

Article

Impact of an Omega-3-Enriched Sheep Diet on the Microbiota and Chemical Composition of Kefalograviera Cheese

Athina Tzora ^{1,*}, Aikaterini Nelli ¹, Chrysoula (Chrysa) Voidarou ¹, Konstantina Fotou ¹, Eleftherios Bonos ¹, Georgios Rozos ¹, Katerina Grigoriadou ², Panagiotis Papadopoulos ¹, Zoitsa Basdagianni ³, Ilias Giannenas ⁴ and Ioannis Skoufos ¹

- ¹ Laboratory of Animal Health, Food Hygiene and Quality, Department of Agriculture, University of Ioannina, 47132 Arta, Greece; knelli@uoi.gr (A.N.); xvoidarou@uoi.gr (C.V.); kfotou@uoi.gr (K.F.); ebonos@uoi.gr (E.B.); clevervet@hotmail.com (G.R.); ppapadopoulos@uoi.gr (P.P.); jskoufos@uoi.gr (I.S.)
² Institute of Plant Breeding and Genetic Resources, Hellenic Agricultural Organization—DEMETER, Thessaloniki, 57001 Thessaloniki, Greece; kgrigoriadou@ipgrb.gr
³ Laboratory of Animal Husbandry, Department of Animal Production, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; basdagianni@agro.auth.gr
⁴ Laboratory of Nutrition, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; igiannenas@vet.auth.gr
* Correspondence: tzora@uoi.gr

Abstract: Kefalograviera is a well-known hard Greek cheese. The aim of this study was to determine how milk produced from ewes fed omega-3-enriched diets could influence the microbiota as well as the chemical composition of Kefalograviera cheese. At the start of the trial, 30 dairy ewes (Lesvos and Chios crossbreed) were selected and fed a conventional diet, based on alfalfa hay, straw and concentrate feed that contained soybean meal for a period of thirty days. Then, for a period of sixty days the same ewes were fed an omega-3-enriched concentrate feed with a lower level of soybean meal that contained 10% flaxseed and 10% lupins. Milk yield was collected individually on Days 30, 60 and 90 and used to produce three different batches of Kefalograviera cheeses, at the same cheese factory, by using a traditional recipe and identical preparation conditions (pasteurization of milk, salt, rennet and culture). Sample analysis was done after six months of Kefalograviera cheese ripening. MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) identification was performed by contrasting the samples' mass spectra with the corresponding reference database. The correlation between the different Kefalograviera cheeses revealed the predominant species being *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, with significant quantitative differences between the experimental groups and the controls. *Pediococcus* spp. was isolated only from the experimental groups' cheeses and *Staphylococcus* spp. only from the controls' cheese, suggesting—among other differences—a bacterial microbiota distinction between the groups. Moreover, increased levels of alpha-linolenic acid and total polyunsaturated omega-3 fatty acids were noted in the enriched Kefalograviera cheeses. These promising findings suggest that enriched Kefalograviera cheese could be manufactured via enriching the ewes' diets, with potential benefits for the consumers' health.

Citation: Tzora, A.; Nelli, A.; Voidarou, C.; Fotou, K.; Bonos, E.; Rozos, G.; Grigoriadou, K.; Papadopoulos, P.; Basdagianni, Z.; Giannenas, I.; et al. Impact of an Omega-3-Enriched Sheep Diet on the Microbiota and Chemical Composition of Kefalograviera Cheese. *Foods* **2022**, *11*, 843. <https://doi.org/10.3390/foods11060843>

Academic Editors: Eleni Tsiplakou and Panagiotis Simitzis

Received: 2 February 2022

Accepted: 11 March 2022

Published: 15 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Μία από τις καλύτερες ερευνητικές εργασίες των εργαστηρίων Υγείας των ζώων, Υγιεινής και Ποιότητας Τροφίμων και Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Διατροφής και Βιοτεχνολογίας που δημοσιεύτηκε στο FOODS, 2022. Σκοπός ήταν να διερευνήσουμε τη δυνατότητα παραγωγής κεφαλογραβιέρας 6 μηνών ωρίμανσης με ανώτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά με τη χρήση γάλακτος από πρόβατα που διατρέφθηκαν με ειδικό σιτηρέσιο, ώστε αφενός το γάλα, αλλά και αφετέρου το τελικό προϊόν να είναι φυσικώς εμπλουτισμένα σε ω3 λιπαρά οξέα. Η ερευνητική ομάδα για πρώτη φορά αποτύπωσε μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης την σημαντική ανάπτυξη ωφέλιμων μικροβιακών πληθυσμών που διαφοροποιούν τη χλωρίδα της κεφαλογραβιέρας που παρασκευάζεται από γάλα

προβατίνων φυσικώς εμπλουτισμένου μέσω της διατροφής σε $\omega 3$ λιπαρά οξέα, αναγνωρίζοντας μεγάλες διαφορές από εκείνη της συμβατικής κεφαλογραβιέρας σε μικροβιακά είδη όπως ο *Lactococcus lactis*, ο *Lactobacillus rhamnosus*, ο *Lactobacillus plantarum*, ο *Lactobacillus brevis*, ο *Lactobacillus paracasei*, ο *Enterococcus faecium* και ο *Enterococcus faecalis*. Ο *Pediococcus* spp. απομονώθηκε μόνο από τις πειραματικές ομάδες της εμπλουτισμένης κεφαλογραβιέρας, ενώ ο *Staphylococcus* spp. μόνο από τις συμβατικές κεφαλογραβιέρες. Φυλλοπρωτεωμικά δέντρα αποτυπώθηκαν και αντίστοιχα δενδρογράμματα και Kronacharts ανέδειξαν την ταξονομική διαφοροποίηση των μικροβιακών πληθυσμών της κεφαλογραβιέρας προς το βέλτιστο, όπως και των αντίστοιχων μικροβιακών ειδών. Το profile των λιπαρών οξέων των κεφαλογραβιέρων εξετάστηκε με της φυσικώς εμπλουτισμένης σε $\omega 3$ λιπαρά οξέα κεφαλογραβιέρας να εμφανίζει σημαντικές διαφορές στο καπρικό και στο άλφα λινολενικό, με σχεδόν δεκαπλασιασμό των $\omega 3$ λιπαρών οξέων στο τυρί και με την αναλογία $\omega 6/\omega 3$ να μεταβάλλεται δραστικά από 18,6 σε 4,1, δεδομένο σημαντικό για τους δείκτες διατροφικής υγείας των ανθρώπων με υψηλή κατανάλωση τυριών. Τα ωφέλιμα στελέχη *Pediococcus pentosaceus* και *Pediococcus acidilactici* που ανήκουν στους λακτοβακίλλους έχουν αντιβακτηριδιακή δράση παράγοντας βακτηριοσίνες, εμφανίζονται δε μόνο στις κεφαλογραβιέρες με υψηλή συγκέντρωση $\omega 3$ και φαίνεται ο πληθυσμός τους να καθοδηγείται από τη συγκέντρωση των $\omega 3$ στο τυρί.

Η μελέτη αυτή οδηγεί σε μια σειρά δεδομένων για την κατοχύρωση των ποιοτικών παραμέτρων της κεφαλογραβιέρας σε ειδικές παραγωγές της που μπορούν να την προσδίδουν μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αναλογία λιπαρών οξέων που τείνει προς τρόφιμα που μπορούν να επιδράσουν θετικά σε δείκτες υγείας των καταναλωτών και δυναμική μικροβιακών πληθυσμών που παρέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα για τη διαμόρφωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της κεφαλογραβιέρας, άρωμα, γεύση, σύσταση, με αυξημένο προβιοτικό και τεχνολογικό δυναμικό.

Η ερευνητική ομάδα ήταν διεπιστημονική με κύριο κορμό το Τμήμα Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην Άρτα και συνεργάτες το Τμήμα Κτηνιατρικής και το Τμήμα Γεωπονίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΟΓ-ΔΗΜΗΤΡΑ.