thermoplasma acidophilum</a>	41.0	41.0	12%	0.004	92.59%	1471 <a href="#">NR_02823.5.1</a>

**Στο δείγμα C405 ταυτοποιήθηκε με χαμηλό ποσοστό ταυτοποίησης 92,59% ο μικροοργανισμός *Cuniculiplasma divulgatum***

**ΔΕΙΓΜΑ 2 (C206)**

20230601AS2P1\_B07\_2023-06-02.ab1

Forward primer

TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
 AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCAT  
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCGC  
 TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAWACCCSKGTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGSCC  
 CMMMMCGARACAA

Reverse primer

20230601AS2P2\_B08\_2023-06-02.ab1

TAATGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCARAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC  
 CATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGA  
 CCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCC  
 GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCKGCTGGCACCTGTCTTATACACATCTGACSCYGSCMMGACR  
 ARACA

Αποτελέσματα forward primer:

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_152049.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	522	522	88%	8e-148	98.90%	1395	<a href="#">NR_113935.1</a>

Select seq NR_1139 34.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1393</a> <a href="#">4.1</a>
Select seq NR_1139 31.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1393</a> <a href="#">1.1</a>
Select seq NR_1139 27.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 4	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1392</a> <a href="#">7.1</a>
Select seq NR_1139 06.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain NBRC 100490 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 6	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">6.1</a>
Select seq NR_1139 04.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">4.1</a>
Select seq NR_1139 03.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100485 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">3.1</a>
Select seq NR_1139 02.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">2.1</a>
Select seq NR_1139 01.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">1.1</a>
Select seq NR_1135 74.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain NBRC 3181 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1357</a> <a href="#">4.1</a>
Select seq NR_0750 22.1	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 5 6 3	<a href="#">NR_0</a> <a href="#">7502</a> <a href="#">2.1</a>
Select seq NR_1170 43.1	<a href="#">Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus rivorum</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 7 9	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1704</a> <a href="#">3.1</a>
Select seq NR_1139 00.1	<a href="#">Enterococcus durans strain NBRC 100479 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - %	98. 90 %	1 4	<a href="#">NR_1</a> <a href="#">1390</a> <a href="#">0.1</a>

Select seq NR_1132 56.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain JCM 8729 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	14 8 8e -	98. 90 %	1 4 8 2	<a href="#">NR_1 1325 6.1</a>
Select seq NR_1192 93.1	<a href="#">Enterococcus dispar strain NCIMB 13000 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 3 9 7	<a href="#">NR_1 1929 3.1</a>
Select seq NR_1147 43.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain DSM 20160 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 3 5	<a href="#">NR_1 1474 3.1</a>
Select seq NR_1147 42.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 3 3	<a href="#">NR_1 1474 2.1</a>
Select seq NR_1144 52.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain ATCC 8043 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 0 7	<a href="#">NR_1 1445 2.1</a>
Select seq NR_0407 89.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 1 7	<a href="#">NR_0 4078 9.1</a>
Select seq NR_0370 82.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 3 5	<a href="#">NR_0 3708 2.1</a>
Select seq NR_0369 22.1	<a href="#">Enterococcus durans strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 3 4	<a href="#">NR_0 3692 2.1</a>
Select seq NR_0369 21.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain 88-5474 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 5 1 2	<a href="#">NR_0 3692 1.1</a>
Select seq NR_1157 65.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 4 8 3	<a href="#">NR_1 1576 5.1</a>
Select seq NR_1175 62.1	<a href="#">Enterococcus lactis strain BT159 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus lactis</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e -	98. 90 %	1 4 3 7	<a href="#">NR_1 1756 2.1</a>

Select seq NR_0419 33.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain DS 2705-87 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 5 0 3	<a href="#">NR_0 4193 3.1</a>
Select seq NR_0249 06.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 5 2 9	<a href="#">NR_0 2490 6.1</a>
Select seq NR_0249 04.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 5 1 4	<a href="#">NR_0 2490 4.1</a>
Select seq NR_1157 64.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain ATCC 19434 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 2	<a href="#">NR_1 1576 4.1</a>
Select seq NR_1132 57.1	<a href="#">Enterococcus durans strain JCM 8725 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 4 8 2	<a href="#">NR_1 1325 7.1</a>
Select seq NR_0423 86.1	<a href="#">Enterococcus canintestini strain LMG 13590 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canintestini</a>	5 2 2	5 2 2	88 % %	8e - 14 8	98. 90 %	1 5 1 1	<a href="#">NR_0 4238 6.1</a>

Αποτελέσματα reverse primer:

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1395	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1501	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1550	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1406	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1484	<a href="#">NR_113935.1</a>
Select seq NR_113934.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1485	<a href="#">NR_113934.1</a>
Select seq NR_113931.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1485	<a href="#">NR_113931.1</a>
Select seq NR_113927.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1484	<a href="#">NR_113927.1</a>
Select seq NR_113906.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain NBRC 100490 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1486	<a href="#">NR_113906.1</a>
Select seq NR_113904.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1485	<a href="#">NR_113904.1</a>
Select seq NR_113903.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100485 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	1426	<a href="#">NR_113903.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Access. Len	Accession
Select seq NR_113902.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_113902.1</a>
Select seq NR_113901.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_113901.1</a>
Select seq NR_113574.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain NBRC 3181 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113574.1</a>
Select seq NR_075022.1	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 6 3	<a href="#">NR_075022.1</a>
Select seq NR_117043.1	<a href="#">Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus rivorum</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 7 9	<a href="#">NR_117043.1</a>
Select seq NR_113900.1	<a href="#">Enterococcus durans strain NBRC 100479 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113900.1</a>
Select seq NR_113256.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain JCM 8729 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 8 2	<a href="#">NR_113256.1</a>
Select seq NR_119293.1	<a href="#">Enterococcus dispar strain NCIMB 13000 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 3 9 7	<a href="#">NR_119293.1</a>
Select seq NR_114743.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain DSM 20160 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 3 5	<a href="#">NR_114743.1</a>
Select seq NR_114742.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 3 3	<a href="#">NR_114742.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	Accession
Select seq NR_1144 52.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain ATCC 8043 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 0 7	<a href="#">NR_1144_2.1</a>
Select seq NR_0407 89.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 1 7	<a href="#">NR_0407_9.1</a>
Select seq NR_0370 82.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 3 5	<a href="#">NR_0370_2.1</a>
Select seq NR_0369 22.1	<a href="#">Enterococcus durans strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 3 4	<a href="#">NR_0369_2.1</a>
Select seq NR_0369 21.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain 88-5474 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 1 2	<a href="#">NR_0369_1.1</a>
Select seq NR_1157 65.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 8 3	<a href="#">NR_1157_5.1</a>
Select seq NR_1175 62.1	<a href="#">Enterococcus lactis strain BT159 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus lactis</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 4 3 7	<a href="#">NR_1175_2.1</a>
Select seq NR_0419 33.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain DS 2705-87 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 0 3	<a href="#">NR_0419_3.1</a>
Select seq NR_0249 06.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 2 9	<a href="#">NR_0249_6.1</a>
Select seq NR_0249 04.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	5 2 3	5 2 3	86 % 	4e - 14 8	99. 26 %	1 5 1 4	<a href="#">NR_0249_4.1</a>



Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_115764.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain ATCC 19434 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	148	<a href="#">NR_115764.1</a>
Select seq NR_113257.1	<a href="#">Enterococcus durans strain JCM 8725 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	148	<a href="#">NR_113257.1</a>
Select seq NR_042386.1	<a href="#">Enterococcus canintestini strain LMG 13590 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canintestini</a>	523	523	86%	4e-148	99.26%	148	<a href="#">NR_042386.1</a>

Στο δείγμα C206, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 99,26% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*.

**ΔΕΙΓΜΑ 3 (C608)**

20230601AS3P1\_C07\_2023-06-02.ab1

Αποτελέσματα forward primer

TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCCAT  
GTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGC  
TGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAWACCCSRGTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGASCC  
CMMMCGAGACAA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percent Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_1133 35.1	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum</a>	5 2 0	520 2e-147 98.90%	87%			1 5 0 1	<a href="#">NR_1133_35.1</a>
Select seq NR_1049 27.1	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum strain CIP 102980 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum</a>	5 2 0	520 147 98.90%	87%	2e-		1 5 0 2	<a href="#">NR_1049_27.1</a>

Αποτελέσματα reverse primer

20230601AS3P2\_C08\_2023-06-02.ab1

CGTAGTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTCGCCACTG  
GTGTTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTACCCTCTTCTGCACTCAAG  
TTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAACCGCCT  
GCACTCTCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCKGCTGGCAC  
CTGTCTCTTATACACATCTGAACTKKSCCCAACGARACA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Ma x Sc o r e	To tal Sc o r e	Q u e r y C o v e r	E v a l u e	Per - I d e n t	Ac c. L e n	Accession
Select seq NR_1133 35.1	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum</a>	5 2 0	5 2 0	86 % %	3e - 14 7	99 .6 3 %	1 5 0 1	<a href="#">NR_1133_35.1</a>
Select seq NR_1049 27.1	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum strain CIP 102980 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Limosilactobacillus fermentum</a>	5 2 0	5 2 0	86 % %	3e - 14 7	99 .6 3 %	1 5 0 2	<a href="#">NR_1049_27.1</a>

Στο Δείγμα C608, το είδος *Limosilactobacillus fermentum* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές (98,9 και 99,63% percentage identity)

#### ΔΕΙΓΜΑ 4: C311

20230601AS4P1\_D07\_2023-06-02.ab1

Αποτελέσματα forward primer

TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA  
GGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAWAC  
CCSKGTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGASCCMMCGAGAMCA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Percent Ident	Accession	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1395	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1501	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1500	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1406	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1404	<a href="#">NR_113935.1</a>
Select seq NR_113934.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1405	<a href="#">NR_113934.1</a>
Select seq NR_113931.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1405	<a href="#">NR_113931.1</a>
Select seq NR_113927.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	520	520	88%	2e-147	98.0%	1404	<a href="#">NR_113927.1</a>

20230601AS4P2\_D08\_2023-06-02.ab1

Αποτελέσματα reverse primer

ACATAGTTTGTCCCCACGCTTTCAGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGARAGCCGCCTTCGCCAC  
 TGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTCTCTTCTGCACTCAA  
 GTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCC  
 TGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCKGCTGGCA  
 CCTGTCTTATACACATCTGACGCTKGSCCCAACRARACAA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Coverage	E-value	Percentage Identity	Accession	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	135	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	150	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	155	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	146	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	148	<a href="#">NR_113935.1</a>
Select seq NR_113934.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	148	<a href="#">NR_113934.1</a>
Select seq NR_113931.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	148	<a href="#">NR_113931.1</a>
Select seq NR_113927.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	148	<a href="#">NR_113927.1</a>
Select seq NR_113906.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain NBRC 100490 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	503	503	85%	3e-142	98.9%	148	<a href="#">NR_113906.1</a>

Στο δείγμα C311, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 98,89% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*

## ΔΕΙΓΜΑ 5 (C412)

20230601AS5P1\_E07\_2023-06-02.ab1

Αποτελέσματα forward primer

TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA  
GGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTCTGTGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAWAC  
CCSWGTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGASCCMMCGAGAMCA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Percent	Accession	Accession
Select seq NR_152049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	135	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	150	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	155	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	146	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	148	<a href="#">NR_113935.1</a>
Select seq NR_113934.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	148	<a href="#">NR_113934.1</a>
Select seq NR_113931.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	148	<a href="#">NR_113931.1</a>
Select seq	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar</a>	518	518	88%	7e-147	98.0%	144	<a href="#">NR_113927.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Per. Ident	Acc. Len	Accession
NR_113 927.1		<a href="#">ATCC 51266</a>				14 7	0 %	8 4	

20230601AS5P2\_E08\_2023-06-02.ab1

Αποτελέσματα reverse primer

ACAATAGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC  
 TGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTCTCTCTTCTGCACTCAA  
 GTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCC  
 TGCCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCKGCTGGCA  
 CCTGTCTTTATACACATCTGASCYKSCCAACGARACAA

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_152 049.1	<a href="#">Enterococcus saigonensis strain VE80 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus saigonensis</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 3 9 5	<a href="#">NR_152049.1</a>
Select seq NR_181 559.1	<a href="#">Enterococcus larvae strain BWM-S5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus larvae</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 5 0 1	<a href="#">NR_181559.1</a>
Select seq NR_114 783.2	<a href="#">Enterococcus hirae strain LMG 6399 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 5 5 0	<a href="#">NR_114783.2</a>
Select seq NR_125 610.1	<a href="#">Enterococcus olivae strain IGG16.11 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus olivae</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 0 6	<a href="#">NR_125610.1</a>
Select seq NR_113 935.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain NBRC 100699 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 4	<a href="#">NR_113935.1</a>



Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_113 934.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain NBRC 100698 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113934.1</a>
Select seq NR_113 931.1	<a href="#">Enterococcus canis strain NBRC 100695 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canis</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113931.1</a>
Select seq NR_113 927.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 strain NBRC 100678 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 4	<a href="#">NR_113927.1</a>
Select seq NR_113 906.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain NBRC 100490 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 6	<a href="#">NR_113906.1</a>
Select seq NR_113 904.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113904.1</a>
Select seq NR_113 903.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain NBRC 100485 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_113903.1</a>
Select seq NR_113 902.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_113902.1</a>
Select seq NR_113 901.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 2 6	<a href="#">NR_113901.1</a>
Select seq NR_113 574.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain NBRC 3181 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 8 5	<a href="#">NR_113574.1</a>
Select seq NR_075 022.1	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae ATCC 9790</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 5 6 3	<a href="#">NR_075022.1</a>
Select seq NR_117 043.1	<a href="#">Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus rivorum</a>	5 2 1	5 2 1	85 % %	1e - 14 7	99 .6 3 %	1 4 4	<a href="#">NR_117043.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
						147	3%	79	
Select seq NR_113 900.1	<a href="#">Enterococcus durans strain NBRC 100479 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	148	<a href="#">NR_113900.1</a>
Select seq NR_113 256.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain JCM 8729 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	148	<a href="#">NR_113256.1</a>
Select seq NR_119 293.1	<a href="#">Enterococcus dispar strain NCIMB 13000 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	149	<a href="#">NR_119293.1</a>
Select seq NR_114 743.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain DSM 20160 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	153	<a href="#">NR_114743.1</a>
Select seq NR_114 742.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	153	<a href="#">NR_114742.1</a>
Select seq NR_114 452.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain ATCC 8043 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	150	<a href="#">NR_114452.1</a>
Select seq NR_040 789.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	151	<a href="#">NR_040789.1</a>
Select seq NR_037 082.1	<a href="#">Enterococcus hirae strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus hirae</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	153	<a href="#">NR_037082.1</a>
Select seq NR_036 922.1	<a href="#">Enterococcus durans strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	154	<a href="#">NR_036922.1</a>
Select seq NR_036 921.1	<a href="#">Enterococcus villorum strain 88-5474 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus villorum</a>	521	522	85%	1e-147	99.6%	152	<a href="#">NR_036921.1</a>

Select for downloading or viewing reports	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Select seq NR_115765.1	<a href="#">Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecalis</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_115765.1</a>
Select seq NR_117562.1	<a href="#">Enterococcus lactis strain BT159 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus lactis</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_117562.1</a>
Select seq NR_041933.1	<a href="#">Enterococcus ratti strain DS 2705-87 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus ratti</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_041933.1</a>
Select seq NR_024906.1	<a href="#">Enterococcus mundtii strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus mundtii</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_024906.1</a>
Select seq NR_024904.1	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus dispar ATCC 51266</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_024904.1</a>
Select seq NR_115764.1	<a href="#">Enterococcus faecium strain ATCC 19434 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus faecium</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_115764.1</a>
Select seq NR_113257.1	<a href="#">Enterococcus durans strain JCM 8725 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus durans</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_113257.1</a>
Select seq NR_042386.1	<a href="#">Enterococcus canintestini strain LMG 13590 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Enterococcus canintestini</a>	521	521	85%	1e-147	99.63%	1483	<a href="#">NR_042386.1</a>

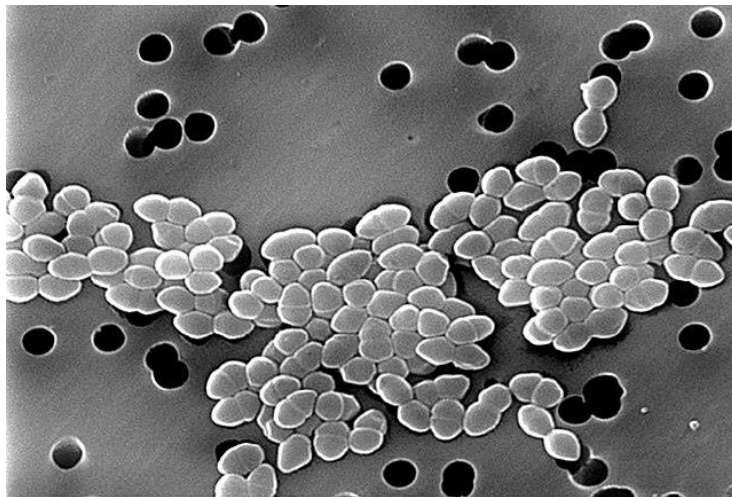
Στο δείγμα C412, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 99,63% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*

## Τελικός πίνακας αποτελεσμάτων ταυτοποίησης μέσω αλληλούχισης 16S RNA

A/A	Περιγραφή	Μικροοργανισμός	% ταυτοποίηση
1	C206	<i>Enterococcus saigonensis</i>	98,90%
2	C311	<i>Enterococcus saigonensis</i>	98,90%
3	C405	<i>Cuniculiplasma divulgatum</i>	92,59%
4	C412	<i>Enterococcus saigonensis</i>	99,6%
5	C608	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99,63%

### *Enterococcus saigonensis*

Ο *Enterococcus saigonensis* VE80<sup>T</sup> είναι ένα είδος βακτηρίων που ανήκει στο γένος *Enterococcus* και πήρε το όνομά του από το Saigon, το προηγούμενο όνομα της πόλης Ho Chi Minh στο Βιετνάμ. Τα κύτταρα του είναι Gram θετικά, προαιρετικά αναερόβια, μη κινητά, μη σποριοποιημένα, σφαιρικοί ή ωσειδείς κόκκοι, που εμφανίζονται ως μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη κυττάρων ή αλυσίδες τριών κυττάρων.



Εικόνα 16. *Enterococcus*

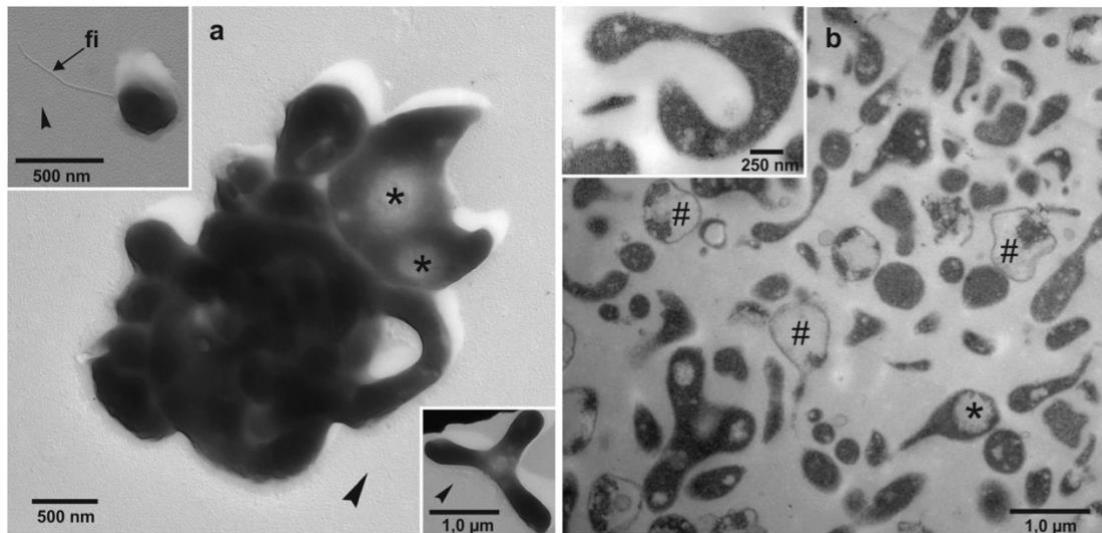
Πολλά είδη *Enterococcus* θεωρούνται αβλαβή, ωστόσο μερικά μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις, ειδικά σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. (Tetsuya Harada, 2016)

Έρευνες που διεξήχθησαν το στέλεχος *Enterococcus saigonensis* που φιλοξενεί vanA και ανθεκτικό στην βανκομυκίνη απομονώθηκε από λιανικό κρέας κοτόπουλου και σουκίτι τον Δεκέμβριο του 2012. (Tetsuya Harada, 2016)

Η βανκομυκίνη είναι ένα είδος αντιβιοτικού που ανήκει στην κατηγορία των γλυκοπεπτιδίων. Έχει μεγάλη σημασία για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από εντερόκοκκους, οι οποίοι είναι μια κατηγορία μικροβίων που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές παθήσεις στον άνθρωπο. Ωστόσο, παρόλο που η βανκομυκίνη είναι αποτελεσματική κατά πολλών στελεχών εντερόκοκκων, έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένες παραλλαγές του εντερόκοκκου έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (γνωστές και ως VRE). Αυτό σημαίνει ότι η βανκομυκίνη μπορεί να αποδυναμώνεται στην ικανότητά της να καταπολεμήσει ορισμένες λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτούς τους ανθεκτικούς στελέχους. Αυτή η ανθεκτικότητα δημιουργεί προκλήσεις στον τομέα της θεραπείας, καθώς μειώνει τις επιλογές των αντιβιοτικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων. (Tetsuya Harada, 2020)

#### *Cuniculiplasma divulgatum*

Το "*Cuniculiplasma divulgatum*" ανήκει στα Αρχαία, σε μια νέα οικογένεια, *Cuniculiplasmataceae* της τάξης *Thermoplasmatales*. Το όνομα του είδους "*divulgatum*" προέρχεται από τη λατινική λέξη "*divulgatus*", που σημαίνει "δημοσιεύτηκε" ή "έγινε γνωστό" και πιθανότατα αναφέρεται στην ανακάλυψη και δημοσίευσή του στην επιστημονική βιβλιογραφία. Τα κύτταρα του είναι όξινα, μεσόφιλα, οργανοτροφικά και προαιρετικά αναερόβια στελέχη χωρίς κυτταρικό τοίχωμα που απομονώθηκαν από όξινους υμένες που σχηματίστηκαν στις επιφάνειες θειικών αποθέσεων που περιέχουν μέταλλευμα χαλκού. (Olga V. Golyshina, 2016)



Εικόνα 17. Υπερδομή του στελέχους S5T. (α) Σύμπλεγμα κυττάρων, τα οποία εμφανίζονται μάλλον πλειομορφικά όταν παρασκευάζονται ως κύτταρα πλήρους τοποθέτησης και με αντίθεση PtC-σκιάς (αιχμή βέλους, κατεύθυνση σκιάς, βέλος, δακτυλιοειδές κελί). Όταν παρατηρούνται σε εξαιρετικά λεπτές τομές (b, c), τα κύτταρα περιβάλλονται από μία μονάδα μεμβράνης (cm) και γενικά παρουσιάζουν ένα πυκνά συσκευασμένο κυτταρόπλασμα χωρίς διακριτά εγκλείσματα.

Το *Cuniculiplasma divulgatum* απομονώθηκε για πρώτη φορά από το έντερο κουνελιών (*Oryctolagus cuniculus*). Όπως όλα τα μέλη των *Thermoplasmatales* που χαρακτηρίζονται ως μικροοργανισμοί, είναι δύσκολο να απομονωθούν και παρουσιάζουν εξαιρετικά όξινο pH ανάπτυξης λόγω της έλλειψης ενός άθικτου κυτταρικού τοιχώματος.

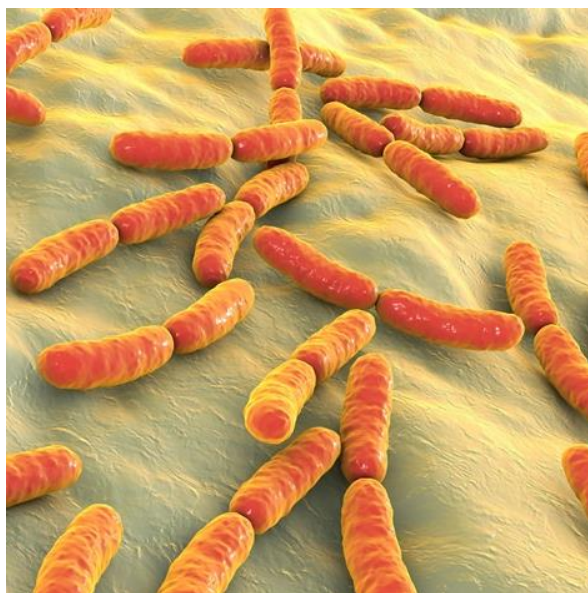
Εκτός από τα χαρακτηριστικά για το γένος, το μικρόβιο "*Cuniculiplasma divulgatum*" αναπτύσσεται σε συγκεκριμένες συνθήκες σε εύρος θερμοκρασίας από 10°C έως 48°C, με το ιδανικό να βρίσκεται στους 37°C έως 40°C και εύρος pH από 0,5 έως 4,0, με το βέλτιστο να είναι ανάμεσα στο 1,0 και 1,2. Επίσης χαρακτηρίζεται ως οργανοετερότροφο, δηλαδή χρειάζεται εξωτερική πηγή οργανικής ύλης για την ανάπτυξή του. Επιβιώνει και αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα βοείου κρέατος και μαγιάς ως την πηγή των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών. (Olga V. Golyshina, 2016)

Το *C. divulgatum* και άλλοι συγγενείς οργανισμοί πριν από την απομόνωσή τους χαρακτηρίστηκαν ως "G-πλάσμα" και εντοπίστηκαν σε μεταγονιδιαματικές αλληλουχίες σε όξινα περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο. Ανάμεσα σε αυτά τα

περιβάλλοντα περιλαμβάνονται τα συστήματα όξινης αποστράγγισης ορυχείων (AMD), τα οποία παράγουν υψηλά επίπεδα ρύπανσης μέσω της παραγωγής εξαιρετικά όξινων και πλούσιων σε βαρέα μέταλλα υδάτων. (Rafael Bargiela, 2020)

#### *Limosilactobacillus fermentum*

Το *L. fermentum* χαρακτηρίζεται ως ένα Gram-θετικό, ραβδοειδές ή κοκκοειδές, ετεροζυμωτικό και αναερόβιο ή αεροανεκτικό βακτήριο. Είναι ένα είδος με πολλά στελέχη που έχουν απομονωθεί από διαφορετικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των ζυμωτικών φυτικών υλικών, των γαλακτοκομικών προϊόντων, του ψωμιού, των λουκάνικων που έχουν υποστεί φυσική ζύμωση, του μητρικού γάλακτος, του σάλιου και των ανθρώπινων περιττωμάτων. (María Jesús Rodríguez-Sojo, 2021)



Εικόνα 18. *Limosilactobacillus fermentum*

Πολλά στελέχη του *L. fermentum* έχουν αποδειχθεί ευεργετικά σε προκλινικές μελέτες, όπως μελέτες in vitro και in vivo, καθώς και σε ανθρώπινες δοκιμές. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφορετικών προβιοτικών παρασκευασμάτων για ιατρική χρήση και διαδικασίες συντήρησης τροφίμων.

Στην πραγματικότητα, το *L. Fermentum* είναι ένα είδος που έχει υποστεί λεπτομερή μελέτη, κυρίως λόγω της δράσης του στη βελτίωση της μεταβολικής λειτουργίας και αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες καθώς και στην διαχείριση του σακχαρώδους

διαβήτη (ΣΔ).Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανακουφίσει από τα συμπτώματα που σχετίζονται με μεταβολικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης, του ελέγχου του λιπιδικού προφίλ, της μείωσης των προφλεγμονωδών κυτοκινών και της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. (Diego Cabral Lacerda, 2022)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Συμπερασματικά:

- Στο δείγμα C405 ταυτοποιήθηκε με χαμηλό ποσοστό ταυτοποίησης 92,59% ο μικροοργανισμός *Cuniculiplasma divulgatum*.
- Στο δείγμα C206, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 99,26% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*.
- Στο Δείγμα C608, το είδος *Limosilactobacillus fermentum* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές (98,9 και 99,63% percentage identity)
- Στο δείγμα C311, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 98,89% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*.
- Στο δείγμα C412, το είδος *Enterococcus saigonensis* ταυτοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές με 98,90% και 99,63% percentage identity. Όμως και άλλα είδη *Enterococcus* έχουν βγάλει τα ίδια ποσοστά, οπότε υπάρχει πιθανότητα ο μικροοργανισμός να ανήκει σε κάποιο άλλο είδος του γένους *Enterococcus*.
- το 16S rRNA αποτελεί ένα ουσιαστικό εργαλείο στον τομέα της μικροβιολογίας, επιτρέποντας στους ερευνητές να εξερευνήσουν τον κόσμο των μικροβίων και να κατανοήσουν τις σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος τους.
- Επιπλέον η χρήση αυτής της τεχνολογίας του μοριακού χαρακτηρισμού είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της αναλογίας των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή τυριού, την ταυτοποίηση και την ταξινόμηση τους καθώς και τη παρακολούθηση της εξέλιξης της μικροβιακής κοινότητας κατά τη διάρκεια της παραγωγής του τυριού. Πιο συγκεκριμένα διαφοροποιεί μεταξύ στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος η και σε διαφορετικό LAB, τα ομαδοποιεί μέσα σε ένα είδος και τα προσδιορίζει.

- Τέλος, για την πλήρη εικόνα των μικροοργανισμών που ενδημούν σε γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες και επιπλέον αναλύσεις σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
- Dheeraj MOHANIA, \* R. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria.
- Diego Cabral Lacerda, P. C. (2022). Potential role of *Limosilactobacillus fermentum* as a probiotic with anti-diabetic properties: A review.
- Gabriela Rabaioli Rama, D. K. (2019). *Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures*. Paraná, Brazil.
- Hui-min Neoh, X.-E. T. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. Στο *Infection, Genetics and Evolution* .
- K Lioliou, E. L.-T. (2001). *Changes in the microflora of manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage*. International Journal of Dairy Technology.
- María Jesús Rodríguez-Sojo, A. J.-M.-C.-N. (2021). *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: Mechanisms and Therapeutic Insights.
- Olga V. Golyshina, c. a.-U. (2016). The novel extremely acidophilic, cell-wall-deficient archaeon *Cuniculiplasma divulgatum* gen. nov., sp. nov. represents a new family, *Cuniculiplasmataceae* fam. nov., of the order *Thermoplasmatales*.
- Rafael Bargiela, K. L. (2020). Proteome Cold-Shock Response in the Extremely Acidophilic Archaeon, *Cuniculiplasma divulgatum*.
- Smithers, G. W. (2008). *Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’*. Australia: International Dairy Journal.
- Tetsuya Harada, V. C. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver Free.
- Tetsuya Harada, D. M. (2020). Detection of Genetic Elements Carrying *vanA* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus saigonensis* VE80T Isolated from Retail Chicken Meat.
- Tom P Beresford, N. A. (2001). *Recent advances in cheese microbiology* (Τόμ. 11). Ireland: International Dairy Journal. Ανάκτηση από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694601000565>
- Ευανθία Λιτοπούλου-Τζανετάκη, Ν. Τ. (2011). *Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά ελληνικών παραδοσιακών τυριών* (Τόμ. 101). Θεσσαλονίκη. Ανάκτηση από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448811003713>
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Μ. Α. (χ.χ.).

## Πηγές εικόνων

Εικόνα 1.

[https://www.itrofi.gr/sites/default/files/styles/ogimage\\_thumb/public/article/2018/10/05/cottage\\_cheese\\_sour\\_cream\\_and\\_milk.jpg?itok=K6BE9MKr](https://www.itrofi.gr/sites/default/files/styles/ogimage_thumb/public/article/2018/10/05/cottage_cheese_sour_cream_and_milk.jpg?itok=K6BE9MKr)

Εικόνα 2.

[https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.dairy-services.com%2F%25CE%25B3%25CE%25BB%25CF%2585%25CE%25BA%25CF%258C-%25CE%25BA%25CE%25B1%25CE%25B9-%25CE%25BE%25CE%25B9%25CE%25BD%25CF%258C-%25CF%2584%25CF%2585%25CF%2581%25CF%258C%25CE%25B3%25CE%25B1%25CE%25BB%25CE%25B1%2F&psig=AOvVaw2UoT2BMT\\_hE1-gbO41rZxl&ust=1675962108768000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCLj49sOzhv0CFQAAAAAdAAAAABAs](https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.dairy-services.com%2F%25CE%25B3%25CE%25BB%25CF%2585%25CE%25BA%25CF%258C-%25CE%25BA%25CE%25B1%25CE%25B9-%25CE%25BE%25CE%25B9%25CE%25BD%25CF%258C-%25CF%2584%25CF%2585%25CF%2581%25CF%258C%25CE%25B3%25CE%25B1%25CE%25BB%25CE%25B1%2F&psig=AOvVaw2UoT2BMT_hE1-gbO41rZxl&ust=1675962108768000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCLj49sOzhv0CFQAAAAAdAAAAABAs)

Εικόνα 3.

<https://wpstatic.gymbeam.com/blog/wp-content/uploads/mageblog/iStock-941807888.jpg>

Εικόνα 4.

[https://cdn.shopify.com/s/files/1/0441/7683/4722/products/manouri3\\_a0d31ef1-ba39-4572-9283-141db3f9ae92.jpg?v=1649254425](https://cdn.shopify.com/s/files/1/0441/7683/4722/products/manouri3_a0d31ef1-ba39-4572-9283-141db3f9ae92.jpg?v=1649254425)

Εικόνα 5

[https://www.cheeselovers.gr/images/di/216\\_257\\_cheeselovers-mizithra2.jpg](https://www.cheeselovers.gr/images/di/216_257_cheeselovers-mizithra2.jpg)

Εικόνα 6.

<https://www.tragreecetional.gr/datafiles/676.jpg>

Εικόνα 7.

[https://www.athensmagazine.gr/photos/w\\_800px/articles/202009/anthotyro.jpg](https://www.athensmagazine.gr/photos/w_800px/articles/202009/anthotyro.jpg)

Εικόνα 8.

<https://tyrokomia-naxou.gr/wp-content/uploads/2018/06/tsimiskaki.jpg>

Εικόνα 9.

[The schema of ribosome complex and 16S rRNA gene. The white and grey... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)

Εικόνα 10.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481930156X>

Εικόνα 11. Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 12. Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 13. Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 14. Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 15. Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 16.

[https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fnl.wikipedia.org%2Fwiki%2FEnterococcus&psig=AOvVaw1Qwbn79Aj6320hr\\_RvxSks&ust=1690555051448000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCKijqbyOr4ADFQAAAAAdAAAAABAJ](https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fnl.wikipedia.org%2Fwiki%2FEnterococcus&psig=AOvVaw1Qwbn79Aj6320hr_RvxSks&ust=1690555051448000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCKijqbyOr4ADFQAAAAAdAAAAABAJ)

Εικόνα 17.

<https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Frepository.helmholtz-hzi.de%2Fhandle%2F10033%2F604371&psig=AOvVaw39oUU8aJ0utccmlCoxeK5F&ust=1690554902678000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCPClgvaNr4ADFQAAAAAdAAAAABAK>

Εικόνα 18.

<https://www.google.gr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.vital.ly%2Ftrc%2FLimosilactobacillus-fermentum%2Fmonograph%3D1558%2F&psig=AOvVaw1MV1tr7P06K0pGRGzbFnL4&ust=1690554772227000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCMCD6reNr4ADFQAAAAAdAAAAABAE>

