

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΙΙΙ
(ΚΩΔ. ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ: ΕΤΔΑ 3434)**

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: Οι φοιτητές να εξοικειωθούν με θέματα που αφορούν στον ποιοτικό έλεγχο του προϊόντος ζύμωσης, «Τυρί»

Διδάσκοντες:

Καθηγητής Καμιναρίδης Σ., Λέκτορας Ακτύπης Α,

Μέλη ΕΔΙΠ: Αναστασίου Ρ., Γεωργάλα Α., Γεωργαλάκη Μ., Ζουμποπούλου Γ., Μανωλοπούλου Ε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΙΙΙ.....	1
ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ	1
ΑΣΚΗΣΗ 4-ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ.....	3
ΔΕΙΓΜΑ 1: ΜΑΛΑΚΟ ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ	5
ΔΕΙΓΜΑ 2: ΣΚΛΗΡΟ ΤΥΡΙ ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ	6
ΔΕΙΓΜΑ 3: ΤΥΡΙ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΥΖΗΘΡΑ.....	8

ΑΣΚΗΣΗ 4-ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι ομάδες των μικροοργανισμών ζύμες και μύκητες, εντερόκοκκοι, μικρόκοκκοι και εντεροβακτήρια αποτελούν τη **χλωρίδα επιμόλυνσης των τυριών** και χαρακτηρίζονται ως **μικροοργανισμοί δείκτες**.

Τα τυριά αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα γαλακτοκομικών προϊόντων. Από μικροβιολογικής άποψης δεν είναι στείρα προϊόντα. Ο έλεγχός τους, όπως και για πολλά άλλα τρόφιμα, βασίζεται στα **γενικά κριτήρια ποιοτικού ελέγχου**, που αφορούν

- α. μακροσκοπικά χαρακτηριστικά
- β. χημική σύσταση και
- γ. τήρηση μικροβιολογικών κριτηρίων.

Τα διαφορετικά είδη τυριών, που είτε ωριμάζουν είτε όχι, φέρουν σχετικά υψηλούς πληθυσμούς μικροοργανισμών από τις πιο κάτω κατηγορίες:

A. Οξυγαλακτικά βακτήρια των γενών *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, τα οποία προστίθενται στα τυριά που ωριμάζουν. Συμβάλλουν στην ζύμωση της λακτόζης και στη συνέχεια στην ωρίμαση των τυριών, ενώ βακτήρια του γένους *Propionibacterium* προστίθενται συμπληρωματικά στην παρασκευή τυριών τύπου Γραβιέρας για την παραγωγή προπιονικού οξέος και CO₂ από τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος.

B. Θερμοάντοχα είδη βακτηρίων (*Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) που μπορεί, αν υπήρχαν στο νωπό γάλα, να επέζησαν της θερμικής επεξεργασίας που δέχτηκε το προς τυροκόμηση γάλα. Τα βακτήρια αυτά πρέπει να βρίσκονται σε μικρό πληθυσμό, έναντι της οξυγαλακτικής χλωρίδας, ώστε να μην εκτρέψουν την πορεία της ζύμωσης της λακτόζης.

Γ. Μικροοργανισμοί επιμόλυνσης Οι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του τυριού προέρχονται από το αλάτι, την πυτιά, τα άλλα πρόσθετα, τα σκεύη, τα μηχανήματα, το περιβάλλον αλλά και από το προσωπικό.

Γ₁. Τα βακτήρια *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus* κ.α καθώς και οι ζύμες ή/και μύκητες, ανάλογα με τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στα διαφορετικά στάδια παραγωγής των τυριών

Γ₂. Παθογόνοι μικροοργανισμοί των γενών *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* κ.α., εάν οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι καλές με κύρια πηγή μόλυνσης το προσωπικό.

Ο **συνολικός πληθυσμός μικροοργανισμών** μεταβάλλεται ανάλογα με τους παράγοντες που διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον του τυριού όπως, το pH, η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού, η αλατοπεριεκτικότητα κ.α.

Σε περίπτωση παρασκευής τυριού από νωπό (χωρίς παστερίωση) γάλα η πλούσια σε είδη και αριθμό η μικροβιακή του χλωρίδα μεταφέρεται στο τυρόπηγμα. Όμως σε αυτή την περίπτωση, εάν το γάλα περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο η Δημόσια Υγεία για αυτό χρειάζονται συνεχείς μικροβιολογικοί έλεγχοι του τυριού σε όλα τα στάδια παρασκευής, ωρίμασής του κλπ. Στη χώρα μας δεν επιτρέπεται η χρήση του νωπού γάλακτος για παρασκευή και εμπορία τυροκομικών προϊόντων.

Για την ασφάλεια των τυροκομικών προϊόντων ιδιαίτερο βάρος δίνεται στη πρόληψη των μικροβιολογικών κινδύνων, με την εφαρμογή κατάλληλων συστημάτων HACCP, ωστόσο η εξέταση του έτοιμου προϊόντος-τυριού, είναι απαραίτητη και αφορά την αναζήτηση,

α. μικροοργανισμών δεικτών και

β. παθογόνων βακτηρίων ή τοξινών τους.

Ο πληθυσμός ζυμών και μυκήτων που υπερβαίνει το 10^5 cfu/g, θεωρείται **κρίσιμο όριο** για την υποβάθμιση του προϊόντος, κυρίως στα μαλακά τυριά άλμης (π.χ Φέτα) και στα Φρέσκα, χωρίς ωρίμαση τυριά.

ΔΕΙΓΜΑ 1: ΜΑΛΑΚΟ ΤΥΡΙ ΦΕΤΑ

Η Φέτα, είναι ένα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) Ελληνικό μαλακό λευκό τυρί άλμης, το οποίο ωριμάζει και διατηρείται σε άλμη, με αλμυρή, ελαφρά όξινη γεύση και ευχάριστες οργανοληπτικές ιδιότητες εξ αιτίας των οποίων έχει αποκτήσει διεθνή αποδοχή. Η Φέτα παρασκευάζεται από παστεριωμένο πρόβειο γάλα ή μείγμα πρόβειου και αίγιου γάλακτος με την προσθήκη οξυγαλακτικών καλλιεργειών. Στο μείγμα, το αίγιο γάλα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 30%,.

ΟΜΑΔΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΞΕΤΑΣΘΟΥΝ: ΖΥΜΕΣ/ΜΥΚΗΤΕΣ & ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ζύμες & Μύκητες

Η πρώτη αραιώση γίνεται με τη διαδικασία Stomacher (10 g τυριού και 90 ml 2% w/v κιτρικού νατρίου), για τις υπόλοιπες αραιώσεις χρησιμοποιείται το αραιωτικό διάλυμα Ringer.

Δεκαδικές αραιώσεις: **(-1,-2)**

Θρεπτικό υπόστρωμα: Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC)

Διαδικασία: Επιφανειακή εξάπλωση

Επώαση: 25 °C/3-5 days

Αρίθμηση αποικιών

Υπολογισμός αποτελέσματος (cfu/ g)

Εντερόκοκκοι

Δεκαδικές αραιώσεις: **(-1,-2)**

Θρεπτικό υπόστρωμα: Kanamycin Esculine Azide Agar (KAA)

Διαδικασία: Επιφανειακή εξάπλωση

Επώαση: 37 °C/24 h

Αρίθμηση αποικιών

Υπολογισμός αποτελέσματος (cfu/g)

ΔΕΙΓΜΑ 2: ΣΚΛΗΡΟ ΤΥΡΙ ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ

Το Κεφαλοτύρι είναι ένα παραδοσιακό σκληρό Ελληνικό τυρί που ωριμάζει και παρασκευάζεται από πρόβειο ή αίγαιο γάλα ή μείγμα αυτών.

ΟΜΑΔΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΞΕΤΑΣΘΟΥΝ: ΜΙΚΡΟΚΟΚΚΟΙ, ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

ΜΙΚΡΟΚΟΚΚΟΙ: Μικροοργανισμοί που ανήκουν στην οικογένεια Micrococcaceae. Ενα από τα 27 γένη της οικογένειας είναι το γένος *Staphylococcus*. Από τους μικροοργανισμούς αυτού του γένους ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* και ο *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος).

Ο *S. aureus* είναι Gram θετικός, αερόβιος, μη σπορογόνος κόκκος και τα κύτταρά του σχηματίζουν σταφυλλοειδείς σχηματισμούς. Όταν στο τρόφιμο ο πληθυσμός του ξεπεράσει το $5 \cdot 10^5$ cfu/g παράγεται σταφυλοκοκκική τοξίνη, που είναι μια τοξική πρωτεΐνη και προκαλεί σταφυλοκοκκίαση-αιτία βακτηριακής λοίμωξης στον άνθρωπο. Η τοξίνη αυτή δεν καταστρέφεται με βρασμό για 30 min, αλλά με αποστείρωση στους 120 °C για 20 μέχρι 30 min. Οι συνθήκες του τροφίμου (a_w , pH, σύσταση) ή οι επεξεργασίες του, ενώ επιδρούν στον *S. aureus*, δεν επιδρούν στις εντεροτοξίνες.

Επειδή η αναζήτηση απευθείας των εντεροτοξινών είναι πολύπλοκη, δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία, εφαρμόζεται αρχικά ο προσδιορισμός του *S. aureus* σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα όταν ο αναμενόμενος πληθυσμός είναι μεγαλύτερος του 100 cfu/g και όταν ο αναμενόμενος πληθυσμός είναι μικρότερος του 100cfu/g, εφαρμόζεται η μέθοδος του περισσότερου πιθανού αριθμού (MPN).

Όταν στα επιλεκτικά υποστρώματα αναπτυχθούν αποικίες χαρακτηριστικές του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (κίτρινες στο Mannitol salt agar και Μαύρες στο Baird Parker agar base με επιλεκτικά πρόσθετα) τότε σε ύποπτες αποικίες γίνονται οι δοκιμές επιβεβαίωσης (δοκιμή της πηκτάσης (κοαγκουλάσης) και αν το αποτέλεσμα της είναι αρνητικό γίνεται και η δοκιμή της δεσοξυριβονουκλεάσης, αφού πρέπει να είναι θετικά τα αποτελέσματα όλων των πιο κάτω βιοχημικών δοκιμών (παραγωγή καταλάσης, παραγωγή κοαγκουλάσης, παραγωγή Dnase's, διάσπαση της γλυκόζης και διάσπαση της μαννιτόλης) για επιβεβαιωθεί ότι η ύποπτη αποικία προέρχεται από μικροοργανισμό *S. aureus*.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μικρόκοκκοι

Η πρώτη αραιώση γίνεται με τη διαδικασία Stomacher (10 g τυριού και 90 ml 2% w/v κιτρικού νατρίου) για τις υπόλοιπες αραιώσεις χρησιμοποιείται το αραιωτικό διάλυμα Ringer.

Δεκαδικές αραιώσεις: **(-1,-2)**

Θρεπτικό υπόστρωμα: Mannitol Salt Agar (MSA)

Διαδικασία: Επιφανειακή εξάπλωση

Επώαση: 37 °C/48 h

Αρίθμηση αποικιών

Υπολογισμός αποτελέσματος (cfu/g)

Εντερόκοκκοι

Η διαδικασία προσδιορισμού των **Εντεροκόκκων** θα γίνει σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε για το μαλακό τυρί.

ΔΕΙΓΜΑ 3: ΤΥΡΙ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΥΖΗΘΡΑ

Τα τυριά τυρογάλακτος που παρασκευάζονται στην Ελλάδα είναι η Μυζήθρα, ο Ανθότυρος, το Μανούρι (Π.Ο.Π.) και η Ξυνομηζήθρα (Π.Ο.Π.). Κοινό χαρακτηριστικό των τυριών αυτών είναι ότι παρασκευάζονται με θέρμανση του τυρογάλακτος με τέτοιο τρόπο ώστε οι πρωτεΐνες και το λίπος να διαχωρίζονται με τη μορφή τυροπήγματος, το οποίο μετά από στράγγιση δίνει το τυρί. Τα τυριά αυτά ανήκουν στην κατηγορία των τυριών που δεν ωριμάζουν

ΟΜΑΔΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΞΕΤΑΣΘΟΥΝ: ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ & ΖΥΜΕΣ ΜΥΚΗΤΕΣ

Εντεροβακτήρια

Δεκαδικές αραιώσεις: **(-1,-2)**.

Η πρώτη αραιώση γίνεται με τη διαδικασία Stomacher (10 g τυριού και 90 ml 2% w/v κιτρικού νατρίου) για τις υπόλοιπες αραιώσεις χρησιμοποιείται το αραιωτικό διάλυμα Ringer.

Θρεπτικό υπόστρωμα: Violet Red Bile Lactose agar (VRBL) (διπλό στρώμα)

Διαδικασία: Ενσωμάτωση

Επώαση: 37 °C/24 h

Αρίθμηση αποικιών

Υπολογισμός αποτελέσματος (cfu/g)

Ζύμες και Μύκητες

Η διαδικασία προσδιορισμού των **ζυμών και μυκήτων** θα γίνει σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε για το μαλακό τυρί

Αποτελέσματα: Καταγράψτε τα αποτελέσματα cfu/g

	Μικρόκοκκοι	Εντερόκοκκοι	Ζύμες & Μύκητες	Εντεροβακτήρια
Μαλακό τυρί				
Σκληρό τυρί				
Τυρί Τυρογάλακτος				

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

1. Τι ονομάζουμε χλωρίδα επιμόλυνσης
2. Τι ονομάζουμε μικροοργανισμούς δείκτες
3. Τι γνωρίζετε για τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου των τυριών
4. Από ποιους παράγοντες επηρεάζεται ο συνολικός πληθυσμός μικροοργανισμών που μπορεί να προσδιοριστεί σε ένα δείγμα τυριού.
5. Ποιο είναι το κρίσιμο όριο ζυμών και μυκήτων για την υποβάθμιση ενός ρέσκου τυριού
6. Αντιστοιχίσετε το κάθε επιλεκτικό υπόστρωμα με την κατάλληλη ομάδα των μικροοργανισμών

Θρεπτικό υπόστρωμα	Ομάδα Μικροοργανισμών
1. MSA	A. Εντεροβακτήρια
2. KAA	B. Ζύμες και Μύκητες
3. VRBLA	Γ. Εντερόκοκκοι
4. YGC	Δ. Μικρόκοκκοι

7. Αντιστοιχίσετε κάθε γένος με την κατάλληλη ομάδα/ες μικροοργανισμών στην οποία μπορεί να ανήκει

Γένος	Ομάδα
1. Salmonella	A. Οξυγαλακτικά
2. Propionibacterium	B. Θερμοάντοχα
3. Clostridium	Γ. Παθογόνα
4. Lactobacillus	Δ. Μικρόκοκκοι

8. Σας παραθέτουμε τα Μικροβιολογικά Κριτήρια που αφορούν τα Τυριά

2.2.3. Cheeses made from raw milk	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g	EN/ISO 6888-2	At the time during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be highest	Improvements in production hygiene and selection of raw materials. If values >10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.
2.2.4. Cheeses made from milk that has undergone a lower heat treatment than pasteurisation (†) and ripened cheeses made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (†)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2		
2.2.5. Unripened soft cheeses (fresh cheeses) made from milk or whey that has undergone pasteurisation or a stronger heat treatment (†)	Coagulase-positive staphylococci	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 or 2	End of the manufacturing process	Improvements in production hygiene. If values > 10 ⁵ cfu/g are detected, the cheese batch has to be tested for staphylococcal enterotoxins.

9. Είναι κριτήρια υγιεινής ή κριτήρια ασφάλειας αυτά;
10. Πρέπει να ικανοποιούνται αυτά τα κριτήρια όταν τα προϊόντα βρίσκονται ακόμα στο τυροκομείο ή όταν τα αγοράζει ο καταναλωτής;
11. Οσο προχωρούμε από το 2.2.3. στο 2.2.5 τα κριτήρια γίνονται αυστηρότερα. Κατά τη γνώμη σας γιατί συμβαίνει αυτό; Δικαιολογήστε την απάντησή σας