



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος

THESIS

The role of lactic acid bacteria in whey cheeses



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT
Ισανκουλίδου Ελένη/ Isankoulidou Eleni
Παπαδάκη Δήμητρα/ Papadaki Dimitra

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR
Τσάκαλη Ευσταθία/ Tsakali Efstathia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «**Ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος**» που παρουσιάστηκε από την **Ισανκουλίδου Ελένη** και την **Παπαδάκη Δήμητρα** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα/ Ιδιότητα	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Ευσταθία Τσάκαλη	Επίκουρη Καθηγήτρια Επιβλέπουσα	
2.	Ανθιμία- Αικατερίνη Μπατρίνου	Επίκουρη Καθηγήτρια Μέλος	
3.	Σπυρίδων Κοντελής	Επίκουρος Καθηγητής Μέλος	

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνουμε ότι είμαστε αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μας αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Ισανκουλίδου Ελένη



Παπαδάκη Δήμητρα



Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε από τις φοιτήτριες Ισανκουλίδου Ελένη και Παπαδάκη Δήμητρα, φοιτήτριες του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής . Το θέμα της πτυχιακής εργασίας ήταν « Ο ρόλος των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος» και πραγματοποιήθηκε το διάστημα Μαρτίου-Σεπτεμβρίου του 2022 με την πολύτιμη επίβλεψη της Επικ. Καθηγήτριας Τσάκαλη Ευσταθίας.

Με το τέλος αυτής της ακαδημαϊκής πορείας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερα κάποια άτομα που στάθηκαν αρωγοί σε όλο αυτό το «ταξίδι». Πρώτη από όλους θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα μας, Επ. Καθηγήτρια Τσάκαλη Ευσταθία, για την πολύτιμη στήριξη με τις γνώσεις της, το ενδιαφέρον της σε ανθρώπινο επίπεδο και την εμπιστοσύνη της .

Ακόμη, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους κ.κ. Επ. Καθηγητή Κοντελέ Σπυρίδωνα και Επ. Καθηγήτρια Μπατρίνου Ανθιμία για τη βοήθεια τους, τόσο πειραματικά όσο και με τις γνώσεις τους σε επίπεδο μικροβιολογίας που μας ήταν εξαιρετικά χρήσιμες.

Παράλληλα, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες μας που ήταν δίπλα μας τόσα χρόνια και μας στήριζαν με όποιον τρόπο μπορούσαν ώστε να καταφέρουμε ό,τι έχουμε καταφέρει μέχρι σήμερα και να μας παροτρύνουν να εξελιχτούμε περαιτέρω. Από το ευχαριστήριο σημείωμα δεν θα μπορούσαν να λείπουν και οι φίλοι μας καθώς όπως λένε «είναι η οικογένεια που επιλέγουμε» οι οποίοι ήταν εκεί για να μας καταλάβουν και να μας ενθαρρύνουν να κατακτήσουμε όλα όσα ονειρευόμαστε.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε η μία την άλλη γιατί εκτός από συνεργάτες στην πτυχιακή εργασία είμαστε και καλές φίλες που περάσαμε μαζί όλη την ακαδημαϊκή μας πορεία στηρίζοντας, μαθαίνοντας η μία από την άλλη και προσπαθώντας από κοινού να αντιμετωπίσουμε άγχη και δυσκολίες της καθημερινότητας. Αυτό το ταξίδι πέρα από γνώσεις μας χάρισε και σχέσεις ζωής που είναι ότι πιο σημαντικό.

Ευχαριστούμε!

Δεν απέτυχα. Απλά βρήκα 10.000 τρόπους που δεν δούλεψαν.

Τόμας Έντισον, Αμερικανός εφευρετής

Περίληψη

Στην Ελλάδα ο τυροκομικός κλάδος είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένος ήδη από τα αρχαία χρόνια. Το τυρόγαλα ή αλλιώς ορός γάλακτος είναι το μεγαλύτερο απόβλητο της τυροκομίας αφού κάθε κιλό τυριού που παράγεται δίνει 9 λίτρα τυρογάλακτος. Εκτός από το υψηλό οργανικό φορτίο που το καθιστά ακατάλληλο για απευθείας αποβολή στο περιβάλλον, το τυρόγαλα είναι πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών. Για τους λόγους αυτούς το ενδιαφέρον στράφηκε από νωρίς στην αξιοποίησή του όπως η παραγωγή τυριών τυρογάλακτος. Τα προϊόντα αυτά γενικά καταναλώνονται φρέσκα, λίγες μέρες μετά την παραγωγή τους. Χαρακτηρίζονται από υψηλή υγρασία και pH και χαμηλή αλατοπεριεκτικότητα γεγονός που τα καθιστά ευπαθή σε προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που υπάρχουν φυσικά στα τυριά τυρογάλακτος και συγκεκριμένα η επίδραση που έχουν τα μεταβολικά τους προϊόντα επί της συντηρησιμότητας.

Αναπτύχθηκε μία μέθοδος για παραγωγή υποστρώματος από τυριά τυρογάλακτος ώστε όλες οι δοκιμές να γίνουν σε ένα περιβάλλον που προσομοιάζει τα προϊόντα αυτά. Μετά τον εμβολιασμό του υποστρώματος με διάφορα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC για να προσδιορισθούν τα είδη και οι ποσότητες των οξέων που παρήχθησαν.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στα τυριά τυρογάλακτος κατά τη διάρκεια της διατήρησης παράγουν οξέα. Τα οξέα αυτά μειώνουν το pH των προϊόντων χωρίς όμως να αλλοιώνουν τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Η αυξημένη αυτή οξύτητα λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προστασίας του τροφίμου έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών ενώ ταυτόχρονα αυξάνει και τη διάρκεια ζωής τους.

Abstract

The cheese industry, in Greece, has been particularly developed since ancient times. Whey is an important by-product of the cheese industry as for every liter of cheese produced gives 9 liters of whey. Apart from the high organic load that makes it unsuitable for direct disposal to the environment, whey is a rich source of nutrients. For these reasons, the interest was turned early to its utilization such as the production of whey cheeses. These products are consumed fresh, a few days after their production. They have high moisture and pH and low salt content which make them susceptible to infestation by pathogens.

The purpose of this project was to study the effect of lactic acid bacteria that are naturally present in whey cheeses and specifically the effect of their metabolic products on shelf-life.

A method was developed to produce a substrate from whey cheeses so that all the tests could be done in an environment that resembles these products. After inoculation of the substrate with various strains of lactic acid bacteria, HPLC analysis was performed to determine the types and amounts of acids produced.

Lactic acid bacteria present in whey cheeses produce acids during storage. These acids reduce the pH of the products without altering their organoleptic characteristics. This increased acidity works as a protective mechanism of the food against *S. aureus* while at the same time it also increases its shelf life.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
Κεφάλαιο 1 Ιστορικά στοιχεία	12
1.1 Τυροκομικός κλάδος	12
1.2 Παραγωγή τυριών	13
Κεφάλαιο 2 Τυρόγαλα	14
2.1 Ορισμός	14
2.2 Σύσταση.....	14
2.3 Θρεπτική αξία.....	16
2.4 Αξιοποίηση τυρογάλακτος	17
Κεφάλαιο 3 Τυριά τυρογάλακτος	20
3.1 Γενικά	20
3.1.1 Μυζήθρα	20
3.1.2 Ανθότυρος.....	21
3.1.3 Μανούρι ΠΟΠ	22
3.1.4 Ξυνομυζήθρα Κρήτης ΠΟΠ	22
3.2 Πρόσθετα	24
3.3 Συντήρηση και μικροβιολογικό προφίλ.....	24
3.4 Μικροβιολογικά κριτήρια	25
3.5 Στατιστικά στοιχεία	26
Κεφάλαιο 4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος	27
4.1 Γενικά	27
4.1.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	28
4.1.2 <i>Lactococcus</i> spp.	29
4.2 Προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης.....	30
4.2.1 Γαλακτικό οξύ	30
4.2.2 Οξικό οξύ	31
4.2.3 Προπιονικό οξύ	31
Κεφάλαιο 5 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
4.1 Ταξινόμηση.....	32
4.2 Μορφολογία.....	32
4.3 Προέλευση	33
4.4 Ανάπτυξη.....	33
4.5 Μικροβιολογικά κριτήρια – νομοθεσία.....	33
4.6 Νοσολογία	34

4.6.1	Είδη λιστερίωσης και συμπτώματα.....	34
4.6.2	Ευπαθείς ομάδες	35
4.6.3	Θεραπεία	35
4.6.4	Επιδημιολογικά στοιχεία	36
4.7	Τρόπος ταυτοποίησης.....	37
Κεφάλαιο 6 Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί		39
5.1	<i>Escherichia coli</i>	39
5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	40
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		42
Κεφάλαιο 7 Σκοπός εργασίας		42
Κεφάλαιο 8 Μέθοδοι και υλικά.....		43
8.1	Τυριά τυρογάλακτος	43
8.2	Παρασκευή υποστρώματος	44
8.3	Έλεγχος ανάπτυξης μικροοργανισμών στο παρασκευασθέν υπόστρωμα.....	46
8.4	Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	46
8.5	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων	47
8.5.1	Αρχή μεθόδου	47
8.5.2	Πειραματική πορεία	48
Κεφάλαιο 9 Αποτελέσματα και συζήτηση		50
9.1	Παρασκευή υποστρώματος	50
9.2	Έλεγχος ανάπτυξης μικροοργανισμών στο παρασκευασθέν υπόστρωμα.....	51
9.3	Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	51
9.3.1	Μεταβολή pH.....	51
9.4	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων	53
9.4.1	Χρωματογραφήματα HPLC	53
9.4.2	Παραγωγή οξέων	54
9.4.3	Επίδραση NaCl	56
9.4.4	Μεταβολή pH.....	57
Κεφάλαιο 10 Συμπεράσματα		60
Βιβλιογραφία.....		61
Ελληνική βιβλιογραφία		61
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία		63
Διαδικτυακή βιβλιογραφία		67
Πηγές εικόνων.....		67

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.1: Παραδοσιακό τυροκομείο στο Καρπενήσι	12
Εικόνα 2.1: Παραλαβή τυρογάλακτος κατά την παραγωγή τυριού	14
Εικόνα 2.2: Κέικ τυρογάλακτος από «Μύλοι Καπλανίδη»	19
Εικόνα 3.1: Μυζήθρα (αριστερά), Ανθότυρος (δεξιά)	21
Εικόνα 3.2: Μανούρι (αριστερά), Ξυνομυζήθρα (δεξιά)	23
Εικόνα 5.1: <i>Listeria monocytogenes</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	32
Εικόνα 8.1: Ανθότυρος από αιγοπρόβειο γάλα	43
Εικόνα 8.2: Μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα	43
Εικόνα 8.3: Ξινή μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα	43
Εικόνα 8.4: (από αριστερά προς τα δεξιά) Μηχάνημα stomacher, Θέρμανση σε κατσαρολάκι με φλόγα, Διαχωρισμός με διηθητικό χαρτί και χωνί	44
Εικόνα 8.5: (από αριστερά προς τα δεξιά) Ορός μετά τη θέρμανση, Διαχωρισμός κροκιδωμάτων από τον ορό, Τελικό υπόστρωμα	45
Εικόνα 8.6: (από αριστερά προς τα δεξιά) Σωλήνες με ορό μετά την ρύθμιση pH, αλατοπεριεκτικότητα και τον εμβολιασμό με γαλακτοβάκιλλους, Πεχάμετρο	47
Εικόνα 8.7: (από αριστερά προς τα δεξιά) Σωλήνες Ependorf με ορό πριν την φυγοκέντριση, Ορός μετά την φυγοκέντριση, Ορός πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη μικροδιήθηση με φίλτρο Whatman	48
Εικόνα 9.1: Χρωματογραφήματα πρότυπων οξέων οξικό (πάνω αριστερά), γαλακτικό (πάνω δεξιά), προπιονικό (κάτω αριστερά), μυρμηκικό (κάτω δεξιά)	53
Εικόνα 9.2: Χρωματογραφήματα δειγμάτων C206 (πάνω αριστερά), C309 (πάνω δεξιά), C609 (κάτω αριστερά), C611 (κάτω δεξιά)	54
Εικόνα 9.3: Διάγραμμα παραγωγής οξέων από κάθε γαλακτοβάκιλλο	56
Εικόνα 9.4: Διάγραμμα με τη συνολική συγκέντρωση οξέων που παράχθηκε από κάθε γαλακτοβάκιλλο	58
Εικόνα 9.5: Διάγραμμα με τα τελικά pH	59

Κατάλογος πινάκων

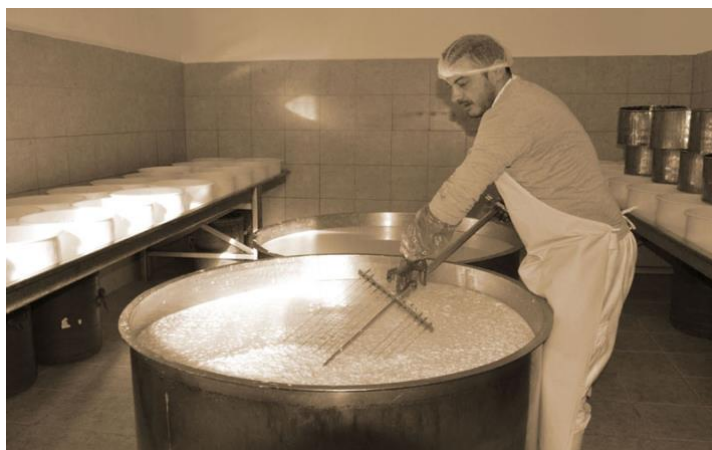
Πίνακας 2.1: Σύσταση γλυκού και όξινου τυρογάλακτος σε g/L (Jelen, 2002).....	16
Πίνακας 3.1: Σύσταση τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ)	23
Πίνακας 5.1: Επιδημιολογικά στοιχεία λιστερίωσης για τα έτη 2015-2019 (EFSA Journal)	36
Πίνακας 5.2: Θάνατοι από λιστερίωση ανά ευρωπαϊκή χώρα το 2020 (Surveillance Atlas of Infectious Diseases)	37
Πίνακας 5.3: Βιοχημικές δοκιμές και δοκιμές ζύμωσης σακχάρων για ταυτοποίηση L.monocytogenes (Nayak N. et al., 2015).....	38
Πίνακας 6.1: Ορότυποι E.coli	40
Πίνακας 9.1: Σύσταση ορού (αποτελέσματα από αναλυτή).....	50
Πίνακας 9.2: Μέση σύσταση πρόβειου και κατσικίσιου γάλατος (Park et al., 2007)	50
Πίνακας 9.3: Τιμές pH από 3 είδη ορού	51
Πίνακας 9.4: Καταμέτρηση αποικιών μετά από δοκιμαστική ανάπτυξη σε ορό και καλλιέργεια σε τρυβλία.....	51
Πίνακας 9.5: Τιμές pH ορού μετά τον εμβολιασμό με γαλακτοβάκιλλους και επακόλουθη επώαση.....	52
Πίνακας 9.6: Ποσότητες οργανικών οξέων που παράχθηκαν από κάθε γαλακτοβάκιλλο	55
Πίνακας 9.7: Συγκεντρώσεις οργανικών οξέων που παράχθηκαν από κάθε γαλακτοβάκιλλο	57

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Ιστορικά στοιχεία

1.1 Τυροκομικός κλάδος

Μετά τον Β΄ Παγκόσμιο πόλεμο, η ανάπτυξη του κλάδου της τυροκομίας στην Ελλάδα ήταν αργή. Κινητήριος δύναμη στην εξέλιξή του ήταν η νέα τεχνολογία που εκσυγχρόνισε την τυροκομία στα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Από τότε μέχρι σήμερα στην Ελλάδα παρατηρείται μία ανάπτυξη σε αυτόν τον τομέα με μεγάλο αριθμό μονάδων παραγωγής. Βιομηχανίες που είχαν ήδη δραστηριοποίηση γύρω από το γάλα στράφηκαν και στην τυροκομία περίπου στο τέλος του 20^{ου} αιώνα. Παρατηρείται πως οι περισσότερες τυροκομικές μονάδες που διατηρούν τον παραδοσιακό τυροκομικό τους χαρακτήρα είναι μικρές οικογενειακές επιχειρήσεις, χαμηλής οικονομικής δυναμικότητας και με διασπορά σε όλη την επικράτεια. Ωστόσο υπάρχουν και μεγάλες βιομηχανικές τυροκομικές μονάδες, που οι περισσότερες εντοπίζονται κυρίως στην Βόρεια Ελλάδα. Ακόμα παρατηρείται έντονος ανταγωνισμός από τις μεγάλες επιχειρήσεις τόσο μεταξύ τους όσο και με μικρότερες που παράγουν εξίσου ποιοτικά προϊόντα αλλά και με εισαγόμενα προϊόντα. Δυστυχώς οι εξαγωγικές δυνατότητες της τυροκομίας είναι μικρές (Σπυρούδη, 2013).



Εικόνα 1.1: Παραδοσιακό τυροκομείο στο Καρπενήσι

1.2 Παραγωγή τυριών

Το γάλα αποτελεί πλούσια πηγή σε θρεπτικά στοιχεία, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Βασικό του μειονέκτημα είναι ο σύντομος χρόνος ζωής του καθώς όντας ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα, είναι ιδανικό για την ανάπτυξη μικροοργανισμών μεταξύ των οποίων και παθογόνοι. Γι' αυτόν κυρίως τον λόγο ήταν επιτακτική η ανάγκη να βρεθούν τρόποι επέκτασης της συντηρησιμότητάς του. Η ανακάλυψη του τυριού φημολογείται πως προέκυψε τυχαία από έναν έμπορο που ταξίδευε στην έρημο και ο οποίος γέμισε με γάλα ένα ασκί που ήταν φτιαγμένο από στομάχι προβάτου. Η υψηλή θερμοκρασία της ερήμου συνδυαστικά με την πυτιά από το εσωτερικό του ασκού προκάλεσε διαχωρισμό του πηγματος από τον ορό. Ο έμπορος που από περιέργεια δοκίμασε το περιεχόμενο του ασκού, ξεδίψασε με τον ορό και περιόρισε την πείνα του με το πήγμα. Μια άλλη εκδοχή είναι πως ερευνητές προσπαθώντας να παρατείνουν τον χρόνο ζωής του γάλακτος μέσω της μεθόδου της ξήρανσης κατέληξαν να παράγουν τυρί (Πυροβόλου, 2019).

Κεφάλαιο 2 Τυρόγαλα

2.1 Ορισμός

Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό FAO και WHO «ο ορός γάλακτος (ή τυρόγαλα) είναι 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».

Ένας άλλος ορισμός που προκύπτει από τον κανονισμό ΕΕ 625/30-03-1978 είναι «το προϊόν που λαμβάνεται κατά την τυροκόμηση ή κατά την παραγωγή καζεΐνης με χρήση είτε οξέων, πυτιάς και/είτε φυσικοχημικών μεθόδων». Πιο συγκεκριμένα, είναι το διάλυμα που διαχωρίζεται μετά από την πήξη του γάλακτος και την απομάκρυνση του τυροπήγματος.

Το τυρόγαλα αποτελεί το ένα από τα δύο συστατικά που μπορεί να διαχωριστεί με την πήξη του γάλακτος. Το άλλο είναι το τυρόπηγμα. Η μέθοδος τυροκόμησης είναι σχεδόν ίδια από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα. Στην Ελλάδα ένα από τα βασικότερα προϊόντα τυροκόμησης αποτελεί η Φέτα. Αρχικά δεν ήταν γνωστό πως μετά την παραγωγή Φέτας υπήρχε η δυνατότητα περαιτέρω επεξεργασίας των υποπροϊόντων για την παραγωγή άλλων ειδών τυριού όπως είναι η μυζήθρα, ο ανθότυρος και άλλα τυριά τυρογάλακτος. Η αρχή της διαδικασίας βασίζεται στην αναθέρμανση του ορού γάλακτος προς ανάκτηση των στερεών του.



Εικόνα 2.1: Παραλαβή τυρογάλακτος κατά την παραγωγή τυριού

2.2 Σύσταση

Το τυρόγαλα έχει κιτρινοπράσινο χρώμα που οφείλεται στη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη Β₂) που περιέχει. Η σύστασή του τυρογάλακτος εξαρτάται από πλήθος παραγόντων όπως

είναι: το γάλα και το είδος του τυριού από το οποίο το εξαγάγουμε, η θερμοκρασία στην οποία θερμαίνεται το γάλα πριν από την πήξη, η θερμοκρασία και ο τρόπος πήξης του γάλακτος, ο βαθμός διαίρεσης του τυροπήγματος καθώς και η θερμοκρασία και ο τρόπος αναθέρμανσης του τυρογάλακτος (Βαρθαλάμης, 2017). Έτσι, για παράδειγμα, από πρόβειο και αγελαδινό γάλα το 50% των στερεών μεταφέρονται στο τυρόγαλα ενώ από αίγιο μεταφέρεται το 45%. Επίσης, από την παρασκευή σκληρού τυριού λαμβάνουμε τυρόγαλα πλουσιότερο σε λίπος (Σβάρνας, 2012). Επομένως, είναι κοινώς αποδεκτό πως δεν μπορεί η σύσταση του τυρογάλακτος να είναι σταθερή.

Το τυρόγαλα διακρίνεται σε δύο είδη ανάλογα με τον τρόπο παραλαβής του. Το «γλυκό τυρόγαλα» λαμβάνεται με πήξη του γάλακτος με πυτιά (ένα μίγμα ενζύμων που περιέχει χυμοσίνη) και έχει τελικό pH=5,6. Η πήξη με πυτιά εφαρμόζεται για την παραγωγή των περισσότερων τυριών καθώς και ορισμένων προϊόντων καζεΐνης (Ryan et al., 2016). Από την άλλη, το «όξινο τυρόγαλα» προκύπτει από την πήξη του γάλακτος με γαλακτικά βακτήρια, οργανικά ή ανόργανα οξέα, όπως για παράδειγμα γαλακτικό ή υδροχλωρικό οξύ αντίστοιχα, και έχει τελικό pH=4,5. Ο τρόπος αυτός χρησιμοποιείται κυρίως για παρασκευή φρέσκων τυριών όπως Cottage και Quark ή για παραγωγή βιομηχανικής καζεΐνης (Jelen, 2002). Το όξινο τυρόγαλα συνήθως δεν προορίζεται για ανθρώπινη διατροφή διότι έχει έντονα όξινη γεύση και υψηλή αλατοπεριεκτικότητα (Χαρίτου, 2018).

Κατά την παρασκευή τυριού το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών και του λίπους περνούν στο παρασκευαζόμενο τυρί, ενώ το νερό και τα υδατοδιαλυτά συστατικά καταλήγουν στο τυρόγαλα (Σβάρνας, 2012). Το τυρόγαλα αντιπροσωπεύει το 85-95% του όγκου του γάλακτος από το οποίο προήλθε και περιέχει περίπου το 55% των θρεπτικών του συστατικών (Ryan et al., 2016).

Περίπου το 93% του όγκου του τυρογάλακτος αποτελείται από νερό. Τα ξηρά στερεά περιλαμβάνουν λακτόζη (70-72% των συνολικών στερεών), πρωτεΐνες ορού (8-10%), ανόργανα άλατα ασβεστίου, καλίου, νατρίου και μαγνησίου (12-15%) (Jelen, 2002) και ίχνη συστατικών όπως μέταλλα (χαλκός και ψευδάργυρος), γαλακτικό και κιτρικό οξύ, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις (ουρία, ουρικό οξύ) και βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Ryan et al., 2016).

Πίνακας 2.1: Σύσταση γλυκού και όξινου τυρογάλακτος σε g/L (Jelen, 2002)

Συστατικά (g/L)	γλυκό τυρόγαλα	όξινο τυρόγαλα
ολικά στερεά	63,0-70,0	63,0-70,0
λακτόζη	46,0-52,0	44,0-46,0
πρωτεΐνη	6,0-10,0	6,0-8,0
ασβέστιο	0,4-0,6	1,2-1,6
φωσφορικά	1,0-3,0	2,0-4,5
γαλακτικό οξύ	2,0	6,4
χλωριούχα	1,1	1,1

Το γλυκό και όξινο τυρόγαλα παρουσιάζουν διαφορές στην οξύτητα, τις αναλογίες αλάτων και κλασμάτων πρωτεΐνης που περιέχουν (Jelen, 2002). Ιδίως όσο αφορά τις πρωτεΐνες, στο όξινο τυρόγαλα με την οξίνιση το pH πέφτει με αποτέλεσμα το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο που περιέχεται στις μικέλλες των καζεϊνών να διαλυτοποιείται και να περνά στην υδατική φάση, δηλαδή στο τυρόγαλα. Από την άλλη, στο γλυκό τυρόγαλα η πήξη με πυτιά περιλαμβάνει απόσπαση του γλυκομακροπεπτιδίου από την κ-καζεΐνη και μεταφορά του στο τυρόγαλα (Jelen, 2002). Μάλιστα το γλυκομακροπεπτίδιο αποτελεί περίπου το 10-15% των πρωτεϊνών που περιέχονται στο γλυκό τυρόγαλα ενώ απουσιάζει από το όξινο (Ryan et al., 2016). Συνολικά περίπου το 20% των πρωτεϊνών του γάλακτος μεταφέρονται στο τυρόγαλα και περιλαμβάνουν β-γαλακτογλοβουλίνη (50-55% των συνολικών πρωτεϊνών του τυρογάλακτος), α-γαλακταλβουμίνη (20-25%), ανοσογλοβουλίνες (10%), αλβουμίνες ορού (5-10%), πρωτεόζες-πεπτόνες (12%), λακτοφερίνη (1-2%) και λακτοϋπεροξειδάση (0,5%), ενώ η καζεΐνη υπάρχει σε ίχνη (Ryan et al., 2016). Παρόλο που οι διαφορές μεταξύ των δύο ειδών τυρογάλακτος είναι μικρές, επηρεάζουν τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους οπότε θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την περαιτέρω επεξεργασία (Jelen, 2002). Το όξινο τυρόγαλα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε τέφρα και λιγότερη πρωτεΐνη, ενώ το γλυκό τυρόγαλα είναι πλουσιότερο σε λακτόζη (Χαρίτου, 2018).

2.3 Θρεπτική αξία

Το τυρόγαλα θεωρείται πηγή πολλών θρεπτικών συστατικών εκ των οποίων το κυριότερο είναι οι πρωτεΐνες του ορού. Περιέχουν υψηλά επίπεδα όλων των απαραίτητων

αμινοξέων και έχουν βιολογική αξία υψηλότερη από αυτές του αυγού (Ryan et al., 2016). Αποτελεί λειτουργικό τρόφιμο για όλες τις ηλικίες καθώς η λακτοφερίνη που περιέχει βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου και εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων στα εντερικά τοιχώματα που είναι ιδίως σημαντικό για τη διατροφή των βρεφών και των παιδιών, βελτιώνει την απορρόφηση ασβεστίου και μπορεί να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο της διατροφής των ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας που πάσχουν από οστεοπόρωση και τέλος, χορηγείται συχνά σε αθλητές διότι περιέχει αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη) που μεταβολίζονται πρώτα κατά τη φυσική άσκηση (Macwan et al., 2016). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι το τυρόγαλα έχει θετική επίδραση σε θεραπείες ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο ιός HIV και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Macwan et al., 2016). Ακόμα έχει δειχθεί ότι η κατανάλωση των πρωτεϊνών του ορού βελτιώνει την σωματική απόδοση, εμποδίζει την μυϊκή ατροφία, βοηθά στην ανάρρωση μετά την άσκηση (Ryan et al., 2016), βελτιώνει το ανοσοποιητικό και έχει αντιμικροβιακές και αντιτοξικές ιδιότητες. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες βοηθούν στη διαχείριση του βάρους και τον έλεγχο της όρεξης αν και αυτά αφορούν βραχυχρόνια πειράματα όπου η κατανάλωση τυρογάλακτος ήταν υψηλότερη του κανονικού (Macwan et al., 2016).

2.4 Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Ο ορός γάλακτος που απομένει μετά την τυροκόμηση περιέχει υψηλό οργανικό φορτίο, δηλαδή υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπών καθώς και άζωτο και φώσφορο (Prazeres A. R. et al., 2012). Ιδιαίτερα το λίπος είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθεί χρησιμοποιώντας τα συνήθη συστήματα βιολογικού καθαρισμού (Μαργαρίτη, 2014). Το οργανικό φορτίο μετριέται σε BOD₅ (Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο) και εκφράζει την ποσότητα του οξυγόνου που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί εντός 5 ημερών για να αποσυνθέσουν το οργανικό φορτίο. Κάθε λίτρο τυρογάλακτος έχει BOD₅ ίσο με 30.000-50.000 mg οξυγόνου (Καραδήμα, 2009). Έχει υπολογιστεί ότι ένα τυροκομείο που παράγει 100 τόνους τυρογάλακτος την ημέρα ρυπαίνει το περιβάλλον όσο μία πόλη 55.000 κατοίκων (Σβάρνας, 2012). Αν ληφθεί υπόψη ότι ετησίως παράγονται περίπου 200 εκατομμύρια τόνοι τυρογάλακτος σε παγκόσμιο επίπεδο (Barba F. J., 2021) γίνεται φανερή η περιβαλλοντική επιβάρυνση που προκαλεί η αποβολή του τυρογάλακτος χωρίς άλλη επεξεργασία απευθείας στο υδατικό δίκτυο.

Εκτός από την δυσσομία και την ποιοτική υποβάθμιση των υδάτων, η απευθείας εναπόθεση του τυρογάλακτος στο υδάτινο περιβάλλον προκαλεί θανάτωση των υδρόβιων οργανισμών, καθώς το οξυγόνο που απαιτείται για την επιβίωσή τους δεσμεύεται από τους μικροοργανισμούς που διασπούν τον οργανικό ρύπο (Καραδήμα, 2009). Ως εκ τούτου το τυρόγαλα δεν μπορεί να αποβληθεί απευθείας στο δίκτυο λυμάτων αλλά να αξιοποιηθεί.

Παραδοσιακά, το τυρόγαλα χρησιμοποιούταν ως ζωοτροφή χοίρων και μηρυκαστικών καθώς είναι πλούσιο σε λακτόζη και μέταλλα, αλλά και ως λίπασμα για το έδαφος (Ryan et al., 2016). Βέβαια, υπερβολικές ποσότητες τυρογάλακτος μπορούν να οδηγήσουν σε πεπτικές διαταραχές στα ζώα (Σβάρνας, 2012) και σε μειωμένη γονιμότητα του εδάφους λόγω των αποθέσεων αλάτων (Ryan et al., 2016). Άλλοι τρόποι με τους οποίους αξιοποιείται το τυρόγαλα είναι με την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος και την παρασκευή ποτών από διήθημα ορού γάλακτος (όπως το ελβετικό «Rivella») ή από ανάμιξη τυρογάλακτος με χυμό φρούτων (ποτά των εταιρειών Djoez και Taksi στην Ολλανδία) (Ryan et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια από το τυρόγαλα παραλαμβάνουμε πλήθος προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Βαρθαλάμης, 2017). Έτσι, με συμπύκνωση και ξήρανση με ψεκασμό λαμβάνεται η σκόνη τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται σε ζωοτροφές ή σε προϊόντα όπως παγωτά και αρτοσκευάσματα. Για προϊόν υψηλότερης ποιότητας γίνεται υπερδιήθηση με μεμβράνες οπότε παίρνουμε συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού με διάφορα ποσοστά πρωτεΐνης (από 35% έως και 80%) ή καθαρές πρωτεΐνες ορού (>90%) οι οποίες χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων λόγω των γαλακτοματοποιητικών, αφριστικών ή πηκτικών τους ιδιοτήτων (Ryan et al., 2016). Επίσης, από το τυρόγαλα είναι δυνατόν να παραληφθεί λακτόζη με κρυστάλλωση η οποία βρίσκει πολλές εφαρμογές στην τεχνολογία τροφίμων καθώς διαθέτει ασθενή γλυκαντική ισχύ, δεσμεύει τις αρωματικές ουσίες και προσδίδει επιθυμητό χρώμα σε τρόφιμα που δέχονται θερμική επεξεργασία (καραμελοποίηση). Τέλος, με ζύμωση του τυρογάλακτος προκύπτουν και άλλα προϊόντα όπως οξέα (π.χ. γαλακτικό), αλκοόλες (π.χ. αιθυλική), ένζυμα (π.χ. β-γαλακτοζιδάση), βιταμίνες (B₂, B₁₂), αλκοολούχα ποτά, αναψυκτικά, ξίδι και βιομάζα (κυρίως ζύμες) (Σβάρνας, 2012).

Από τα ενδιαφέροντα προϊόντα διατροφής που παράγονται από την αξιοποίηση του τυρογάλακτος είναι το «κέικ τυρογάλακτος» και τα «πρωτεϊνικά μπισκότα». Ο στόχος παραγωγής τους ήταν για να βρεθεί λύση για το τεράστιο πρόβλημα της ρύπανσης κυρίως από το τυρόγαλα. Πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Δ. Κουρέτα του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



Εικόνα 2.2: Κέικ τυρογάλακτος από «Μύλοι Καπλανίδη»

Κεφάλαιο 3 Τυριά τυρογάλακτος

3.1 Γενικά

Τα τυριά τυρογάλακτος παρασκευάζονται με θέρμανση του τυρογάλακτος πάνω από τους 85°C και προαιρετική οξίνιση. Έτσι λαμβάνουμε μία ποικιλία προϊόντων όπως η ιταλική Ricotta, το γαλλικό Serac, το γερμανικό Ziger, η κυπριακή Ανάρη και τα ελληνικά Μυζήθρα, Μανούρι, Ανθότυρο και Ξυνομυζήθρα Κρήτης (Σβάρνας, 2012). Η σύνθεση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τυριών αυτών διαφέρουν και εξαρτώνται όχι μόνο από την τεχνολογία παραγωγής και το είδος γάλακτος (αίγαιο, πρόβειο, αγελαδινό) αλλά και από το είδος του τυριού που παρασκευάστηκε με το γάλα αυτό (μαλακό, σκληρό, ημίσκληρο) (Καλοσπύρου, 2014). Ωστόσο η αποκλειστική χρήση τυρογάλακτος ως πρώτη ύλη δεν έχει καλά ποιοτικά αποτελέσματα στο προϊόν γι' αυτό προστίθενται συνήθως γάλα ή/και κρέμα γάλακτος.

3.1.1 Μυζήθρα

3.1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η μυζήθρα είναι ένα ελληνικό τυρί που παράγεται σε πολλές περιοχές της χώρας μας. Μπορεί να παραχθεί από αγελαδινό, κατσικίσιο ή πρόβειο τυρόγαλα ή μίγμα αυτών. Διακρίνεται σε νωπή και ξηρή. Η νωπή μυζήθρα έχει χρώμα λευκό έως υπόλευκο, μαλακή υφή και συμπαγή δομή χωρίς επιδερμίδα και οπές. Η ξηρή μυζήθρα είναι ένα σκληρό τυρί υπόλευκου χρώματος με συμπαγή δομή και εξωτερική υπόλευκη επιδερμίδα (Δημόπουλος, 2015).

3.1.1.2 Παρασκευή

Αρχικά το τυρόγαλα διηθείται ή φυγοκεντρείται για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα κόκκων που με την θέρμανση θα σκληρύνουν και θα επηρεάσουν την υφή της μυζήθρας. Ακολουθεί θέρμανση με ατμό υπό συνεχή ανάδευση. Όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 65-70°C μπορεί να προστεθεί πρόσγαλα σε αναλογία 3-5% για βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Στους 73-75°C προστίθεται και το αλάτι σε αναλογία 1-1,5%. Η θέρμανση συνεχίζεται σταθερά μέχρι τους 80-82°C όπου αρχίζει να σχηματίζεται το πήγμα. Τότε επιταχύνουμε την θέρμανση ενώ παράλληλα επιβραδύνουμε την ανάδευση μέχρι την πλήρη παύση στους 88-92°C όπου πλέον έχει σχηματιστεί ένα στρώμα πήγματος στην επιφάνεια. Το πήγμα αφήνεται σε κατάσταση ηρεμίας για περίπου 15-30 λεπτά. Στην περίπτωση της ξηρής μυζήθρας οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που εφαρμόζονται είναι υψηλότεροι ώστε να επιτευχθεί το λεγόμενο «ψήσιμο» του πήγματος.

Στη συνέχεια το πήγμα μεταφέρεται σε τυρόπανα ή καλούπια για να στραγγίσει. Το σχήμα των καλουπιών καθορίζει και το τελικό σχήμα του προϊόντος. Η στράγγιση διαρκεί 3-5 ώρες, ακολουθεί ψύξη και συσκευασία. Η νωπή μυζήθρα συσκευάζεται συνήθως υπό κενό για μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Ειδικότερα για την ξηρή μυζήθρα μετά την στράγγιση γίνεται αλάτιση και ξήρανση έως ότου η υγρασία πέσει κάτω από 40% κατά βάρος. Με την ολοκλήρωση της ξήρανσης καθαρίζεται η επιφάνεια του τυριού και είτε συσκευάζεται είτε υφίσταται παραφίνωση (Δημόπουλος, 2015).

3.1.2 Ανθότυρος

3.1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο ανθότυρος παρασκευάζεται σε ολόκληρη την Ελλάδα και διακρίνεται σε νωπό και ξηρό. Και τα δύο είδη διαθέτουν συμπαγή δομή χωρίς οπές. Ο νωπός ανθότυρος είναι μαλακός και έχει χρώμα λευκό έως υπόλευκο, ενώ ο ξηρός ανθότυρος που προκύπτει από αλάτιση και ωρίμανση του νωπού είναι σκληρός με υπόλευκο χρώμα (Καλομοίρη, 2019).

3.1.2.2 Παρασκευή

Ο ανθότυρος παρασκευάζεται από τυρόγαλα αιγοπρόβειου γάλακτος και μετά από τυροκόμηση σκληρών τυριών. Για το λόγο αυτό έχει υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα σε σχέση με τη μυζήθρα και επομένως καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Κατά την παρασκευή του μπορεί να προστεθεί αιγοπρόβειο γάλα ή και κρέμα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με την τεχνολογία παρασκευής μυζήθρας με τη μόνη διαφορά ότι για τον ανθότυρο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αγελαδινό γάλα (Καλομοίρη, 2019).



Εικόνα 3.1: Μυζήθρα (αριστερά), Ανθότυρος (δεξιά)

3.1.3 Μανούρι ΠΟΠ

3.1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το μανούρι είναι ένα λευκό, μαλακό τυρί με συμπαγή δομή χωρίς επιδερμίδα και οπές και ευχάριστη, γλυκιά γεύση. Παρασκευάζεται από πρόβειο ή γίδινο τυρόγαλα ή μίγμα αυτών, ενώ η προσθήκη γάλατος και κρέμας είναι προαιρετική. Σύμφωνα με το άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών είναι ένα προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης οπότε η πρώτη ύλη θα πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές της Θεσσαλίας ή της Κεντρικής και Δυτικής Μακεδονίας (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

3.1.3.2 Παρασκευή

Το τυρόγαλα διηθείται ή φυγοκεντρείται προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα τυροπήγατος και προστίθεται γάλα ώστε η λιποπεριεκτικότητα να ρυθμιστεί στο 2,5%. Ακολουθεί θέρμανση στους 88-90°C για 40-45 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Όταν το τυρόγαλα φτάσει στους 70-75°C προστίθεται 1% περίπου NaCl και γάλα ή κρέμα σε αναλογία $\leq 25\%$. Στους 80°C η ανάδευση αρχίζει να επιβραδύνεται ενώ όταν φτάσει του 88-90°C αφήνεται για 15-30 λεπτά. Στη συνέχεια το πήγμα μεταφέρεται σε υφασμάτινους σάκους στους οποίους αφήνεται να στραγγίσει για 4-5 ώρες. Το τυρί συντηρείται υπό ψύξη στους 4-5°C μέχρι τη διάθεσή του προς κατανάλωση (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

3.1.4 Ξυνομυζήθρα Κρήτης ΠΟΠ

3.1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η ξυνομυζήθρα είναι ένα λευκό έως υπόλευκο, μαλακό τυρί με κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή χωρίς επιδερμίδα και οπές και ξινή έως υπόξινη γεύση. Παρασκευάζεται από πρόβειο ή γίδινο τυρόγαλα ή μίγμα αυτών. Επειδή είναι προϊόν ΠΟΠ, το γάλα που χρησιμοποιείται πρέπει απαραίτητως να προέρχεται από ζώα που ανατρέφονται στην περιοχή της Κρήτης (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

3.1.4.2 Παρασκευή

Το τυρόγαλα υφίσταται διήθηση ή φυγοκέντριση ώστε να απομακρυνθούν οι κόκκοι τυροπήγατος και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 92°C για 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Όταν το τυρόγαλα φτάσει τους 68-70°C μπορεί να προστεθεί γάλα 15% κατά βάρος. Στους 80°C η θέρμανση επιταχύνεται ενώ η ανάδευση επιβραδύνεται καθώς αρχίζουν να εμφανίζονται οι πρώτες νιφάδες πήγατος. Στους 92°C έχει σχηματιστεί στην

επιφάνεια ένα παχύ στρώμα πήγματος το οποίο αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται σε καλούπια για να στραγγίξει για 3-5 ώρες. Με το πέρας της στραγγίσης προστίθεται 1,5-2% NaCl, γίνεται καλή ανάδευση και μεταφορά σε υφασμάτινους σάκους. Στο πήγμα ασκείται πίεση για μία εβδομάδα στη διάρκεια της οποίας αυξάνεται και η οξύτητά του. Έπειτα το πήγμα τοποθετείται σε βαρέλια κατά τρόπο που δεν αφήνει κενά στην μάζα. Τα βαρέλια οδηγούνται σε θαλάμους όπου η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 10°C και αφήνονται να ωριμάσουν για 2 μήνες πριν διατεθούν προς πώληση (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).



Εικόνα 3.2: Μανούρι (αριστερά), Ξυνομυζήθρα (δεξιά)

Σύμφωνα με τον ΕΦΕΤ η ξηρή μυζήθρα, ο ανθότυρος και το μανούρι έχουν την ακόλουθη σύσταση:

Πίνακας 3.1: Σύσταση τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ)

Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά	Ξηρή Μυζήθρα	Ανθότυρο	Μανούρι
Ενέργεια	366 kcal/ 100 g	191 kcal/ 100 g	374 kcal/ 100 g
Πρωτεΐνες	20%	11%	10,5%
Λίπος	30%	19,5%	36%
Μέγιστη Υγρασία	50%	70%	60%
Μέγιστη Αλατοπεριεκτικότητα (% NaCl)	1,2%	1,2%	1,4%
Ελάχιστη Λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	70%	70%	70%

3.2 Πρόσθετα

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

- ✓ χρωστικές της ομάδας II (*quantum satis*)
- ✓ σορβικό οξύ- σορβικά 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 τυρόγαλα σκληρού, ημίσκληρου και ημιμαλακού 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*).

3.3 Συντήρηση και μικροβιολογικό προφίλ

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών τα τυριά τυρογάλακτος επιτρέπεται να κυκλοφορήσουν στο εμπόριο εφόσον η υγρασία τους δεν ξεπερνάει το 70% και το λίπος επί ξηρού είναι τουλάχιστον 50% (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

Τα τυριά τυρογάλακτος έχουν υψηλό pH και υγρασία, χαμηλή περιεκτικότητα άλατος και ενεργότητα νερού που πλησιάζει την μονάδα. Αυτά, σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και με το γεγονός ότι στα προϊόντα αυτά δεν προστίθενται καλλιέργειες έχουν ως αποτέλεσμα τη μικρή διάρκεια ζωής τους. Επιπλέον, είναι ευπαθή σε προσβολές από αλλοιογόνους ακόμα και παθογόνους μικροοργανισμούς (*Listeria*, *Staphylococcus*, *E.coli*, *Pseudomonas*) (Madureira et al., 2011). Σε αερόβιες συνθήκες τα προϊόντα αυτά συντηρούνται για 7 μέρες, ενώ σε αναερόβιες (π.χ. συσκευασία κενού) μπορούν να συντηρηθούν για 20-30 μέρες (Panagou et al., 2012) εκτός αν πρόκειται για την ξηρή μυζήθρα που μπορεί να καταναλωθεί σε διάστημα ενός έτους (ΕΦΕΤ, 2012).

Η θερμική επεξεργασία που υφίστανται τα τυριά τυρογάλακτος μειώνει τους μικροοργανισμούς σε πολύ μεγάλο βαθμό (Pintado et al., 2001). Ορισμένοι επιβιώνουν της θερμικής επεξεργασίας, παγιδεύονται μέσα στο πήγμα και αρχίζουν να αναπτύσσονται μετά τη στράγγιση. Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται: γένη της οικογένειας Enterobacteriaceae (με κυρίαρχο το *Hafnia*), κολοβακτηρίδια, γαλακτικά βακτήρια και ζύμες. Η επιφάνεια των τυριών παρουσιάζει υψηλότερους

πληθυσμούς μικροοργανισμών απ' ότι το εσωτερικό, γεγονός που οφείλεται στην επιμόλυνση από τα υφάσματα που χρησιμοποιούνται για την στράγγιση. Την άνοιξη ο αέρας είναι πλουσιότερος σε ζύμες λόγω της άνθησης των λουλουδιών οπότε και τα τυριά τυρογάλακτος παρουσιάζουν αυξημένους αριθμούς ζυμών. Από την άλλη, το καλοκαίρι το τυρόγαλα που χρησιμοποιείται είναι περισσότερο επιμολυσμένο και άρα τα τυριά έχουν αυξημένους πληθυσμούς μικροοργανισμών. Οι αρχικοί αυτοί πληθυσμοί αυξάνονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα εντεροβακτήρια, για παράδειγμα, επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα όταν συντηρούνται στους 4°C. Μάλιστα, ο συνδυασμός του pH, του άλατος και της χαμηλής θερμοκρασίας όχι μόνο δεν εμποδίζουν την ανάπτυξη των εντερικών παθογόνων αλλά επιτρέπουν την επιβίωση και την ανάπτυξη ψυχρότροφων, αλατοανεκτικών βακτηρίων και ζυμών. Μετά από 20 μέρες την άνοιξη και 15 το καλοκαίρι οι αποικίες γίνονται πλέον ορατές (Lioliou et al., 2001).

Γενικά, η επιμόλυνση των προϊόντων σχετίζεται και με την μεταχείριση τους μετά την θερμική επεξεργασία και αφορά κυρίως τις συνθήκες υγιεινής. Η επιμόλυνση μπορεί να προέλθει από τα σκεύη, τη συσκευασία ή και τον αέρα της μονάδας παραγωγής (Panagou et al., 2012). Γι' αυτό θα πρέπει να τηρούνται οι συνθήκες υγιεινής, τα προϊόντα να ψύχονται γρήγορα και να συντηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Pintado et al., 2001).

3.4 Μικροβιολογικά κριτήρια

Σύμφωνα με τον 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.

3.5 Στατιστικά στοιχεία

Η παγκόσμια παραγωγή τυρογάλακτος ανέρχεται σήμερα στους 200 εκατ. τόνους ετησίως εκ των οποίων περίπου 40 εκατ. τόνοι παράγονται στην Ευρώπη. Ωστόσο μόνο η μισή ποσότητα από αυτή αξιοποιείται, ενώ η υπόλοιπη αποβάλλεται (Barba F. J., 2021).

Στον Ελλαδικό χώρο παράγονται συνολικά 15 χιλιάδες τόνοι τυριών τυρογάλακτος τον χρόνο από αιγοπρόβειο γάλα (Μασούρας, 2017). Το 2017 από την ετήσια παραγωγή τυριών τα τυριά τυρογάλακτος καταλάμβαναν ένα ποσοστό της τάξεων 11,1% (ICAP, 2019) με τη μυζήθρα να αποτελεί το 50% της παραγωγής των τυριών τυρογάλακτος συνολικά (Χατζηαντωνίου, 2020).

Κεφάλαιο 4 Βακτήρια του γαλακτικού οξέος

4.1 Γενικά

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, μικροαερόφιλα, μη κινητά και μη σπορογόνα βακτήρια. Σε αυτά περιλαμβάνονται κυρίως τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Enterococcus*. Βρίσκονται στο αγελαδινό, το πρόβειο και το κατσικίσιο γάλα καθώς επίσης και στο ανθρώπινο, ενώ αποτελούν και μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου (Rama et al., 2019). Ένα από τα βασικά τους χαρακτηριστικά είναι ότι αδυνατούν να συνθέσουν ομάδες πορφυρίνης όπως είναι η αίμη (Panesar et al., 2007). Θεωρούνται ασφαλή βακτήρια (GRAS: Generally Regarded As Safe) γι' αυτό και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων (Özcelik et al., 2016).

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον για τη ζύμωση λαχανικών, κρεάτων και γαλακτοκομικών προϊόντων. Ιδιαίτερα στα γαλακτοκομικά, η λακτόζη ζυμώνεται από τα βακτήρια αυτά κυρίως ως προς γαλακτικό οξύ. Ανάλογα με τα προϊόντα της ζύμωσης τα βακτήρια αυτά κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: τα ομοζυμωτικά που παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ και τα ετεροζυμωτικά όπου ταυτόχρονα με το γαλακτικό παράγονται αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Τα ομοζυμωτικά βακτήρια επιτυγχάνουν ταχεία πτώση του pH για να αρχίσει η ζύμωση οπότε χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες εκκίνησης (Rama et al., 2019). Σε συνθήκες στρες όπως για παράδειγμα υψηλό pH, χαμηλή θερμοκρασία, έλλειψη πηγών άνθρακα ή παρουσία άλλων πηγών πέρα της γλυκόζης, οι ομοζυμωτικοί μικροοργανισμοί δίνουν και μυρμηκικό οξύ ως προϊόν της αντίδρασης (Bintsis, 2018). Τα ετεροζυμωτικά, από την άλλη, δεν αποτελούν μέρος των καλλιεργειών εκκίνησης (non-starter LAB (NSLAB)). Σε αυτά ανήκουν μεσόφιλα *lactobacilli*, *pediococci*, *enterococci* και το γένος *Leuconostoc* και όλα τα τυριά περιέχουν βακτήρια τουλάχιστον μίας από τις 4 αυτές ομάδες (Casey et al., 2006).

Παρόλο που τα ετεροζυμωτικά βακτήρια δεν χρησιμοποιούνται ως ζυμωτικοί παράγοντες, η παρουσία τους είναι σημαντική καθώς παράγουν πολλές χρήσιμες ουσίες όπως οργανικά οξέα, διακετύλιο, υπεροξείδιο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες. Οι ουσίες αυτές διαμορφώνουν την οργανοληπτική ποιότητα των προϊόντων ήτοι την γεύση, την οσμή, το χρώμα και την υφή. Επιπλέον, προσφέρουν προστασία ενάντια στους

παθογόνους μικροοργανισμούς και συμβάλλουν στην ασφάλεια των τροφίμων αυτών (de Souza et al., 2017).

Πολλά LAB βακτήρια έχουν αποδεδειγμένα οφέλη για την υγεία όπως είναι η θεραπεία των γαστρεντερικών παθήσεων, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού ακόμα και η πρόληψη του καρκίνου. Κάποια θεωρούνται προβιοτικά (Rama et al., 2019) ενώ άλλα παράγουν βιταμίνες (ριβοφλαβίνη, βιταμίνη B12), βιοενεργά πεπτίδια που ωφελούν το καρδιαγγειακό, το πεπτικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, βιοενεργά λιπίδια (συζευγμένο λινολεϊκό οξύ) και ένζυμα όπως η β-γαλακτοσιδάση που βοηθάει τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη (de Souza et al., 2017).

Τα LAB έχουν τεχνολογικά και λειτουργικά οφέλη οπότε είναι φυσικό να υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την παραγωγή τους ιδίως σε μεγάλη κλίμακα. Το βασικό κόστος πηγάζει από το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξή τους. Το τυρόγαλα είναι πλούσιο σε λακτόζη και άλλα θρεπτικά συστατικά οπότε θεωρείται άριστη «τροφή» για τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το τυρόγαλα έχει μεγάλο οργανικό φορτίο και δεν μπορεί να αποβάλλεται απευθείας στο περιβάλλον έστρεψε το ενδιαφέρον των επιστημόνων στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος και του δεύτερου τυρογάλακτος (δηλαδή του υγρού που μένει μετά την παρασκευή των τυριών τυρογάλακτος) ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια και ανάπτυξη των LAB βακτηρίων (Rama et al., 2019).

4.1.1 *Lactobacillus* spp.

Το γένος *Lactobacillus* είναι το μεγαλύτερο της οικογένειας των Lactobacillaceae με 196 επίσημα αναγνωρισμένα είδη μέχρι το 2018. Είναι gram+ βακτήρια σε σχήμα ραβδίου, προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα, μη σπορογόνα και οξυανθεκτικά. Έχουν μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον καθώς βρίσκουν εφαρμογές στα τρόφιμα, τις ζωοτροφές, τη φαρμακευτική και τη βιοτεχνολογία (Huang et al., 2018).

4.1.1.1 *Lactobacillus bulgaricus*

Ο *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός που δεν αναπτύσσεται παρουσία αέρα αλλά πραγματοποιεί τη γαλακτική ζύμωση τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες (Burgos-Rubio et al., 2000). Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι 42-44°C και το άριστο pH=5,6-

5,7 (Marziyeh et al., 2014, Taleghani et al., 2016, Burgos-Rubio et al., 2000). Μαζί με τον *Streptococcus thermophilus* αποτελούν τους βασικούς μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή γιαούρτης και άλλων ζυμώμενων προϊόντων (Van De Guchte et al., 2006). Ο *Lactobacillus bulgaricus* παρόλο που δεν είναι προβιοτικός μικροοργανισμός, έχει ευνοϊκές επιδράσεις σε διάφορες γαστρεντερικές παθήσεις όπως είναι η δυσκοιλιότητα, η δυσανεξία στη λακτόζη, η διάρροια ακόμα και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Μάλιστα σε συνδυασμό με τον *S.thermophilus* και άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς αποτελούν ιδανική τροφή για άτομα που πάσχουν από υπεργλυκαιμία ή υπέρταση (Apostolidis et al., 2007).

4.1.1.2 *Lactobacillus casei*

Ο *Lactobacillus casei* είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος και προαιρετικά ετεροζυμωτικός μικροοργανισμός (Huang et al., 2018). Χρησιμοποιείται σε ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα κυρίως για τη συμβολή του στη γεύση και στην υφή (Hill et al., 2018), ως συμπλήρωμα διατροφής και ως προβιοτικό (Huang et al., 2018). Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες (τουλάχιστον 10^6 cfu/g (Dimitrellou et al., 2014)) προσφέρουν οφέλη στην ανθρώπινη υγεία βελτιώνοντας την μικροχλωρίδα του εντέρου (Hill et al., 2018). Ειδικότερα ο *Lactobacillus casei* έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την χοληστερόλη και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα προβιοτικά για να είναι ωφέλιμα θα πρέπει να παραμένουν βιώσιμα καθόλη τη διάρκεια συντήρησης και να επιβιώνουν τα «εμπόδια» του πεπτικού συστήματος (Wang et al., 2008). Για το λόγο αυτό ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσιάζει αντοχή σε όξινα περιβάλλοντα, χαμηλές θερμοκρασίες, χολικά άλατα, οξειδωτικό και οσμωτικό στρες (Hill et al., 2018). Ωστόσο, το ιδανικό pH για την ανάπτυξή του είναι 6,75-6,85 και η άριστη θερμοκρασία 37°C (Thakur et al., 2018, Thakur et al., 2019).

4.1.2 *Lactococcus spp.*

Το γένος *Lactococcus* ανήκει στην οικογένεια των Streptococcaceae μαζί με τα γένη *Streptococcus* και *Leuconostoc*. Τα βακτήρια αυτά είναι σφαιρικά, θετικά κατά gram, μικροαερόφιλα και μη κινητά. Βρίσκονται κυρίως σε φυτά, ζώα και προϊόντα αυτών ενώ δεν συναντώνται στο έδαφος ή τα κόπρανα. Είναι μεσόφιλα και αναπτύσσονται σε

συγκεντρώσεις 2-4% NaCl (Teuber et al., 2015). Χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για την γεύση και την υφή που προσδίδουν αλλά και για τις συντηρητικές τους ικανότητες. Εκτός από γαλακτικό οξύ ορισμένα είδη (*Lactococcus lactis*) παράγουν και βακτηριοσίνες προστατεύοντας έτσι το τρόφιμο από διάφορους μικροοργανισμούς (Song et al., 2017). Ωστόσο, δεν είναι όλα τα είδη του γένους ασφαλή (GRAS). Πιο συγκεκριμένα, ο *Lactococcus garvieae* εκτός από παθογόνος για τα ιχθυηρά είναι και υπεύθυνος για τη μαστίτιδα των αγελάδων και των βουβαλιών (Teuber et al., 2015).

4.2 Προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης

Τα οργανικά οξέα που προκύπτουν ως προϊόντα ζύμωσης μέσω των LAB εκτός από την θετική επίδραση που ασκούν στην οργανοληπτική ποιότητα, παίζουν και σημαντικό ρόλο στην μικροβιολογική προστασία των τροφίμων. Δημιουργούν χαμηλό pH οπότε είναι λιποδιαλυτά και έτσι μέσω της κυτταρικής μεμβράνης διεισδύουν στο κύτταρο, μειώνουν το ενδοκυτταρικό pH με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τις μεταβολικές λειτουργίες των παθογόνων μικροοργανισμών (de Souza et al., 2017).

Τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα LAB κατά τη ζύμωση εξαρτώνται από το είδος του LAB καθώς και από το μέσο και τις συνθήκες ανάπτυξης (Özcelik et al., 2016).

Τα οργανικά οξέα συνθέτονται κυρίως από μη ανανεώσιμες πηγές ενέργειας αν και γίνονται έρευνες σχετικά με την αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων (όπως το τυρόγαλα) και την μικροβιακή παραγωγή για τον σκοπό αυτό. Η μικροβιακή παραγωγή θεωρείται προτιμότερη της χημικής σύνθεσης καθώς οι συνθήκες (pH, θερμοκρασία, πίεση) είναι ηπιότερες αλλά και η όλη διαδικασία είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον (Pais-Chanfrau et al., 2020).

4.2.1 Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ ($C_3H_6O_3$) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο (E270) σε τυριά, λίπη και έλαια, φρούτα και λαχανικά σε κονσέρβες και γυάλινα δοχεία, μαρμελάδες, ζελέ, κ.ά. (ΕΚ 1333/2008). Παράγεται κυρίως με μικροβιακή ζύμωση υδατανθράκων (κυρίως πεντοζών ή εξοζών που περιέχονται στο τυρόγαλα ή τη μελάσα (Martinez et al., 2013)) και σε μικρότερο βαθμό μέσω χημικής σύνθεσης από ακεταλδεΐδη (Pais-Chanfrau et al., 2020). Διαθέτει δύο στερεοϊσομερή, το L(+) και το D(-) εκ των οποίων μόνο το πρώτο μεταβολίζεται από τον ανθρώπινο οργανισμό (Martinez et al., 2013).

4.2.2 Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$) είναι ένα διαβρωτικό οξύ με έντονη οσμή και καυστική γεύση (Wagner et al., 2000). Χρησιμοποιείται ως αντιδρών για παραγωγή διάφορων χημικών (οξική κυτταρίνη, οξικό πολυβινύλιο) αλλά αποτελεί και προϊόν ζύμωσης από βακτήρια του οξικού οξέος (ξύδι). Το μεγαλύτερο μέρος παράγεται με καρβονυλίωση της μεθανόλης, ενώ ένα πολύ μικρό μερίδιο προκύπτει από μικροβιακή βιομετατροπή σακχάρων (Martinez et al., 2013).

4.2.3 Προπιονικό οξύ

Το προπιονικό οξύ ($C_3H_6O_2$) διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων αλλά και ως συστατικό σε προϊόντα καθαρισμού καθώς τα άλατά του καταστέλλουν την ανάπτυξη ζυμών σε επιφάνειες. Μάλιστα, όταν βρίσκεται σε συνδυασμό με γαλακτικό και οξικό οξύ εμποδίζει την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*. Γενικά το προπιονικό μπορεί να παραχθεί με ζύμωση, βιοσύνθεση ή καταβολισμό αμινοξέων. Η βιομηχανική σύνθεση είναι αυτή που εφαρμόζεται κατά κόρον αν και τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στις ζυμώσεις που θεωρούνται περισσότερο βιώσιμες (Gonzalez-Garcia et al., 2017).

Κεφάλαιο 5 *Listeria monocytogenes*

4.1 Ταξινόμηση

Το γένος *Listeria* ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae* και μέχρι το 2020 είχαν αναγνωρισθεί και ταυτοποιηθεί συνολικά 20 είδη του γένους αυτού (Nwaiwu O., 2020). Από αυτά, μόνο 2 είναι παθογόνα η *Listeria monocytogenes* -που προκαλεί σοβαρές τροφιογενείς δηλητηριάσεις σε ανθρώπους και ζώα- και η *Listeria ivanovii* που απειλεί την υγεία κυρίως των μηρυκαστικών (Guillet C. et al., 2010).

4.2 Μορφολογία

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά gram βακτήριο που δεν παράγει σπόρια και είναι προαιρετικά αναερόβιο (Radoshevich L. et al., 2017). Έχει σχήμα ραβδίου με 0,5 μm πάχος και 1-1,5 μm πλάτος (Dongyou L., 2006).

Κάθε βακτήριο διαθέτει 4 με 6 περίτριχα μαστίγια χάρη στα οποία μπορεί και κινείται όταν βρίσκεται έξω από τα κύτταρα του ξενιστή (Renier S. et al., 2011). Η βιοσύνθεση των μαστιγίων όμως, εξαρτάται από την θερμοκρασία. Έτσι σε θερμοκρασίες όπου γίνεται σύνθεση των μαστιγίων (<30°C) έχουμε κινητικότητα, ενώ σε θερμοκρασίες όπου τα γονίδια των μαστιγίων δεν μεταγράφονται (>37°C) τα βακτήρια δεν είναι κινητά. Μάλιστα, έρευνες προτείνουν ότι η απουσία κινητικότητας σε αυτές τις θερμοκρασίες οφείλεται σε έναν μηχανισμό της *L.monocytogenes* να αποφύγει την αναγνώριση και τη δραστηριοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή όταν αυτή «εισέρχεται» σε αυτόν (Grundling A. et al., 2004).



Εικόνα 5.1: *Listeria monocytogenes* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Επιπλέον, το συγκεκριμένο βακτήριο έχει την ικανότητα να σχηματίζει biofilm που του επιτρέπει να προσκολλάται σε επιφάνειες γυαλιού, μετάλλου, καουτσούκ και πλαστικού. Το biofilm προστατεύει τον μικροοργανισμό από το περιβαλλοντικό στρες με αποτέλεσμα αυτός να παραμένει, να επιβιώνει και να αναπτύσσεται για μεγάλες χρονικές

περιόδους στην επιφάνεια προσκόλλησης επιμολύνοντας τα τρόφιμα με τα οποία έρχεται σε επαφή (Renier S. et al., 2010).

4.3 Προέλευση

Όντας ανεκτική ακόμα και σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και αλατοπεριεκτικότητας, η *Listeria monocytogenes* ενδημεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπως το έδαφος, το νερό και τα λύματα, τη βλάστηση και τα τρόφιμα (Dongyou L., 2006). Ειδικότερα για τα τρόφιμα, ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός έχει ανιχνευθεί σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. μαλακά τυριά), φρέσκα λαχανικά, έτοιμα προς κατανάλωση κρέατα, πουλερικά, ιχθυηρά και έτοιμα γεύματα (Chen J. et al, 2017).

4.4 Ανάπτυξη

Η *L.monocytogenes* είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο που επιβιώνει και αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (από -1,5° έως 45°C με άριστη θερμοκρασία γύρω στους 30°-37°C). Η ψύξη δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξή της, όμως θανατώνεται σε θερμοκρασίες άνω των 50°C.

Είναι ανθεκτική τόσο σε όξινα (pH<5) όσο και σε αλκαλικά (pH=9,6) περιβάλλοντα με το άριστο να βρίσκεται στο pH=7. Αν και είναι οξυανθεκτική, η ανθεκτικότητα αυτή μειώνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας.

Η άριστη a_w (ενεργότητα ύδατος) για την ανάπτυξή της είναι 0,97, όμως αναπτύσσεται επίσης και σε $a_w=0,90$ ενώ επιβιώνει και σε $a_w=0,81$. Επίσης, αναπτύσσεται καλά σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου πάνω από 10%. Μάλιστα, η αλατοανεκτικότητα αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας.

Τέλος, αναπτύσσεται καλά σε αερόβιες αλλά ακόμα καλύτερα σε αναερόβιες συνθήκες (Saha M. et al., 2015).

4.5 Μικροβιολογικά κριτήρια – νομοθεσία

Σύμφωνα με τον κανονισμό 2073/2005 όσο αφορά τα μικροβιολογικά κριτήρια για την *L.monocytogenes* προβλέπεται:

απουσία σε 25 g τροφίμου για:

- ✓ έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς

- ✓ έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη *L.monocytogenes* που όμως δεν προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και για τα οποία ο υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων δεν μπορεί να αποδείξει ότι το προϊόν δεν θα ξεπεράσει τα 100 cfu/g καθ'όλη τη διάρκεια διατήρησης

έως και 100 cfu/g για:

- ✓ έτοιμα τρόφιμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* που όμως δεν προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς εφόσον ο ο υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων δεν μπορεί να αποδείξει ότι το προϊόν δεν θα ξεπεράσει τα 100 cfu/g καθ'όλη τη διάρκεια διατήρησης
- ✓ έτοιμα τρόφιμα μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* που όμως δεν προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Τέτοια τρόφιμα θεωρούνται αυτά που έχουν $pH \leq 4,4$ ή $a_w \leq 0,92$, τα προϊόντα με $pH \leq 5,0$ και $a_w \leq 0,94$ καθώς και τα τρόφιμα με διάρκεια διατήρησης μικρότερης των 5 ημερών.

4.6 Νοσολογία

Η είσοδος της *Listeria monocytogenes* στον οργανισμό γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω επιμολυσμένων τροφίμων. Έτσι, με την κατάποση ο μικροοργανισμός οδηγείται στο στομάχι όπου και επιβιώνει για να εισέλθει στη συνέχεια μέσα στο έντερο. Από εκεί διαδίδεται στη λέμφο και το αίμα και μεταφέρεται στους μεσεντερικούς αδένες, τη σπλήνα και το συκώτι. Όλη αυτή η διαδικασία γίνεται με μεγάλη ταχύτητα. Στη συνέχεια, τα μακροφάγα καταστρέφουν την πλειονότητα των βακτηρίων από την σπλήνα και το συκώτι, ενώ όσα απομένουν πολλαπλασιάζονται για διάστημα 2-5 ημερών. Από εκεί και έπειτα το ανοσοποιητικό σύστημα ενός υγιούς οργανισμού δραστηριοποιείται και εξαλείφει τα εναπομείναντα κύτταρα του παθογόνου. Σε περίπτωση που το ανοσοποιητικό είναι εξασθενημένο, τα βακτήρια περνούν στην κυκλοφορία του αίματος και από εκεί μπορούν να εισέλθουν στη μήτρα ή το νευρικό σύστημα (Orsi R. et al., 2010).

4.6.1 Είδη λιστερίωσης και συμπτώματα

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* μπορεί με δύο τρόπους να επηρεάσει τον οργανισμό και να εμφανίσει συμπτώματα. Ο ένας τρόπος είναι να προσβάλλει το γαστρεντερικό

σύστημα προκαλώντας στον άνθρωπο ναυτία ή διάρροια σε συνδυασμό με πυρετό και μυαλγίες. Ο άλλος τρόπος είναι να επεκταθεί στο νευρικό σύστημα και να παρουσιάσει συμπτώματα όπως σύγχυση, σπασμούς, έλλειψη ισορροπίας, κεφαλαλγία και αδυναμία κίνησης στον αυχένα.

Στην περίπτωση της προσβολής του γαστρεντερικού σωλήνα, ο χρόνος επώασης είναι 6 ώρες με 4 ημέρες, με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισής της μετά από 24 ώρες. Εμφάνιση συμπτωμάτων μπορεί να παρατηρήσουμε και μετά από διάστημα δύο μηνών γι' αυτό είναι δύσκολη η ιχνηλάτιση ως προς τον εντοπισμό του μολυσμένου τροφίμου.

4.6.2 Ευπαθείς ομάδες

Παρόλο που τα βακτήρια αυτά είναι εξαιρετικά παθογόνα, άτομα υγιή μπορεί να μην νοσήσουν ακόμα και αν έχουν καταναλώσει κάποιο μολυσμένο τρόφιμο. Ωστόσο, άτομα υψηλού κινδύνου διατρέχουν αυξημένη πιθανότητα νόσησης από λιστερίωση ακόμα και στην περίπτωση που το τρόφιμο που έχουν καταναλώσει έχει πολύ χαμηλό αριθμό κυττάρων *L.monocytogenes* (ΕΟΔΥ). Στους ενήλικες που εμφανίζουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και στους ηλικιωμένους η λιστερίωση μπορεί να καταλήξει σε μηνιγγίτιδα, εγκεφαλική λοίμωξη και σοβαρή λοίμωξη του αίματος (European Center for Disease prevention and Control).

Στις έγκυες, το νεογνό μπορεί να μολυνθεί από το βακτήριο μέσω του πλακούντα. Η πορεία της εγκυμοσύνης μετά την προσβολή από το βακτήριο εξαρτάται από την ηλικία στην οποία γίνεται η κύηση και μπορεί να προκληθεί αποβολή εμβρύου, θνησιγένεια, πρόωρος τοκετός ακόμα και νεογέννητο που θα πάσχει από σοβαρή λοίμωξη (ΕΟΔΥ). Στην μητρική-νεογνική φάση, ο χρόνος επώασης είναι από 1 έως 67 μέρες, με έναν μέσο όρο πιθανότητας εμφάνισης στις 28 ημέρες (Ευρωπαϊκή επιτροπή).

4.6.3 Θεραπεία

Η διαπίστωση λοίμωξης από *L.monocytogenes* σε γυναίκα που εγκυμονεί αντιμετωπίζεται άμεσα με την λήψη αντιβιοτικών ώστε να προληφθεί η λοίμωξη στο έμβρυο ή το νεογνό. Στην περίπτωση που τελικά το έμβρυο νοσήσει, λαμβάνει την ίδια αντιβιοτική αγωγή με αυτή ενός ενήλικα. Παρόλη την γρήγορη αντιμετώπιση με αντιβιοτικά σε ένα άτομο που έχει υποστεί λιστερίωση, μπορεί τελικά να καταλήξει σε θάνατο (ΕΟΔΥ).

4.6.4 Επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα η λιστερίωση είναι η πέμπτη συχνότερη τροφιογενής λοίμωξη και έχει τις περισσότερες νοσηλείες και θανάτους παγκοσμίως. Το διάστημα 2008-2016 η πορεία των κρουσμάτων ήταν αυξητική, ενώ σε σταθερά επίπεδα βρισκόταν το 2017-2018. Το 2020 παρατηρήθηκε μείωση στην Ευρώπη ως προς τον αριθμό των κρουσμάτων και αυτό μπορεί να οφείλεται στην καθολική περίοδο καραντίνας λόγω της πανδημίας του Covid-19 γιατί όπως προαναφέρθηκε τα προηγούμενα έτη υπήρχε στατιστική σταθερότητα (EFSA Journal 2021).

Την περίοδο 2010-2019 η εμφάνιση των κρουσμάτων εμφάνιζε εποχιακή επαναληψιμότητα, δηλαδή τους καλοκαιρινούς μήνες η λιστερίωση ήταν συχνότερη σε σχέση με τους χειμερινούς (EFSA Journal 2021).

Πίνακας 5.1: Επιδημιολογικά στοιχεία λιστερίωσης για τα έτη 2015-2019 (EFSA Journal)

	2019	2018	2017	2016	2015	Πηγή
Σύνολο επιβεβαιωμένων κρουσμάτων	2,621	2,545	2,475	2,500	2,183	ECDC
Λοίμωξη που αποκτήθηκε στην Ε.Ε	1,871	1,640	1,639	1,539	1,450	ECDC
Αριθμός χωρών που συμμετείχαν στην έρευνα	28	28	28	28	28	ECDC
Αριθμός κρουσμάτων επιβεβαιωμένων εστιών	349	159	39	27	233	ECDC
Συνολικός αριθμός εξάρσεων	21	14	10	6	15	EFSA

Όπως έχει ήδη ειπωθεί η λιστερίωση είναι τροφιογενής λοίμωξη με ποσοστό επιβεβαιωμένων κρουσμάτων σε ευρωπαϊκό επίπεδο 0,47 ανά 100.000 πληθυσμό το 2018

(EFSA Journal). Για το 2020, ο αριθμός των θανάτων από λιστερίωση σε ευρωπαϊκό επίπεδο παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.2: Θάνατοι από λιστερίωση ανά ευρωπαϊκή χώρα το 2020 (Surveillance Atlas of Infectious Diseases)

Γαλλία	43	Ολλανδία	12	Πολωνία	5
Ισπανία	33	Αυστρία	11	Ελλάδα	3
Γερμανία	26	Ουγγαρία	9	Σλοβενία	2
Πορτογαλία	14	Τσεχία	6	Βέλγιο	2

Η Νορβηγία και η Μάλτα είχαν από έναν θάνατο

Συνολικοί θάνατοι: 168

Αυξημένος κίνδυνος θνησιμότητας παρατηρήθηκε σε ηλικίες άνω των 64 και ιδιαίτερα σε αυτές άνω των 84. Τα πιο συχνά αναφερόμενα τρόφιμα ήταν τα ψάρια και τα προϊόντα αυτών, προϊόντα κρέατος και το τυρί.

4.7 Τρόπος ταυτοποίησης

Για την ταυτοποίηση της *L.monocytogenes* σύμφωνα με το ISO 11290 γίνεται ένας πρώτος προεμπλουτισμός του δείγματος με Fraser broth και επώαση στους 30°C για 24 ώρες. Ακολουθεί ένας δεύτερος εμπλουτισμός και επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια το δείγμα καλλιεργείται σε θρεπτικό άγαρ και επωάζεται στους 37°C για 48 ώρες. Η *L.monocytogenes* σχηματίζει μπλε-πράσινες αποικίες με δακτύλιο.

Ακολουθούν βιοχημικές δοκιμές και δοκιμές ζύμωσης σακχάρων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού.

Πίνακας 5.3: Βιοχημικές δοκιμές και δοκιμές ζύμωσης σακχάρων για ταυτοποίηση *L.monocytogenes* (Nayak N. et al., 2015)

Βιοχημικά τεστ	<i>L.monocytogenes</i>
καταλάση	+
οξειδάση	-
νιτρικό άλας	-
ερυθρό του μεθυλίου	+
Voges Proskauer	+
Τεστ ζύμωσης σακχάρων	<i>L.monocytogenes</i>
ραμινόζη	+
ξυλόζη	-
μαννιτόλη	-

Κεφάλαιο 6 Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί

5.1 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένας βάκιλλος αρνητικός κατά gram που ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Κινείται χάρη στα μαστίγια που διαθέτει και επικολλάται σε επιφάνειες με τη βοήθεια των τριχιδίων του. Είναι ένας μικροοργανισμός δυνητικά αναερόβιος που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτύσσεται παρουσία ή απουσία αέρα, ωστόσο δεν επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH (Blount et al., 2015).

Η *E.coli* μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, το νερό και τα φυτά ενώ αποτελεί μέρος του εντερικού μικροβιώματος ανθρώπων και ζώων στο οποίο υπάρχει χωρίς να προκαλεί ασθένεια. Εκεί έχει διάφορες ευεργετικές δράσεις καθώς παράγει τις βιταμίνες K και B12, καταναλώνει το οξυγόνο δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς του εντερικού σωλήνα και ανταγωνίζεται τους παθογόνους που εισέρχονται σε αυτόν. Κάποια στελέχη υπάρχουν μόνιμα στο έντερο και κάποια άλλα μεταβάλλονται ανάλογα την κατάσταση της υγείας, τη διατροφή και την έκθεση σε αντιβιοτικά (Blount et al., 2015).

Η παρουσία της *E.coli* στον ανθρώπινο οργανισμό ανιχνεύεται ήδη από την βρεφική ηλικία. Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ο μικροοργανισμός αυτός υπάρχει σε αυξημένους αριθμούς στο σώμα της εγκύου ώστε να είναι σίγουρο ότι θα μεταφερθεί στο επιθήλιο του εντέρου του βρέφους. Εκεί θα προκαλέσει τις απαραίτητες δομικές και λειτουργικές αλλαγές για την ομαλή ανάπτυξη του μικροβιώματος του εντέρου του νεογέννητου. Τα τελευταία χρόνια με την αύξηση των καισαρικών επεμβάσεων και την βελτίωση της υγιεινής των νοσοκομείων τα επίπεδα της *E.coli* παρουσιάζονται μειωμένα στο μικροβίωμα των βρεφών με ταυτόχρονη αύξηση του *Staphylococcus aureus* γεγονός που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παθήσεων όπως διαβήτη, άσθμα και παχυσαρκία (Blount et al., 2015).

Παρά τη συμβιωτική κατάσταση που υπάρχει μεταξύ της *E.coli* και του ανθρώπινου οργανισμού, το βακτήριο αυτό παραμένει ένας από τους πιο επικίνδυνους τροφιογενείς παθογόνους που απασχολεί τους επιστήμονες. Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.1, οι ορότυποί του κατατάσσονται σε 7 κατηγορίες ανάλογα με τον παράγοντα λοιμογόνου δράσης και τα συμπτώματα που προκαλούν. Από τους ορότυπους αυτούς μεγαλύτερη ανησυχία προκαλεί η εντεροαιμορραγική *E.coli* που παράγει τις Shiga-τοξίνες

και αποτελεί την πιο λοιμογόνο, διαρροϊκή *E.coli* που είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η *E.coli* 0157:H7 (Allocati et al., 2013).

Πίνακας 6.1: Ορότυποι *E.coli*

Ορότυπος <i>E.coli</i>	Νόσος
Εντεροπαθογόνος (EPEC)	Παιδική διάρροια
Εντεροτοξιγενής (ETEC)	Διάρροια του ταξιδιώτη
Εντεροδιεισδυτική (EIEC)	Δυσεντερία παρόμοια της σιγκέλωσης
Εντεροδιαχεόμενη (DAEC)	Οξεία παιδική διάρροια
Εντεροσυσσωρευόμενη (EAEC)	Παιδική διάρροια
Εντεροαιμορραγική (EHEC)	Αιμορραγική κολλίτιδα

Στο νωπό τυρόγαλα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια με το H₂O₂ και τα φυσικά αντιβιοτικά που παράγουν δημιουργούν ένα ανταγωνιστικό περιβάλλον που δυσκολεύουν την επιβίωση και την ανάπτυξη της *E.coli* 0157:H7 (Marek et al., 2004).

Η θερμική επεξεργασία που υφίσταται το τυρόγαλα για την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος είναι εντονότερη της παστερίωσης οπότε η *E.coli* 0157:H7 θανατώνεται. Τυχόν παρουσία του μικροοργανισμού αυτού στο τελικό προϊόν οφείλεται σε επιμόλυνση από μετέπειτα χειρισμούς κατά την συσκευασία, μεταφορά ή αποθήκευση. Σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης (2-4°C) ο μικροοργανισμός απλώς επιβιώνει ενώ σε υψηλότερες (12-15°C) μπορεί και αναπτύσσεται. Η επικινδυνότητα του συγκεκριμένου παθογόνου έγκειται στη χαμηλή μολυσματική δόση καθώς μόνο 10 cfu/g αρκούν για να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή. Όμως ακόμα και στην περίπτωση που ο αριθμός κυττάρων είναι μεγαλύτερος, αυτό δεν μπορεί να γίνει αντιληπτό καθώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δεν αλλοιώνονται (Govaris et al., 2001).

5.2 *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένας gram θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος που ανήκει στην οικογένεια Staphylococcaceae. Οι παράγοντες λοιμογόνου δράσης περιλαμβάνουν την καταλάση που διασπά το H₂O₂ και την κοαγκουλάση που είναι υπεύθυνη για θρομβώσεις (Ondusko et al., 2018). Ενδημεί στο δέρμα και τη ρινική κοιλότητα των ανθρώπων γι'αυτό και οι περισσότερες τροφικές δηλητηριάσεις από σταφυλόκοκκο οφείλονται στους λανθασμένους χειρισμούς και στη μη τήρηση των

μέτρων υγιεινής (Kümmel et al., 2016). Βέβαια τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί και στα βοειδή καθώς ο μαστός των ζώων που πάσχουν από μαστίτιδα έχει προσβληθεί από *Staphylococcus aureus* ο οποίος επιμολύνει το νωπό γάλα κατά το άρμεγμα (Mehli et al., 2016).

Λόγω της ευρείας και αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών ο συγκεκριμένος σταφυλόκοκκος έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ με αποτέλεσμα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε επιφάνειες εγκαταστάσεων, εξοπλισμό ακόμα και σε πλαστικές συσκευασίες (Carvalho et al., 2021).

Η επιμόλυνση των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων με σταφυλόκοκκο ανησυχεί τους επιστήμονες για διάφορους λόγους. Αυτό που καθιστά τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο επικίνδυνο είναι οι εντεροτοξίνες που παράγει οι οποίες είναι ανθεκτικές στη θερμική επεξεργασία (συμπεριλαμβανομένης της παστερίωσης) και τις πρωτεάσες του γαστρεντερικού συστήματος. Επομένως, μετά τον σχηματισμό τους στο τρόφιμο δεν μπορούν να καταστραφούν ούτε να αδρανοποιηθούν (Kümmel et al., 2016). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τις γενετικές εκφράσεις ώστε να προσαρμόζεται σε ακραία περιβάλλοντα όπως είναι το χαμηλό pH, η χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οι ακραίες θερμοκρασίες και η παρουσία των αντιβιοτικών (Ondusko et al., 2018).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 7 Σκοπός εργασίας

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να εξεταστεί η επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και κυρίως των οξέων που παράγουν στα τυριά τυρογάλακτος. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία εμβολιάστηκαν και αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα από τυρί τυρογάλακτος. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είχε δύο διαφορετικές αλατοπεριεκτικότητες. Με το πέρας της επώασης έγινε καταμέτρηση του pH και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση HPLC κάποια βασικά οργανικά οξέα που παρήγαγαν οι μικροοργανισμοί. Λήφθηκαν συμπεράσματα για τον ρόλο που παίζουν τα οργανικά οξέα στη διαμόρφωση του pH. Επιπλέον έγινε σύγκριση της «μεταβολικής συμπεριφοράς» των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις δύο διαφορετικές αλατοπεριεκτικότητες.

Κεφάλαιο 8 Μέθοδοι και υλικά

8.1 Τυριά τυρογάλακτος

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής τυριά τυρογάλακτος:

1. Ανθότυρος από αιγοπρόβειο γάλα



	Ανά 100g
Ενέργεια (kcal)	179
Λίπος (g)	14
Υδατάνθρακες (g)	1,65
Πρωτεΐνες (g)	11,6
Αλάτι (g)	0,52

Εικόνα 8.1: Ανθότυρος από αιγοπρόβειο γάλα

2. Ανθότυρος από κατσικίσιο γάλα

3. Μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα



	Ανά 100g
Ενέργεια (kcal)	196
Λίπος (g)	15
Υδατάνθρακες (g)	3,3
Πρωτεΐνες (g)	12
Αλάτι (g)	1,5

Εικόνα 8.2: Μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα

4. Ξινή μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα



	Ανά 100g
Ενέργεια (kcal)	197
Λίπος (g)	15
Υδατάνθρακες (g)	2,6
Πρωτεΐνες (g)	13
Αλάτι (g)	2

Εικόνα 8.3: Ξινή μυζήθρα από αιγοπρόβειο γάλα

Πέρα από τον κασικίσιο ανθότυρο που υπήρχε αποθηκευμένος στην κατάψυξη του εργαστηρίου, όλα τα υπόλοιπα τυριά αγοράστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα.

8.2 Παρασκευή υποστρώματος

Στο πείραμα αυτό δεν χρησιμοποιήθηκαν συμβατικά υποστρώματα αλλά παρασκευάστηκαν από τα εξεταζόμενα τυριά τυρογάλακτος με σκοπό η σύσταση τους να προσομοιάζει αυτή του κάθε τυριού.

Παρασκευή υποστρωμάτων

Αρχικά, ζυγίζονται 25g τυρί τυρογάλακτος σε ένα stomacher bag και συμπληρώνονται με 225ml απιονισμένου νερού. Η σακούλα τοποθετείται στο stomacher έως ότου γίνει ομογενοποίηση. Στη συνέχεια με ένα σιφώνιο λαμβάνεται μόνο η υγρή φάση που έχει διαχωριστεί από το φίλτρο του stomacher bag και μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Το ποτήρι αυτό τοποθετείται σε κατσαρολάκι με νερό το οποίο θερμαίνεται σε φλόγα. Με ένα θερμόμετρο που είναι βυθισμένο στον ορό παρακολουθείται η θερμοκρασία και όταν αυτή φτάσει τους 70°C απομακρύνεται το ποτήρι ζέσεως από το νερό. Σε αυτό το σημείο έχουν κατακρημνιστεί κάποια στερεά οπότε και γίνεται διαχωρισμός με χωνί και διηθητικό χαρτί. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με αποστείρωση στους 121,1°C.



Εικόνα 8.4: (από αριστερά προς τα δεξιά) Μηχάνημα stomacher, Θέρμανση σε κατσαρολάκι με φλόγα, Διαχωρισμός με διηθητικό χαρτί και χωνί

Η θέρμανση στους 70°C γίνεται με σκοπό την κατακρήμνιση των στερεών ώστε τελικά να παραληφθεί ένα υγρό χωρίς ίζημα. Έγινε και δοκιμή θέρμανσης σε θερμαντική

πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι η άνοδος της θερμοκρασίας είναι πιο αργή και ότι απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία (80°C) ώστε να γίνει η κατακρήμνιση των στερεών. Ο λόγος που απορρίψαμε αυτή την μέθοδο θέρμανσης ήταν για να μην προξενήσουμε επιπλέον καταπόνηση υποστρώματος καθώς στην συνέχεια θα ακολουθούσε η αποστείρωσή του. Επιπλέον, ο μαγνήτης με την κίνησή του προκαλούσε διάσπαση των κροκιδωμάτων που σχηματίζονταν σε μικρότερα κομμάτια αυξάνοντας τη θολότητα του διαλύματος με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η παρακολούθηση της κατακρήμνισης και ιδίως η ολοκλήρωσή της.

Ο διαχωρισμός υγρού και στερεών μετά τη θέρμανση σε φλόγα γίνεται με διηθητικό χαρτί καθώς τόσο το φίλτρο μικροδιήθησης όσο και η αντλία κενού δίνουν διάλυμα το οποίο δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του πειράματος λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών.



Εικόνα 8.5: (από αριστερά προς τα δεξιά) Ορός μετά τη θέρμανση, Διαχωρισμός κροκιδωμάτων από τον ορό, Τελικό υπόστρωμα

Μετά την παρασκευή του υποστρώματος ακολουθεί αποστείρωση η οποία έχει δύο σκοπούς. Ο πρώτος είναι να κατακρημνιστούν και άλλα στερεά αφού η αποστείρωση φθάνει μέχρι τους 121°C ενώ η θέρμανση με το νερό έφτασε μόνο μέχρι τους 70°C. Ο δεύτερος είναι να παραλάβουμε στείρο υπόστρωμα στο οποίο θα αναπτυχθούν μόνο τα οξυγαλακτικά βακτήρια με τα οποία θα γίνει ο εμβολιασμός και όχι άλλοι μικροοργανισμοί που πιθανόν προϋπάρχουν στον ορό.

8.3 Έλεγχος ανάπτυξης μικροοργανισμών στο παρασκευασθέν υπόστρωμα

Αφού παρασκευασθεί ο ορός πρέπει να γίνει έλεγχος που αφορά τα θρεπτικά συστατικά και συγκεκριμένα αν επαρκούν ποσοτικά και ποιοτικά ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της *L. monocytogenes* (μελλοντική εργασία-βλ.Κεφ.10) ξεχωριστά.

Έτσι, γίνεται ανάλυση του ορού ως προς το λίπος, τις πρωτεΐνες, τη λακτόζη και τα ολικά στερεά σε αναλυτή MILKOSCAN (Foss, Denmark) (πίνακας 9.1). Στη συνέχεια, μικρή ποσότητα του παρασκευασθέντος ορού τοποθετείται σε τρεις σωλήνες και ο καθένας εμβολιάζεται με *L. monocytogenes* και 2 διαφορετικά είδη γαλακτοβάκιλλων. Γίνεται επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Μετά την επώαση παρατηρείται μία θολότητα στο υγρό η οποία είναι ένδειξη ανάπτυξης μικροοργανισμών. Για επιβεβαίωση, λαμβάνεται δείγμα από κάθε σωλήνα και γίνεται καλλιέργεια σε τρυβλία. Μετά την επώαση αυτών γίνεται η καταμέτρηση τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον πίνακα 9.4.

8.4 Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων

Με την προηγούμενη δοκιμή διαπιστώθηκε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται στο υπόστρωμα το οποίο παρασκευάζεται από τυρί τυρογάλακτος. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει εμβολιασμό του υποστρώματος με διαφορετικά στελέχη γαλακτοβάκιλλων και έλεγχο της αλλαγής pH σε συνδυασμό με τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των οργανικών οξέων που θα παραχθούν.

Η ποσότητα του ορού χωρίζεται σε 2 μέρη και σε κάθε μέρος προστίθεται διαφορετική ποσότητα επιτραπέζιου αλατιού ώστε τελικά οι περιεκτικότητες σε NaCl να είναι 1,0% και 1,4% αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες περιεκτικότητες επιλέχθηκαν διότι τα τυριά τυρογάλακτος σπάνια ξεπερνούν τις τιμές αυτές. Γίνεται μέτρηση του pH και των δύο διαλυμάτων (pH=5,4) και με διάλυμα NaOH 1M ρυθμίζεται στο 5,7 ώστε να προσομοιάζει την οξύτητα των τυριών τυρογάλακτος. Ο ορός μεταφέρεται σε μικρούς περιέκτες και σε κάθε περιέκτη προστίθεται περίπου 1ml (μία κρική) από ένα διαφορετικό στέλεχος γαλακτοβάκιλλου που υπάρχουν αποθηκευμένα στην κατάψυξη του εργαστηρίου. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση στους 37°C για 48 ώρες γίνεται μέτρηση

και καταγραφή του pH για κάθε δείγμα. Οι τιμές που λήφθηκαν φαίνονται στον πίνακα 9.5.



Εικόνα 8.6: (από αριστερά προς τα δεξιά) Σωλήνες με ορό μετά την ρύθμιση pH, αλατοπεριεκτικότητας και τον εμβολιασμό με γαλακτοβάκιλλους, Πεχάμετρο

8.5 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης ή αλλιώς HPLC.

8.5.1 Αρχή μεθόδου

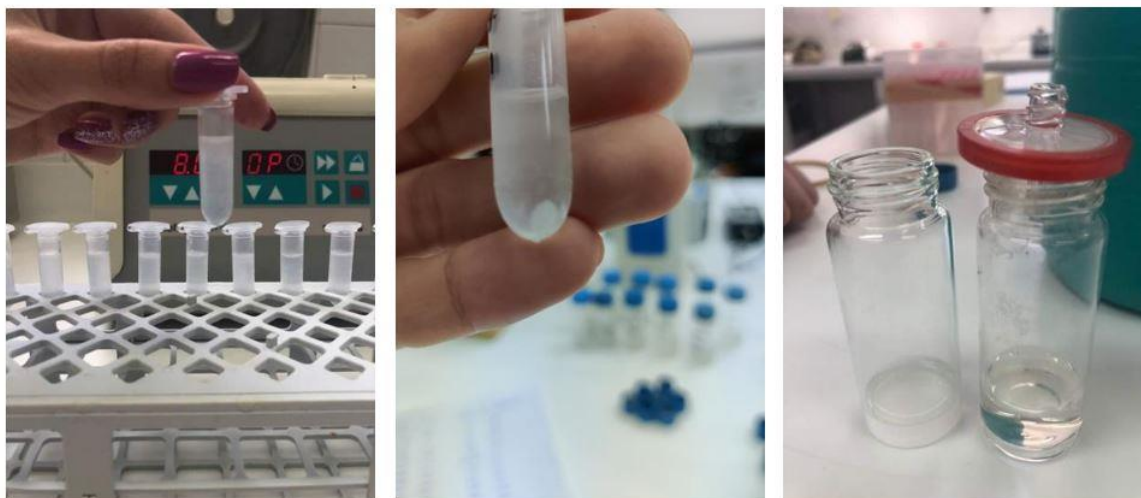
Η HPLC ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και επακόλουθη ταυτοποίηση των συστατικών μίγματος ουσιών. Γενικά οι χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης αποτελούνται από μία κινητή φάση δηλαδή διαλύτη ή μίγμα διαλυτών και μία στατική φάση που είναι συνήθως πορώδες στερεό υλικό. Ο διαχωρισμός των συστατικών εξαρτάται από τη φυσικοχημική συγγένεια των ουσιών (μέγεθος, φορτίο, διαλυτότητα, πτητικότητα) με κάθε φάση και εκφράζεται από τον συντελεστή κατανομής $K = \frac{C_s}{C_m}$ όπου C_s και C_m οι συγκεντρώσεις της ουσίας στην στατική και κινητή φάση αντίστοιχα. Ο συντελεστής K αποτελεί σταθερά για κάθε ένωση και συνδυασμό στατικής-κινητής φάσης σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και προκειμένου δύο ουσίες να μπορούν να διαχωριστούν θα πρέπει να έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής K . Έτσι, μία ουσία που έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση εκκλύεται πιο γρήγορα σε σχέση με μία ένωση που έχει συγγένεια με την στατική φάση.

Η HPLC αποτελεί μία τεχνική χρωματογραφίας στήλης όπου η ροή της κινητής φάσης δεν οφείλεται στην βαρύτητα αλλά στη λειτουργία μίας αντλίας. Με τον τρόπο αυτό πετυχαίνουμε μείωση του μεγέθους της στήλης και καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών.

8.5.2 Πειραματική πορεία

8.5.2.1 Προετοιμασία δείγματος

Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στη στήλη είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί ότι τα δείγματα δεν περιέχουν ίχνη στερεών που θα δυσκολέψουν και πιθανώς να εμποδίσουν την ροή της κινητής φάσης. Γι' αυτό με μία πιπέτα μεταφέρουμε 1ml από κάθε περιέκτη που περιέχει ορό σε δύο σωλήνες Eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 8.000 στροφές για 8 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης έχει γίνει κατακάθιση των στερεών οπότε με μία πιπέτα παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο υγρό και το μεταφέρουμε σε σωλήνες για να ακολουθήσει μικροδιήθηση με φίλτρο 0,45 μm (Syringeless filters, Mini-UniPrep™, Whatman™) οπότε και παραλαμβάνεται καθαρό υγρό.



Εικόνα 8.7: (από αριστερά προς τα δεξιά) Σωλήνες Eppendorf με ορό πριν την φυγοκέντριση, Ορός μετά την φυγοκέντριση, Ορός πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη μικροδιήθηση με φίλτρο Whatman

8.5.2.2 Ανάλυση

Η ανάλυση HPLC πραγματοποιήθηκε σε μονάδα VWR Hitachi με ανιχνευτή συστοιχίας διόδου L-2455 Elite La Chrom (VWR International, Radnor, PA). Η στήλη ήταν Aminex HPX, 1.3 × 7,8 mm, με μέγεθος σωματιδίων 9 μm (Bio-Rad). Η κινητή φάση ήταν θειικό οξύ 0,05M. Ο χρόνος εκτέλεσης ήταν 30 λεπτά και ο ρυθμός ροής 0,4mL/min. Η θερμοκρασία

στήλης ήταν ρυθμισμένη στους 30°C και ο όγκος έγχυσης ήταν 2μL. Η ανίχνευση έγινε σε απορρόφηση 210 nm.

Αρχικά, έγινε ανάλυση στα 4 πρότυπα δείγματα των οργανικών οξέων (οξικού, γαλακτικού, προπιονικού και μυρμηκικού). Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις εμπορικών προτύπων και οι τιμές διορθώθηκαν με βάση την καθαρότητα. Τα πρότυπα αναλύθηκαν το καθένα ξεχωριστά αλλά και σε μίγμα όλα μαζί ώστε να εξεταστούν τυχόν παρεκκλίσεις στους χρόνους κατακράτησης. Οι πρότυπες καμπύλες που λήφθηκαν φαίνονται στην εικόνα 9.1.

Στη συνέχεια έγινε η ανάλυση των δειγμάτων. Η συγκέντρωση κάθε οργανικού οξέος υπολογίστηκε με τη μέθοδο των πρότυπων καμπυλών. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν δύο φορές, σε διαφορετικές μέρες και εις διπλούν κάθε φορά. Τα χρωματογραφήματα μερικών δειγμάτων φαίνονται στην εικόνα 9.2.

Κεφάλαιο 9 Αποτελέσματα και συζήτηση

9.1 Παρασκευή υποστρώματος

Κατά την παρασκευή του ορού κάποια είδη τυριών τυρογάλακτος παρουσίασαν προκλήσεις. Ο κατσικίσιος ανθότυρος ο οποίος είχε αποθηκευτεί κάποιους μήνες στην κατάψυξη του εργαστηρίου έδωσε έναν ορό σχετικά «φτωχό» σε θρεπτικά συστατικά όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9.1: Σύσταση ορού (αποτελέσματα από αναλυτή)

	ορός από αιγοπρόβειο ανθότυρο	ορός από κατσικίσιο ανθότυρο
Λίπος (%)	0,60	0,22
Πρωτεΐνες (%)	0,48	0,37
Λακτόζη (%)	0,48	0,04
ολικά στερεά (%)	1,62	1,24

Γενικά, το πρόβειο γάλα είναι διατροφικά πλουσιότερο σε σύγκριση με το κατσικίσιο όπως φαίνεται και στον πίνακα 9.1. Επομένως, είναι λογικό και το τυρόγαλα που προκύπτει από το κατσικίσιο γάλα να είναι φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά.

Πίνακας 9.2: Μέση σύσταση πρόβειου και κατσικίσιου γάλατος (Park et al., 2007)

	πρόβειο γάλα	κατσικίσιο γάλα
Λίπος (%)	7,9	3,8
Πρωτεΐνες (%)	6,2	3,4
Λακτόζη (%)	4,9	4,1

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν τη λακτόζη προς παρασκευή οξέων επομένως αυτό είναι το συστατικό που ενδιαφέρει περισσότερο στο συγκεκριμένο πείραμα. Είναι εμφανές ότι εδώ ο ορός από κατσικίσιο ανθότυρο υστερεί σημαντικά σε λακτόζη οπότε μετά την παρασκευή και την ανάλυση της σύστασής του απορρίφθηκε από τα υποστρώματα που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Παρασκευάστηκε ορός από τα άλλα 3 τυριά τυρογάλακτος και στο τέλος της διαδικασίας έγινε μέτρηση και καταγραφή του pH. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9.3: Τιμές pH από 3 είδη ορού

	pH
ορός από ανθότυρο (αιγοπρόβειο)	5,7
ορός από μυζήθρα	5,4
ορός από ξινή μυζήθρα	4,15

Ο ορός από ξινή μυζήθρα είχε αρκετά αυξημένη οξύτητα σε σχέση με τους άλλους δύο το οποίο προφανώς οφείλεται στη φύση του προϊόντος («ξινή»). Γενικά τα τυριά τυρογάλακτος παρουσιάζουν υψηλότερο pH (αιγοπρόβειος ανθότυρος: pH=5,6), συνεπώς για να είναι το υπόστρωμά μας αντιπροσωπευτικό ως προς την οξύτητα ο ορός από ξινή μυζήθρα δεν χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα στάδια του πειράματος.

9.2 Έλεγχος ανάπτυξης μικροοργανισμών στο παρασκευασθέν υπόστρωμα

Μετά τον εμβολιασμό του ορού με *Listeria monocytogenes* και 2 τυχαία οξυγαλακτικά βακτήρια έγινε καλλιέργεια σε τρυβλία η οποία έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 9.4: Καταμέτρηση αποικιών μετά από δοκιμαστική ανάπτυξη σε ορό και καλλιέργεια σε τρυβλία

είδος μ.ο.	αραίωση	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Lactobacillus 306		6 αποικίες
Lactobacillus 410	35 αποικίες	2 αποικίες
<i>Listeria monocytogenes</i>	TNTC	

Επομένως, το υπόστρωμα που παρασκευάστηκε είναι ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη τόσο των γαλακτοβάκιλλων όσο και της *L.monocytogenes*.

9.3 Ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων

9.3.1 Μεταβολή pH

Η αρχική τιμή pH του ορού ήταν 5,7 ενώ οι τελικές κυμαίνονται από 3,21 έως 3,94 όπως φαίνεται στον πίνακα 9.5. Η μεγαλύτερη πτώση του pH που παρατηρείται είναι κατά 2,49 μονάδες, η μικρότερη κατά 1,76 ενώ ο μέσος όρος πτώσης pH είναι 2,18 μονάδες.

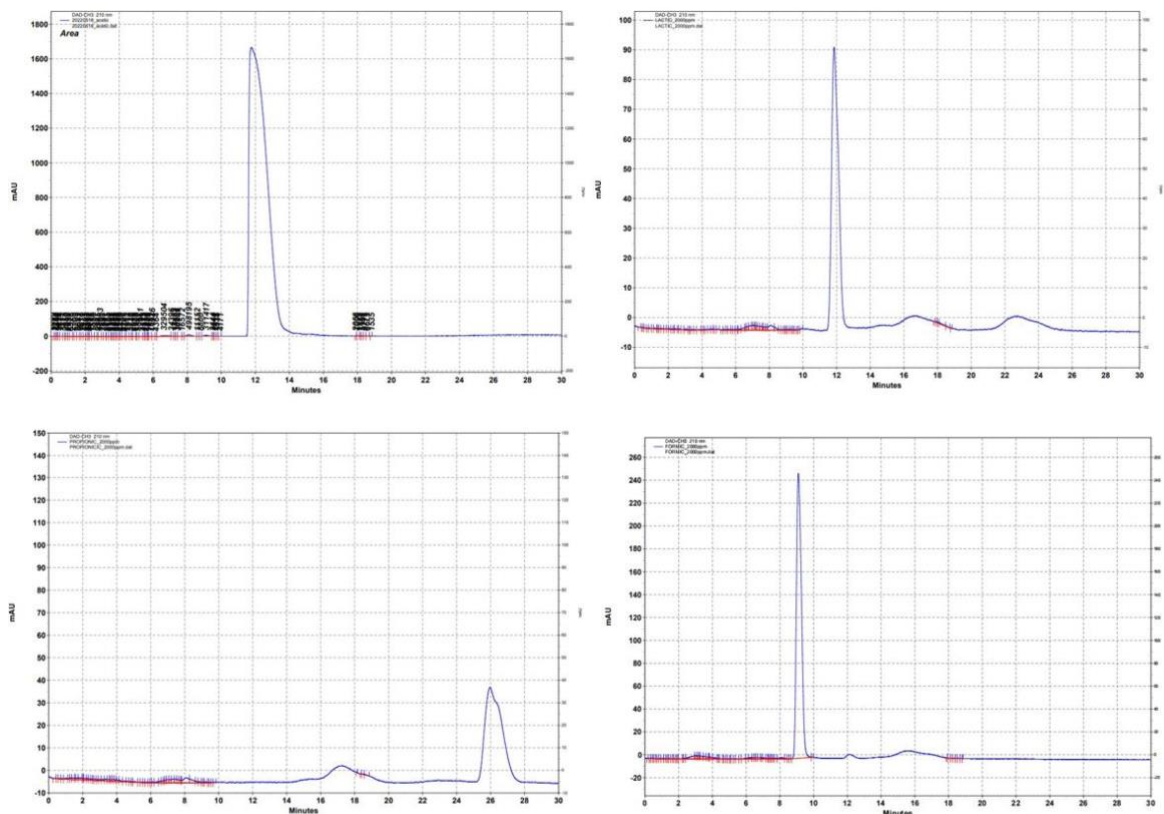
Πίνακας 9.5: Τιμές pH ορού μετά τον εμβολιασμό με γαλακτοβάκιλλους και επακόλουθη επώαση

NaCl 1,0%		NaCl 1,4%	
κωδικός γαλακτοβάκιλλου	pH	κωδικός γαλακτοβάκιλλου	pH
C105	3,28	C109	3,55
C108	3,35	C110	3,46
C304	3,51	C205	3,41
C308	3,47	C206	3,48
C309	3,59	C207+305	3,24
C311	3,42	C307	3,46
C507	3,38	C403	3,93
C606	3,21	C404	3,90
C607	3,38	C405	3,94
C608	3,34	C408	3,90
C609	3,37	C412	3,92
C611	3,43		

Η αύξηση αυτή της οξύτητας οφείλεται στη ζύμωση της λακτόζης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια προς παραγωγή διάφορων οργανικών οξέων. Δεδομένου ότι όλα τα δείγματα «ξεκίνησαν» με τα ίδια θρεπτικά συστατικά (αφού χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ορός ως υπόστρωμα) και την ίδια οξύτητα, το τελικό pH που είναι διαφορετικό για κάθε δείγμα οφείλεται στο διαφορετικό είδος γαλακτοβάκιλλου που χρησιμοποιήθηκε κατά τον εμβολιασμό. Κάθε μικροοργανισμός μεταβολίζει την λακτόζη προς οργανικά οξέα και άλλα προϊόντα που επιδρούν (καταλυτικά ή ανασταλτικά) στην εξέλιξη της αντίδρασης. Τα οργανικά οξέα που ενδιαφέρουν σε αυτή την περίπτωση επηρεάζουν την τελική τιμή του pH ανάλογα το είδος και τη συγκέντρωσή τους.

9.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων

9.4.1 Χρωματογραφήματα HPLC



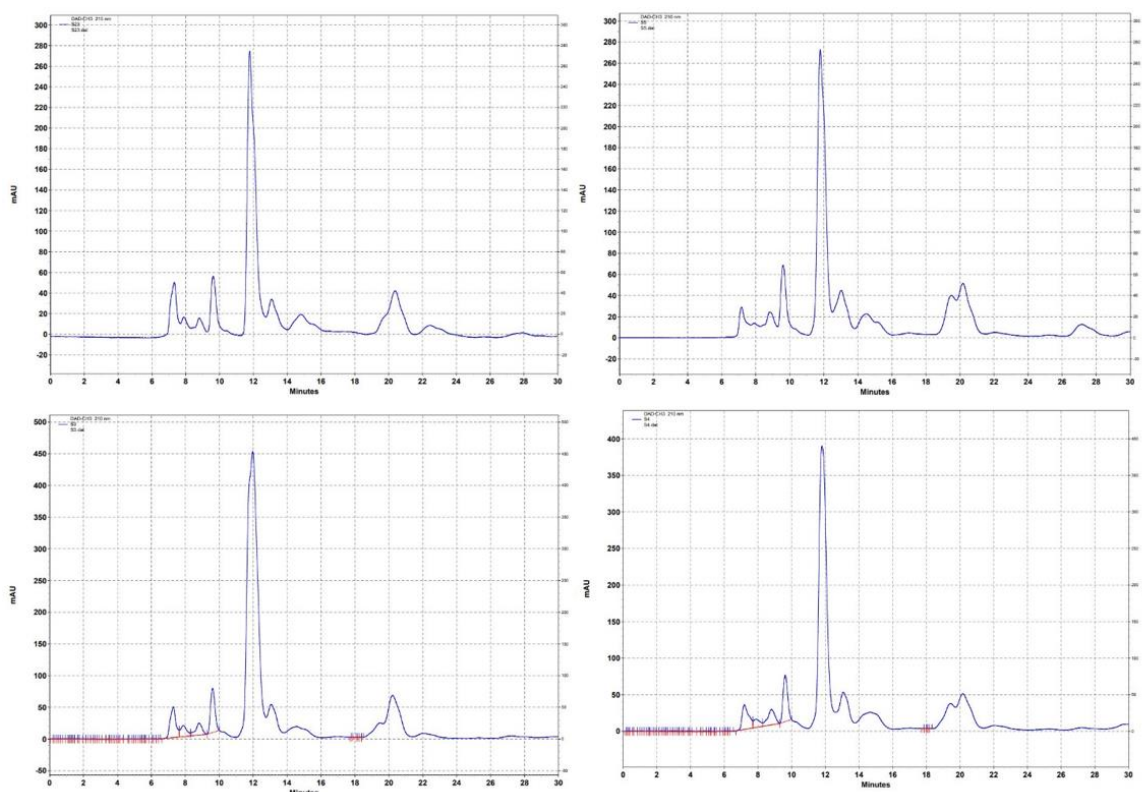
Εικόνα 9.1: Χρωματογραφήματα πρότυπων οξέων οξικό (πάνω αριστερά), γαλακτικό (πάνω δεξιά), προπιονικό (κάτω αριστερά), μυρμηκικό (κάτω δεξιά)

Στα χρωματογραφήματα, οι κορυφές δηλαδή οι χρόνοι κατακράτησης χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση κάθε ουσίας, ενώ το εμβαδό κάτω από κάθε κορυφή χρησιμεύει στον υπολογισμό της ποσότητας της ουσίας αυτής.

Από τα παραπάνω χρωματογραφήματα (εικόνα 9.1) φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε πρότυπο οργανικό οξύ ξεχωριστά. Το οξικό και το γαλακτικό οξύ φαίνεται να έχουν πολύ κοντινούς χρόνους κατακράτησης (11-12') όμως το γαλακτικό παρουσιάζει και δύο άλλες κορυφές (περίπου στα 16' και 22').

Στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων (εικόνα 9.2) υπάρχουν μικρές αποκλίσεις στους χρόνους κατακράτησης σε σχέση με τις πρότυπες καμπύλες που οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει μίγμα και όχι μία μοναδική ουσία. Κάθε δείγμα φαίνεται ότι περιέχει ένα μίγμα ουσιών αφού κάθε χρωματογράφημα έχει πολλές κορυφές. Οι περισσότερες κορυφές φαίνονται να εμφανίζονται στον ίδιο χρόνο άρα όλα τα δείγματα περιέχουν περίπου τις ίδιες ουσίες. Αυτό που διαφέρει είναι τα εμβαδά τους και άρα οι ποσότητές

τους. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τέσσερα πρότυπα οπότε δεν ταυτοποιήθηκαν όλες οι ουσίες παρά μόνο το γαλακτικό, το οξικό, το προπιονικό και το μυρμηκικό οξύ.



Εικόνα 9.2: Χρωματογραφήματα δειγμάτων C206 (πάνω αριστερά), C309 (πάνω δεξιά), C609 (κάτω αριστερά), C611 (κάτω δεξιά)

9.4.2 Παραγωγή οξέων

Όλοι οι γαλακτοβάκιλλοι παρήγαγαν γαλακτικό και οξικό οξύ, μόνο ορισμένοι παρήγαγαν προπιονικό ενώ κανένας μικροοργανισμός δεν έδωσε μυρμηκικό. Η ποσότητα του γαλακτικού για όλους τους γαλακτοβάκιλλους είναι από 4 έως και 13 φορές περισσότερη σε σχέση με το οξικό αφού αποτελεί το κυριότερο προϊόν της γαλακτικής ζύμωσης. Από τους 23 μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι 11 παρήγαγαν προπιονικό, όμως και αυτό υπήρχε σε πολύ μικρή ποσότητα σε σχέση με τα άλλα δύο οξέα. Όσο αφορά το μυρμηκικό, αυτό συνήθως παράγεται σε συνθήκες στρες δηλαδή όταν η οξύτητα ή η θερμοκρασία είναι χαμηλές ή όταν υπάρχει έλλειψη πηγής άνθρακα. Βέβαια, μπορεί να παράχθηκε σε κάποια φάση της επώασης αλλά στη συνέχεια να καταναλώθηκε σε κάποια αντίδραση.

Πίνακας 9.6: Ποσότητες οργανικών οξέων που παράχθηκαν από κάθε γαλακτοβάκιλλο

	Κωδικός γαλακτοβάκιλλου	% περιεκτικότητα σε NaCl	Συγκέντρωση οξέων σε mg/L			
			Οξικό	Γαλακτικό	Προπιονικό	Μυρμηκικό
1	C105	1%	1212,1	10582,6	-	-
2	C108	1%	1108,4	7180,1	-	-
3	C304	1%	911,1	6385,6	-	-
4	C308	1%	1619,9	8431,6	467,2	-
5	C309	1%	1213,5	6742,0	419,7	-
6	C311	1%	852,3	6953,4	-	-
7	C507	1%	1114,7	7990,3	-	-
8	C606	1%	866,2	11224,9	96,4	-
9	C607	1%	2478,8	12281,5	185,3	-
10	C608	1%	1065,7	9870,5	95,5	-
11	C609	1%	1049,6	14017,4	-	-
12	C611	1%	1209,3	9581,1	-	-
13	C109	1,4%	864,5	7021,2	-	-
14	C110	1,4%	513,7	3476,2	-	-
15	C205	1,4%	801,2	8192,9	-	-
16	C206	1,4%	836,2	7040,8	144,3	-
17	C207+C305	1,4%	1070,0	12640,2	-	-
18	C307	1,4%	923,3	5720,9	-	-
19	C403	1,4%	807,3	5433,4	508,6	-
20	C404	1,4%	857,0	5947,5	682,0	-
21	C405	1,4%	874,9	4948,7	1129,7	-
22	C408	1,4%	1008,6	5513,1	766,4	-
23	C412	1,4%	767,0	4052,3	578,7	-

Οι γαλακτοβάκιλλοι C205 και C207+305 που παρουσίασαν την μεγαλύτερη παραγωγή οξέων σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4% σημείωσαν και τη μεγαλύτερη πτώση pH στην αλατοπεριεκτικότητα αυτή (κατά 2,29 και 2,46 μονάδες αντίστοιχα). Όμως αξίζει να αναφερθεί ότι κανένας τους δεν είχε παραγωγή προπιονικού οξέος που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού pH όπως φαίνεται στη συνέχεια.



Εικόνα 9.3: Διάγραμμα παραγωγής οξέων από κάθε γαλακτοβάκιλλο

9.4.3 Επίδραση NaCl

Οι βάκιλλοι που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με την χαμηλότερη αλατοπεριεκτικότητα (1%) παρήγαγαν μεγαλύτερη ποσότητα οξέων συνολικά σε σύγκριση με τους γαλακτοβάκιλλους που αναπτύχθηκαν σε υψηλότερη αλατοπεριεκτικότητα (1,4%) όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα. Αυτό δείχνει πως η υψηλότερη συγκέντρωση NaCl αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη μεταβολική δράση των γαλακτοβάκιλλων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ο C207 και C305 που αναπτύχθηκαν μαζί σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4% αλλά παρόλα αυτά είχαν πολύ μεγάλη παραγωγή οξέων (κυρίως γαλακτικού) σε σχέση με τα άλλα στελέχη που αναπτύχθηκαν στην ίδια αλατοπεριεκτικότητα. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στη συμβιωτική σχέση των δύο μικροοργανισμών, δηλαδή τα προϊόντα που παρήγαγε ο ένας αποτέλεσαν «τροφή» για την ανάπτυξη και την δράση του άλλου. Ο μικροοργανισμός με την μικρότερη παραγωγή οξέων ήταν ο C110 που αναπτύχθηκε σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4%. Αυτό

μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση NaCl ή σε κάποιο μεταβολικό προϊόν που αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη δράση του μικροοργανισμού.

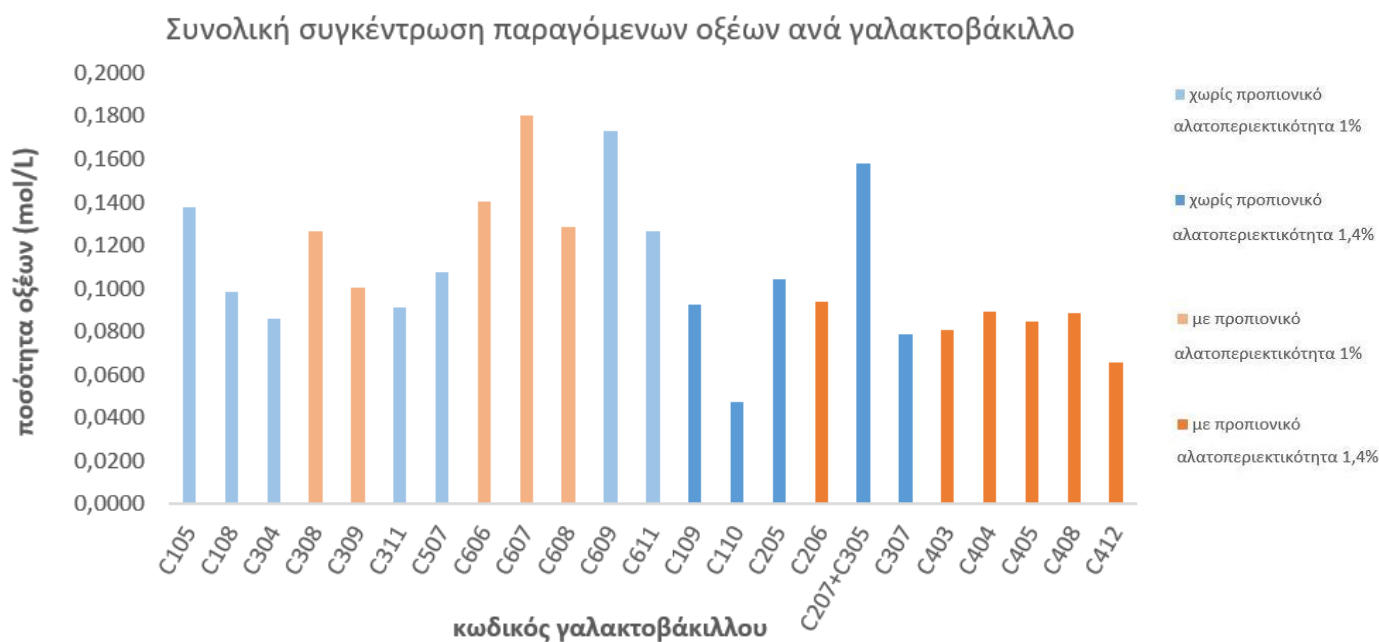
9.4.4 Μεταβολή pH

9.4.4.1 Επίδραση NaCl

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των οξέων που παρήγαγε κάθε γαλακτοβάκιλλος. Οι γαλακτοβάκιλλοι που αναπτύχθηκαν σε μικρότερη αλατοπεριεκτικότητα (1%) είχαν χαμηλότερο τελικό pH σε σχέση με τους γαλακτοβάκιλλους σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4%. Αυτό είναι λογικό γιατί όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω οι γαλακτοβάκιλλοι σε χαμηλότερη αλατοπεριεκτικότητα παρήγαγαν μεγαλύτερη ποσότητα οξέων που αύξησαν περισσότερο την οξύτητα.

Πίνακας 9.7: Συγκεντρώσεις οργανικών οξέων που παράχθηκαν από κάθε γαλακτοβάκιλλο

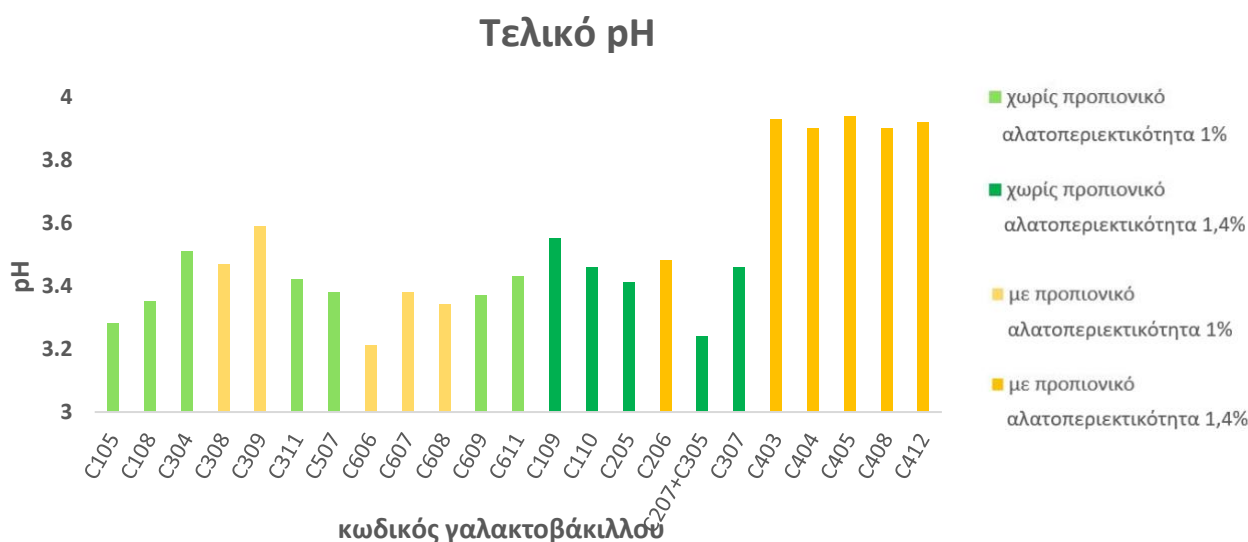
NaCl 1%		NaCl 1,4%	
Κωδικός γαλακτοβάκιλλου	Συγκέντρωση οξέων (mol/L)	Κωδικός γαλακτοβάκιλλου	Συγκέντρωση οξέων (mol/L)
C105	0,13766	C109	0,09234
C108	0,09817	C110	0,04714
C304	0,08606	C205	0,10429
C308	0,12688	C206	0,09403
C309	0,10072	C207+C305	0,15814
C311	0,09138	C307	0,07888
C507	0,10727	C403	0,08063
C606	0,14034	C404	0,08950
C607	0,18012	C405	0,08476
C608	0,12861	C408	0,08834
C609	0,17309	C412	0,06557
C611	0,12650		



Εικόνα 9.4: Διάγραμμα με τη συνολική συγκέντρωση οξέων που παράχθηκε από κάθε γαλακτοβάκιλλο

9.4.4.2 Επίδραση προπιονικού οξέος

Οι μικροοργανισμοί που παρήγαγαν προπιονικό οξύ είχαν μεγαλύτερο τελικό pH σε σχέση με αυτούς που παρήγαγαν μόνο γαλακτικό και οξικό. Με βάση την σταθερά διάστασης τα τρία οξέα κατατάσσονται με σειρά μειούμενης ισχυρότητας ως εξής: γαλακτικό > οξικό > προπιονικό. Το προπιονικό είναι το ασθενέστερο από τα τρία οξέα επομένως δεν μειώνει το pH τόσο όσο το γαλακτικό ή το οξικό. Για παράδειγμα, ο C108 και ο C309 αναπτύχθηκαν στην ίδια αλατοπεριεκτικότητα (1%), παρήγαγαν περίπου την ίδια ποσότητα οξέων (0,09817 mol/L και 0,10072 mol/L αντίστοιχα) όμως ο δεύτερος παρήγαγε προπιονικό με αποτέλεσμα το pH του να είναι υψηλότερο ($pH_{108}=3,35$ και $pH_{309}=3,59$). Το ίδιο παρατηρείται και με τους μικροοργανισμούς C307 και C403. Αναπτύχθηκαν και οι δύο σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4%, παρήγαγαν παραπλήσια ποσότητα οξέων (0,07888 mol/L και 0,08063 mol/L) όμως ο δεύτερος είχε και προπιονικό με αποτέλεσμα το pH του να είναι πιο υψηλό ($pH_{307}=3,46$ και $pH_{403}=3,93$).



Εικόνα 9.5: Διάγραμμα με τα τελικά pH

Πέρα από την ποσότητα των οξέων σημαντικό ρόλο παίζει και το είδος τους και πιο συγκεκριμένα ο βαθμός διάστασης του (ισχυρότητα). Ένα ασθενές οξύ σε μεγάλη ποσότητα μπορεί να έχει την ίδια επίδραση στο pH όσο μικρότερη ποσότητα από ένα πιο ισχυρό οξύ. Για παράδειγμα, οι γαλακτοβάκιλλοι C507 και C607 αναπτύχθηκαν στην ίδια αλατοπεριεκτικότητα (1%), μόνο ο δεύτερος παρήγαγε προπιονικό οξύ αλλά είχαν και οι δύο ίδιο τελικό pH (3,38). Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι ο C607 είχε 40% περισσότερη παραγωγή οξέος από τον C507 (0,18012 mol/L και 0,10727 mol/L αντίστοιχα). Επειδή όμως ο πρώτος είχε και προπιονικό το pH του δεν μειώθηκε πολύ. Το ίδιο συνέβη και με τους γαλακτοβάκιλλους C206 και C110 που αναπτύχθηκαν στην ίδια αλατοπεριεκτικότητα (1,4%) όμως μόνο ο C206 παρήγαγε προπιονικό οξύ. Ενώ έχουν παραπλήσια τελικά pH ($pH_{206}=3,48$ και $pH_{110}=3,46$) ο C206 είχε διπλάσια παραγωγή οξέων από τον C110 (0,09403 mol/L και 0,04714 mol/L αντίστοιχα).

Κεφάλαιο 10 Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Συμπερασματικά, το NaCl αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την δράση των γαλακτοβακίλλων και την παραγωγή οξέων. Επίσης, όσα περισσότερα οξέα παράγονται τόσο περισσότερο μειώνεται το pH. Πέρα όμως από την ποσότητα σημαντικό ρόλο παίζει και το είδος των οξέων αυτών και πιο συγκεκριμένα ο βαθμός διάστασής τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα ταυτοποιήθηκαν τρία οξέα τα οποία κατατάσσονται με σειρά μειούμενης ισχυρότητας ως εξής: γαλακτικό > οξικό > προπιονικό. Με παρουσία προπιονικού οξέος δεν παρατηρήθηκε τόσο μεγάλη πτώση pH όσο με παρουσία μόνο γαλακτικού και οξικού. Επομένως, συμπεραίνεται ότι σε ένα μίγμα οξέων το λιγότερο ισχυρό δεν συμβάλλει τόσο στην μείωση του pH όσο τα ισχυρότερα.

Τα συμπεράσματα του πειράματος αυτού θέτουν ερωτήματα τα οποία θα μπορούσαν να εξεταστούν σε μελλοντικές εργασίες. Για παράδειγμα, θα ήταν ενδιαφέρον οι γαλακτοβάκιλλοι που αναπτύχθηκαν σε αλατοπεριεκτικότητα 1% να αναπτυχθούν σε αλατοπεριεκτικότητα 1,4% και να εξεταστεί αν όντως παράγονται λιγότερα οξέα και το pH μειώνεται λογότερο.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη θα μπορούσε να αφορά την εξέταση της *Listeria monocytogenes* σε σχέση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι από τους βασικούς «εχθρούς» των τυριών τυρογάλακτος οπότε θα ήταν σκόπιμο να μελετηθεί η μεταβολική συμπεριφορά τόσο της *L. monocytogenes* όσο και των οξυγαλακτικών βακτηρίων όταν αυτά συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον. Άλλωστε, το υπόστρωμα που παρασκευάστηκε εξετάστηκε και για την ικανότητά του να υποστηρίξει την ανάπτυξη του παθογόνου αυτού οπότε η βάση έχει ήδη τεθεί.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Ανυφαντάκης, Ε. (2004). Τυροκομία. Εκδόσεις Σταμούλη. (ISBN: 9603515159)
2. Αραμπατζής, Δ. (2018). Παραγωγή, επεξεργασία και αξιοποίηση αποβλήτων τυροκομείου. (Μελέτη περίπτωσης τυροκομείου στο νομό Λαρίσης.)
3. Βαρθαλάμης, Γ. (2019). Αξιοποίηση τυρογάλακτος απόβλητο τυροκομίας.
4. Δημόπουλος, Ε. Η. (2015). Παρασκευή και μελέτη τυριών τυρογάλακτος μειωμένης λιποπεριεκτικότητας.
5. ΕΦΕΤ. (2012). Γενικός Οδηγός για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις.
6. Ζερφυρίδης, Γ. (2001). Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος. Εκδόσεις Γιαχούδη. (ISBN:9780007425327)
7. Καλομοίρη, Ε. (2019). Μελέτη της διεργασίας της ξήρανσης τυριών τυρογάλακτος.
8. Καλοσπύρου, Κ. (2017). Τεχνολογία παραγωγής φέτας και ανθότυρο.
9. Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1129/2011 της Επιτροπής της 11ης Νοεμβρίου 2011
10. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 Της Επιτροπής της 5ης Δεκεμβρίου 2007
11. Καραδήμα, Κ. (2009). *Εκτίμηση της τοξικότητας διαφόρων σταδίων επεξεργασίας αποβλήτων τυροκομικών μονάδων με χρήση βιοδεικτών* (Doctoral dissertation).
12. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Μέρος Α΄, Τρόφιμα και Ποτά, Κεφάλαιο ΙΧ, Προϊόντα Ζωϊκής Προέλευσης, Άρθρο 83
13. Λαγός, Δ. (2021). Διαχείριση υποπροϊόντων τυροκομείου για παραγωγή πρωτεΐνης και λακτόζης.
14. Μαργαρίτη Βασιλική. (2014). *Παραγωγή Ενέργειας από Υγρά Απόβλητα Τυροκομείων*. [Διπλωματική εργασία].
15. Μασούρας Θ. (2017). «Καινοτομία στον γαλακτοκομικό τομέα». Εργαστήριο γαλακτοκομίας. ΓΠΑ.
16. Μπίντσης, Θ., Παπαδήμας, Φ. (2009). Τυρί. Τεχνολογία γάλακτος, τυροκομία, παρουσίαση τυριών. Εκδόσεις Ψύχαλος. (ISBN: 9789608455634)
17. Παπαβασιλείου, Γ., Γουγουλή, Μ., Μαλούδη, Μ., Κρυσταλλίδου, Ε., & Κώτσιος, Π. (2019). Τυροκομία. (ISBN: 9786188420533)

18. Παπαδοπούλου, Ε. (2022). Ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά και ανταγωνιστικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων με την *Listeria monocytogenes*.
19. Πυροβόλου, Α. (2021). Η ανταγωνιστική σχέση της *Listeria monocytogenes* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε υπόστρωμα τυριών τυρογάλακτος με χρήση μοντέλων προορατικής μικροβιολογίας διαθέσιμων στο διαδίκτυο.
20. Σβάρνας, Χ. (2012). Παραγωγή και αξιοποίηση υποπροϊόντων αιγοπρόβειου γάλακτος στο νομό Ιωαννίνων.
21. Σπυρούδη, Α. (2013). Παραγωγή βιοαερίου από εκχύλισμα ημικομποστοποιημένων στερεών πτηνοτροφικών αποβλήτων με τυρόγαλα στη μεσόφιλη περιοχή. Τεχνικοοικονομική διερεύνηση εφαρμογής των αποτελεσμάτων σε τυροκομείο στην Αργολίδα.
22. Υπουργείο ΠΕ.ΧΩ.ΔΕ. Γενική Δ/νση Περιβάλλοντος. (2005). Εγκύκλιος Διαχείρισης τυρογάλακτος από τυροκομικές μονάδες της χώρας.
23. Χαρίτου, Γ. (2019). Ορρός γάλακτος και οι χρήσεις του στη βιομηχανία τροφίμων.
24. Χατζηαντωνίου, Σ. (2020). Ανάπτυξη και μελέτη ανακατεργασμένων τυριών τυρογάλακτος (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας. Τομέας Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων).

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

25. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.
26. Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Ghaedian, R., & Shetty, K. (2007). Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food biotechnology*, 21(3), 217-236.
27. Barba, F. J. (2021). An integrated approach for the valorization of cheese whey. *Foods*, 10(3), 564.
28. Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, 4(4), 665.
29. Blount, Z. D. (2015). The natural history of model organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4, e05826.
30. Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R., & Wankat, P. C. (2000). Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology progress*, 16(3), 305-314.
31. Carvalho, L. G., Alvim, M. M. A., Fabri, R. L., & Apolônio, A. C. M. (2021). *Staphylococcus aureus* biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging. *International Journal of Dairy Technology*, 74(3), 575-580.
32. Casey, M. G., Häni, J. P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W., & Wechsler, D. (2006). Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Le Lait*, 86(6), 407-414.
33. de Souza, J. V., & Dias, F. S. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 13, 1-9.
34. Dimitrellou, D., Kandyli, P., Sidira, M., Koutinas, A. A., & Kourkoutas, Y. (2014). Free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393 on whey protein as starter cultures for probiotic Feta-type cheese production. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4675-4685.
35. Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2017). Microbial propionic acid production. *Fermentation*, 3(2), 21.

36. Govaris, A., Koidis, P., & Papatheodorou, K. (2001). The fate of *Escherichia coli* O157: H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12 C. *Food Microbiology*, 18(5), 565-570.
37. Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. A., & Higgins, D. E. (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12318-12323.
38. Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., ... & Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 136.
39. Hamon, M., Bierne, H., & Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 423-434.
40. Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 2107.
41. Huang, C. H., Li, S. W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1974.
42. Jelen, P. (2002). WHEY PROCESSING. Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2739–2745.
43. Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., ... & Ehling-Schulz, M. (2016). *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1603.
44. Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Robinson, R. K. (2001). Changes in the microflora of Manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 54(3), 100-106.
45. Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of medical microbiology*, 55(6), 645-659.
46. Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., & Aparnathi, K. D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(8), 134-155.
47. Madureira, A. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2011). Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. *Journal of Food Protection*, 74(7), 1194-1199.

48. Marek, P., Nair, M. K. M., Hoagland, T., & Venkitanarayanan, K. (2004). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157: H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 1-7.
49. Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.
50. Aghababaie, M., Beheshti, M., & Khanahmadi, M. (2014). Effect of Temperature and pH on Formulating the Kinetic Growth Parameters and Lactic Acid Production of *Lactobacillus bulgaricus*. *Nutrition and Food Sciences Research*, 1(1), 49-56.
51. Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., ... & Vallejo-Córdoba, B. (2020). Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ACE-inhibitory activity. *Fermentation*, 6(1), 19.
52. Mehli, L., Hoel, S., Thomassen, G. M. B., Jakobsen, A. N., & Karlsen, H. (2017). The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. *International Dairy Journal*, 65, 20-27.
53. Nayak, D. N., Savalia, C. V., Kalyani, I. H., Kumar, R., & Kshirsagar, D. P. (2015). Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. *Veterinary world*, 8(6), 695.
54. Nwaiwu, O. (2020). What are the recognized species of the genus *Listeria*?. *Access Microbiology*, 2(9).
55. Ondusko, D. S., & Nolt, D. (2018). *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in review*, 39(6), 287-298.
56. Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.
57. Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT*, 73, 536-542.
58. Pais-Chanfrau, J. M., Núñez-Pérez, J., Espin-Valladares, R. D. C., Lara-Fiallos, M. V., & Trujillo-Toledo, L. E. (2020). Bioconversion of Lactose from Cheese Whey to Organic Acids. *Lactose and Lactose Derivatives*, 1st ed.; Gutiérrez-Méndez, N., Ed, 53-74.

59. Panagou, E. Z., Nychas, G. J. E., & Sofos, J. N. (2013). Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control*, 29(1), 32-41.
60. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1), 1-14.
61. Pintado, M. E., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2001). Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7(2), 105-116.
62. Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 110, 48-68.
63. Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32-46.
64. Rama, G. R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M. J., & de Souza, C. F. V. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25-37.
65. Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(4), 835-850.
66. Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(3), 479-498.
67. Saha, M., Debnath, C., & Pramanik, A. K. (2015). *Listeria monocytogenes*: An emerging foodborne pathogen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(11), 52-72.
68. Song, A. A. L., In, L. L., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-15.
69. Taleghani, H. G., Najafpour, G. D., & Ghoreyshi, A. A. (2016). A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(1), 58-63
70. Teuber, M. (2015). The Genus *Lactococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Vol. 3, 2nd Edition, 711-722
71. Thakur, A., Panesar, P. S., & Saini, M. S. (2018). Parametric optimization of lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using Box-Behnken Design. *Periodica polytechnica chemical engineering*, 62(3), 274-285.

72. Thakur, A., Panesar, P. S., & Saini, M. S. (2019). Optimization of process parameters and estimation of kinetic parameters for lactic acid production by *Lactobacillus casei* MTCC 1423. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9(2), 253-266.
73. Tsakali, E., Petrotos, K., D'Allessandro, A., & Goulas, P. (2010, June). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In *Proc. 6th International. Conference on Simulation Modelling in Food and Bioindustry, FOOSIM'2010 Braganca, Portugal* (pp. 195-201).
74. Van De Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., ... & Maguin, E. (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9274-9279.
75. Wagner, F. S., & Staff, U. B. (2000). Acetic acid. Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-21.
76. Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of dairy science*, 92(6), 2468-2476.

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

77. <https://new-economy.gr/2019/02/06/icap-kladiki-meleti-tirokomikon-proionton/>
78. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073>
79. <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
80. <https://eody.gov.gr/disease/listeriosi/>
81. https://ec.europa.eu/food/safety/biological-safety/food-hygiene/microbiological-criteria_el#listeria-monocytogenes
82. <https://www.ecdc.europa.eu/en/listeriosis>

Πηγές εικόνων

Εικόνα 1.1: <http://tirokomeio.gr/%ce%b9%cf%83%cf%84%ce%bf%cf%81%ce%af%ce%b1/>

Εικόνα 2.1: <https://www.dairy-services.com/%CF%84%CE%B9>

%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%AF%CE%B6%CE%B5%CF%84%CE%B5%CF%8C%CF%84%CE%B9-%CF%80%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%AD%CF%87%CE%B5%CE%B9

%CF%84%CE%BF-%CF%84%CF%85%CF%81%CF%8C%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1/

%CF%84%CE%BF-%CF%84%CF%85%CF%81%CF%8C%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1/

Εικόνα 2.2: <https://www.kaplanidis.gr/feedback/>

Εικόνα 3.1: <https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/216-myzithra.html>

<https://cibum.gr/oikiaka/anthotyro-i-diatrofiki-aksia-posa-lipara-exei-kai-poses-thermides/>

Εικόνα 3.3: <https://www.dairy->

[services.com/%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%8D%CF%81%CE%B9/](https://www.dairy-services.com/%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%8D%CF%81%CE%B9/)

<https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/237-ksinomyzithra-ksinotyro.html>

Εικόνα 4.1: https://textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html

Εικόνα 8.1-8.7: προσωπικό αρχείο