

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ**  
**ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ**  
**ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

---

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΩΝ**  
**ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ**  
**ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΤΟΥ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ Δ. ΑΓΓΕΛΙΚΗ**  
Βιοχημικός – Βιοτεχνολόγος

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2015**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΩΝ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ  
ΤΟΥ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ Δ. ΑΓΓΕΛΙΚΗ**  
Βιοχημικός – Βιοτεχνολόγος

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ**  
**Δ. Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και**  
**Γήρανσης, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**  
**Ε. Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ**

*Στους γονείς μου, αρωγούς σε κάθε βήμα της ζωής μου.*

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	<b>6</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Γενικά χαρακτηριστικά και στάδια παρασκευής του τυριού Φέτα</b> .....	<b>9</b>
1.1. Προετοιμασία γάλακτος τυροκόμησης .....	10
1.2. Προσθήκη CaCl <sub>2</sub> .....	11
1.3. Προσθήκη καλλιεργείων .....	11
1.4. Προσθήκη πυτιάς και πήξη του γάλακτος .....	12
1.5. Διαίρεση και ανάπαυση του τυροπήγματος .....	12
1.6. Εξαγωγή και στράγγιση του τυροπήγματος .....	12
1.7. Αλάτισμα .....	14
1.8. Ωρίμανση .....	15
<b>2. Οξυγαλακτικά βακτήρια</b> .....	<b>15</b>
2.1. Γενικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	16
2.2. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	17
2.3. Εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	18
2.4. Μεταβολισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων .....	19
<b>3. Προπιονικά βακτήρια</b> .....	<b>22</b>
3.1. Ταξινόμηση των προπιονικών βακτηρίων .....	24
3.2. Γενοτυπικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Propionibacterium</i> .....	24
3.3. Οικολογία προπιονικών βακτηρίων .....	26
3.4. Παράγοντες ασφάλειας .....	26
3.5. Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των προπιονικών βακτηρίων .....	26
3.7. Ρόλος στην ανάπτυξη αρώματος στο τυρί .....	30
<b>4. Απόπτωση</b> .....	<b>32</b>
4.1. Μορφολογικές αλλαγές στην απόπτωση .....	32
4.2. Βιοχημικές αλλαγές στην απόπτωση .....	33
4.3. Αποπτωτικά μονοπάτια .....	33
4.4. Καρκίνος του παχέος εντέρου και απόπτωση .....	36
4.5. Προπιονικά βακτήρια και καρκίνος .....	38
<b>5. Σκοπός της μελέτης</b> .....	<b>40</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>41</b>
<b>1. Μικροοργανισμοί</b> .....	<b>41</b>
<b>2. Κυτταρική σειρά</b> .....	<b>41</b>
<b>3. Επιλογή στελέχους προπιονικού βακτηρίου για τις τυροκομήσεις</b> .....	<b>42</b>
<b>4. Επιλογή θρεπτικού υλικού για την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών</b> .....	<b>42</b>
<b>5. Προσομοίωση συμπεριφοράς στελεχών στο γάλα</b> .....	<b>42</b>

6.	Τυροκομήσεις .....	43
7.	Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	44
8.	Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	45
8.1	Χημική σύσταση του γάλακτος.....	45
8.2	Προσδιορισμός του pH.....	45
8.3	Προσδιορισμός της υγρασίας των τυριών .....	45
8.4	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC.....	46
9.	Οργανοληπτικός έλεγχος.....	46
10.	Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών στα κύτταρα HT-29 .....	47
10.1	Προετοιμασία των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών για πειράματα με την κυτταρική σειρά HT29 47	
10.2	Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη (τρυψινοποίηση) .....	47
10.3	Μέτρηση αριθμού κυττάρων με κυτταρομετρητή Coulter Counter.....	48
10.4	Προσδιορισμός της βιωσιμότητας .....	49
10.5	Ωσμωμοριακότητα.....	50
10.6	Χρώση DAPI για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων .....	50
11.	Στατιστική ανάλυση .....	51
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>52</b>
1.	Επιλογή στελέχους προπιονικού βακτηρίου για τις τυροκομήσεις .....	52
2.	Επιλογή θρεπτικού υλικού για την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών.....	52
3.	Προσομοίωση συμπεριφοράς στελεχών στο γάλα .....	52
4.	Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	54
5.	Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	62
5.1	Χημική σύσταση του γάλακτος.....	62
5.2	Μεταβολή του pH.....	63
5.3	Υγρασία.....	63
5.4	HPLC .....	64
6.	Οργανοληπτικός έλεγχος.....	71
7.	Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών στη βιωσιμότητα των κυττάρων HT-29.....	76
8.	Προσδιορισμός ωσμωμοριακότητας .....	82
9.	Χρώση DAPI για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων .....	83
	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>85</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>86</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ.....</b>	<b>87</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....</b>	<b>96</b>

## Ευχαριστίες

Η ερευνητική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, διευθύντρια του οποίου είναι η κα. Έφη Τσακαλίδου προς την οποία εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη μου για την αμέριστη συμπαράσταση, σχεδιασμό της ερευνητικής αυτής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις της στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Στον Δρ. Δημήτρη Κλέτσα, διευθυντή του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του για την εκπόνηση των πειραμάτων με την κυτταρική σειρά HT-29 καθώς και για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αυτής της εργασίας.

Θερμά επίσης ευχαριστώ, τον επίκουρο καθηγητή κ. Πανάγου Ευστάθιο, για την πολύτιμη συμβολή του στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Η βασική ιδέα και ο σχεδιασμός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ανήκουν στον Δρα. Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου τον οποίο και ευγνωμωνώ.

Επιπρόσθετα ευχαριστώ τον Δρ. Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου καθώς και τη Δρ. Ελένη Μαυρογονάτου για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή τους καθ' όλη την παραμονή μου και στα δύο εργαστήρια.

Επίσης ευχαριστώ τη διδακτορική φοιτήτρια Βούλα Αλεξανδράκη για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια της στην εκπόνηση των πειραμάτων μου. Ήταν πάντα δίπλα μου και με βοήθησε να εξοικειωθώ με το χώρο και τις τεχνικές του εργαστηρίου και την ευχαριστώ ιδιαίτερος γι' αυτό.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον τυροκόμο κ. Θοδωρή Πάσχο για την αμέριστη βοήθεια του κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων καθώς και τον κ. Μπακούλα για την προμήθεια του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε κατά τις τυροκομήσεις.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη για τη βοήθειά της στην HPLC αλλά και την κα. Ευγενία Μανωλοπούλου για την συμβολή της στη διάρκεια των τυροκομήσεων.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω να ευχαριστήσω τη φίλη και συμφοιτήτρια Διαμάντω Λέντζου για τη βοήθεια της με το στατιστικό πακέτο Statgraphics αλλά και για την υποστήριξή που μου προσέφερε τις δύσκολες στιγμές.

Τέλος ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης για την καθοιονδήποτε τρόπο βοήθειά τους.

## Συντομογραφίες

**5-FU:** 5-φλουορουρακίλη  
**AIF:** Apoptosis Inducing Factor  
**Apaf-1:** Apoptosis Inducing Factor 1  
**Asp:** Ασπαρτικό Οξύ  
**ATP:** Τριφωσφορική Αδενοσίνη  
**CRC:** Colorectal Cancer  
**Cys:** Κυστεΐνη  
**DAXX:** Death Associated Protein  
**DIABLO:** Direct IAP binding protein with low pI  
**DISC:** Death-Inducing Signaling Complex  
**EFSA:** European Food Safety Authority  
**EMP:** Μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas  
**EPS:** Extracellular Polymeric Substances  
**FADD:** Fas-Associated Death Domain  
**FDA:** U.S. Food and Drug Administration  
**GRAS:** Generally Recognised As Safe  
**GSH:** Γλουταθειόνη  
**HDACI:** Αναστολείς Αποακετυλάσης των Ιστονών  
**HtrA2:** Omi/high temperature requirement protein A  
**IAPs:** Inhibitor of Apoptosis Proteins  
**LAB:** Οξυγαλακτικά Βακτήρια  
**NADH:** Νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο  
**NSLAB:** Non Starter Lactic Acid Bacteria  
**PAB:** Προπιονικά Βακτήρια  
**PCD:** Programmed Cell Death  
**PEP:** Phosphoenolpyruvate  
**polyP:** Πολυφωσφορικό Οξύ  
**PPK:** Πολυφωσφορική Κινάση  
**PTS:** Phosphoenoltransferase System  
**QPS:** Qualified Presumption of Safety  
**RIP1:** Receptor Interacting Protein Kinase 1  
**SCFAs:** Short Chain Fatty Acids  
**Smac:** Second mitochondria-derived activator of caspase  
**TNFR1:** Tumor Necrosis Factor 1  
**TRADD:** TNF-receptor Associated Death Domain  
**WHO:** World Health Organisation  
**ΠΟΠ:** Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης  
**ΣΥ:** Σχετική Υγρασία

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή αποσκοπεί στην παρασκευή λευκού τυριού άλμης με την χρήση προπιονικών βακτηρίων και στην *in vitro* αξιολόγηση αυτού όσον αφορά πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HT-29. Αρχικά επιλέχθηκε το κατάλληλο στέλεχος προπιονικών βακτηρίων (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) για τις τυροκομήσεις αλλά και θρεπτικό υλικό για την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών καθώς και πραγματοποιήθηκε προσομοίωση της συμπεριφοράς των επιλεγμένων στελεχών (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 87, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) στο γάλα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 3 τυροκομήσεις όπου παρασκευάστηκαν 2 διαφορετικά τυριά, με (B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) και χωρίς προπιονικά βακτήρια (A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29), κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις σε επιλεγμένες ημέρες (0, 1, 6, 15, 30 και 60 d). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν καταμετρήθηκαν προπιονικά βακτήρια στο τυρί στο οποίο δεν είχαν προστεθεί ως συμπληρωματική εναρκτήρια καλλιέργεια. Όσον αφορά τις φυσικοχημικές αναλύσεις, μετρήθηκε το pH των τυριών, η υγρασία καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προκειμένου να προσδιοριστούν τα σάκχαρα και τα οξέα στα 2 τυριά. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα σημεία δειγματοληψίας προπιονικό οξύ στο τυρί που δεν περιέχει προπιονικά βακτήρια. Μετά το πέρας της ωρίμανσης των τυριών (60 d), πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος των τυριών από 14μελή ομάδα του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου ξεχώρισε το τυρί B1. Εν συνεχεία, βασιζόμενη στη βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία τα προπιονικά βακτήρια παράγουν προπιονικό οξύ το οποίο ανήκει στα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και επάγει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του γαστρεντερικού, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των τυριών και προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων HT-29 κατόπιν επώασης με τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών των τριών τυροκομήσεων για 72 h. Τα αποτελέσματα ωστόσο έδειξαν ότι μόνο το τυρί B της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης συνάδει με τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα αποτελέσματα ενώ τα άλλα τυριά έδειξαν αντίστροφα αποτελέσματα, δηλαδή το τυρί A εμφάνισε μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με το B. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών στις υψηλές συγκεντρώσεις (αραίωση 1/2 και 1/4) είτε στην υψηλή ωσμωμοριακότητα των τυριών που οδηγεί στο θάνατο των κυττάρων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε χρώση DAPI στα κύτταρα HT-29 τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης και ανιχνεύθηκαν αποπτωτικοί πυρήνες μόνο στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το τυρί B1.

Λέξεις κλειδιά: Λευκό τυρί άλμης, προπιονικά βακτήρια, απόπτωση



# PRODUCTION OF BRINED CHEESE WITH THE USE OF PROPIONIC ACID BACTERIA AND THE IN VITRO STUDY OF ITS POTENTIAL ANTICANCER PROPERTIES

## SUMMARY

This study aims at the production of white-brined cheese with the use of propionic acid bacteria and the *in vitro* evaluation of potential anticancer properties. Initially, we chose the suitable strain of PAB (*P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) and at the same time the growing media for selective enumeration of the chosen strains for the cheesemaking. We simulated the behavior of the selected strains in milk UHT full fat and then proceeded with the cheesemaking in which we produced 2 types of cheese, A (*L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29) and B (*L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>). During the ripening of the cheese and in selected days (0, 1, 6, 15, 30, 60 d) were conducted microbiological and physicochemical analyses. It is notable that there was no detection of PAB in the cheese A. Moreover, physicochemical analyses such as pH, moisture and HPLC were performed. Interestingly, propionic acid was not detected in any of the sampling points of the cheese A. After the ripening of the cheese (60d), sensory evaluation took place in which participated 14 members of the laboratory of Dairy Science of Agricultural University of Athens. Subsequently, based on the literature according to which PAB produce propionic acid which belongs to the Short Chain Fatty Acids and induces apoptosis in colorectal cancer cells, we proceeded with the homogenization of the cheeses and the determination of the viability of HT-29 cells when they were incubated with the 2 cheeses for 72h. However the results showed that only the cheeses of the first cheesemaking were consistent with the published results whereas the other cheeses showed reversed results, i.e. cheese A displayed lower survival when compared to cheese B. This could be attributed to either the depletion of nutrients during the incubation of HT-29 cells at high concentrations (1/2 and 1/4) or to high osmolatiry values (>0,5 osm/kg) which leads to the death of the cells. Finally, DAPI staining was performed in HT-29 cells which were previously incubated with the cheese A1 and B1. We found that the nuclei of the cells which were incubated with the cheese B1, showed apoptosis features.

Keywords: White-brined cheese, propionic acid bacteria, apoptosis

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Γενικά χαρακτηριστικά και στάδια παρασκευής του τυριού Φέτα

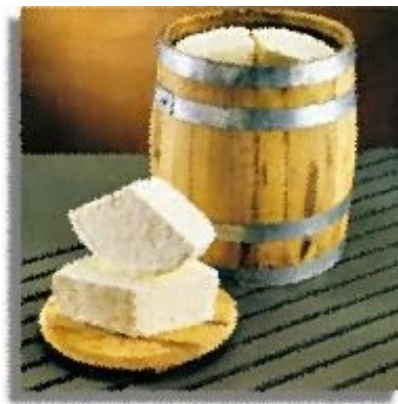
Τα τυριά άλμης έχουν κοινό χαρακτηριστικό το ότι ωριμάζουν και συντηρούνται σε άλμη. Αντιπροσωπεύονται κυρίως από την ελληνική Φέτα, τον Τελεμέ, το Χαλούμι Κύπρου και το Αιγυπτιακό Domiati. Τα τυριά αυτά είναι από τα αρχαιότερα στον κόσμο και η έναρξη παρασκευής τους στις αντίστοιχες χώρες, χάνεται στα βάθη της ιστορίας (Scott, 1986).

Το τυρί Φέτα είναι ένα λευκό τυρί υψηλής ποιότητας, που παρασκευάζεται σύμφωνα με συγκεκριμένη τεχνολογία από πρόβειο γάλα ή από μίγμα πρόβειου και αίγιου γάλακτος, το οποίο ωριμάζει και συντηρείται σε άλμη. Έχει αλμυρή, ελαφρώς όξινη γεύση και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η τεχνολογία παρασκευής του περιλαμβάνει στράγγιση με βαρύτητα, επιφανειακό ξηρό αλάτισμα, προσωρινή συσκευασία και προ-ωρίμανση στους 14-18 °C για δύο εβδομάδες ή μέχρι τιμής pH 4,4-4,6 και υγρασία μικρότερη από 56 g/100 g. Τελικά το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους και ωριμάζει για τουλάχιστον 60 μέρες. Η περίοδος προ-ωρίμανσης αποτελεί ουσιαστικό στάδιο για το σχηματισμό των τελικών φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τυριού.

Το όνομα Φέτα κατοχυρώθηκε ως Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) με τον κανονισμό 1892/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής με βάση τις εξής προδιαγραφές (Anifantakis & Moatsou, 2006):

1. Η Φέτα είναι ένα μαλακό τυρί, χωρίς επιδερμίδα, λευκού χρώματος και ελαφρώς όξινης γεύσης. Χαρακτηριστικό της δομής της είναι η παρουσία λίγων μηχανικών σχισμών.
2. Παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγματά του με αίγιο γάλα, το οποίο δεν υπερβαίνει το 30% της ολικής ποσότητας του γάλακτος τυροκόμησης. Το γάλα της τυροκόμησης πρέπει να παράγεται αποκλειστικά στις γεωγραφικές περιοχές της Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και Λέσβου.
3. Απαγορεύεται η χρήση συμπυκνωμένου γάλακτος και η προσθήκη σκόνης γάλακτος, συμπυκνώματος πρωτεϊνών και καζεϊνικών αλάτων στο γάλα της τυροκόμησης καθώς επίσης και η χρήση χρωστικών και συντηρητικών.
4. Η μέγιστη υγρασία πρέπει να είναι 56% και το ελάχιστο λίπος επί ξηρού 43% (g/g)
5. Η περίοδος ωρίμανσης πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 60 ημέρες.

Η Φέτα διατηρείται μέσα σε άλμη χαμηλής πυκνότητας και συσκευάζεται ερμητικά σε ξύλινα βαρέλια καθαρού βάρους 50-60 kg (**Σχήμα 1**) ή σε λευκοσιδηρά δοχεία καθαρού βάρους 16-18 kg. Τα τυροτεμάχια έχουν σχήμα τριγωνικό και βάρος ~3 kg (ξύλινα βαρέλια) ή σχήμα κύβου και βάρος ~1kg (λευκοσιδηρά δοχεία). Στο ελληνικό εμπόριο το τυρί αυτό που καλύπτει το 80% περίπου της κατανάλωσης των μαλακών τυριών κυκλοφορεί με τη μορφή δύο ποιοτικών παραλλαγών, τη μαλακή Φέτα (πιο «γλυκιά» επειδή περιέχει περισσότερη υγρασία και λιγότερο αλμυρή, ελαφρώς υπόξινη, με πλούσιο άρωμα και λίγο πικάντικη γεύση) και τη σκληρή Φέτα (λίγο πιπεράτη, περισσότερο αλμυρή, με πολύ τονισμένη γεύση και άρωμα) (Κυριακόπουλος, 1995).



Σχήμα 1: Τυρί Φέτα σε βαρέλι (Anifantakis, 1991)

### 1.1. Προετοιμασία γάλακτος τυροκόμησης

Για την παραγωγή καλής ποιότητας τυριού Φέτα, η οξύτητα του γάλακτος πρέπει να είναι μικρότερη από 0,23 g/100 ml γαλακτικού οξέος και το  $\text{pH} \geq 6,5$ . Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος συνήθως ποικίλλει μεταξύ 6,5-8 g/100 g ανάλογα με την εποχή και προτείνεται να προσαρμόζεται στα 6 g/100 g. Η πιο κατάλληλη αναλογία καζεΐνης/λίπους είναι 0,72.

Αρχικά το γάλα διηθείται και τυποποιείται. Ακολουθεί παστερίωση σε πλακοειδή εναλλάκτη θερμότητας (θερμοκρασία 72-73 °C για 15 sec) ή σε τυρολέβητα διπλών τοιχωμάτων ανοιχτού τύπου (θερμοκρασία 68 °C για 15 min). Σε πολλές περιπτώσεις το γάλα θερμαίνεται σε ανοικτή δεξαμενή στους 63-65 °C για 3-20 min. Στη συνέχεια ψύχεται στη θερμοκρασία πήξεως (32-36 °C) (Anifantakis & Moatsou, 2006).

## 1.2. Προσθήκη CaCl<sub>2</sub>

Το αιγοπρόβειο γάλα περιέχει ικανοποιητικές ποσότητες ασβεστίου. Με την παστερίωση όμως μια ποσότητα αυτού συνήθως αδιαλυτοποιείται και κατακρημνίζεται (Κυριακόπουλος, 1995). Στην περίπτωση που παρουσιάζεται ανάγκη προσθήκης, προστίθεται στο τυροκομούμενο γάλα CaCl<sub>2</sub> (μέχρι 0,2 g/kg γάλακτος), πριν την προσθήκη της πυτιάς, για τη διασφάλιση καλύτερης πήξης και τη δημιουργία συνεκτικού πήγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

## 1.3. Προσθήκη καλλιεργιών

Η χρήση καλλιέργειας είναι μια σχετικά νέα εξέλιξη στην τυροκομία. Παλαιότερα, το τυρί παρασκευαζόταν με νωπό ή απαστερίωτο γάλα και η οξύτητα έφτανε στα επιθυμητά επίπεδα λόγω της δράσης της φυσικής μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος. Με την εφαρμογή της παστερίωσης, όμως, οι αριθμοί της επιθυμητής αυτής μικροχλωρίδας μειώνονται αισθητά με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δράσουν ικανοποιητικά.

Ο σκοπός της προσθήκης καλλιέργειας είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος και επομένως η αύξηση της οξύτητας, σε ορισμένο ρυθμό, τόσο στο γάλα, όσο και στο τυρόπηγμα, αλλά και στο φρέσκο τυρί μέχρι να στραγγίσει.

Η προσθήκη καλλιέργειας είναι ένα από τα πιο σημαντικά στάδια για την παρασκευή του τυριού καθώς παίζει σύνθετο ρόλο. Με τη χρήση της, επιτυγχάνεται ο έλεγχος της μικροχλωρίδας του τυριού καθώς αναπτύσσεται η καλλιέργεια σε βάρος της φυσικής μικροχλωρίδας, η οποία είναι άγνωστη και πιθανώς ανεπιθυμητή και μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση του τυριού (Μπίντσης, Παπαδήμας, 2009).

Η προσθήκη της εναρκτήριας καλλιέργειας πραγματοποιείται 15-30 min πριν από την προσθήκη πυτιάς με σκοπό την οξίνιση του πηγματος. Τα μικρά τυροκομεία χρησιμοποιούν συνήθως γιαούρτι ως εναρκτήρια καλλιέργεια (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* σε αναλογία 1:1 και σε ποσότητα ~0,3 ml/100ml), επειδή είναι ευκολότερη η προετοιμασία και η συντήρηση. Στα μεγάλα εργοστάσια παραγωγής τυριού Φέτας, χρησιμοποιούνται μεσόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) ή μείγμα μεσόφιλων και θερμόφιλων καλλιεργιών (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) σε ποσότητα μέχρι 0,5 ml/100 ml. Τα είδη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες, η αναλογία στην οποία προστίθενται, ο χρόνος που μεσολαβεί από

τον εμβολιασμό μέχρι την προσθήκη της πυτιάς και η θερμοκρασία του γάλακτος της τυροκόμησης είναι παράμετροι που επηρεάζουν το ρυθμό οξίνισης του πήγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

#### 1.4. Προσθήκη πυτιάς και πήξη του γάλακτος

Η προσθήκη της πυτιάς στο γάλα της τυροκόμησης πραγματοποιείται 15-30 min μετά τον εμβολιασμό του γάλακτος με την εναρκτήρια καλλιέργεια. Η ποσότητα της προστιθέμενης πυτιάς πρέπει να είναι κατάλληλη για την πήξη του γάλακτος και τη δημιουργία συνεκτικού πήγματος, το οποίο διαιρείται μετά από 50 min (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται η παραδοσιακή εγχώρια πυτιά. Η εγχώρια πυτιά παρασκευάζεται με τη χρήση ολόκληρου του ήνυστρου μη απογαλακτισμένων αρνιών και κατσικιών, συμπεριλαμβανομένων των ζωικών ιστών και του πηγμένου γάλακτος από ζώα που τρέφονται αποκλειστικά με γάλα.

Η ανάπτυξη του ευχάριστου αρώματος και της πιπεράτης γεύσης της παραδοσιακής Φέτας που παρασκευάζεται με εγχώρια πυτιά μπορεί να αποδοθεί στη λιπολυτική δράση των προγαστρικών εστερασών. Σε μεγάλα τυροκομεία, η παραδοσιακή εγχώρια πυτιά έχει αντικατασταθεί μερικώς ή πλήρως από την εμπορική πυτιά. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται μείγμα των δύο τύπων πυτιάς σε αναλογία 1:3 (παραδοσιακή/εμπορική) (Anifantakis & Moatsou, 2006).

#### 1.5. Διάρθρωση και ανάπαυση του τυροπήγματος

Αφού ολοκληρωθεί η πήξη του γάλακτος, περίπου 50 min μετά την προσθήκη της πυτιάς, το πήγμα διαιρείται σε κύβους ακμής 2-3 cm και αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 10 min ώστε να αποβάλει από τη μάζα του μεγαλύτερη ποσότητα τυρογάλακτος, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).

#### 1.6. Εξαγωγή και στράγγιση του τυροπήγματος

Μετά την ανάπαυση του τυροπήγματος, το τελευταίο μεταφέρεται προσεκτικά σε μεταλλικά ανοξείδωτα ή πλαστικά, ορθογώνια ή κυλινδρικά καλούπια (**Σχήμα 2**), τα οποία φέρουν μεγάλο αριθμό οπών σε όλη την επιφάνειά τους για να διευκολύνεται η στράγγιση

του πήγματος. Σε περίπτωση που το τυρί πρόκειται να συσκευασθεί σε βαρέλια, χρησιμοποιούνται κυλινδρικά καλούπια, ενώ αν η συσκευασία γίνει σε λευκοσιδηρά δοχεία, χρησιμοποιούνται τα ορθογώνια.



Σχήμα 2: Καλούπι για τυρί Φέτα (Ιδιωτική συλλογή)

Τα καλούπια γεμίζονται σταδιακά, γιατί σε αντίθετη περίπτωση η αποβολή ορού καθυστερεί. Η σταδιακή μεταφορά του πήγματος στα καλούπια έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών σχισμών στη μάζα του τυριού, που είναι χαρακτηριστικό του τυριού Φέτα. Αφού τοποθετηθεί το τυρόπηγμα στα καλούπια, τα τελευταία αφήνονται με κλίση πάνω σε τυροτράπεζα και περιστρέφονται περιοδικά για να διευκολυνθεί η απομάκρυνση του τυρογάλακτος (**Σχήμα 3**). Μετά από 2-3 h, τα καλούπια αναστρέφονται στην τυροτράπεζα και αφήνονται για 2-3 h σε θερμοκρασία 14-18 °C για να ολοκληρωθεί η στράγγιση (Anifantakis & Moatsou, 2006).



Σχήμα 3: Παραδοσιακός τρόπος στράγγισης του πήγματος τυριού Φέτα που θα ωριμάσει σε ξύλινα βαρέλια (Anifantakis & Moatsou, 2006)

### 1.7. Αλάτισμα

Αφού ολοκληρωθεί η συναίρεση του πήγματος, το τελευταίο εξάγεται από τα καλούπια και τεμαχίζεται σε κομμάτια  $\sim 12 \times 10 \times 10$  cm, τα οποία τοποθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο σε τυροτράπεζα και αλατίζονται. Για το αλάτισμα χρησιμοποιείται καθαρό χοντρόκοκκο αλάτι, το οποίο διαλύεται αργά. Το λεπτόκοκκο αλάτι, διαλύεται γρήγορα με αποτέλεσμα η επιφάνεια του τυριού να γίνεται πολύ σκληρή και η αποβολή του ορού να καθυστερεί (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Το επόμενο πρωί, τα τεμάχια αναποδογυρίζονται και αλατίζονται. Το pH του τυριού στο στάδιο αυτό πρέπει να είναι γύρω στο 5 (Κυριακόπουλος, 1995). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 12 h και συνολικά 4 φορές έτσι ώστε η κάθε επιφάνεια των τυροτεμαχίων να αλατιστεί εις διπλούν. Η τελική συγκέντρωση του αλατιού στην τυρομάζα πρέπει να είναι  $\sim 3\text{g}/100\text{g}$  (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Μετά το αλάτισμα, τα τυροτεμάχια αφήνονται στην τυροτράπεζα και αναποδογυρίζονται κάθε 24 h μέχρι η επιφάνειά τους να γίνει «γλοιώδης», χαρακτηριστικό που οφείλεται στην ανάπτυξη βακτηρίων και ζυμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στην ωρίμανση του τυριού και επομένως στην ανάπτυξη των ειδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Τα τυροτεμάχια τοποθετούνται προσωρινά σε ανοιχτά ξύλινα βαρέλια ή σε πλαστικούς περιέκτες και αλατίζονται. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάθε 2 ημέρες από το ένα βαρέλι σε άλλο για να διευκολυνθεί η απομάκρυνση του ορού και παράλληλα αλατίζονται (Anifantakis & Moatsou, 2006). Πολλά από τα παραπάνω στάδια σήμερα έχουν απαλοποιηθεί και συχνά το αλάτισμα των κομματιών των

φρέσκων τυριών δε γίνεται σε τυροτράπεζα, αλλά σε δοχεία, όπου τα τυροτεμάχια συσκευάζονται προσωρινά.

### 1.8. Ωρίμανση

Μετά από 4-5 ημέρες, δεδομένου ότι το  $pH \leq 4,6$  και η υγρασία  $\leq 56$  g/100g, τα τυροτεμάχια καθαρίζονται προσεκτικά με τη χρήση νερού ή άλμης και μιας μαλακής βούρτσας. Στη συνέχεια τοποθετούνται προσεκτικά και συσκευάζονται σε στρώσεις σε ξύλινα βαρέλια χωρητικότητας περίπου 50 kg, έτσι ώστε να μην υπάρχουν κενά μεταξύ τους. Τα ξύλινα βαρέλια, λόγω του υψηλού τους κόστους και της δυσκολίας χειρισμού τους, έχουν αντικατασταθεί από λευκοσιδηρά δοχεία μικρότερης χωρητικότητας στα οποία το τυρί συσκευάζεται με προσθήκη άλμης (8 g NaCl/ 100 ml). Τα βαρέλια σφραγίζονται και μεταφέρονται σε θαλάμους με υψηλή σχετική υγρασία (ΣΥ), όπου παραμένουν για 10 περίπου ημέρες ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανση στους 16-18 °C. Κατά διαστήματα πραγματοποιείται κύλιση των βαρελιών και συμπλήρωση με άλμη 5%. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους με θερμοκρασία 3-4 °C και υψηλή ΣΥ (95-100%), όπου παραμένουν για 2 μήνες από την ημερομηνία παρασκευής, οπότε και ολοκληρώνεται η ωρίμανσή τους. Αν το pH είναι χαμηλότερο από 4,4-4,6, το τυρί αποκτά όξινη γεύση, παρατηρείται απώλεια υγρασίας και θρυμματίζεται κατά τον τεμαχισμό ενώ σε υψηλότερο pH η διάρκεια συντήρησης μειώνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).

## 2. **Οξυγαλακτικά βακτήρια**

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε τους μικροοργανισμούς στην εμπειρική παρασκευή διαφόρων ζυμούμενων τροφίμων για πολλές χιλιάδες χρόνια. Παρά το γεγονός ότι δεν γνώριζε από την αρχή την ύπαρξή τους, γνώριζε πολύ καλά το αποτέλεσμα της δράσης τους. Στα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα, η κατάσταση αυτή άλλαξε. Το 1873, δέκα χρόνια μετά τη μελέτη της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος από τον Louis Pasteur, απομονώθηκε η πρώτη καθαρή καλλιέργεια οξυγαλακτικού βακτηρίου (Lactic Acid Bacteria, LAB) από τον J. Lister.

Σε παγκόσμιο επίπεδο τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία, με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen, 2002). Για το λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πλέον από τους καλύτερα μελετημένους. Η ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζει υψηλή ποικιλομορφία και περιλαμβάνει ένα



μεγάλο αριθμό γενών και ειδών, τα οποία απαντώνται σε πολλά οικοσυστήματα, όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα, στην αναπνευστική, εντερική και γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων, στα νερά των υπονόμων και στα αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά.

## 2.1. Γενικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Σε μια κλασική προσέγγιση, ο Orla-Jensen (1942) όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους οργανισμούς (ραβδία ή κόκκους) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Για τις σύγχρονες προσεγγίσεις, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη φυλογενετικές αναλύσεις και μοριακές τεχνικές, αυτός ο ορισμός θεωρείται μονοσήμαντος. Παρόλα αυτά παραμένει γενικά αποδεκτός (Axelsson, 2004; Stiles & Holzapfel, 1997).

Τα μέλη της ομάδας αυτής δε διαθέτουν πορφυρίνες και κυτοχρώματα, δεν εκτελούν οξειδωτική φωσφορυλίωση, και κατά συνέπεια αποκτούν ενέργεια μόνο με φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος (Law, 1997). Όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αναερόβια. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όμως, διαφέρουν από άλλα αναερόβια ως προς το ότι δεν είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο και μπορούν ν' αναπτυχθούν είτε παρουσία είτε απουσία του. Κατά συνέπεια είναι μικροαερόφιλα βακτήρια. Τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια παίρνουν ενέργεια μόνο από το μεταβολισμό σακχάρων και κατά συνέπεια περιορίζονται σε ενδიაιτήματα όπου υπάρχουν σάκχαρα. Συνήθως διαθέτουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες, ενώ οι σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις τους περιλαμβάνουν αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες (Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Στην πλειοψηφία τους δεν είναι ικανά για κίνηση, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις βακίλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια. Η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 55% (Klein et al., 1998; Axelsson, 2004).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40° C. Είναι ανθεκτικά στα οξέα (έχει σημειωθεί ανάπτυξη ορισμένων ειδών ακόμα και σε pH 3,5) αν και έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης την ελαφρώς όξινη περιοχή (5.0-7.0). Στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999).

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων υποομάδων των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά τη φύση των προϊόντων που σχηματίζονται από τη ζύμωση των σακχάρων. Η μια ομάδα, που ονομάζεται ομοζυμωτική, παράγει ένα και μόνο προϊόν ζύμωσης, το γαλακτικό οξύ, ενώ η άλλη ομάδα, που ονομάζεται ετεροζυμωτική, παράγει άλλα προϊόντα, κυρίως αιθανόλη ή οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (carbon dioxide, CO<sub>2</sub>) αλλά και

γαλακτικό οξύ. Επειδή τα ετεροζυμωτικά βακτήρια δε διαθέτουν αλδολάση, δεν μπορούν να διασπάσουν τη δις-φωσφορική φρουκτόζη προς φωσφορική τριόζη (γλυκόλυση). Αντίθετα, οξειδώνουν την 6-φωσφορική γλυκόζη προς 6-φωσφογλυκονικό οξύ και κατόπιν το αποκαρβοξυλιώνουν προς φωσφορική πεντόζη, η οποία διασπάται σε φωσφορική τριόζη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφο-κετολάση.

Στα ετεροζυμωτικά βακτήρια, η φωσφορική τριόζη μετατρέπεται τελικά σε γαλακτικό οξύ με την παραγωγή 1 mol τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), ενώ το ακετυλο-φωσφορικό οξύ προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) που δημιουργείται κατά την παραγωγή της φωσφορικής πεντόζης και μετατρέπεται κατόπιν σε αιθανόλη δίχως να παράγεται ATP. Εξαιτίας αυτού, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια παράγουν μόνο 1 mol ATP από γλυκόζη αντί των 2 mol που παράγουν τα ομοζυμωτικά. Επειδή τα ετεροζυμωτικά βακτήρια αποκαρβοξυλιώνουν το 6-φωσφο-γλυκονικό οξύ, παράγουν CO<sub>2</sub> ως προϊόν ζύμωσης, ενώ τα ομοζυμωτικά παράγουν λίγο ή καθόλου CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για πολλές δεκαετίες, η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασιζόταν στα μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Παρόλα αυτά, η εξέλιξη των μοριακών μεθόδων και ο συνεχής εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες 16S rDNA γονιδίων προκάλεσαν μεγάλες αλλαγές στη συστηματική των βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Γενικά, αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που επεκτείνεται ταχέως και επί του παρόντος περιλαμβάνει έξι οικογένειες και περίπου 40 γένη, γεγονός που απεικονίζει και τη μεγάλη ποικιλομορφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, έχουν περιγραφεί 7 γένη για την οικογένεια *Aerococcaceae*, 16 γένη για την οικογένεια *Carnobacteriaceae*, 7 γένη για την οικογένεια *Enterococcaceae*, 3 γένη για την οικογένεια *Lactobacillaceae*, 4 γένη για την οικογένεια *Leuconostocaceae* και 3 γένη για την οικογένεια *Streptococcaceae*.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Το γένος *Bifidobacterium*, αν και φυλογενετικά ανήκει στο φύλο *Actinobacteria*, εξετάζεται συνήθως με τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της στενής του συγγένειας με αυτά όσον αφορά τις φυσιολογικές και

βιοχημικές ιδιότητες αλλά και γιατί απαντάται στα ίδια οικοσυστήματα, όπως για παράδειγμα το γαστρεντερικό σύστημα (Vandamme et al., 1996).

Η κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι υπό συνεχή εξέλιξη. Ο μεγάλος αριθμός των ειδών που έχουν ήδη περιγραφεί, η συνεχής απομόνωση νέων στελεχών παγκοσμίως και η βιο-διαφοροποίηση που αυτά παρουσιάζουν απαιτεί την εφαρμογή πολυφασικών ταξινομικών προσεγγίσεων.

### 2.3. Εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η πρωταρχική δράση των εναρκτήριων οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η παραγωγή οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ωστόσο, μπορούν να συμβάλουν και στην ωρίμανση των τυριών κατά την οποία τα ένζυμά τους συμμετέχουν στην πρωτεόλυση και μετατροπή των αμινοξέων σε ενώσεις που σχετίζονται με το άρωμα (Fox & Wallace, 1997). Ως εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια ορίζονται αυτά που παράγουν οξύ ικανό να μειώσει το pH του γάλακτος κάτω από το 5,3 μέσα σε 6 ώρες στους 30-37 °C και τα οποία κατά την παρασκευή των τυριών αναπτύσσονται σε πληθυσμούς της τάξης των  $10^8$ - $10^9$  cfu/g μέσα σε λίγες ώρες. Οι εναρκτήριες καλλιέργειες είτε προστίθενται κατά την έναρξη της τυροκόμησης είτε μπορεί να αποτελούν ενδογενή χλωρίδα του γάλακτος, όπως συμβαίνει σε πολλά τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα. Για την παραγωγή των τυριών χρησιμοποιούνται είτε μεσόφιλες είτε θερμόφιλες εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων, ανάλογα με τον τύπο του τυριού που παρασκευάζεται. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα οξυγαλακτικά βακτήρια ως εναρκτήριες καλλιέργειες είναι μέλη των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Enterococcus* (Beresford et al., 2001).

Ως μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) χαρακτηρίζονται οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και πεδιόκοκκοι που αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας των περισσότερων τυριών κατά την ωρίμανση. Δεν συνιστούν μέρος της φυσιολογικής εναρκτήριας χλωρίδας, δεν αναπτύσσονται καλά στο γάλα (Cogan et al., 1997) και δε διαθέτουν υψηλή ικανότητα οξύνισης του γάλακτος. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπληρωματικές καλλιέργειες (adjuncts). Τέτοια στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Beresford et al., 2001).

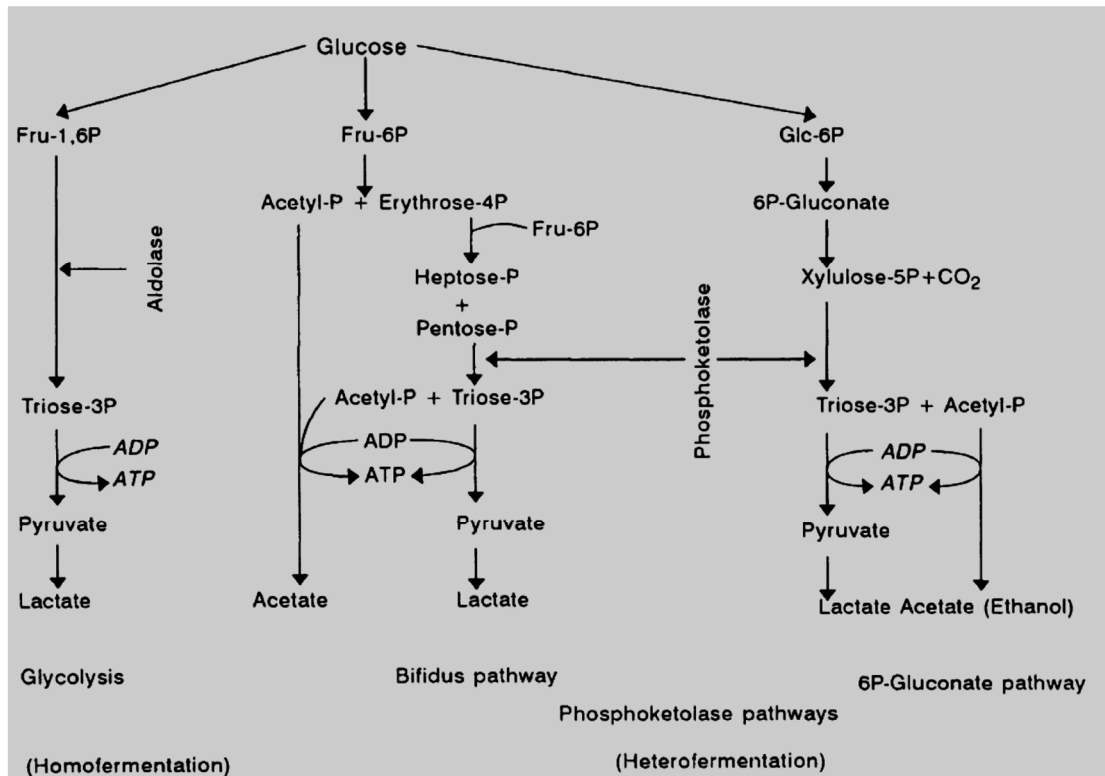
## 2.4. Μεταβολισμός οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι απαιτητικοί οργανισμοί και χρειάζονται υδατάνθρακες, αμινοξέα, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία προκειμένου να αναπτυχθούν. Επιπλέον, ορισμένα οξυγαλακτικά απαιτούν ειδικούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο ορός του γάλακτος. Τα οξυγαλακτικά αποικοδομούν υδατάνθρακες μέσω διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών. Το ATP που παράγεται μέσω της φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος, χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ενώσεων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και για βιοσυνθετικούς σκοπούς.

### 2.4.1. *Μεταβολισμός σακχάρων*

Το κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η ζύμωση των υδατανθράκων με τη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν διάφορους υδατάνθρακες και συγγενικές ενώσεις με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ.

Όσον αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, υπάρχουν δυο κύρια μεταβολικά μονοπάτια στα οξυγαλακτικά βακτήρια: το ομοζυμωτικό μονοπάτι (γλυκόλυση ή μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) και το ετερόζυμωτικό μονοπάτι (μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών). Η μεταφορά και φωσφορυλίωση της γλυκόζης λαμβάνει χώρα με μεταφορά του ελεύθερου σακχάρου και φωσφορυλίωσή του από μια ATP-εξαρτώμενη γλυκοκινάση. Κάποια είδη χρησιμοποιούν το σύστημα της φωσφο-τρανσφεράσης (Phosphotransferase system, PTS) που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (Phosphoenolpyruvate, PEP) (σύστημα PEP-PTS) με το PEP να είναι ο δότης της φωσφορικής ομάδας (Postma et al., 1993).



Σχήμα 4: Μεταβολικά μονοπάτια της γλυκόζης: (Α) Ομοζυμωτικό μονοπάτι (γλυκόλυση), (Β) Ετεροζυμωτικό μονοπάτι (μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών) (Holzapfel & Wood, 2014)

Το γλυκολυτικό μονοπάτι (ομοζυμωτικό) (**Σχήμα 4**) χρησιμοποιείται από μέλη των οικογενειών *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* και *Streptococcaceae*, εκτός από μία ομάδα του γένους *Lactobacillus*. Στη μεταβολική αυτή οδό, η γλυκόζη μέσω της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια, σε γαλακτικό οξύ και παράγονται 2 μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης μέσω φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος.

Μέλη της οικογένειας *Leuconostocaceae* και διάφορα είδη του γένους *Lactobacillus* μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (ετεροζυμωτικό) (**Σχήμα 4**). Το μονοπάτι αυτό χαρακτηρίζεται από τα αρχικά στάδια οξειδωσης της γλυκόζης, τον σχηματισμό του 6-φωσφογλυκονικού οξέος και την αποκαρβοξυλίωση αυτού. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια στερούνται της αλδολάσης της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης και της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών που αποτελούν σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Η παραγόμενη 6-φωσφορική πεντόζη διασπάται από την φωσφοκετολάση προς 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη στην συνέχεια εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ είτε ανάγεται προς αιθανόλη, μέσω

του ακετυλο-CoA και της ακεταλδεΐδης, είτε αποφωσφορυλιώνεται προς οξικό οξύ και ATP, είτε ενώνεται με ένα μόριο CoA, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς ακεταλδεΐδη που με τη σειρά της ανάγεται προς αιθανόλη έτσι ώστε να αναγεννηθεί το NAD στην οξειδωμένη του μορφή (Law, 1997). Καθώς αυτός ο μεταβολισμός οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτικού οξέος αλλά και σημαντικών ποσοτήτων άλλων τελικών προϊόντων (CO<sub>2</sub>, οξικό οξύ ή αιθανόλη) χαρακτηρίζεται ως ετεροζυμωτικό μονοπάτι.

Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια η λακτόζη είναι η κύρια πηγή άνθρακα στο γάλα και η ζύμωσή της αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο δισακχαρίτη. Σε διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια (όπως π.χ. στους θερμοφίλους *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* και *Lactobacillus acidophilus* και τα είδη του γένους *Leuconostoc*) η λακτόζη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της περμεάσης της λακτόζης και στη συνέχεια αποικοδομείται από την ενδοκυτταρική β-γαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και γαλακτόζη (Fox et al., 1990). Σε άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. σε διάφορους λακτοκόκκους και γαλακτοβακίλλους) η λακτόζη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορική λακτόζη μέσω ενός συστήματος PEP-PTS και στη συνέχεια διασπάται από τη β-φωσφογαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και 6-φωσφορική γαλακτόζη. Το σύστημα PEP-PTS της λακτόζης καθώς και η β-φωσφογαλακτοζιδάση σε γενικές γραμμές επάγονται ή καταστέλλονται από την παρουσία της γλυκόζης (Kandler, 1983). Το σύστημα PEP-PTS είναι πιο πολύπλοκο από το σύστημα μεταφοράς μέσω της περμεάσης της λακτόζης, αφού για να λειτουργήσει απαιτεί την παρουσία ιόντων Mg<sup>2+</sup> και τέσσερις πρωτεΐνες. Δυο από αυτές, το ένζυμο II και το ένζυμο III, βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση όσον αφορά το σάκχαρο-υπόστρωμα. Οι δυο άλλες, το ένζυμο I και μια χαμηλού μοριακού βάρους θερμοανθεκτική πρωτεΐνη (HPr), είναι διαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και απαντώνται σε όλα τα συστήματα PEP-PTS (Postma et al., 1993). Ανεξάρτητα από το σύστημα μεταφοράς, η γλυκόζη στην συνέχεια θα οξειδωθεί προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού, η γαλακτόζη θα μεταβολισθεί μέσω της οδού Leloir ή μέσω του μονοπατιού της ταγκατόζης (Marilley & Casey, 2004). Παρόλα αυτά, επισημαίνεται ότι κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. οι θερμοφίλοι *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* και *Lb. acidophilus*) δεν είναι ικανά να μεταβολίσουν τη γαλακτόζη, την οποία εκκρίνουν προς το εξωτερικό του κυττάρου.

#### 2.4.2. Πρωτεόλυση και λιπόλυση

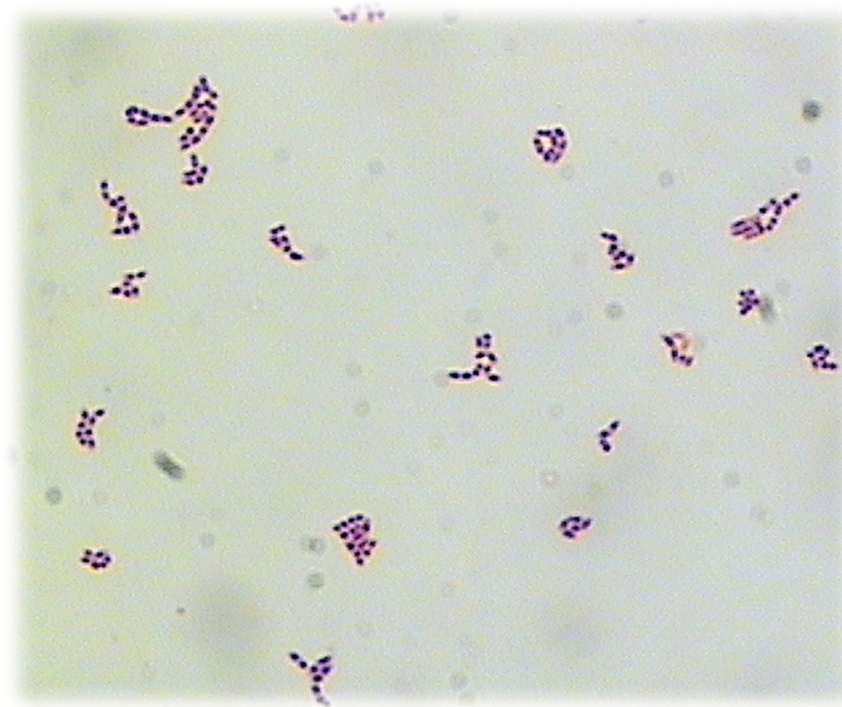
Καθώς τα ελεύθερα αμινοξέα σπανίζουν στο γάλα, ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια γαλακτοκομικής προέλευσης έχουν πρωτεολυτικές ιδιότητες και αποκτούν αμινοξέα από την καζεΐνη του γάλακτος. Σε γενικές γραμμές, η αξιοποίηση της καζεΐνης από τα LAB πραγματοποιείται από μια πρωτεΐνάση του κυτταρικού φακέλου που αποικοδομεί την πρωτεΐνη σε ολιγοπεπτίδια, τα οποία στην συνέχεια προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω ειδικών συστημάτων μεταφοράς πεπτιδίων για περαιτέρω αποικοδόμηση σε μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα με την συντονισμένη δράση ενδοκυτταρικών πεπτιδασών (Savijoki et al., 2006). Αρκετοί τύποι γονιδίων πρωτεΐνάσης από οξυγαλακτικά βακτήρια που προέρχονται από το περιβάλλον του γάλακτος κλωνοποιήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* (Savijoki et al., 2006). Η πρωτεόλυση έχει επίσης βιομηχανική σημασία λόγω της συμβολής της στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (Meyer and Spahni, 1998; Sridhar et al., 2005).

Η λιπόλυση είναι σημαντική για την ανάπτυξη της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ιδιαίτερα στην ωρίμανση του τυριού. Αρκετά οξυγαλακτικά βακτήρια του περιβάλλοντος του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων των *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *L. casei*, *L. plantarum* και *L. rhamnosus*, έχουν αναφερθεί ότι έχουν λιπολυτική δράση (Centeno et al., 1999; Di Cagno et al., 2006; Abeijòn Mukdsi et al., 2009). Η λιπόλυση στο τυρί συνήθως πραγματοποιείται μέσω των συστημάτων εστεράσης / λιπάσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των προπιονικών βακτηρίων, των μυκήτων και των ζυμών.

### 3. Προπιονικά βακτήρια

Τα προπιονικά βακτήρια (Propionic Acid Bacteria, PAB) είναι Gram θετικά, θετικά στη δοκιμή καταλάσης και με υψηλό περιεχόμενο σε G+C%. Παρουσιάζουν αδυναμία σχηματισμού σπορίων, αδυναμία κίνησης και είναι πλειομορφικά βακτήρια (Cummins & Johnson, 1986; Stackebrandt et al., 2006). Σε γενικές γραμμές, οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος των προπιονικών βακτηρίων είναι αναερόβιοι έως ελαφρώς μικροαερόφιλοι και μορφολογικά ετερογενείς συμπεριλαμβάνοντας ραβδόμορφα και νηματοειδή διακλαδισμένα κύτταρα που μπορούν να προκύψουν είτε μεμονωμένα είτε σε ζευγάρια σχηματίζοντας ένα σχήμα V ή Y (**Σχήμα 5**). Αναπτύσσονται ιδανικά στους 30 °C

και έχουν ουδέτερο pH. Έχουν έναν ιδιόμορφο μεταβολισμό που οδηγεί στον σχηματισμό προπιονικού οξέος ως κύριο προϊόν ζύμωσης.



Σχήμα 5: Φωτογραφία του *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* από μικροσκόπιο

Παρά το γεγονός ότι το 1861, ο Louis Pasteur έδειξε ότι η προπιονική ζύμωση οφειλόταν στη βιοχημική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, οι πρώτες μελέτες σχετικά με τη μορφολογία και την φυσιολογία των προπιονικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν από τον Albert Fitz (1879), ο οποίος παρατήρησε ότι οι οργανισμοί από τα τυριά «με μάτια» ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ σε προπιονικό και οξικό οξύ και απελευθερώνουν διοξείδιο του άνθρακα. Από τις αρχές του 20ου αιώνα, οι E. Von Freudenreich και Sigurd Orla-Jensen (1906) απομόνωσαν τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό «ματιών» στο emmental και μερικά χρόνια αργότερα, το όνομα *Propionibacterium* προτάθηκε από τον Orla-Jensen παραπέμποντας στα βακτήρια που παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες προπιονικού οξέος. Μολονότι πολλά στελέχη απομονώθηκαν τα επόμενα χρόνια, οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν περιλήφθηκαν στο εγχειρίδιο του Bergey της προσδιοριστικής βακτηριολογίας μέχρι και την τρίτη έκδοση που εκδόθηκε το 1930. Από τότε νέα είδη έχουν περιγραφεί βάσει των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών, όπως το σχήμα V, η παραγωγή προπιονικού οξέος και το προφίλ της ζύμωσης υδατανθράκων. Το *Propionibacterium*



*freudenreichii* χρησιμοποιείται ευρέως ως καλλιέργεια ωρίμανσης στην παρασκευή τυριών ελβετικού τύπου (Dorner, 1939; Langsrud & Reinbold, 1973; Steffen et al., 1993). Είναι επίσης γνωστό για την παραγωγή της βιταμίνης B<sub>12</sub> και του προπιονικού οξέος (Thierry et al., 2011) και πλέον μελετάται όλο και περισσότερο για τις προβιοτικές του ιδιότητες.

### 3.1. Ταξινόμηση των προπιονικών βακτηρίων

Τα προπιονικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη των ακτινοβακτηρίων που περιλαμβάνουν Gram θετικά βακτήρια υψηλής περιεκτικότητας G+C. Τα ακτινοβακτήρια παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα μορφολογιών, φυσιολογικών και μεταβολικών ιδιοτήτων και αποικίζουν διάφορα ενδιαιτήματα συμπεριλαμβανομένου του χώματος (Ventura et al., 2007). Το γένος *Propionibacterium* σήμερα περιλαμβάνει 12 είδη. Δύο διακριτές ομάδες διαχωρίζονται με βάση το φυσικό τους βίοτοπο: «γαλακτοκομικά» (κλασσικά) και «δερματικά» προπιονικά βακτήρια (Cummins & Johnson, 1986). Τα γαλακτοκομικά προπιονικά βακτήρια έχουν παραδοσιακά απομονωθεί από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τέσσερα τυπικά γαλακτοκομικά είδη περιγράφηκαν: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* και *P. thoenii*. Τα δερματικά προπιονικά βακτήρια συμβιώνουν με τα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Το πιο μελετημένο είδος μέσα στην ομάδα των δερματικών προπιονικών βακτηρίων είναι το *P. acnes* που εμπλέκεται στην ακμή και στις μετεγχειρητικές μολύνσεις. Τέσσερα είδη προπιονικών βακτηρίων περιγράφηκαν πιο πρόσφατα: το *P. cyclohexanicum* που απομονώθηκε από αλλοιωμένο χυμό πορτοκαλιού (Kusano et al., 1997), το *P. microaerophilum* από λύματα ελαιοτριβείου (Koussemon et al., 2001), το *P. australiense* από κοκκιωματώδεις βλάβες βοειδών (Bernard et al., 2002) και το *P. Acidifaciens*, το οποίο έχει απομονωθεί από την ανθρώπινη στοματική κοιλότητα (Downes & Wade, 2009). Η ανάλυση των γονιδιακών αλληλουχιών του 16S rDNA έδειξε ότι το *P. cyclohexanicum*, το *P. acidifaciens* και το *P. australiense* συνδέονται φυλογενετικά με το *P. freudenreichii* ενώ το *P. microaerophilum* συνδέεται με το *P. acidipropionici* (Downes & Wade, 2009).

### 3.2. Γενοτυπικά χαρακτηριστικά του γένους *Propionibacterium*

Τα μέλη του γένους *Propionibacterium* διαθέτουν ένα κυκλικό χρωμόσωμα όπως τα περισσότερα βακτήρια, το μέγεθος του οποίου ποικίλει από 2,3 με 3,2 Mb, ανάλογα με τα διάφορα είδη (Gautier et al., 1992). Το περιεχόμενο σε G+C στο DNA τους κυμαίνεται από

53-68% κι αν και γενικά δεν περιέχουν πλασμίδια έχει αναφερθεί η ύπαρξή τους σε στελέχη των ειδών *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* και *P. jensenii* (Rehberger & Glatz, 1990). Στην πραγματικότητα, το 10-30% των στελεχών του *P. freudenreichii* περιέχουν 1-2 κρυπτικά πλασμίδια (van Luijk et al., 2002).

Το γονιδίωμα του στελέχους *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CIRM-BIA1<sub>T</sub> αλληλουχίστηκε με 11-fold κάλυψη (Falentin et al., 2010). Αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα των 2616384 ζευγών βάσεων με 67% περιεχόμενο σε G+C, 2 rDNA οπερόνια και 45 tRNAs. Το χρωμόσωμα έχει προβλεφθεί ότι περιέχει 2439 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και περιέχει επίσης 22 διαφορετικές αλληλουχίες εισαγωγής που αντιπροσωπεύουν το 3,47% του γονιδιώματος. Οι αλληλουχίες ένθεσης και τα μεταθετά στοιχεία μπορούν επίσης να προάγουν την πλαστικότητα του γονιδιώματος και να επάγουν φαινοτυπικές αλλαγές που συμβάλλουν στη βακτηριακή προσαρμογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα και συγκεκριμένα για τα προπιονικά βακτήρια, η ικανότητα ζύμωσης της λακτόζης (Falentin et al., 2010).

Το *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CIRM-BIA1<sub>T</sub> διαθέτει την ικανότητα μεταβολισμού της λακτόζης αν και η ιδιότητα αυτή εξαρτάται από το στέλεχος, αφού τα γονίδια *Lac* μπορεί να έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς λόγω έκθεσης σε φάγους. Υπό την έννοια αυτή, πρέπει να τονιστεί ότι η παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση θα πρέπει να είναι το μόνο χαρακτηριστικό που επιτρέπει σε αυτά τα βακτήρια να προσαρμοστούν στο περιβάλλον του τυριού.

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος έδειξε επίσης ότι το *P. freudenreichii* διαθέτει έναν πλήρη ενζυμικό μηχανισμό για την *de novo* βιοσύνθεση αμινοξέων και βιταμινών (με εξαίρεση το παντοθενικό οξύ και τη βιοτίνη), γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των πηγών άνθρακα, ανοσία έναντι φάγων, σαπερονίνες για αντοχή στο στρες και αποθήκευση του ανόργανου πολυφωσφορικού και γλυκογόνου (Falentin et al., 2010). Αν και τα προπιονικά βακτήρια συνήθως περιγράφονται ως αναερόβια, όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα απαιτούνται για την αερόβια αναπνοή όπως η NADH αφυδρογονάση, η ηλεκτρική αφυδρογονάση, το σύμπλοκο του κυτοχρώματος bd, η ATPάση και το μονοπάτι για τη σύνθεση της αίμης έχουν ανιχνευθεί στο γονιδίωμα του *P. freudenreichii* (Falentin et al., 2010).

### 3.3. Οικολογία προπιονικών βακτηρίων

Στα περισσότερα τυριά, το *P. freudenreichii* καθώς και άλλα προπιονικά βακτήρια υπάρχουν σε χαμηλούς πληθυσμούς. Στο Emmental και σε παρόμοια τυριά, ωστόσο, το *P. freudenreichii* απαντάται σε υψηλούς πληθυσμούς που φτάνει κατά την ωρίμανση του τυριού τα  $10^9$  cfu/g τυριού. Η υψηλή θερμοανθεκτικότητα του *P. freudenreichii* συγκριτικά με τα άλλα είδη μπορεί να θεωρηθεί ως υπεύθυνη για την επικράτηση του είδους στα τυριά τύπου Emmental όπου το τυρόπηγμα θερμαίνεται στους 50-55 °C για περίπου 30 λεπτά.

### 3.4. Παράγοντες ασφάλειας

Το *P. freudenreichii* έχει μια μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης στη διατροφή του ανθρώπου καθώς και στις ζωοτροφές. Έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognised As Safe) από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) (Mogensen et al., 2002). Το *P. freudenreichii* ανήκει, όπως και το *P. acidipropionici*, στη λίστα των βιολογικών παραγόντων που συνιστώνται για Qualified Presumption of Safety (QPS) από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA, 2009). Το QPS είναι μια γενική προσέγγιση της εκτίμησης του κινδύνου που χρησιμοποιείται από την EFSA για την εναρμόνιση της εκτίμησης των βιολογικών παραγόντων που προορίζονται να ενταχθούν στην τροφική αλυσίδα (Leuschner et al., 2010).

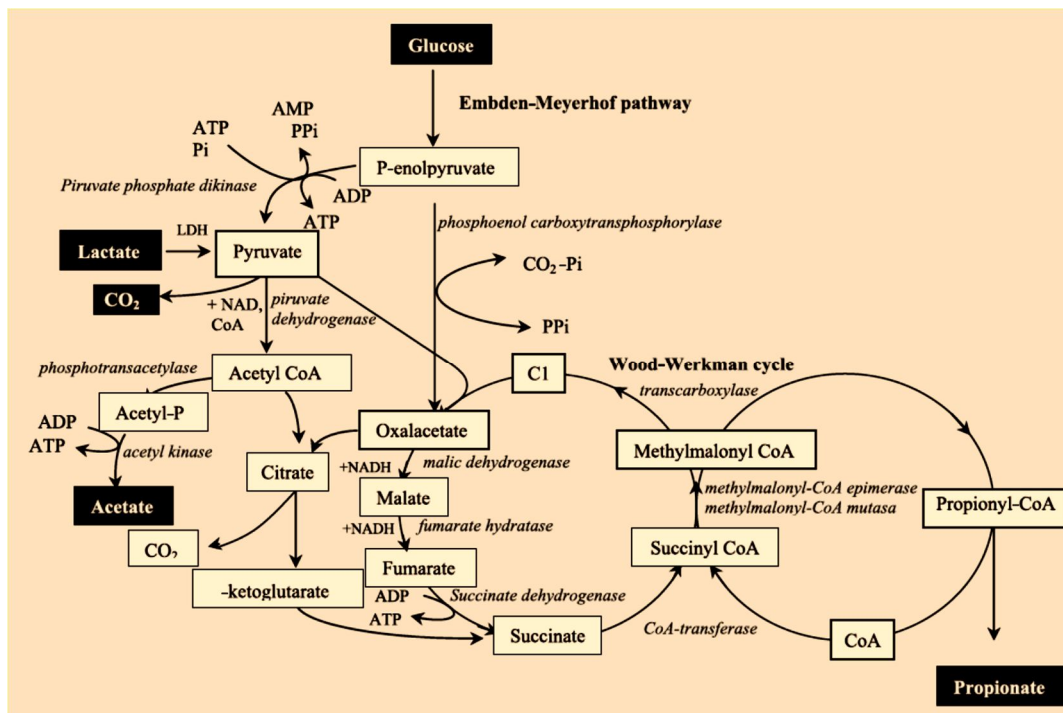
### 3.5. Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των προπιονικών βακτηρίων

Ο μεταβολισμός των προπιονικών βακτηρίων είναι αρκετά πολύπλοκος διότι χρησιμοποιούν ταυτόχρονα διάφορα αλληλεπικαλυπτόμενα μονοπάτια (Hettinga & Reinbold, 1972; Riveteau, 1999; Wood, 1981). Τα προπιονικά βακτήρια είναι αναερόβια έως μικροαερόφιλα. Έχουν χαμηλές διατροφικές απαιτήσεις και είναι ικανά να προσαρμόζονται, να επιβιώνουν και να παραμένουν ενεργά σε διάφορα περιβάλλοντα.

#### 3.5.1. Προπιονική ζύμωση μέσω του κύκλου Wood Werkman

Το *P. freudenreichii* ζυμώνει μια ποικιλία υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πολυολών, όπως η γλυκερόλη, η ερυθριτόλη και η αδονιτόλη, και οργανικών οξέων, όπως το γαλακτικό και το γλυκονικό οξύ (Cummins & Johnson, 1986). Τα κύρια

προϊόντα της ζύμωσης είναι το προπιονικό οξύ, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και το διοξείδιο του άνθρακα. Τα υποστρώματα αρχικά οξειδώνονται προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω γλυκόλυσης ή μέσω της οδού φωσφορικών πεντοζών παράγοντας ATP και ανηγμένα συνένζυμα. Το πυροσταφυλικό οξύ οξειδώνεται προς οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα ή ανάγεται σε προπιονικό οξύ (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Ζύμωση του προπιονικού οξέος στα προπιονικά βακτήρια (Zárate, 2012)

Η αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος προς προπιονικό οξύ λαμβάνει χώρα μέσω ενός κύκλου που ονομάζεται κύκλος της τρανσκαρβοξυλάσης ή Wood Werkman (Crow, 1987; Houwen et al., 1991). Το μονοπάτι αυτό χρησιμοποιεί το NADH που σχηματίζεται κατά τη γλυκόλυση και την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και παράγει επιπλέον ATP. Όλες οι αντιδράσεις του κύκλου της τρανσκαρβοξυλάσης είναι αντιστρεπτές. Μια από τις αντιδράσεις-κλειδιά είναι αυτή της τρανσκαρβοξυλίωσης κατά την οποία μεταφέρεται μία καρβοξυλική ομάδα από το μεθυλο-μηλόνηλο-CoA στο πυροσταφυλικό οξύ για να σχηματιστεί οξαλοξικό οξύ και προπιόνυλο-CoA. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται χωρίς την κατανάλωση ATP και καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυ-τρανσφεράση. Το οξαλοξικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ με τις αντιδράσεις αυτές να καταλύονται από ένζυμα του κύκλου Krebs. Η αναγωγή του φουμαρικού οξέος προς ηλεκτρικό οξύ καταλύεται από την αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, η οποία εμπλέκει αναερόβια μεταφορά

ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα b και παραγωγή ATP. Το ηλεκτρικό οξύ μετατρέπεται σε ηλέκτρο-υλο-CoA ταυτόχρονα με τη μετατροπή του προπιόνυλο-CoA σε προπιονικό οξύ από μια CoA-τρανσφεράση. Το ηλέκτρο-υλο-CoA τελικά ισομερίζεται προς μεθυλο-μηλό-υλο-CoA με την αντίδραση να καταλύεται από τη μούτάση του μεθυλο-μηλό-υλο-CoA. Αυτό το ένζυμο που εξαρτάται από τη βιταμίνη B12 εντοπίζεται μόνο στα προπιονικά βακτήρια.

Τα κύτταρα ρυθμίζουν τις αναλογίες του πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο είτε ανάγεται σε προπιονικό οξύ είτε οξειδώνεται σε οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα ώστε να διατηρηθεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία. Οι αναλογίες του πυροσταφυλικού οξέος που κατευθύνονται σε κάθε μονοπάτι εξαρτώνται από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις ιδιότητες των στελεχών. Για παράδειγμα, η οξείδωση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος οδηγεί σε μια γραμμομοριακή αναλογία προπιονικού και οξικού οξέος 1 προς 2 (δηλαδή 2 mol πυροσταφυλικού οξέος ανάγονται σε προπιονικό οξύ ενώ 1 mol πυροσταφυλικού οξέος οξειδώνεται προς οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα). Αντίθετα, η οξείδωση της γλυκερόλης οδηγεί στην αποκλειστική παραγωγή προπιονικού οξέος. Το *P. freudenreichii* είναι σε θέση να συν-μεταβολίσει το ασπαρτικό και άλλα υποστρώματα, όπως το γαλακτικό οξύ μ' έναν τρόπο που εξαρτάται από το στέλεχος. Το ασπαρτικό απαμινώνεται προς φουμαρικό οξύ, το οποίο ανάγεται περαιτέρω σε ηλεκτρικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή NAD και ATP. Στελέχη που χρησιμοποιούν ασπαρτικό μαζί με γαλακτικό οξύ μετατρέπουν λιγότερο πυροσταφυλικό οξύ σε προπιονικό οξύ και οξειδώνουν περισσότερο πυροσταφυλικό σε οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα προκειμένου να διατηρηθεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία συγκριτικά με εκείνα που μεταβολίζουν μόνο γαλακτικό οξύ.

### 3.5.2. Αναπνοή

Το *P. freudenreichii* συνήθως καλλιεργείται κάτω από αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες και περιγράφεται ως αναερόβιο. Ωστόσο μελέτες αναφέρουν επίσης οξειδωτική δραστηριότητα με ελεύθερο οξυγόνο σε μια πληθώρα υποστρωμάτων στα προπιονικά βακτήρια (Vorobjeva, 1999). Σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, η σύνθεση του κυτοχρώματος c και συνεπώς η ανάπτυξη του *P. freudenreichii* αναστέλλονται. Μια αλλαγή από αναερόβια σε αερόβια καλλιέργεια επάγει την κατανάλωση του προπιονικού οξέος που παράγεται σε αναερόβιες συνθήκες. Μια τέτοια αλλαγή έχει εφαρμοστεί για τη βελτίωση της απόδοσης της παραγωγής της βιταμίνης B<sub>12</sub> (Ye et al., 1999) και της παραγωγής του 1,4-διυδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (Furuichi et al., 2007). Κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ο

αποδέκτης ηλεκτρονίων στο *P. freudenreichii* μπορεί να είναι το θειικό άλας, το φουμαρικό οξύ, το νιτρικό οξύ, η μενακινόνη, ή μια δεξαμενή σιδήρου και χουμικού οξέος στο έδαφος (Benz et al., 1998).

### 3.5.3. Σύνθεση βιταμινών και πορφυρίνης

Το *P. freudenreichii* παρουσιάζει λίγες διατροφικές απαιτήσεις. Είναι σε θέση να συνθέσει όλα τα αμινοξέα και τις περισσότερες βιταμίνες. Μπορεί να αναπτυχθεί σε καθορισμένα θρεπτικά μέσα που περιέχουν μια πηγή άνθρακα και χρησιμοποιούν τα κατιόντα αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ) ως πηγή αζώτου, μέταλλα και βιταμίνες (παντοθενικό, βιοτίνη, θειαμίνη). Συγκεκριμένα μπορεί και συνθέτει τη βιταμίνη B<sub>12</sub> (κοβαλαμίνη), έναν συμπαράγοντα της μούτωσης του μεθυλο-μηλότυλο-CoA μέσω της αναερόβιας οδού, ανεξάρτητα από τις συνθήκες καλλιέργειας (Iida et al., 2007).

### 3.5.4. Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (Extracellular Polymeric Substances, EPS)

Το *P. freudenreichii* παράγει εξωπολυσακχαρίτες (EPS) συμπεριλαμβανομένων τόσο ετεροπολυσακχαριτών όσο και ομοπολυσακχαριτών. Μέχρι σήμερα 2 κύριες δομές εξωπολυσακχαριτών έχουν περιγραφεί σε διαφορετικά στελέχη: ένας ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται από D-γλυκόζη, D-μανόζη και D-γλυκουρονικό οξύ σε μοριακές αναλογίες 2:2:1 κι έναν ομοπολυσακχαρίτη (1→3, 1→2)-β-d-γλυκάνης (Deutsch et al., 2008). Ένας πολυσακχαρίτης του τελευταίου τύπου ταυτοποιήθηκε στο 35% των στελεχών του *P. freudenreichii* (Deutsch et al., 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι ένα μόνο γονίδιο, το *gtf* είναι υπεύθυνο για την σύνθεση αυτού του επιφανειακού πολυσακχαρίτη όπως δείχθηκε σε πειράματα απενεργοποίησης (inactivation) και ετερόλογης έκφρασης σε *Lactococcus lactis* (Deutsch et al., 2010).

## 3.6. Παράγοντες που επιτρέπουν την επί μακρόν επιβίωση

Οι καλλιέργειες των προπιονικών βακτηρίων γαλακτοκομικής προέλευσης παραμένουν ζωντανές για πολλούς μήνες σε θερμοκρασία δωματίου (Cummins & Johnson, 1992). Πράγματι, το *P. freudenreichii* είναι σε θέση να επιβιώνει και να παραμένει ενεργό σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένου του τυριού αλλά και της πεπτικής οδού

(Hervé et al., 2007). Η ικανότητα αυτή μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα του *P. freudenreichii* να συσσωρεύει διάφορες πηγές ενέργειας και άνθρακα.

Το *P. freudenreichii* συσσωρεύει πολυφωσφορικό οξύ (polyP) ως ενεργειακή αποθήκη. Το polyP είναι γραμμικά πολυμερή δεκάδων ή εκατοντάδων καταλοίπων ορθοφωσφορικού που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς φωσφο-ανυδρίτη υψηλής ενέργειας. Η σύνθεσή τους καταλύεται από την πολυφωσφορική κινάση (PPK), η οποία μεταφέρει το τερματικό φωσφορικό του ATP στο polyP. Τα polyPs είναι γνωστό ότι επιτρέπουν στους μικροοργανισμούς να ανταποκρίνονται και να είναι ανθεκτικοί στο στρες. Η συσσώρευση του polyP επίσης ρυθμίζει την ενεργοποίηση της RNA πολυμεράσης RpoS και την σύνθεση του ppGpp, ενός σημαντικού συστατικού στα σηματοδοτικά μονοπάτια (Seufferheld et al., 2008). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούν polyP αντί για ATP καταλύουν αντιστρεπτές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα η πυροφωσφορική φωσφοφρουκτοκινάση στο *P. freudenreichii* η οποία συμμετέχει τόσο στη γλυκόλυση όσο και στη νεογλυκογένεση (Meurice et al., 2004).

Το *P. freudenreichii* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται στα διάφορα στρες που συναντά κατά τις διεργασίες ζύμωσης και σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Οι βιομηχανικές εναρκτήριες καλλιέργειες που προστίθενται στο γάλα για την παραγωγή τυριού προστίθενται σε λυοφιλωμένη μορφή κι έτσι έχουν να προσαρμοστούν στο ωσμωτικό στρες. Κατά την παρασκευή του τυριού Emmental, πρέπει να αντέχει σε διαφορετικά διαδοχικά στρες: θέρμανση από τους 50 °C, οξίνιση του τυροπήγματος σε pH 5,2, ωσμωτικό στρες λόγω της προσθήκης χλωριούχου νατρίου (NaCl) και η χαμηλή θερμοκρασία (4 με 12 °C) στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού. Ορισμένα στελέχη είναι ανθεκτικά στο στρες που προκαλείται από τα οξέα και τα χολικά άλατα που αναπτύσσονται στο πεπτικό σύστημα, το οποίο αποτελεί και προϋπόθεση για τη χρήση τους σαν προβιοτικά (Thierry et al., 2011).

### 3.7. Ρόλος στην ανάπτυξη αρώματος στο τυρί

Η κύρια εφαρμογή του γένους *Propionibacterium* στη βιομηχανία είναι η χρήση των «κλασσικών» προπιονικών βακτηρίων ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παρασκευή τυριών ελβετικού τύπου. Η ονομασία αυτή αναφέρεται σε ποικιλίες τυριών όπως το Sbrinz, το Emmental, το Gruyère, το Compté, το Appenzeler και άλλα τα οποία παρασκευάζονται με νωπό είτε με παστεριωμένο γάλα.

Στα προϊόντα αυτά, τα προπιονικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική πικάντικη γεύση που προκύπτει από την παραγωγή του οξικού και του προπιονικού οξέος,

αμινοξέων, όπως η προλίνη και η λευκίνη, αλλά κυρίως για τον σχηματισμό των χαρακτηριστικών οπών από την απελευθέρωση του CO<sub>2</sub> (Langsrud et al., 1973; Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2004; Thierry et al., 2010). Ωστόσο τα προπιονικά βακτήρια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή διαφόρων τυριών χωρίς οπές για την ενίσχυση του σχηματισμού αρωμάτων (Thierry et al., 2005).

Το *P. freudenreichii* συμβάλλει στο σχηματισμό αρώματος στα τυριά Ελβετικού τύπου παράγοντας ενώσεις αρώματος από 3 κύρια μεταβολικά μονοπάτια: την ζύμωση του γαλακτικού και του ασπαρτικού οξέος, τον καταβολισμό των αμινοξέων και την υδρόλυση του λίπους (Thierry et al., 2005a; Thierry et al., 2005b). Τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης του προπιονικού οξέος θεωρούνται ως ενώσεις αρώματος στο τυρί ενώ ο μεταβολισμός του ασπαρτικού οδηγεί σε επιπλέον παραγωγή CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, στελέχη με υψηλή ικανότητα μεταβολισμού ασπαρτικού οξέος μπορούν να συσχετισθούν με ανεπιθύμητες ρωγμές στο τυρί (Wyder et al., 2001).

Τα προπιονικά βακτήρια καταβολίζουν αμινοξέα με διακλαδισμένη αλυσίδα σε διακλαδισμένες πτητικές ενώσεις. Οι κύριες ενώσεις που παράγονται από το *P. freudenreichii* είναι το 2-μεθυλο-βουτανοϊκό οξύ και το 3-μεθυλο-βουτανοϊκό οξύ (ισοβαλερικό οξύ) τα οποία προκύπτουν από την αποικοδόμηση της λευκίνης και της ισολευκίνης αντίστοιχα. Ο σχηματισμός των μεθυλο-βουτανοϊκών οξέων πραγματοποιείται μέσω τρανσαμίνωσης των διακλαδισμένων αμινοξέων, οδηγώντας στον σχηματισμό κετοξέων που μετατρέπονται περαιτέρω σε οξέα με τη βοήθεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Thierry & Maillard, 2002).

Το *P. freudenreichii* έχει εξέχοντα ρόλο στη λιπόλυση του τυριού καθώς απελευθερώνει ελεύθερα λιπαρά οξέα από το λίπος του τυριού κατά το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού (Dhérbecourt et al., 2010). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι σημαντικές ενώσεις αρώματος σε πολλά τυριά όπως για παράδειγμα το Ελβετικό τυρί. Η λιπολυτική δραστηριότητα του *P. freudenreichii* εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται (Chamba & Perréard, 2002). Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν 10 ενδοκυτταρικές εστεράσες στο γονιδίωμα του *P. freudenreichii*, οι οποίες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην σύνθεση των πτητικών εστέρων που σχετίζονται με τον σχηματισμό φρουτώδους αρώματος στο τυρί (Dhérbecourt et al., 2008).

Σε αντίθεση, το *P. freudenreichii* έχει πολύ χαμηλή καζεϊνολυτική δραστηριότητα. Παρά το γεγονός ότι διαθέτει διάφορες ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες, εμφανίζει μειωμένο ρόλο στη δευτερογενή πρωτεόλυση συγκριτικά με τις εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς δεν συμμετέχει στη λύση στα τυριά (Valence et al., 1998; Gagnaire et al., 2001).



#### 4. Απόπτωση

Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να ταξινομηθεί με βάση (α) μορφολογικά κριτήρια σε απόπτωση, νέκρωση ή αυτοφαγία, (β) ενζυμικά κριτήρια (με και χωρίς τη συμμετοχή νουκλεασών ή διακριτών τάξεων πρωτεασών, όπως οι κασπάσες, οι καλπαΐνες, οι καθεψίνες και οι τρανσγλουταμινάσες), (γ) λειτουργικές πτυχές (προγραμματισμένος, τυχαίος, φυσιολογικός ή παθολογικός) ή (δ) ανοσολογικά χαρακτηριστικά (ανοσογόνα ή μη) (Melino, 2001).

Ο όρος απόπτωση προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις «από» και «πτώση» και αναφέρεται στην πτώση των φύλλων των δέντρων το φθινόπωρο. Η απόπτωση ή PCD (Programmed Cell Death) είναι μια φυσική διαδικασία με την οποία το κύτταρο οδηγείται στον προγραμματισμένο θάνατο. Αντίθετα, η νέκρωση ή νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος ορίζεται ως τυχαίος κυτταρικός θάνατος και χαρακτηρίζεται από αύξηση του όγκου των κυττάρων, διόγκωση των οργανιδίων, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης κι επακόλουθη απώλεια ενδοκυττάρων συστατικών (Golstein & Kroemer, 2007).

##### 4.1. Μορφολογικές αλλαγές στην απόπτωση

Η διαδικασία της απόπτωσης συνοδεύεται από χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης στον πυρήνα είναι η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο κατακερματισμός του πυρήνα, τα οποία συνοδεύονται από μείωση του όγκου του κυττάρου (πύκνωση) και σύμπτυξη των ψευδοποδιών (Kroemer et al., 2005). Η συμπύκνωση της χρωματίνης ξεκινά από την περιφέρεια της πυρηνικής μεμβράνης σχηματίζοντας μια δομή δαχτυλιδιού. Η χρωματίνη συμπυκνώνεται περαιτέρω μέχρις ότου σπάει μέσα σ' ένα κύτταρο με άθικτη μεμβράνη, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται karyorrhexis (Manjo & Joris, 1995). Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, η κυτταροπλασματική μεμβράνη παραμένει άθικτη. Σε μεταγενέστερο στάδιο της απόπτωσης ορισμένα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν διόγκωση της μεμβράνης και τροποποίηση των κυτταροπλασματικών οργανιδίων (Kroemer et al., 2005). Συνήθως τα φαγοκύτταρα περικυκλώνουν πλήρως τα αποπτωτικά κύτταρα πριν προκύψουν τα αποπτωτικά σωμάτια.

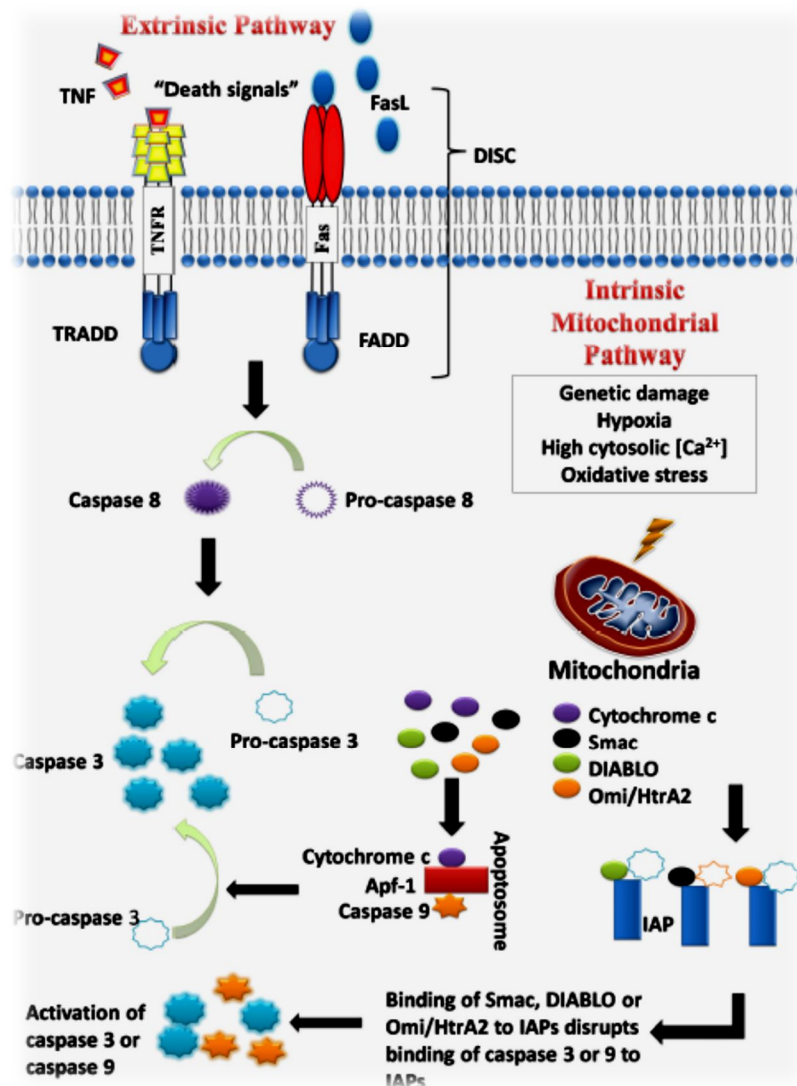
#### 4.2. Βιοχημικές αλλαγές στην απόπτωση

Σε γενικές γραμμές, 3 είναι οι βασικές βιοχημικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την απόπτωση: 1) ενεργοποίηση των κασπασών, 2) αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και του DNA και 3) μεμβρανικές αλλαγές και αναγνώριση από τα φαγοκύτταρα (Kumar et al., 2010). Σε πρώιμα στάδια της απόπτωσης, εκφράζεται η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στα εξωτερικά στρώματα της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία έχει εκκριθεί από τα εσωτερικά στρώματα. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει την έγκαιρη αναγνώριση των νεκρών κυττάρων από τα μακροφάγα, οδηγώντας στην φαγοκυττάρωση χωρίς την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταρικών συστατικών (Hengartner, 2000). Αυτό ακολουθείται από τον κατακερματισμό του DNA σε μεγάλα τμήματα μεγέθους 50-300 kb (Vaux & Silke, 2003). Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται ενδοπυρηνική διάσπαση του DNA από τις ενδονουκλεάσες σε ολιγονουκλεοσωματίδια. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η ενεργοποίηση μιας ομάδας ενζύμων, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών και ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες χρησιμοποιούν ένα κατάλοιπο Cys (κυστεΐνης) στο ενεργό τους κέντρο και κόβουν το υπόστρωμα μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (Asp) (Kumar et al., 2010). Οι ενεργές κασπάσες αποικοδομούν ζωτικής σημασίας κυτταρικές πρωτεΐνες, το πυρηνικό ικρίωμα και είναι υπεύθυνες για την αποδιάταξη του κυτταροσκελετού. Επίσης ενεργοποιούν τις DNάσες, οι οποίες αποικοδομούν περαιτέρω το DNA (Lavrik et al., 2005). Παρόλο που οι βιοχημικές αλλαγές μπορούν να εξηγήσουν εν μέρει κάποιες από τις μορφολογικές αλλαγές στην απόπτωση, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι βιοχημικές αναλύσεις της αποικοδόμησης του DNA ή της ενεργοποίησης των κασπασών δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την απόπτωση, καθώς η απόπτωση μπορεί να προκύψει χωρίς την ολιγονουκλεοσωμική κατάτμηση του DNA και μπορεί να είναι ανεξάρτητη από τη δράση των κασπασών (Galluzi et al., 2007).

#### 4.3. Αποπτωτικά μονοπάτια

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι εξαιρετικά σύνθετοι και περίπλοκοι και περιλαμβάνουν έναν καταρράκτη μοριακών γεγονότων. Οι κασπάσες εντοπίζονται στο επίκεντρο του μηχανισμού της απόπτωσης καθώς είναι υπεύθυνες τόσο για την έναρξη όσο και για την εκτέλεση της απόπτωσης. Υπάρχουν 3 κύριες οδοί μέσω των οποίων ενεργοποιούνται οι κασπάσες. Οι δύο πιο κοινές οδοί είναι το εξωγενές μονοπάτι και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (**Σχήμα 7**). Και τα δύο μονοπάτια τελικά οδηγούν σε

ένα κοινό μονοπάτι, το εκτελεστικό. Ένα τρίτο λιγότερο γνωστό μονοπάτι έναρξης είναι το ενδογενές ενδοπλασματικό μονοπάτι.



Σχήμα 7: Το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι. (Wong, 2011)

#### 4.3.1. Εξωγενές μονοπάτι

Το εξωγενές μονοπάτι σηματοδότησης, όπως υπονοείται από το όνομά του, ξεκινά όταν οι υποδοχείς θανάτου δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα θανάτου. Αν και αρκετοί υποδοχείς θανάτου έχουν περιγραφεί, ο καλύτερα χαρακτηρισμένος υποδοχέας είναι ο τύπου 1 Tumor Necrosis Factor (TNF-R1) και ένας άλλος είναι ο Fas ή CD95. Οι αντίστοιχοι προσδέτες ονομάζονται TNF και FasL (Hengartner, 2000).

Ένας αριθμός πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση, «στρατολογούνται» από τους υποδοχείς θανάτου μέσω ενδιάμεσων πρωτεϊνών-προσαρμοστών που συνδέονται στους υποδοχείς θανάτου ή σε άλλα στοιχεία του σηματοδοτικού συμπλέγματος που δημιουργείται από τους υποδοχείς θανάτου (DISC: Death-Inducing Signaling Complex). Το ρόλο ενδιάμεσων πρωτεϊνών-προσαρμοστών παίζουν οι FADD (Fas-associated death domain), TRADD (TNF-receptor-associated death domain), RIP1 (receptor interacting protein kinase 1) και η DAXX (death associated protein). Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν περιοχές θανάτου (Death Domain, DD) οι οποίες αναγνωρίζουν και συνδέονται στις DD της ενδοκυτταρικής περιοχής των υποδοχέων θανάτου. Δημιουργούν έτσι μια σκαλωσιά η οποία συντελεί στην στρατολόγηση και σύνδεση των διαφόρων συστατικών του DISC (Ζίφα Α., 2010). Το DISC στη συνέχεια ενεργοποιεί την προ-κασπάση 8. Η ενεργοποιημένη μορφή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της απόπτωσης αφού ενεργοποιεί πρωτεολυτικά τις κασπάσες-τελεστές οδηγώντας το κύτταρο στο θάνατο (Karp, 2008).

#### 4.3.2. Ενδογενές μονοπάτι

Όπως υποδηλώνεται και από το όνομα, το ενδογενές μονοπάτι λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό του κυττάρου. Εσωτερικά ερεθίσματα όπως η ανεπανόρθωτη γενετική βλάβη, η υποξία, η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση κυτοσολικού  $Ca^{2+}$  καθώς και το οξειδωτικό στρες πυροδοτούν το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Karp, 2008). Ανεξάρτητα από το ερέθισμα, το μονοπάτι αυτό είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης μιτοχονδριακής διαπερατότητας και της απελευθέρωσης προ-αποπτωτικών μορίων, όπως το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα (Danial & Korsmeyer, 2004). Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζεται από μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2. Υπάρχουν 2 κύριες ομάδες των Bcl-2 πρωτεϊνών, οι προ-αποπτωτικές (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bim και Hrk) και οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 και Mcl-1) (Tsujiimoto, 1984). Ενώ οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν την απόπτωση αναστέλλοντας τη μιτοχονδριακή απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες δρουν προάγοντας την απελευθέρωσή του. Άλλοι αποπτωτικοί παράγοντες οι οποίοι απελευθερώνονται από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα είναι ο AIF (apoptosis inducing factor), ο Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), ο DIABLO (direct IAP Binding protein with low pI) και η HtrA2 (Omi/high temperature requirement protein A) (Kroemer et al., 2007). Η κυτταροπλασματική απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ενεργοποιεί την κασπάση 3 μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου γνωστό ως αποπτώσωμα

το οποίο απαρτίζεται από το κυτόχρωμα c, το Araf-1 (Apoptosis activating factor 1) και την κασπάση 9. Από την άλλη πλευρά το Smac/DIABLO ή το Omi/HtrA2 προάγει την ενεργοποίηση των κασπασών με το να δεσμεύεται σε πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν την απόπτωση (IAPs, inhibitor of apoptosis proteins). Αυτό έχει ως συνέπεια τη διαταραχή της αλληλεπίδρασης των IAPs με την κασπάση 3 ή την κασπάση 9 (LaCasse et al., 2008).

#### 4.3.3. Εκτελεστικό μονοπάτι

Το εκτελεστικό μονοπάτι εμπλέκει την ενεργοποίηση μιας σειράς κασπασών. Η αναρροϊκή κασπάση για το ενδογενές μονοπάτι είναι η κασπάση 9 ενώ για το εξωγενές, η κασπάση 8. Τόσο το εξωγενές όσο και το μιτοχondριακό μονοπάτι συγκλίνουν στην κασπάση 3 η οποία με τη σειρά της διασπά τον αναστολέα της επαγόμενης από κασπάσες δεοξυριβονουκλεάσης που είναι υπεύθυνος για την πυρηνική απόπτωση (Ghobrial et al., 2005). Επιπλέον, οι καταρροϊκές κασπάσες επάγουν τη διάσπαση των κινασών, των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA και των ανασταλτικών υπομονάδων της οικογένειας των ενδονουκλεασών. Μπορούν επίσης να επιδρούν στον κυτταροσκελετό, στον κυτταρικό κύκλο και στα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία από κοινού συμβάλλουν στις μορφολογικές μεταβολές στην απόπτωση.

#### 4.4. Καρκίνος του παχέος εντέρου και απόπτωση

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer, CRC) είναι ο τρίτος πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου στις Δυτικές χώρες (Kumar et al., 2007). Σε παγκόσμια κλίμακα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου προσβάλλει πάνω από 1 εκατομμύριο ανθρώπους ετησίως και είναι υπεύθυνος για το θάνατο πάνω από 500.000 ανθρώπους (Huerta et al., 2006). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), έως και το 2030, 17 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν πεθάνει από αυτόν τον τύπο καρκίνου, 27 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν προσβληθεί από την νόσο και 75 εκατομμύρια άνθρωποι θα είναι φορείς της ασθένειας (INCA, 2008; Stein et al., 2012).

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αναπτύσσεται από την συσσώρευση μεταλλάξεων, αρχής γενομένης από τα βλαστικά κύτταρα στη βάση των κρυπτών (Barker et al., 2009) και σε πρώιμο στάδιο εμφανίζεται ως μη κακοήθης πολύποδας (Jemal et al., 2011). Η συχνότητα εμφάνισης του CRC μπορεί να συνδεθεί με έναν αριθμό γενετικών παραγόντων, όπως οι γαμετικές μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης και στο γονίδιο APC (Adenomatous

Polyposis Coli, APC) (de Miranda et al., 2009). Εκτός από τη γενετική προδιάθεση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή και ο τρόπος ζωής παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση του κινδύνου CRC (Steffensen et al., 1997). Έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι μια δίαιτα πλούσια σε κόκκινο κρέας και επεξεργασμένα τρόφιμα με χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών αυξάνει την συχνότητα εμφάνισης του CRC (Ahmed, 2007). Αυτός ο τρόπος ζωής και διατροφής οδηγεί επίσης σε διαταραχές στο εντερικό περιβάλλον συμπεριλαμβανομένης της μικροχλωρίδας και του περιεχομένου του αυλού (Zhu et al., 2011).

Πέρα από τους περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες, προδιάθεση για CRC προκαλεί επίσης η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Η ελκώδης κολίτιδα αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου με τους όγκους να αρχίζουν να εμφανίζονται 5-8 έτη μετά την ανάπτυξη της νόσου. Ο κίνδυνος για τους ασθενείς που πάσχουν από κοκκιωματώδη κολίτιδα (νόσος του Crohn) είναι μικρότερος από αυτούς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα, αλλά εξακολουθεί να είναι 4-20 φορές υψηλότερος από το γενικό πληθυσμό (Yang et al., 2009).

Η πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι κακή με ποσοστό επιβίωσης 30-63% (5 έτη) και 10% στην περίπτωση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Geier et al. 2006; Gill & Rowland, 2002).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο εντερικός βλεννογόνος υποβάλλεται σε μια διαδικασία διαρκούς ανανέωσης των κυττάρων του, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κανονικής λειτουργίας του. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται στην κρύπτη ενώ η διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια μιας ταχείας, ομαλής μετάβασης στις λάχνες. Τα διαφοροποιημένα εντερικά κύτταρα, τα οποία συνιστούν την πλειοψηφία των κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο υποβάλλονται σε μια διαδικασία αυθόρμητης απόπτωσης. Στο λεπτό έντερο, ανιχνεύθηκε μια υψηλότερη συχνότητα απόπτωσης στις θέσεις 4 και 5 από την κρύπτη, οι οποίες αποτελούν την θέση των βλαστοκυττάρων (Potten et al., 1997). Ως εκ τούτου, η αυθόρμητη απόπτωση στην κρύπτη μπορεί να είναι υπεύθυνη για την εξάλειψη των πρόσθετων βλαστικών κυττάρων. Το υψηλό ποσοστό της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στην ίδια θέση υποστηρίζει περαιτέρω την υπόθεση αυτή.

Τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου τα οποία εντοπίζονται στο κάτω μέρος μιας κρύπτης, πολλαπλασιάζονται ώστε να σχηματίσουν θυγατρικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα και αποικίζουν τις κρύπτες και διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά, κυπελλοειδή και εντεροενδοκρινικά κύτταρα (Bach et al., 2000). Καθώς τα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύουν στο ανώτερο τμήμα της κρύπτης χάνουν την ικανότητα

πολλαπλασιασμού αν και συνεχίζουν να διαφοροποιούνται. Λίγες μέρες αργότερα, τα διαφοροποιημένα εντερικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση κι αποβάλλονται (Strater et al., 1995). Η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου λαμβάνει χώρα κυρίως στην επιφάνεια του αυλού. Η απόπτωση αυτού του τύπου συνδέεται με την πρωτεΐνη Bcl-2 καθώς έχειδειχθεί ότι όταν έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη απενεργοποίηση (knocked-out) του γονιδίου *Bcl-2*, αυξάνεται ο ρυθμός της απόπτωσης στις θέσεις 1 και 2 από το κάτω μέρος της κρύπτης του παχέος εντέρου που είναι και η θέση των βλαστικών κυττάρων στην κρύπτη του παχέος εντέρου (Merritt et al., 1995).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, στην περίπτωση αδενωματώδους πολύποδα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται στην επιφάνεια του αυλού ενώ η απόπτωση στο κάτω μέρος της κρύπτης (Regitnig & Denk, 2000).

Όλο και περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι η συχνότητα των αποπτωτικών θανάτων στα καρκινώματα είναι υψηλότερος από ότι στα αδενώματα (Carr, 2000; Nomura et al., 2000). Αυτό ωστόσο φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με τη γενική ιδέα ότι η μειωμένη απόπτωση συνδέεται με την πρόοδο του καρκίνου. Παρ' όλ' αυτά η εξέλιξη του όγκου σχετίζεται με ανισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης (Anti et al., 2001; Melen-Mucha & Niewiadomska, 2002) και όχι απαραίτητα με μειωμένο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η αυξημένη κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στους όγκους μπορεί να αυξήσει την απόπτωση λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών, ανταγωνισμό για αυξητικούς παράγοντες και παροχή οξυγόνου (Evan & Littlewood, 1998). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το επίπεδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σχετίζεται με τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε αδενώματα και καρκινώματα (Arai & Kino 1995; Evertsson et al., 1999; Sinicrope et al., 1999; Carr, 2000).

#### 4.5. Προπιονικά βακτήρια και καρκίνος

Η σημαντική επίδραση της διατροφής στον επιπολασμό του καρκίνου του παχέος εντέρου είχε ως αποτέλεσμα τον σχεδιασμό ειδικής διατροφής και τη δημιουργία διατροφικών συμπληρωμάτων ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου. Τα προβιοτικά είναι μη παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν προσλαμβάνονται σε κατάλληλη ποσότητα, ασκούν θετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή (FAO/WHO, 2006). Έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την εντερική φυσιολογία είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της ρύθμισης της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Ανάμεσα στα βακτήρια, τα οποία έχουνδειχθεί ότι έχουν προβιοτικές ιδιότητες ανήκουν και τα προπιονικά βακτήρια. Ο μεταβολισμός των

PAB βασίζεται στην αναερόβια μετατροπή των υδατανθράκων και του γαλακτικού οξέος σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acids, SCFAs), κυρίως προπιονικό και οξικό οξύ (Britz & Steyn, 1979).

Τα λιπαρά οξέα είναι βασικά, βιοενεργά, αλειφατικά μονοκαρβοξυλικά οξέα, τα οποία κατηγοριοποιούνται με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στην αλειφατική τους αλυσίδα. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας αποτελούνται από τα: οξικό οξύ (C2:0), προπιονικό (C3:0), βουτυρικό (C4:0), βαλερικό (C5:0) και καπροϊκό οξύ (C6:0) (Hinnebusch et al., 2002). Τα SCFAs παράγονται στο εγγύς κόλον με μια μέση γραμμομοριακή αναλογία οξικού: προπιονικού: βουτυρικού ίση με 60:25:10 mmol/L. Ο λόγος αυτός ωστόσο δεν είναι σταθερός αλλά προσδιορίζεται από το είδος του υποστρώματος που ζυμώνεται (Schepbach et al., 1995). Τα SCFAs αποτελούν το κύριο καύσιμο των εντερικών κυττάρων και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας, την προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης, τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικές σειρές της γαστρεντερικής οδού. Τα SCFAs ανήκουν σε μια τάξη προ-φαρμάκων γνωστή ως αναστολείς της αποακετυλάσης των ιστονών (HDACI), οι οποίες οδηγούν σε υπερακετυλίωση των ιστονών (H3, H4). Η υπερακετυλίωση των ιστονών διακόπτει τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις με το γειτονικό DNA, οδηγώντας σε λιγότερο συμπυκνωμένη χρωματίνη και επιτρέποντας στους μεταγραφικούς παράγοντες να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένα γονίδια (Grunstein, 1997). Οι HDACI τροποποιούν τα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται σε διαφορετικά μοντέλα όγκων, επάγοντας απόπτωση και τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου και αναδύονται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Jones et al., 2008; Wilson et al., 2006; Hinnebusch et al., 2002). Τα SCFAs τροποποιούν τον κυτταρικό κύκλο προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση κι έτσι μπορεί να είναι κατάλληλα ως συμπληρωματικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, καθώς η πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου εκφράζουν μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, οι οποίες επιτρέπουν την αποφυγή της παύσης του κυτταρικού κύκλου (Gryfe et al., 1997).

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου είναι ο πρωταρχικός ρυθμιστής της ομοιόστασης μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης (Wang et al., 2000). Η μειωμένη διαθεσιμότητα των βασικών αντι-οξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη (GSH), διεγείρει τα νεοπλασματικά κύτταρα να υποστούν απόπτωση, αντιπροσωπεύοντας ένα μηχανισμό μέσω του οποίου ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να αυξηθεί σε χημειοθεραπευτικά καθεστώτα (Aw, 1999).



## 5. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η παρασκευή λευκού τυριού άλμης με την χρήση προπιονικών βακτηρίων ως δευτερεύουσα καλλιέργεια και η *in vitro* μελέτη του συστήματος του τυριού για τη διερεύνηση ύπαρξης αντικαρκινικών ιδιοτήτων.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν:

- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 87 (*L. bulgaricus*), το οποίο απομονώθηκε από γιαούρτη.
- *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 29 (*S. thermophilus*), το οποίο απομονώθηκε από γιαούρτη.
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* LMG 16412<sup>T</sup> (*P. freudenreichii*), το οποίο απομονώθηκε από Ελβετικό τυρί.
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* LMG 16413 (*P. freudenreichii*), το οποίο απομονώθηκε από παρμεζάνα.
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* LMG 16423 (*P. freudenreichii*), το οποίο απομονώθηκε από πρόβειο γάλα.
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> (*P. shermanii*), το οποίο απομονώθηκε από τυρί Gruyère.

Τα στελέχη *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29 ανήκουν στην συλλογή ACA-DC του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας (Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου). Τα στελέχη των προπιονιβακτηρίων με κωδικό LMG ανήκουν στην συλλογή BCCM/LMG Bacteria Collection (Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium).

### 2. Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν:

- **HT-29:** Ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου. (ATCC, American Tissue Culture Collection). Όλα τα πειράματα με τα HT-29 κύτταρα πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης.

### 3. Επιλογή στελέχους προπιονικού βακτηρίου για τις τυροκομήσεις

Για την επιλογή του κατάλληλου στελέχους προπιονικού βακτηρίου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάπτυξης των στελεχών *P. freudenreichii* LMG 16412<sup>T</sup>, *P. freudenreichii* LMG 16413, *P. freudenreichii* LMG 16423 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> σε γάλα UHT full fat. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε για κάθε στέλεχος ήταν 1% (v/v) και 2% (v/v) και αξιολογήθηκε η ικανότητα των στελεχών να μειώνουν το pH του γάλακτος μέσα σε διάστημα 10 ημερών.

### 4. Επιλογή θρεπτικού υλικού για την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών

Για την ανίχνευση των στελεχών *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29 καθώς και του *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων, τα ανωτέρω στελέχη αναπτύχθηκαν σε διάφορους συνδυασμούς στα εν δυνάμει επιλεκτικά θρεπτικά μέσα: MRS agar pH 5,2 στους 45 °C, αναερόβια για 72h, M17L agar (1% λακτόζη w/v) στους 45 °C, αερόβια για 24 h και Pal Propriobac στους 30 °C, αναερόβια για 6 ημέρες (Ashraf R. & Shah N. P., 2011). Πιο συγκεκριμένα, αναπτυχθήκαν μεμονωμένα τα στελέχη, ο συνδυασμός των στελεχών *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29 αλλά και τα τρία στελέχη συνδυαστικά σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά.

### 5. Προσομοίωση συμπεριφοράς στελεχών στο γάλα

Προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά των στελεχών *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> στο γάλα πριν ξεκινήσουν οι τυροκομήσεις, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των μεμονωμένων στελεχών αλλά και συνδυασμός τους σε γάλα UHT full fat για διάστημα 5 ημερών. Οι συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν ήταν: α) *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29 και β) *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια του πειράματος ήταν γάλα UHT full fat ανεμβολίαστο. Στο χρονικό διάστημα αυτό μετρήθηκε το pH των καλλιιεργειών (0 h έως 120 h) και καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί (0 έως 4 d).

## 6. Τυροκομήσεις

Για την παρασκευή λευκού τυριού άλμης χρησιμοποιήθηκε πρόβειο γάλα από τον Ασπρότυργο καθώς επίσης και 2 διαφορετικοί συνδυασμοί καλλιέργειών. Ο πρώτος συνδυασμός (Α, μάρτυρας) περιείχε τις εναρκτήριες καλλιέργειες *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, σε ποσοστό 1% (v/v) η κάθε μία. Ο δεύτερος συνδυασμός (Β) περιείχε τις εναρκτήριες καλλιέργειες μαζί με την συμπληρωματική καλλιέργεια *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>, σε ποσοστό 1% (v/v) η κάθε μία.

Όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε RCM broth στους -80 °C που περιείχε γλυκερόλη (20% v/v). Πριν από τις τυροκομήσεις, οι εναρκτήριες καλλιέργειες ανανεώθηκαν 1 φορά σε γάλα UHT full fat (1% v/v) για 48 h στους 37 °C, μικροαερόφιλα. Αντίθετα, το *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> ανανεώθηκε 3 φορές σε γάλα UHT full fat (1% v/v) για 72h στους 37 °C, μικροαερόφιλα.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις τυροκομήσεις σε διάστημα τριών συνεχόμενων εβδομάδων. Σε κάθε τυροκόμηση παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικά τυριά από πρόβειο γάλα, σε δύο διαφορετικά καζάνια (Α και Β) χρησιμοποιώντας τους συνδυασμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αρχικά, το γάλα παστεριώθηκε στους 68 °C για 10 min κι έπειτα ψύχθηκε αμέσως στους 35 °C. Ακολούθως, εφαρμόστηκε η τεχνολογία παρασκευής της Φέτας όπως αυτή περιγράφηκε από τον Ανυφαντάκη (1993). Κατά τη διάρκεια της παρασκευής και της ωρίμανσης του λευκού τυριού άλμης ελήφθησαν δείγματα από το εσωτερικό της με σκοπό την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών αναλύσεων (0, 1, 6, 15, 30 και 60 ημέρες).

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**) παρουσιάζονται τα στάδια που ακολουθήθηκαν καθώς και οι χρόνοι που τηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων τόσο του Α όσο και του Β τυριού. Μετά την παστερίωση του γάλακτος προστέθηκε το χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>) καθώς και οι εναρκτήριες καλλιέργειες. Μετά το πέρας 10 min, χρόνος απαραίτητος ώστε να δράσουν οι εναρκτήριες καλλιέργειες, προστέθηκε η πυτιά. Συνολικά ο χρόνος που χρειάστηκε για να πραγματοποιηθεί η πήξη του γάλακτος ήταν 45 min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διαίρεση του πήγματος με μαχαίρι και τα τμήματα του πήγματος μεταφέρθηκαν στα προκαθορισμένα καλούπια ώστε να πραγματοποιηθεί στράγγιση του πήγματος. Τέλος τα καλούπια μεταφέρθηκαν στον ειδικό θάλαμο ωρίμανσης (18 °C).

Πίνακας 1: Στοιχεία τυροκόμησης

A	B
CaCl <sub>2</sub> (v/v)	
Προσθήκη εναρκτήριων καλλιιεργειών	
Προσθήκη καλλιέργειας <i>P. shermanii</i> LMG 16424	
Προσθήκη πυτιάς (3% w/v)	
Χρόνος πρόπησης α-φάση (16 min)	
Διάρκεια πήξης β-φάση (≈36 min)	
Χρόνος πήξης (45 min)	
Διάρκεια με μαχαίρι	
Μεταφορά σε καλούπι	
pH στο καλούπι: 6,65/24 °C	pH στο καλούπι: 6,62/24 °C
Μεταφορά πήγματος στο θάλαμο ωρίμανσης μετά το πέρας 1h	

## 7. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, 10 g δείγματος τυριού αναμείχθηκαν με 90 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και ομογενοποιήθηκαν για 1 min σε συσκευή Stomacher 400 (Seward-Laboratory Blender, BA 7021, London SE1 1PP, UK). Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (IDF Standard No 122C, 1996). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν εκφράστηκαν σε cfu/ml.

Καταμετρήθηκαν οι παρακάτω ομάδες μικροοργανισμών υπό τις εξής συνθήκες:

- Θερμόφιλοι βάκλιοι σε MRS agar (pH 5,2) στους 45 °C για 72 h, αναερόβια,
- Μεσόφιλοι κόκκοι σε M17 agar στους 30 °C για 48 h, αερόβια.
- Θερμόφιλοι κόκκοι σε M17 agar με προσθήκη 1% (w/v) λακτόζης στους 45 °C για 48 h, αερόβια.
- Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) σε Rogosa agar στους 30 °C για 3-5 ημέρες αναερόβια.
- Εντερόκοκκοι σε KAA agar στους 37 °C για 24 h, αερόβια (στ) Κολοβακτηρίδια σε VRBA στους 37 °C για 24 h, αναερόβια.
- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα σε PCA στους 30 °C για 72 h, αερόβια και
- Προπιονικά Βακτήρια σε Pal Propriobac στους 30 °C για 6-8 ημέρες, αναερόβια.

## 8. Φυσικοχημικές αναλύσεις

### 8.1 Χημική σύσταση του γάλακτος

Η χημική σύσταση του γάλακτος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις τυροκομήσεις προσδιορίστηκε με την χρήση του Milkoscan 133 (A/S N. Foss Electronic, Denmark).

### 8.2 Προσδιορισμός του pH

Πραγματοποιήθηκε με τη βύθιση ηλεκτροδίου (Metrohm Herisau, 632 pH-Meter, Switzerland) στη μάζα του τυριού.

### 8.3 Προσδιορισμός της υγρασίας των τυριών

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, αποξηράθηκε συγκεκριμένη ποσότητα τυριού σε κλίβανο στους 105 °C όπως περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά προστέθηκαν 20 g αλατιού σε πορσελάνινη κάψα, στην οποία προστέθηκε γυάλινη ράβδος ανάδευσης με πεπλατυσμένα άκρα και εν συνεχεία προσεκτικά με την χρήση λαβίδας, τοποθετήθηκε η πορσελάνινη κάψα σε ξηραντήριο ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς να επιτραπεί η πρόσληψη υγρασίας. Λήφθηκε με ακρίβεια το απόβαρο της κάψας και η μέτρηση καταγράφηκε. Στην συνέχεια, προστέθηκαν γρήγορα 3 g περίπου από το ομογενοποιημένο δείγμα τυριού με τη βοήθεια κουταλιού μέσα στην κάψα, λήφθηκε το μεικτό βάρος της και η μέτρηση καταγράφηκε. Ακολούθησε καλή ανάμιξη του δείγματος τυριού με το αλάτι με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ομοιόμορφη κατανομή του περιεχομένου στο διαθέσιμο χώρο της κάψας. Η κάψα και το περιεχόμενό της τοποθετήθηκαν στον κλίβανο 105±1 °C για την αποξήρανση. Μετά από 24 h περίπου οι κάψες εξήχθησαν από τον κλίβανο, ζυγίστηκαν και η μέτρηση καταγράφηκε. Η υγρασία των τυριών υπολογίστηκε από τον κάτωθι τύπο:

$$\% \text{ ξηρή ουσία} = \frac{\text{μικτό βάρος μετά την ξήρανση} - \text{απόβαρο κάψας}}{\text{μικτό βάρος πριν την ξήρανση} - \text{απόβαρο κάψας}}$$

$$\% \text{ υγρασία} = 100 - \text{ξηρή ουσία}$$

## 8.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC

### 8.4.1. Προετοιμασία δειγμάτων για την HPLC

Αρχικά, ζυγίστηκαν 2 g λευκού τυριού άλμης στα διάφορα στάδια της δειγματοληψίας, τοποθετήθηκαν σε σακούλα stomacher και προστέθηκαν 10 ml απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας 40 °C. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα stomacher για 5 min ώστε να επιτευχθεί ομογενοποίησή τους. Ρυθμίστηκε το pH στο 4,5-4,6 με διάλυμα HCl κανονικότητας 5N και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C για 1 h. Μοιράστηκε η ποσότητα του διαλύματος σε σωληνάκια Eppendorf χωρητικότητας 2 ml. Τα κύτταρα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση (12500 rpm/min, 30 min, 4 °C; Heraeus Sepatech, Biofuge 22R) και η υπερκείμενη φάση διηθήθηκε από φίλτρο Whatman No 40. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της υπερκείμενης φάσης στις 12500 rpm/min για 60 min στους 4 °C και τέλος η υπερκείμενη φάση διηθήθηκε από φίλτρο πορώδους 0,22.

### 8.4.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων και οργανικών οξέων, πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η λακτόζη, το κιτρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, η γαλακτόζη, το προπιονικό οξύ και το οξικό οξύ με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC, Varian Associates Inc., 2010, CA, USA). Κατά την ανάλυση έγινε ένεση δείγματος όγκου 20 μl σε στήλη Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, Hercules, CA, USA) συνδεδεμένη σε ανιχνευτή δείκτη διαθλάσεως (GBC Scientific Equipment Pty Ltd, LC 1240, Victoria, Australia). Οι συγκεντρώσεις τόσο των οργανικών οξέων όσο και των σακχάρων υπολογίστηκαν βάσει των δεδομένων που δίνει ο RI ανιχνευτής. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με κινητή φάση 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> υπό σταθερή θερμοκρασία 60 °C και με ταχύτητα ροής 0,5 ml/min. Η συλλογή και ανάλυση των δεδομένων έγινε με το καταγραφικό 746 Data Module (Waters Corporation, Milford, USA).

## 9. Οργανοληπτικός έλεγχος

Σε δείγματα του ώριμου λευκού τυριού άλμης (60 μέρες) πραγματοποιήθηκε τυφλός οργανοληπτικός έλεγχος από μια 14-μελή ομάδα του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας (Τμήμα

Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Τα δείγματα αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν ως προς την εμφάνιση (0-10), τη δομή (0-40) και τη γεύση (0-50). Η δομή χαρακτηρίστηκε ως μαλακή, ημίσκληρη και σκληρή ενώ η γεύση αξιολογήθηκε ως ευχάριστα όξινη, όξινη, πικάντικη, ταγγισμένη, αλμυρή και πικρή. Τέλος, τα τυριά αξιολογήθηκαν και ως προς την αγοραστική τους δύναμη. Οι συγκρίσεις έγιναν τόσο μεταξύ των τυριών από τις 3 διαφορετικές τυροκομήσεις όσο και με ένα λευκό τυρί άλμης του εμπορίου.

## **10. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών στα κύτταρα HT-29**

### 10.1 Προετοιμασία των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών για πειράματα με την κυτταρική σειρά HT29

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των τυριών Α και Β για τα κύτταρα HT-29 είναι ίδιο με αυτό που ακολουθήθηκε στην § 8.3α με ορισμένες διαφοροποιήσεις που περιγράφονται παρακάτω. Αρχικά, ζυγίστηκαν 10 g ώριμου λευκού τυριού άλμης (60 d), τοποθετήθηκαν σε σακούλα stomacher και προστέθηκαν 10 ml απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας 40 °C. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα stomacher για 5 min ώστε να επιτευχθεί ομογενοποίησή τους. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Στο διάλυμα της πρώτης επανάληψης, ρυθμίστηκε το pH στο 7 με διάλυμα NaOH κανονικότητας 5N και ακολούθως τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C για 1 h ενώ δεν πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH της δεύτερης επανάληψης. Ωστόσο μετρήθηκε το pH του και ανιχνεύθηκε στο 4,5-4,6.

### 10.2 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη (τρυψινοποίηση)

Όλες οι διαδικασίες για την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες, ενώ αποστειρωμένα ήταν επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> με 10 ml πλήρους υλικού, στους 37, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και σε υγρασία 95%. Η καλλιέργεια των κυττάρων HT-29 έγινε με υλικό κυτταροκαλλιέργειας DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) εμπλουτισμένο με 1 mM πυροσταφυλικού νατρίου, 2 mM L-γλουταμίνης, 50 U/ml πενικιλίνης και 50 μg/ml στρεπτομυκίνης παρουσία ορού εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) τελικής συγκέντρωσης 10% (v/v). Το διάλυμα τρυψίνης παρασκευάστηκε από



10 φορές συμπυκνωμένο διάλυμα μετά από αραιώση και προσθήκη κιτρικού νατρίου σε συγκέντρωση 10 mM.

Η ανακαλλιέργεια με τρυψίνη πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει όλο το ταπήτιο του τρυβλίου (80% πληρότητα), καθώς δεν υπάρχει άλλος χώρος προκειμένου να αναπτυχθούν περαιτέρω. Σε πρώτη φάση, παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και ελέγχεται η μορφολογία τους αλλά και η πληρότητα του ταπητίου τους (confluency). Έπειτα απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και γίνεται έκπλυση με 5 ml διαλύματος τρυψίνης 0,25% (w/v)/κιτρικού νατρίου 10 mM. Στη συνέχεια απομακρύνεται η τρυψίνη και προστίθενται 3 ml διαλύματος τρυψίνης και ανακινείται η φλάσκα προκειμένου να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της φλάσκας με το διάλυμα της τρυψίνης. Ακολούθησε επώαση μέχρι τα κύτταρα να συρρικνωθούν και να στρογγυλοποιηθούν. Ακολούθως, όλη η ποσότητα του διαλύματος της τρυψίνης απομακρύνεται και η αποκόλληση των κυττάρων γίνεται με ήπια μηχανική ανατάραξη της φλάσκας. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσία ορού, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αδρανοποίηση της τρυψίνης και μοιράζονται σε νέες φλάσκες με λόγο κατανομής (split ratio) 1:10.

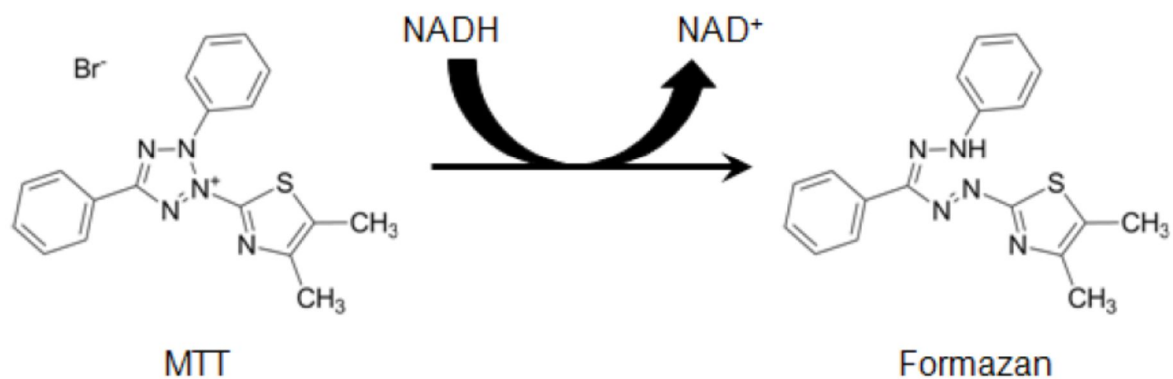
### 10.3 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με κυτταρομετρητή Coulter Counter

Η μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρομετρητή Coulter Counter. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Wallace H. Coulter στη δεκαετία του 1950 για τη γρήγορη καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος και βασίζεται στη μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας που παρατηρείται όταν σωματίδια περνούν διαμέσου ενός πεδίου ηλεκτρικού ρεύματος μικρών διαστάσεων (Coulter 1956). 0,5 ml κυτταρικού εναιωρήματος προστίθεται σε 12 ml ισοτονικού αλατούχου διαλύματος και ακολουθεί καλή ανάδευση. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων του κάθε δείγματος υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις. Η μέτρηση κυτταρικού αριθμού με την χρήση του Coulter Counter είναι ταχύτερη και ακριβής, έχει όμως το μειονέκτημα του υψηλού κόστους. Επιπλέον, το όργανο μετρά αριθμό σωματιδίων αδυνατώντας να διαχωρίσει τα ακέραια κύτταρα από τα κυτταρικά συσσωματώματα ή τα κυτταρικά θραύσματα, με αποτέλεσμα να απαιτείται για την πραγματοποίηση μιας ακριβούς μέτρησης, ένας καλά επαναιωρημένος κυτταρικός πληθυσμός απαλλαγμένος από πάσης φύσης υπολείμματα.

#### 10.4 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας

Η μέθοδος MTT (Microculture Tetrazolium Test) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mossman το 1984 και βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης (**Σχήμα 8**). Η δοκιμασία MTT βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών (μεταβολικά ενεργών) κυττάρων να ανάγουν το άλας του τετραζολίου, 3(4,5-διμέθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (succinic dehydrogenase), με αποτέλεσμα να παράγονται ως προϊόν ιώδεις κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι δυνατόν να διαλυτοποιηθούν με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών και να προσδιοριστεί στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά η έκταση της αντίδρασης: όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων φορμαζάνης και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται στα 550 nm. Επομένως η δοκιμασία MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης ενός κυτταρικού πληθυσμού (growth rate). Το MTT είναι μια δοκιμή, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του χαμηλού κόστους, της ακρίβειας, της ταχύτητας και της έλλειψης ραδιοϊσοτόπων. Η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη της βιωσιμότητας των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη της τοξικότητας του υλικού.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω. Εν συντομία, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων σε DMEM παρουσία FBS 10% (v/v) για 24 ώρες. Στην συνέχεια, προστέθηκαν τα δείγματα Α και Β σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακολουθώντας δυαδικές αραιώσεις και τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 h, πριν από την αντικατάσταση του θρεπτικού με DMEM απουσία ερυθρού της φαινόλης το οποίο περιέχει 1mg/ml MTT. Τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω με το διάλυμα του MTT για χρονικό διάστημα 4 h και η φορμαζάνη που παράχθηκε από την κανονική μιτοχονδριακή δραστηριότητα διαλυτοποιήθηκε σε ισοπροπανόλη. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε μήκος κύματος 550 nm και σε μήκος κύματος 660 nm (κύμα αναφοράς).



Σχήμα 8: Οι δομές του MTT και της φορμαζάνης (Sittampalam et al., 2004)

### 10.5 Ωσμωμοριακότητα

Ένα διάλυμα ορίζεται ωσμωμοριακό όταν αυτό περιέχει 1 mol μιας μη-ιονίζουσας ουσίας σε 1 kg νερό. Είναι ένα μέτρο του συνολικού αριθμού των σωματιδίων τα οποία είναι διαλυμένα σε 1 kg νερού και εξαρτάται από την ηλεκτρολυτική φύση της διαλυμένης ουσίας.

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ωσμωμοριακότητας των τυριών (Α και Β) με τη βοήθεια αυτόματου ωσμώμετρου σημείου πήξης. Η ρύθμιση του οργάνου γίνεται με την χρήση απιονισμένου νερού και ενός πρότυπου διαλύματος NaCl γνωστής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O).

### 10.6 Χρώση DAPI για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων

Το DAPI (4,6-διαμινιδο-2-φαινυλινδόλη) είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία δεσμεύεται ισχυρά σε περιοχές αδενίνης-θυμίνης στο DNA. Είναι μια χρωστική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη μικροσκοπία φθορισμού. Το DAPI έχει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και με τον τρόπο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χρώση τόσο ζωντανών όσο και μονιμοποιημένων κυττάρων, αν και περνά λιγότερα αποτελεσματικά μέσα από τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων και έτσι η αποτελεσματικότητα της χρώσης είναι μικρότερη.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω αναλυτικά. Αρχικά τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm σε DMEM παρουσία 10% (v/v) FBS στα οποία έχει τοποθετηθεί στον πάτο καλυπτρίδα. Τα τρυβλία επώαστηκαν για ένα 24h και

την επόμενη μέρα τοποθετήθηκαν τα δείγματα A και B σε γνωστή συγκέντρωση και τα κύτταρα επώαστηκαν για 3, 6, 16 και 24h. Στην συνέχεια, ακολουθήθηκε το στάδιο της μονιμοποίησης των κυττάρων στο οποίο αρχικά αναρροφήθηκε το υλικό των κυττάρων, προστέθηκαν 2 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης 4% (v/v) το οποίο παρέμενε στα τρυβλία για χρονικό διάστημα 15 min, έγινε αναρρόφηση της φορμαλδεΰδης και προστέθηκε 2 ml διαλύματος PBS (Phosphate-Buffered saline). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του PBS και προστέθηκαν 2 ml PBS το οποίο παρέμεινε στα τρυβλία για 10 min, αναρροφήθηκε μετά το πέρας του προαναφερθέντος χρόνου και προστέθηκαν 2 ml απορρυπαντικού Triton 0,2% (v/v) για να γίνει διαπερατοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών. Πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με 2 ml PBS μεταξύ των οποίων μεσολάβησε χρονικό διάστημα 10 min και προστέθηκαν 2 ml διαλύματος HCl (υδροχλωρίου) κανονικότητας 2N. Μετά το πέρας 30 min αναρροφήθηκε το διάλυμα HCl, πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με 2 ml διαλύματος PBS (10 min) και προστέθηκε στο κέντρο της καλυπτρίδας κάθε τρυβλίου 40  $\mu$ L διαλύματος DAPI τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu$ g/ml.

## **11. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο Statgraphics Centurion XVI.I για Windows (1995, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland 20852, USA). Οι συγκρίσεις μεταξύ πολλαπλών μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance) κατά, ANOVA με εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών κατά Tukey (Tukey's post hoc test). Οι συγκρίσεις μεταξύ δύο μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Τυχόν διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμές του p που ήταν μικρότερες από 0,05.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Επιλογή στελέχους προπιονικού βακτηρίου για τις τυροκομήσεις

Μετά από παρακολούθηση της ανάπτυξης των στελεχών *P. freudenreichii* LMG 16412, *P. freudenreichii* LMG 16413, *P. freudenreichii* LMG 16423 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> και της ικανότητας των παραπάνω στελεχών να μειώνουν το pH του γάλακτος σε διάστημα 10 ημερών, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> προκάλεσε τη μεγαλύτερη πτώση με το pH τη 10<sup>η</sup> ημέρα να είναι ίσο με 5,4 και να εμφανίζει πτώση μίας μονάδας από τη μέτρηση του pH του στελέχους την ημέρα 0 (αρχικό pH 6,6). Τα υπόλοιπα στελέχη δεν παρουσίασαν τόσο θεαματική πτώση του pH του γάλακτος. Μάλιστα τα υπόλοιπα στελέχη τη 10<sup>η</sup> μέρα, είχαν pH ίσο με 6,3. Συνεπώς αξιολογώντας την ικανότητα των στελεχών να μειώνουν το pH, επιλέχθηκε το στέλεχος *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> για τις τυροκομήσεις. Τα πειράματα ανάπτυξης των στελεχών σε γάλα UHT full fat πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2. Επιλογή θρεπτικού υλικού για την επιλεκτική αρίθμηση των στελεχών

Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των στελεχών *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> αλλά και των συνδυασμών τους (A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) στα θρεπτικά υλικά MRS agar pH 5,2 για 72h, στους 42 °C αναερόβια, M17L agar για 48h στους 45 °C, αερόβια Pal Propiobac για 6 d στους 30 °C, αναερόβια.

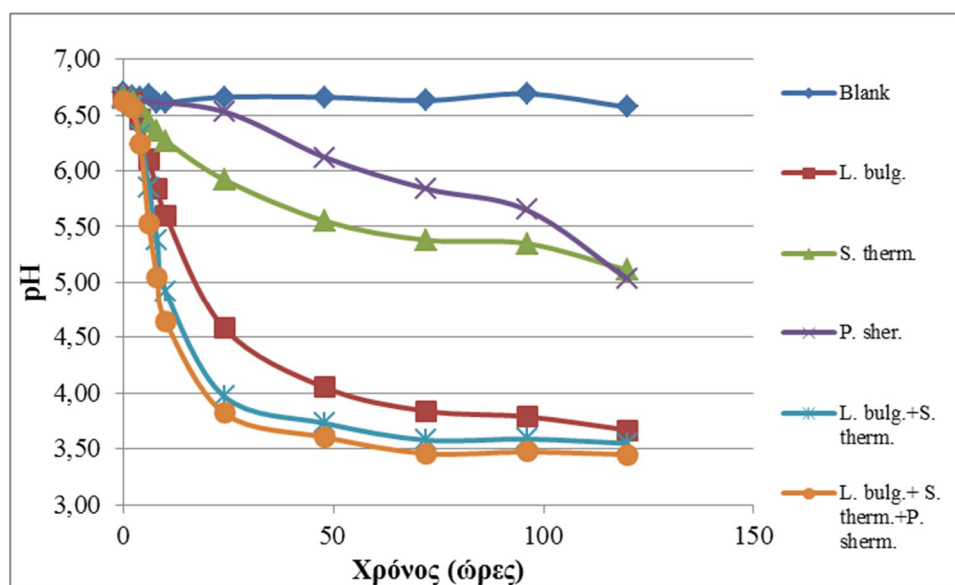
Διαπιστώθηκε ότι το θρεπτικό υλικό MRS agar στις προαναφερόμενες συνθήκες λειτουργεί ως επιλεκτικό για τον *L. bulgaricus* ACA-DC 87, το M17L για τον *S. thermophilus* ACA-DC 29 ενώ το Pal Propiobac είναι επιλεκτικό για το *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>. Τα αποτελέσματα του πειράματος συνάδουν με αυτά των Tharmaraj και Shah (Tharmaraj & Shah, 2004).

### 3. Προσομοίωση συμπεριφοράς στελεχών στο γάλα

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των μεμονωμένων στελεχών καθώς και των συνδυασμών τους σε UHT γάλα full fat για χρονικό διάστημα 5 ημερών κάτω από μικροαερόφιλες

συνθήκες, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH καθώς και καταμέτρηση των πληθυσμών (Σχήμα 9 και Πίνακας 2).

Στην περίπτωση μονών καλλιιεργειών, ο *L. bulgaricus* ACA-DC 87 εμφανίζει την ταχύτερη πτώση του pH ενώ ακολουθούν ο *S. thermophilus* ACA-DC 29 και ο *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>. Όσον αφορά την ανάπτυξη των συνδυασμών, επιβεβαιώνεται το άνωθεν φαινόμενο. Ειδικότερα, στην καλλιέργεια *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-C 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> παρατηρήθηκε ελαφρώς μεγαλύτερη πτώση του pH σε σύγκριση με τον συνδυασμό *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-C 29.



Σχήμα 9: Πτώση του pH των στελεχών σε χρονικό διάστημα 5 ημερών  
Το blank αντιστοιχεί σε γάλα UHT full fat

Σχετικά με τους πληθυσμούς των *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> (Πίνακας 2), ο *L. bulgaricus* ACA-DC 87 παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης σε γάλα UHT full fat (96 h) και εμφάνισε τη μέγιστη ανάπτυξη τις πρώτες 24 h καθώς μετά εμφάνισε σταδιακή πτώση του πληθυσμού του. Όσον αφορά τον *S. thermophilus* ACA-DC 29, αυτός παρουσίασε πλήρη ανάπτυξη μέσα στις πρώτες 24h ( $17 \cdot 10^6$  cfu/ml) ενώ τις μετέπειτα ημέρες δεν παρουσίασε ανάπτυξη. Ο *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> εμφάνισε τη μέγιστη ανάπτυξη την 2<sup>η</sup> μέρα ( $13 \cdot 10^6$  cfu/ml) και φάνηκε να αναπτύσσεται μέχρι και την 3<sup>η</sup> μέρα μικροαερόφιλης ανάπτυξης σε γάλα UHT full fat. Το *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> είναι γνωστό ότι εμφανίζει αδυναμία ανάπτυξης στο γάλα

καθώς δε διαθέτει πρωτεάσες ικανές να υδρολύουν τις καζεΐνες του γάλακτος και εκεί θα μπορούσε να αποδοθεί η δυσκολία στην ανάπτυξη του (Dupuis et al., 1995).

Πίνακας 2: Πληθυσμός των *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> σε διάστημα 4 ημερών

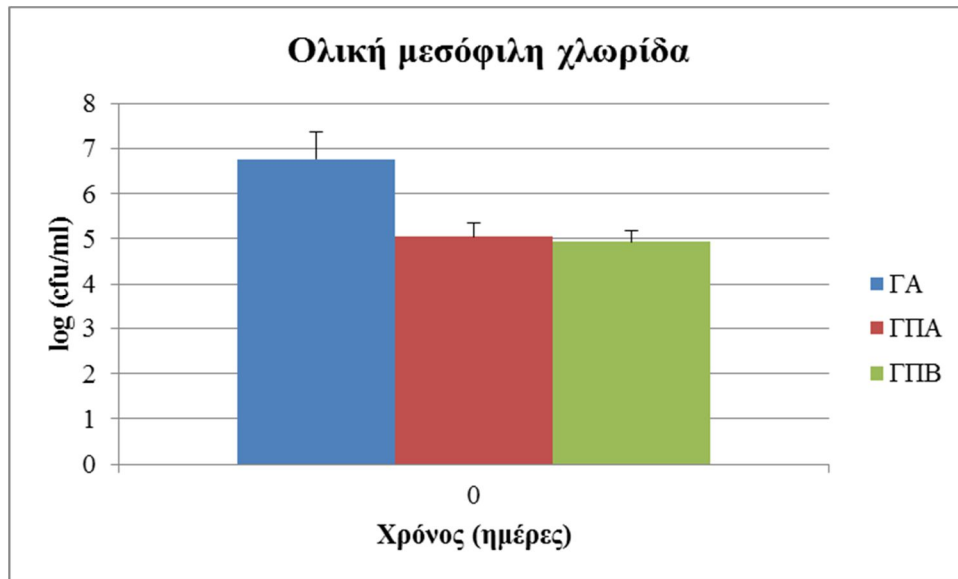
Πληθυσμός (10 <sup>6</sup> cfu/ml)			
Time points (ώρες)	<i>L. bulgaricus</i> ACA-DC 87	<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 29	<i>P. shermanii</i> LMG 16424 <sup>T</sup>
0	1	0,1	1
24	860	17	5,7
48	560	0	13
72	300	0	0,0059
96	9,8	0	0

#### 4. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η μεταβολή των πληθυσμών των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια παρασκευής και ωρίμανσης των τυριών αποτελεί ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους, το οποίο βοηθάει τους μικροβιολόγους και τεχνολόγους τροφίμων να εκτιμήσουν καλύτερα την επίδραση αυτών των ομάδων στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τυριών.

Στην παρούσα μελέτη, η εξέλιξη των πληθυσμών των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα καζάνια (Α και Β) παρουσιάζεται στα **Σχήματα 9-16**.

Στο **Σχήμα 9** απεικονίζεται ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του απαστερώτου γάλακτος και του γάλακτος μετά από παστερίωση στους 68 °C για 10 min το οποίο και χρησιμοποιήθηκε στις τυροκομήσεις. Παρατηρείται πτώση του πληθυσμού κατά 2 λογαριθμικές μονάδες γεγονός που αιτιολογείται από την παστερίωση.

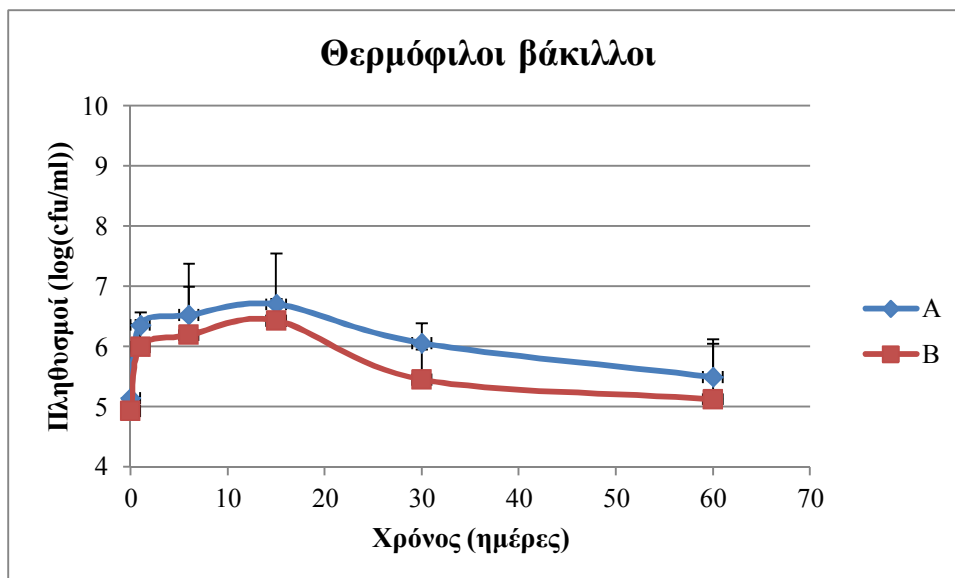


Σχήμα 10: Ολική μεσόφιλη χλωρίδα του απαστερίωτου και παστεριωμένου γάλακτος (PCA agar στους 30 °C, για 72 h, αναερόβια). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. ΓΑ: γάλα απαστερίωτο, ΓΠΑ: γάλα παστεριωμένο για το τυρί (Α) με *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29 και ΓΠB: γάλα παστεριωμένο για το τυρί (B) με *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Πραγματοποιήθηκε επίσης καταμέτρηση του πληθυσμού των κολοβακτηριδίων του απαστερίωτου γάλακτος καθώς και του γάλακτος μετά την παστερίωση (δεν απεικονίζεται) και ενώ το απαστερίωτο γάλα είχε πληθυσμό  $10^5$ , μετά το πέρας της παστερίωσης δεν ανιχνεύθηκαν κολοβακτηρίδια σε κανένα από τα 2 καζάνια.

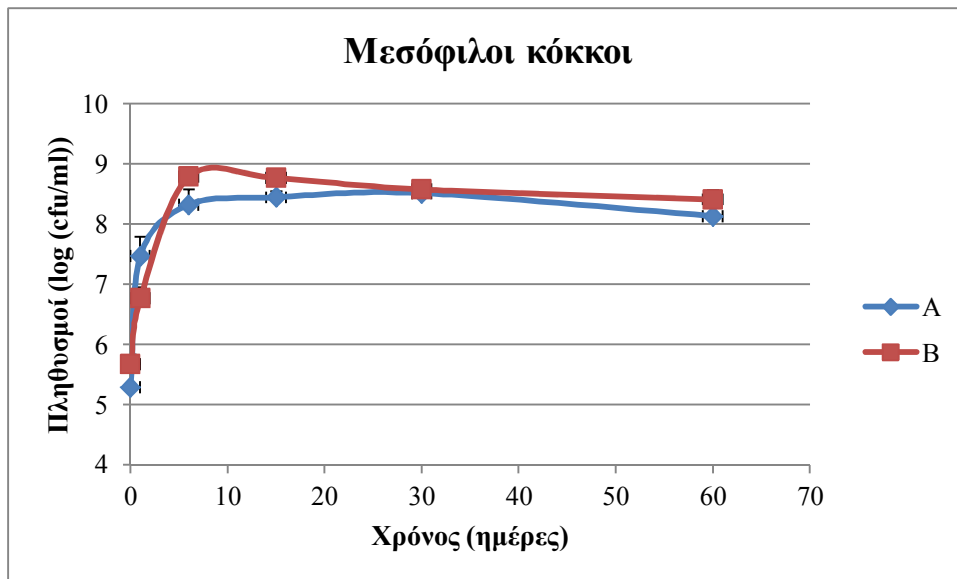
Όσον αφορά τον πληθυσμό των θερμοφίλων βακίλων (**Σχήμα 10**) παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού τους μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα της ωρίμανσης του τυριού. Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης (60 d). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του τυριού Α και Β αλλά μεταξύ των ημερών της δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ).





Σχήμα 11: Μεταβολή των θερμόφιλων βακίλων κατά την ωρίμανση (MRS agar με pH 5,2 για 72 h στους 42 °C, αναερόβια). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29. B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

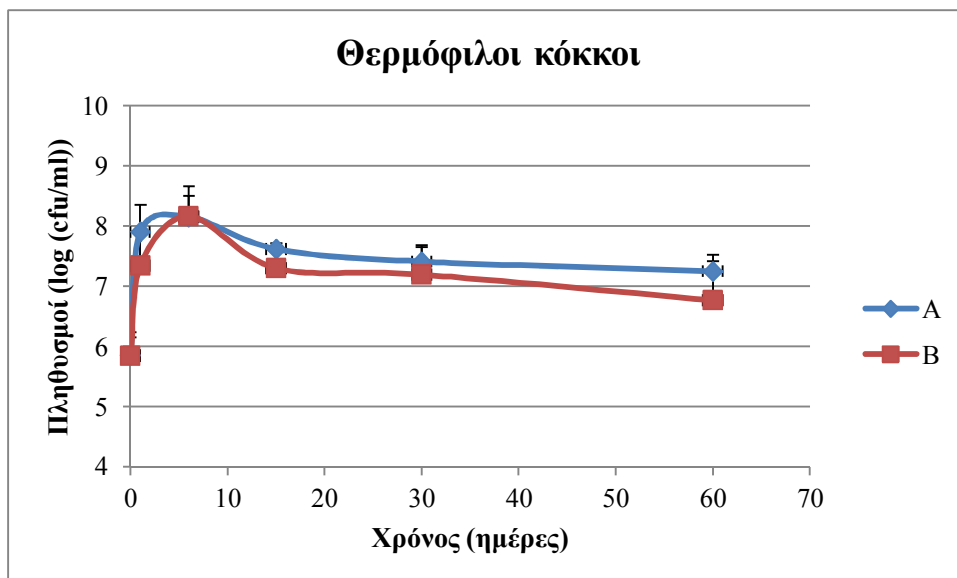
Ο πληθυσμός των μεσόφιλων κόκκων (Σχήμα 12) παρουσιάζει μια απότομη αύξηση την 1<sup>η</sup> ημέρα 7 log cfu/ml, η οποία κορυφώνεται την 6<sup>η</sup> ημέρα ωρίμανσης του τυριού και στα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας οι μεσόφιλοι κόκκοι παρουσιάζουν ελάχιστη μείωση του πληθυσμού τους. Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ) αλλά όχι μεταξύ των 2 τυριών.



Σχήμα 12: Μεταβολή των μεσόφιλων κόκκων κατά την ωρίμανση (M17 agar για 48 h στους 30 °C). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. Α: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29. Β: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Αναφορικά με τους θερμοφίλους κόκκους (**Σχήμα 13**) παρουσίασαν το μέγιστο της ανάπτυξής τους την 6<sup>η</sup> ημέρα και στη συνέχεια ο πληθυσμός τους μειώθηκε σταδιακά μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης (60 d). Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ) αλλά όχι μεταξύ των τυριών Α και Β.

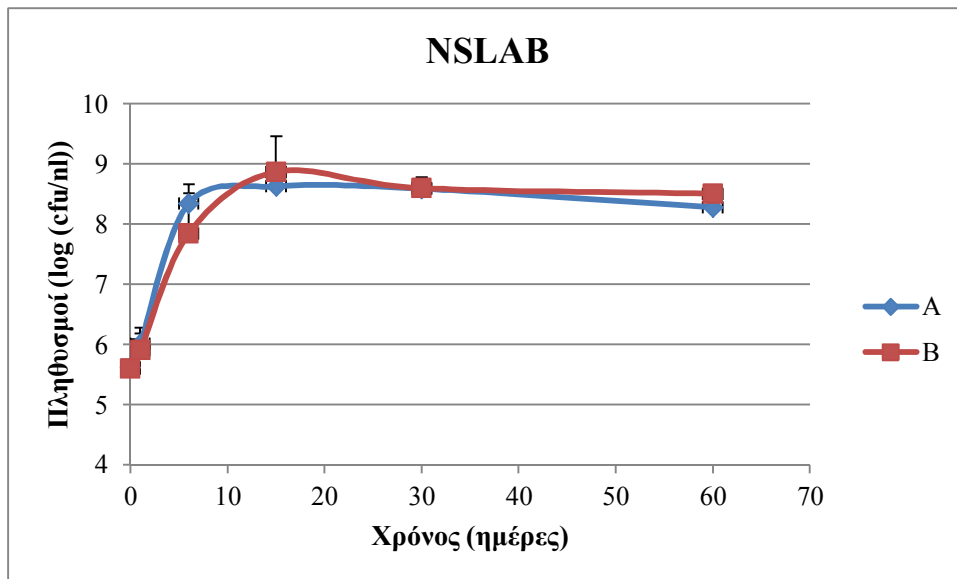
Όπως αναφέρθηκε, τρεις από τις κύριες ομάδες μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του λευκού τυριού άλμης ήταν οι θερμοφίλοι κόκκοι, οι μεσόφιλοι κόκκοι και οι θερμοφίλοι βάκλιοι. Επίσης ως εναρκτήριες καλλιέργειες για την παρασκευή του λευκού τυριού άλμης επιλέχθηκαν στελέχη των ειδών *S. thermophilus* και *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Θα πρέπει λοιπόν θεωρητικά το μεγαλύτερο μέρος από τις παραπάνω ομάδες μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν να τις αποτελούν οι εναρκτήριες καλλιέργειες.



Σχήμα 13: Μεταβολή των θερμοφίλων κόκκων κατά την ωρίμανση του λευκού τυριού άλμης (M17L για 48 h στους 45 °C). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

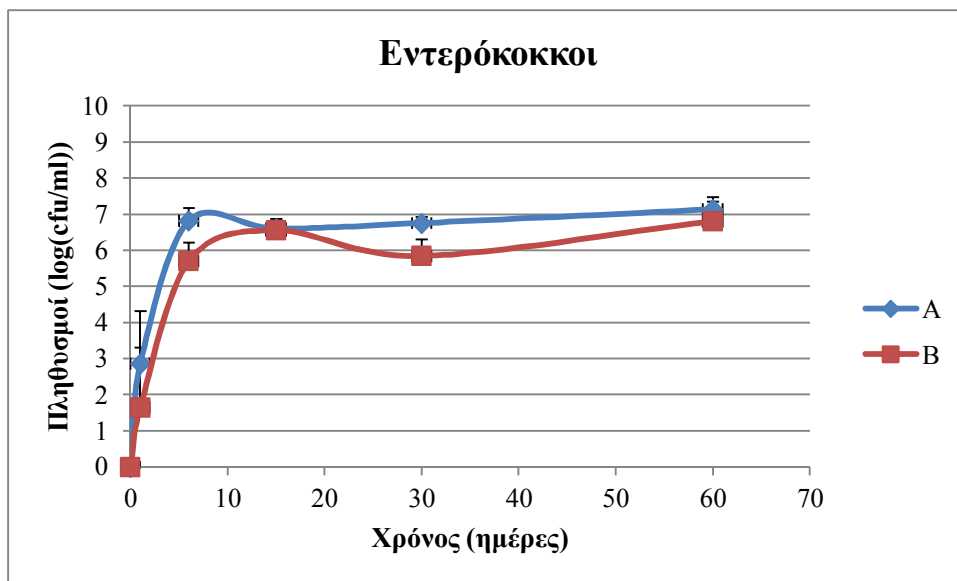
Στην περίπτωση των non-starter lactic acid bacteria (NSLAB), ο αρχικός πληθυσμός (1<sup>η</sup> μέρα) ήταν μικρότερος 6 log cfu/ml, συγκρινόμενος με τους πληθυσμούς των εναρκτήριων καλλιεργειών την ίδια χρονική στιγμή. Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε μια ταχεία αύξηση μέχρι και την 15<sup>η</sup> μέρα 9 log cfu/ml φτάνοντας τους αριθμούς των εναρκτήριων καλλιεργειών. Μετά ο πληθυσμός των NSLAB μειώθηκε λίγο μέχρι την 60<sup>η</sup> μέρα 8 log cfu/ml (**Σχήμα 13**). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του τυριού A και B αλλά μεταξύ των ημερών της δειγματοληψίας (P<0,05).

Γενικότερα, η ομάδα των NSLAB τυπικά φτάνει τους πληθυσμούς των 7-8 log cfu/ml κατά τη διάρκεια ωρίμανσης πολλών τυριών και οι γαλακτοβάκιλλοι συνήθως κυριαρχούν μεταξύ αυτών (Fitzsimons et al., 1999). Βέβαια, αν και οι πληθυσμοί των NSLAB είναι υψηλοί σε πολλά τυριά, η συνεισφορά τους στην ωρίμανση και στην τελική ποιότητά τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Fox et al., 1993).



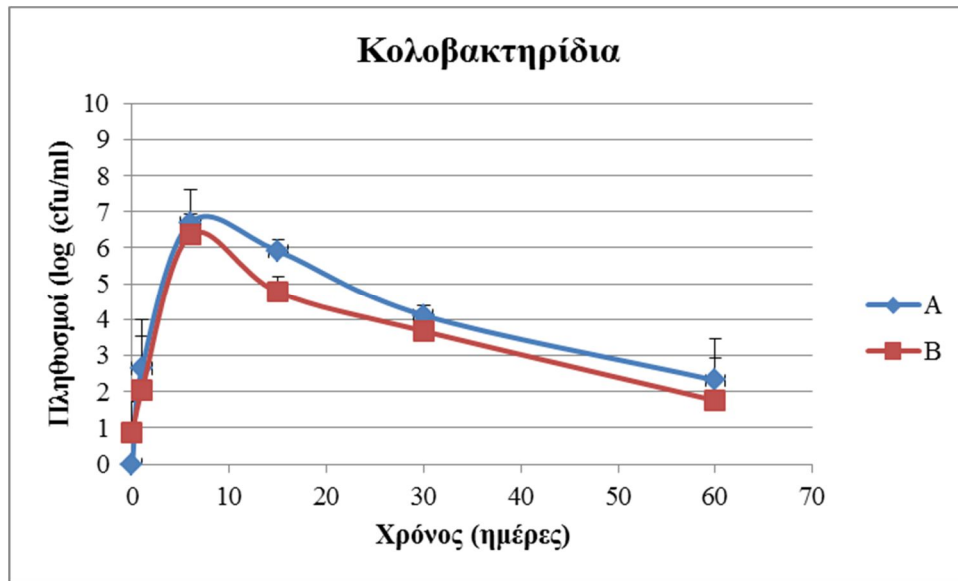
Σχήμα 14: Μεταβολή των NSLAB κατά την ωρίμανση (Rogosa agar για 3-5 d στους 30 °C). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Ο πληθυσμός των εντερόκοκκων αυξήθηκε ελάχιστα την 1<sup>η</sup> μέρα  $\leq 3$  log cfu/ml αλλά στην συνέχεια αυξήθηκε αρκετά πιο γρήγορα μέχρι τη 15<sup>η</sup> μέρα, φτάνοντας τους 7 log cfu/ml. Ακολούθως, παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος μέχρι το τέλος της ωρίμανσης (**Σχήμα 14**). Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ) αλλά όχι μεταξύ των 2 τυριών.



Σχήμα 15: Μεταβολή των εντερόκοκκων (KAA agar για 24 h στους 37 °C). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. Α: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, Β: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

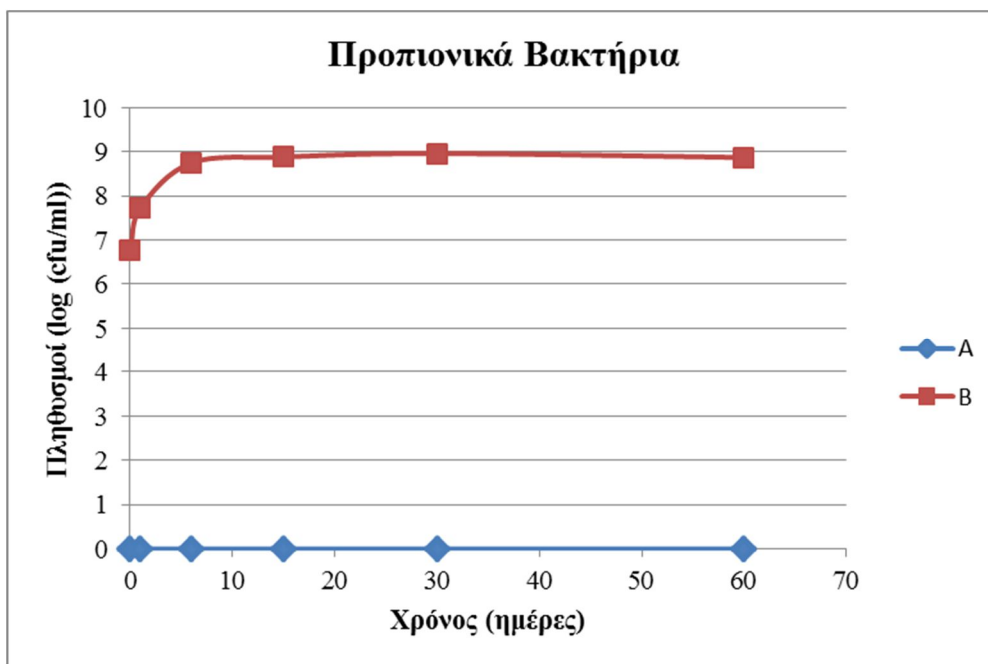
Για την ομάδα των κολοβακτηριδίων (**Σχήμα 16**), το μέγιστο του πληθυσμού 6-7 log cfu/ml παρατηρήθηκε την 6<sup>η</sup> μέρα, ενώ στην συνέχεια οι αριθμοί τους μειώθηκαν μέχρι και την 60<sup>η</sup> μέρα 2 log cfu/ml. Αυτή η αύξηση του πληθυσμού των κολοβακτηριδίων μέχρι την 6<sup>η</sup> μέρα θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλή υγρασία καθώς και στο υψηλό pH, γεγονός που επιτρέπει την επιβίωση των κολοβακτηριδίων (Nikolaou et al., 2002; Beresford & Williams, 2004). Περίπου τα ίδια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες εργασίες που σχετίζονται με τη Φέτα και άλλα λευκά τυριά άλμης, στα οποία παρατηρήθηκε ότι οι αριθμοί των κολοβακτηριδίων ήταν περίπου 2 log cfu/ml μετά το πέρας των 90 ημερών ωρίμανσης (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 1992; Ανυφαντάκης, 1998). Γενικά, τα κολοβακτηρίδια αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων παρασκευής των τυριών, όταν οι συνθήκες (pH και θερμοκρασία) είναι ευνοϊκές. Η εξάντληση των διαθέσιμων σακχάρων, το χαμηλό pH αλλά και η έλλειψη οξυγόνου στα επόμενα στάδια της ωρίμανσης έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των κολοβακτηριδίων (Gripou, 1993; Walstra et al., 1993), κάτι που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη. Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ) αλλά όχι μεταξύ των 2 τυριών.



Σχήμα 16: Μεταβολή των κολοβακτηριδίων κατά την ωρίμανση (VRBL agar για 24 h στους 37 °C, αναερόβια).

Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Στην περίπτωση των προπιονικών βακτηρίων (**Σχήμα 17**), πραγματοποιήθηκαν σε τυχαία σημεία δειγματοληψίας μετρήσεις του πληθυσμού στο τυρί μάρτυρα (A) και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη των προπιονικών βακτηρίων. Αντίθετα, στο τυρί B, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε το *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> ως συμπληρωματική εναρκτήρια καλλιέργεια, σημειώθηκε μέγιστη ανάπτυξη των προπιονικών βακτηρίων στην 6<sup>η</sup> μέρα της ωρίμανσης του λευκού τυριού άλμης. Ο πληθυσμός των προπιονικών βακτηρίων στο τυρί B παρέμεινε σταθερός στο 9 log cfu/ml μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης του τυριού (60 d). Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών τυροκομήσεων A και B ( $P < 0,05$ ) και όχι μεταξύ των ημερών της δειγματοληψίας, όπως με τις άλλες ομάδες μικροοργανισμών.



Σχήμα 17: Μεταβολή των PAB κατά την ωρίμανση (*Pal Propriobac* για 6-8 d στους 30 °C, αναερόβια). Στο τυρί με τον κωδικό A, δεν αναπτύχθηκαν προπιονικά βακτήρια. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

## 5. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Οι μεταβολές των διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων των τυριών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσής τους είναι αποφασιστικής σημασίας, αφού είναι αυτές που τελικά θα καθορίσουν τη δομή, την υφή, τη γεύση και το άρωμά τους.

### 5.1 Χημική σύσταση του γάλακτος

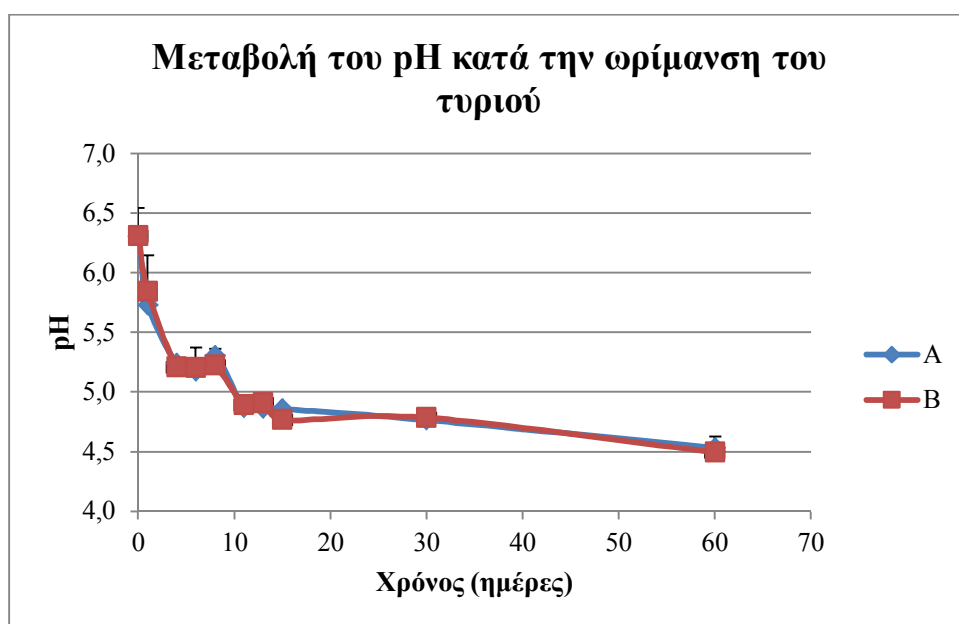
Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης (%) των συστατικών του γάλακτος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις τυροκομήσεις.

Πίνακας 3: Χημική σύσταση γάλακτος (%). ΣΥΑΛ: Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους, ΣΥ: Στερεό υπόλειμμα

Γάλα τυροκόμησης	Λίπος	Πρωτεΐνες	Λακτόζη	ΣΥΑΛ	ΣΥ
	7,1	6,2	5,1	12,0	19,3

## 5.2 Μεταβολή του pH

Το pH (**Σχήμα 18**) μειώθηκε λιγότερο από 1 μονάδα (αρχική τιμή: 6,3) κατά τη διάρκεια της 1<sup>ης</sup> μέρας φτάνοντας την τιμή 5,8. Αυτού του είδους η μείωση θα μπορούσε να αποδοθεί στη μειωμένη δράση και ανάπτυξη των εναρκτήριων καλλιεργειών. Μετά από 60 μέρες η μέση τιμή του pH ήταν περίπου 4,5, η οποία είναι η συνηθισμένη τιμή pH στα λευκά τυριά άλμης (Ανυφαντάκης, 1998; Ανυφαντάκης, 1993; Vaforoulou-Mastrojiannaki et al., 1990; Vaforoulou et al., 1989). Ωστόσο στην Φέτα, η τιμή του pH πέφτει στο 4,35 την 30<sup>η</sup> μέρα γεγονός το οποίο δεν συνέβη στη δική μας περίπτωση κι αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αδυναμία των εναρκτήριων καλλιεργειών να μειώσουν το pH. Οι μέσες τιμές του pH διέφεραν σημαντικά μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P < 0,05$ ) και όχι μεταξύ των διαφορετικών τυροκομήσεων.



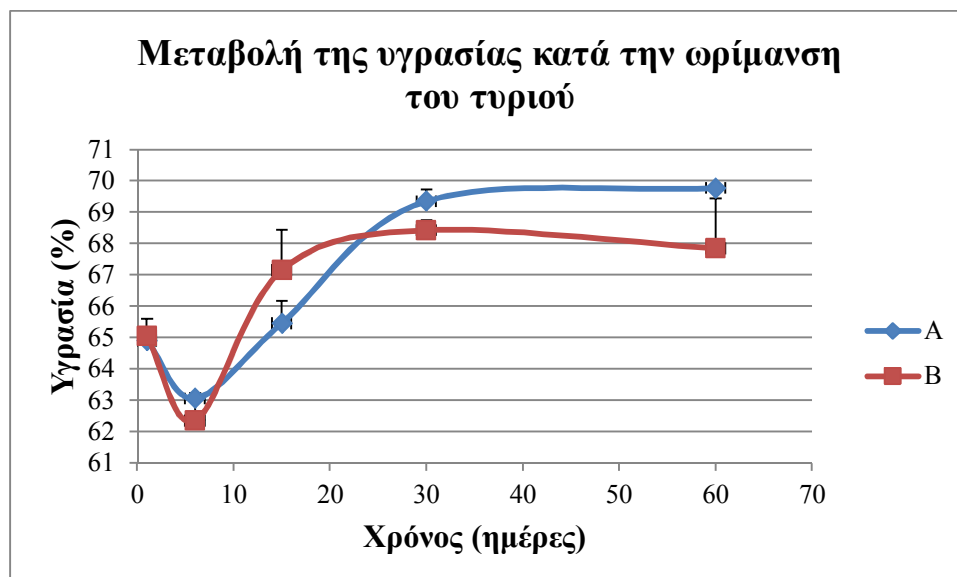
Σχήμα 18: Μεταβολή του pH κατά την ωρίμανση λευκού τυριού άλμης. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

## 5.3 Υγρασία

Η υγρασία και στα 2 τυριά μειώθηκε από την 1<sup>η</sup> μέρα ( $\approx 65\%$ ) μέχρι την 6<sup>η</sup> μέρα ( $\approx 63\%$ ) και έπειτα αυξήθηκε μέχρι το τέλος της ωρίμανσης ( $\approx 68,5\%$ ). Με βάση το **Σχήμα 19** είναι φανερό πως ταχύτερες αλλαγές στην υγρασία παρατηρούνται κατά τις πρώτες 15 μέρες της



ωρίμανσης. Ωστόσο σε κανένα σημείο της δειγματοληψίας η υγρασία δεν αποκτά τιμές κοντά στο 56%, που είναι το ανώτατο όριο σύμφωνα με το Γενικό Χημείο του Κράτους (1988). Σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, η υγρασία στο καζάνι Β ήταν σημαντική μικρότερη σε σύγκριση με το καζάνι Α (τυφλό) ( $P=0,0143$ ). Η αύξηση της υγρασίας στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης είναι σύνηθες φαινόμενο για τα λευκά τυριά άλμης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη πρωτεόλυση, δηλαδή στην εκτεταμένη υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών και συνεπώς στον σχηματισμό νέων ιονικών ομάδων μέσα στη μάζα του τυριού, οι οποίες με τη σειρά τους δεσμεύουν νερό από την άλμη που περιβάλλει το τυρί, προκαλώντας αύξηση της υγρασίας (Tzanetakis et al., 1995; Litopoulou-Tzanetakis et al., 1993).



Σχήμα 19: Μεταβολή της υγρασίας κατά την ωρίμανση λευκού τυριού άλμης. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. Α: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, Β: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

#### 5.4 HPLC

Ο προσδιορισμός των σακχάρων και των οργανικών οξέων σε ώριμο λευκό τυρί άλμης πραγματοποιήθηκε με ανάλυση HPLC. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη τυριών σύμφωνα με την εφαρμοζόμενη τεχνολογία παρασκευής, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της ωρίμανσης, την εποχή παραγωγής και τη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται. Επιπλέον, το επίπεδο των οργανικών οξέων εξαρτάται από

το είδος των εναρκτήριων οξυγαλακτικών καλλιεργείων, των συμπληρωματικών εναρκτήριων καλλιεργείων και των υπόλοιπων μη προστιθέμενων μικροοργανισμών (Manolaki et al., 2006).

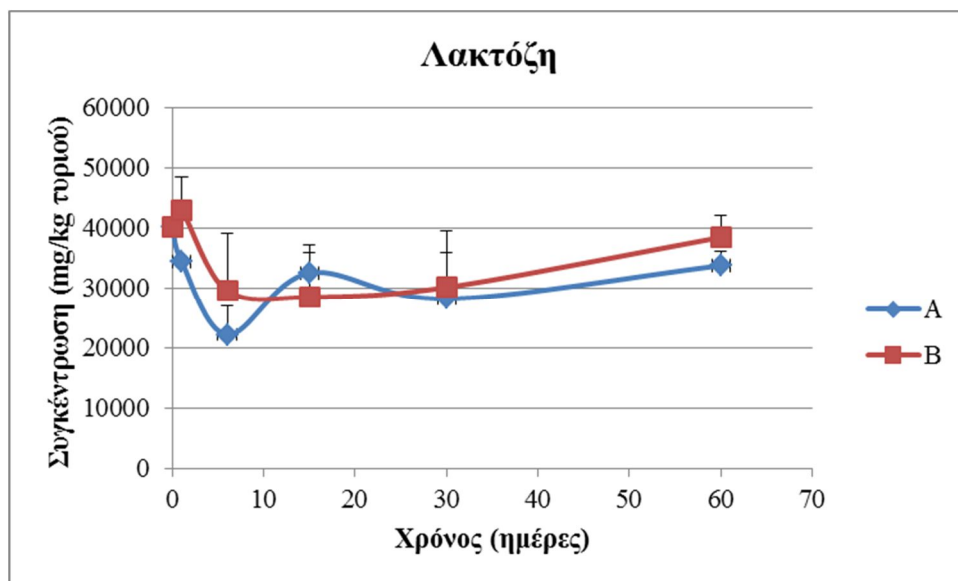
Τα κύρια σάκχαρα και οργανικά οξέα που ανιχνεύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά ήταν τα παρακάτω: η λακτόζη, το κιτρικό οξύ, η γαλακτόζη, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και το προπιονικό οξύ.

#### 5.4.1 Λακτόζη

Η λακτόζη στα τυριά μεταβολίζεται κατά κύριο λόγο σε γαλακτικό οξύ μετά από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων. Η μετατροπή αυτή είναι ταχεία ώστε να θεωρείται ότι σε 24 h από την παρασκευή του τυριού έχει διασπαστεί το μεγαλύτερο μέρος της (Accolas et al., 1978; Moquot, 1979).

Από πολλούς ερευνητές έχει διαπιστωθεί η μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης κατά την ωρίμανση των τυριών. Κατά τους Bouzas et al. (1991), η συγκέντρωση της λακτόζης στο τυρί cheddar μειώθηκε από τα 7250 στα 3850 mg/kg τυριού έπειτα από 8 ημέρες συντήρησης στους 12 °C, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στα δείγματα των 48 ημερών.

Όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (**Σχήμα 20**), τα επίπεδα της λακτόζης αρχικά και στα δύο τυριά ξεκινάνε από παρεμφερές επίπεδο ενώ στην συνέχεια παρατηρούμε μια πτώση (6<sup>η</sup> ημέρα). Από την 15<sup>η</sup> μέρα και μετά, τα επίπεδα της λακτόζης αυξάνονται και στα δύο τυριά και ιδιαίτερα στο Α. Ωστόσο στο τέλος της ωρίμανσης (60<sup>η</sup> μέρα), η λακτόζη βρίσκεται στα ίδια επίπεδα και στα δύο τυριά ( $\approx 40000$  mg/kg), γεγονός το οποίο αποκλίνει από τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα δεδομένα (Abd el-Salam et al. 1993), σύμφωνα με τα οποία η συγκέντρωση της λακτόζης στη Φέτα ανέρχεται στα 5000 mg/kg τυριού.



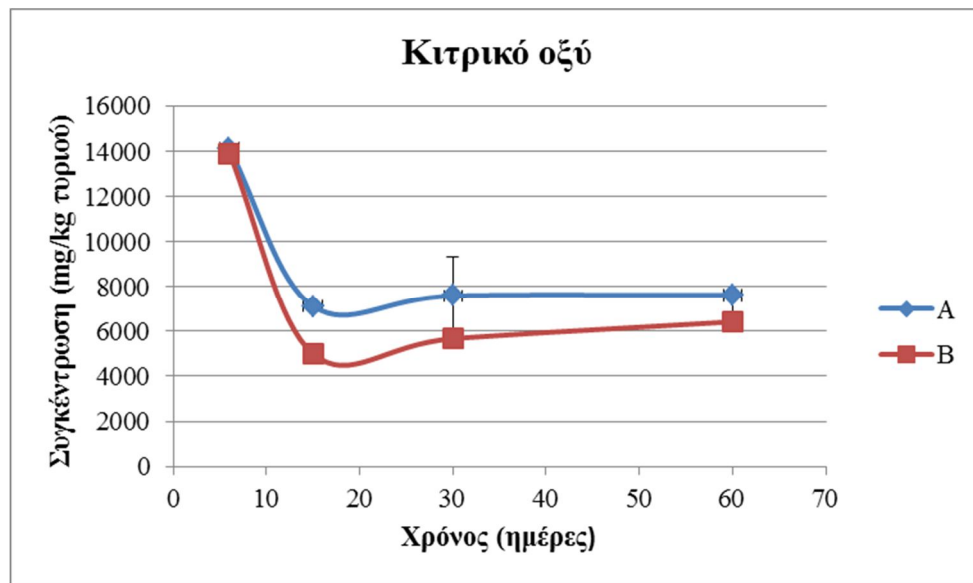
Σχήμα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης της λακτόζης κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

#### 5.4.2 Κιτρικό οξύ

Το γάλα περιέχει 1808 mg/g κιτρικού οξέος, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου απομακρύνεται με το τυρόγαλα κατά την τυροκόμηση, δεδομένου ότι το 94% του κιτρικού οξέος εντοπίζεται στην υδατική φάση του γάλακτος. Παρ' όλη τη μικρή συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στο τυρόπηγμα, είναι μεγάλης σημασίας καθώς μπορεί να μεταβολιστεί σε μεγάλο αριθμό αρωματικών συστατικών από μικροοργανισμούς, οι οποίοι ζυμώνουν το κιτρικό οξύ. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κάποια συγκεκριμένα είδη μεσόφιλων εναρκτηρίων οξυγαλακτικών καλλιεργείων (*Cit*<sup>+</sup> lactococci και *Leuconostoc spp.*) και συγκεκριμένα μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι που ανήκουν στη μη-εναρκτηρία μικροχλωρίδα.

Κατά τους Marsili et al. (1981), το κιτρικό οξύ στο πλήρες γάλα βρισκόταν σε συγκέντρωση 940 mg/kg γάλακτος, ενώ κατά τους Bevilacqua & Califano (1989), στο νωπό γάλα η συγκέντρωση του 1610 mg/kg γάλακτος. Σύμφωνα με τον Panari (1986), δεν ανιχνεύτηκε κιτρικό οξύ στα τυριά Reggiano, Emmental (Ελβετίας), Emmental (Γαλλίας), Fontina και Sbrinz καθώς η κορυφή έκλουσής του, κατά τον προσδιορισμό του με την τεχνική HPLC ήταν πολύ μικρή και επικαλυπτόταν από άλλες κορυφές. Στη Φέτα η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος ήταν ίση με 616 mg/kg τυριού (Manolaki et al., 2005).

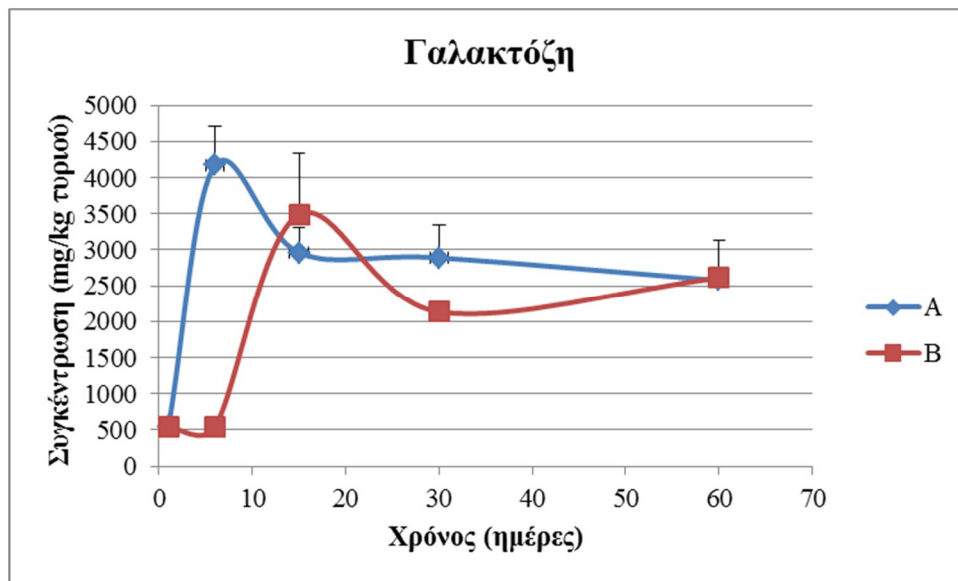
Στο **Σχήμα 21**, δεν παρουσιάζονται οι μετρήσεις του κιτρικού οξέος τη μέρα των τυροκομήσεων και την 1<sup>η</sup> μέρα της ωρίμανσης καθώς δεν κατέστη δυνατόν να διαχωριστεί το κιτρικό οξύ από τη λακτόζη. Στην συνέχεια, η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος μειώθηκε σταδιακά (60<sup>η</sup> μέρα) μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης και στα δύο τυριά ( $\approx 7000$  mg/kg τυριού). Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος θα μπορούσε να αποδοθεί στο μεταβολισμό του κιτρικού οξέος σε ενώσεις αρώματος.



Σχήμα 21: Μεταβολή της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

#### 5.4.3 Γαλακτόζη

Η γαλακτόζη (**Σχήμα 22**) την 1<sup>η</sup> μέρα ωρίμανσης ξεκινά από τις ίδιες συγκεντρώσεις στα 2 τυριά. Στο τυρί A, η συγκέντρωση της γαλακτόζης αρχικά αυξάνεται ενώ από την 15<sup>η</sup> μέρα και μέχρι το τέλος της ωρίμανσης η συγκέντρωση μειώνεται. Αντίθετα στο τυρί B, η γαλακτόζη ενώ ξεκινά από τα ίδια επίπεδα, αυξάνεται μέχρι την 15<sup>η</sup> μέρα, μειώνεται έως την 30<sup>η</sup> και αυξάνεται μέχρι και την 60<sup>η</sup> μέρα όπου φτάνει στα ίδια επίπεδα με το τυρί A (2500 mg/kg τυριού).



Σχήμα 22: Μεταβολή της συγκέντρωσης της γαλακτόζης κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

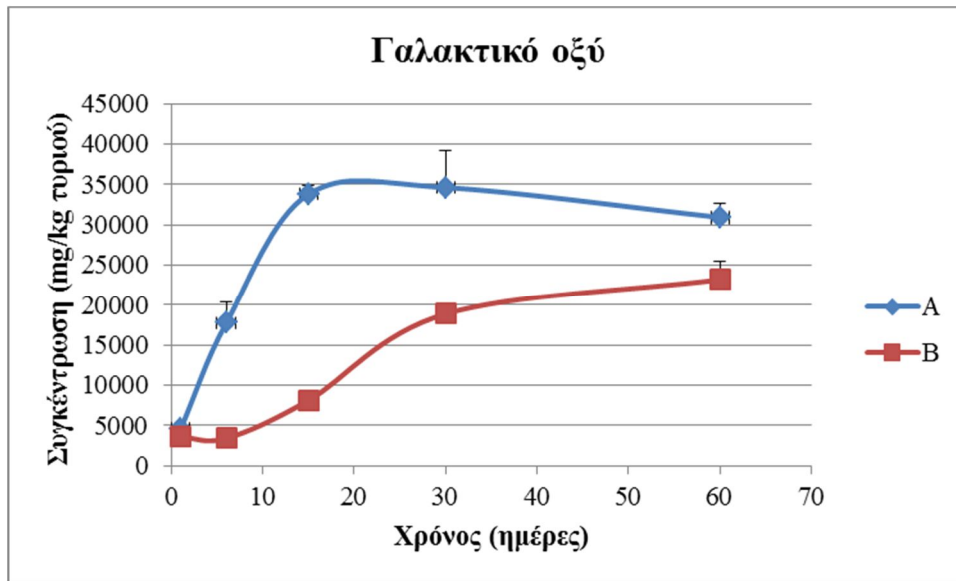
#### 5.4.4 Γαλακτικό οξύ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γαλακτικό οξύ παράγεται από τη ζύμωση της λακτόζης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ανάλογα με το είδος της εναρκτήριας καλλιέργειας που χρησιμοποιείται η λακτόζη μεταβολίζεται μέσω της γλυκόλυσης ή μέσω του μονοπατιού της φωσφοκετολάσης (*Leuconostoc spp.*).

Ο σχηματισμός του γαλακτικού οξέος επιδρά στην πήξη του γάλακτος και στην στράγγιση του τυροπήγματος καθώς και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού. Προκαλεί πτώση του pH και κατά αυτόν τον τρόπο επηρεάζει άμεσα το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται. Είναι επομένως απαραίτητο για την ανάπτυξη του αρώματος, την κανονική ωρίμανση και την καλή ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Califano & Bevilaqua, 2000).

Ο Panari (1986) αναφέρει ότι στο τυρί Reggiano (ωρίμανση 20 μήνες), Emmental Ελβετίας (ωρίμανση 4 μήνες), Emmental Ελβετίας (ωρίμανση 5 μήνες), Fontina (ωρίμανση 3 μήνες), Sbrinz (ωρίμανση 12 μήνες) κυριαρχεί το γαλακτικό οξύ και βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 16800, 6400, 4300, 6800 και 13500 mg/kg τυριού αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στη Φέτα ήταν ίση 14000 mg/kg (Manolaki et al., 2006)

Στο Σχήμα 23 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος στα διάφορα στάδια δειγματοληψίας του τυριού (A και B). Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο τέλος της ωρίμανσης του λευκού τυριού άλμης είναι 23000 mg/kg τυριού στο τυρί B και 31000 mg/kg τυριού στο A. Η διαφορά αυτή της συγκέντρωσης μεταξύ A και B αιτιολογείται από το γεγονός ότι τα προπιονικά βακτήρια ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ προς σχηματισμό προπιονικού οξέος, οξικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα (Cummins & Johnson, 1986).



Σχήμα 23: Μεταβολή της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

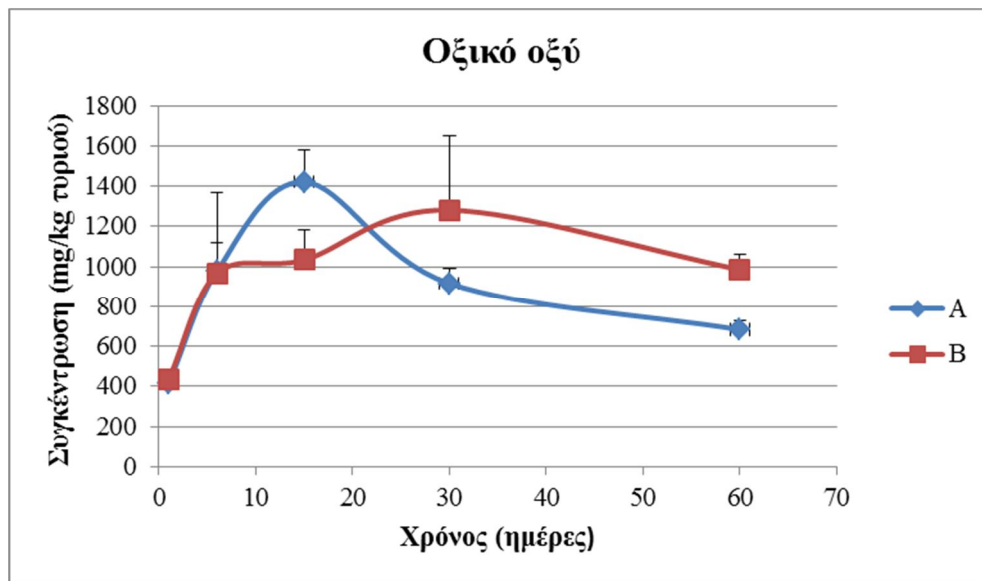
#### 5.4.5 Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ στο τυρί σχηματίζεται από το μεταβολισμό της λακτόζης από τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος από τους Cit<sup>+</sup> κόκκους και τα βακτήρια του γένους *Leuconostoc* καθώς και από το μεταβολισμό του γαλακτικού οξέος από τα προπιονικά βακτήρια. Επίσης μπορεί να σχηματιστεί και μέσω του μεταβολισμού των αμινοξέων (Mc Sweeney & Sousa, 2000).

Στο τυρί Blue Cheese, η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν 0,25 mg/g τυριού (Marsili et al., 1981). Σύμφωνα με τους Mullin & Emmons (1997), η συγκέντρωση του οξικού οξέος στα τυριά Brie, Camembert και Blue Cheese ήταν 1206, 1070 και 2227 mg/kg τυριού

αντίστοιχα. Κατά τους Manolaki et al (2005) η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στη Φέτα ήταν 373 mg/kg τυριού.

Στο **Σχήμα 24** απεικονίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του οξικού οξέος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του λευκού τυριού άλμης. Παρουσιάζεται ξεκάθαρα ότι το τυρί B έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση (985 mg/kg τυριού) απ' ό τι το τυρί A (683 mg/kg τυριού), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ζύμωση των προπιονικών βακτηρίων.



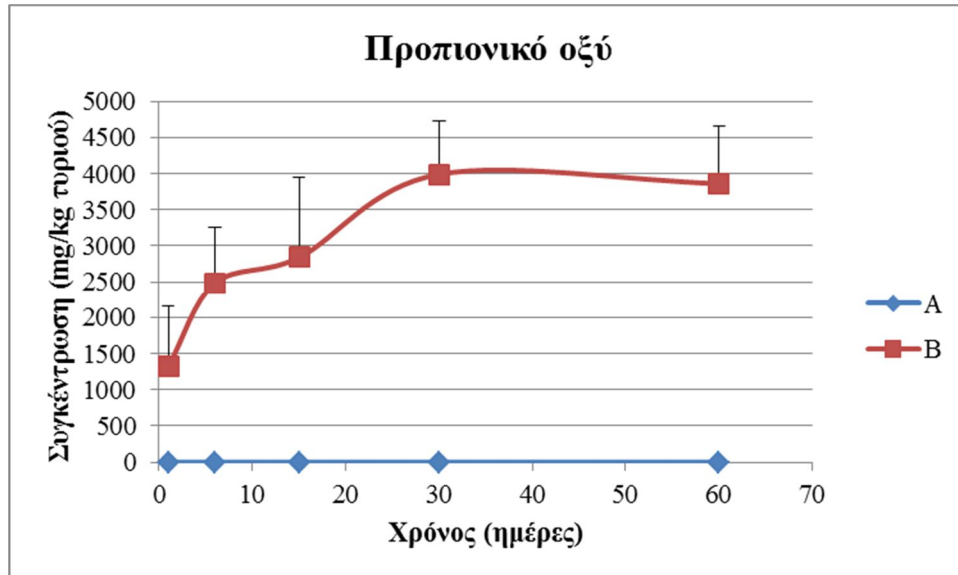
Σχήμα 24: Μεταβολή της συγκέντρωσης του οξικού οξέος κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

#### 5.4.6 Προπιονικό οξύ

Τα PAB έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ προς προπιονικό οξύ, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (Cummins & Johnson, 1986). Επιπλέον, το προπιονικό οξύ μπορεί να παράγεται από την αποδόμηση της λακτόζης και τον καταβολισμό των αμινοξέων από ορισμένους μικροοργανισμούς (Molimard & Spinnler, 1996).

Στο **Σχήμα 25** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος στα διάφορα στάδια της δειγματοληψίας (1, 6, 15, 30, 60 d). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο τυρί A δεν ανιχνεύθηκε κατά την HPLC προπιονικό οξύ ενώ στο τυρί B στο οποίο είχε προστεθεί ως συμπληρωματική εναρκτήρια καλλιέργεια *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>, ανιχνεύθηκε προπιονικό οξύ την 30<sup>η</sup> μέρα ωρίμανσης του τυριού, του οποίου η

συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή (3862 mg/kg τυριού) μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης (60 d). Παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ) μεταξύ της τυροκόμησης A (μάρτυρας) και B (προπιονικά) και όχι μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας.



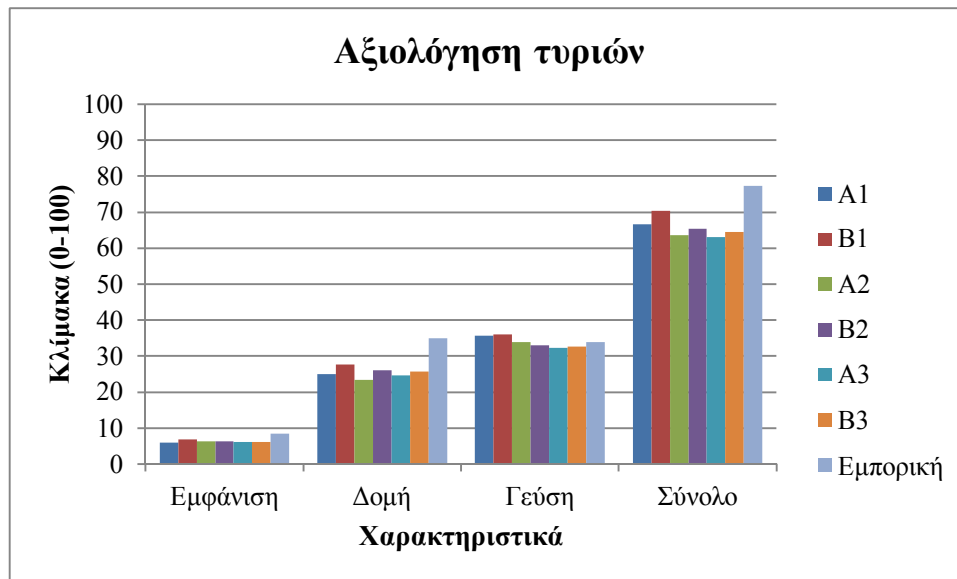
Σχήμα 25: Μεταβολή της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος κατά την ωρίμανση. Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

## 6. Οργανοληπτικός έλεγχος

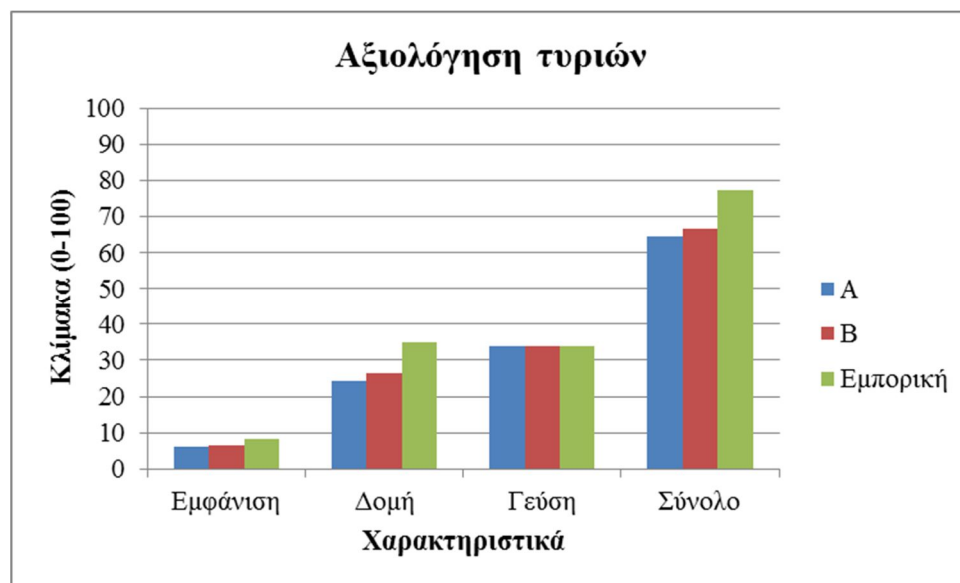
Ο οργανοληπτικός έλεγχος των ζυμώσιμων γαλακτοκομικών προϊόντων και ειδικότερα των τυριών αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο, το οποίο συμβάλλει στην εκτίμηση της πιθανής επίδρασης των εναρκτήριων καλλιεργειών ή και της υπόλοιπης μικροχλωρίδας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των προϊόντων.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των 2 τυριών (A και B) της παρούσας μελέτης παρουσιάζεται στα **Σχήματα 26** και **27**. Το τυρί με τον κωδικό B1 αξιολογήθηκε με τη μεγαλύτερη βαθμολογία στη γεύση. Η εμπορική Φέτα συγκέντρωσε τη μεγαλύτερη βαθμολογία σε κάθε επιμέρους κατηγορία αλλά και συνολικά με το B1 να ακολουθεί. Όσον αφορά τη δομή (**Σχήμα 28**), τα περισσότερα τυριά χαρακτηρίστηκαν από τους δοκιμαστές ως μαλακά με εξαίρεση τη Φέτα του εμπορίου η οποία χαρακτηρίστηκε ως ημίσκληρη.

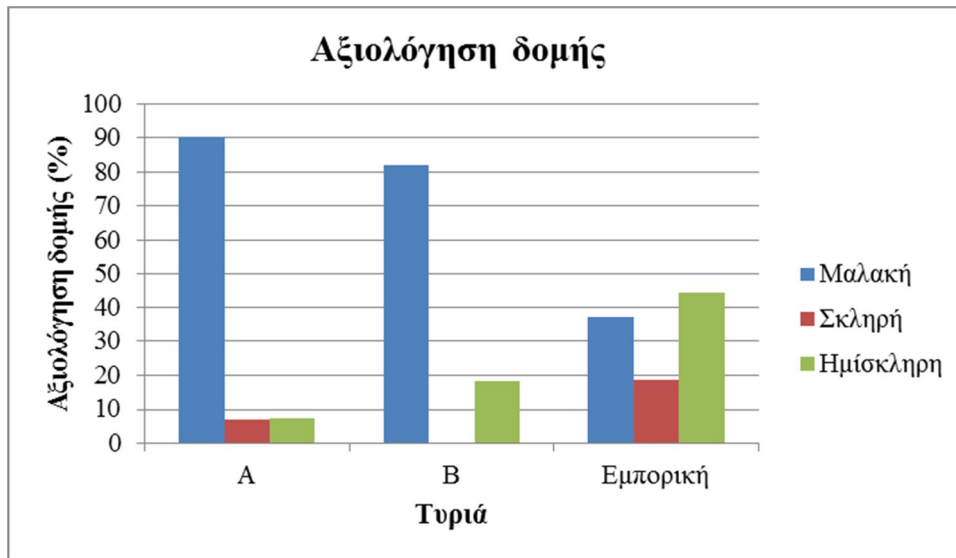




Σχήμα 26: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ώριμων τυριών (>60d). A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>. Οι δείκτες 1, 2 και 3 αναφέρονται στις 3 επαναλήψεις των τυροκομήσεων

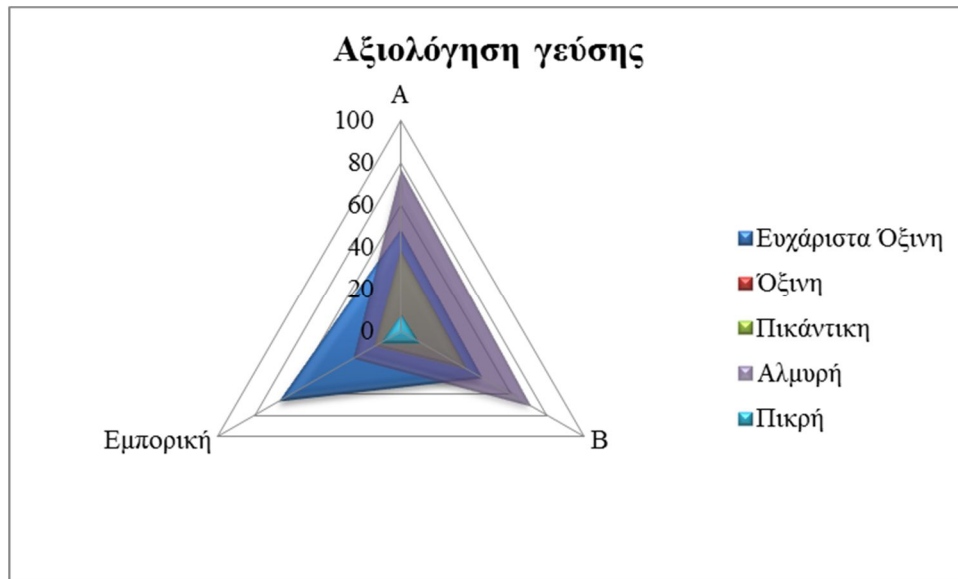


Σχήμα 27: Οργανοληπτική αξιολόγηση των ώριμων τυριών (>60d). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>



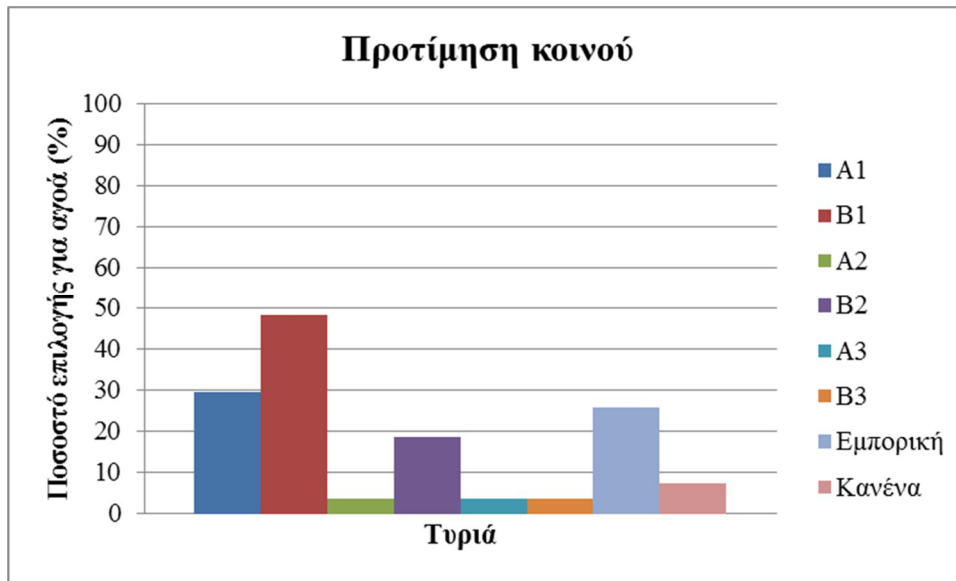
Σχήμα 28: Αξιολόγηση της δομής των ώριμων τυριών (>60d). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Σχετικά με τη γεύση (Σχήμα 29), τα τυριά A και B βαθμολογήθηκαν περίπου το ίδιο, αλλά οι βαθμοί τους ήταν χαμηλότεροι συγκριτικά με την εμπορική Φέτα. Τόσο το τυρί A όσο και το B χαρακτηρίστηκαν ως αλμυρά ( $\approx 73\%$ ) και πικάντικα ( $\approx 37\%$ ) ενώ η εμπορική Φέτα χαρακτηρίστηκε ως ευχάριστα όξινη (66,7%) και πικρή ( $\approx 11\%$ ).

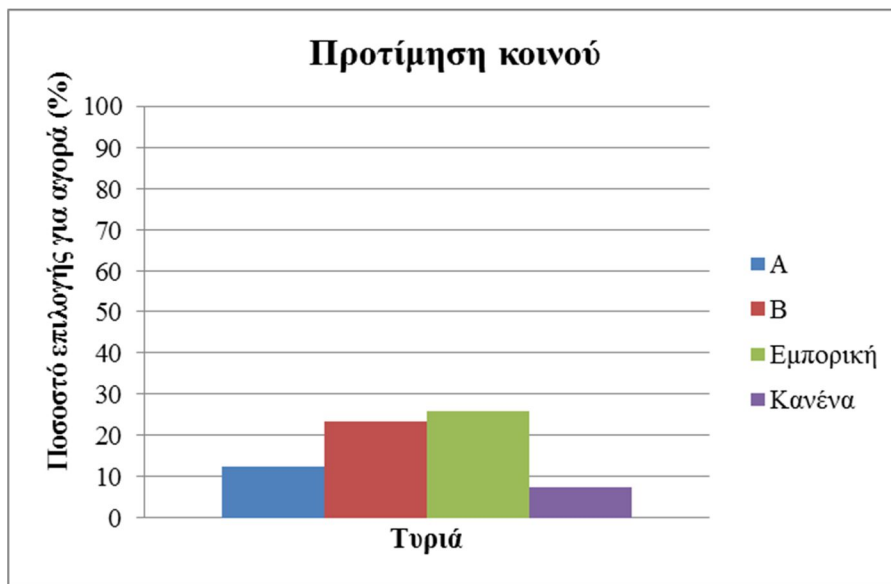


Σχήμα 29: Αξιολόγηση της γεύσης των ώριμων τυριών (>60d). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Στην προτίμηση του κοινού (Σχήμα 30 και 31), το τυρί B1 έλαβε τη μεγαλύτερη βαθμολογία με το τυρί A1 να ακολουθεί και την εμπορική Φέτα να ακολουθεί. Ωστόσο στην συνολική κατάταξη (Σχήμα 31) η εμπορική Φέτα, φαίνεται να προτιμάται συγκριτικά με τα υπόλοιπα τυριά.



Σχήμα 30: Πρόθεση αγοράς των ώριμων τυριών (>60d) από το καταναλωτικό κοινό. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>. Οι δείκτες 1, 2 και 3 αναφέρονται στις 3 επαναλήψεις των τυροκομήσεων

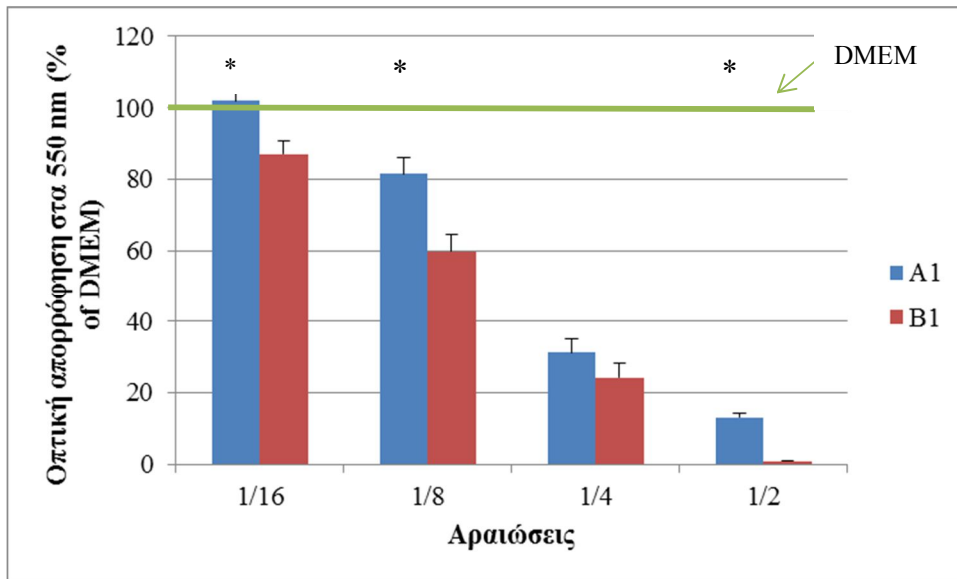


Σχήμα 31: Πρόθεση αγοράς των ώριμων τυριών (>60 d) από το καταναλωτικό κοινό. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. A: *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29, B: *L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

## 7. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών στη βιωσιμότητα των κυττάρων HT-29

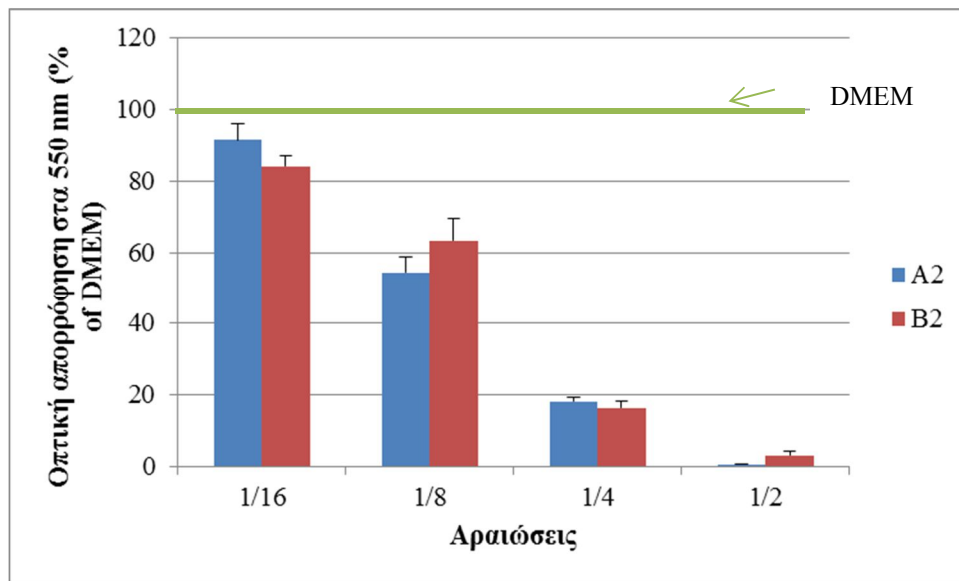
Προκειμένου να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων HT-29 (ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου) μετά την προσθήκη των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών Α και Β πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο ΜΤΤ. Προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών να καταστέλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29.

Στο **Σχήμα 32** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης (Α και Β) σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Γίνεται αντιληπτό ότι τα κύτταρα HT-29 μετά την προσθήκη του τυριού Β1 (*P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) εμφανίζουν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τα ίδια κύτταρα κατόπιν προσθήκης του τυριού Α1. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην ύπαρξη προπιονικού οξέος στο τυρί Β1, το οποίο έχει προκύψει μετά τη ζύμωση των προπιονικών βακτηρίων (Cummins & Johnson, 1986).



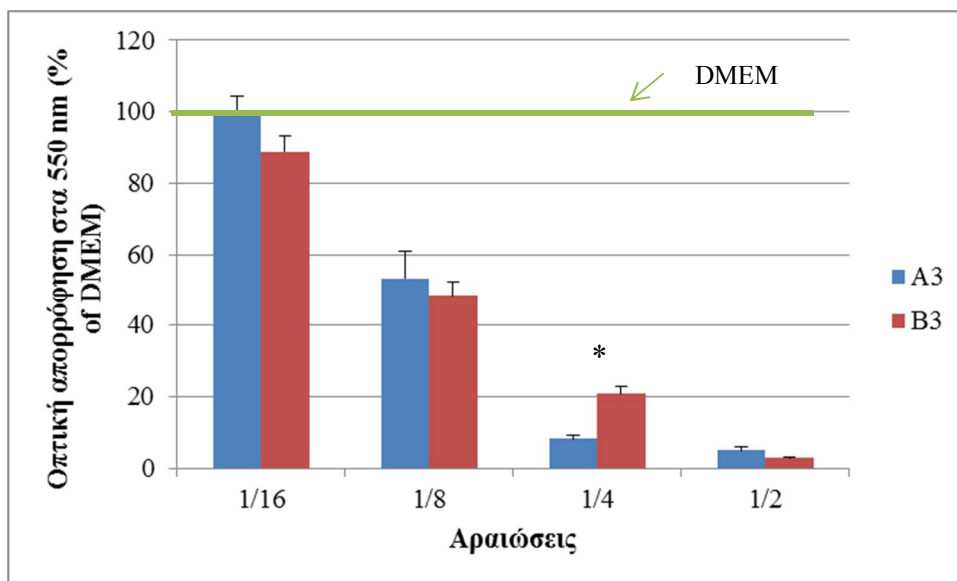
Σχήμα 32: Δοκιμασία βιωσιμότητας στα κύτταρα HT-29. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, των οποίων έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A1: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B1: λευκό τυρί άλμης (60 d) της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>, \*: P < 0,05

Στο **Σχήμα 33** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 2<sup>ης</sup> τυροκόμησης (A και B) σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Φαίνεται ότι τα κύτταρα HT-29 μετά την προσθήκη του τυριού A2 (*P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) δεν εμφανίζουν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τα ίδια κύτταρα κατόπιν προσθήκης του τυριού B2, γεγονός αναμενόμενο καθώς το τυρί B2 έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση προπιονικού οξέος (73 mM) συγκριτικά με τα υπόλοιπα 2 τυριά (B1 και B3).



Σχήμα 33: Δοκιμασία βιωσιμότητας στα κύτταρα HT-29. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, των οποίων έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A2: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της 2<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B1: λευκό τυρί άλμης (60 d) της 2<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

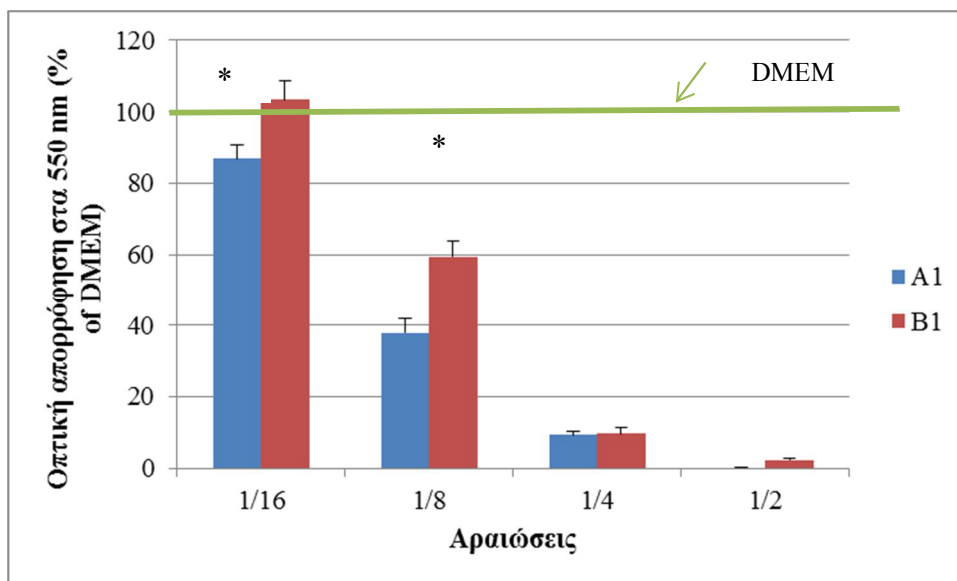
Στο **Σχήμα 34** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης (A και B) σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των HT-29 ( $P < 0,05$ ) παρατηρήθηκαν μόνο στην αραιώση 1/4, με το A3 να παρουσιάζει μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με το B3, που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε εξάντληση θρεπτικών συστατικών.



Σχήμα 34: Δοκιμασία βιωσιμότητας στα κύτταρα HT-29. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, των οποίων έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A3: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B1: λευκό τυρί άλμης (60 d) της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

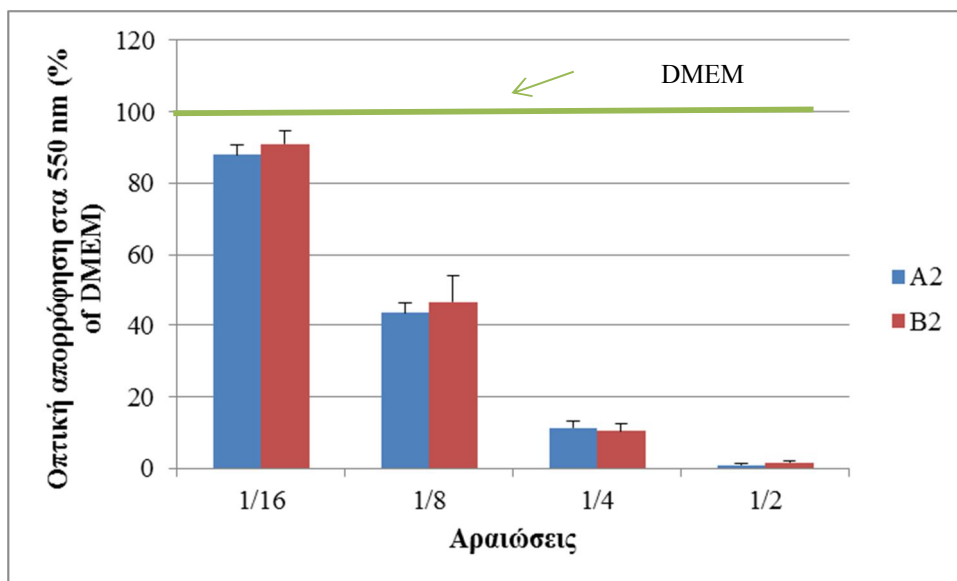
Στο **Σχήμα 35** απεικονίζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης (A και B), χωρίς να έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επιβίωση ( $P < 0,05$ ) στα πιο αραιά δείγματα (1/8 και 1/16), με το A1 να επιβιώνει λιγότερο σε σύγκριση με το B1.





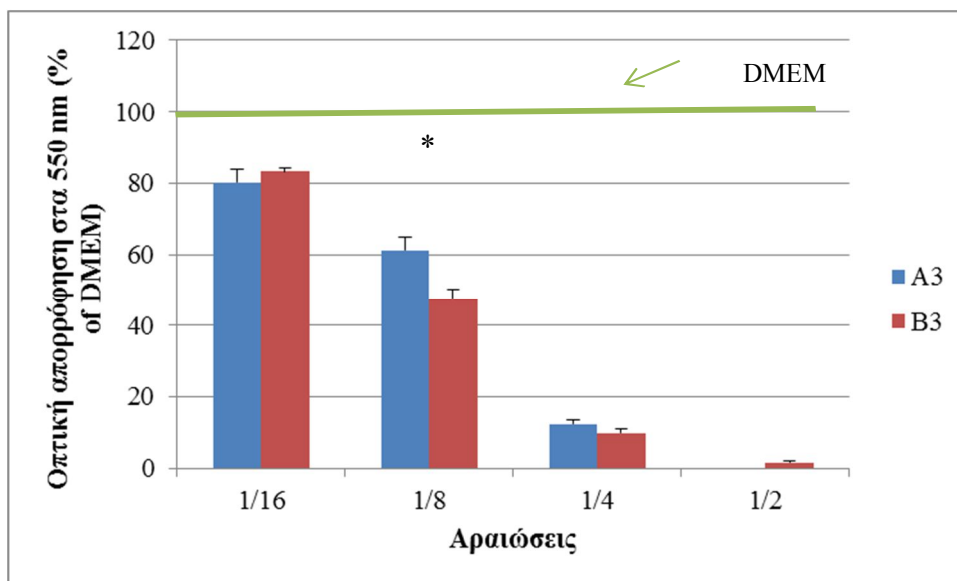
Σχήμα 35: Δοκιμασία βιωσιμότητας στα κύτταρα HT-29. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A1: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B1: λευκό τυρί άλμης (60 d) της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>, \*: P<0,05

Στο **Σχήμα 36** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 2<sup>ης</sup> τυροκόμησης (A και B), χωρίς να έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Όπως και στην περίπτωση των τυριών της 2<sup>ης</sup> τυροκόμησης όπου είχε προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τυριών A2 και B2 σε καμία από τις 4 αραιώσεις.



Σχήμα 36: Δοκιμασία βιωσιμότητας στα κύτταρα HT-29. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A2: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της δεύτερης τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B2: λευκό τυρί άλμης (60 d) της δεύτερης τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>

Στο **Σχήμα 37** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης (A και B), χωρίς να έχει προηγηθεί ρύθμιση του pH στο 7, σε τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις (από 1/2 έως 1/16), να καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,05$ ) στην αραιώση 1/8, με το A3 να εμφανίζει μικρότερη επιβίωση σε σχέση με το B3.



Σχήμα 37: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων, ακολουθεί επώαση 72 h και στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της βιωσιμότητας όπως περιγράφεται στην § 10.4. Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A3: λευκό ώριμο τυρί άλμης (60 d) της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *L. bulgaricus* ACA-DC 87, B3: λευκό τυρί άλμης (60 d) της 3<sup>ης</sup> τυροκόμησης με *S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>, \* : P<0,05

## 8. Προσδιορισμός ωσμωμοριακότητας

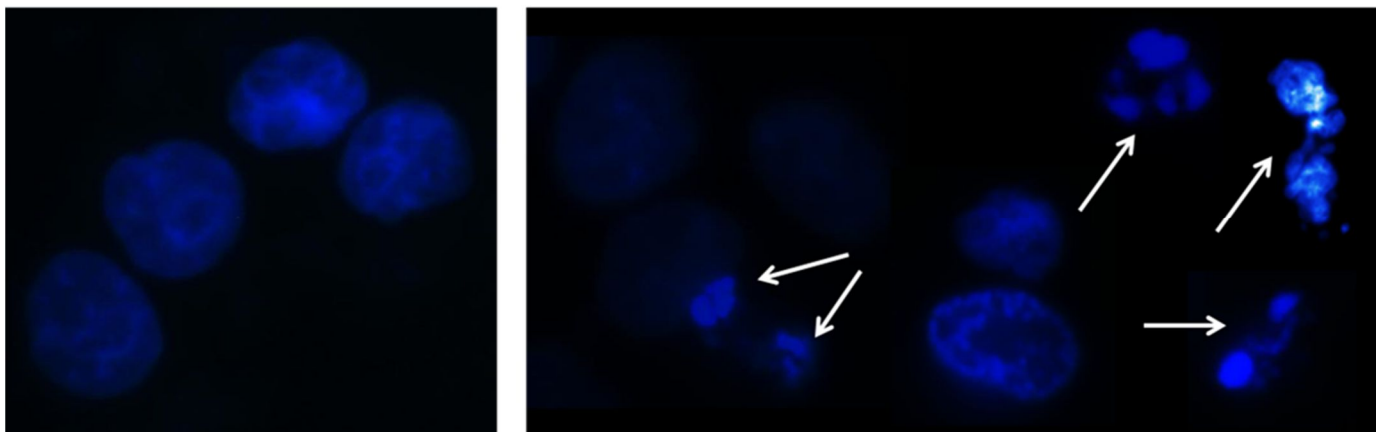
Μετρήθηκε η ωσμωμοριακότητα των ώριμων τυριών (60 d) στις τρεις διαφορετικές τυροκομήσεις και βρέθηκε ότι οι τιμές που προέκυψαν ήταν πολύ μεγαλύτερες από την τιμή που «ανέχονται» τα καρκινικά κύτταρα (0,5 osm/kg) καθώς πάνω από αυτήν, πεθαίνουν. Στην περίπτωση αυτή, στις υψηλές συγκεντρώσεις (αραιώσεις 1/2 και 1/4) θα μπορούσαμε να αποδώσουμε τη μειωμένη επιβίωση των κυττάρων HT-29 στην υψηλή ωσμωμοριακότητα.

Πίνακας 3: Τιμές ωσμωμοριακότητας (osm/kg) στα τυριά A και B των τριών τυροκομήσεων με και χωρίς ρύθμιση του pH στο 7.

pH 7		pH 4,5	
A1	0,9	A1	1,3
A2	1,4	A2	1,1
A3	1,5	A3	0,9
B1	1,2	B1	0,9
B2	1,2	B2	0,9
B3	1,4	B3	1,0

## 9. Χρώση DAPI για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μορφολογίας του πυρήνα των κυττάρων HT-29 μετά από επώασή τους με τα υδατικά εκχύλισματά των τυριών A1 (*L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29) και B1 (*L. bulgaricus* ACA-DC 87, *S. thermophilus* ACA-DC 29 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>), χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού αφού έχει προηγηθεί προηγουμένως χρώση DAPI (**Σχήμα 38**). Στο αριστερό μέρος του σχήματος παρουσιάζονται οι πυρήνες των κυττάρων HT-29 τα οποία έχουν επεξεργαστεί με το υδατικό εκχύλισμα του τυριού A1. Παρατηρείται ότι οι πυρήνες των HT-29 δεν εμφανίζουν κάποια αλλαγή στη μορφολογία τους μετά από την επώαση των κυττάρων με το A1. Ωστόσο όταν τα κύτταρα HT-29 επωαστούν με το υδατικό εκχύλισμα του τυριού B1 παρουσιάζουν κατακερματισμένους πυρήνες καθώς και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων στις 24 h.



Σχήμα 38: Εμφάνιση αποπτωτικών HT-29 κυττάρων μετά από επώαση με τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών A1 (δεξιά) και B1 (αριστερά) (αραίωση 1/16). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h με τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση DAPI και τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα βέλη στο δεξί μέρος του σχήματος υποδεικνύουν τους αποπτωτικούς πυρήνες καθώς και τον σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων

Πραγματοποιήθηκε χρώση DAPI μόνο για τους πυρήνες των κυττάρων HT-29 που είχαν επωαστεί με τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών της πρώτης τυροκόμησης και όχι με τα τυριά των υπολοίπων δύο τυροκομήσεων καθώς τα αποτελέσματα του MTT στην δεύτερη και τρίτη τυροκόμηση δεν έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα, δηλαδή διαφορά στην επιβίωση των HT-29 που να οφείλεται στα τυριά στα οποία είχε προστεθεί *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του DAPI, συνάδουν με τη βιβλιογραφία (Jan et al., 2002; Lan et al., 2007) καθώς όταν τα κύτταρα HT-29 επώάζονται με *P. shermanii* και εν συνεχεία πραγματοποιηθεί χρώση DAPI παρατηρούνται χαρακτηριστικά απόπτωσης.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή αποτελεί μια καινοτόμο προσπάθεια παρασκευής λευκού τυριού άλμης με την χρήση προπιονικών βακτηρίων. Παρασκευάστηκαν 2 τυριά εκ των οποίων το ένα (*L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29) ήταν ο μάρτυρας ενώ στο άλλο (*S. thermophilus* ACA-DC 29, *L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup>) είχε γίνει προσθήκη προπιονικών βακτηρίων. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 τυροκομήσεις. Η τεχνολογία παρασκευής που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της Φέτας. Μετά την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών αναλύσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι εναρκτήριες καλλιέργειες (*L. bulgaricus* ACA-DC 87 και *S. thermophilus* ACA-DC 29) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακατάλληλες γι' αυτόν τον σκοπό καθώς δεν προκάλεσαν την σύντομη πτώση του pH αλλά ούτε μείωσαν την υγρασία στα επιθυμητά όρια (56 %). Ωστόσο αξίζει να τονιστεί ότι το *P. shermanii* LMG 16424<sup>T</sup> αναπτύχθηκε και εμφάνισε υψηλούς πληθυσμούς μέχρι και το πέρας της ωρίμανσης του τυριού γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αργή πτώση του pH. Όταν ολοκληρώθηκε η ωρίμανση του τυριού πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ελέγχου της επίδρασης του τυριού στην επιβίωση των κυττάρων HT-29. Όμως μόνο το τυρί της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης που περιείχε τα προπιονικά βακτήρια προκάλεσε μεγαλύτερο θάνατο στα κύτταρα HT-29 σε σύγκριση με το τυρί-μάρτυρα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην πολυπλοκότητα του συστήματος του τυριού. Εν συνεχεία, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το τυρί της 1<sup>ης</sup> τυροκόμησης επάγει απόπτωση στα κύτταρα HT-29 πραγματοποιήθηκε χρώση DAPI και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Οι εικόνες που λήφθηκαν συνάδουν με τη μέχρι τώρα δημοσιευμένη βιβλιογραφία, δηλαδή παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικοί πυρήνες αλλά και αποπτωτικά σώματα.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν από τις κάτωθι αναφερόμενες εταιρείες:

- Τα Kanamycin Aesculin Azide (KAA) Agar, Violet Red Bile Agar (VRBA) και Rogosa Agar από την LabM (UK).
- Το Pal Propriobac kit από την Standa (France).
- Τα MRS broth, M17 broth, Plate Count Agar (PCA), Reinforced Clostridial Medium (RCM) broth, Bacteriological Agar type E και Ringer's Solution από την Biokar (France).
- Η λακτόζη και το γαλακτικό οξύ από την Mallinckrodt (USA).
- Η γλυκόζη από την AppliChem (Germany).
- Η γαλακτόζη, το προπιονικό οξύ, το οξικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, το κιτρικό οξύ και το υδροχλωρικό οξύ από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Το θειικό οξύ από την Merck (Germany).
- Η γλυκερόλη από την HiMedia (India).
- Οι σακούλες δειγματοληψίας από την LabM (UK).
- Τα υλικά της καλλιέργειας των κυττάρων (MEM κατά Dulbecco, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, όξινο ανθρακικό νάτριο) από την Biochrom (Germany).
- Η τρυψίνη και ο ορός εβρύου βοός από την Gibco BRL (Invitrogen, Paisley, UK).
- Οι φλάσκες μεγέθους 75cm<sup>2</sup> από την Corning (USA).
- Οι πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων από την Greiner (USA).
- Τα κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet), σαφρανίνη (safranine) και μπλε της βρωμοκρεσόλης (purple bromocresol) από την Merck (Germany).
- Τα φίλτρα διαμέτρου 0,22 μm από Whatman (Germany).
- Τα GasPak από την Becton, Dickinson and Company (USA).
- Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την Sigma-Aldrich (Germany).

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd El-Salam M. E., Alichanidis E. & Zerfiridis G. K. (1993). Domiati and Feta type cheeses. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (2nd ed., Vol. 2, pp. 301–335). London: Chapman & Hall.
- Abeijón Mukdsi M. C., Medina R. B., Katz M. B., Pivotto R., Gatti P. & Gonzalez S.N., (2009). Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1036–44.
- Accolas J.P., Melcion D. & Vassal L. (1978). Etude de la flore superficielle des fromages de Gruytre et de Beaufort. In XXth International Dairy Congress, Paris, pp. 773-774. Edited by Congrilaire, Paris.
- Ahmed F. E., (2007). Colorectal cancer epigenetics: the role of environmental factors and the search for molecular biomarkers. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 25, 101–154.
- Anifantakis E. M. & Moatsou G (2006). Feta and Other Balkan Cheeses. In: *Brined cheeses*, (edr A. Y. Tamime), Blackwell Publishing Ltd, 43-76.
- Anifantakis E. M., (1991). Greek Cheeses, a Tradition of Centuries. National Dairy Committee of Greece, Athens, 27-42.
- Anti M., Armuzzi A., Morini S., Iascone E., Pignataro G., Coco C., Lorenzetti R., Paolucci M., Covino M., Gasbarrini A., Vecchio F., Gasbarrini G., (2001). Severe imbalance of cell proliferation and apoptosis in the left colon and in the rectosigmoid tract in subjects with a history of large adenomas. *Gut* 48:238–246.
- Arai T. & Kino I., (1995). Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J. Pathol.* 176:37–44.
- Ashraf R., & Shah N. P., (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt -a review. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 194-208.
- Aw T. Y., (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*; 70:557-65.
- Axelsson L., (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, third ed. Marcel Dekker, New York, pp. 1–66.
- Bach S. P., Renehan A. G., Potten C. S., (2000). Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21:469–476.
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born M., Danenberg E., Clarke A. R., Sansom O. J. & Clevers H., (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.
- Benz M., Schink B., Brune A., (1998). Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4507–4512.
- Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. & Cogan T. M., (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.



- Beresford T. & Williams A. (2004) The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General Aspects, 3rd edn, pp 287–318. Fox P F, McSweeney P L H, Cogan T M and Guinee T P, eds. London: Elsevier.
- Bernard, K. A., Shuttleworth, L., Munro, C., Forbes-Faulkner, J. C., Pitt, D., Norton, J. H., Thomas, A. D., (2002). *Propionibacterium australiense* sp. nov. derived from granulomatous bovine lesions. *Anaerobe* 8, 41–47.
- Bevilaqua A. E. & Califano A. N., (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* 54, 1076-1079.
- Bouzas J., Knatt C. A., Bodyfelt F. & Torres J. A., (1991). Simultaneous determination of sugars and organic acids in cheddar cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* 56, 276-278.
- Britz T, Steyn P., (1979). Volatile fatty acid production by the dairy and clinical propionibacteria and related coryneforms. *Phytophylactica*, 11: 111-115.
- Caplice E. & Fitzgerald. G. F., (1999). Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol*, 50, 131-149.
- Califano A. N. & Bevilaqua A. E., (2000). Multivariate analysis of the organic acids content of gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 946-960.
- Carr N. J., (2000). M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124:1768–1772
- Centeno J. A., Menendez S., Hermida M. & Rodriguez-Otero J. L., (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 97–111.
- Chamba J. F. & Perréard E., (2002). Contribution of propionibacteria to lipolysis of cheese — a review III. Ripening and flavor production. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 593–609.
- Crow V. L., (1987). Citrate cycle intermediates in the metabolism of aspartate and lactate by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2600–2602.
- Cogan T. M. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.
- Cummins C. S., Johnson J. L. *Propionibacterium*, (1986). In: Holt JG. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD, USA: The Williams & Wilkins Co. p. 1346-1353.
- Cummins C. S., Johnson J. L., (1992). The genus *Propionibacterium*. In: Balows E., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, Verlag.
- Daniel N. N. , Korsmeyer S. J. : Cell death: critical control points. *Cell* 2004, 116(2):205-219.
- De Miranda, N. F., Nielsen M., Pereira D., van Puijenbroek M., Vasen H. F., Hes F. J., van Wezel T. & Morreau H., (2009). MUTYH-associated polyposis carcinomas frequently lose HLA class I expression - a common event amongst DNA-repair-deficient colorectal cancers. *J. Pathol.* 219, 69–76.

- Deutsch S. M., Falentin H., Dols-Lafargue M., LaPointe G., Roy D., (2008). Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *International Journal of Food Microbiology* 125, 252–258.
- Deutsch S. M., Le Bivic P., Herve C., Madec M. N., LaPointe G., Jan G., Le Loir Y., Falentin H., (2010). Correlation of the capsular phenotype in *Propionibacterium freudenreichii* with the level of expression of *gtf*, a unique polysaccharide synthase-encoding gene. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2740–2746.
- Dherbécourt J., Falentin H., Canaan S., Thierry A., (2008). A genomic search approach to identify esterases in *Propionibacterium freudenreichii* involved in the formation of flavour in Emmental cheese. *Microbial Cell Factories* 7.
- Dherbécourt J., Bourlieu C., Maillard M. B., Aubert-Frogerais L., Richoux R., Thierry A., (2010a). Time course and specificity of lipolysis in Swiss cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 11732–11739.
- Di Cagno R., Quinto M., Corsetti A., Minervini F. & Gobbetti M., (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int. Dairy J.* 16: 119–30.
- Dorner, W., (1939). Recherches sur les bactéries propioniques. *Le Lait* 19, 897–918.
- Downes J., Wade W. G., (2009). *Propionibacterium acidifaciens* sp. nov., isolated from the human mouth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2778–2781.
- Dupuis C., Corre C., Boyaval P. (1995). Proteinase activity of dairy *Propionibacterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 40: 750-755
- Evan G., Littlewood T., (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281:1317–1322.
- Evertsson S., Bartik Z., Zhang H., Jansson A., Sun X. F., (1999). Apoptosis in relation to proliferating cell nuclear antigen and Dukes' stage in colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 15:53–58.
- Falentin H., Deutsch S. M., Jan G., Loux V., Thierry A., Parayre S., Maillard M. B., Dherbecourt J., Cousin F. J., Jardin J., Siguier P., Couloux A., Barbe V., Vacherie B., Wincker P., Gibrat J. F., Gaillardin C., Lortal S., (2010a). The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PloS One* 5, e11748.
- FAO/WHO, (2006). *Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*. Rome: FAO Food and Nutrition.
- Fitz A. Ueber Spaltpilzgährungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* 1879; 12: 474–481. doi: 10.1002/cber.187901201136.
- Fox, P. F., Law J., McSweeney P. L. H., Wallace J., (1993). In: Fox, P.F. (Ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects, Biochemistry of Cheese Ripening*, Vol. 1, Second Edition, Chapman and Hall, London, UK, pp. 389-438.
- Fox P. F. & Wallace J. M., (1997). Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Food Microbiology*, 45, 17–85.
- Fox P. F., Lucey J. A. & Cogan T. M., (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29(4), 237-253.
- Fröhlich-Wyder M. T., Bachmann H. P., (2004). Cheeses with propionic acid fermentation. In: Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (Eds.), *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, London, pp. 141–156.

- Furuichi K., Katakura Y., Ninomiya K., Shioya S., (2007). Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3137–3143.
- Gagnaire V., Thierry A., Léonil J., (2001). *Propionibacteria* and facultatively heterofermentative lactobacilli weakly contribute to secondary proteolysis of Emmental cheese. *Lait*; 81: 339–353.
- Galluzi L., Maiuri M. C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G.: Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007, 14:1237-1266.
- Garrity G. M. & Holt J. G., (2001). The road map to the manual. In: Boone DR, Castenholz RW (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York.
- Gautier M., Mouchel N., Rouault A., Sanseau P. Determination of genome size of four *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis. *Lait* 1992; 72: 421-446.
- Geier M, Butler R, Howarth G., (2006) Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer; *Cancer Biol. Ther.* 5:1265–1269
- Ghobrial I. M., Witzig T. E., Adjei A. A.: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 2005, 55:178-194.
- Gill C., Rowland I., (2002) Diet and cancer: assessing the risk. *Br. J. Nutr.* 88:S73–S87.
- Golstein, P. & Kroemer, G., (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.
- Gripou, J. C., (1993). In: Fox, P.F. (Ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Major Cheese Groups. Mould-Ripened Cheeses. Vol. 2, Second Edition*, Chapman & Hall, London, UK, pp. 111-114.
- Grunstein M., (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature (Lond.)* 389: 349–352.
- Gryfe R., Swallow C., Bapat B., Redston M., Gallinger S., Couture J., (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer*; 21:233-300.
- Hansen, E. B., (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.
- Hengartner M. O. : Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 2000, 104:325-328.
- Hervé C., Fondrevez M., Chéron A., Barloy-Hubler F., Jan G., (2007). Transcarboxylase mRNA: a marker which evidences *P. freudenreichii* survival and metabolic activity during its transit in the human gut. *International Journal of Food Microbiology* 113, 303–314.
- Hettinga D. H. & Reinbold G. W., (1972). The propionic-acid bacteria — a review II metabolism. *Journal of Milk and Food Technology* 35, 358–372.
- Hinnebusch B. F., Meng S., Wu J. T., Archer S. Y., Hodin R. A., (2002). The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J. Nutr.*; 132:1012-7.
- Houwen F. P., Dijkema C., Stams A. J. M., Zehnder A. J. B., (1991). Propionate metabolism in anaerobic bacteria; determination of carboxylation reactions with <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics* 1056, 126–132.

- Huerta, P. T., Kowal, C., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., Diamond, B., (2006). Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 678–683.
- Jan G., Belzacq A. S., Haouzi D., Rouault A., Metivier D., Kroemer G., Brenner C., (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ.* 9: 179–188.
- Iida K., Ohtaka K., Kajiwara M., (2007). Mechanism of the ring contraction process in vitamin B-12 biosynthesis by the anaerobe Propionibacterium shermanii under aerobic conditions. *The FEBS Journal* 274, 3475–3481.
- INCA – Instituto nacional de câncer (2008) Ações de prevenção primária e secundária no controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca 2008: 628.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69–90.
- Jones J., Bentas W., Blaheta R. A., Makarevic J., Hudak L., Wedel S. et al., (2008). Modulation of adhesion and growth of colon and pancreatic cancer cells by the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Int. J. Mol. Med.*; 22:293-9.
- Kandler O., (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224.
- Karp G.: Cell and molecular biology: Concepts and experiments. 5 edition. John New Jersey: Wiley and Sons; 2008, 653-657.
- Klein G., Pack A. & Reuter G., (1998). Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1825-1830.
- Koussemon M., Combet-Blanc Y., Patel B. K., Cayol J. L., Thomas P., Garcia, J. L., Ollivier B., (2001). Propionibacterium microaerophilum sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1373–1382.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G., (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, 12:1463-1467.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiol. Rev.* 2007, 87(1):99-163.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H. et al, (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell. Death. Differ.* 16:3–11.10.1038/cdd.2008.150
- Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J. C.: Robins and Cotran: pathologic basis of disease. 8 edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, 25-32.
- Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L. S., Hansen, J. M., Li, T., Yamoah, K., Pan, Z. Q., Jones, D. P. & Neish, A. S. (2007). Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 26, 4457–4466.
- Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M. & Yamasato, K. (1997). Propionibacterium cyclohexanicum sp. nov., a new acid-tolerant  $\omega$ -cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 825±831
- LaCasse E. C., Mahoney D. J., Cheung H. H., Plenchette S., Baird S., Korneluk R. G.: IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008, 27(48):6252-6275.

- Lan A. et al., (2007). Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *Br. J. Nutr.* 97:714–724
- Langsrud T., Reinbold G. W., (1973a). Flavor development and microbiology of Swiss cheese — a review. II. Starters, manufacturing processes and procedures. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 531–542.
- Langsrud T., Reinbold G. W., (1973b). Flavor development and microbiology of Swiss cheese — a review III. Ripening and flavor production. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 593–609.
- Lavrik I. N., Golks A., Krammer P. H.: Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 2005, 115:2665-2672.
- Law, B. A. (Ed), (1997). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Second edition. Blackie academic & professional. London, UK.
- Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrqjiannaki A., (1993). Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* 10, 31-41.
- Litopoulou-Tzanetaki E. & Tzanetakis N., (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* 9,13-19.
- Leuschner R. G. K., Robinson T. P., Hugas M., Cocconcelli P. S., Richard-Forget F., Klein G., Licht T. R., Nguyen-the C., Querol A., Richardson M., Suarez J. E., Thrane U., Vlak J. M., von W. A., (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* 21, 21.
- Manjo G, Joris I., (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146:3-15.
- Manolaki P, Katsiari M. C., Alichanidis E., (2006). Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chem.* 98(4): 658-663.
- Marilley L. & Casey M. G., (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.
- Marsili R. T., Ostapenko H., Simmons R. E. & Green D. E., (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science* 46, 52-57.
- McSweeney P. L. H. & Sousa M. J. (2000). A review: Biochemical pathways for the production of flavor compounds in: Fox P. F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Chapman and Hall, London, UK, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 3, pp. 403-468.
- Melen-Mucha G., Niewiadomska H. (2002). Frequency of proliferation, apoptosis, and their ratio during rat colon carcinogenesis and their characteristic pattern in the dimethylhydrazine-induced colon adenoma and carcinoma. *Cancer Invest.* 20:700–712.
- Melino G. The Sirens' song. *Nature* 2001;412:23.
- Merritt A. J., Potten C. S., Watson A. J., Loh D. Y., Nakayama K., Nakayama K., Hickman J. A., (1995). Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6):2261–2271.

- Meurice G., Deborde C., Jacob D., Falentin H., Boyaval P., Dimova D., (2004). In silico exploration of the fructose-6-phosphate phosphorylation step in glycolysis: genomic evidence of the coexistence of an atypical ATP-dependent along with a PPI-dependent phosphofructokinase in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. In *Silico Biology* 4, 0043.
- Meyer J. & Spahn A., (1998). Influence of X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyere cheese. *Milchwissenschaft* 53: 449–53.
- Mogensen G., Salminen S., O'Brien J., Ouwehand A., Holzappel W., Shortt C., Fonden R., Miller G., Donohue D., Playne M., Crittenden R., Salvadori B., Zink R., (2002). Inventory of microorganisms with a documented history of use in food, *Bulletin of the IDF* 10–19.
- Molimard P. & Spinnler H. E. (1996). Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Moquot G., (1979). *Journal of Dairy Research*, 46, 113.
- Mullin W. J. & Emmons D. B. (1997). Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*, 30, 147-151.
- Nikolaou E., Tzanetakis N., Liopoulou-Tzanetaki E. & Robinson R. K. (2002). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 55, 12-17.
- Nomura M., Watari J., Yokota K., Saitoh Y., Obara T., Kohgo Y., (2000). Morphogenesis of nonpolypoid colorectal adenomas and early carcinomas assessed by cell proliferation and apoptosis. *Virchows Arch.* 437:17–24.
- Orla-Jensen S. Die hauptlien des natürlichen bakteriensystems. *Centrlbl Bakteriolog Hyg II Abt.* (1909); 22: 305-346.
- Panari G., (1986). HPLC of organic acids: an approach to cheese analysis. *Milchwissenschaft*, 41, 214-216.
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T.R., (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol*, 15, 546-53.
- Piveteau P., (1999). Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. *Le Lait* 79, 23–41.
- Postma P. W., Lengeler J. W. & Jacobson G. R., (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), 543-594.
- Potten C. S., Wilson J. W., Booth C., (1997). Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15:82–93.
- Regitnig P., Denk H., (2000). Lack of Pseudomelanosis coli in colonic adenomas suggests different pathways of apoptotic bodies in normal and neoplastic colonic mucosa. *Virchows Arch.* 436:588–594.
- Rehberger T. G., Glatz B. A., (1990). Characterization of *Propionibacterium* plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 864-871.
- Savijoki K., Ingmer, H. & Varmanen P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Scott R., 1986. *Cheesemaking practice*. Appl. Sci. Publ. Ltd. London.

- Seufferheld M. J., Alvarez H. M., Farias M. E., (2008). Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5867–5874.
- Sinicrope F. A., Hart J., Hsu H. A., Lemoine M., Michelassi F., Stephens L. C., (1999). Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node-negative colon carcinomas. *Clin. Cancer. Res.* 5:1793–1804.
- Sridhar V. R., Hughes J. E., Welker D. L., Broadbent J. R. & Steele J. L., (2005). Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3025–32.
- Stackebrandt, E. (ed.). *The Prokaryotes: A handbook on the Biology of Bacteria*. Singapur: Springer. 2006. p 400-418.
- Steffen C., Eberhard P., Bosset J. O., Rüegg M., (1993). Swiss-type varieties. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, pp. 83–110.
- Steffensen I. L., Paulsen J. E. & Alexander J., (1997). Genetic and environmental factors in colorectal cancer. Mutations in the familial adenomatous polyposis gene. *Tidsskr Nor Laegeforen* 117, 2046–2051 (in Norwegian).
- Stein K., Borowicki A., Scharlau D., Schettler A., Scheu K. et al. (2012). Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells. *J. Nutr. Biochem.* 23: 777-784.
- Stiles M. E., & Holzapfel W. H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Strater J., Koretz K., Gunthert A. R., Moller P., (1995). In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 37:819–825.
- Tannock G. W., (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 1, 53-64.
- Tharmaraj N., Shah N. P., (2004). Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, pp. 1055–1066.
- Thierry A., Falentin H., Deutsch S. M., Jan G., (2011). Bacteria, beneficial: *Propionibacterium* spp. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier, pp. 403–411.
- Thierry A. & Maillard M. B., (2002). Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Le Lait* 82, 17–32.
- Thierry A., Maillard M. B., Bonnarne P., Roussel E., (2005a). The addition of *Propionibacterium freudenreichii* to Raclette cheese induces biochemical changes and enhances flavour development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4157–4165.
- Thierry A., Maillard M. B., Richoux R., Kerjean J. R., Lortal S., (2005b). *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Le Lait* 85, 57–74.

- Thierry A., Berthier F., Gagnaire V., Kerjean J. R., Lopez C., Noël Y., (2010). Eye formation and Swiss-type cheeses. In: Law B. A., Tamime A. Y. (Eds.), *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell, pp. 360–383.
- Tsujimoto Y., Finger L. R., Yunis J., Nowell P. C., Croce C. M.: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984, 226:1097-1099.
- Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., (1995). The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiol.* 12, 55-63.
- Vafopoulou A., Alichanidis E., Zerfiridis. G., (1989). Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *J. Dairy Res.* 56, 285-296.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., (1990). Effect of *Pediococcus pentosaceus* on ripening changes of Feta cheese. *Microbiologie-Aliments Nutrition* 8, 53-62.
- Valence F., Richoux R., Thierry A., Palva A., Lortal S., (1998). Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheeses: first evidence by using species-specific lysis markers. *The Journal of Dairy Research* 65, 609–620.
- Van Luijk N., Stierli M. P., Schwenninger S. M., Herve C., Dasen G., Jore J. P. M., Pouwels P. H., van der Werf M. J., Teuber M., Meile L., (2002). Genetics and molecular biology of propionibacteria. *Le Lait* 82, 45–57.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Pp. 408-414. Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium.
- Vaux D., Silke J., (2003): Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203:449-504.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., Van Sinderen, D., (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylura. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 495–548.
- Von freudenreich E., Orla-Jensen S. Über die im Emmentalerkase staffindene Propionsäuregärung. *Zbl Bakteriol* (1906); 2: 529-546. 59, 2778–2781.
- Vorobjeva L. I., (1999). *Propionibacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic, pp. 1–291.
- Ye K. M., Shijo M., Miyano K., Shimizu K., (1999). Metabolic pathway of *Propionibacterium* growing with oxygen: enzymes, C-13 NMR analysis, and its application for vitamin B-12 production with periodic fermentation. *Biotechnology Progress* 15, 201–207.
- Walstra, P., Ncomen, A., Geurts, T. J., (1993). In: Fox, P. F. (Ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Major Cheese Groups. Dutch-Type Varieties*. Vol. 2, Second Edition, Chapman & Hall, London, UK, pp. 74-76.
- Wang T. G, Gotoh Y., Jennings M. H., Rhoads C. A., Aw T. Y., (2000). Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance. *Faseb. J.*; 14:1567-76.
- Wilson A. J., Byun D. S., Popova N., Murray L. B., L'Italien K., Sowa Y. et al., (2006). Histone deacetylase3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J. Biol. Chem.*; 281:13548-58.



- Wong R. S., (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30:87.
- Wyder M. T., Bosset J. O., Casey M. G., Isolini D., Sollberger H., (2001). Influence of two different propionibacterial cultures on the characteristics of Swiss-type cheese with regard to aspartate metabolism. *Milchwissenschaft* 56, 78–81.
- Yang S. Y., Sales K. M. & Winslet M. C. (2009). Apoptosis in Colorectal Tumorigenesis and Chemotherapy. In: Chen G. G, Lai P. B. S. (Eds.), *Apoptosis in Carcinogenesis & Chemotherapy, Apoptosis in Cancer*, Springer p. 75-88.
- Ye, K. M., Shijo, M., Miyano, K., Shimizu, K., (1999). Metabolic pathway of *Propionibacterium* growing with oxygen: enzymes, C-13 NMR analysis, and its application for vitamin B-12 production with periodic fermentation. *Biotechnology Progress* 15, 201–207.
- Zhu Y., Michelle Luo T., Jobin C. & Young, H. A. (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* 309, 119–127.
- Sittampalam, G.S., Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, V., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Riss, T., Trask, O.J., Weidner, J., Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J. and Minor, L. (2004): *Cell Viability Assays*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).

#### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανυφαντάκης Ε.Μ, (1993). Τυροκομία, Ελληνικά τυριά, Φέτα Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς 132-137.
- Ανυφαντάκης Ε.Μ, (1998). ΕΠΕΤ ΙΙ Έργο 564/95, Φάση 130, Παραδοτέο D1301. Τεχνολογία της Φέτας Μελέτη ορισμένων παραμέτρων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα.
- Ζίφα Α., (2010). Διακυτταρική Επικοινωνία και Μεταγωγή Σήματος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, 489-490.
- Κυριακόπουλος Π. Ι., (1995). Η τυροκομία στην πράξη, Τρίαινα Εκδοτική, Αθήνα, 143-151.
- Μπίντσης Θ., Παπαδήμας Φ., (2009). Τυρί, Εκδόσεις Ψύχαλος, Αθήνα, 85-106.