

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

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ-ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ
ΕΛΕΓΧΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: Οι φοιτητές να εξοικειωθούν με θέματα που αφορούν τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης

Διδάσκοντες:

Λέκτορας Ακτύπης Α,(Υπεύθυνος Μαθήματος)

μέλη ΕΔΙΠ: PhD Αναστασίου Ρ., PhD Γεωργάλα Α., PhD Γεωργαλάκη Μ., PhD Ζουμποπούλου Γ., Msc Μανωλοπούλου Ε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΣΚΗΣΗ 2- ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	3
ΕΙΔΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	4
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ	5
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ-ΕΜΒΟΛΙΟ-ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	5
ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΟΞΥΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	6
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ - ΤΟ ΟΦΕΛΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΕΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	8
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9

ΑΣΚΗΣΗ 2- ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΚΟΚΚΟΥ (ΘΚ)- ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΒΑΚΙΛΛΟΥ (ΘΒ) ΚΑΙ ΑΝΑΜΕΙΚΤΗ (ΘΚ+ΘΒ) (1:1)

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Λέγοντας **οξυγαλακτικές καλλιέργειες**, εννοούμε τους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ζύμες) που χρησιμοποιούνται σαν εκκινήτες (starters) στην παρασκευή προϊόντων που παρασκευάζονται με ζύμωση (προϊόντα ζύμωσης). Γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης είναι το γιαούρτι, τα τυριά, το οξύγαλα, το κεφίρ κλπ.

Οι **οξυγαλακτικές καλλιέργειες** είναι το εργαλείο στην προσπάθεια παραγωγής αυτών των προϊόντων με σταθερή και υψηλή ποιότητα.

Οι **λειτουργικές τους ιδιότητες** είναι:

- α. **Τεχνολογικές**, αφού συμβάλλουν στη διαμόρφωση της δομής και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων
 - β. **Προστατευτικές** συμβάλλοντας στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής και στην ασφάλεια των προϊόντων και
 - γ. **Προβιοτικές** με το να συμβάλλουν στην βελτίωση της υγείας των καταναλωτών
- Μια λειτουργική οξυγαλακτική καλλιέργεια θα πρέπει

- να έχει καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά,
- να μην είναι επιμολυσμένη με ξένους μικροοργανισμούς,
- να έχει αυξημένη υψηλή ζωτικότητα και εφόσον είναι επιθυμητό
- καλή οξυπαραγωγική ικανότητα, ώστε να παράγει το επιθυμητό επίπεδο του γαλακτικού οξέος (Οξύνιση) σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Μορφές που διατίθενται οι καλλιέργειες για βιομηχανική χρήση (IDF Standard 149: 1991)

1. **Υγρή μορφή** (10^8 cfu/ml) έχει το **μειονέκτημα** ότι αυτού του τύπου η καλλιέργεια δεν μπορεί να διατηρήσει τη «δράση της» για μεγάλο χρονικό διάστημα. Χρειάζεται συνεχείς ανακαλλιέργειες και αυτό αποτελεί μειονέκτημα διότι υπάρχει πάντα ο κίνδυνος επιμολύνσεων.
2. **Λυοφιλωμένη μορφή** (10^8 - 10^9 cfu/ml). Σε αυτό τον τύπο των καλλιεργειών μπορεί η πυκνότητα των κυττάρων να είναι περιορισμένη, οπότε χρειάζεται ανακαλλιέργεια ή να είναι πολύ αυξημένη οπότε τότε προστίθεται απευθείας στη δεξαμενή πήξης. Το **πλεονέκτημα** αυτού του τύπου των καλλιεργειών είναι ότι διατηρούνται σε καλή κατάσταση σε θερμοκρασία ψυγείου μέχρι 6 μήνες και στην κατάψυξη μέχρι ένα χρόνο.
3. **Συμπυκνωμένη κατεψυγμένη** (10^{10} - 10^{13} cfu/ml)-**Direct Vat Starters (DVS)**. Αυτού του τύπου οι καλλιέργειες πλεονεκτούν κατά το ότι προστίθενται απευθείας στη δεξαμενή πήξης οπότε αποφεύγεται η ανακαλλιέργεια. **Μειονεκτούν** κατά το ότι απαιτούν βαθιά κατάψυξη από το εργαστήριο παρασκευής τους, κατά τη μεταφορά και μέχρι τη χρήση τους στη βιομηχανία.
4. **Συμπυκνωμένη Λυοφιλωμένη** (10^{12} - 10^{13} cgu/gr) - **Direct Vat Starters (DVS)**. Ο τύπος αυτός **πλεονεκτεί** όλων, λόγω της απευθείας χρήσης τους στην παραγωγική διαδικασία. Πλεονεκτούν επίσης και κατά το ότι μπορούν να συντηρηθούν στους 4 °C για 6 μήνες, ή 2 χρόνια στους -16 °C.



ΕΙΔΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ: Μεσόφιλες -Θερμόφιλες

➤ Εμπορικοί τύποι μεσόφιλων καλλιιεργειών

(1) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (παράγει γαλακτικό οξύ) για όξινη κρέμα, όλοι οι τύποι των τυριών

(2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (2)),(παράγει γαλακτικό οξύ) για όξινη κρέμα, όλοι οι τύποι των τυριών,

(3) *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (παράγει οξύ και άρωμα), για ώριμη κρέμα, βούτυρο και τυριά

(4) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (παράγει άρωμα) για βουτυρόγαλα, ωρίμαση κρέμας και βούτυρο

Οι συνδυασμοί διαφορετικών καλλιιεργειών κωδικοποιούνται ως εξής

O (1+2), **L** (1+2+4), **D** (1+2+3), **LD** (1+2+3+4). Ποιο είδος θα επιλεγεί εξαρτάται από το προϊόν που θα παραχθεί. Οι μεσόφιλες καλλιιεργειες χρησιμοποιούνται ευρύτατα γι' αυτό και υπάρχει μεγαλύτερη γνώση και εμπειρία για τη χρήση τους.

➤ Θερμόφιλες καλλιιεργειες

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subs *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* κ.α.. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνες τους ή σε συνδυασμό.

➤ Προβιοτικές

Bifidobacteria sp.

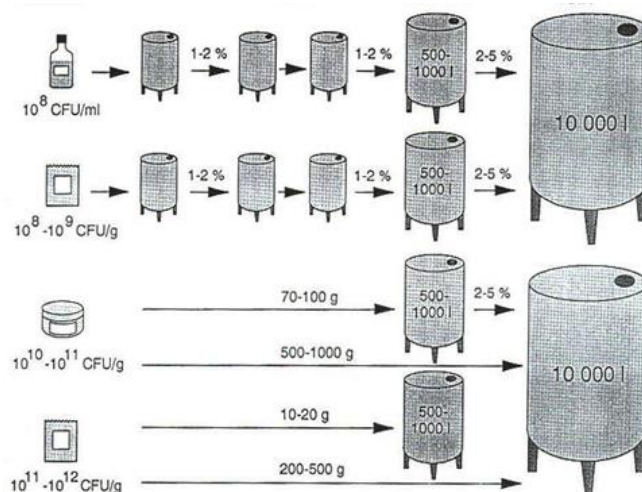
Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus rhamnosus

Lactobacillus casei (Κασέρι, τυριά με πλαστική μάζα)

➤ Προπιονικές (Propionibacteriaceae) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (Εμμενταλ, σκληρά τυριά)

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ



Προκειμένου να αξιολογηθεί ποιοτικά μια καλλιέργεια, λαμβάνεται δείγμα σε αποστειρωμένη φιάλη υπό ασηπτικές συνθήκες και διατηρείται κλειστή σε ψυγείο μέχρι να γίνει η εργαστηριακή ανάλυση.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ-ΕΜΒΟΛΙΟ-ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Ακολουθείται η εξής διαδικασία: Χρησιμοποιείται άπαχο γάλα

- Γίνεται ανασύσταση (10% w/v) της σκόνης απάχου γάλακτος
- Το ανασυσταμένο γάλα αποστειρώνεται στους 95 °C για 15 min
- Ψύχεται
- Εμβολιάζεται με την υπό έλεγχο καλλιέργεια σε ποσοστό 0,5-1% v/v και
- Επώαζεται σε θερμοκρασία ανάλογη με το είδος του μικροοργανισμού

Η επώαση πρέπει να γίνει για όσο χρονικό διάστημα ορίζει ο κατασκευαστής ώστε να παραχθεί η ζητούμενη οξύτητα εκφρασμένη είτε σε βαθμούς Dornic (°Dornic) είτε σε % γαλακτικό οξύ.

Κριτήρια ελέγχου των οξυγαλακτικών καλλιεργειών στο εργαστήριο: Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργαστηριακής άσκησης θα διεξαχθούν ο έλεγχος της καθαρότητας των καλλιεργειών με μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση και οι ιδιότητες οξυπαραγωγική ικανότητα και ζωτικότητα

Οι ιδιότητες που αφορούν την παραγωγή αρωματικών ουσιών, την παραγωγή πολυσακχαριτών, την αντοχή στους βακτηριοφάγους, την παραγωγή αρωματικών ουσιών στο προϊόν, την ομο ή ετεροζυμωτική χρήση των πηγών άνθρακα, τη διαμόρφωση της ενδεδειγμένης κατά περίπτωση υφής του πηγματος μαζί και με άλλες ιδιότητες ελέγχονται και μελετώνται από τις εταιρείες παρασκευής των εμπορικών σκευασμάτων των οξυγαλακτικών καλλιεργειών.

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΟΞΥΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Ενδεικτική αξιολόγηση καλλιεργείων ως προς την οξύπαραγωγική ικανότητα	Ώρες επώασης
Ταχεία	3,40
Μέση	3,40-7,20
Αργή	>7,20
Θερμόφιλες καλλιέργειες	Επιθυμητή Οξύτητα (Βαθμοί Dornic (°D))
<i>Str. thermophilus</i>	40-50°D/37 °C/2-4 h
<i>Lb. bulgaricus</i>	60-70°D/37 °C/2-4 h
Μεσόφιλες καλλιέργειες	Επιθυμητή οξύτητα είναι η υποδεικνυόμενη από τον κατασκευαστή μετά από επώαση στους 30 °C για 6 h

1. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΑΡΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΣΤΗ ΦΕΤΑ:

Η χρήση των καλλιεργειών στην παραγωγική διαδικασία της Φέτας, **είναι επιθυμητή** γιατί μπορεί **να επιφέρει**

- γρήγορη οξύνιση του τυροπήγματος (pH 5-5,2 σε 6-7 h). Η οξύνιση αυτή, επιταχύνει τη δράση της πυτιάς κατά την πήξη του γάλακτος,
- καλλίτερη συναίρεση του πήγματος,
- αύξηση της συνεκτικότητας του πήγματος,
- συγκράτηση της πυτιάς στο τυρόπηγμα και κατά συνέπεια ενίσχυση της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής δράσης κατά την ωρίμαση του τυριού.
- παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών

2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ACA-DC (<http://www.aca-dc.gr/>)

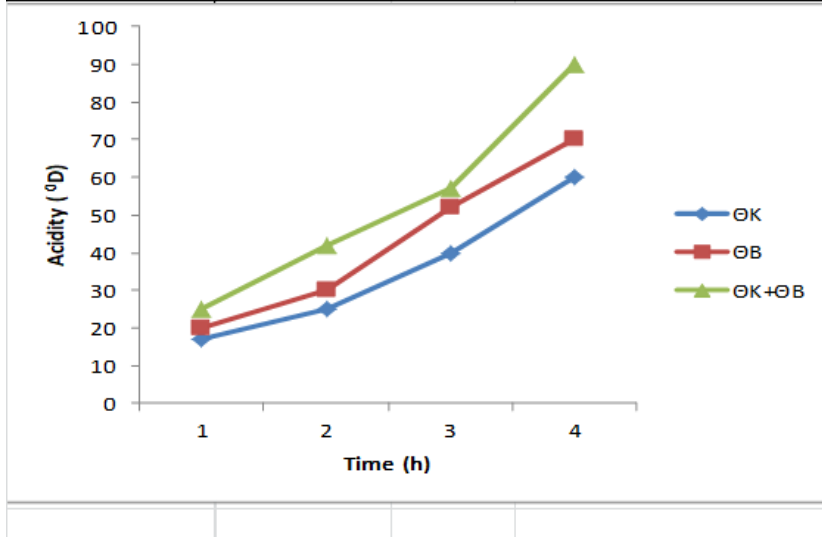
3. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΗΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΣΕ ΓΙΑΟΥΡΤΙ



**The ACA-DC Collection of Microorganisms
A Treasure Chest of Functional Starters**

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ - ΤΟ ΟΦΕΛΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΕΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Time (h)	ΘΚ	ΘΒ	ΘΚ+ΘΒ
1	17	20	25
2	25	30	42
3	40	52	57
4	60	70	90



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

1α. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ: Η καλλιέργεια ελέγχεται ως προς την εμφάνιση, την υφή και την οσμή.

1β. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ: Σύντομη αναφορά στη χρώση Gram-Παρατήρηση παρασκευασμάτων στο μικροσκόπιο. Αν βάψουμε κατά Gram δείγμα καλλιέργειας μπορούμε να παρατηρήσουμε την καθαρότητα γνωρίζοντας ότι:

- Οι θερμοφίλοι κόκκοι εμφανίζονται γενικά σαν διπλόκοκκοι και στρεπτόκοκκοι, με κύτταρα μικρότερα και μεγαλύτερα σε μέγεθος αναλόγως του είδους του μικροοργανισμού.
- Οι θερμοφίλοι βάκιλλοι εμφανίζονται σαν ραβδόμορφα βακτήρια χωρίς σπόρια αλλά ενίοτε με ψευδοπυρήνες.
- Τα μεσόφιλα βακτήρια είτε είναι κόκκοι είτε είναι βάκιλλοι και έχουν μικρότερο μέγεθος κυττάρου.

Μόλυνση της καλλιέργειας με ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς υποδηλώνει τη παρουσία

- Gram (-) βακτηρίων, κυρίως της οικογένειας Enterobacteriaceae, η
- μικρών κόκκων σε ακατάστατη ή βοτρυοειδή διάταξη, που μπορεί να είναι *Micrococcus* spp. ή *Staphylococcus* spp. ή/και
- μεγαλύτερων κυττάρων (ζύμες-μύκητες).

2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml γάλα μεταφέρεται 1 ml από την εξεταζόμενη καλλιέργεια. Προσθέτουμε 1 ml δείκτη κυανό του μεθυλενίου ή ρεζαζουρίνη και αναδεύουμε ήπια. Το γάλα χρωματίζεται γαλαζοπράσινο/μώβ, αντίστοιχα.
- Ο σωλήνας πωματίζεται με ελαστικό πώμα. Αναδεύουμε ήπια δυο-τρεις φορές και ο σωλήνας μεταφέρεται σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας ανάλογης με τη καλλιέργεια που εξετάζουμε (μεσόφιλες, 30 °C/θερμοφίλες 37 °C
- Καταγράφουμε τότε και αν θα προκύψει αποχρωματισμός Αξιολογούμε την καλλιέργεια σαν ζωτική αν ο αποχρωματισμός γίνει σε χρονικό διάστημα από 20 λεπτά μέχρι μια ώρα.

3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΥΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Μεταφέρονται 10 ml από την υπό αξιολόγηση καλλιέργεια σε ποτήρι ζέσεως. Το σιφώνιο ξεπλένεται με λίγο απιονισμένο νερό
- Προστίθενται 2-3 σταγόνες δείκτης φαινολοφθαλεΐνη
- Γίνεται τιτλοδότηση με N/9 NaOH μέχρι να εμφανισθεί απαλό ροζ χρώμα. Παράλληλα μπορεί να γίνεται και μέτρηση του pH.

Η κατανάλωση αν πολλαπλασιαστεί Χ10 εκφράζει την οξύτητα που έχει παραχθεί από τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό σε βαθμούς Dornic (°D), ενώ αν διαιρεθεί δια 10, σε (%) γαλακτικό οξύ

ΚΑΤΑΤΑΓΡΑΦΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

Δείγμα-Διάρκεια επώασης σε ώρες στους 37 °C	Χρόνος Αποχρωματισμού (Μπλε του Μεθυλενίου)	Οξύτητα (° Dornic)
B-2 h		
B-4 h		
B-6 h		
B-8 h		
K-2 h		
K-4 h		
K-6 h		
K-8 h		
B+K 2 h		
B+K 4 h		
B+K 6 h		
B+K 8 h		

Εκτίμησης Αποτελέσματος: Αξιολογείστε την οξυπαραγωγική ικανότητα και τη ζωτικότητα της καλλιέργειας που μελετήσατε στην εργαστηριακή άσκηση.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΜΠΕΔΩΣΗΣ

1. Τι ονομάζουμε οξυγαλακτικές καλλιέργειες
2. Τι ιδιότητες πρέπει να έχουν οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σαν οξυγαλακτικές καλλιέργειες
3. Εμπορικοί τύποι οξυγαλακτικών καλλιεργείων
4. Ποιος εμπορικός τύπος θεωρείται πιο ασφαλής κατά τη διαδικασία παρασκευής ενός προϊόντος ζύμωσης
5. Πρέπει όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σαν οξυγαλακτικές καλλιέργειες να έχουν υψηλή οξυπαραγωγική ικανότητα
6. Όταν χρησιμοποιούμε ένα συνδυασμό μικροοργανισμών για τη παρασκευή ενός προϊόντος ζύμωσης, τι είναι απαραίτητο να έχουμε ελέγξει
7. Πως χρησιμοποιούμε τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες στον έλεγχο της ζωτικότητας μιας καλλιέργειας
8. Τι πληροφορίες μας δίνει ο έλεγχος της ζωτικότητας μιας καλλιέργειας
9. Πως λειτουργεί ο οξειδοαναγωγικός δείκτης στη περίπτωση του γάλακτος και πως στη περίπτωση μιας οξυγαλακτικής καλλιέργειας
10. Ο χρόνος αποχρωματισμού μεταβάλλεται ευθέως ανάλογα ή δυσανάλογα με τη ζωτικότητα της καλλιέργειας.
11. Γιατί πρέπει να γίνεται μικροσκοπικός έλεγχος σε μια οξυγαλακτική καλλιέργεια