



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΜΗΜΑ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη της μικροβιοχλωρίδας ελληνικών μαλακών τυριών  
Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.)**

**Αναστασίου Ηρώ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018**

**Μελέτη της μικροβιοχλωρίδας ελληνικών μαλακών τυριών  
Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.)**

Αναστασίου Ηρώ

**Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (Α.Τ.Ε.Ι.),  
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141**

Υποβολή Διπλωματικής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Εισηγητής: Λυκοτραφίτη Ελένη

Εξεταστική επιτροπή: Δημητρέλη Γεωργία, Ραφαηλίδης Στυλιανός

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με το πέρας της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Dr. Λυκοτραφίτη Ελένη για την επιστημονική καθοδήγησή της καθόλη την διάρκεια της έρευνας και συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr. Jonathan Rhodes για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Ραφαηλίδη Στυλιανό γιατί χωρίς αυτόν δεν θα ξεκινούσε αυτό το ‘ταξίδι’.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν για να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας στην ξαδέρφη μου Μυρτώ, η οποία έφυγε νωρίς και δεν κατάφερε να ολοκληρώσει τα όνειρά της.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΥΡΕΤΗΡΙΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	10
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	11
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>13</b>
1.1 Ελληνικά Τυριά.....	13
1.1.1 Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης.....	14
1.1.2 Υποχρεωτικές αναγραφόμενες ενδείξεις.....	15
1.2 Κατηγορίες Π.Ο.Π. Τυριών και Βακτήρια.....	15
1.2.1 Τυριά σε άλμη.....	15
1.2.1.1 Φέτα.....	15
1.2.1.2 Μπάτζος.....	17
1.2.1.3 Καλαθάκι Λήμνου.....	17
1.2.2 Μαλακά τυριά.....	18
1.2.2.1 Ανεβατό.....	18
1.2.2.2 Γαλοτύρι.....	19
1.2.2.3 Κοπανιστή.....	19
1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΥΡΙΩΝ.....	20
1.3.1 Κύρια καλλιέργεια (εκκινητές).....	20
1.3.2 Δευτερεύουσα καλλιέργεια.....	21
1.3.3 Μη εναρκτήριες καλλιέργειες (Non starter lactic acid bacteria-NSLAB) - ‘Άγρια’ μικροβιοχλωρίδα.....	21
1.3.4 Γαλακτικά Βακτήρια (lactic acid bacteria).....	22
1.3.4.1 Γένος <i>Lactobacillus</i> .....	23
1.3.4.2 Γένος <i>Lactococcus</i> .....	24
1.3.4.3 Γένος <i>Enterococcus</i> .....	26
1.3.4.4 Γένος <i>Leuconostoc</i> .....	27
1.3.4.5 Γένος <i>Pediococcus</i> .....	27
1.3.4.6 Μύκητες.....	28
1.3.4.7 Ζύμες.....	29
1.3.4.8 Κολοβακτηρίδια (Coliforms).....	29
1.3.4.9 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30

1.3.4.10 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
1.4 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ.....	31
1.4.1 Ορισμός.....	31
1.4.2 Κριτήρια.....	31
1.4.3 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS).....	32
1.4.4 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) .....	32
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>34</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>35</b>
3.1 Υλικά.....	35
3.2 Μέθοδοι .....	36
3.2.1 Δειγματοληψία .....	36
3.2.2 Απομόνωση και χαρακτηρισμός αναπτυγμένων αποικιών .....	37
3.2.3 Μελέτη της μορφολογίας σε νωπή κατάσταση .....	37
3.2.3 Η δοκιμή της καταλάσης.....	38
3.2.4 Ανάπτυξη των στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης .....	38
3.2.5 Ανάπτυξη των στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος .....	38
3.2.5.1 Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης με διαφορετικούς υδατάνθρακες .....	39
3.3 Στατιστική Ανάλυση.....	39
<b>4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>40</b>
4.1 Καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού των τυριών.....	40
4.2 Απομόνωση στελεχών σε εκλεκτικά υποστρώματα .....	43
4.3 Επιλογή βέλτιστου υδατάνθρακα με βάση το συνδυασμό μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης.....	49
<b>5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>55</b>
<b>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>59</b>
<b>5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>66</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των εγχώριων ελληνικών τυριών προσδιορίστηκαν με καταμέτρηση σε εκλεκτικά και μη εκλεκτικά υποστρώματα. Εξετάστηκαν τρία διαφορετικά είδη από έξι κατηγορίες τυριών: Ανεβατό, Μπάτζος, Φέτα, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου και Κοπανιστή. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: γενική μικροβιακή χλωρίδα, δείκτης εντερικών βακτηρίων και δυνητικά παθογόνα. Η γενική μικροβιακή χλωρίδα εκτιμήθηκε με την μέτρηση του αερόφιλου μεσόφιλου πληθυσμού (Aerobic Plate Count - APC), των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic acid bacteria- LAB), των γαλακτικών στρεπτόκοκκων (Lactic acid Streptococci-LS) και του αριθμού των ζυμών και μυκήτων (Yeasts and Moulds-YM). Ο δείκτης εντερικών βακτηρίων που καταμετρήθηκε ήταν ύποπτα κολοβακτηρίδια και εντερόκοκκοι. Στα ύποπτα παθογόνα, καταμετρήθηκαν ο *Staphylococcus aureus* και τα *Listeria spp.*

Παρόλο που οι σημαντικές διαφορές μεταξύ μεμονωμένων μικροβιακών πληθυσμών ήταν λίγες ( $p < 0.05$ ) για τα διαφορετικά είδη τυριών, παρατηρήθηκαν ορισμένες γενικές τάσεις. Οι μεγαλύτεροι συνολικά μικροβιακοί πληθυσμοί παρατηρήθηκαν στην Φέτα και το Γαλοτύρι και οι χαμηλότεροι στην Κοπανιστή. Το Ανεβατό είχε τους περισσότερους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους ενώ η Φέτα είχε εμφανώς λιγότερους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους από όλα τα υπόλοιπα τυριά. Ο μεγαλύτερος αριθμός γαλακτοβάκιλλων παρατηρήθηκε στην Φέτα, ενώ ο μικρότερος στην Κοπανιστή. Οι υψηλότεροι πληθυσμοί σε κολοβακτηρίδια, εντερόκοκκους, ύποπτο *Staphylococcus aureus* και ύποπτα *Listeria spp* βρέθηκαν στον Μπάτζο. Κανένα τυρί δεν ήταν εντελώς απαλλαγμένο από δείκτες εντερικών βακτηρίων και ύποπτα παθογόνα (αν και κάποια μεμονωμένα δείγματα ήταν), αλλά η Κοπανιστή περιείχε τους χαμηλότερους αριθμούς.

Συνολικά απομονώθηκαν 215 βακτήρια από 18 τυριά. Ορισμένα από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά τυριά, ταυτοποιήθηκαν ως προς το γένος και είδος με τη χρήση ταξινομικής ανάλυσης βασισμένης σε ανάλυση αλληλουχίας 16S rRNA. Από τα 33 οξυγαλακτικά βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν, 25 ήταν *Lactobacillus sp.* (πιο κοινά είδη *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*), έξι ήταν *Enterococcus sp.*, ένα *Pediococcus sp.* και ένα *Leuconostoc sp.* Τα βακτήρια αυτά εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να ζυμώνουν διαφορετικούς υδατάνθρακες.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο πρεβιοτικά, φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) και γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS). Σχεδόν όλες οι απομονώσεις (86,7%) αναπτύχθηκαν καλά σε GOS (όπως και στη γλυκόζη), οι υπόλοιπες απομονώσεις παρουσίασαν ελάχιστη ανάπτυξη. Στο FOS, το 33,3% αναπτύχθηκε καλά, 63,3% έδειξαν ελάχιστη ανάπτυξη. Όλες οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν στους 15°C και στους 45°C και σε συγκέντρωση 10% χλωριούχου νατρίου.

## ABSTRACT

The microbiological characteristics of indigenous Greek cheeses were determined by plate counting on selective and non-selective media. Three different samples of each of six cheese types were examined: Anevato, Batzos, Feta, Galotyri, Kalathaki Limnou and Kopanisti. The microbiological analyses performed were grouped into three categories: general microbial flora, faecal indicator bacteria and potential pathogens. The general microbial flora was assessed using aerobic mesophilic plate count (Aerobic Plate Count- APC), presumptive lactic acid bacteria (Lactic acid bacteria- LAB) count, presumptive lactic streptococci (Lactic acid Streptococci- LS) count and yeast and mould (Yeasts and Moulds- YM) count. The faecal indicator bacteria enumerated were presumptive coliforms and presumptive enterococci. The presumptive pathogens enumerated were *Staphylococcus aureus* and *Listeria spp.*

Although significant ( $P < 0.05$ ) differences between individual microbial counts for different cheeses were few, some general trends were observable. Highest overall microbial populations were recorded in Feta and Galotyri and the lowest in Kopanisti. Anevato cheese had significantly more lactic streptococci and Feta cheese had significantly fewer lactic streptococci than the other cheeses. Feta cheese had the highest number of lactic acid bacteria, whereas Kopanisti cheese had the fewest. The highest levels of coliforms, enterococci, presumptive *Listeria spp.* and presumptive *St. aureus* were all recorded in Batzos cheese. No cheese type was entirely free of faecal indicators and pathogens (although some individual samples were), but Feta and Kopanisti contained the lowest numbers.

In total isolated 215 bacteria from 18 cheeses. Presumptive lactic acid bacteria isolated from the cheeses were identified to the level of genus and most likely species using 16S rRNA sequencing based taxonomic analysis. Of the 33 isolates examined, 25 were *Lactobacillus sp.* (most common species *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*), six were *Enterococcus sp.*, one *Pediococcus sp.* and one *Leuconostoc sp.* These were tested for their ability to grow on the prebiotics fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS) using absorbance as an indicator of growth. Nearly all isolates (86,7%) grew well on GOS (as well as on glucose), the remaining isolates showed limited growth. On FOS, 33,3% grew well, 63,3% showed limited growth. All isolates were capable of growth at 15°C and 45°C, and in broth with 10% sodium chloride.

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1</b> Παραγωγή Μαλακών Τυριών ανά Περιφέρεια το 2015.....	15
<b>Πίνακας 2.</b> Τα κυριότερα γένη γαλακτικών βακτηρίων .....	23
<b>Πίνακας 3.</b> Οι κυριότερες ‘φυσικές’ και εμπορικές εναρκτήριες καλλιέργειες.....	26
<b>Πίνακας 4.</b> Μικροβιακός πληθυσμός τυριών. Μέσος όρος τριών επαναλήψεων (n=3), log cfu/g. APC – aerobic plate count/Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), LAB – presumptive lactic acid bacteria/γαλακτικά βακτήρια, LS – presumptive lactic streptococci/γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι, YM – yeasts and moulds/ζύμες και μύκητες.....	41
<b>Πίνακας 5.</b> Μη επιβεβαιωμένα παθογόνα βακτήρια και μικροοργανισμοί δείκτες που απομονώθηκαν από τα τυριά. Τα αριθμητικά στοιχεία δείχνουν τον αριθμό των δειγμάτων (n=3) στα οποία ανιχνεύθηκαν τα παθογόνα .....	41
<b>Πίνακας 6.</b> Μοριακή ταυτοποίηση 33 στελεχών απομονομένων από τα υπό εξέταση τυριά και αποτελέσματα ανάπτυξης τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις άλατος.....	46
<b>Πίνακας 7.</b> Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $h^{-1}$ ) – Περιγραφική Στατιστική (n=30) των τεσσάρων υδατανθράκων.....	51
<b>Πίνακας 8.</b> Λανθάνουσα φάσης ανάπτυξης (h) – Περιγραφική Στατιστική (n=30) των τεσσάρων υδατανθράκων.....	51
<b>Πίνακας 9.</b> Σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη (n=30) .....	52
<b>Πίνακας 10.</b> Σύγκριση του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (n=3) των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη (*0=καμία σημαντική διαφορά $P>0.05$ ; 1=πρεβιοτικό σημαντικά μικρότερο από την Glu; 2= πρεβιοτικό σημαντικά μεγαλύτερο από την Glu) .....	54
<b>Πίνακας 11.</b> Σύγκριση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης (μέσοι όροι n=3, hours) των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη .....	55



<b>Πίνακας 12.</b> Απομόνωση και χαρακτηρισμός 38 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα M17 Agar από Ανεβατό, Φέτα, Μπάτζο, Γαλοτύρι και Κοπανιστή .....	70
<b>Πίνακας 13.</b> Απομόνωση και χαρακτηρισμός 127 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα MRS Agar από Ανεβατό, Φέτα, Μπάτζο, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου και Κοπανιστή .....	75
<b>Πίνακας 14.</b> Απομόνωση και χαρακτηρισμός 50 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα KF Agar από Ανεβατό, Μπάτζο, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου και Κοπανιστή.....	93

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.</b> Μέσος όρος (n=3) πληθυσμού βακτηρίων log cfu/g ανά είδος τυριού. APC <sub>1</sub> /OMX LAB <sub>2</sub> /γαλακτικά βακτήρια, LS <sub>3</sub> /γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι, YM <sub>4</sub> /ζύμες-μύκητες.....	43
<b>Σχήμα 2.</b> Αριθμός θετικών δειγμάτων (n=3) σε κολοβακτηρίδια, ύποπτη (μη επιβεβαιωμένη) <i>Listeria sp.</i> και ύποπτος (μη επιβεβαιωμένος) <i>St. aureus</i> στα υπό εξέταση τυριά.....	43
<b>Σχήμα 3.</b> Κατανομή των ταυτοποιημένων βακτηριών (%) ανά είδος τυριού .....	49

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

OMX	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα
cfu	Colony forming units
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Ped.</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
LS	Lactic Streptococci
FOS	Fructooligosaccharides
GOS	Galactooligosaccharides
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
NaCl	Χλωριούχο Νάτριο
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Υπεροξείδιο του Υδρογόνου
D.P.	Degree of polymerization
NSLAB	Non Starter Lactic Acid Bacteria
O.D.	Optical Density/Οπτική πυκνότητα
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid

T- MRS	Modified de Man, Rogosa and Sharpe
VRBA	Violet Red Bile Agar
YM	Yeasts and Moulds
Π.Ο.Π.	Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης
GRAS	Generally Regarded As Safe

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ελληνικά Τυριά

Η Ελλάδα είναι μια χώρα με τυροκομική παράδοση και αριθμεί πάνω από 70 είδη τυριών, από τα οποία τα 21 έχουν χαρακτηριστεί ως Τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.), σύμφωνα με τα στοιχεία της Επίσημης Εφημερίδας των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Ε.Ε. L148/1996). Ο κατάλογος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τυριά: Ανεβατό, Γαλοτύρι, Γραβιέρα Αγράφων, Γραβιέρα Κρήτης, Γραβιέρα Νάξου, Καλαθάκι Λήμνου, Κασέρι, Κατίκι Δομοκού, Κεφαλογραβιέρα, Κοπανιστή, Λαδοτύρι Μυτιλήνης, Μανούρι, Μετσοβόνη, Μπάτζος, Ξυνομυζήθρα Κρήτης, Πηχτόγαλο Χανίων, Σαν Μιχάλη, Φέτα, Σφέλα, Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού και Ξινόγαλο Σητείας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν έξι από τα παραπάνω τυριά. Το Ανεβατό, το Γαλοτύρι, το Καλαθάκι Λήμνου, ο Μπάτζος, η Φέτα και η Σφέλα. Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή, το 2015 η παραγωγή μαλακών τυριών (σε τόννους) ανά περιφέρεια φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1** Παραγωγή Μαλακών Τυριών ανά Περιφέρεια το 2015

Περιφέρεια	Παραγωγή Μαλακών Τυριών (τόνους)
Ηπείρου	16.635
Δυτικής Μακεδονίας	2.033
Κεντρικής Μακεδονίας	9.296
Ανατολικής Μακεδονίας & Θράκης	4.463
Πελοποννήσου	8.905
Θεσσαλίας	26.240
Στερεάς Ελλάδας	5.318
Βορείου Αιγαίου	4.621
Νοτίου Αιγαίου	778
Κρήτης	1.434
Αττικής	999
Δυτικής Ελλάδας	9.603
Ιονίων Νήσων	1.398
Σύνολο	91.722

Πηγή: Ελληνική Στατιστική Αρχή

### 1.1.1 Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης

Ως τυρί προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.) νοείται εκείνο το προϊόν, το οποίο παράγεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή, από γάλα προερχόμενο από ζώα που διαβιούν και τρέφονται στην περιοχή αυτή, έτσι ώστε τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά να οφείλονται στο συγκεκριμένο γεωγραφικό περιβάλλον σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20ής Μαρτίου 2006 για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων.

### **1.1.2 Υποχρεωτικές αναγραφόμενες ενδείξεις**

Στα μέσα συσκευασίας που περιέχουν τυρί αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις:

- α) Ονομασία είδους τυριού
- β) Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.)
- γ) Τυρί
- δ) Η επωνυμία και η έδρα του παραγωγού - συσκευαστή,
- ε) Η ημερομηνία παραγωγής.
- στ) Το βάρος του περιεχομένου.
- ζ) Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:
  1. Τα τρία πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης
  2. Ο αύξοντας αριθμός του μέσου συσκευασίας
  3. Η ημερομηνία παραγωγής (ΚΤΠ, Άρθρο 83, Έκδοση 3, Απρίλιος 2014)

## **1.2 Κατηγορίες Π.Ο.Π. Τυριών και Βακτήρια**

### **1.2.1 Τυριά σε άλμη**

#### **1.2.1.1 Φέτα**

Το τυρί Φέτα ανήκει στην κατηγορία των λευκών τυριών άλμης και παράγεται αποκλειστικά στις περιοχές της Ηπείρου, Μακεδονίας, Θράκης, Πελοποννήσου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας και του νομού Λέσβου από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινου (έως 30%).

Η παρασκευή της Φέτας πραγματοποιείται με θέρμανση του γάλακτος για 15 δευτερόλεπτα στους 72°C και αμέσως μετά γίνεται ψύξη στους 32-34°C. Ακολουθεί η προσθήκη οξυγαλακτικών καλλιεργειών και μετά από είκοσι λεπτά προστίθεται πυτιά (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011). Στη συνέχεια το τυρόπηγμα τοποθετείται για φυσική στράγγιση σε ειδικά καλούπια και αφού στραγγιστεί αλατίζεται με βρώσιμο χλωριούχο νάτριο. Στο σημείο αυτό της παραγωγής υπάρχει αυξημένη μικροβιοχλωρίδα η οποία συμβάλει στην ωρίμανση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της Φέτας. Μετά το αλάτισμα αρχίζει η διαδικασία της ωρίμανσης, όπου το τυρόπηγμα τοποθετείται σε μεταλλικούς ή ξύλινους υποδοχείς και προστίθεται άλμη 7% κατά βάρος. Οι υποδοχείς αυτοί

τοποθετούνται σε θαλάμους ωρίμανσης με τουλάχιστον 85% υγρασία και θερμοκρασία 18°C για 15 ημέρες. Στην συνέχεια οι υποδοχείς μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους με ανάλογη υγρασία και θερμοκρασία 2-4°C. Η διαδικασία ωρίμανσης της Φέτας διαρκεί συνολικά δύο μήνες (ΦΕΚ 8/11.01.94).

Σύμφωνα με τους (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011), η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα που απομονώθηκε από τυριά τύπου Φέτα στα αρχικά στάδια της παραγωγής συμπεριλαμβάνουν οξύγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και αλατοανεκτικά βακτήρια. Τα κυρίαρχα γένη και είδη των γαλακτικών βακτηρίων που καλλιεργήθηκαν μετά από 4 μέρες ωρίμανσης ήταν ο *Lactococcus lactis*, ο *Lactobacillus. plantarum* και το *Leuconostoc* ενώ στο τέλος της ωρίμανσης κυριαρχούσαν τα οξύγαλακτικά βακτήρια με κυρίαρχο είδος τον *Lb. plantarum*. Και άλλα είδη ετεροζυμωτικών οξύγαλακτικών βακτηρίων απομονώνονται συχνά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης όπως ο *Lb. pentosus* και *Lb. paraplantarum* (Manolopoulou *et al.*, 2003)

Έρευνες σε μαλακά τυριά έδειξαν ότι προσθήκη συγκεκριμένων ειδών γαλακτικών βακτηρίων ως δευτερεύουσες καλλιέργειες κατά τη διάρκεια παρασκευής παρουσίασαν καλά τεχνικά χαρακτηριστικά και πιο συγκεκριμένα κυρίως τα είδη *Lb. casei*, *Lb. fermentum* and *Lb. curvatus* συνέχισαν να παράγουν οξέα με αργό ρυθμό κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης προσδίδοντας ποιότητα στο προϊόν (Briggiler-Marcó *et al.*, 2007).

Σε άλλη έρευνα η προσθήκη διαφορετικών στελεχών *Enterococcus faecium* ως δευτερεύουσες καλλιέργειες στην παρασκευή Φέτας, επηρέασε θετικά τη γεύση, το άρωμα, το χρώμα και τη δομή της στο τέλος της ωρίμανσης όπως και όλο το οργανοληπτικό της προφίλ (Sarantinopoulos, Kalantzopoulos and Tsakalidou, 2002).

Ορισμένα στελέχη του γένους *Enterococcus* είναι δυνητικά παθογόνα και η ασφαλής χρήση τους στα τρόφιμα δεν έχει αποδεκτή γίνει παρόλο που πολλά είδη του *Enterococcus* χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων (Zhong *et al.*, 2017). Συγκεκριμένα είδη του *Enterococcus* που έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα παράγουν βακτηριοσίνες που παρεμποδίζουν την αλλοίωση των τροφίμων και την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων όπως η *Listeria monocytogenes*. ο *Staphylococcus aureus* και το (Giraffa, 2003).



### 1.2.1.2 Μπάτζος

Το τυρί Μπάτζος ανήκει στην κατηγορία των λευκών τυριών άλμης και παράγεται αποκλειστικά στις περιοχές της Δυτικής και Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας από γάλα γίδινο, πρόβειο ή μίγμα αυτών.

Η τεχνολογία παρασκευής του Μπάτζου πραγματοποιείται με θέρμανση του γάλακτος στους 28-32°C και προσθήκη πυτιάς για την πήξη του. Μετά την πήξη, ακολουθεί η κοπή του τυροπήγματος και η παραμονή του για 30 λεπτά, πριν την ανάδευση και την αναθέρμανσή του στους 45°C. Ακολουθεί εκ νέου τεμαχισμός του τυροπήγματος και αλάτισμα με βρώσιμο χλωριούχο νάτριο. Μετά από 5 ημέρες μεταφέρεται σε μεταλλικά δοχεία με άλμη περιεκτικότητας 10-12% κατά βάρος και παραμονή τρεις μήνες για ωρίμανση (ΦΕΚ 25/18.01.94).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού, αρχικά η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα απαρτίζεται από γαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτηριακά και κολοβακτηρίδια, αλλά με σημαντικές αλλαγές στον πληθυσμό των παραπάνω βακτηρίων ανάλογα αν το γάλα που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατά κύριο λόγο από αίγες ή πρόβατα αντίστοιχα. Προς το τέλος της ωρίμανσης ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων αυξάνεται μειώνοντας το pH με συνέπεια την μείωση των πληθυσμών των εντεροβακτηρίων και των κολοβακτηριδίων (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2011; Psoni, Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 2003). Επιπλέον οι παραπάνω συγγραφείς παρατήρησαν ότι η εποχή της γαλακτικής περιόδου είχε επίδραση στο μικροβιακό φορτίο του τυριού. Σε τυριά που παρασκευάστηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα ήταν αυτή των λακτόκοκκων και των εντερόκοκκων ενώ σε τυριά που παρασκευάστηκαν κατά την άνοιξη και καλοκαίρι ο πληθυσμός των λακτόκοκκων ήταν μειωμένος ενώ σπάνια απομονώνονταν εντερόκοκκοι. Το κυριότερο είδος λακτόκοκκων που απομονώθηκε ήταν ο *Lc. lactis subsp lactis* στα χειμερινά τυριά, ενώ το κυριότερο είδος εντερόκοκκου ήταν ο *E. durans* εν αντιθέση με τα καλοκαιρινά τυριά όπου επικρατούσαν ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι με κυριότερα είδη τους *Lb. plantarum* και *Lb. paraplantarum* (Psoni, Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 2003).

### 1.2.1.3 Καλαθάκι Λήμνου

Το τυρί Καλαθάκι Λήμνου ανήκει στην κατηγορία των λευκών τυριών άλμης, αναγνωρίζεται ως τυρί προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης και παράγεται αποκλειστικά στη Νήσο Λήμνο από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο (έως 30%).

Η παρασκευή του τυριού Καλαθάκι Λήμνος πραγματοποιείται με θέρμανση στους 33-34°C, προστίθεται πυτιά και με το πέρας των 45-60 λεπτών το γάλα αφήνεται σε ηρεμία για λίγα λεπτά ακόμα και μεταφέρεται σε ειδικούς κυλινδρικούς υποδοχείς για στράγγιση και βιολογική οξίνιση, οι οποίοι δίνουν το χαρακτηριστικό ανάγλυφο σχήμα στο τυρί. Το τυρί αφού στραγγιστεί, εξάγεται από τα καλούπια, αλατίζεται με βρώσιμο χλωριούχο νάτριο και τοποθετείται σε λευκοσιδηρά κυτία στα οποία γίνεται πλήρωση με άλμη περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο 6-8% κατά βάρος. Τα κυτία μεταφέρονται σε θαλάμους ωρίμανσης θερμοκρασίας 14-18°C για τρεις εβδομάδες και αργότερα μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας μικρότερης των 6°C για ωρίμανση τουλάχιστον δύο μηνών (ΦΕΚ 16/14.01.94).

## **1.2.2 Μαλακά τυριά**

### **1.2.2.1 Ανεβατό**

Το τυρί με την ονομασία Ανεβατό ανήκει στην κατηγορία των λευκών μαλακών τυριών, προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης, παραγόμενα αποκλειστικά στις περιοχές των Γρεβενών και της Κοζάνης από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγμα αυτών.

Το προορισμένο, για την παρασκευή του τυριού Ανεβατό, γάλα αφήνεται σε θερμοκρασία 18-22°C μέχρις ότου αποκτήσει οξύτητα 35°D. Το γάλα αυτό μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους 2-4°C για 24 ώρες και στη συνέχεια θερμαίνεται σε θερμοκρασία 12-14°C, προστίθεται ποσότητα πυτιάς ώστε να επιτευχθεί πήξη μέσα σε 12 ώρες. Κατόπιν τεμαχίζεται και το τυρόπηγμα παραμένει μέσα στον τυρολέβητα για 12 περίπου ώρες. Ακολουθεί στράγγιση, ξηρό επιφανειακό αλάτισμα και ωρίμανση του τυριού για δύο τουλάχιστον μήνες (ΦΕΚ 24/18.01.94).

Σύμφωνα με τους Hatzikamari and Tzanetakis, (1999) οι λακτόκοκκοι ήταν ο επικρατέστερος πληθυσμός στο Ανεβατό μέχρι την 15ή ημέρα ωρίμανσης ενώ οι λακτοβάκιλλοι επικράτησαν μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης και ο *Lc. lactis* ήταν το επικρατέστερο είδος που απομονώθηκε από το Ανεβατό.

### 1.2.2.2 Γαλοτύρι

Το τυρί Γαλοτύρι ανήκει στην κατηγορία των λευκών μαλακών τυριών προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης για τα είδη που παράγονται αποκλειστικά στις περιοχές της Ηπείρου και της Θεσσαλίας από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγμα αυτών.

Το γάλα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και τοποθετείται σε πήλινα δοχεία για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν αλατίζεται με βρώσιμο χλωριούχο νάτριο 3-4% κατά βάρος και αφήνεται για άλλες δύο ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπου αναδεύεται κατά διαστήματα για να επιτευχθεί οξίνιση. Το οξιτισμένο γάλα με ή χωρίς προσθήκη πυτιάς, μεταφέρεται σε υφασμάτινους ή δερμάτινους σάκους (τουλούμια) ή ξύλινα βαρέλια για στράγγιση. Οι ανωτέρω περιέκτες κλείνονται αεροστεγώς και μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας κάτω των 8°C για ωρίμαση τουλάχιστον δύο μηνών (ΦΕΚ 8/11.01.94).

Οι Samelis and Kakouri, (2007) παρατήρησαν ότι, ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων σε γαλοτύρι, παρασκευασμένο τόσο σε βιομηχανική κλίμακα όσο και με παραδοσιακό τρόπο, ήταν της τάξης των 8 log cfu/g ενώ οι ψευδομονάδες, τα εντεροβακτήρια και οι πηκτάση-θετικοί σταφυλόκοκκοι ήταν < 2 log cfu/g και απουσία Σαλμονέλας σε 25g τυριού. Επιπλέον παρατήρησαν παρουσία της *L. monocytogenes* σε ένα γαλοτύρι παρασκευασμένο σε βιομηχανική κλίμακα και σε δυο παρασκευασμένα με παραδοσιακό τρόπο ενώ τα παραδοσιακά γαλοτύρια είχαν σημαντικά ( $p < 0.05$ ) μεγαλύτερους πληθυσμούς εντερόκκων, εντεροβακτηριακών και ζωμών σε σχέση με τα γαλοτύρια βιομηχανικής κλίμακας. οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα στο Γαλοτύρι.

### 1.2.2.3 Κοπανιστή

Το τυρί Κοπανιστή ανήκει στην κατηγορία των λευκών μαλακών τυριών, προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης που παράγονται αποκλειστικά στην περιοχή του νομού Κυκλάδων από γάλα αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο ή μίγμα αυτών.

Η τεχνολογία παρασκευής του τυριού Κοπανιστή, σύμφωνα με την Ε.Ε C186/2012, πραγματοποιείται με προσθήκη πυτιάς στο γάλα και θέρμανσή του στους 28-30°C για δύο περίπου ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η πήξη. Το τυρόπηγμα παραμένει στον τυρολέβητα για 20-24 ώρες περίπου. Ακολουθεί τεμαχισμός και μεταφορά των διαιρεμένων τυροπηγμάτων σε σάκους από συνθετικό υλικό, κατάλληλο για τρόφιμα, προς στράγγιση. Η στραγγισμένη τυρομάζα αναμειγνύεται με την προσθήκη βρώσιμου χλωριούχου νατρίου 4-5% κατά βάρος

και φρέσκου βουτύρου έως 15%, το οποίο προέρχεται από την αποκορύφωση του γάλακτος ζώων της περιοχής των Κυκλάδων. Η προσθήκη του βουτύρου προσδίδει άρωμα και καλύτερη υφή στην Κοπανιστή. Στη συνέχεια η τυρομάζα μεταφέρεται σε δοχείο με χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή σχετική υγρασία ώστε να αναπτυχθεί στην επιφάνειά του άφθονη μικροβιακή χλωρίδα. Ακολουθεί ανάμιξη για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή της μικροβιακής χλωρίδας. Στη συνέχεια αφήνεται ώστε να εμφανιστεί νέα μικροβιακή χλωρίδα στην επιφάνεια του τυριού. Αυτή η ενέργεια επαναλαμβάνεται 3-4 φορές μέχρι να ολοκληρωθεί η ωρίμανση του τυριού που διαρκεί 30-40 μέρες (ΦΕΚ 16/14.01.94).

Τα επικρατέστερα απομονωμένα είδη λακτοβακίλλων στη Κοπανιστή σύμφωνα με τους Tzanetakis, Litoroulou-Tzanetaki and Manolkidis (1987), ήταν ο *Lb. plantarum* και ο *Lb. casei subsp casei*, ενώ παράλληλα απομονώθηκαν και εντερόκοκκοι και ο *Pediococcus pentosaceus* από δείγματα Κοπανιστής.

### **1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΥΡΙΩΝ**

#### **1.3.1 Κύρια καλλιέργεια (εκκινητές)**

Οι βακτηριακές καλλιέργειες, γνωστές ως εκκινητές, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία παρασκευής τυροκομικών προϊόντων. Οι εκκινητές προστίθενται στο γάλα μετά τη θέρμανση ή την παστερίωσή του και αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι εναρκτήριες καλλιέργειες αποτελούνται από οξυγαλακτικά βακτήρια, οι οποίες ζυμώνουν τη λακτόζη του γάλακτος σε γαλακτικό οξύ. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα βακτήρια αυτά παράγουν ουσίες, οι οποίες δίνουν στο προϊόν χαρακτηριστικά όπως είναι η οξύτητα (pH), συνεκτικότητα, άρωμα και γεύση που είναι χαρακτηριστικά για το κάθε είδος τυριού (Tetra Pak processing systems, 2003). Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης διαφέρουν ανάλογα με το είδος τυριού και τα χαρακτηριστικά του και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την προτιμώμενη θερμοκρασία ανάπτυξης τους σε μεσόφιλα βακτήρια με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 20-30°C και στα θερμόφιλα βακτήρια με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 40-45°C. Οι εκκινητές χωρίζονται επίσης σε μόνο-καλλιέργειες (ένα μόνο στέλεχος) και σε μίγματα ειδών βακτηρίων που το καθένα αποδίδει διαφορετικά χαρακτηριστικά στο προϊόν. Οι εκκινητές πρέπει να εξυπηρετούν δύο σκοπούς, να μειώνουν την οξύτητα και να διασπών τους πρωτεϊνικούς δεσμούς (Beresford and Williams, 2004).

Τα βακτήρια των εναρκτήριων καλλιεργειών πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, όμως συνεχίζουν να συμβάλλουν στην ωρίμανση λόγω των ενζύμων που απελευθερώνουν κατά τη δράση τους. Οι εναρκτήριες καλλιέργειες, οι οποίες επιτελούν τον σκοπό της ζύμωσης του γάλακτος για τη παρασκευή των τυριών, αποτελούνται κυρίως από μίγμα μικροβιακής χλωρίδας με επικρατέστερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι πιο συνήθεις εναρκτήριες καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται συμπεριλαμβάνουν τα *Lc. lactis* subsp. *lactis* ή *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, και *Lb. helveticus* (Beresford and Williams, 2004).

### 1.3.2 Δευτερεύουσα καλλιέργεια

Στην παρασκευή των τυριών, εκτός των εναρκτήριων καλλιεργειών χρησιμοποιούνται και δευτερεύουσες καλλιέργειες βακτηρίων. Συνήθως χρησιμοποιούνται μεσόφιλοι λακτοβάκιλλοι για τους παρακάτω λόγους:

- Να προσδώσουν 'ένταση' στη γεύση η οποία αλλοιώνεται εξαιτίας της παστερίωσης του γάλακτος, της χρήσης κλειστών δεξαμενών που προστατεύουν το τυρί από επιμολύνσεις και της χρήσης συγκεκριμένων στελεχών εναρκτήριων καλλιεργειών που μειώνουν τη μικροχλωρίδα του τυριού
- Να επιταχύνουν την ωρίμανση των τυριών, ειδικά αυτών με χαμηλή υγρασία ή αυτών με έντονη γεύση, που καθυστερούν σημαντικά και άρα αυξάνεται το κόστος
- Να προσδώσουν συγκεκριμένα γευστικά χαρακτηριστικά σε τυριά μειωμένης λιποπεριεκτικότητας
- Να καταστείλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μη εναρκτήριων καλλιεργειών ώστε να μειωθεί η ανομοιομορφία στην ποιότητα του τυριού (Fox, 2004).

### 1.3.3 Μη εναρκτήριες καλλιέργειες (Non starter lactic acid bacteria-NSLAB) - 'Άγρια' μικροβιοχλωρίδα

Εκτός από το γένος *Leuconostoc*, οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες δεν προστίθενται σκόπιμα μαζί με τις εναρκτήριες ή ως επιπρόσθετες καλλιέργειες αλλά αποτελούν 'παράγοντες επιμόλυνσης' και συνήθως αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών. Οι καλλιέργειες αυτές (*lactobacilli*, *Leuconostoc*, *pediococci* and *enterococci*) δεν συμβάλλουν

στην παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά την ωρίμανση των τυριών όμως τους προσδίδουν άρωμα και γεύση (Beresford and Williams, 2004). Η άγρια μικροβιοχλωρίδα των τυριών μπορεί να προέλθει από το απαστερίωτο γάλα που χρησιμοποιείται όπως και από τον εξοπλισμό και το περιβάλλον του τυροκομείου. Στα τυριά μεγάλης διάρκειας ωρίμανσης τα "άγρια" οξυγαλακτικά βακτήρια, αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και σταδιακά μπορεί να φτάσουν υψηλό αριθμό. Τα γάλα που προέρχεται από συγκεκριμένη περιοχή και προορίζεται για την παρασκευή συγκεκριμένου είδους παραδοσιακού τυριού φιλοξενεί συνήθως και συγκεκριμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (Fox *et al.*, 2004). Έχουν γίνει έρευνες για την απομόνωση και χρησιμοποίηση της "άγριας" μικροβιακής χλωρίδας, προερχόμενη από παραδοσιακά απαστερίωτα τυριά, ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παραγωγή τυριών (Bernardeau *et al.*, 2008). Πολλά από αυτά τα βακτήρια, όπως και ορισμένες εναρκτήριες καλλιέργειες βακτηρίων, παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες τις βακτηριοσίνες (νισίνη, λακτοκοκκίνη, διπλοκοκκίνη κ.α.), οι οποίες είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη ή μπορούν να αδρανοποιήσουν ορισμένα παθογόνα βακτήρια (Ayad *et al.*, 2002; Montel *et al.*, 2014).

### 1.3.4 Γαλακτικά Βακτήρια (lactic acid bacteria)

Τα κυριότερα Γένη γαλακτικών βακτηρίων είναι: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Οι λακτοβάκιλλοι μπορεί να είναι είτε υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί, είτε προαιρετικά ετεροζυμωτικοί ή υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί. Λακτοβάκιλλοι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί περιλαμβάνουν τα είδη *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. salivarius* και *Lb. helveticus*. Αυτοί ζυμώνουν εξόζες και παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ αλλά δεν μπορούν να ζυμώσουν πεντόζες. Οι προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν τις εξόζες μέσω της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhof pathway-EMP) και παράγουν γαλακτικό οξύ αλλά μπορούν να ζυμώσουν και πεντόζες με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος.

**Πίνακας 2.** Τα κυριότερα γένη γαλακτικών βακτηρίων

Γένος	Μορφολογία	Τύπος ζύμωσης	DNA (mole %GC)	
<i>Lactococcus</i>	cocci in chains	homo	L	33–37
<i>Leuconostoc</i>	cocci	hetero	D	38–41
<i>Pediococcus</i>	cocci	homo	DL	34–42
<i>Lactobacillus</i>	rods	homo/hetero	DL, D, L	32–53
<i>Streptococcus</i>	cocci in chains	homo	L	40 <sup>a</sup>

Πηγή: Adams & Moss, Food Microbiology, 3<sup>rd</sup> Edition, 2008)

Προαιρετικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι περιλαμβάνουν είδη πολύ σημαντικά σε ζυμούμενα τρόφιμα όπως: *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus* και *Lb. sakei*. Οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι περιλαμβάνουν τα είδη *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri* και *Lb. kefir* και ζυμώνουν τις εξόζες παράγοντας γαλακτικό και οξικό οξύ καθώς και διοξειδίο του άνθρακα (Adams and Moss, 2008).

#### 1.3.4.1 Γένος *Lactobacillus*

Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram +, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα βακτήρια, καταλάση και οξειδάση αρνητικά, τα οποία μορφολογικά εμφανίζονται κυλινδρικά, λεπτά και μακριά, μεμονωμένα ή και σε κοντές έως μακριές αλυσίδες. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι από 30-40°C αλλά έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν ακόμα και σε εύρος 5-53°C. Το άριστο pH ανάπτυξής τους είναι από 5.5-5.8. Απαριθμούνται τουλάχιστον 152 επιβεβαιωμένα γενετικά είδη του γένους *Lactobacillus* (Salvetti, Torriani and Felis, 2012). Οι λακτοβάκιλλοι βρίσκονται στο τουρσί, στο κρέας και τα προϊόντα του, στα λαχανικά, στα δημητριακά, στα φυτά, στο γάλα, στα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Η σημασία των λακτοβακίλλων έγκειται στο ότι πολλά είδη χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων, καθώς επίσης και στο ότι ορισμένα στελέχη έχουν προβιοτικές ιδιότητες καθώς παρουσιάζουν ανεκτικότητα στα οξέα και στα χολικά άλατα, η οποία τους επιτρέπει την επιβίωσή τους καθώς διαπερνούν το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Τα σημαντικότερα είδη του *Lactobacillus* που χρησιμοποιούνται ως στην παρασκευή τυριών συμπεριλαμβάνουν: *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. pentosus* και ο *Lb. alimentarius* (Vázquez-Velázquez *et al.*, 2018; Hynes *et al.*, 2002). Είδη όπως ο *Lb. plantarum* και ο *Lb. rhamnosus*, προστίθενται ως δευτερεύουσες καλλιέργειες ώστε να ενισχύσουν την λειτουργία των εκκινητών. Η χρήση των λακτοβακίλλων ως εναρκτήριες καλλιέργειες έγκειται στην ικανότητά τους να παράγουν γαλακτικό οξύ, μειώνοντας το pH στο περιβάλλον των τυριών συμβάλλοντας στην συντηρησιμότητά τους, στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών καθώς επίσης στη γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος. Οι δευτερεύουσες καλλιέργειες προστίθενται για να ενισχύσουν την δράση των πρώτων ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τυριών. Έρευνα των Bintsis *et al.*, (2000), έδειξε ότι η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα στην άλμη της φέτας ήταν οι δευτερεύουσες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων (NSLAB) μετά από δύο μήνες ωρίμανσης και συγκεκριμένα ο *Lb.*

*paracasei* subsp. *paracasei* και ο *Lb. plantarum*. Ο *Lb. plantarum* έχει απομονωθεί τόσο από παστεριωμένα όσο και από απαστερίωτα τυριά και έχει φαινοτυπικά ταυτοποιηθεί από την ικανότητά του να αναπτύσσεται στους 15°C και 45°C καθώς και σε 6.5% (w/v) NaCl (Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2017).

Ο *Lb. zeae* απομονώνεται πιο συχνά από το αγελαδινό γάλα και πρόσφατα αλληλουχήθηκε ολόκληρο το γονιδίωμα του στέλεχους *Lb. zeae* KCTC 3804 (Kim *et al.*, 2011). Σύμφωνα με την ταξινόμική ανάλυση 16S rRNA των Salvetti, Torriani and Felis, (2012), κάποια στελέχη του *Lb. zeae* και *Lb. casei* ανήκουν στη ίδια οικογένεια λακτοβακίλλων, όπως είχε αναφερθεί και από τους Felis *et al.*, (2001) οι οποίοι με γονιδιακή ταυτοποίηση βρήκαν ότι στελέχη του *Lb. casei* συνδέονται ταξινόμικά με στελέχη των *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* και *Lb. zeae*.

#### 1.3.4.2 Γένος *Lactococcus*

Τα βακτήρια του γένους *Lactococcus* είναι Gram + κόκκοι, ακίνητα, τα οποία αναπτύσσονται σε ζεύγη ή σε κοντές αλυσίδες. Δεν σχηματίζουν σπόρια και ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης τους εμφανίζονται με ωοειδές σχήμα. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι οι 30°C, αναπτύσσονται στους 10°C αλλά όχι στους 45°C. Δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία 6.5% (w/v) NaCl. Τα είδη του γένους *Lactococcus* διαφέρουν στη ικανότητά τους να παράγουν οξύ από τη ζύμωση σακχάρων όπως η λακτόζη, ημανιτόλη και η ραφινόζη. Τα είδη που χρησιμοποιούνται στη παραγωγή γαλακτομικών προϊόντων χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη (Demarigny, 2014). Κυρίως τα είδη *Lc. lactis* subsp. *lactis* και *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, που είναι μεσόφιλες εναρκτηρίες καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαιτίας της αλατοανεκτικότητάς τους και ο συνδυασμός του θεωρείται ως ο καλύτερος όσον αφορά το άρωμα και τη γεύση που προσδίδουν στο τυρί. Τα βακτήρια του γένους *Lactococcus*, μαζί με τα βακτήρια των γενών *Leuconostoc* και *Pediococcus*, ανήκουν στους μεσόφιλους εκκινητές. Όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν πρωτεΐνες, τις βακτηριοσίνες, οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα. Έχει βρεθεί ότι κάποια στελέχη του *Lc. lactis* παράγουν νιασίνη (βακτηριοσίνη), η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* και του *S. aureus* (Cogan, 1999).



Πίνακας 3. Οι κυριότερες ‘φυσικές’ και εμπορικές εναρκτήριες καλλιέργειες

Bacterium	Type	Shape	Lactic acid produced in milk <sup>a</sup>	Metabolism of citrate	NH <sub>3</sub> from arginine	Growth at				Fermentation of sugar	Isomer of lactate produced
						10°C	15°C	40°C	45°C		
<b>Commercial starter cultures</b>											
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Thermophilic	Coccus	0.6	-	-	-	-	+	+	Homofermentative	L
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Thermophilic	Rod	2.0	-	-	-	-	+	+	Homofermentative	D,L
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Thermophilic	Rod	1.8	-	±	-	-	+	+	Homofermentative	D
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Thermophilic	Rod	1.8	-	±	-	-	+	+	Homofermentative	D
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Mesophilic	Coccus	0.8	±	-	+	+	-	-	Homofermentative	L
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Mesophilic	Coccus	0.8	±	+	+	+	+	-	Homofermentative	L
<i>Leuconostoc lactis</i>	Mesophilic	Coccus	<0.5	+	-	+	+	-	-	Heterofermentative	D
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Mesophilic	Coccus	0.2	+	-	+	+	-	-	Heterofermentative	D
<b>Natural (artisanal) starter cultures</b>											
Bacteria involved in commercial starter cultures, plus:											
<i>Lactobacillus casei</i>		Rod		±	-		+		-	Homofermentative	L
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		Rod			-	+	+	+	±	Homofermentative	L
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> <sup>b</sup>		Rod			-	+	+	+	-	Homofermentative	L
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		Rod			-	±	+	+	+	Homofermentative	L
<i>Lactobacillus plantarum</i>		Rod		±	-		+		-	Homofermentative	D,L
<i>Lactobacillus curvatus</i>		Rod			-		+		-	Homofermentative	D,L
<i>Lactobacillus fermentum</i>		Rod			+		+	+	+	Heterofermentative	D,L
<i>Enterococcus faecalis</i>		Coccus		+	+	+	+	+	+	Homofermentative	L
<i>Enterococcus faecium</i>		Coccus			+	+	+	+	+	Homofermentative	L

<sup>a</sup>Approximate values; individual strains vary.

<sup>b</sup>Survives heating at 72°C for 40 s.

Πηγή: Cogan 1999

#### 1.3.4.3 Γένος *Enterococcus*

Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει βακτήρια που παλαιότερα ήταν γνωστά ως "εντερικοί στρεπτόκοκκοι". Μορφολογικά είναι Gram + κόκκοι, σφαιρικοί ή ωοειδείς, ακίνητοι, σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες, προαιρετικά αναερόβιοι και καταλάση αρνητικοί. Είναι θερμοάντοχα βακτήρια με ικανότητα ανάπτυξης σε εύρος θερμοκρασιών από 10-65°C. Ο *E. faecalis* μπορεί να επιζήσει στους 60°C για 30 λεπτά. Διαχωρίζονται από τους λακτόκοκκους και τους στρεπτόκοκκους από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε 6.5% NaCl (w/v) στους 10°C. Αναπτύσσονται σε pH 4.5- 10.0.

Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει περίπου 51 είδη με σημαντικότερα τα *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* και *E. durans*. Οι εντερόκοκκοι είναι φυσική χλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων και μεταφέρονται στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων (Fisher and Phillips, 2009). Είδη του γένους *Enterococcus* βρίσκονται σε φρέσκα και παστεριωμένα τυριά, μαλακά και ημίσκληρα, κυρίως τα είδη *E. faecium* και *E. faecalis*. Ο *E. durans* έχει απομονωθεί από γάλα, προϊόντα κρέατος και από μολυσμένο νερό. Σε τυριά από φρέσκο γάλα, οι εντερόκοκκοι βρίσκονται εξαιτίας της μεταφοράς τους μέσω του γάλακτος και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αποτελούν την κύρια μικροβιοχλωρίδα των τυριών (Giraffa, 2003). Σε έρευνα των Sarantinopoulos, Kalantzopoulos and Tsakalidou (2002), στελέχη του *E. faecium* χρησιμοποιήθηκαν, είτε μόνα τους είτε ως κόκτειλ, ως δευτερεύουσα καλλιέργεια στην παρασκευή Φέτας και παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των εντερόκοκκων αυξήθηκε ραγδαία τις πρώτες 15 μέρες της ωρίμανσης και μετά παρέμεινε σταθερός. Ορισμένα στελέχη των *E. faecium*, *E. faecalis* και *E. durans* παράγουν βακτηριοσίνη ενάντια σε παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια των τυριών, όπως *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *St. aureus*, *V. cholerae*, *Clostridium spp* και *Bacillus spp*. (Pieniz *et al.*, 2014; Giraffa, 2003). Η παρουσία των εντερόκοκκων στα τρόφιμα, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, δεν αποτελεί αναγκαστική επιμόλυνσή τους για το λόγο ότι αποτελούν μέρος του μικροβιακού φορτίου των συγκεκριμένων προϊόντων. Η χρόνια χρήση των αντιβιοτικών ως παράγοντες ανάπτυξης στα ζώα και η κατάχρησή τους από τον άνθρωπο, έχουν καταστήσει πολλά στελέχη των *E. faecium* και *E. faecalis* ανθεκτικά σε αυτά, ειδικά στην βανκομυκίνη και για αυτό τον λόγο δεν θεωρούνται ως ασφαλή (generally regarded as safe-GRAS) για χρήση στα τρόφιμα (Lebreton, Willems and Gilmore, 2014; Ogier and Serror, 2008).

#### 1.3.4.4 Γένος *Leuconostoc*

Τα είδη του γένους *Leuconostoc* ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι Gram +, σφαιρικά, σε ζεύγη ή αλυσίδες, καταλάση αρνητικά, προαιρετικά αναερόβια, με άριστο pH ανάπτυξης 5.5-6.5 και αναπτύσσονται σε 7% NaCl (w/v). Τα βακτήρια του γένους *Leuconostoc* διαφέρουν από τους άλλους κόκκους λόγω της ζύμωσης της γλυκόζης σε D (-) - γαλακτικό οξύ και CO<sub>2</sub>, ενώ όλοι οι άλλοι γαλακτόκοκκοι παράγουν L (+) - ή DL - γαλακτικό οξύ, χωρίς παραγωγή αερίου και η αδυναμία σχηματισμού αμμωνίας από την αποκαρβοξυλίωση της αργινίνης (Adams and Moss, 2008). Στελέχη του γένους *Leuconostoc* απομονώνονται συχνά από τρόφιμα πλούσια σε σουκρόζη (παράγουν δεξτράνη) και σακχαρόζη και από ζυμούμενα τρόφιμα όπως λαχανικά (λάχανο/sauerkraut), κρεατικά υπό ψύξη, γαλακτοκομικά προϊόντα και από το περιβάλλον των τυροκομείων. Το γένος *Leuconostoc* περιλαμβάνει 18 είδη, όλα είναι ετεροζυμωτικά, με σημαντικότερα τα *Ln. mesenteroides* και *Ln. paramesenteroides*. Άλλα είδη του γένους *Leuconostoc* περιλαμβάνουν τα *Ln. menteroides ssp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides ssp cremoris*, *Ln. mesenteroides ssp dextranicum*, *Ln. lactis* και *Ln. pseudomesenteroides*. Όλα τα στελέχη παρουσιάζουν φυσική ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη. Τα στελέχη του είδους *Ln. mesenteroides* σε συνδυασμό με άλλα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων ως καλλιέργειες εκκίνησης λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που προσδίδουν στα τυριά εξαιτίας της παραγωγής αρωματικών ουσιών. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως δευτερεύουσες καλλιέργειες και βοηθούν στην αναστολή παραγωγής οξέος από τους λακτόκοκκους, των οποίων περιορίζουν την ανάπτυξη, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα όπως η πικρότητα στα προϊόντα (Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004).

#### 1.3.4.5 Γένος *Pediococcus*

Τα είδη του γένους *Pediococcus* είναι Gram +, ομοζυμωτικά και διαφέρουν μορφολογικά από τους υπόλοιπους κόκκους. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ο σχηματισμός τετράδων λόγω της διαίρεσης των κυττάρων τους σε δύο κάθετα μεταξύ τους επίπεδα. Όλα τα είδη του γένους *Pediococcus* έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης από 25-35°C, αλλά εξαρτάται από το είδος. Μπορούν να αναπτυχθούν σε pH 5 και τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις 4-5% NaCl (w/v), αλλά μόνο οι *Ped. acidilactici* και *Ped. pentosaceus* μπορούν να ανεχθούν συγκέντρωση 10% NaCl (w/v). Οι *Ped. acidilactici*, *Ped.*

*ethanolidurans*, *Ped. siamensis* και *Ped. stilesii* μπορούν να αναπτυχθούν στους 45°C καθώς και ορισμένα στελέχη του *Ped. pentosaceus* ενώ όλα τα υπόλοιπα είδη δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτή τη θερμοκρασία. Όλα τα είδη του γένους *Pediococcus* ζυμώνουν τη φρουκτόζη, μαννόζη και σελομπιόζη αλλά ο *Ped. parvulus* δεν ζυμώνει τη μαλτόζη, σουκρόζη και τις πεντόζες αραμπινόζη, ξυλόζη και ριβόζη. Συγκεκριμένα στελέχη ζυμώνουν την γαλακτόζη. Αναπτύσσεται σε συγκέντρωση μέχρι 8% NaCl (w/v) και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι στους 35 °C και pH 4.5 (Franz *et al.*, 2014).

Τα σημαντικότερα είδη του γένους είναι οι *Ped. acidilactici*, *Ped. pentosaceus*, *Ped. parvulus* και *Ped. inopinatus*, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρασκευή πολλών ζυμωμένων τροφίμων συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο *Ped. pentosaceus* συμμετέχει στη ζύμωση και ωρίμανση τυριών ειδικά σε αυτά που απαιτείται έντονο άρωμα (Ogier *et al.*, 2002; Callon, Millet and Montel, 2004).

#### 1.3.4.6 Μύκητες

Οι μύκητες είναι πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες. Τα σπόρια των μυκήτων μεταφέρονται μέσω του αέρα. Η ανάπτυξη και διασπορά των μυκήτων στα τυριά ξεκινά από την επιφάνειά τους και προχωρά στο εσωτερικό τους. Η εμφάνισή τους είναι έγχρωμη και κολλώδης. Οι μύκητες αναπτύσσονται σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα καθώς και σε όξινα τρόφιμα. Η παρουσία των μυκήτων σε τυριά είναι συχνή και μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως άσχημη γεύση, οσμή και εμφάνιση (Farkye, 1999). Τα πιο συχνά απομονωμένα γένη μυκήτων, από τυριά όπως ο τελεμές και η φέτα, περιλαμβάνουν τα *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium* και *Fusarium*. Ορισμένα είδη μυκήτων όπως τα *Penicillium cyclospium*, *P. viridicatum*, *Aspergillus flavus* και *A. ochraceus* μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες (Ozer, 1999a). Οι μύκητες, οι οποίοι είναι αιτία επιμόλυνσης ορισμένων τυριών μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή για αυτό και συστήνονται αεροστεγείς συσκευασίες ώστε να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους.

Σε ορισμένα τυριά οι μύκητες αποτελούν την εναρκτήρια καλλιέργεια και σε αυτούς στηρίζεται η παραγωγή και ωρίμανση των τυριών με στόχο τη δημιουργία συγκεκριμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Υπάρχουν δύο τύποι παραγωγής τυροκομικών προϊόντων με την προσθήκη μυκήτων: ο πρώτος στον οποίο ο μύκητας αναπτύσσεται στην επιφάνεια του τυριού και ο δεύτερος στον οποίο ο μύκητας αναπτύσσεται στο εσωτερικό του τυριού.

Τα τυριά Camembert και Brie ανήκουν στην πρώτη κατηγορία τα οποία ωριμάζουν με την προσθήκη των μυκήτων *P. camamberti* και *Geotrichum candidum*. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα τυριά Danish Blue, Roquefort, Bleu D' Auvergne, Stilton και Gorgonzola, τα οποία ωριμάζουν με την προσθήκη του *P. roqueforti* (Nichol, 1999).

#### 1.3.4.7 Ζύμες

Οι ζύμες αναπτύσσονται σε όξινες συνθήκες με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Οι ζύμες διασπούν τα σάκχαρα σε διοξείδιο του άνθρακα, αλκοόλες και οξέα. Οι οξειδωτικές ζύμες οξειδώνουν τα σάκχαρα σε οργανικά οξέα και αλκοόλη με αύξηση του pH των τροφίμων. Αναπτύσσονται στην επιφάνεια τροφίμων με υγρασία σχηματίζοντας ένα φιλμ. Οι αλατοανεκτικές ζύμες προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα με υψηλή συγκέντρωση άλατος. Όπως αναφέρουν οι Moatsou and Gouaris (2011), η ανεπαρκής μείωση της οξύτητας τις πρώτες ώρες παραγωγής του τυριού ή η αργή μείωση του pH, αυξάνει το ρίσκο ανάπτυξης των ζυμών και των κολοβακτηριδίων. Οι Hatzikamari and Tzanetakis (1999), διαπίστωσαν ότι ο πληθυσμός των ζυμών στο τυρί Ανεβατό εξαρτάται από την περίοδο παραγωγής του, με τον πληθυσμό τους να είναι μικρότερος τον Ιανουάριο σε σχέση με τον Μάρτιο και τον Μάιο. Η ανάπτυξη των ζυμών στην επιφάνεια των τυριών είναι αναμενόμενη λόγω του χαμηλού pH, χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης και της υψηλής συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου στην επιφάνεια των τυριών (Brennan *et al.*, 2004). Για την παραγωγή του τελεμέ, ο συνδυασμός εκκινητών και ζυμών όπως οι *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus varlactus*, θα μπορούσε να βοηθήσει στην ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης του (Ozer, 1999a).

#### 1.3.4.8 Κολοβακτηρίδια (Coliforms)

Τα κολοβακτηρίδια είναι προαιρετικά αναερόβια, Gram -, βακτήρια σε σχήμα ραβδίων και ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Τα ευρισκόμενα σε τυριά κολοβακτηρίδια προέρχονται από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων, το έδαφος, τα φυτά, την κοπριά και το μολυσμένο νερό, όπου μεταφέρονται στο γάλα μέσω της άλμεξης των ζώων. Τα κολοβακτηρίδια ζυμώνουν την λακτόζη σε γαλακτικό οξύ, καθώς και σε άλλα οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο και διασπούν τις πρωτεΐνες του γάλακτος αποδομώντας τη γεύση και το άρωμα του. Η δράση των κολοβακτηριδίων πραγματοποιείται

στο πρώιμο στάδιο ωρίμανσης των τυριών όπου παρατηρείται έντονη παραγωγή αερίου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό οπών στη μάζα τους (Pandey, A. Vinod, J. K, Nigam P. Socol, 1999). Η δράση αυτή σταματάει με τη ζύμωση της λακτόζης και την πτώση του pH κάτω από 6.0. Το πρόβλημα της δραστηριότητας των βακτηρίων αυτών παύει με την παστερίωση του γάλακτος. Η εμφάνιση των κολοβακτηριδίων στο γάλα και στους αγωγούς του εξοπλισμού των τυροκομείων μετά την παστερίωση είναι σημάδι μη καλής απολύμανσης του.

#### **1.3.4.9 *Listeria monocytogenes***

Η *Listeria* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, Gram +, μη σπορογόνο, σε σχήμα ραβδίων βακτήριο. Υπάρχουν 17 είδη του γένους *Listeria* με κυριότερα τα *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi* και *L. welshimeri*. Τα είδη της *Listeria* θεωρούνται μη παθογόνα, με εξαίρεση την *L. monocytogenes*, η οποία θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο και τα ζώα, καθώς και την *L. ivanovii*, η οποία θεωρείται παθογόνος για τα ζώα (Martin & Fisher, 1999). Η *L. monocytogenes* έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 30-37°C, αναπτύσσεται και στους 4°C και έχει εύρος pH 4.0- 9.5. Στελέχη της *L. monocytogenes* έχουν απομονωθεί από ανοξείδωτο εξοπλισμό παστερίωσης και ψύξης των τυροκομείων (Ozer, 1999b). Η *L. monocytogenes* προκαλεί τη λιστερίωση, τα συμπτώματα της οποίας διαρκούν από λίγες ημέρες έως 3 εβδομάδες. Η προσβολή από λιστερίωση έχει 70% θνησιμότητα, κυρίως σε ευπαθείς ομάδες με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα. Άλλα συμπτώματα της λιστερίωσης είναι η σηψαιμία, ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία, ηπατίτιδα, ουρηθρίτιδα, ανεύρυσμα αορτής και δερματικές αλλοιώσεις (Martin & Fisher, 1999).

#### **1.3.4.10 *Staphylococcus aureus***

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae* και αριθμεί περισσότερα από 20 είδη. Τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* διαβιούν φυσιολογικά στο δέρμα, μαλλιά, χέρια και στις βλεννώδεις περιοχές των θηλαστικών, όπως τα ρουθούνια. Ο σταφυλόκοκκος είναι Gram +, καταλάση θετικός, με σφαιρικό σχήμα και εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης από 7- 48°C (Harvey & Gilmour, 1999). Ο *St. aureus* είναι ένα από τα 54 είδη του γένους *Staphylococcus*. Τα περισσότερα είδη του γένους έχουν βρεθεί στο ανθρώπινο δέρμα και στην ρινική κοιλότητα (Martin, Scott & Iandolo, 1999). Τρόφιμα από όπου έχει απομονωθεί ο *St. aureus* συμπεριλαμβάνουν το κρέας, ψάρι, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά, λαχανικά κ.α.. Για την αποφυγή του πολλαπλασιασμού του

*St. aureus*, τα τρόφιμα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες κάτω των 5°C. Ο *St. aureus* μπορεί να αναπτυχθεί σε αερόβιες συνθήκες παρουσία αμινοξέων και βιταμινών και σε αναερόβιες συνθήκες παρουσία μιας ζυμούμενης πηγής άνθρακα, όμως η μεγαλύτερη του ανάπτυξη εμφανίζεται σε αερόβιες συνθήκες (Martin, Scott & Iandolo, 1999). Ο *St. aureus* παράγει τη σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη. Σε περίπτωση κατανάλωσης τροφίμου με σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό και διάρροια σε διάστημα 1-6 ώρες από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου.

## **1.4 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ**

### **1.4.1 Ορισμός**

Σύμφωνα με τους (Gibson and Roberfroid, 1995) τα πρεβιοτικά ορίζονται ως μη αφομοιώσιμα συστατικά των τροφίμων που δρουν ευεργετικά στον ξενιστή διεγείροντας επιλεκτικά την ανάπτυξη και/ή τη δραστηριότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων που αποικίζουν το έντερο. Οι κυριότερες ουσίες που χρησιμοποιούνται ως πρεβιοτικά είναι ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν με τρεις τρόπους: από φυτικές ύλες, με βιοτεχνολογική παραγωγή ή ενζυμική σύνθεση και με ενζυμική υδρόλυση πολυσακχαριτών (Crittenden and Playne, 1996). Ορισμένοι υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται για τις πρεβιοτικές τους ιδιότητες προέρχονται από φυτικές πηγές όπως το πράσο, η μπανάνα, το κρεμμύδι, το σκόρδο και η αγγινάρα κ.α.. Τα πρεβιοτικά μπορούν να ενισχύσουν τη δράση των προβιοτικών στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων.

### **1.4.2 Κριτήρια**

Για να θεωρηθεί ένας υδατάνθρακας ως πρεβιοτικό θα πρέπει να αντέχει την ενζυμική αποικοδόμηση ή υδρόλυση, να ζυμώνεται από τα μικρόβια και επιλεκτικά να διεγείρει την ανάπτυξη ή και τη δραστηριότητα των ωφέλιμων μικροοργανισμών. Τα πρεβιοτικά θα πρέπει να είναι ασφαλή και να προσδίδουν τις επιθυμητές οργανοληπτικές και μηχανικές ιδιότητες (Likotrafiti *et al.*, 2014). Τα κυριότερα πρεβιοτικά είναι ολιγοσακχαρίτες, όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες, η ινουλίνη, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη κ.α.

### 1.4.3 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS)

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) είναι υδατάνθρακες, με μικρού και μεσαίου μεγέθους αλυσίδες, οι οποίοι αποτελούνται από μονάδες φρουκτόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β- 2,1 γλυκοζιτικούς δεσμούς που καταλήγει συχνά σε μια τερματική μονάδα γλυκόζης (Sabater-Molina *et al.*, 2009).

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι ταξινομημένοι με βάση τον αριθμό των μονάδων των μονοσακχαριτών, οι οποίοι καθορίζουν τον βαθμό πολυμερισμού τους. Η ολιγοφρουκτόζη έχει βαθμό πολυμερισμού 2-8. Ο β - 2,1 δεσμός του FOS, συμπεριλαμβανομένου του πρώτου δεσμού γλυκόζη-φρουκτόζη, δεν υδρολύεται εύκολα από το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου (Gibson and Roberfroid, 1995). Η παραγωγή ινουλίνης γίνεται από τα φυτά των οικογενειών *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* και *Compositae*. Περιέχονται σε τρόφιμα όπως το σκόρδο, το κρεμμύδι, το σπαράγγι και η αγκινάρα ενώ σε βιομηχανική κλίμακα παράγεται από την εξαγωγή ζεστού νερού από τις ρίζες του κιχωρίου (*Cichorium intybus*). Η ολιγοφρουκτόζη παράγεται από την μερική υδρόλυση της ινουλίνης. Ο βαθμός πολυμερισμού της ινουλίνης κιχωρίου κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 2 και 60 (Kalyani Nair, Kharb and Thompkinson, 2010). Η ραφτιλόζη ανήκει στους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες. Αποτελείται από 95% ολιγοφρουκτόζη, με επίπεδο γλυκύτητας 30% σε σχέση με την σουκρόζη. Ο βαθμός πολυμερισμού της φρουκτάνης είναι 4 και αποτελείται περισσότερο από 90% ινουλίνη (μικρής αλυσίδας), λιγότερο από 4% γλυκόζη και φρουκτόζη, λιγότερο από 8% σουκρόζη. Το στερεό της υπόλειμμα είναι 97% και έχει pH 5-7. Εξαιτίας της γλυκαντικής της δύναμης, η ραφτιλόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αρτοσκευάσματα, γαλακτοκομικά προϊόντα, ποτά, παιδικές τροφές, δημητριακά, κρεατοσκευάσματα, σουπές, σάλτσες και κατεψυγμένα επιδόρπια (<https://www.ingredientsnetwork.com/orafti-p95-prod645466.html>)

### 1.4.4 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες σχηματίζονται κυρίως από την ενζυμική κατεργασία της λακτόζης με την β- γαλακτοσιδάση για την παραγωγή αρκετών, διαφορετικού μήκους αλυσίδας, ολιγομερών. Συνήθως έχουν βαθμό πολυμερισμού 2-10, με μια τερματική μονάδα γλυκόζης (Macfarlane, Steed and Macfarlane, 2008). Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν φυσικά από την λακτόζη του αγελαδινού γάλακτος, αλλά η κύρια πρώτη ύλη σε βιομηχανική κλίμακα είναι συνήθως ορός γάλακτος. Συνήθως περιέχουν 24-55%



ολιγοσακχαρίτες και μικρότερες ποσότητες λακτόζης, γλυκόζης και γαλακτόζης. Τα ένζυμα και οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται καθορίζουν τους διάφορους γλυκοζιτικούς δεσμούς στα τελικά προϊόντα (Birkett and Francis, 2010). Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες λόγω της υψηλής τους σταθερότητας και διαλυτότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα όπως οι χυμοί φρούτων, τα γιαούρτια, τα αρτοσκευάσματα και δημητριακά πρωινού. Η πιο εξειδικευμένη χρήση τους είναι στην παιδική τροφή, στα λειτουργικά τρόφιμα και στην κλινική διατροφή. Οι ολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται στο γάλα για βρέφη παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού τους συστήματος, τη μείωση της πιθανότητας λοίμωξης και αλλεργιών και τη μείωση της δυσκοιλιότητας. Η κατανάλωση GOS μπορεί να αυξήσει την απορρόφηση του ασβεστίου, μαγνησίου και φωσφόρου, τα οποία είναι απαραίτητα για τα οστά και να μειώσει τη δυσανεξία στη λακτόζη (Azcarate-Peril *et al.*, 2017).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εξέταση μικροβιολογικών πληθυσμών βακτηρίων απομονωμένων από Ελληνικά μαλακά τυριά Π.Ο.Π. Όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 15°C και 45°C καθώς και σε συγκεντρώσεις 6, 8 και 10% NaCl (w/v). Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα διαφορετικών στελεχών των γενών *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus* να αναπτύσσονται παρουσία φρουκτοολιγосακχαριτών (FOS) και γαλακτοολιγосακχαριτών (GOS) με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

Τα χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany) και της εταιρείας Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) ενώ τα μικροβιολογικά υλικά ήταν της εταιρείας Lab M (Lancashire, UK). Τα υλικά και η προετοιμασία τους για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν τα ακόλουθα:

- Plate Count Agar (PCA)
- de Man, Rogosa and Sharpe Agar & Broth (MRS)
- Yeast Glucose Agar [(YGC), (Merck, Darmstadt, Germany)]
- KF Streptococcus Agar (Pancreac Quimica SA, Barcelona, Espana)
- M17 Agar (Merck, Darmstadt, Germany)
- Oxford Listeria Isolation Medium and supplement
- Baird-Parker Agar Medium Base
- Violet Red Bile Agar (VRBA)
- Ringer's solution ¼ strength
- T-MRS Broth (τροποποιημένο MRS) που περιείχε: 10g Bacteriological Peptone, 10g Meat Extract, 5g Yeast Extract, 5g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 2g C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0,05g MnSO<sub>4</sub> σε 1L απιονισμένου H<sub>2</sub>O)
- Θρεπτικός ζωμός (pH 7,0) με 6, 8 και 10% συγκέντρωση NaCl (5g Meat Extract, 10g Peptone σε 1L απιονισμένου H<sub>2</sub>O)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% (v/v)

Η αποστείρωση όλων των υποστρωμάτων έγινε στους 121°C για 15 min πριν τη χρήση τους εκτός από το VRB Agar στο οποίο έγινε βρασμός (100°C) για την αποστείρωση του, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αποθηκεύθηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι εμπορικά διαθέσιμοι υδατάνθρακες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) Raftilose<sup>®</sup>P95 (93.2 % ολιγοσακχαρίτες, Beneo-Orafti, Belgium, DP 2-8) και Raftilose<sup>®</sup>L95 και ο γαλακτοολιγοσακχαρίτης (GOS) Vivinal<sup>®</sup>GOS,

(59% ολιγοσακχαρίτες, 19% γλυκόζη, 21% λακτόζη, 1% γαλακτόζη, FrieslandCampina Domo, Ολλανδία]. Η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως μη εκλεκτικός υδατάνθρακας και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Η Raftilose<sup>®</sup>P95 ήταν σε μπρφή σκόνης ενώ τα Raftilose<sup>®</sup>L95 και Vivinal<sup>®</sup>GOS ήταν σε μορφή σιροπιού. Προετοιμάστηκαν διαλύματα 10% (w/v) όλων των υδατανθράκων, αποστειρώθηκαν με φίλτρα διήθησης για σύριγγα με άνοιγμα βροχίδας 0.2μm (Filtres Fiorini, France) και αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Δειγματοληψία

Μελετήθηκαν 6 διαφορετικά Ελληνικά τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) εις τριπλούν με κάθε επανάληψη να προέρχεται από διαφορετικό παραγωγό και περιοχή. Τα 6 τυριά που μελετήθηκαν ήταν: Ανεβατό (Γρεβενά και Τύρναβος), Γαλοτύρι (Ηπειρος και Μέτσοβο), Καλαθάκι Λήμνου (Γαλάτιστα Χαλκιδικής, Λέσβος και Λήμνος), Κοπανιστή (Μύκονος και Σύρος), Μπάτζος (Βέροια, Ορεινό Βέρμιο και Γρεβενά) και Φέτα (Ηπειρος, Χελμός και Όλυμπος).

Για τη μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων ζυγίσθηκαν 10g τυριού σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher υπό ασηπτικές συνθήκες και προστέθηκαν 90ml διαλύματος ¼ Ringer's και ομογενοποιήθηκαν στο Stomacher 400 (Seward) σε υψηλή ταχύτητα για 60sec. Κατόπιν έγιναν δεκαδικές αραιώσεις ενοφθαλμίζοντας 1ml κάθε αραιώσης σε 9ml διαλύματος ¼ Ringer's και ενοφθαλμίστηκαν 20μL σε κάθε τεταρτημόριο στα αντίστοιχα τρυβλία με εκλεκτικά και μη υπόστρωματα. Πιο αναλυτικά, 20μL ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης σε: Plate Count Agar και επώαση στους 30°C για 48h, σε MRS Agar και επώαση στους 30°C για 72h, σε KF Streptococcus Agar και επώαση για τις πρώτες 4h στους 37°C και κατόπιν επώαση στους 44°C για 44h, σε M17 Agar και επώαση στους 30°C για 48h, σε Baird Parker Agar και επώαση στους 37°C για 48h. Ενώ 100μL ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης σε YGC Agar και επώαση στους 25°C για 72h και 0.5mL σε Oxford Agar και επώαση στους 30°C για 48h. 1mL ενοφθαλμίστηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης σε κάθε τρυβλίο με VRB Agar και επώαση στους 37°C για 48h.

Για τη μελέτη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) χρησιμοποιήθηκε το Plate Count Agar, για την απομόνωση λακτοβακίλλων χρησιμοποιήθηκε το MRS Agar, για την απομόνωση στρεπτόκοκκων/πεδιόκοκκων χρησιμοποιήθηκε το KF Streptococcus Agar, για

την απομόνωση λακτόκοκκων χρησιμοποιήθηκε το M17 Agar, για την απομόνωση σταφυλόκοκκων χρησιμοποιήθηκε το Baird Parker Agar, για την απομόνωση Μυκήτων-Ζυμών χρησιμοποιήθηκε το YGC Agar, για την απομόνωση της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε το Oxford Agar και για την απομόνωση των coliforms χρησιμοποιήθηκε το VRB Agar.

Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Ο αριθμός στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 30 και 300.

### **3.2.2 Απομόνωση και χαρακτηρισμός αναπτυγμένων αποικιών**

Οι αποικίες που μακροσκοπικά διέφεραν μεταξύ τους στο ίδιο υπόστρωμα απομονώθηκαν ασηπτικά με κρίκο σε νέα τρυβλία με το ίδιο υπόστρωμα με στόχο τον διαχωρισμό/καθαρισμό τους. Απομονώθηκαν συνολικά 215 διαφορετικές αποικίες από τα υποστρώματα MRSA, M17 Agar και KF Streptococcus Agar και έγινε καταγραφή της μορφολογίας της καθεμιάς στο ανάλογο υπόστρωμα. Ακολούθησε μικροσκόπηση σε νωπή κατάσταση για την μελέτη της μορφολογίας και κινητικότητας της κάθε αποικίας.

### **3.2.3 Μελέτη της μορφολογίας σε νωπή κατάσταση**

Η τεχνική της νωπής κατάστασης από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Στο κέντρο αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετήθηκε μια μικρή σταγόνα νερού. Από την καλλιέργεια των βακτηρίων σε στερεό υπόστρωμα μεταφέρθηκε ασηπτικά με τον κρίκο μικρή ποσότητα αυτής, ομογενοποιήθηκε στην σταγόνα νερού και καλύφθηκε με την καλυπτρίδα. Τοποθετήθηκε μια σταγόνα κεδρελαίου στην καλυπτρίδα και το παρασκεύασμα εξετάστηκε στο μικροσκόπιο (ZEISS AXIO Lab.A1) χρησιμοποιώντας τον καταδυτικό φακό X 100.

### **3.2.3 Η δοκιμή της καταλάσης**

Σε όλες τις απομονωμένες αποικίες έγινε η δοκιμή της καταλάσης η οποία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Στο κέντρο αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετήθηκε μια σταγόνα 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Μεταφέρθηκε με τον κρίκο ένα μέρος της αποικίας του βακτηρίου και ομογενοποιήθηκε στην σταγόνα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Έκλυση φυσαλίδων θεωρήθηκε ότι το βακτήριο ήταν θετικό (παραγωγή O<sub>2</sub>), καμία παραγωγή φυσαλίδων θεωρήθηκε ότι το βακτήριο ήταν καταλάση αρνητικό.

### **3.2.4 Ανάπτυξη των στελεχών σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης**

Μεταφέρθηκε ασηπτικά μια καθαρή αποικία από τα 215 απομονωμένα στελέχη σε 9ml T-MRS ζωμό και επώαστηκε στους 37°C για 72h. Ποσότητα 100μl από τους παραπάνω ζωμούς ενοφθαλμίστηκε έπειτα εις διπλούν σε 9ml MRS ζωμό και οι δοκιμάστικοι σωλήνες επώαστηκαν τόσο στους 15°C για 72h όσο και στους 45°C για 24h. Μετά την επώαση 200μl από κάθε ζωμό μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες πλακέτες των 100 θέσεων και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 580nm με τη χρήση του Bioscreen C (Oy Groth Curves Ab Ltd., Helsingfors, Finland). Ανάλογα με την τιμή της οπτικής πυκνότητας τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως (+) για ελάχιστη ανάπτυξη (O.D. 0.2), (++) για μέτρια ανάπτυξη (O.D. 0.9), και (+++) για μέγιστη ανάπτυξη (O.D. 1.8).

### **3.2.5 Ανάπτυξη των στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος**

Για τη μελέτη της αλατοανεκτικότητας των στελεχών χρησιμοποιήθηκε απλός θρεπτικός ζωμός με συγκέντρωση 6, 8 και 10% (w/v) NaCl. Ποσότητα 100μl κάθε στελέχους ενοφθαλμίστηκε σε 9ml θρεπτικό ζωμό και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος και επώαστηκε στους 37°C για 72h. Μετά την επώαση 200μl από κάθε ζωμό μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες πλακέτες των 100 θέσεων και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 580nm με τη χρήση του Bioscreen C. Ανάλογα με την τιμή της οπτικής πυκνότητας τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως (+) για ελάχιστη ανάπτυξη (O.D. 0.2), (++) για μέτρια ανάπτυξη (O.D. 0.3) και (+++) για μέγιστη ανάπτυξη (O.D. 0.5).

### **3.2.5.1 Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης με διαφορετικούς υδατάνθρακες**

Από τα 215 απομονωμένα στελέχη έγινε τυχαία επιλογή 33 εξ αυτών που να καλύπτει όλο το φάσμα των δειγμάτων τυριών με σκοπό να μελετηθεί ο ρυθμός ανάπτυξής τους με την προσθήκη διαφορετικών υδατανθράκων.

Μεταφέρθηκαν 100μl από κάθε ένα από τα 33 στελέχη από ζωμό MRS (τα οποία επώαστηκαν για 48h στους 37°C) σε 9ml ζωμό T- MRS με 1% (w/v) διάλυμα GOS, L95, P95 και γλυκόζης και έγινε επώαση στους 37°C για 24h. Στη συνέχεια σε κάθε κυψελίδα της αποστειρωμένης πλακέτας μεταφέρθηκαν 30μl από κάθε καλλιέργεια και 270μl από δοκιμαστικό σωλήνα, που επώαστηκε για 24h στους 37°C, με τον T- MRS ζωμό και 1% (w/v) συγκέντρωση για κάθε έναν υδατάνθρακα. Μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων ανά μία ώρα για 24h στα 580nm. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία του θαλάμου των δειγμάτων παρέμενε σταθερή στους 37°C.

Κάθε πειραματική διαδικασία έγινε εις τριπλούν και για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων.

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τόσο ο ζωμός T- MRS όπως και ο ζωμός T-MRS (1/10 αραιώση με καθένα διαφορετικό υδατάνθρακα).

### **3.3 Στατιστική Ανάλυση**

Κάθε πειραματική διαδικασία έγινε εις τριπλούν και για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Ο αριθμός στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 30 και 300.

Οι μικροβιολογικές μετρήσεις μετατράπηκαν σε λογαρίθμους και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις.

Τα δεδομένα των μικροβιολογικών αναλύσεων αξιολογήθηκαν με Microsoft Office Excel για τον προσδιορισμό διαφορών σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού των τυριών

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών αναλύσεων διαφορετικών πληθυσμών βακτηρίων σε έξι διαφορετικά τυριά δίνονται στους Πίνακες 4 και 5.

**Πίνακας 4.** Μικροβιακός πληθυσμός τυριών. Μέσος όρος τριών επαναλήψεων (n=3), log cfu/g. APC – aerobic plate count/Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), LAB – presumptive lactic acid bacteria/γαλακτικά βακτήρια, LS – presumptive lactic streptococci/γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι, YM – yeasts and moulds/ζύμες και μύκητες

	APC	LAB	LS	YM
<b>Ανεβατό</b>	7.22±0.49	6.59±0.37	6.26±0.74	5.73±1.08
<b>Μπάτζος</b>	6.95±0.18	5.79±0.43	5.93±0.33	4.69±0.65
<b>Φέτα</b>	7.74±0.43	7.42±0.32	2.75±0.92	5.68±0.73
<b>Γαλοτύρι</b>	7.31±0.44	6.87±0.61	5.67±1.39	4.91±1.65
<b>Καλαθάκι Λήμνου</b>	7.05±0.82	6.34±0.52	5.87±0.73	5.35±0.36
<b>Κοπανιστή</b>	6.05±0.46	4.86±2.03	4.60±1.85	3.06±1.59

**Πίνακας 5.** Μη επιβεβαιωμένα παθογόνα βακτήρια και μικροοργανισμοί δείκτες που απομονώθηκαν από τα τυριά. Τα αριθμητικά στοιχεία δείχνουν τον αριθμό των δειγμάτων (n=3) στα οποία ανιχνεύθηκαν τα παθογόνα

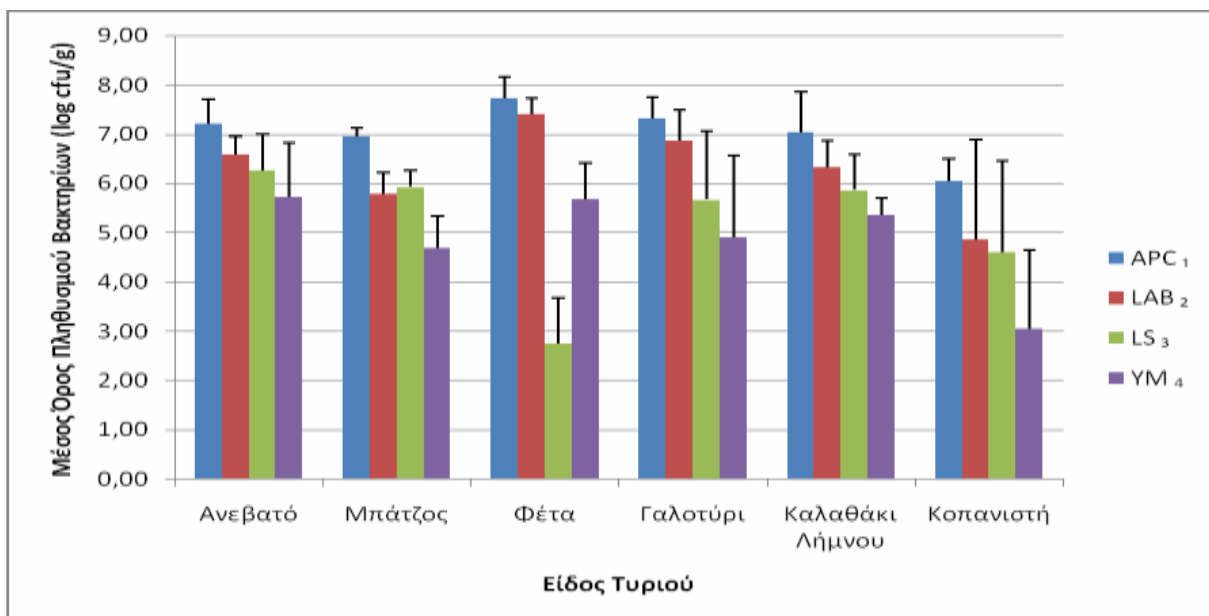
	Coliforms	<i>Listeria sp.</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Ανεβατό</b>	1	3	2
<b>Μπάτζος</b>	2	2	3
<b>Φέτα</b>	0	1	0
<b>Γαλοτύρι</b>	1	2	1
<b>Καλαθάκι Λήμνου</b>	0	2	1
<b>Κοπανιστή</b>	1	2	0



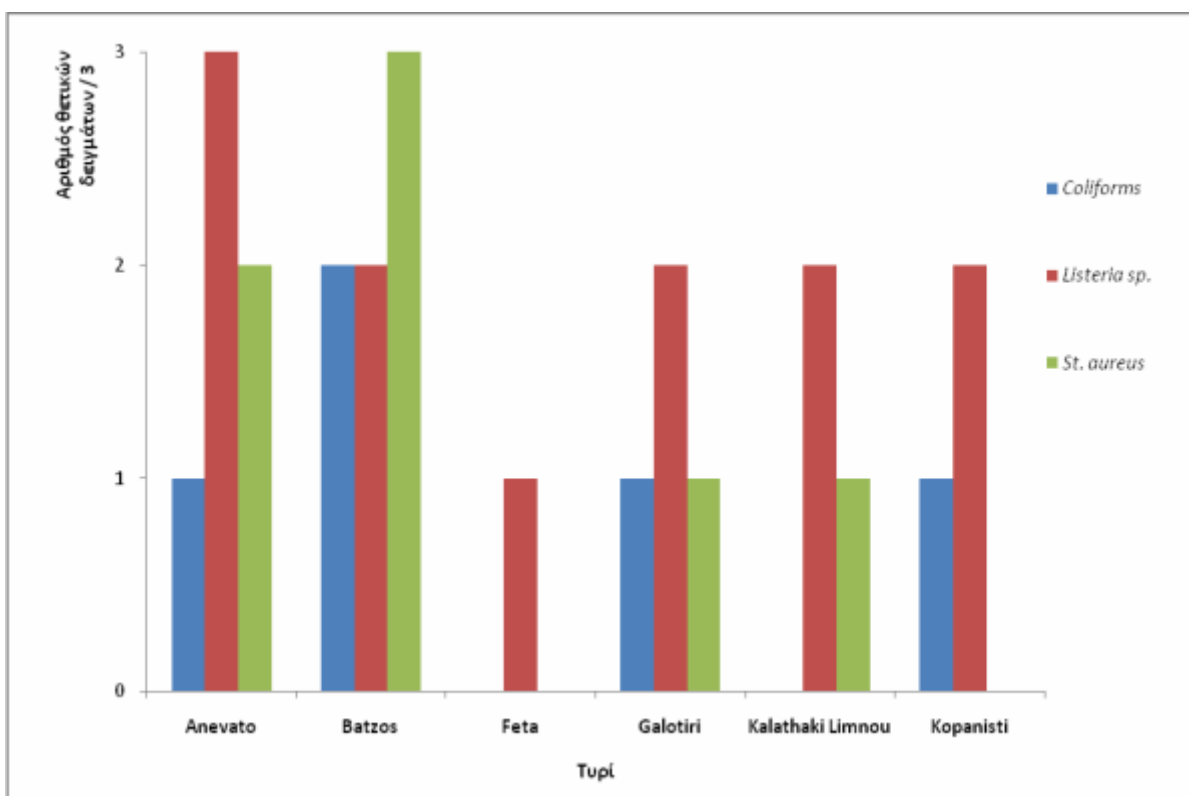
Η OMX των έξι τυριών (μέσος όρος 3 δειγμάτων) κυμάνθηκε από 6.0 έως 7.7 log cfu/g. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός OMX παρατηρήθηκε στη Φέτα ενώ ο μικρότερος στη Κοπανιστή, αλλά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ της OMX Κοπανιστής και Φέτας και Κοπανιστής με το Γαλοτύρι. Τα δύο τυριά με τη χαμηλότερη OMX, η Κοπανιστή και ο Μπάτζος, είχαν επιπλέον και τη μικρότερη αναλογία γαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με την OMX (6.5% και 7.1% αντίστοιχα). Όσον αφορά τα υπόλοιπα τυριά, η αναλογία των γαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε από 19.4% έως 47.4% σε σχέση με την OMX. Στα περισσότερα τυριά ο πληθυσμός των γαλακτικών στρεπτόκοκκων είχε μια διαφορά της τάξης των 1.2 log cfu/g σε σχέση με τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων (χαμηλότερος σε όλα τα τυριά εκτός από τον Μπάτζο όπου οι δυο πληθυσμοί ήταν σχεδόν ίδιοι). Εξαίρεση αποτέλεσε η Φέτα η οποία αν και είχε τον μεγαλύτερο πληθυσμό γαλακτικών βακτηρίων (7.4 log cfu/g), είχε τον μικρότερο πληθυσμό γαλακτικών στρεπτόκοκκων (2.8 log cfu/g) σε σχέση με τα υπόλοιπα τυριά. Γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι ανιχνεύθηκαν μόνο σε ένα από τα τρία δείγματα Φέτας. Η μεγαλύτερη διακύμανση μικροβιακών πληθυσμών, μεταξύ των τριών δειγμάτων που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκαν στην Κοπανιστή. Ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε από  $< 250$  cfu/g έως 6.9 log cfu/g, γαλακτικών στρεπτόκοκκων από 3.3 log cfu/g έως 6.5 log cfu/g και ζυμών και μυκήτων από 2.0 log cfu/g έως 5.2 log cfu/g.

Κολοβακτηρίδια (coliforms) ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον ένα δείγμα από όλα τα τυριά που εξετάστηκαν με εξαίρεση τη Φέτα και το Καλαθάκι Λήμνου, ύποπτη (μη επιβεβαιωμένη) *Listeria* sp. ανιχνεύτηκε σε τουλάχιστον ένα δείγμα σε όλα τα υπό μελέτη τυριά και ύποπτος (μη επιβεβαιωμένος) *St. aureus* σε τουλάχιστον ένα δείγμα από όλα τα τυριά με εξαίρεση τη Φέτα και την Κοπανιστή.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ) διαφορά των μετρούμενων μικροβιακών πληθυσμών για τα τυριά Ανεβατό, Γαλοτύρι, Κοπανιστή και Καλαθάκι Λήμνου. Σημαντικές ( $p > 0.05$ ) διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ της OMX σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, γαλακτικούς στρεπτόκοκκους και μύκητες-ζύμες στον Μπάτζο. Ενώ στη Φέτα σημαντικές ( $p > 0.05$ ) διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ της OMX σε σχέση με τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους και μύκητες-ζύμες και επιπλέον μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με τους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους και μύκητες-ζύμες και μεταξύ γαλακτικών στρεπτόκοκκων και μύκητες-ζύμες.



**Σχήμα 1.** Μέσος όρος (n=3) πληθυσμού βακτηρίων log cfu/g ανά είδος τυριού. APC<sub>1</sub>/OMX LAB<sub>2</sub>/γαλακτικά βακτήρια, LS<sub>3</sub>/γαλακτικοί στρεπτόκοκκοι, YM<sub>4</sub>/ζύμες-μύκητες



**Σχήμα 2.** Αριθμός θετικών δειγμάτων (n=3) σε κολοβακτηρίδια, ύποπτη (μη επιβεβαιωμένη) *Listeria sp.* και ύποπτος (μη επιβεβαιωμένος) *St. aureus* στα υπό εξέταση τυριά

## 4.2 Απομόνωση στελεχών σε εκλεκτικά υποστρώματα

Από τα 18 δείγματα των υπό εξέταση τυριών έγινε απομόνωση των διαφορετικών ανεπτυγμένων αποικιών (μακροσκοπικά) για τους λακτόκοκκους (M17 Agar), τους εντερόκοκκους (KF Agar) και τους λακτοβάκιλλους (MRS Agar). Έγιναν τουλάχιστον τρεις ανακαλλιέργειες όλων των απομονωμένων στελεχών στα αντίστοιχα εκλεκτικά υποστρώματα μέχρι να αποκτηθεί μία καθαρή καλλιέργεια. Για την μακροπρόθεσμη αποθήκευση των απομονωμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα φιαλίδια τύπου errendorf με 5% (w/v) αποστειρωμένου διαλύματος απιονισμένου νερού με γλυκερόλη όπου έγινε η διάχυση όλων των στελεχών και αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψύκτη στους -80°C. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε μακροσκοπικό και μικροσκοπικό έλεγχο. Επιπλέον, έγινε η δοκιμή της καταλάσης και μελετήθηκε η ανάπτυξή τους σε θερμοκρασίες 15°C και 45°C και σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 6, 8 και 10% (w/v) NaCl.

Από το εκλεκτικό υπόστρωμα M17 Agar απομονώθηκαν συνολικά 38 βακτηριακά στελέχη από 5 διαφορετικά είδη τυριών (Ανεβατό, Φέτα, Μπάτζος, Γαλοτύρι, Κοπανιστή). Από τα 38 απομονωμένα στελέχη, 14 είχαν την μορφολογία ραβδίων (5 κινητά/9 ακίνητα) και 24 ήταν ακίνητοι κόκκοι (Πίνακας 12 Παράρτημα).

Από το εκλεκτικό υπόστρωμα MRS Agar απομονώθηκαν συνολικά 127 βακτηριακά στελέχη από 6 διαφορετικά είδη τυριών (Ανεβατό Φέτα, Μπάτζος, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου, Κοπανιστή). Από τα 127 απομονωμένα στελέχη, 121 είχαν την μορφολογία ραβδίου (43 κινητά/80 ακίνητα) και 6 ήταν κόκκοι [(5 ακίνητοι/1 κινητός) (Πίνακας 13 Παράρτημα).

Από το εκλεκτικό υπόστρωμα KF Streptococcus Agar απομονώθηκαν συνολικά 50 βακτηριακά στελέχη από 5 διαφορετικά είδη τυριών (Ανεβατό, Μπάτζος, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου, Κοπανιστή). Από τα 50 απομονωμένα στελέχη, 22 είχαν την μορφολογία ραβδίου (5 κινητά/17 ακίνητα) και 16 ήταν ακίνητοι κόκκοι (Πίνακας 14 Παράρτημα).

Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν στα τρία εκλεκτικά υποστρώματα, M17 Agar, MRS Agar και KF Agar έδωσαν αρνητική αντίδραση στο ένζυμο καταλάση (απουσία του ενζύμου καταλάση).

Συνολικά από τα τρία εκλεκτικά υποστρώματα, MRS, M17 και KF Streptococcus Agar, απομονώθηκαν 215 βακτήρια. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από όλα τα εκλεκτικά υποστρώματα, τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. Μετά την επώαση μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των ζωμών στα 580nm. Όλα τα

στελέχη παρουσίασαν άριστη ανάπτυξη (O.D. 0.5) σε συγκέντρωση 6% NaCl (w/v), μέτρια ανάπτυξη (O.D. 0.3) σε συγκέντρωση 8% NaCl (w/v) και φτωχή ανάπτυξη (O.D. 0.2) σε συγκέντρωση 10% NaCl (w/v).

Όλα τα παραπάνω στελέχη ενοφθαλμίστηκαν σε MRS ζωμό και επώαστηκαν στους 15°C για 72h και στους 45°C για 24h. Μετά την επώαση μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των ζωμών στα 580nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 33,5% των στελεχών αναπτύχθηκε άριστα (O.D. 1.8), το 41,4% είχε μέτρια ανάπτυξη (O.D. 0.9) και το 25,1% αναπτύχθηκε ελάχιστα (O.D. 0.2) στους 15°C για 72h ενώ στους 45°C για 24h το 46,5% των στελεχών αναπτύχθηκε άριστα (O.D. 1.8), το 34,9% παρουσίασε μέτρια ανάπτυξη (O.D. 0.9) και το 18,6% είχε ελάχιστη ανάπτυξη (O.D. 0.2). Η αναλυτική παράθεση των παραπάνω αποτελεσμάτων δίνεται στους Πίνακες 12, 13 και 14 στο Παράρτημα.

Από τα 215 απομονωμένα στελέχη έγινε τυχαία επιλογή 33 στελεχών, απομονωμένα από διαφορετικά τυριά και με διαφορετική μορφολογία το καθένα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές. Η ταυτότητα των στελεχών αυτών καθώς και τα αποτελέσματα ανάπτυξής τους σε διαφορετικές συνθήκες δίνονται στον Πίνακα 6.

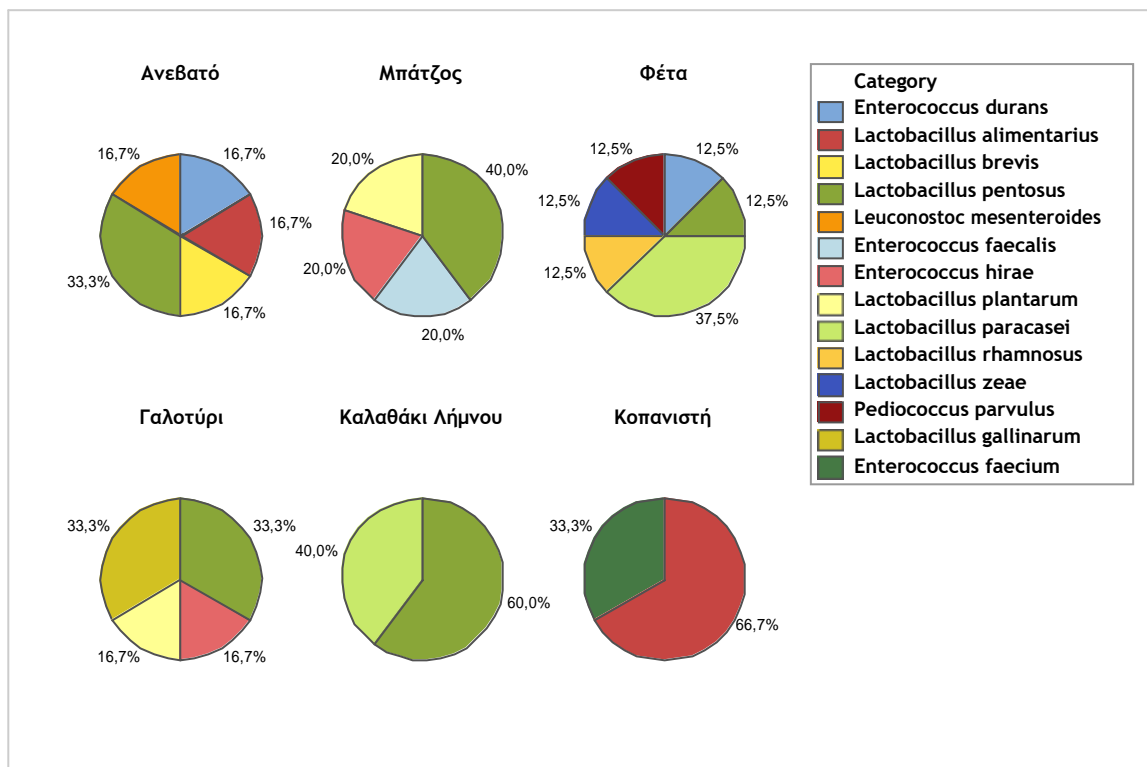
**Πίνακας 6.** Μοριακή ταυτοποίηση 33 στελεχών απομονομένων από τα υπό εξέταση τυριά και αποτελέσματα ανάπτυξής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις άλατος

ΤΥΠΙ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ	15/45 °C	6% (w/v) NaCl	8% (w/v) NaCl	10% (w/v) NaCl
Ανεβατό	MRS 6d	<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	+++/ +	+++	++	+
Ανεβατό	M17 6f	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	+++/ +	+++	++	+
Ανεβατό	M17 14	<i>Enterococcus</i>	<i>E. durans</i>	+++/ +	+++	++	+
Ανεβατό	MRS 14b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	+++/ +	+++	++	+
Ανεβατό	MRS 15a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>	+++/ +	+++	++	+
Ανεβατό	MRS 15b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	+++/ +	+++	++	+
Γαλοτύρι	MRS 9aiib	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	+++/ +++	+++	++	+
Γαλοτύρι	MRS 9b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. gallinarum</i>	+++/ +++	+++	++	+
Γαλοτύρι	MRS 9b2	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. gallinarum</i>	+++/ +++	+++	++	+
Γαλοτύρι	M17 17a1c	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	+++/ +	+++	++	+
Γαλοτύρι	KF 18c1a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	+++/ +	+++	++	+
Γαλοτύρι	M17 18aiia	<i>Enterococcus</i>	<i>E. hirae</i>	+++/ +++	+++	++	+
Καλαθάκι Λήμνου	MRS 3a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++/ +	+++	++	+

ΚαλαθάκιΛήμονου	MRS 3c1	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++++/ +	+++	++	+
ΚαλαθάκιΛήμονου	MRS 7bi	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++++/ +	+++	++	+
ΚαλαθάκιΛήμονου	MRS 7bii	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	++++/ +	+++	++	+
ΚαλαθάκιΛήμονου	MRS 16c	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	++++/ +	+++	++	+
Κοπανιστή	MRS 4a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	++++/ +	+++	++	+
Κοπανιστή	MRS 4b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	++++/ +	+++	++	+
Κοπανιστή	M17 19c1b	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	++++/ +++	+++	++	+
Μπάτζος	KF 2b1	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++++/ +	+++	++	+
Μπάτζος	KF 2c	<i>Enterococcus</i>	<i>E. hirae</i>	++++/ +++	+++	++	+
Μπάτζος	MRS 13d	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	++++/ +++	+++	++	+
Μπάτζος	MRS 12b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++++/ +	+++	++	+
Μπάτζος	MRS 12d	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	++/ ++	+++	++	+
Φέτα	MRS 5b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	++++/ +++	+++	++	+
Φέτα	MRS 5a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	++++/ +	+++	++	+
Φέτα	MRS 10a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. zaeae</i>	++++/ +++	+++	++	+
Φέτα	MRS 10a1	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	++++/ +	+++	++	+

Φέτα	M17 10a1a	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	++++/ +	+++	++	+
Φέτα	M17 10a3a	<i>Enterococcus</i>	<i>E. durans</i>	++++/ ++	+++	++	+
Φέτα	MRS 11d1a3b	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	++++/ +	+++	++	+
Φέτα	MRS 11aia	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped. parvulus</i>	++++/ +	+++	++	+

Όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από το τυρί Ανεβατό, παρουσίασαν άριστη ανάπτυξη στους 15°C σε σχέση με τους 45°C. Παρόμοια στο Γαλοτύρι, όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν παρουσίασαν άριστη ανάπτυξη τόσο στους 15°C όσο και στους 45°C, με εξαίρεση 2 στελέχη *Lb. pentosus* που έδειξαν ελάχιστη ανάπτυξη στους 45°C. Στο Καλαθάκι Λήμνου και τα πέντε στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. pentosus* και *Lb. paracasei* έδειξαν άριστη ανάπτυξη στους 15°C και ελάχιστη στους 45°C. Στην Κοπανιστή και τα 2 στελέχη *Lb. alimentarius* έδειξαν άριστη ανάπτυξη στους 15°C και ελάχιστη στους 45°C ενώ ο *E. faecium* αναπτύχθηκε άριστα και στις δυο θερμοκρασίες. Στον Μπάτζο τόσο ο *E. hirae* και *faecalis* όσο και ο *Lb. plantarum* αναπτύχθηκαν άριστα και στις δυο θερμοκρασίες ενώ ο *Lb. pentosus* αναπτύχθηκε άριστα στους 15°C και ελάχιστα στους 45°C. Στη Φέτα άριστη ανάπτυξη και στις δυο θερμοκρασίες παρατηρήθηκε στα στελέχη *Lb. rhamnosus* και *Lb. zeae*, άριστη ανάπτυξη στους 15°C αλλά μέτρια στους 45°C παρατηρήθηκε στον *E. durans* ενώ άριστη ανάπτυξη στους 15°C και ελάχιστη στους 45°C παρατηρήθηκε στα 2 στελέχη *Lb. paracasei*, στον *Lb. pentosus* και στον *Ped. parvulus*.



Σχήμα 3. Κατανομή των ταυτοποιημένων βακτηριών (%) ανά είδος τυριού



### 4.3 Επιλογή βέλτιστου υδατάνθρακα με βάση το συνδυασμό μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) και λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης

Υπολογίστηκε ο μέγιστος ρυθμός και η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης 30 στελεχών σε τέσσερις διαφορετικούς υδατάνθρακες (γλυκόζη και 3 πρεβιοτικά). Τρία στελέχη αποκλείστηκαν εξαιτίας της φτωχής ανάπτυξής τους στη γλυκόζη. Οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας προσαρμόστηκε αφαιρώντας την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του αποστειρωμένου ζωμού. Οι τιμές των μετρήσεων καταχωρήθηκαν σε γραφική παράσταση σε ημιλογαριθμική κλίμακα (φυσιολογική κλίμακα καταγραφής) σε σχέση με τον χρόνο. Έγινε επιλογή μιας περιόδου όπου παρατηρήθηκε μέγιστος εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης σε διάστημα δυο ωρών και έγινε εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης για την επιλεγμένη εκθετική περίοδο ανάπτυξης χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση.

$$\text{Growth rate} = \ln(\text{OD}_t/\text{OD}_0)/t$$

Όπου  $\text{OD}_t$  είναι η οπτική πυκνότητα στο τέλος της επιλεγμένης εκθετικής περιόδου ανάπτυξης,  $\text{OD}_0$  είναι η οπτική πυκνότητα στην αρχή της επιλεγμένης εκθετικής περιόδου ανάπτυξης και  $t$  είναι η διάρκεια σε ώρες της επιλεγμένης εκθετικής περιόδου ανάπτυξης.

Η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης εκτιμήθηκε από την καμπύλη ανάπτυξης στη πλησιέστερη ώρα. Καθώς είναι μια διακριτή μεταβλητή χωρίς διακύμανση σε πολλές περιπτώσεις, η στατιστική σημασία δεν μπορεί να προσδιοριστεί.

Σε όλες τις δοκιμές το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε σε  $P = 0.05$ .

**Πίνακας 7.** Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ( $h^{-1}$ ) – Περιγραφική Στατιστική (n=30) των τεσσάρων υδατανθράκων

	<b>Glu</b>	<b>L95</b>	<b>P95</b>	<b>GOS</b>
<b>Max</b>	1.579	1.210	1.704	1.641
<b>Min</b>	0.468	0.421	0.261	0.470
<b>Mean</b>	0.862	0.783	0.837	0.893
<b>Median</b>	0.916	0.776	0.872	0.920
<b>SIQR</b>	0.231	0.167	0.180	0.194
<b>Stdev</b>	0.282	0.208	0.277	0.250

**Πίνακας 8.** Λανθάνουσα φάση ανάπτυξης (h) – Περιγραφική Στατιστική (n=30) των τεσσάρων υδατανθράκων

	<b>Glu</b>	<b>L95</b>	<b>P95</b>	<b>GOS</b>
<b>Max</b>	7.000	5.000	8.000	5.000
<b>Min</b>	2.000	2.333	1.000	2.000
<b>Mean</b>	4.067	4.022	3.900	3.567
<b>Median</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>SIQR</b>	1.000	0.958	0.500	0.500
<b>Stdev</b>	1.015	0.835	1.155	0.898

**Πίνακας 9.** Σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη (n=30)

	<b>L95</b>	<b>P95</b>	<b>GOS</b>
<b>No significant difference to glucose</b>	12	15	16
<b>Significantly lower than glucose</b>	12	10	4
<b>Significantly higher than glucose</b>	6	5	10

Ο μέσος (n=3 επαναλήψεις) μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης των 30 στελεχών στη γλυκόζη κυμάνθηκε από 0.47 h<sup>-1</sup> ως 1.58 h<sup>-1</sup>, με μέση τιμή (n=30 στελέχη) την 0.86 h<sup>-1</sup>. Ο μέσος μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης στο L95, P95 και GOS ήταν 0.78, 0.84 και 0.89 αντίστοιχα και δε διέφερε σημαντικά σε σχέση με τη γλυκόζη (paired T-test). Όταν τα στελέχη μελετήθηκαν μεμονομένα και οι ρυθμοί ανάπτυξής τους συγκρίθηκαν με αυτόν της γλυκόζης, 12 και 10 στελέχη που αναπτύχθηκαν σε L95 και P95 αντίστοιχα, είχαν ρυθμό ανάπτυξης μικρότερο σε σχέση με αυτόν σε γλυκόζη. Μόνο 4 στελέχη είχαν σημαντικά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης στο GOS από ότι στη γλυκόζη ενώ 10 στελέχη είχαν σημαντικά μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης στο GOS. Για 20 στελέχη ο ρυθμός ανάπτυξης στο GOS ήταν είτε μη σημαντικά διαφορετικός σε σχέση με το L95 ή το P95 ή σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με ένα από τα δυο.

Η μέση λανθάνουσα φάση ανάπτυξης των στελεχών που αναπτύχθηκαν στη γλυκόζη ήταν 4.1 h, και κυμάνθηκε από 2.0 ως 7.0 h.

Η μέση λανθάνουσα φάση ανάπτυξης για το L95 και P95 αντίστοιχα ήταν 4.0 και 3.9 h, και δεν διέφερε σημαντικά από τη μέση λανθάνουσα φάση ανάπτυξης που παρατηρήθηκε στη γλυκόζη. Η μέση λανθάνουσα φάση ανάπτυξης των 3.6 h που παρατηρήθηκε στα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο GOS ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή των στελεχών που αναπτύχθηκαν στη γλυκόζη.

Από τα πειράματικά δεδομένα επιλογής βέλτιστου υδατάνθρακα εξάγεται το συμπέρασμα ότι το GOS ήταν το πιο αποτελεσματικό πρεβιοτικό για τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη που απομονώθηκαν από τα τυριά όταν έγινε συλλογική εκτίμηση, καθώς επέδειξε την καλύτερη

απόδοση για τον μεγαλύτερο αριθμό στελεχών και στο ρυθμό ανάπτυξης και στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, η τελική επιλογή του κατάλληλου πρεβιοτικού για να χρησιμοποιηθεί ως συνβιοτικό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επιλεγμένο βακτηριακό στέλεχος.

**Πίνακας 10.** Σύγκριση του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (n=3) των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη (\*0=καμία σημαντική διαφορά P>0.05; 1=πρεβιοτικό σημαντικά μικρότερο από την Glu; 2= πρεβιοτικό σημαντικά μεγαλύτερο από την Glu)

	Μέσος				Τυπική απόκλιση				T-Test σε σχέση με Glu			Σημαντικό σε P =0.05*		
	Glu	L95	P95	GOS	Glu	L95	P95	GOS	L95	P95	GOS	L95	P95	GOS
<b>KF 18c1a</b>	1.169	1.005	1.035	1.122	0.031	0.015	0.016	0.130	0.0012	0.0028	0.5723	1	1	0
<b>KF 19c1b</b>	1.009	0.612	1.007	1.223	0.011	0.009	0.032	0.058	0.0000	0.9203	0.0033	1	0	2
<b>KF 2bi</b>	0.554	0.577	0.910	0.809	0.028	0.022	0.012	0.039	0.3282	0.0000	0.0008	0	2	2
<b>KF 2c</b>	0.480	0.781	1.004	0.694	0.002	0.038	0.051	0.034	0.0002	0.0001	0.0004	2	2	2
<b>M17 10a3a</b>	0.907	0.680	1.036	1.030	0.044	0.005	0.112	0.011	0.0009	0.1380	0.0092	1	0	2
<b>M17 10aia</b>	0.924	0.554	0.791	0.806	0.082	0.311	0.026	0.022	0.1173	0.0541	0.0722	0	0	0
<b>M17 12d</b>	0.641	0.783	0.644	0.642	0.005	0.042	0.012	0.015	0.0043	0.6925	0.8651	2	0	0
<b>M17 14</b>	1.014	0.990	1.037	0.824	0.040	0.024	0.020	0.022	0.4207	0.4339	0.0020	0	0	1
<b>M17 17a1c</b>	0.687	0.632	0.683	0.647	0.018	0.026	0.010	0.009	0.0383	0.7672	0.0267	1	0	1
<b>M17 18aia</b>	0.490	0.752	1.004	0.694	0.021	0.028	0.051	0.034	0.0002	0.0001	0.0009	2	2	2
<b>M17 6f</b>	1.106	1.029	0.787	1.641	0.048	0.027	0.017	0.014	0.0721	0.0004	0.0001	0	1	2
<b>MRS 10a</b>	0.556	0.770	0.755	0.926	0.013	0.002	0.038	0.019	0.0000	0.0011	0.0000	2	2	2
<b>MRS 10a1</b>	0.552	0.525	0.546	0.654	0.023	0.016	0.001	0.006	0.1598	0.6485	0.0017	0	0	2
<b>MRS 11aia</b>	1.000	1.210	1.144	1.088	0.088	0.010	0.024	0.003	0.0151	0.0531	0.1598	2	0	0
<b>MRS 11d1a3b</b>	0.567	0.829	0.585	0.567	0.018	0.066	0.005	0.032	0.0027	0.1787	0.9987	2	0	0
<b>MRS 12b</b>	1.045	0.923	0.906	0.973	0.073	0.059	0.025	0.009	0.0875	0.0357	0.1670	0	1	0
<b>MRS 13d</b>	0.697	0.506	0.598	0.657	0.076	0.021	0.036	0.037	0.0140	0.1144	0.4652	1	0	0
<b>MRS 14b</b>	1.144	1.038	1.006	1.086	0.062	0.017	0.080	0.047	0.0453	0.0778	0.2680	1	0	0
<b>MRS 15a</b>	1.013	0.771	0.889	0.974	0.046	0.064	0.003	0.033	0.0060	0.0093	0.2973	1	1	0
<b>MRS 15b</b>	1.020	0.607	0.657	1.045	0.021	0.001	0.015	0.038	0.0000	0.0000	0.3801	1	1	0
<b>MRS 16c</b>	0.468	0.421	0.378	0.470	0.003	0.005	0.017	0.007	0.0001	0.0008	0.7593	1	1	0
<b>MRS 3a</b>	1.117	0.878	0.752	0.720	0.061	0.017	0.009	0.005	0.0027	0.0005	0.0003	1	1	1
<b>MRS 3c1</b>	1.188	1.058	1.024	1.058	0.032	0.102	0.030	0.102	0.1025	0.0029	0.1025	0	1	0
<b>MRS 4a</b>	1.165	1.135	1.105	1.146	0.013	0.062	0.105	0.088	0.4578	0.3822	0.7271	0	0	0
<b>MRS 5a</b>	0.552	0.525	0.532	0.654	0.023	0.016	0.016	0.006	0.1598	0.2730	0.0017	0	0	2
<b>MRS 5b</b>	1.036	0.948	1.704	0.925	0.084	0.054	0.153	0.020	0.1999	0.0027	0.0908	0	2	0
<b>MRS 6d</b>	1.579	0.876	0.901	1.184	0.060	0.073	0.024	0.018	0.0002	0.0001	0.0004	1	1	1
<b>MRS 7bi</b>	0.894	0.826	0.856	0.914	0.059	0.039	0.016	0.033	0.1692	0.3343	0.6357	0	0	0
<b>MRS 7bii</b>	0.618	0.582	0.581	0.968	0.016	0.009	0.034	0.030	0.0300	0.1684	0.0001	1	0	2
<b>MRS 9aiib</b>	0.652	0.674	0.261	0.636	0.002	0.021	0.012	0.037	0.1544	0.0000	0.4845	0	1	0

**Πίνακας 11.** Σύγκριση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης (μέσοι όροι n=3, hours) των μεμονομένων στελεχών σε πρεβιοτικά σε σχέση με τη γλυκόζη

	<b>Glu</b>	<b>L95</b>	<b>P95</b>	<b>GOS</b>
<b>KF 18c1a</b>	3.000	3.333	3.000	3.000
<b>KF 19c1b</b>	3.000	3.000	3.000	3.000
<b>KF 2bi</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>KF 2c</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>M17 10a3a</b>	4.000	5.000	4.000	4.000
<b>M17 10aia</b>	2.000	2.333	8.000	3.000
<b>M17 12d</b>	5.000	5.000	5.000	5.000
<b>M17 14</b>	5.000	3.000	3.000	3.000
<b>M17 17a1c</b>	5.000	3.000	4.000	3.000
<b>M17 18aiia</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>M17 6f</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>MRS 10a</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>MRS 10a1</b>	5.000	5.000	3.000	2.000
<b>MRS 11aia</b>	3.000	3.000	3.000	3.000
<b>MRS 11d1a3b</b>	5.000	5.000	5.000	5.000
<b>MRS 12b</b>	3.000	3.000	3.000	4.000
<b>MRS 13d</b>	7.000	5.000	5.000	4.000
<b>MRS 14b</b>	3.000	3.000	3.000	3.000
<b>MRS 15a</b>	3.000	5.000	3.000	4.000
<b>MRS 15b</b>	3.000	5.000	3.000	3.000
<b>MRS 16c</b>	5.000	5.000	5.000	5.000
<b>MRS 3a</b>	4.000	4.000	4.000	2.000
<b>MRS 3c1</b>	4.000	4.000	1.000	4.000
<b>MRS 4a</b>	3.000	4.000	4.000	4.000
<b>MRS 5a</b>	5.000	5.000	5.000	2.000
<b>MRS 5b</b>	4.000	4.000	4.000	2.000
<b>MRS 6d</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>MRS 7bi</b>	5.000	5.000	4.000	5.000
<b>MRS 7bii</b>	4.000	4.000	4.000	4.000
<b>MRS 9aiib</b>	5.000	3.000	4.000	3.000

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ελληνικά μαλακά τυριά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το Ανεβατό, Γαλοτύρι, Μπάτζος, Καλαθάκι Λήμνου, Κοπανιστή και Φέτα. Κάθε τυρί μελετήθηκε εις τριπλούν για τις ανάγκες επαναληψιμότητας και στατιστικής ανάλυσης. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που μελετήθηκαν ήταν: Ολική μεσόφιλη χλωρίδα, γαλακτικά βακτήρια, λακτόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, κολοβακτηρίδια, *Listeria* spp., *S. aureus*, ζύμες και μύκητες.

Ο μεγαλύτερος πληθυσμός OMX παρατηρήθηκε στη Φέτα ενώ ο μικρότερος στη Κοπανιστή, αλλά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ της OMX Κοπανιστής και Φέτας και Κοπανιστής με το Γαλοτύρι. Οι Tzanetakis, Litopoulou-Tzanetaki and Manolkidis, (1987) μελέτησαν τους μικροβιακούς πληθυσμούς σε 50 δείγματα Κοπανιστής του εμπορίου και βρήκαν ότι οι λακτοβακίλλοι ήταν  $>10^5$  cfu/g σε 86% των τυριών, οι ζύμες-μύκητες ήταν  $>10^3$  cfu/g σε 78% των τυριών, και τα κολοβακτηρίδια δεν ανιχνεύθηκαν σε 60% των δειγμάτων ενώ οι *Lb. plantarum* και *Lb. casei* ήταν τα πιο επικρατέστερα είδη λακτοβακίλλων. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε μεγάλη διακύμανση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των 3 δειγμάτων που αναλύθηκαν. Η OMX κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα ενώ ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων ήταν μικρότερος σε σχέση με την παραπάνω μελέτη και παρόλο που δεν έγινε ταυτοποίηση του είδους των επικρατέστερων λακτοβακίλλων ο *Lb. alimentarius* και *E. faecium* ήταν τα είδη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη στην Κοπανιστή.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στον Μπάτζο στην παρούσα μελέτη ήταν μικρότεροι σε σύγκριση με αυτούς που παρατηρήθηκαν από τους Litopoulou-Tzanetaki and Tzanetakis, (2011) με εξαίρεση τον πληθυσμό των ζυμών που ήταν μεγαλύτερος. Οι παραπάνω συγγραφείς απομόνωσαν επίσης *Lb. pentosus* και *Lb. paraplantarum* (*Lb. plantarum* στην παρούσα μελέτη) καθώς και *E. faecalis* ενώ στη παρούσα μελέτη απομονώθηκε επιπλέον και *E. hirae*.

Στη Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ο πληθυσμός των μεσόφιλων λακτόκοκκων και εντερόκοκκων μειώνεται (Manolopoulou *et al.*, 2003), όπως παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Οι Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki (1992) βρήκαν ότι ο *Lb. plantarum* ήταν το επικρατέστερο είδος στη Φέτα (50% των NSLAB πληθυσμού) καθώς και οι *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* και *Lb. brevis* απομονώθηκαν επίσης συχνά. Επιπλέον οι εντερόκοκκοι και οι πεδιόκοκκοι ανήκουν επίσης στα επικρατέστερα είδη στη Φέτα σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς. Τα βακτήρια που

απομονώθηκαν από τη Φέτα από τυχαία επιλεγμένες αποικίες στη παρούσα μελέτη περιλαμβάνουν 3 στελέχη *Lb. paracasei* και από ένα στέλεχος *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. zeae* καθώς και από ένα στέλεχος *E. durans* και *Ped. parvulus*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μετά από ένα μήνα ωρίμανσης οι εντερόκοκκοι, Enterobacteriaceae, coliforms, ζύμες και Gram αρνητικά βακτήρια μειώνονται ενώ οι λακτοβάκιλλοι αυξάνονται (Vassiliadis *et al.*, 2009) και μετά από 2 μήνες τα Enterobacteriaceae και coliforms δεν ανιχνεύονται στη Φέτα που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Σε έρευνα των Bintsis *et al.*, (2000), αναφέρθηκε ότι η επικρατούσα μικροβιοχλωρίδα στην άλμη της φέτας ήταν οι επιπρόσθετες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων (NSLAB) και συγκεκριμένα τα είδη *Lb. paracasei ssp. paracasei* και *Lb. plantarum*. Κατά την προσθήκη της Φέτας στην άλμη μεταφέρονται οξυγαλακτικά βακτήρια όπως οι *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* και ζύμες, τα οποία βρίσκονται στην άλμη.

Στο Ανεβατό, τις πρώτες 15 μέρες επικρατούν οι λακτόκοκκοι στους 4°C ενώ μετά από 1 και 2 μήνες ωρίμανσης επικρατούν οι λακτοβάκιλλοι. Τα είδη του γένους *Leuconostoc* ενώ εμφανίζονται σε χαμηλά επίπεδα στην αρχή, εμφανίζονται πιο συχνά μετά το αλάτισμα με τον *Ln. paramesenteroides* και τον *Lb. plantarum* να είναι τα πιο συχνά απομονωμένα είδη (Xanthopoulos *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο Ανεβατό δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ του μικροβιακού πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων και των γαλακτικών στρεπτόκοκκων και απομονώθηκαν από τα δείγματα τόσο ο *Ln. mesenteroides* όσο και ο *E. durans* καθώς και 2 στελέχη του *Lb. pentosus*, και από ένα του *Lb. brevis* και του *Lb. alimentarius*.

Στο γαλοτύρι επικρατούν τα γαλακτικά βακτήρια και ο πληθυσμός τους κυμαίνεται σε 8.0 log<sub>10</sub> cfu/g ενώ ανεπιθύμητα βακτήρια όπως *pseudomonas*, *enterobacteria* και παθογόνοι *staphylococci* βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα (<2.0 log<sub>10</sub> cfu/g). Ζύμες έχουν επίσης καταμετρηθεί σε υψηλά επίπεδα (10<sup>4</sup> cfu/g), όπως και στη παρούσα μελέτη και αποτελούν τον κύριο παράγοντα αλλοίωσης του προϊόντος ενώ έχει επίσης ανιχνευτεί σε δείγματα και *L. monocytogenes*, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα ανησυχίας για την ασφάλεια του τυριού (Samelis and Kakouri, 2007). Από το γαλοτύρι απομονώθηκαν από 2 στελέχη ο *Lb. pentosus* και ο *Lb. gallinarum* αντίστοιχα και από ένα στέλεχος ο *Lb. plantarum* και ο *E. hiraе*.

Το Καλαθάκι Λήμνου παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως η Φέτα με τη διαφορά ότι η στράγγιση γίνεται σε στρογγυλά καλάθια και γίνεται και επιφανειακό αλάτισμα. Τα είδη των



βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Καλαθάκι Λήμνου ήταν παρόμοια με αυτά της Φέτας, με 3 απομονωμένα στελέχη *Lb. pentosus* και 2 στελέχη *Lb. paracasei*.

Ως εναρκτήριες καλλιέργειες στη παρασκευή τυριών χρησιμοποιούνται τα βακτήρια των γενών *Lactococcus*, *Leuconostoc* και κάποιοι *Lactobacilli*. Στις μη εναρκτήριες καλλιέργειες βακτηρίων ανήκουν τα βακτήρια των γενών *Enterococcus*, *Pediococcus* και κάποιοι *Lactobacilli* (Beresford and Williams, 2004). Οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες γαλακτοβακίλλων αποτελούν την πλειονότητα των μη εναρκτήριων γαλακτικών βακτηρίων. Στην παρούσα εργασία τα 215 βακτήρια που απομονώθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 15°C και 45°C.

Οι περισσότεροι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται και στους 15°C και στους 45°C καθώς και σε συγκέντρωση 6.5 % NaCl (w/v), αλλά αρκετές φορές εξαρτάται από το είδος καθώς και από το μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξή τους. Ο *Lb. plantarum* σύμφωνα με τους Adesulu-Dahunsi *et al.*, (2017) αναπτύσσεται και στους 15°C και στους 45°C καθώς και σε συγκέντρωση 6.5 % NaCl (w/v) ενώ σύμφωνα με Πίνακα που παρατίθεται από τον Cogan, (1999) δεν αναπτύσσεται στους 45°C. Οι λακτόκοκκοι και το *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* δεν αναπτύσσονται στους 45°C ενώ οι λακτόκοκκοι δεν μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε συγκέντρωση 6.5 % NaCl (w/v) (Demarigny, 2014) ενώ το *Leuconostoc* αναπτύσσεται σε 7 % NaCl (w/v) (Adams & Moss, 2008). Οι εντερόκοκκοι είναι θερμοάντοχοι και αναπτύσσονται τόσο στους 15°C όσο και στους 45°C και αναπτύσσονται σε 6.5 % NaCl (w/v) (Cogan, 1999). Τα περισσότερα είδη του γένους *Pediococcus* αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις 4-5% NaCl (w/v), αλλά μόνο οι *Ped. acidilactici* και *Ped. pentosaceus* μπορούν να ανεχθούν συγκέντρωση 10% NaCl (w/v). Οι *Ped. acidilactici*, *Ped. ethanolidurans*, *Ped. siamensis* και *Ped. stilesii* μπορούν να αναπτυχθούν στους 45°C καθώς και ορισμένα στελέχη του *Ped. pentosaceus* ενώ όλα τα υπόλοιπα είδη δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτή τη θερμοκρασία. Ο *Ped. parvulus* αναπτύσσεται και σε συγκέντρωση μέχρι 8% NaCl (w/v) (Franz *et al.*, 2014). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

30 από τα ταυτοποιημένα βακτήρια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε τρεις εμπορικά διαθέσιμους υδατάνθρακες. Εξετάστηκαν οι ολιγοσακχαρίτες GOS και FOS (L95 και P95). Το GOS ήταν το πιο αποτελεσματικό προβιοτικό για τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη που απομονώθηκαν από τα τυριά όταν έγινε συλλογική εκτίμηση, καθώς επέδειξε την καλύτερη απόδοση για τον μεγαλύτερο αριθμό στελεχών και στο ρυθμό ανάπτυξης και στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, η

τελική επιλογή του κατάλληλου πρεβιοτικού για να χρησιμοποιηθεί ως συνβιοτικό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επιλεγμένο βακτηριακό στέλεχος.

Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών *E. hirae* (KF 2c και M1718a<sub>iii</sub>) και *Lb. zeae* (MRS 10 a) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε L95, P95 και GOS σε σχέση με τη γλυκόζη ενώ ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών *E. faecium* (M17 19c1b) και *Lb. paracasei* (MRS 5a MRS 7b<sub>ii</sub>) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε GOS σε σχέση με τη γλυκόζη.

Αντίστοιχα, ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών του *Lb. rhamnosus* (MRS 5b) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε P95 σε σχέση με τη γλυκόζη ενώ του *Lb. pentosus* (KF 2b<sub>i</sub>) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε P95 και GOS σε σχέση με τη γλυκόζη.

Οι περισσότεροι λακτοβάκιλλοι ζυμώνουν και το GOS και το FOS αλλά εξαρτάται από το είδος του λακτοβακίλλου. Σχεδόν όλα τα στελέχη του γένους *Enterococcus* μπορούν να μεταβολίσουν την μανόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και λακτόζη. Το GOS προκάλεσε ανάπτυξη γαλακτικών στελεχών και πιο συγκεκριμένα τους *Lb. gasseri* και *Lb. salivarius* καθώς και εντεροκόκκων (Maathuis *et al.*, 2012).

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams Martin R. and Moss Maurice O. (2008) *Food Microbiology*. Available at: [http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Food Microbiology.pdf](http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Food%20Microbiology.pdf) (Accessed: 22 May 2018).
- Adesulu-Dahunsi, A. T. *et al.* (2017) ‘Genetic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains from some indigenous fermented foods in Nigeria’, *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 82, pp. 199–206. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.055.
- Ayad, E. H. E. *et al.* (2002) ‘Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins’, *International Dairy Journal*, 12(2–3), pp. 145–150. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00133-9.
- Azcarate-Peril, M. A. *et al.* (2017) ‘Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(3), pp. E367–E375. doi: 10.1073/pnas.1606722113.
- Beresford, T. and Williams, A. (2004) *The Microbiology of Cheese Ripening, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/S1874-558X(04)80071-X.
- Bernardeau, M. *et al.* (2008) ‘Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus’, *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), pp. 278–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015.
- Bintsis, T. *et al.* (2000) ‘Microbiology of brines used to mature feta cheese’, *International Journal of Dairy Technology*, 53(3), pp. 106–112. doi: 10.1111/j.1471-0307.2000.tb02671.x.
- Birkett, A. M. and Francis, C. C. (2010) *Short-Chain Fructo-Oligosaccharide- A Low Molecular Weight Fructan, Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients- Health Benefits and Food Applications*. doi: 10.1007/978-0-387-79058-9.
- Brennan, N. M. *et al.* (2004) ‘Bacterial surface-ripened cheeses’, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2(C), pp. 199–225. doi: 10.1016/S1874-558X(04)80045-9.
- Briggiler-Marcó, M. *et al.* (2007) ‘Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses’, *Journal*

*of Dairy Science*, 90(10), pp. 4532–4542. doi: 10.3168/jds.2007-0180.

Callon, C., Millet, L. and Montel, M. C. (2004) ‘Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese’, *Journal of Dairy Research*, 71(2), pp. 231–244. doi: 10.1017/S0022029904000159.

Cogan, T. M. (1999) ‘STARTER CULTURES/Cultures Employed in Cheese- making’, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 2100–2108. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1520>.

Crittenden, R. G. and Playne, M. J. (1996) ‘Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides’, *Trends in Food Science and Technology*, 7(11), pp. 353–361. doi: 10.1016/S0924-2244(96)10038-8.

Demarigny, Y. (2014) ‘Lactococcus: Lactococcus lactis Subspecies lactis and cremoris’, in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, pp. 442–446. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00182-8.

Farkye, N. Y. (1999) ‘CHEESE/ Microbiology of Cheese- making and Maturation’, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 381–387. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0300>.

Felis, G. E. *et al.* (2001) ‘Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the Lactobacillus casei group’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), pp. 2113–2117. doi: 10.1099/ijs.0.63333-0.

Fisher, K. and Phillips, C. (2009) ‘The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus’, *Microbiology*, pp. 1749–1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0.

Fox, P. F. (2004) *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. Elsevier. Available at: [https://books.google.es/books?id=a95C5Nza5\\_EC&pg=PA602&lpg=PA602&dq=what+is+the+difference+between+non+starter+LAB+and+wild+flora&source=bl&ots=diVBfRi7UA&sig=18uUw6Uk\\_Kd-CLVakPxHjTBJ-iI&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiO9vnO7YfbAhWDQBQKHWErDNIQ6AEIJzAA#v=onepage&q=what is the difference between non starter LAB and wild flora&f=false](https://books.google.es/books?id=a95C5Nza5_EC&pg=PA602&lpg=PA602&dq=what+is+the+difference+between+non+starter+LAB+and+wild+flora&source=bl&ots=diVBfRi7UA&sig=18uUw6Uk_Kd-CLVakPxHjTBJ-iI&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiO9vnO7YfbAhWDQBQKHWErDNIQ6AEIJzAA#v=onepage&q=what is the difference between non starter LAB and wild flora&f=false) (Accessed: 15 May 2018).

Franz, C. M. A. P. *et al.* (2014) ‘The genus *Pediococcus*’. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118655252.ch21> (Accessed: 22 May

2018).

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995) 'Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.', *The Journal of nutrition*, 125(6), pp. 1401–1412. doi: 10.1079/NRR200479.

Giraffa, G. (2003) 'Functionality of enterococci in dairy products', in *International Journal of Food Microbiology*, pp. 215–222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1.

Harvey, J., Gilmour, A. (1999) 'Staphylococcus aureus', in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier GmbH., pp. 2066–2017. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1495>.

Hatzikamari, M. and Tzanetakis, N. (1999) 'hatzikamari Microbiological characteristics of Anevato a traditional Greek cheese', pp. 595–601.

Hemme, D. and Foucaud-Scheunemann, C. (2004) 'Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods', *International Dairy Journal*, 14, pp. 467–494. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.10.005.

Hynes, E. *et al.* (2002) 'The influence of starter and adjunct lactobacilli culture on the ripening of washed curd cheeses', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Associação Brasileira de Engenharia Química, 19(4), pp. 397–402. doi: 10.1590/S0104-66322002000400007.

Kalyani Nair, K., Kharb, S. and Thompkinson, D. K. (2010) 'Inulin dietary fiber with functional and health attributes - a review', *Food Reviews International*, 26(2), pp. 189–203. doi: 10.1080/87559121003590664.

Kim, D. W. *et al.* (2011) 'Draft Genome Sequence of *Lactobacillus zeae* KCTC 3804', *Journal of Bacteriology*, 193(18), p. 5023. doi: 10.1128/JB.05602-11.

Lebreton, F., Willems, R. J. L. and Gilmore, M. S. (2014) *Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization, Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649513> (Accessed: 22 May 2018).

Likotrafiti, E. *et al.* (2014) 'An invitro study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota', *Anaerobe*, 27. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.03.009.

- Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. (2011) 'Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses', *Small Ruminant Research*. Elsevier B.V., 101(1–3), pp. 17–32. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.022.
- Maathuis, A. J. H. *et al.* (2012) 'Galacto-Oligosaccharides Have Prebiotic Activity in a Dynamic In Vitro Colon Model Using a <sup>13</sup>C-Labeling Technique', *The Journal of Nutrition*. Oxford University Press, 142(7), pp. 1205–1212. doi: 10.3945/jn.111.157420.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. and Macfarlane, S. (2008) 'Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics', *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), pp. 305–344. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x.
- Manolopoulou, E. *et al.* (2003) 'Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening', *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), pp. 153–161. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00258-1.
- Manolopoulou, E. *et al.* (no date) 'Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening'. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S0168160502002581/1-s2.0-S0168160502002581-main.pdf?\\_tid=feb09c45-7209-4f55-abef-e14167fe852a&acdnat=1525876784\\_6ae7268d822d13d874894e5fd0f8e5e3](https://ac.els-cdn.com/S0168160502002581/1-s2.0-S0168160502002581-main.pdf?_tid=feb09c45-7209-4f55-abef-e14167fe852a&acdnat=1525876784_6ae7268d822d13d874894e5fd0f8e5e3) (Accessed: 9 May 2018).
- Martin, S. E, Fisher, C. W. (1999) 'Listeria monocytogenes', in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 1228–1238. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0965>.
- Martin, Scott E., Iandolo, J. J. (1999) 'STAPHYLOCOCCUS', in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 2062–2065. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1490>.
- Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) *Food Microbiology*. Available at: [http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Food Microbiology.pdf](http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Food%20Microbiology.pdf) (Accessed: 22 May 2018).
- Moatsou, G. and Govaris, A. (2011) 'White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants milk in Greece', *Small Ruminant Research*, 101(1–3), pp. 113–121. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.031.
- Montel, M. C. *et al.* (2014) 'Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 177, pp. 136–154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- Nichol, A. W. (1999) 'Mould- ripened Varieties', in *Encyclopedia of Food Microbiology*.

- Elsevier Ltd, pp. 387–393. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0305>.
- Ogier, J.-C. *et al.* (2002) ‘Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis’, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), pp. 3691–3701. doi: 10.1128/AEM.68.8.3691.
- Ogier, J.-C. and Serror, P. (2008) ‘Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus’. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017.
- Ozer, B. H. (1999a) ‘CHEESE/ Microflora of White- brined Cheeses’, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, pp. 397–403. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0315>.
- Ozer, B. H. (1999b) ‘MILK AND MILK PRODUCTS/ Microbiology of Liquid Milk’, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 1436–1441.
- Pandey, A. Vinod, J. K., Nigam P. Soccol, C. R. (1999) ‘ENTEROBACTERIACEAE, COLIFORMS AND E. COLI’, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 604–610. doi: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0510>.
- Pieniz, S. *et al.* (2014) ‘Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus durans strain LAB18s’, *Food Control*. Elsevier Ltd, 37(1), pp. 251–256. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.055.
- Psoni, L., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2003) ‘Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat’s milk’, *Food Microbiology*, 20(5), pp. 575–582. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00153-3.
- Sabater-Molina, M. *et al.* (2009) ‘Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health’, *Journal of Physiology and Biochemistry*. Springer Netherlands, 65(3), pp. 315–328. doi: 10.1007/BF03180584.
- Salvetti, E., Torriani, S. and Felis, G. E. (2012) ‘The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update’, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Springer-Verlag, 4(4), pp. 217–226. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8.
- Samelis, J. and Kakouri, A. (2007) ‘Microbial and safety qualities of PDO galotyri cheese manufactured at the industrial or artisan scale in Epirus, Greece’, *Italian Journal of Food Science*, pp. 81–90.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2002) ‘Effect of Enterococcus

faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese', *International Journal of Food Microbiology*, 76(1–2), pp. 93–105. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00021-1.

Tetra Pak processing systems (2003) 'Dairy processing handbook'.

Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992) 'Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, Two Greek Cheeses from Ewes' Milk', *Journal of Dairy Science*, 75(6), pp. 1389–1393. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77891-6.

Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Manolkidis, K. (1987) 'Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese', *Food Microbiology*, 4, pp. 251–256. Available at: [https://ac.els-cdn.com/0740002087900074/1-s2.0-0740002087900074-main.pdf?\\_tid=792ccdb7-b02e-4329-a648-3f907ddce444&acdnat=1526313762\\_7ae638db2bed414906bf819fbe66f0a1](https://ac.els-cdn.com/0740002087900074/1-s2.0-0740002087900074-main.pdf?_tid=792ccdb7-b02e-4329-a648-3f907ddce444&acdnat=1526313762_7ae638db2bed414906bf819fbe66f0a1) (Accessed: 14 May 2018).

Vassiliadis, A. *et al.* (2009) 'Changes in microbial populations, kinds of lactic acid bacteria and biochemical characteristics of Greek traditional feta cheese during ripening', *International Journal of Dairy Technology*, 62(1), pp. 39–47. doi: 10.1111/j.1471-0307.2008.00453.x.

Vázquez-Velázquez, R. *et al.* (2018) 'Use of starter culture of native lactic acid bacteria for producing an artisanal Mexican cheese safe and sensory acceptable', *CyTA - Journal of Food*. Taylor & Francis, 16(1), pp. 460–468. doi: 10.1080/19476337.2017.1420694.

Xanthopoulos, V. *et al.* (2000) 'Characteristics of Anevato Cheese made from Raw or Heat-treated Goat Milk Inoculated with a Lactic Starter', *LWT - Food Science and Technology*, 33(7), pp. 483–488. doi: 10.1006/fstl.2000.0699.

Zhong, Z. *et al.* (2017) 'Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*', *Microbiological Research*. Elsevier GmbH., 196, pp. 95–105. doi: 10.1016/j.micres.2016.12.009.

Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων Ε.Ε. L148/1996, [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/L148\\_1996.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/L148_1996.pdf), (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).



E.E C186/2012, [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=uriserv:OJ.C\\_.2012.186.01.0011.01.ELL&toc=OJ:C:2012:186:TOC](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=uriserv:OJ.C_.2012.186.01.0011.01.ELL&toc=OJ:C:2012:186:TOC) (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

Ελληνική Στατιστική Αρχή <http://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/> (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

Κανονισμός (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20ής Μαρτίου 2006 για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων, <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/510/2008-05-29/ell/pdf> (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 83, Έκδοση 3, Απρίλιος 2014, <http://www.gcsf.gr/media/trofima/83-iss3.pdf> (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

ΦΕΚ 16/14.01.94, [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek16\\_1994.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek16_1994.pdf), (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

ΦΕΚ 24/18.01.94, [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek24\\_1994.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek24_1994.pdf), (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

ΦΕΚ 25/18.01.94, [http://w2.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek25\\_1994.pdf](http://w2.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/POP-PGE/fek25_1994.pdf) <http://www.minagric.gr>, (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

ΦΕΚ 8/11.01.94, <http://www.thessaly.gov.gr/data/arepo/gr/%CE%A6%CE%95%CE%9A%208%2011.01.1994%20CE%A5%CF%80%CE%BF%CF%85%CF%81%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%91%CF%80%CF%8C%CF%86%CE%B1%CF%83%CE%B7%20%CE%A0%CF%81%CE%BF%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CF%8E%CE%BD%20%CE%A6%CE%95%CE%A4%CE%91%CE%A3.pdf>, (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

<https://www.ingredientsnetwork.com/orafti-p95-prod645466.html>, (Τελευταία είσοδος 09/05/2018).

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 12.** Απομόνωση και χαρακτηρισμός 38 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα M17 Agar από Ανεβατό, Φέτα, Μπάτζο, Γαλοτύρι και Κοπανιστή

Κωδικός	Δείγμα τυριού	Περιγραφή αποικίας	Μορφολογία	Κινητικότητα	Δοκιμή καταλάση	Ανάπτυξη 15°C	Ανάπτυξη 45°C	6% (w/v) NaCl	8% (w/v) NaCl	10% (w/v) NaCl
6d	Ανεβατό, Γρεβενά	Πολύ μικρή υπόλευκη	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	++	+++	++	+
6e	Ανεβατό, Γρεβενά	Μεγάλη υπόλευκη γυαλιστερή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
6f	Ανεβατό Γρεβενά	Μεγάλη υπόλευκη γυαλιστερή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
10a1	Φέτα-Δωδώνη	Μικρή πρασινογκρί	Μονοί κόκκοι, δίκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
10a1a	Φέτα-Δωδώνη	Μεσαία λευκή	Λεπτά, μεσαίου μεγέθους ραβδία σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
10a2	Φέτα-Δωδώνη	Μεσαία πρασινογκρί	Μεγάλοι μονοί κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
10a2b	Φέτα-Δωδώνη	Μεγάλη λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους σε αλυσίδες των δύο και 2>	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+

10a3a	Φέτα- Δωδώνη	Μεσαία λευκή	Κόκκοι σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	++	+++	++	+
10a3b	Φέτα- Δωδώνη	Μεγάλη λευκή	Λεπτά ραβδία, κυρτά, μεμονωμένα και σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12a1	Μπάτζος- Βερμίου	Μεσαία υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία (μοιάζουν με δίκοκκους)	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12a1b	Μπάτζος- Βερμίου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία (μοιάζουν με δίκοκκους, τετράκοκκους)	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12a3	Μπάτζος- Βερμίου	Μεσαία γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε 2 (μοιάζουν με κόκκους)	Κινητά	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12b	Μπάτζος- Βερμίου	Μικρή υπόλευκη	Κόκκοι, μικροί/μεμονωμ ένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12b1	Μπάτζος- Βερμίου	Μεσαία λευκή	Κόκκοι, μεμονωμένοι και σε αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12c	Μπάτζος-	Μεγάλη	Κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

	Βερμίου	λευκή	μεμονωμένοι							
12d	Μπάτζος-Βερμίου	Μεσαία γκρι	Μονόκοκκοι, δίκοκκοι, τετράκοκκοι, σε αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
14	Ανεβατό	Μεγάλη λευκή με ροζ κορυφή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
16a	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη υπόλευκη	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
16b	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
17a1	Γαλοτύρι	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία (μοιάζουν μονόκοκκους/δίκοκκους)	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
17a1a	Γαλοτύρι	Μεσαία υπόλευκη	Μικρά ραβδία/συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
17a1c	Γαλοτύρι	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία μεμονωμένα και σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
17a2	Γαλοτύρι	Μεσαία υπόλευκη	Κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

17a2c	Γαλοτύρι	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία σε αλυσίδες των δύο/συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
17a3	Γαλοτύρι	Μεσαία γκρι	Κόκκοι μεμονωμένοι, σε ζεύγη και αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
18a	Γαλοτύρι	Μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
18aiia	Γαλοτύρι	Μεσαία γκρι	Δίκοκκοι, σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
18aiib	Γαλοτύρι	Μικρή υπόλευκη	Δίκοκκοι και τετράκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
19a	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
19b	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Μεγάλοι κόκκοι, μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
19c	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή γυαλιστερή	Μονοί κόκκοι σε αλυσίδες (μοιάζουν με δίκοκκους)	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
19c1a	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Δίκοκκοι, τετράκοκκοι και μεγαλύτερες αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

19c1b	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή γκρι	Κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
19c2a	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή υπόλευκη	Κόκκοι σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
19c2b	Κοπανιστή-Σύρος	Μεσαία λευκή	Ραβδία μικρά, παχιά, μεμονωμένα και σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
19c2c	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Δίκοκκοι, τετράκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
19c3	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Δίκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
19c3c	Κοπανιστή-Σύρος	Μικρή λευκή	Δίκοκκοι, τετράκοκκοι και αλυσίδες μεγαλύτερες των τεσσάρων	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

**Πίνακας 13.** Απομόνωση και χαρακτηρισμός 127 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα MRS Agar από Ανεβατό, Φέτα, Μπάτζο, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου και Κοπανιστή

Κωδικός	Δείγμα τυριού	Περιγραφή αποικίας	Μορφολογία	Κινητικότητα	Δοκιμή καταλάση	Ανάπτυξη 15°C	Ανάπτυξη 45°C	6% (w/v) NaCl	8% (w/v) NaCl	10% (w/v) NaCl
2a	Μπάτζος-Βέροια	Μικρές λευκές	Μικρά ραβδία σε ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
2ai	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαίες υποκίτρινες	Μικρά ραβδία μονά/ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
2aii	Μπάτζος-Βέροια		Μικρά ραβδία μονά	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
2b	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαίες λευκές	Μικρά ραβδία μονά/ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
2bi	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαίες λευκές	Μικρά ραβδία σε μικρές/μεγάλες αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
2bii	Μπάτζος-Βέροια	Μικρές λευκές	Μικρά ραβδία μονά/ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
2biii	Μπάτζος-Βέροια	Μεγάλες υποκίτρινες	Μικρά ραβδία μονά/ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
2d	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και >2	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+

2e	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή γκρι	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
2f	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία υπόλευκη	Μεσαίου μεγέθους ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
2g	Μπάτζος-Βέροια	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2 έως 5 και μεγαλύτερες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
2h	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία υπόλευκη	Μεσαίου μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματα	Κινητά	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
3a	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλες λευκές γαλακτερές	Πολύ μικρά ραβδία μονά/ζεύγη	Κινητά	Αρνητικό	++	+	+++	++	+
3b	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 2 και <4	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
3c	Καλαθάκι	Μεσαίες	Ραβδία σε 2 και	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+



	Λήμνου	γκρίζες θαμπές	μεγαλύτερες αλυσίδες							
3c1	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη υπόλευκη γυαλιστερή	Μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
3d	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία υπόλευκη	Μικρά ραβδία μεμονωμένα	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
3e	Καλαθάκι Λήμνου	Πολύ μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
3f	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2 και <5	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
3g	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη λευκή	Πολύ μικρά ραβδία μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 3 και >5	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
3m	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη λευκή	Μικρά ραβδία σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
4a	Κοπανιστή-	Μικρές	Ραβδία μεσαίου μεγέθους,	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+

	Τήνος	υπόλευκες	χοντρά σε αλυσίδες 2,3,4 και πιο μακριές							
4b	Κοπανιστή-Τήνος	Μεσαίες λευκές	Ραβδία μεγάλα λεπτά σε μεγάλες αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
4c	Κοπανιστή-Τήνος	Μικρές λευκές	Ραβδία μεγάλα λεπτά σε μεγάλες αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
4d	Κοπανιστή-Τήνος	Μικρές υπόλευκες γαλακτερές	Μικρά κοντόχρονα ραβδία σε δυάδες-τετράδες	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
5a	Φέτα-Όλυμπος	Μεσαία λευκή	Μεσαιού μεγέθους, παχιά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
5b	Φέτα-Όλυμπος	Μικρές λευκές	Ραβδία σε μεγάλες λεπτές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
5c	Φέτα-Όλυμπος	Μεσαία υπόλευκη	Μεσαιού μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+

5e	Φέτα-Όλυμπος	Μικρή υπόλευκη	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία σε αλυσίδες των 6	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
5f	Φέτα-Όλυμπος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
5h	Φέτα-Όλυμπος	Μεσαία υποκίτρινη	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 3, 4, 5 και μεγαλύτερες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
5k	Φέτα-Όλυμπος	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
5m	Φέτα-Όλυμπος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
6a	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρές λευκές	Ραβδία μεσαίου μεγέθους μονά/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
6b	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρές λευκές	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες 4-6, >	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+

6d	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρές υπόλευκες	Μεσαίου μεγέθους κόκκοι, σε αλυσίδες	Κινητοί	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
6e	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρές υπόλευκες	Ραβδία μεσαίου μεγέθους σε μεγάλες αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
7a	Καλαθάκι Λήμνου-Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2,3,4 και >	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
7bi	Καλαθάκι Λήμνου-Νταμπίζας	Μεσαίες υποκίτρινες	Ραβδία σε αλυσίδες κάνουν συσσωματώματα	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
7bii	Καλαθάκι Λήμνου-Νταμπίζας	Μικρές λευκές γυαλιστερές	Ραβδία μεσαίου μεγέθους σε πολύ μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
7biii	Καλαθάκι Λήμνου-Νταμπίζας	Μεσαίες λευκές	Ραβδία μεσαίου μεγέθους σε πολύ μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
7c	Καλαθάκι Λήμνου-Νταμπίζας	Πολύ μικρές υπόλευκες	Ραβδία σε τετράεδρα και συσσωματώματα περισσότερων των 8	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+

7d	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως 5	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
7e	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 και > 4	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
7f	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεγάλη λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
7h	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεγάλη λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 2, 3, 4	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
7k	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Μεσαιού μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
7m	Καλαθάκι Λήμνου- Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
9ai	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεσαιές λευκές	Ραβδία μικρά σε δυάδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

9aii	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεσαίες λευκές γυαλιστερές	Κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9aiia	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεγάλη υποκίτρινη με ροζ κορυφή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους, μεμονωμένα /αλυσίδες- συσσωματώματ α	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9aiib	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεγάλη λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους μεμονωμένα/ αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9aiic	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεγάλη λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9b	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μικρές ροζ αραχνοειδεί ς	Ραβδία	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9b1	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεσαία υπόλευκη	Λεπτά μεγάλα ραβδία σε τεράστιες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
9b2	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεγάλη υπόλευκη	Ραβδία λεπτά, μακριά, σηματίζουν τεράστιες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

9f	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεσαία λευκή	Πολύ μεγάλα ραβδία	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
9g	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
10a	Φέτα- Δωδώνη	Μεσαία λευκή	Ραβδία, κοντά, παχιά, σε αλυσίδες από 4 έως και πάνω από 30	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
10a1	Φέτα- Δωδώνη	Μεσαία λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους, σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
10a2	Φέτα- Δωδώνη	Μεγάλη λευκή	Μικρά ραβδία σε αλυσίδες των δύο, τριών, τεσσάρων και >	Κινητά	Αρνητικό	+++	++	+++	++	+
11aia	Φέτα- Χελμός	Μεσαία λευκή	Κόκκοι, δίδρα, τρίεδρα, τετράεδρα	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
11aiaib	Φέτα- Χελμός	Μεσαία υπόλευκη	Ραβδία μεσαίου μεγέθους, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
11b	Φέτα- Χελμός	Μεσαία λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους σε διπλή/τριπλή	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

		γυαλιστερή	αλυσίδα							
11c	Φέτα-Χελμός	Μεσαία υπόλευκη	Ραβδία μεσαίου μεγέθους, διπλά κα σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
11dia	Φέτα-Χελμός	Μεσαία λευκή γαλακτερή	Κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
11d1a2a	Φέτα-Χελμός	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους, παχιά ραβδία σε συσσωματώματα/μεμονωμένα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	++	+++	++	+
11d1a2b	Φέτα-Χελμός	Μεγάλη λευκή	Μικρά παχιά ραβδία μεμονωμένα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	++	+++	++	+
11d1a3b	Φέτα-Χελμός	Μεγάλη λευκή	Μικρά ραβδία κυρτά, μεμονωμένα και σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
12a	Μπάτζος-Βερμίου	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 2, 3, 4 και >	Κινητά	Αρνητικό	+	+++	+++	++	+
12b	Μπάτζος-Βερμίου	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+



12c	Μπάτζος-Βερμίου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2, 3, 4 και >	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
12d	Μπάτζος-Βερμίου	Μεσαία γκρι	Πολύ μεγάλοι κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
12e	Μπάτζος-Βερμίου	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε μικρές αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12f	Μπάτζος-Βερμίου	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες από 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
12g	Μπάτζος-Βερμίου	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
12h	Μπάτζος-Βερμίου	Μικρή λευκή	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία σε αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
13a	Μπάτζος-Γρεβενών	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13b	Μπάτζος-Γρεβενών	Μεσαία υποκίτρινη	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλ	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+

			υσίδες							
13d	Μπάτζος-Γρεβενών	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες των 2 και > των 5	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
13e	Μπάτζος-Γρεβενών	Πολύ μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13f	Μπάτζος-Γρεβενών	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους πολύ λεπτά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
13g	Μπάτζος-Γρεβενών	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες των 2, 3	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13h	Μπάτζος-Γρεβενών	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
14a	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρή λευκή	Ραβδία μακρόστενα, λεπτά, μονά/αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
14b	Ανεβατό-	Μεγάλη	Ραβδία, μεσαίου μεγέθους,	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+

	Γρεβενά	λευκή	μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες							
14c	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
14d	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
14e	Ανεβατό-Γρεβενά	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
14g	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή υπόλευκη	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε μικρές αλυσίδες των 2, 3	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
14h	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
14k	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
14p	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 6	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

			και >							
14v	Ανεβατό-Γρεβενά	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
15a	Ανεβατό-Τύρναβος	Μεγάλη λευκή γυαλιστερή	Ραβδία, λεπτά, μεμονωμένα/αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
15b	Ανεβατό-Τύρναβος	Μεγάλη υπόλευκη	Ραβδία, λεπτά, 2 ή περισσότερα σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
15e	Ανεβατό-Τύρναβος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
15f	Ανεβατό-Τύρναβος	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
15h	Ανεβατό-Τύρναβος	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία μεμονωμένα/αλυσίδες των 2 έως και > των 5	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
15k	Ανεβατό-Τύρναβος	Μεγάλη λευκή	Μικρά ραβδία σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

			α							
15m	Ανεβατό- Τύρναβος	Μικρή υποκίτρινη	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως και > των 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
15p	Ανεβατό- Τύρναβος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
15q	Ανεβατό- Τύρναβος	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
15v	Ανεβατό- Τύρναβος	Μεγάλη λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
16a	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία λευκή	Μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
16c	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή λευκή	Ραβδία μεσαίου μεγέθους	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
16d	Καλαθάκι Λήμνου	Μεγάλη λευκή	Ραβδία μικρά, παχιά σε αλυσίδες 2, 3, 4	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
16e	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, σε αλυσίδες των 2, 3, 4 και 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+

16f	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία υπόλευκη	Μεσαίου μεγέθους ραβδία σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
16g	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία σε μεγάλες αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
16h	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
16k	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία υπόλευκη	Μεσαίου μεγέθους ραβδία σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
16m	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία μεμονωμένα/αλ υσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
16v	Καλαθάκι Λήμνου	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες των 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
17a	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμενα/αλ υσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

			έως και μεγαλύτερες των 5							
17b	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία/αλυσίδες των 2 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
17c	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία, μεμονωμένα/αλ υσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
17d	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μικρή λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία σε συσσωματώματ α	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
17f	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
17g	Γαλοτύρι- Μέτσοβο	Μεσαία λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία, σε αλυσίδες των 2 έως και > των 6	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
18bii	Γαλοτύρι	Μεσαία υποκίτρινη	Ραβδία μικρού μεγέθους σε διπλές αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+

18c	Γαλοτύρι	Μεγάλη λευκή	Ραβδία μικρά σε διπλή αλυσίδα	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
18d	Γαλοτύρι	Μεσαία υπόλευκη γυαλιστερή	Ραβδία λεπτά, μεσαίου μεγέθους σε αλυσίδα	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
19aii	Κοπανιστ-Σύρος	Μικρή λευκή	Ραβδία μικρά σε δυο ή > αλυσίδα	Κινητά	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
19aiii	Κοπανιστ-Σύρος	Μικρή υπόλευκη	Ραβδία μικρά σε δυο ή > αλυσίδα	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
19b	Κοπανιστή-Σύρος	Μεγάλη υπόλευκη γυαλιστερή	Ραβδία μεγάλα σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
19c	Κοπανιστή-Σύρος	Μεσαία υποκίτρινη	Μεγάλα λεπτά ραβδία σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+



**Πίνακας 14.** Απομόνωση και χαρακτηρισμός 50 στελεχών από το εκλεκτικό υπόστρωμα KF Agar από Ανεβατό, Μπάτζο, Γαλοτύρι, Καλαθάκι Λήμνου και Κοπανιστή

Κωδικός	Δείγμα τυριού	Περιγραφή αποικίας	Μορφολογία	Κινητικότητα	Δοκιμή καταλάση	Ανάπτυξη 15°C	Ανάπτυξη 45°C	6% (w/v) NaCl	8% (w/v) NaCl	10% (w/v) NaCl
2a	Μπάτζος-Βέροια	Μικρές λευκές	Μεσαίου μεγέθους ραβδία/αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2a1	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία πρασινογκρί	Δίκοκκοι, τρίκοκκοι, τετράκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2a2	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία πρασινογκρί	Μονόκοκκοι, δίκκοκοι σε αλυσίδες	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2a3	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία πρασινογκρι	Δίκκοκοι σε αλυσίδες των τριών/τεσσάρων	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2b	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή γκρι	Κόκκοι μεμονωμένοι (4κοκκοι)	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
2b1	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία γκρι	Λεπτά, μακριά ραβδία σε αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
2b2	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή γκρι	Μονόκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2c	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή λευκή	Δίκκοκοι, τετράκοκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
2d	Μπάτζος-Βέροια	Πολύ μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως και > των 4	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+

2e	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2 έως 7	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
2f	Μπάτζος-Βέροια	Μικρή γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
2g	Μπάτζος-Βέροια	Μεσαία γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες των 2	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
3a	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
3b	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή γκρι	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
3c	Καλαθάκι Λήμνου	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα κα σε αλυσίδες των 2, 3, 4, 5	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
7a	Καλαθάκι Λήμνου Νταμπίζας	Μεσαία λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι και σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
7b	Καλαθάκι Λήμνου, Νταμπίζας	Μικρή γκρι	Μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 2 έως και > των 4	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
7c	Καλαθάκι Λήμνου, Νταμπίζας	Μικρή γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 3 έως 5	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
7d	Καλαθάκι Λήμνου,	Μεσαία γκρι	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

	Νταμπίζας		αλυσίδες των 2 έως 7							
7e	Καλαθάκι Λήμνου, Νταμπίζας	Μεσαία γκρι	Μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
8a	Κοπανιστή- Μύκονος	Μικρή λευκή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
8b	Κοπανιστή- Μύκονος	Μεσαία λευκή	Μικρά, λεπτά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
9a	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Πολύ μικρή λευκή	Μεμονωμένοι κόκκοι και σε συσσωματώματα	Κινητοί	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9b	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
9c	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
9d	Γαλοτύρι- Ήπειρος	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12a	Μπάτζος- Βέρμιο	Πολύ μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι και σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
12b	Μπάτζος- Βέρμιο	Μικρή γκρι	Κόκκοι μεμονωμένοι και σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12c	Μπάτζος- Βέρμιο	Μεσαία λευκή	Μεμονωμένοι κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+

12d	Μπάτζος-Βέρμιο	Μικρή γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12e	Μπάτζος-Βέρμιο	Μεσαία γκρι	Πολύ μικρά ραβδία σε συσσωματώματα	Ακίνητα	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
12f	Μπάτζος-Βέρμιο	Μικρή γκρι	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
12g	Μπάτζος-Βέρμιο	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13a	Μπάτζος-Γρεβενά	Μεσαία γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες των 2 έως 6	Κινητά	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13b	Μπάτζος-Γρεβενά	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
13c	Μπάτζος-Γρεβενά	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
14a	Ανεβατό-Γρεβενά	Πολύ μικρή λευκή	Μεσαίου μεγέθους, λεπτά ραβδία, σε αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
14b	Ανεβατό-Γρεβενά	Μικρή υπόλευκη	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	+	+++	++	+
15a	Ανεβατό-Τύρναβος	Μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι και σε συσσωματώματα	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
15b	Ανεβατό-Τύρναβος	Μικρή γκρι	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+

			αλυσίδες των 2, 3							
15c	Ανεβατό- Τύρναβος	Μεσαία λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα/μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	+	++	+++	++	+
15d	Ανεβατό- Τύρναβος	Μικρή υπόλευκη	Μικρά, λεπτά ραβδία σε μικρές αλυσίδες	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
15e	Ανεβατό- Τύρναβος	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία, μεμονωμένα και σε αλυσίδες των 2, 3	Ακίνητα	Αρνητικό	++	++	+++	++	+
17a	Γαλοτύρι- Καδοτύρι	Μικρή λευκή	Πολύ μικρά ραβδία σε αλυσίδες των 4	Ακίνητα	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
17b	Γαλοτύρι- Καδοτύρι	Μεσαία λευκή	Μεμονωμένοι κόκκοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
18c1a	Γαλοτύρι	Μεγάλη λευκή	Μικρά ραβδία, μεμονωμένα/αλυσίδες	Κινητά	Αρνητικό	+++	+	+++	++	+
18c1b	Γαλοτύρι	Μικρή λευκή	Κόκκοι, μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	++	+++	+++	++	+
18c2a	Γαλοτύρι	Μεγάλη λευκή	Μεσαίου μεγέθους ραβδία μεμονωμένα/αλυσίδες των δύο, τριών και τεσσάρων	Κινητά	Αρνητικό	+++	+++	+++	++	+
19a	Κοπανιστή	Μεσαία λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	++	++	+
19b	Κοπανιστή	Μικρή λευκή	Κόκκοι μεμονωμένοι	Ακίνητοι	Αρνητικό	+++	+++	++	++	+