

***ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ
ΓΑΛΛΑ
ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ***

ΠΑΠΑΔΗΜΑΤΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ 2008

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
2.1 ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΑ	7
2.1.1 Γενικά	7
2.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της σαλμονέλλας	8
2.1.3 Πηγές της <i>Salmonella</i>	10
2.1.4 Τρόφιμα που είναι επικίνδυνα για σαλμονέλλωση	10
2.1.5 Η ασθένεια της Σαλμονέλλωσης	11
2.1.6 Συμπτώματα της Σαλμονέλλωσης	12
2.1.7 Έλεγχος της <i>Salmonella</i>	12
2.2 <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS	13
2.2.1 Γενικά	13
2.2.2 Μέθοδοι ανίχνευσης της <i>Salmonella</i> Enteritidis σε τρόφιμα	14
2.2.3 Σημασία της <i>Salmonella enteritidis</i> στη βιομηχανία τροφίμων	15
2.3 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	16
2.3.1 Γενικά	16
2.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i> ..	17
2.3.3 Ανθεκτικότητα στη θέρμανση	18
2.3.4 Ψύξη – κατάψυξη	19
2.3.5 Πηγές της <i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.3.6 Τρόφιμα που προκαλούν λιστερίωση	20
2.3.7 Λιστερίωση και συμπτώματα	20
2.3.8 Πρόληψη – θεραπεία	22
2.3.9 Διατήρηση της <i>Listeria monocytogenes</i> στα τρόφιμα	22
2.3.10 Κανονισμοί	23
2.3.11 Σημασία για την βιομηχανία τροφίμων	23
2.3.12 Σημασία για τον καταναλωτή	24
2.4 ΤΟ ΓΑΛΛ ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ	26

2.4.1	Γενικά	26
2.4.2	Παθογόνοι μικροοργανισμοί και βακτηριακοί τύποι που απαντώνται στο γάλα.....	27
2.4.3	Επεξεργασία γάλακτος	27
2.5	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	30
2.5.1	ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.5.1.1	Παστερίωση – Αποστείρωση	31
2.5.1.2	Αφυδάτωση	32
2.5.1.3	Ψύξη	32
2.5.1.4	Κατάψυξη	33
2.5.2	ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.5.2.1	ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	34
2.5.2.2	Διαδικασία εφαρμογής Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης	37
2.5.2.3	Εφαρμογή των υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα	37
2.5.2.4	Επίδραση της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης στα συστατικά των τροφίμων	38
2.5.2.5	Επίδραση της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης στα ένζυμα	40
2.5.2.6	Επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στους μικροοργανισμούς	41
2.5.2.7	Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα υψηλής υδροστατικής πίεσης	43
2.5.2.8	Πλεονεκτήματα	43
2.5.2.9	Μειονεκτήματα	44
2.5.2.10	Εφαρμογές των υψηλών υδροστατικών πιέσεων	44
2.5.2.11	Επίδραση του pH, Ενεργότητας του νερού (a_w) και Θερμοκρασίας	45
2.5.2.12	Αδρανοποίηση των μικροοργανισμών	47
2.5.2.13	Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αδρανοποίηση	48
2.5.2.14	Μικροβιακή αδρανοποίηση με θερμότητα και πίεση	50
2.5.2.15	Συσκευασία τροφίμων για επεξεργασία με υψηλή πίεση	50
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
3.1	ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	52
3.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
3.2.1	Προετοιμασία εμβολίων	52

3.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων γάλακτος	53
3.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων εμβολιασμένου γάλακτος	53
3.2.4 Προετοιμασία μηχανήματος πίεσης	54
3.2.5 Εφαρμογή Πίεσης	54
3.2.6 Εμβολιασμός μικροοργανισμού	55
3.2.7 Καταμέτρηση των Αποικιών και Υπολογισμοί	55
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
3.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	57
3.3.2 <i>Salmonella enteritidis</i>	60
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	64
4.1 <i>Salmonella Enteritidis</i>	65
4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	70
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτριά μου στο ΤΕΙ Καλαμάτας, κα Μανωλοπούλου Ελένη, για την ευκαιρία που μου προσέφερε, μέσω της συνεργασίας που διατηρεί με το Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών (ΕΘΙΑΓΕ), να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία σε ένα περιβάλλον υψηλού ερευνητικού επιπέδου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υπεύθυή μου στο ΕΘΙΑΓΕ, κα Τάσσου Σούλα, για την συνεχή και καθοριστική για τη διεξαγωγή της εργασίας μου καθοδήγηση. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα και συνεργάτη του ιδρύματος, κο Νατσκούλη Παντελή, για το ειλικρινές ενδιαφέρον, την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια και την υποστήριξή του σε όλες τις φάσεις εκπόνησης και αξιολόγησης των πειραματικών αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας.

Θα ήταν παράληψη να μην αναφέρω τη συμβολή όλου του εμπλεκόμενου στον τομέα του μικροβιολογικού εργαστηρίου προσωπικού, χωρίς την ύπαρξη του οποίου δεν θα ήταν δυνατή η περάτωση του πειραματικού μέρους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την Αγγελική Μπάλλιου, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Χημικών Μηχανικών, Επιστήμη Υλικών του ΕΜΠ, η οποία με τη βοήθειά της και τις πολύτιμες συμβουλές της βοήθησε στο μέγιστο σε όλους τους τομείς για την ολοκλήρωση της εργασίας, και τους φίλους μου για την υπομονή τους και την ηθική συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της απασχόλησής μου στο ΕΘΙΑΓΕ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για πολλά χρόνια, συμβατικές θερμικές επεξεργασίες αποτελούσαν την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τη διασφάλιση των τροφίμων από την μικροβιακή ανάπτυξη. Αν και η θερμική επεξεργασία ελέγχει αποτελεσματικά τους μικροοργανισμούς, οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων. Η τελευταία τάση στην επεξεργασία των τροφίμων είναι η παραγωγή τροφίμων υγιεινών, θρεπτικών και βολικών για την κατανάλωση από τους ανθρώπους. Για αυτό το λόγο νέες αναδυόμενες τεχνολογίες έχουν ερευνηθεί για να αντικαταστήσουν ή να συμπληρώσουν τις υπάρχουσες συμβατικές που υιοθετούνται στην επεξεργασία τροφίμων. Οι τεχνολογίες αυτές περιλαμβάνουν την υψηλή υδροστατική πίεση, την ωμική θέρμανση, τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία, τη θέρμανση μικροκυμάτων, την ακτινοβολία γάμμα και τον υπέρηχο. [1]

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να αναδείξει τη σημασία των νέων τεχνολογιών στην επεξεργασία των τροφίμων και συγκεκριμένα στην απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως η *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Enteritidis*, καθώς και την αποτελεσματικότητά τους συγκριτικά με τις παλιές κλασικές μεθόδους επεξεργασίας. Συγκεκριμένα η εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης έχει σαν αποτέλεσμα την επέκταση της ζωής του τροφίμου, την εγγύηση της ασφάλειάς του και τη διατήρηση της φρεσκάδας του. [1]

Η υπερυψηλή πίεση έχει τη δυνατότητα να απενεργοποιεί μικροοργανισμούς σε διάφορα είδη τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου και του γάλακτος, με το οποίο ασχοληθήκαμε σε αυτή την εργασία, με μόνο μικρές επιδράσεις στην υφή, τη θρεπτικότητα και τη γεύση. Υγρά τρόφιμα, όπως είναι το γάλα, ταιριάζουν ιδανικά στην τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης επειδή η υπερυψηλή πίεση μπορεί και μεταδίδεται γρήγορα και αποτελεσματικά μέσα στα υγρά τρόφιμα με ελάχιστη βλάβη στην ποιότητά τους, κάτι άλλωστε που ζητάει συνεχώς πλέον το καταναλωτικό κοινό. [2]

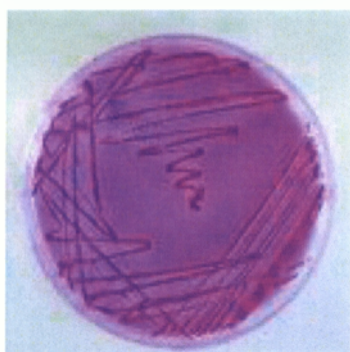
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 SALMONELLA

2.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το γένος *Salmonella* πήρε την ονομασία του από τον Αμερικανό βακτηριολόγο Daniel E. Salmon ο οποίος μαζί με μερικούς συναδέλφους του απομόνωσε το 1886 ένα βακτηρίδιο από χοίρους (που είναι γνωστό σήμερα ως *Salmonella choleraesuis*) που θεώρούσαν ως αιτία της πανώλης (χολέρα γουρουνιών).

Η σαλμονέλα είναι το όνομα ενός γένους ραβδόμορφων κινητών βακτηρίων (τα μη κινητά στελέχη είναι οι εξαιρέσεις *S. gallinarum* and *S. pullorum*), μη σπορογόνων και gram-αρνητικών.



Εικόνα 1: Αποικίες του μ.ο *Salmonella enteritidis* σε φθορίζον υπόστρωμα.

Οι οργανισμοί της *Salmonella* είναι κατά καταλάση θετικοί και κατά οξειδάση αρνητικοί με ταυτόχρονα ζυμωτικό και αναπνευστικό μεταβολισμό. Δεν μεταβολίζουν τη λακτόζη και αναπτύσσονται εύκολα σε απλά μέσα τα οποία περιέχουν γλυκόζη, ανόργανο άζωτο και μεταλλικό αλάτι. Ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και είναι μια ομοιογενής ομάδα βακτηρίων της οποίας τα μέλη διαφοροποιούνται μόνο με ορολογικές μεθόδους. Με ορολογικές δοκιμές διακρίνονται περίπου 2.200 διαφορετικοί ορολογικοί τύποι. Λίγοι όμως ορολογικοί

τύποι των σαλμονελλών προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Απαντάται ιδιαίτερα συχνά στα ζώα, ειδικά στα πουλερικά και τους χοίρους.

2.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της σαλμονέλλας

Μια σειρά απο περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την ανάπτυξη, το θάνατο ή την επιβίωση της *Salmonella*, διαμορφώνοντας τη βάση για τον έλεγχο και τη διατήρηση των μέτρων που πρέπει να υπάρχουν στην βιομηχανία τροφίμων. Μερικές απο αυτές τις συνθήκες είναι η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα του νερού (a_w).

Θερμοκρασία

Η *Salmonella* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών απο 2 έως 54 °C, αν και ανάπτυξη κάτω απο τους 7 °C έχει παρατηρηθεί μόνο σε μικροβιολογικά μέσα ανάπτυξης και όχι σε τρόφιμα. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37 °C, πράγμα το οποίο δεν πρέπει να μας προκαλεί έκπληξη, αν αναλογισθούμε οτι το φυσικό περιβάλλον των περισσότερων στελεχών της *Salmonella*, τα οποία αφορούν τη δημόσια υγεία, είναι η γαστρονομική οδός των θερμόαιμων ζώων. Πάνω απο την ανώτερη θερμοκρασία ανάπτυξης, η *Salmonella* καταστρέφεται εύκολα ακόμα και ύστερα απο ήπιες θερμικές επεξεργασίες, όπως είναι η παστερίωση. Παρόλα αυτά η δεκτικότητα της *Salmonella* ποικίλει ανάλογα με το κάθε στέλεχος της. Έκθεση της *Salmonella* σε αντίξοες συνθήκες, (σχεδόν θανατηφόρων θερμοκρασιών και υπερβολικών τιμών pH), παρατηρήθηκε οτι αυξάνει την ανθεκτικότητά της.

Η *Salmonella* επιβιώνει αρκετά καλά και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αν και ο χρόνος επιβίωσης ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα πάνω στο οποίο βρίσκεται και την επίδραση την οποία δέχεται απο παράγοντες όπως το pH και η ενεργότητα του νερού (a_w), τα στελέχη της *Salmonella* μπορούν να επιβιώσουν για μέρες έως και εβδομάδες σε ψυχρές θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασίες παγώματος, ο πληθυσμός της salmonella μειώνεται σε αντίστροφη αναλογία προς την αναλογία παγώματος. Ενώ, μετά το πάγωμα ο πληθυσμός της *Salmonella* παρουσιάζει μια φθίνουσα πορεία, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη θερμοκρασία αποθήκευσης.

pH

Η άριστη τιμή του pH για την ανάπτυξη της *Salmonella* κυμαίνεται μεταξύ 6.5 και 7.5. Τα στελέχη της αναπτύσσονται σε τιμές pH πάνω από 9.5 και κάτω από 4,05 αν και το ελάχιστο ποικίλλει αρκετά ανάλογα με την όξινη ουσία που χρησιμοποιείται για να μειωθεί το pH. Η ανάπτυξη των στελεχών για χαμηλές τιμές του εμφανίζεται για τιμές μικρότερες ή κοντά στο ελάχιστο pH των 4,05 με τη χρήση μη πτητικών οργανικών οξέων όπως το κιτρικό οξύ ή ορυκτών οξέων όπως το υδροχλωρικό οξύ. Εντούτοις η ανάπτυξη αυτή σταματάει στις υψηλότερες από αυτές τις τιμές pH όταν χρησιμοποιούνται εναλλακτικά τα πτητικά λιπαρά οξέα. Η ευαισθησία στο χαμηλό pH αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την παρουσία στα τρόφιμα προσθετικών ουσιών όπως αλάτι και νιτρώδη. Η ευαισθησία στο pH παίζει πολύ μεγάλο ρόλο σε τρόφιμα στα οποία έχουν προστεθεί οξώδη, όπως στη μαγιονέζα, ή σε τρόφιμα στα οποία παράγονται οξέα με την διαδικασία της ζύμωσης, όπως για παράδειγμα το σαλάμι και το τυρί. Η επίδραση των οξέων είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της αυξανόμενης επιβίωσης της *Salmonella* Enteritidis στη μαγιονέζα, η οποία παράγεται από χυμό λεμονιού αντί για ξύδι. Ενώ σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μαγιονέζα βρέθηκε ότι σε τιμή pH 4 η *Salmonella* καταστρέφεται σε 24 ώρες αν ο πληθυσμός της είναι χαμηλός ή σε αρκετές ημέρες αν ο πληθυσμός της είναι υψηλός. [3]

Η ανοχή ή η προσαρμογή στο χαμηλό pH είναι σημαντική σχετικά με την οξύτητα, που αυξάνει την πιθανότητα της επιζούσας γαστρικής οξύτητας ή το όξινο ενδοκυτταρικό περιβάλλον του φαγοκυτταρικού κυττάρου. Η *Salmonella* γενικά παρουσιάζει δύο ευδιάκριτες απαντήσεις ως προς την οξύτητα, ένα γενικά ανεξάρτητο pH και μια απάντηση η οποία εξαρτάται από το pH, όπου και οι δύο απαντήσεις είναι ενεργές σε μια στάσιμη φάση. [4]

Ενεργότητα του νερού

Η *Salmonella* αναπτύσσεται σε ένα εύρος τιμών ενεργότητας νερού (a_w) που κυμαίνεται μεταξύ 0.999 και 0.945 υπό εργαστηριακές συνθήκες, ενώ στα τρόφιμα αναπτύσσεται σε τιμή ενεργότητας νερού 0.93 με άριστη τιμή ανάπτυξης την 0.995. Σε τιμές κάτω από 0.93 η *Salmonella* δεν αναπτύσσεται αλλά επιβιώνει, και ο χρόνος επιβίωσης αυξάνεται όσο η ενεργότητα του νερού μειώνεται. Σε τρόφιμα με χαμηλή υγρασία όπως είναι τα ζυμαρικά, η σοκολάτα και το φυστικοβούτυρο η επιβίωση της *Salmonella* μπορεί να διαρκέσει μήνες.

2.1.3 Πηγές της salmonella

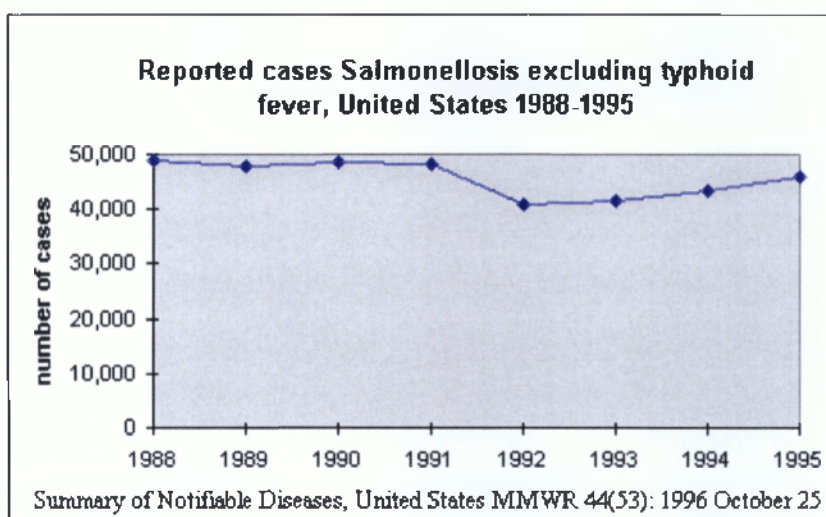
Πηγή της *Salmonella* είναι το πεπτικό σύστημα των θερμόαιμων και των ψυχρόαιμων ζώων. Μεταδίδεται στο νερό και στα τρόφιμα με τα κόπρανα των ζώων καθώς επίσης και με την επαφή, απο άτομα ή ζώα που πάσχουν απο σαλμονέλλωση. Οι περιβαλλοντικές πηγές του μικροοργανισμού περιλαμβάνουν το νερό, το χώμα, τα έντομα, τις επιφάνειες εργοστασίων, τις επιφάνειες κουζινών, τα ζωικά περιττώματα, τα ακατέργαστα κρέατα, τα ακατέργαστα πουλερικά και τα ακατέργαστα θαλασσινά. [4]

2.1.4 Τρόφιμα που είναι επικίνδυνα για σαλμονέλλωση

Τα τρόφιμα που προκαλούν σαλμονέλλωση είναι κυρίως το κρέας και τα πουλερικά, αν μετά την επεξεργασία τους μολυνθούν απο νωπά σφάγεια που διατηρήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός ψυγείου ή μολύνθηκαν απο το προσωπικό του σφαγείου. Στα ζημούμενα αλλαντικά, μπέικον, λουκάνικα κτλ μπορεί να αναπτυχθεί *Salmonella* αν διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι κονσερβοποιημένο βοδινό κρέας προκάλεσε σαλμονέλλωση λόγω επιμόλυνσής του απο διαρροή κατά την ψύξη των κουτιών με μη χλωριωμένο νερό που είχε μολυνθεί με απόβλητα. Άλλα τρόφιμα απο τα οποία μπορεί να προκληθεί σαλμονέλλωση είναι το νωπό γάλα, το παγωτό, τα τυριά καθώς και το αφυδατωμένο γάλα. Πουλερικά που έχουν μολυνθεί με *Salmonella* μπορεί να τη μεταδώσουν στα αυγά, και απο τα αυγά να μεταδοθεί στα προϊόντα ζαχαροπλαστικής ή στα τρόφιμα που δεν υφίστανται επαρκή θέρμανση ή παστερίωση. Επικίνδυνα τρόφιμα επίσης για ύπαρξη *Salmonella* είναι τα οστρακόδερμα και τα ψάρια τα οποία μπορούν να μολυνθούν απο νερά τα οποία περιέχουν είτε ανθρώπινα είτε ζωικά απόβλητα. Για παράδειγμα, *Salmonella* είχε βρεθεί σε διάφορα οστρακοειδή, καβούρια καθώς και σε μύδια, στις δυτικές και ανατολικές ακτές της Φλόριντα στην Αμερική. Όσον αφορά τα φρούτα και τα λαχανικά, σπάνια έχουν αναμιχθεί σε επιδημίες σαλμονέλλωσης, εντούτοις, τα φρούτα και τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν απο οργανισμούς οι οποίοι απαντώνται είτε σε περιττώματα ζώων είτε σε μολυσμένα νερά τα οποία χρησιμοποιούνται για πότισμα σε λαχανικά και σε καρπούς. Τέλος, άλλα τρόφιμα τα οποία μπορούν να μεταδώσουν *Salmonella* στον άνθρωπο είναι το κακάο, η σοκολάτα και η ινδική καρύδα. [3]

2.1.5 Η ασθένεια της Σαλμονέλλωσης

Όλα τα μέλη του γένους της *Salmonella* είναι ενδεχομένως παθογόνα για τον άνθρωπο όπως και για όλα τα σπονδυλωτά ζώα. Η μετάδοση της ασθένειας γίνεται συνήθως από τα ζώα στους ανθρώπους με την κατανάλωση τροφίμων που προέρχονται από μολυσμένα με την ασθένεια ζώα. Απ'ευθείας μετάδοση είναι πιθανό να γίνει από άνθρωπο σε άνθρωπο, από άνθρωπο σε ζώο και φυσικά από ζώο σε άνθρωπο.



Πίνακας 1: Αναφερθείσες περιπτώσεις σαλμονέλλωσης στις ΗΠΑ εξαιρώντας τον τυφοειδή πυρετό για τα έτη 1988 ως 1995. Ο αριθμός περιπτώσεων για κάθε έτος ποικίλλει μεταξύ 40.000 και 50.000. Από περίληψη των δηλωμένων ασθενειών, Ηνωμένες Πολιτείες MMWR 44 (53): 1996.

Η ασθένεια που προκαλείται από τη *Salmonella* χωρίζεται σε τέσσερα σύνδρομα τα οποία μπορεί να συμβούν ατομικά, ταυτόχρονα ή διαδοχικά. Αυτά τα σύνδρομα είναι, η κατάσταση κατά την οποία κάποιος πλέον είναι φορέας της ασθένειας, το σύνδρομο του εντερικού πυρετού, η γαστρεντερίτιδα και η σηψαιμία. Από τα τέσσερα αυτά σύνδρομα, το πιο συχνά καταγεγραμμένο είναι η γαστρεντερίτιδα, η οποία είναι τεράστιας σημασίας για τους μικροβιολόγους. [5]

2.1.6 Συμπτώματα της Σαλμονέλλωσης

Σαλμονέλλωση προκαλείται μετά την κατανάλωση τροφίμου που φέρει 10^7 - 10^9 ζώντα κύτταρα *Salmonella*/gr. Έχουν αναφερθεί όμως και τροφικές δηλητηριάσεις οι οποίες προκλήθηκαν από λίγα κύτταρα σαλμονελλών/gr όπως για παράδειγμα, από σοκολάτα που περιείχε 1 κύτταρο/gr.

Τα συμπτώματα της τροφολοίμωξης από *Salmonella* εμφανίζονται 12-14 ώρες μετά τη λήψη της τροφής και αυτά είναι ναυτία, εμετός, κοιλιακοί πόνοι και διάρροια. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 4,1 %, αλλά στα άτομα που έχουν ηλικία άνω των 50 ετών το ποσοστό θνησιμότητας είναι 21 %, ενώ στα νεογέννητα το ποσοστό αυτό είναι 5,8 %. Οι μολύνσεις σαλμονελλών διαρκούν συνήθως 5-7 ημέρες και συνήθως δεν απαιτούν κάποια θεραπεία εκτός αν ο ασθενής είναι σοβαρά αφυδατωμένος ή η μόλυνση εξαπλώνεται από τα έντερα. Τα άτομα με σοβαρή διάρροια μπορεί να χρειαστούν ενυδάτωση, συνήθως με ενδοφλέβια μέσα. Τα αντιβιοτικά δεν είναι συνήθως απαραίτητα εκτός αν η μόλυνση εξαπλώνεται από τα έντερα. [3]

2.1.7 Έλεγχος της *Salmonella*

Ο έλεγχος της *Salmonella* σε σχέση με τις ασθένειες που προέρχονται από την κατανάλωση των τροφίμων, παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες. Αυτό οφείλεται στη στενή συνύπαρξη περιβάλλοντος, ζωικών τροφών και του ίδιου του ανθρώπου. Ο έλεγχος αυτός πρέπει να γίνεται σε δύο επίπεδα: στην παραγωγή και στην επεξεργασία των τροφίμων.

Για αυτό το σκοπό, έχει αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων για την πρόβλεψη και τον έλεγχο της *Salmonella* κατά την παραγωγή τροφίμων, ιδίως πουλερικών, τα οποία αποτελούν κύριο φορέα μετάδοσης της. Μεταξύ αυτών των μεθόδων περιλαμβάνεται η διακίνηση ζώων και ζωικών τροφών, που έχουν ελεγχθεί για *Salmonella*, αυστηρός βιολογικός έλεγχος, έλεγχος για ύπαρξη τρωκτικών, εμβολιασμός με αποδυναμωμένα στελέχη *Salmonella* και χρήση προβιοτικών σκευασμάτων.

Το πιο σημαντικό μέτρο για τον έλεγχο της *Salmonella* στην επεξεργασία των τροφίμων είναι η εκπαίδευση, πρώτα των λιανεμπόρων τροφίμων σε σχέση με την προσωπική υγιεινή και την υγιεινή των τροφίμων, ειδικά στον τομέα της εξυπηρέτησης πελατών, και στη συνέχεια των ίδιων των καταναλωτών.

Μπορεί η *Salmonella* να μην απαλειφθεί εντελώς ποτέ, είναι όμως δυνατή η σημαντική μείωσή της με την εφαρμογή των κατάλληλων μεθόδων ελέγχου στα πλαίσια μιας σωστά αναπτυγμένης ανάλυσης (HAACP) με ένα πλάνο απο την αρχή της παραγωγής μέχρι και την κατανάλωση.

Όσον αφορά στον έλεγχο της *Salmonella* στην καθημερινή ζωή, ο απλός πολίτης μπορεί να εφαρμόσει μερικούς πολύ απλούς τρόπους πρόληψης όπως είναι το καλό πλύσιμο των χεριών μετά απο επαφή με ζωικά περιττώματα, το καλό ψήσιμο των τροφίμων όπως των πουλερικών, των αυγών και του κρέατος, το καλό πλύσιμο των εργαλείων και των χεριών όταν πρόκειται να μεταχειριστούμε ωμά τρόφιμα και τέλος θα πρέπει να προσέχουμε να μην καταναλώνουμε τρόφιμα τα οποία είναι ακατέργαστα ή μη παστεριωμένα, όπως για παράδειγμα το γάλα και τα υπόλοιπα παράγωγά του. [4]

2.2 SALMONELLA ENTERITIDIS

2.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η *Salmonella* Enteritidis, με την οποία συγκεκριμένα ασχοληθήκαμε σε αυτή την εργασία, είναι μόνο ένα είδος μέσα στο γένος της *Salmonella* *S. choleraesuis* το οποίο αποτελείται απο πέντε υποείδη. Είναι ένα gram αρνητικό, μη σπορογόνο βακτήριο, ζελατινάση αρνητικό, λακτόζη αρνητικό, σουκρόζη αρνητικό και γλυκόζη θετικό το οποίο σχηματίζεται σε ράβδους και συνήθως παράγει υδρογόνο του σουλφιδίου. Είναι αναερόβιο, καταλάση θετικό, οξειδάση αρνητικό και όπως όλα τα είδη της *Salmonella* ζυμώνει τους υδατάνθρακες με την παραγωγή οξέος και αερίων.

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Salmonella* Enteritidis είναι 37 °C και η τιμή της ενεργότητας του νερού ξεπερνάει το 0.93. Η *Salmonella* Enteritidis επιβιώνει σε ξηρό περιβάλλον καθώς έχει απομονωθεί πολλές φορές απο ξηρά τρόφιμα. Η επιβίωση και η ανάπτυξή της αυξάνονται με την αύξηση της ενεργότητας του νερού (a_w) και η μικρότερη τιμή pH στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί η *Salmonella* Enteritidis είναι το 4 αν και η άριστη τιμή pH είναι το 7.

Εντοπίζεται κυρίως στα πτηνά και εύκολα μεταδίδεται στα θηλαστικά. Συνεπώς είναι φορέας ζωνοσογόνου λοίμωξης μεταξύ πτηνών και ανθρώπων. Τα σοβαρότερα περιστατικά στα πτηνά παρατηρούνται πιο συχνά σε κοτόπουλα ηλικίας μικρότερης του ενός μηνός και σε στρεσογόνες περιόδους όπως κατά τη διάρκεια πτώσης των φτερών, ενώ τα κοτόπουλα τα οποία είναι μεγαλύτερα του ενός μηνός, παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας (σύμφωνα με μελέτες αυτό το ποσοστό δεν ξεπερνά το 20%) και πολλά από τα πτηνά δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα της ασθένειας. Η *Salmonella* Enteritidis διαθέτει διάφορους ιογόνους παράγοντες οι οποίοι ενδυναμώνουν την παθογένεια. Παράγει μια εντεροτοξίνη που είναι ασταθής στη θερμοκρασία, και η οποία προκαλεί σοβαρή εντερική απώλεια υγρών στα νεογνά τρωκτικά.

2.2.2 Μέθοδοι ανίχνευσης της *Salmonella* Enteritidis σε τρόφιμα

Υπάρχει ποικιλία από γρήγορες και συμβατικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της *Salmonella* Enteritidis στα τρόφιμα. Οι περισσότερες από τις μεθόδους καλλιέργειας αποτελούνται από πέντε βήματα :

- Εμπλουτισμός σε μη εκλεκτικό υπόστρωμα για την επαναφορά τραυματισμένων μικροοργανισμών
- Εμπλουτισμός σε εκλεκτικό υπόστρωμα για να επιτραπεί στους μικροοργανισμούς της *Salmonella* spp. να πολλαπλασιαστούν σε ευδιάκριτα επίπεδα ενώ καταστέλλεται η ανάπτυξη των ανταγωνιστών
- Βιοχημικό τεστ
- Ορολογική ανάλυση
- Εκλεκτική / διαφορική ανάλυση, και οι δύο για την καταστολή της ανάπτυξης των ανταγωνιζόμενων μικροοργανισμών και για να επιτραπεί η απομόνωση των διακριτών ύποπτων αποικιών.

Αυτές οι μέθοδοι καλλιέργειας δίνουν οριστικά αποτελέσματα σε βακτηριακή απομόνωση. Αν και είναι πολύ ακριβείς (μερικές ακόμα και πάνω από 98%), συνήθως τα αποτελέσματά τους δεν εκλαμβάνονται ως οριστικά επειδή δεν μπορούν να μετρηθούν σε απόλυτα απομονωμένο περιβάλλον. Οι μέθοδοι αυτές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα είδος οδηγού για τη συνέχεια, όταν συνδυάζονται με την μέθοδο καλλιέργειας. [4]

2.2.3 Σημασία της *Salmonella* Enteritidis στη βιομηχανία τροφίμων

Στη βιομηχανία τροφίμων η *Salmonella* Enteritidis απασχολεί κυρίως την βιομηχανία των πουλερικών. Προϊόντα όπως είναι το παγωτό, η κρέμα, τα ζυμαρικά και το τυρί, έχουν αναμιχθεί σε ξεσπάσματα επιδημιών που οφείλονταν στη *Salmonella enteritidis* αλλά αποδείχτηκε ότι τα αυγά είχαν την άμεση σχέση με τις μολύνσεις.

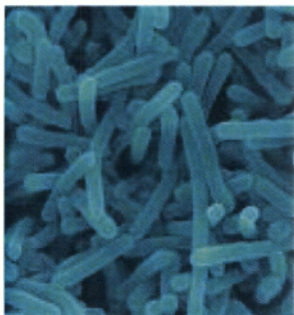
Η *Salmonella* Enteritidis, μαζί με κάποια άλλα στελέχη της *Salmonella* αλλά και άλλα παθογόνα βακτήρια, είναι πολύ σημαντική για την βιομηχανία τροφίμων. Μία έξαρση μόλυνσης που οφείλεται στη *Salmonella* μπορεί να επιφέρει ζημιά εκατομμυρίων ευρώ σε μια εταιρεία αν αναλογιστεί κανείς τις απώλειες από το κόστος, την παραγωγή, τη δυσφήμιση και ότι αυτά συνεπάγονται. Βέβαια η *Salmonella* Enteritidis μπορεί να επιφέρει ζημιά στα κέρδη ενός παραγωγού αυγών ακόμα και χωρίς να ξεσπάσει κάποια μόλυνση. Και τούτο διότι η *Salmonella* Enteritidis είναι υπεύθυνη για την θνησιμότητα και τη νοσηρότητα στη μονάδα των κοτόπουλων. Επιπλέον απώλειες σε κέρδη υπάρχουν όταν στην αγορά εντοπίζονται μολυσμένα τρόφιμα και αυτά πρέπει αποσυρθούν, γεγονός που συνεπάγεται δυσφήμιση για την εταιρεία, συνεχείς έλεγχοι των τροφίμων και των εγκαταστάσεών της.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω γίνεται απολύτως κατανοητό ότι οι συνεχείς έλεγχοι που πρέπει να γίνονται σε μια εταιρεία, είτε αυτοί γίνονται από την πλευρά της είτε από τους κατάλληλους φορείς, θωρακίζουν την δημόσια υγεία αλλά και την ίδια την εταιρεία από κρούσματα όχι μόνο *Salmonella* αλλά και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. [4]

2.3 LISTERIA MONOCYTOGENES

2.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το βακτήριο *Listeria* ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του Joseph Lister (1827-1912), ενός άγγλου χειρουργού, ο οποίος εισήγαγε τη σύγχρονη αντισηπτική χειρουργική επέμβαση. Κατέδειξε το 1865 ότι το καρβολικό οξύ ήταν ένα αποτελεσματικό αντισηπτικό που μειώνει τα μετεγχειρητικά μοιραία περιστατικά μόλυνσης. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Murray, Webb και Swann από αίμα ποντικών που έπασχαν από μηνιγγίτιδα. Χαρακτηριστικό της ήταν ο εξαναγκασμός του πάσχοντος τρωκτικού να σχηματίζει μεγάλο αριθμό μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στο αίμα. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε αρχικά, *Bacterium Monocytogenes* και στη συνέχεια πήρε το όνομα *Listeria monocytogenes*. Την ίδια περίοδο διαπιστώθηκε ότι ήταν παθογόνος και για τον άνθρωπο και προξενούσε τη σοβαρή ασθένεια που ονομάστηκε Λιστερίωση. Είναι ένα gram-θετικό βακτηρίδιο, που κινείται με τη βοήθεια μαστιγίων. Μερικές μελέτες αναφέρουν ότι 1-10% των ανθρώπων μπορεί να είναι εντερικοί μεταφορείς του *L. monocytogenes*. Έχει βρεθεί σε 37 τουλάχιστον θηλαστικά είδη, οικόσιτα και άγρια, καθώς επίσης και σε 17 τουλάχιστον είδη πουλιών και ενδεχομένως σε μερικά είδη ψαριών και οστρακόδερμων. Μπορεί να απομονωθεί από το χώμα, το χορτάρι και άλλες περιβαλλοντικές πηγές.



Εικόνα 2: Εικόνα του μ.ο *Listeria monocytogenes* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η *L. monocytogenes* είναι αρκετά ανθεκτική και αντιστέκεται στα επιβλαβή αποτελέσματα του παγώματος, της ξήρανσης και της θερμότητας εντυπωσιακά καλά για ένα βακτηρίδιο που δεν παράγει σπόρους. Οι περισσότερες *L. monocytogenes*

είναι παθογόνες μέχρι ενός ορισμένου βαθμού. Ιδιαίτερη σημασία για την Μικροβιολογία Τροφίμων έχει το γεγονός ότι η Λιστέρια αναπτύσσεται και στη θερμοκρασία των 2,5 – 4 °C και σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου μέχρι 10%. Επίσης ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι είναι θετική ως προς την καταλάση και για αυτό μπορούμε και την διαχωρίζουμε από τους στρεπτόκοκκους. Μεγάλη σημασία για την τεχνολογία τροφίμων συγκεντρώνουν οι μικρές απαιτήσεις της *L. monocytogenes* σε θρεπτικά συστατικά, αφού το παθογόνο αποδείχτηκε ικανό να αναπτύσσεται στο νερό εκπλύσεως των κρεατομηχανών, αλλά και του δαπέδου των εγκαταστάσεων επεξεργασίας κρέατος. [7], [8]

2.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*

Θερμοκρασία

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης, αν και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής της κυμαίνεται από 30°C ως 37°C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην επιβίωση και στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, έχει γίνει αντικείμενο μελέτης πολλές φορές και μάλιστα σε συνδυασμό και με άλλες περιβαλλοντικές μεταβλητές. Ορισμένοι ερευνητές μελέτησαν τη θερμοκρασία και την αλληλεπίδρασή της με το αρχικό pH, τη σύνθεση της ατμόσφαιρας, την περιεκτικότητα σε NaCl καθώς και σε Νιτρώδες Νάτριο. Ανακάλυψαν ότι η κινητική ανάπτυξη εξαρτάται από την αλληλεπίδραση αυτών των πέντε μεταβλητών και ότι η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* είναι 0,3 ° έως 1,1 °C. Ανακάλυψαν επίσης ότι τα αιμολυτικά βακτήρια της *Listeria monocytogenes* αναπτύσσονται καλύτερα από τα μη αιμολυτικά σε συνθήκες κρύου. Στο ζυμό κοτόπουλου η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξής της ποικίλει από -0,1 έως -0,4 °C με χρόνους ανάπτυξης να ποικίλουν από 13 έως 24 ώρες στους 5 °C και 62 έως 131 ώρες στους 0 °C.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης φαίνεται πως επηρεάζει τη λοιμογόνο δράση της *Listeria monocytogenes*. [8]

NaCl

Το NaCl προστίθεται συχνά στο φαγητό για να δώσει γεύση και ως μέσο για την μείωση της δραστηριότητας του νερού. Η *Listeria monocytogenes* είναι ανεκτική στο αλάτι εφόσον διαθέτει δυνατότητα ανάπτυξης σε περιεκτικότητα 10% NaCl και να επιζήσει επι ένα έτος σε περιεκτικότητα 16% NaCl. Όπως συμβαίνει με το pH και τη θερμοκρασία, η επίδραση του αλατιού συχνά εξετάζεται μαζί με άλλες μεταβλητές. Η θερμική απενεργοποίηση της *Listeria monocytogenes* δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία ποσοστού έως και 2% NaCl, αλλά κύτταρα καταπονημένα από την υψηλή θερμοκρασία παρουσίαζαν αυξημένη ευαισθησία στο αλάτι. Χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι 4 – 6% βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης, ενώ υψηλότερες περιεκτικότητες μείωσαν την επιβίωση των κυττάρων της *Listeria monocytogenes*. [8]

pH

Το άριστο pH για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* κυμαίνεται από 6 έως 8. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη του βακτηρίου εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού, τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος, την τιμή δραστηριότητας του νερού και τη συγκέντρωση του άλατος καθώς και άλλων αλάτων ή ανασταλτικών ουσιών. Για την ίδια τιμή pH, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα ακολουθεί την παρακάτω σειρά: οξικό οξύ > γαλακτικό οξύ > κιτρικό οξύ > μηλικό οξύ > HCl. Οι τιμές pH στις οποίες παρατηρείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κυμαίνονται μεταξύ 4,1 και 9,6. [3]

2.3.3 Ανθεκτικότητα στη θέρμανση

Στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρείται ότι η *Listeria monocytogenes* καταστρέφεται με την παστερίωση (72 °C για 15 sec ή 63 °C για 30 min). Πολλοί ερευνητές όμως αναφέρουν ότι σε διαφορετικές συνθήκες θερμικής επεξεργασίας ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει. Οι D-τιμές στους 72 °C κυμαίνονται από 0,9 έως 2 sec. Στα κρεατοσκευάσματα οι D-τιμές της *Listeria monocytogenes* είναι υψηλότερες από το γάλα. Οι D-τιμές στους 70 °C σε βοδινό κρέας και πουλερικά είναι από 6,6 έως 8,4 sec. Στην κρεατόπαστα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή αλλαντικών, η D-τιμή στους 62 °C είναι 61 sec. Με την προσθήκη των ουσιών αλλαντοποίησης η D-τιμή αυξάνεται στα 7,1 min, γεγονός που δείχνει ότι το NaCl, τα νιτρώδη άλατα, η γλυκόζη και η λακτόζη δρουν

προστατευτικά στα κύτταρα του μικροοργανισμού κατά τη θερμική επεξεργασία. Σε τιμές pH που πλησιάζουν το 7,0 ο μικροοργανισμός παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα, ενώ σε όξινο περιβάλλον καταστρέφεται ευκολότερα. [3]

2.3.4 Ψύξη – κατάψυξη

Η συμπεριφορά της *Listeria monocytogenes* έναντι της ψύξης και της κατάψυξης είναι ένα θέμα με ιδιαίτερη σημασία, θεωρητική και πρακτική, γιατί τα περισσότερα κρούσματα της λιστερίωσης προκλήθηκαν από μισοβρασμένα κρέατα, συσκευασμένα υπο κενό ή υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα, που διατηρήθηκαν για κάποιο διάστημα υπο ψύξη ή κατάψυξη.

Η *Listeria monocytogenes* στη θερμοκρασία ψύξης, δηλαδή από 0 έως 4 °C, όχι μόνο δεν παρεμποδίζεται στην ανάπτυξή της αλλά ως ψυχρότροφο βακτήριο πολλαπλασιάζεται και καθιστά το τρόφιμο επικίνδυνο για κατανάλωση. Σε ό,τι αφορά τη συμπεριφορά της στην κατάψυξη, ήδη από το 1976 ο Ciobanu απέδειξε ότι η διατήρηση ενός τροφίμου σε θερμοκρασία -10 °C ή χαμηλότερη, παρέτεινε κατά 5 – 50 φορές την εμπορική ζωή του τροφίμου σε σχέση με τη συντήρηση υπό ψύξη. Κύτταρα της *Listeria monocytogenes* σε βοδινό κιμά, λουκάνικα Φρανκφούρτης και γαλοπούλα, επέζησαν για 8 εβδομάδες σε θερμοκρασία -18 °C. Με κατάψυξη στους -198 °C και εναποθήκευση στους -18 °C για ένα μήνα, τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* εξοντώθηκαν πλήρως σε ποσοστό 60% και σε ποσοστό 36% υπέστησαν σοβαρές βλάβες αν το ρευστό εναιωρήσεως ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Διαπιστώθηκε ακόμη ότι οι περισσότεροι κύκλοι ψύξεως-απόψυξης ήταν περισσότερο θανατηφόροι για το παθογόνο από ό,τι ο ένας και μοναδικός. [9]

2.3.5 Πηγές της *Listeria monocytogenes*

Ο μικροοργανισμός είναι πολύ διαδεδομένος στη φύση και απαντάται στα φυτά, στο έδαφος, στα κόπρανα των ζώων, στις αποχετεύσεις, στο νερό και στις ενσιρωμένες ζωοτροφές. Τα χλωρά χόρτα που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή είναι μια πολύ σημαντική πηγή της *Listeria monocytogenes* καθώς η χρήση τους συνδέεται με ξεσπάσματα επιδημιών λιστερίωσης σε μυρμηκαστικά. Η παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα χλωρά χόρτα φαίνεται να επηρεάζεται από τις τιμές του pH σε

αυτά. Για παράδειγμα, χλωρά χόρτα με pH 5,0 έως 6,0 είναι πολύ πιο πιθανό να περιέχουν *Listeria monocytogenes*, συγκριτικά με χλωρά χόρτα που είχαν pH χαμηλότερο από 5,0. Για τον τρόπο με τον οποίο η *Listeria monocytogenes* μεταφέρεται από το περιβάλλον στα τρόφιμα υπάρχουν πολλές διαφωνίες. Από μελέτες που έγιναν σε 14 χώρες για την παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα, διαπιστώθηκε ότι ο μικροοργανισμός υπάρχει στο 45% των δειγμάτων του γάλακτος, στο 95% των δειγμάτων χοιρινού κρέατος, στο 60% των δειγμάτων πουλερικών, στο 79% των δειγμάτων του κιμά και στο 30% των δειγμάτων ορισμένων λαχανικών (κυρίως στις πατάτες και στα ραπανάκια, ενώ ο μικροοργανισμός δεν προσδιορίστηκε στα καρότα, στις τομάτες και στο κουνουπίδι). Τέλος, δυναμικές πηγές μόλυνσης από *Listeria monocytogenes* είναι η σάπια βλάστηση, τα επιφανειακά νερά, τα νερά των ποταμών, τα νερά των καναλιών και τα απόβλητα. [3]

2.3.6 Τρόφιμα που προκαλούν Λιστερίωση

Η *Listeria monocytogenes* έχει συνδεθεί με τρόφιμα όπως το ακατέργαστο γάλα, υποθετικά (λανθασμένα) με το παστεριωμένο γάλα, τα τυριά (ιδιαίτερα τα μαλακά-ωριμασμένους τύπους), το παγωτό, τα ακατέργαστα λαχανικά, τα ζυμώμενα λουκάνικα ακατέργαστου κρέατος, τα ακατέργαστα και μαγειρεμένα πουλερικά, τα ακατέργαστα κρέατα (όλοι οι τύποι) και τα ακατέργαστα και καπνισμένα ψάρια. Η δυνατότητά της να αυξηθεί σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όπως 3°C επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό της στα κατεψυγμένα τρόφιμα. [7]

2.3.7 Λιστερίωση και συμπτώματα

Κατά τα τελευταία χρόνια η λιστερίωση έχει συγκεντρώσει την προσοχή και του ιατρικού κόσμου, αλλά και του καταναλωτικού κοινού, γιατί υπήρξαν κρούσματα ομαδικής προσβολής από *Listeria* με οδυνηρές επιπτώσεις. Σημειώνεται ότι στις ΗΠΑ το 1983 πέθαναν από λιστερίωση 14 άνθρωποι που κατανάλωσαν παστεριωμένο γάλα, ενώ το 1985 στην Καλιφόρνια σημειώθηκε ομαδική προσβολή από *Listeria* σε 86 άτομα που κατανάλωσαν μολυσμένο τυρί και οι νεκροί έφτασαν τους 29.

Λιστερίωση είναι το όνομα της γενικής ομάδας διαταραχών που προκαλούνται από τη *Listeria monocytogenes*. Η λιστερίωση καθορίζεται κλινικά όταν ο οργανισμός απομονώνεται από το αίμα, τον εγκεφαλονωτιαίο μυελό, ή μια ειδικά κανονικά αποστειρωμένη περιοχή (π.χ. πλακούντας, έμβρυο). Οι εκδηλώσεις της λιστερίωσης περιλαμβάνουν τη σηψαιμία, τη μηνιγγίτιδα (ή μηνιγγιτιδοεγκεφαλίτιδα), την εγκεφαλίτιδα, και τις ενδομήτριες ή αυχενικές μολύνσεις στις έγκυες γυναίκες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην αυτόματη αποβολή (δεύτερο/ τρίτο τρίμηνο) ή τη θνησιγένεια. Η αρχή των προαναφερθεισών διαταραχών προηγείται συνήθως από συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη συμπεριλαμβανομένου του επίμονου πυρετού. Αναφέρθηκε ότι γαστροεντερικά συμπτώματα όπως η ναυτία, ο εμετός, και η διάρροια μπορούν να προηγηθούν των σοβαρότερων μορφών λιστερίωσης ή μπορούν να είναι τα μόνα συμπτώματα που εκφράζονται. Τα γαστροεντερικά συμπτώματα συνδέθηκαν επιδημιολογικά με τη χρήση των αντιοξέων ή της σιμετιδίνης (φάρμακο για το έλκος). Ο αρχικός χρόνος στις σοβαρές μορφές λιστερίωσης είναι άγνωστος, αλλά μπορεί να κυμανθεί από μερικές ημέρες έως τρεις εβδομάδες. Ο αρχικός χρόνος στα γαστροεντερικά συμπτώματα είναι άγνωστος, αλλά πιθανώς μεγαλύτερος από 12 ώρες. Τα συμπτώματα της λιστερίωσης δεν παρουσιάζουν ομοιομορφία σε όλους τους ανθρώπους, επειδή η πορεία της ασθένειας εξαρτάται από τη γενική κατάσταση του ξενιστή. Υγιή άτομα που δεν έχουν υποβληθεί σε ανοσοκαταστολή είναι πολύ ανθεκτικά σε μολύνσεις από *Listeria monocytogenes* και δεν υπάρχουν πληροφορίες ότι τέτοια άτομα έχουν νοσήσει από λιστερίωση. Άτομα όμως που έχουν υποβληθεί σε ανοσοκαταστολή, άτομα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με κορτικοστεροειδή, αλκοολικοί, διαβητικοί, καρδιοπαθείς, άτομα που πάσχουν από AIDS, άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμοσχεύσεις, ηλικιωμένοι και νεογέννητα μπορεί να προσβληθούν από *Listeria monocytogenes* και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και αν καταναλώσουν τρόφιμα που μπορεί να φέρουν 1 κύτταρο του μικροοργανισμού / gr.

Η μολυσματική δόση του *Listeria monocytogenes* είναι άγνωστη, αλλά θεωρείται ότι ποικίλει με την ευαισθησία του θύματος. Στις περιπτώσεις που προκαλείται από το ακατέργαστο ή υποθετικά παστεριωμένο γάλα στα ευαίσθητα άτομα, λιγότεροι από 1.000 συνολικά μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να εισβάλει στο γαστροεντερικό επιθήλιο. Μόλις το βακτηρίδιο εισαχθεί στα μονοκύτταρα του ξενιστή, στα μακρόφαγα, ή

πολυμορφοποιητικά λευκοκύτταρα, είναι αιμογενές (σεπτισεμικό) και μπορεί να αναπτυχθεί. Η παρουσία του, ενδοκυτταρικά στα φαγοκυτταρικά κύτταρα επιτρέπει επίσης την πρόσβαση στον εγκέφαλο και πιθανώς την μωσχευματική μετανάστευση στο έμβρυο στις έγκυες γυναίκες. Η παθογένεση της *Listeria monocytogenes* επικεντρώνεται στη δυνατότητά της να επιζήσει και να πολλαπλασιάζεται στα φαγοκυτταρικά κύτταρα των ξενιστών. [7, 9]

2.3.8 Πρόληψη – θεραπεία

Η συνολική πρόληψη πιθανώς δεν είναι δυνατή, εντούτοις τα κατάλληλα αποθηκευμένα, θερμασμένα και μαγειρευμένα τρόφιμα είναι γενικά ασφαλή, γιατί τα βακτηρίδια σκοτώνονται στην θερμοκρασία των 75 °C. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος είναι η επαναμόλυνση, όπου το μαγειρεμένο υλικό έρχεται σε επαφή με ακατέργαστα προϊόντα ή μολυσμένα υλικά (σανίδες τεμαχισμού).

Τα νεογέννητα βρέφη και τα άτομα με περιορισμένο ανοσολογικό μηχανισμό είναι τα περισσότερο ευαίσθητα στη λιστερίωση. Στις περιπτώσεις αυτές η θεραπεία είναι δύσκολη και βασίζεται σε συνδυασμό αντιβιοτικών ευρέως φάσματος με αμινογλυκοζίδια. Η εξόντωση των μολυσμένων ζώων και η προφύλαξη απο μολυσμένα με *Listeria* τρόφιμα είναι τα κυριότερα μέσα αμύνης κατά της λιστερίωσης. Προληπτικό εμβόλιο δεν υπάρχει, όμως αποκτάται ανοσία μετά απο προσβολή. Όταν υπάρχει λοίμωξη απο λιστέρια στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η άμεση χορήγηση αντιβιοτικών στην έγκυο γυναίκα μπορεί συχνά να προλάβει τη λοίμωξη του εμβρύου ή του νεογνού. Τα νεογνά με λιστερίωση λαμβάνουν την ίδια αντιμικροβιακή αγωγή με τους ενήλικες. Ακόμη και μετά την άμεση χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, μερικές λοιμώξεις καταλήγουν σε θάνατο.

Για αυτούς τους παραπάνω λόγους θα πρέπει να υπάρχει η κατάλληλη ενημέρωση των ατόμων που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου για την αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων υψηλού κινδύνου, αλλά και για το σωστό χειρισμό των τροφίμων και την τήρηση των βασικών κανόνων υγιεινής. [7, 9]

2.3.9 Διατήρηση της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα

Η *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε τρόφιμα που διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες και επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε τυριά που περιείχαν 0,3% σορβικό οξύ και εμβολιάστηκαν με 5×10^2 κύτταρα /gr,

η *Listeria monocytogenes* επιβίωσε στους 4 °C για 130 μέρες. Σε αφυδατωμένο άπαχο γάλα, ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* μειώθηκε κατά 1-1,5 λογαρίθμους κατά την εκνέφωση και κατά 4 λογαρίθμους κατά τη διατήρηση του αφυδατωμένου προϊόντος στους 25 °C για 16 εβδομάδες. Σε κρεατόπαστα που περιείχε 120 ppm NaNO₂ και 3 % NaCl, ο αρχικός πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* μειώθηκε μόνο κατά ένα λογάριθμο στη διάρκεια της ζύμωσης των αλλαντικών. Σε κρεατοσκευάσματα που παρασκευάζονται από κρέας πουλερικών ευνοείται πολύ η ανάπτυξη του μικροοργανισμού λόγω του υψηλού αρχικού pH. [3]

2.3.10 Κανονισμοί

Με την εξεύρεση της μεθοδολογίας, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει τη *Listeria monocytogenes*, οι περισσότεροι κανονισμοί έχουν στόχο να θέσουν τις βάσεις για αριθμητικά όρια. Σε πολλές χώρες, ανάμεσά τους, οι ΗΠΑ, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία, εφαρμόζεται πλέον μηδενική ανοχή όσον αφορά στην ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών στο λεγόμενο «γρήγορο φαγητό». Στον Καναδά και την Ευρώπη, έχουν τεθεί ποσοτικά όρια μεγαλύτερα του μηδενός (<100) και αυτά καθορίζονται από το είδος του τροφίμου και το είδος του καταναλωτικού κοινού. Επομένως, τρόφιμα τα οποία προορίζονται προς κατανάλωση από παιδιά ή από άτομα τα οποία μπορεί να είναι πιο ευάλωτα στη λιστερίωση έχουν φυσικά πιο αυστηρές προδιαγραφές. Ένας δεύτερος παράγοντας είναι ο χρόνος αποθήκευσης του τροφίμου. Προϊόντα τα οποία είναι εξαιρετικά ευάλωτα, αν αποθηκεύονται κάτω από συνθήκες ψύξης, έχουν λιγότερο αυστηρές προδιαγραφές, από τη στιγμή που οι ευκαιρίες πολλαπλασιασμού της *Listeria* είναι μικρότερες. [8]

2.3.11 Σημασία για την βιομηχανία τροφίμων

Η μόλυνση των τροφίμων με *Listeria monocytogenes* μπορεί να οδηγήσει σε απόσυρση του προϊόντος ακόμα και αν υπάρξει αναφορά ασθένειας που πλήττει τα τρόφιμα. Μπορεί να γίνει ενδημική σε φυτά και λαχανικά που βρίσκονται υπό επεξεργασία. Οι δεξαμενές στις οποίες επεξεργάζονται προϊόντα αποτελούν πηγή συνεχούς μόλυνσης των προϊόντων ακόμα σε αυτά που έχουν «καλό» σχεδιασμό αποθήκευσης. Οι σφουγγαρίστρες είναι σοβαρός πόλος έλξης της *Listeria* και η ανάγκη διατήρησης στεγνών των χώρων παραγωγής είναι ουσιώδης. Εφόσον η

Listeria μπορεί να εντοπιστεί σε διαφόρων ειδών διατροφικά προϊόντα, οι περισσότερες βιομηχανίες τροφίμων χρειάζεται να είναι σχολαστικές κατά την επεξεργασία. Όπως συμβαίνει και με άλλες παθογένειες των τροφίμων, ο σχεδιασμός και η εφαρμογή του HACCP μπορεί να αποτελέσει την πρώτη γραμμή άμυνας για την πρόληψη της *Listeria*. Ανάμεσα στην εφαρμογή του HACCP και σε ένα καλό βιομηχανικό πρόγραμμα βρίσκονται όλα τα στοιχεία που βοηθούν δραστικά στη μείωση των προβλημάτων που σχετίζονται με τη *Listeria*. Η βασική φροντίδα του διαχωρισμού των φρέσκων από τα κατεργασμένα προϊόντα, η χρήση αποτελεσματικού καθαρισμού και διαδικασιών απολύμανσης και η διατήρηση στεγνού περιβάλλοντος, δρουν όλα αποτελεσματικά στη μείωση της μόλυνσης από *Listeria*. [8]

2.3.12 Σημασία για τον καταναλωτή

Η λιστερίωση στον άνθρωπο μπορεί να λάβει μία από τις ακόλουθες κλινικές μορφές: εγκεφαλίτιδα, σηψαιμία και διακοπή κύησης. Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν από συμπτώματα που ομοιάζουν με γρίπη έως και περισσότερο σοβαρές κλινικές ενδείξεις. Σε κάθε περίπτωση, μόνο η *L. monocytogenes* φαίνεται να είναι παθογόνος για τους ανθρώπους, ενώ άλλες μορφές, όπως η *Listeria ivanovii*, σύμφωνα με μελέτες προκαλεί αποβολές και καθυστέρηση ανάπτυξης στα πρόβατα. Η λιστερίωση παρουσιάζει υψηλότερο δείκτη θνησιμότητας από κάθε άλλη βακτηριακή ασθένεια των τροφίμων. Έχει αναφερθεί ότι ο δείκτης θνησιμότητας αγγίζει το 20%, αλλά αυτό το ποσοστό μπορεί να είναι παραπλανητικό εφόσον ελάχιστες περιπτώσεις λιστερίωσης πέραν των συμπτωμάτων που ομοιάζουν με γρίπη, έχουν σωστή διάγνωση. Ο ευπαθής πληθυσμός, όπως τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, δεν πρέπει απλώς να είναι προσεκτικοί και να αποφεύγουν τα τρόφιμα που πιθανόν να περιέχουν *Listeria*, αλλά και να αναζητούν ιατρική περίθαλψη, όταν συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη δεν υποχωρούν γρήγορα. Τα άτομα με Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοποιητικής Ανεπάρκειας (AIDS) συγκαταλέγονται στον ευπαθή πληθυσμό. Οι εμβρυακές αποβολές είναι το κύριο αποτέλεσμα επιδημιών καθώς και σποραδικών εμφανίσεων της ασθένειας.

Υπάρχει μια σειρά καλά τεκμηριωμένων επιδημιών λιστερίωσης σε ανθρώπους, και όλες αφορούν τη *Listeria monocytogenes*. Ο πιο κοινός ορολογικός

τύπος της *L. monocytogenes* που σχετίζεται με τροφική ασθένεια είναι ο 4B. Ευάλωτα είναι μια σειρά τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων που βασίζονται σε ζωικά, γαλακτοκομικά και φυτικά προϊόντα. Το πιο σύνηθες τρόφιμο είναι το μαλακό τυρί, το οποίο εξαιτίας της φύσης της παρασκευής του, είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στη μόλυνση από *L. monocytogenes*. Η σωστή παρασκευή των τροφών κατ' οίκον, ιδίως των χοτ-ντογκ, μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες προσβολής από λιστερίωση. Το 1998, μια εκτεταμένη επιδημία που οδήγησε σε μία σειρά θανάτων και αποβολών εμβρύων, είχε σχέση με χοτ-ντογκ και πιθανόν κι άλλα είδη πρόχειρου φαγητού με κρέας. Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί η αρχική πηγή μόλυνσης. [8]

2.4 ΤΟ ΓΑΛΑ ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ

2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το γάλα κατέχει ξεχωριστή θέση τόσο ανάμεσα στα υπόλοιπα ζωικά τρόφιμα όσο και στα φυτικά, αφού αποτελεί την αποκλειστική τροφή για τον άνθρωπο και για πολλά άλλα θηλαστικά ζώα κατά το πρώτο στάδιο της ζωής τους. Από αυτό συμπεραίνεται ότι το γάλα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται ένας νέος οργανισμός για να αναπτυχθεί και είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πρωτεΐνες και άλατα. Με τον όρο γάλα, χωρίς αυτός να συνοδεύεται από άλλη προσδιοριστική λέξη, νοείται μόνο το γάλα πού προέρχεται από αγελάδα, είναι νωπό, πλήρες, δεν έχει αποβουτυρωθεί, δεν έχει υποστεί αφυδάτωση (γάλα σκόνης) ή συμπύκνωση (γάλα εβαπορέ) και δεν περιέχει ξένες ύλες (εμπλουτισμένα γάλατα).

Για τη διατροφή του ανθρώπου, εκτός από το γάλα της αγελάδας, χρησιμοποιείται και το γάλα του προβάτου, της κατσίκας (πο πλούσιο σε λιπαρά από της αγελάδας, αλλά υστερεί συγκρινόμενο με το πρόβειο) και του βουβαλιού (ιδιαίτερα πλούσιο σε λιπαρά). Επίσης, υπάρχουν γάλατα που προορίζονται για άτομα με παθήσεις ή ιδιαιτερότητες, όπως είναι το γάλα μικρής περιεκτικότητας σε γαλακτοσάκχαρο (άτομα με μειωμένη δραστηριότητα της γαλακτάσης στο πεπτικό σύστημα), το γάλα μικρής περιεκτικότητας σε νάτριο (για υπέρτασικούς, και άτομα που παρουσιάζουν οιδήματα), το γάλα όνου (για βρεφικές και παιδικές εντερικές παθήσεις) και το γάλα σόγιας (για φυτοφάγους).

Το γάλα είναι ίσως μοναδικό σαν τρόφιμο κι αυτό το οφείλει στην περιεκτικότητά του σε συστατικά που καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα θρεπτικών ουσιών που έχει ανάγκη ο ανθρώπινος οργανισμός. Πιο συγκεκριμένα, το γάλα είναι πολύ πλούσιο σε πρωτεΐνη υψηλής βιολογικής αξίας, περιέχει υδατάνθρακες (τη γνωστή λακτόζη) καθώς και μια πλειάδα άλλων συστατικών όπως είναι το ασβέστιο, ο φωσφόρος και το κάλιο και βιταμίνες, όπως η ριβοφλαβίνη ή βιταμίνη Β2 κλπ. Τα συστατικά αυτά, όπως είναι φυσικό, υπάρχουν και στα προϊόντα που παράγονται από το γάλα, όπως είναι το τυρί και το γιαούρτι. Το ολόπαχο γάλα και τα αντίστοιχα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν επίσης κορεσμένο λίπος η ποσότητα του οποίου είναι διαφορετική ανάλογα με το προϊόν. Η συγκεκριμένη όμως ομάδα τροφών είναι

κυρίως γνωστή για τη συνεισφορά της στην ανθρώπινη διατροφή σε ασβέστιο, ένα στοιχείο που είναι απαραίτητο για το κτίσιμο των δοντιών και των οστών και την πρόληψη της οστεοπόρωσης αλλά και τον έλεγχο των κτύπων της καρδιάς, την πηκτικότητα του αίματος, τις συσπάσεις των μυών, τη λειτουργία των νεύρων κλπ. [13]

2.4.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί και βακτηριακοί τύποι που απαντώνται στο γάλα

Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που απαντώνται στο γάλα είναι οι *Brucella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Coliforms*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp.*

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς είναι γνωστές στο κοινό, όπως η Λιστερίωση, Γαστροεντερίτιδα, Τυφοειδής πυρετός, Αιμολυτικό Ουρεμικό Σύνδρομο, Φυματίωση κ.α., με κυριότερα συμπτώματα αυτά του πυρετού, της διάρροιας, του πιθανού θανάτου, αδυναμία, ζαλάδες, γρίπη, πονοκέφαλοι κτλ.

Ενώ οι κυριότεροι βακτηριακοί τύποι που μπορούμε να συναντήσουμε στο γάλα είναι οι *Pseudomonas*, *Brucella*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *S. Agalactiae*, *S. Thermophilus*, *Lactobacillus*, όπου οι περισσότεροι από αυτούς προκαλούν παθογένειες, παράγουν οξύ ή προκαλούν ζυμώσεις. [14]

2.4.3 Επεξεργασία γάλακτος

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση προβλέπεται το πλήρες γάλα, το ακατέργαστο, το ημιαποκορυφωμένο και το αποκορυφωμένο. Σχετικώς με τη συντήρηση του γάλακτος, προβλέπεται το παστεριωμένο, το αποστειρωμένο (γάλα μακράς διάρκειας-UHT) και το υπερπαστεριωμένο. [14]

Παστερίωση γάλακτος

Η παστερίωση είναι η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για να καταστρέψει τα βακτηρίδια στο γάλα. Στην παστερίωση, το γάλα θερμαίνεται σε μια θερμοκρασία επαρκή για να σκοτώσει τα παθογόνα βακτηρίδια, αλλά αρκετά κάτω από το σημείο βρασμού του. Αυτό, σκοτώνει επίσης πολλούς μη παθογόνους οργανισμούς και με αυτόν τον τρόπο επεκτείνεται η σταθερότητα αποθήκευσης του γάλακτος. Πολυάριθμοι συνδυασμοί χρόνου/θερμοκρασίας συστήνονται, αλλά ο πιο συνηθισμένος συνδυασμός είναι 72°C για 15 δευτερόλεπτα και ακολουθεί γρήγορη ψύξη κάτω από τους 10°C. Αυτός ο συνδυασμός αναφέρεται ως επεξεργασία υψηλής θερμοκρασίας σύντομης χρονικής διάρκειας (HTST). Το γάλα είναι κανονικά παστεριωμένο πριν από την πώληση ως υγρό. Η παστερίωση χρησιμοποιείται για να μειώσει το μικροβιακό φορτίο του γάλακτος για την παρασκευή γάλακτος, βουτύρου και διαφόρων γαλακτοκομικών κρεμών. Επίσης χρησιμοποιείται και άλλος ένας συνδυασμός παστερίωσης χρόνου/θερμοκρασίας όπου σταθερές ποσότητες γάλακτος θερμαίνονται στους 63°C για 30 λεπτά. Ύστερα το γάλα ψύχεται στους 5°C και συσκευάζεται. Η χαμηλότερη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για αυτού του είδους την παστερίωση σημαίνει ότι απαιτείται πολύ περισσότερος χρόνος για να ολοκληρωθεί η διαδικασία, σε σύγκριση με την παστερίωση των 15 sec στους 72°C.

Η παστερίωση του γάλακτος είναι τελείως απαραίτητη, γιατί όσο και να πιστεύει κανείς ότι το γάλα είναι υγιεινό και δεν περιέχει μικροοργανισμούς, πάντα περιέχει και πολλές φορές μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Στην περίπτωση που το γάλα είναι μολυσμένο σε μεγάλο βαθμό, με την παστερίωση δεν καταστρέφονται όλα τα μικρόβια. Πάντα μερικά παραμένουν, είτε γιατί η παστερίωση δεν έγινε καλά είτε γιατί τα μικρόβια αυτά δεν καταστρέφονται με τη θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την παστερίωση. Για το λόγο αυτό το γάλα που προέρχεται από άρρωστα ζώα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται, έστω και αν έχει γίνει παστερίωση. Επίσης, ποτέ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τροφή, γάλα άβραστο. [14]

Επίδραση της παστερίωσης στο γάλα

Η παστερίωση μειώνει το στρώμα κρέμας του γάλακτος, δεδομένου ότι μερικές από τις μεμβράνες των λιποσφαιρίων, οι οποίες είναι συστατικά των μεμβρανών, μετουσιώνονται. Αυτό εμποδίζει τη συγκέντρωση των μεμβρανών λιποσφαιρίων και μειώνει συνεπώς την έκταση της αποβουτύρωσης. Εντούτοις, η

παστερίωση δεν μειώνει την περιεκτικότητα σε λίπος του γάλακτος και έχει το ελάχιστο αποτέλεσμα στη θρεπτική αξία του γάλακτος. Υπάρχει όμως απώλεια βιταμινών C και B και φυσικά λόγω της θέρμανσης του προϊόντος έχουμε μετουσίωση των πρωτεϊνών και έστω και μια μικρή υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του γάλακτος. Η διαδικασία σκοτώνει πολλούς ζυμωτικούς οργανισμούς, καθώς επίσης και τα παθογόνα. Οι μικροοργανισμοί που επιζούν της παστερίωσης είναι σηπτικοί. Το παστεριωμένο γάλα έχει μια σταθερότητα αποθήκευσης 2 έως 3 ημερών, η επερχόμενη δε επιδείνωση οφείλεται στους σηπτικούς οργανισμούς. Κατά συνέπεια, το παστεριωμένο γάλα πιθανότερο είναι να σαπίσει παρά να αναπτυχθεί η οξύτητα. Στην αγροτική επεξεργασία γάλακτος, πολλές διαδικασίες εξαρτώνται από την ανάπτυξη της οξύτητας, και ως εκ τούτου η παστερίωση μπορεί να μην είναι κατάλληλη [14].

2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Με ελάχιστες εξαιρέσεις, η υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων ξεκινάει από τη συγκομιδή, τη σφαγή ή την παρασκευή. Η υποβάθμιση της ποιότητας εξαρτάται από τον τύπο του τροφίμου, τη σύνθεσή του, το σχήμα του, την επεξεργασία στην οποία υποβάλλεται αλλά και από τις συνθήκες αποθήκευσής του. Οι πιο σημαντικοί στόχοι που αφορούν τη συντήρηση, περιλαμβάνουν τις φυσιολογικές, ενζυματικές, χημικές και μικροβιολογικές αντιδράσεις των τροφίμων. Διάφορες τεχνικές είναι διαθέσιμες για την καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών και την καθυστέρηση άλλου τύπου ποιοτικής υποβάθμισης. Οι περισσότερες από τις αντιμικροβιακές τεχνικές λειτουργούν απαγορευτικά ή μειώνουν ή αποτρέπουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ελάχιστες διαθέσιμες τεχνικές δρουν με κύριο σκοπό την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

Οι καταναλωτές σε πολλές χώρες απαιτούν τρόφιμα τα οποία να είναι πιο βολικά (για αποθήκευση και προετοιμασία), πιο φρέσκα, πιο φυσικά, λιγότερο επεξεργασμένα και χωρίς συντηρητικά, σε σχέση με τα τρόφιμα που παράγονται αυτή τη στιγμή. Η βιομηχανία τροφίμων αντιδρά θετικά σε αυτή τη νέα τάση. Είναι σημαντικό οι νέες τεχνολογίες να διατηρήσουν ή να βελτιώσουν την ποιότητα και να διασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων.

Η εφαρμογή φυσικών τεχνικών, όπως αυτής της υπερυψηλής πίεσης για τη συντήρηση των τροφίμων, αποβλέπει στην παραγωγή τροφίμων τα οποία θα είναι σύμφωνα με πολλές από τις καταναλωτικές απαιτήσεις. Οι φυσικές τεχνικές είναι βασισμένες περισσότερο στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών παρά στην παρεμπόδισή τους, δεν περιέχουν συντηρητικά, είναι κυρίως μη θερμικές ή περιλαμβάνουν μειωμένες θερμικές επεξεργασίες, έχουν ελάχιστη επίπτωση στην ποιότητα των τροφίμων και για αυτό θεωρούνται φυσικές μέθοδοι. [8]

2.5.1 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.5.1.1 Παστερίωση – Αποστείρωση

Η παστερίωση είναι μια ήπια θερμική επεξεργασία που εφαρμόζεται στα τρόφιμα σε θερμοκρασίες μικρότερες των 100 °C, που καταστρέφει τα ενδογενή ένζυμα και τους θερμοευαίσθητους μικροοργανισμούς, δηλαδή μόνο τις ζύμες, τους μύκητες και τις βλαστικές μορφές των βακτηρίων και όχι τα σπόρια αυτών. Ως ήπια θερμική επεξεργασία, η παστερίωση προκαλεί μικρές έως ασήμαντες μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων και επιτυγχάνει την συντήρησή τους για περιορισμένο χρονικό διάστημα, ολίγων ημερών ή εβδομάδων, κατά κανόνα σε συνδυασμό με άλλη μέθοδο συντήρησης.

Η παστερίωση που εφαρμόζεται σε ένα προϊόν είναι επαρκής, όταν καταστραφεί το ένζυμο ή ο υπεύθυνος μικροοργανισμός που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στην υγεία του καταναλωτή ή να αλλοιώσει το προϊόν.

Όπως και η παστερίωση, έτσι και η αποστείρωση είναι μια θερμική μέθοδος επεξεργασίας των τροφίμων, με την διαφορά ότι η αποστείρωση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100 °C, και αποβλέπει στην καταστροφή των σπορίων των βακτηρίων. Ταυτόχρονα με την αποστείρωση καταστρέφονται και όλες οι βλαστικές μορφές των βακτηρίων, οι ζύμες και οι μύκητες, επειδή είναι λιγότερο ανθεκτικοί στη θέρμανση από τα σπόρια των μυκήτων. Όταν με τη θερμική επεξεργασία επιτυγχάνεται η καθολική καταστροφή τόσο των βλαστικών μορφών όσο και των σπορίων των βακτηρίων που απαντούν στο τρόφιμο, τότε μιλάμε για πλήρη αποστείρωση, η οποία όμως δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί, γιατί απαιτεί θέρμανση για απεριόριστο χρόνο. Μια τέτοια όμως θέρμανση του προϊόντος, για απεριόριστο χρόνο, επιφέρει την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος. [11]

2.5.1.2 Αφυδάτωση

Η αφυδάτωση είναι μια μέθοδος συντήρησης που στηρίζεται στην απομάκρυνση νερού από τα τρόφιμα, έτσι ώστε η υγρασία τους να μειωθεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα και τα προϊόντα να καταστούν στερεά. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η δραστηριότητα νερού του τροφίμου σε τιμές που αναστέλλεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι οποίοι θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το προϊόν. Αποτέλεσμα της αφυδάτωσης είναι η συντήρηση των τροφίμων σε συνθήκες περιβάλλοντος για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, με την προϋπόθεση ότι αυτό θα έχει συσκευασθεί κατάλληλα, κατά τρόπο που θα εμποδίζεται η επαναπρόσληψη υγρασίας.

Η αφυδάτωση αποτελεί την αρχαιότερη μέθοδο συντήρησης των τροφίμων. Τρόφιμα τα οποία υφίστανται αφυδάτωση είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το βοδινό κρέας, πολλά αλιεύματα, τα προϊόντα γάλακτος κ.α.

Και σε αυτή τη μέθοδο όμως υπάρχουν κάποια πολύ σοβαρά μειονεκτήματα που δεν μπορούν να παραλειφθούν. Μερικά από αυτά είναι, η απώλεια σε αρωματικές ουσίες, η ανάπτυξη ανεπιθύμητων οσμών λόγω των υψηλών θερμοκρασιών στις οποίες πραγματοποιείται η αφυδάτωση, η μετουσίωση πρωτεϊνών, η καταστροφή θερμοευαίσθητων θρεπτικών στοιχείων και τέλος, η μεταβολή της δομής του αφυδατωμένου προϊόντος. [11]

2.5.1.3 Ψύξη

Η ψύξη είναι μια μέθοδος συντήρησης των τροφίμων σε περιβάλλον με θερμοκρασίες κατά κανόνα χαμηλότερες από 8 °C έως 15 °C και υψηλότερες από το σημείο πήξης του κάθε τροφίμου. Θεωρείται η κύρια μέθοδος συντήρησης των ευάλωτων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων που διατίθενται στον καταναλωτή ως νωπά. Αυτή η μέθοδος ήταν γνωστή από την αρχαία εποχή, όταν οι πρωτόγονοι άνθρωποι συντηρούσαν τα ευαίσθητα προϊόντα τους σε σπήλαια και υπόγειους χώρους, στους οποίους η θερμοκρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν χαμηλή. Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι στους αρχαίους ακόμα χρόνους χρησιμοποιούσαν το χόνι και τον πάγο για τη συντήρηση των ευάλωτων τροφίμων.

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η ψύξη ως μέθοδος συντήρησης είναι η επιβράδυνση την οποία επιφέρει στη δράση όλων των παραγόντων που προκαλούν την αλλοίωση στα νωπά γεωργικά προϊόντα και τα τρόφιμα. Ειδικότερα, η ψύξη

επιβραδύνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τον ρυθμό των μετασπλεκτικών μεταβολικών διεργασιών στους φυτικούς ιστούς, των μεταθανάτιων μεταβολών στους ζωικούς εχθρούς, των χημικών αντιδράσεων και των φυσικών μεταβολών, όπως η αφυδάτωση των νωπών προϊόντων. Κατά συνέπεια, η ψύξη επιμηκύνει το χρονικό διάστημα όπου τα τρόφιμα είναι διαθέσιμα για κατανάλωση. Η ψύξη μπορεί να εφαρμοσθεί με διάφορες μεθόδους όπως, με πρόψυξη, με εφαρμογή κενού, με ψυχρό νερό, με τριμμένο πάγο, με εναλλάκτες θερμότητας και με κρυογενή μέσα.

Το μειονέκτημα της μεθόδου όμως είναι ότι ο χρόνος συντήρησης των τροφίμων με ψύξη είναι περιορισμένος και εξαρτάται από τη φύση του τροφίμου και τις συνθήκες συντήρησης. Κατά τη διάρκεια συντήρησης των τροφίμων με ψύξη έχει παρατηρηθεί σημαντική απώλεια υγρασίας σε προϊόντα, έτσι έχουμε αφυδάτωση του προϊόντος, καθώς επίσης έχει παρατηρηθεί και απώλεια σε βιταμίνη C έως και 50% σε ορισμένα λαχανικά. [11]

2.5.1.4 Κατάψυξη

Η κατάψυξη, όπως και η ψύξη, είναι μια μέθοδος συντήρησης η οποία συνίσταται στην απομάκρυνση της θερμότητας από τα προϊόντα με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας τους και στη συνέχεια τη διατήρησή τους σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από το σημείο πήξης, γεγονός που επιφέρει τη μετατροπή του νερού σε παγοκρυστάλλους. Η κατάψυξη ως μέθοδος συντήρησης των τροφίμων στηρίζεται στο γεγονός ότι προκαλεί την πλήρη αναστολή της δράσης των μικροοργανισμών και επιβραδύνει τη δράση των ενζύμων και τον ρυθμό των χημικών αντιδράσεων.

Όμως, παρά τα πλεονεκτήματα που υπάρχουν κατά τη συντήρηση με κατάψυξη, δεν μπορούμε να παραβλέψουμε τις πολύ σημαντικές αρνητικές μεταβολές στην ποιότητα των τροφίμων που προκύπτουν κατά τη συντήρησή τους με κατάψυξη, όπως είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών, η επανακρυστάλλωση, η οξείδωση των λιπαρών ουσιών, η αφυδάτωση λόγω εξάχνωσης, η διάσπαση των χρωστικών ουσιών, η απώλεια σε βιταμίνες και η συνεχιζόμενη ενζυμική δραστηριότητα. [11]

2.5.2 ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στις νεότερες μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων ανήκουν: τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία υψηλής τάσης, το παλμικό φως υψηλής έντασης, τα παλλόμενα μαγνητικά πεδία, οι υπέρηχοι, η ωμική θέρμανση αλλά και η υπερυψηλή υδροστατική πίεση, με την οποία ασχοληθήκαμε σε αυτή την εργασία και θα πούμε περισσότερα παρακάτω.

Στις περισσότερες από αυτές τις μεθόδους δεν εφαρμόζεται θέρμανση κατά την επεξεργασία των τροφίμων και ο χρόνος επεξεργασίας είναι πολύ μικρός. Κατά συνέπεια αυτές οι μέθοδοι δεν έχουν τα γνωστά αρνητικά αποτελέσματα της θερμικής επεξεργασίας και ενδείκνυνται για την παραγωγή ελάχιστα επεξεργασμένων τροφίμων. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές δεν βρίσκουν μέχρι σήμερα ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ είναι πιθανή η εξέλιξή τους και η ευρύτερη εφαρμογή τους στο μέλλον.

2.5.2.1 ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ

Η Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ) αποτελεί μια από τις νεότερες τεχνολογίες παραγωγής και συντήρησης τροφίμων, η οποία στηρίζεται στην άσκηση στα τρόφιμα υδροστατικών πιέσεων από 100 ως 600 MPa για ορισμένο χρόνο, σε θερμοκρασίες δωματίου ή σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες καταστρέφονται οι μικροοργανισμοί και τα ένζυμα, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν την αλλοίωση του προϊόντος, ενώ αυτό διατηρεί το άρωμα και τη γεύση, δηλαδή τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του νεπού προϊόντος.

Την εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα πειραματίστηκε για πρώτη φορά ο χημικός Bert Hite στο Γεωργικό Πειραματικό Σταθμό του Πανεπιστημίου της Δυτικής Βιρτζίνια στις ΗΠΑ. Μαζί με τους συνεργάτες του κατασκεύασαν τη δεκαετία του 1890 μια μηχανή για την ανάπτυξη υδροστατικών πιέσεων μέχρι 680 MPa και μελέτησαν την επίδραση των πιέσεων αυτών στη συντήρηση του γάλακτος, των φρούτων, των χυμών και άλλων προϊόντων. Σε εργασία του δημοσιεύτηκε το 1914 ανέφερε ότι ροδάκινα και αχλάδια στα οποία εφαρμόστηκε υδροστατική πίεση 400 MPa για 30 min διατηρήθηκαν αναλλοίωτα για 5 χρόνια. Το ίδιο έτος άλλος ερευνητής δημοσίευσε ότι οι υψηλές υδροστατικές

πίεσεις μεταβάλλουν τη δομή των πρωτεϊνών στο ασπράδι του αυγού και προκαλούν τη θρόμβωση του. Έκτοτε έγιναν πολύ λίγες αναφορές πάνω στην επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στους μικροοργανισμούς και τα τρόφιμα, χωρίς ωστόσο να βρουν επιτυχή εφαρμογή. Το 1986 εφαρμόστηκε στην Ιαπωνία για πρώτη φορά με επιτυχία η τεχνολογία των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στην παραγωγή τροφίμων και στις αρχές της δεκαετίας του 1990 κυκλοφόρησαν στην αγορά τα νέα προϊόντα.

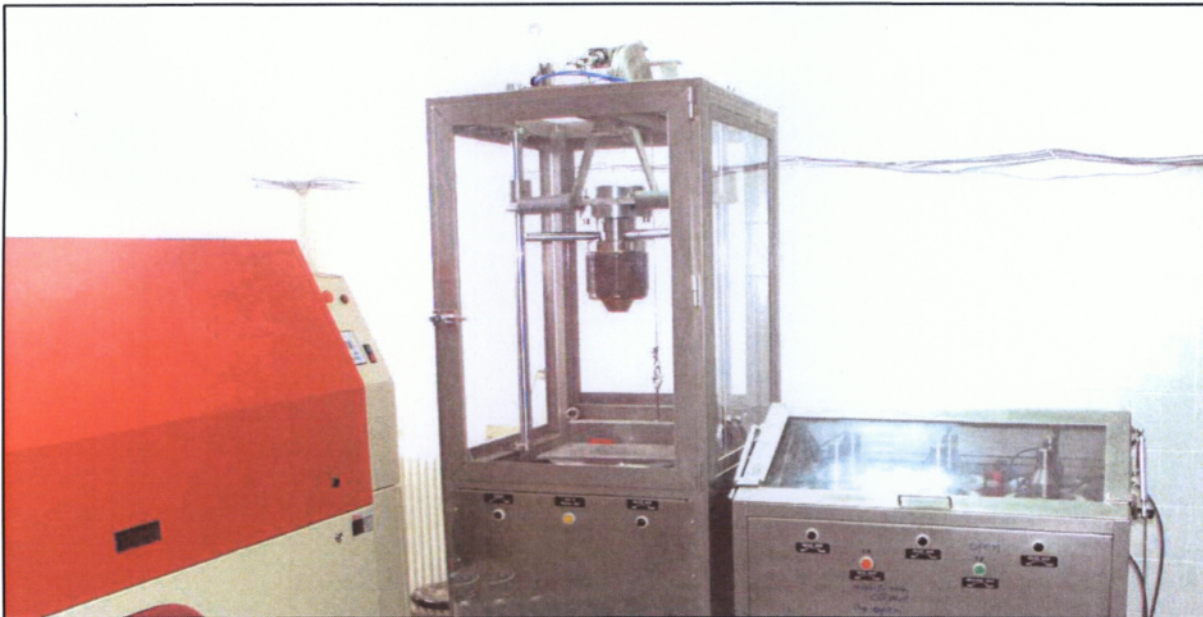
Σήμερα οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις αποτελούν την πλέον σύγχρονη και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, που προσφέρει στη βιομηχανία τη δυνατότητα να παράγει τρόφιμα με υψηλή θρεπτική αξία και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά υψηλής ποιότητας, τα οποία επιπλέον είναι ασφαλή για τον καταναλωτή και έχουν την ικανότητα να συντηρηθούν για μεγάλο σχετικά διάστημα με ψύξη ή ακόμη και σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ήδη, στην Ευρώπη, την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ γίνεται εκτεταμένη έρευνα για την ανάπτυξη νέων προϊόντων με την εφαρμογή της τεχνολογίας των υψηλών υδροστατικών πιέσεων. [11]



Εικόνα 1. Σύστημα εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης εργαστηριακής κλίμακας Food Pressure Unit LO1, (Resato Int. BV, Roden, Holland), η οποία παρέχει τη δυνατότητα μέγιστης πίεσης και θερμοκρασίας λειτουργίας 1000 MPa και 100 °C αντίστοιχα, σε ένα σύστημα έξι μικροθαλάμων (vessels) χωρητικότητας 45 ml ο καθένας.



Εικόνα 2. Λεπτομέρεια θαλάμου εισαγωγής δείγματος



Εικόνα 3. Πλήρης εργαστηριακός εξοπλισμός εφαρμογής της μεθόδου υπερυψηλής πίεσης. Απο τα αριστερά προς τα δεξιά, φαίνεται η διάταξη ελέγχου και 2 συστήματα θαλάμων (Vessels) υπερυψηλής πίεσης διαφορετικής δυναμικότητας και χωρητικότητας.

2.5.2.2 Διαδικασία εφαρμογής Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης

Υδροστατική πίεση είναι η πίεση την οποία ασκεί το υγρό που βρίσκεται σε ηρεμία σε κάθε επιφάνεια βυθισμένη σε αυτό. Ασκείται κάθετα προς την επιφάνεια και είναι ανεξάρτητη από τον προσανατολισμό της.

Σύμφωνα με την αρχή του Pascal, αν στην επιφάνεια του υγρού που βρίσκεται σε ηρεμία ασκηθεί εξωτερική πίεση, η πίεση αυτή μεταδίδεται μέσα στο υγρό στιγμιαία και ομοιόμορφα προς όλες τις κατευθύνσεις. Κατά συνέπεια, αν μέσα σε ένα υγρό που βρίσκεται σε ηρεμία βυθισθεί ένα σώμα και στην επιφάνεια του υγρού ασκηθεί εξωτερική πίεση, η πίεση αυτή θα μεταδοθεί στιγμιαία στην επιφάνεια του σώματος και θα είναι κάθετη σε κάθε σημείο της επιφάνειας του σώματος. Σημειώνεται ότι ο χρόνος επιβολής της πίεσης είναι ανεξάρτητος από το μέγεθος και το σχήμα της επιφάνειας του σώματος. [11]

2.5.2.3 Εφαρμογή των υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα

Τα ρευστά προϊόντα τα οποία μπορούν να αντληθούν εισάγονται με τη βοήθεια αντλιών απευθείας στο δοχείο υψηλών πιέσεων. Στην περίπτωση αυτή το δοχείο υψηλών πιέσεων φέρει εσωτερικά εύκαμπτο υλικό μέσα στο οποίο οδηγείται το ρευστό προϊόν, ενώ στο χώρο μεταξύ των τοιχωμάτων του δοχείου υψηλών πιέσεων και του εύκαμπτου υλικού εισάγεται το υγρό μέσο μεταβίβασης των πιέσεων. Μετά την εφαρμογή των υψηλών υδροστατικών πιέσεων για ορισμένο χρόνο τα προϊόντα οδηγούνται στο σύστημα ασηπτικής συσκευασίας, όπου συσκευάζονται κάτω από αυστηρές συνθήκες υγιεινής.

Ωστόσο, όλα σχεδόν τα τρόφιμα συσκευάζονται κατάλληλα υπό κενό πριν την επεξεργασία τους με τις υψηλές υδροστατικές πιέσεις. Το συσκευασμένο προϊόν τοποθετείται σε ειδικά κάνιστρα και εισάγεται στο δοχείο υψηλών πιέσεων. Το προϊόν διατηρείται κάτω από την επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων για ορισμένο χρονικό διάστημα χωρίς δαπάνη πρόσθετης ενέργειας. Ο χρόνος παραμονής του προϊόντος υπό την επίδραση των υψηλών πιέσεων εξαρτάται από το είδος του τροφίμου και τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η επεξεργασία του. Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος άσκησης των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στο προϊόν, το δοχείο υψηλών πιέσεων αποσυμπιέζεται και το προϊόν εξέρχεται από το δοχείο, στεγνώνει με θερμό αέρα και συσκευάζεται σε παλέτες για να οδηγηθεί στους

αποθηκευτικούς χώρους ή στην κατανάλωση. Η συσκευασία γίνεται σε εύκαμπτους περιέκτες, χωρίς να αφήνεται ελεύθερο διάστημα. Αυτοί κατασκευάζονται από πολύφυλλες μεμβράνες και περιλαμβάνουν ως ενδιάμεσο στρώμα την αιθυλενοβινυλική αλκοόλη. Οι περιέκτες αυτοί πρέπει να εξασφαλίζουν ισχυρή θερμοσυγκόλληση και πλήρη στεγανότητα σε υδρατμούς, σε οξυγόνο και φως. Οι μεταλλικές κονσέρβες και οι γυάλινες φιάλες κρίνονται ως ακατάλληλες. Η άσκηση υψηλών πιέσεων στο προϊόν δεν προκαλεί καμμία παραμόρφωση στην συσκευασία, επειδή η πίεση ασκείται ομοιόμορφα σε όλα τα σημεία, κάθετα στην επιφάνεια του περιέκτη. [11]

2.5.2.4 Επίδραση της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης στα συστατικά των τροφίμων

Νερό

Με τη συμπίεση του νερού επέρχεται μικρή μείωση του όγκου του, η οποία είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης υδροστατικής πίεσης. Αν στο νερό εφαρμοσθούν υδροστατικές πιέσεις μεγαλύτερες των 1000 MPa σε θερμοκρασία δωματίου, τότε επέρχεται μεταβολή της φυσικής του κατάστασης και το νερό απο υγρό μετατρέπεται σε πάγο με μηδαμινή ικανότητα συμπίεσης. Απο τα παραπάνω προκύπτει οτι τρόφιμα τα οποία περιέχουν μεγάλη ποσότητα νερού και πολύ μικρή ποσότητα αερίων συμπεριφέρονται με την εφαρμογή υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης, όπως το νερό. Οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις προκαλούν μεταβολή στη θερμοκρασία που το νερό υφίσταται αλλαγή φάσης, δηλαδή στη θερμοκρασία κρυσταλλοποίησης του νερού και της τήξης του πάγου. Με την επίδραση υδροστατικών πιέσεων μέχρι 210 MPa το νερό διατηρείται ως υγρό στους -22 °C. Αυτό οφείλεται στο γεγονός οτι οι ασκούμενες υψηλές υδροστατικές πιέσεις εμποδίζουν τους παγοκρυστάλλους να αυξηθούν σε όγκο. Το φαινόμενο αυτό έχει τις παρακάτω σημαντικές πρακτικές συνέπειες:

- α) Κατεψυγμένα τρόφιμα και άλλα βιολογικά υλικά που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα μπορούν να αποψυχθούν κάτω απο υψηλές υδροστατικές πιέσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι και -20 °C.
- β) Αν η κατάψυξη των ευαίσθητων τροφίμων και των βιολογικών υλικών είναι ανεπιθύμητη, είναι δυνατόν αυτά να συντηρηθούν κάτω απο υψηλές υδροστατικές

πιέσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες, μέχρι και $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ χωρίς τον κίνδυνο σχηματισμού παγοκρυστάλλων.

γ) Είναι δυνατόν να επιτύχουμε υπερταχεία και ομοιόμορφη κατάψυξη των τροφίμων και των βιολογικών μέσων, αν αρχικά ασκήσουμε στο προϊόν υψηλές υδροστατικές πιέσεις 200 MPa, στη συνέχεια ψύξουμε το προϊόν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, χωρίς να επέλθει η κατάψυξή του και τέλος απομακρύνουμε ξαφνικά τις υψηλές υδροστατικές πιέσεις. Στην περίπτωση αυτή οι σχηματιζόμενοι παγοκρύσταλλοι έχουν απειροελάχιστο μέγεθος και προκαλούν τη μικρότερη δυνατή καταστροφή στη δομή του προϊόντος σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο κατάψυξης. [11]

Πρωτεΐνες

Υψηλές υδροστατικές πιέσεις υψηλότερες από 100-200 MPa ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου, μπορούν να προκαλέσουν, διάσπαση των ολιγοπεπτιδίων στις επιμέρους μονάδες πεπτιδίων, μερικό ξεδίπλωμα και μετουσίωση των μονομερών και θρόμβωση των πρωτεϊνών και σχηματισμό πηκτώματος. Οι μεταβολές αυτές προκαλούν μετουσίωση των πρωτεϊνών. Αυτή μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μόνιμη, ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης και το μέγεθος των πιέσεων και είναι δυνατόν να μεταβάλει τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες τροφίμων που μετουσιώνονται με την επίδραση υπερυψηλών υδροστατικών πιέσεων, όπως οι πρωτεΐνες αυγών, σόγιας, κρέατος και ψαριών, έχουν περισσότερο κολλώδη εμφάνιση, είναι διαφανείς και μαλακές, με μεγαλύτερη πυκνότητα και λεία επιφάνεια σε σύγκριση με εκείνες που υφίστανται θέρμανση. Επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων σε ασπράδι αυγού, στα 390 MPa για 30 min στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, προκάλεσε το σχηματισμό μαλακού πηκτώματος το οποίο διατήρησε το φυσικό του χρώμα και το άρωμα, όλες τις βιταμίνες και τα αμινοξέα και ήταν περισσότερο εύπεπτο σε σχέση με το πήκτωμα από ασπράδι που δέχθηκε θέρμανση. Οι μοναδικές αυτές ιδιότητες, που αποκτούν οι πρωτεΐνες των τροφίμων με την επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων, δίνουν τη δυνατότητα παραγωγής πλήθους νέων προϊόντων. [11]

Λίπη

Οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις αυξάνουν το σημείο τήξης των λιπών κατά 10°C / 100MPa, κατά τρόπο αντιστρεπτό. Οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι τριγλυκεριδίων έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα και είναι σταθερότεροι.

Όμως, οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις αυξάνουν το ρυθμό των αντιδράσεων οξειδώσεως των λιπών παρουσία οξυγόνου σε τρόφιμα που περιέχουν λίπος και σε βιολογικά συστήματα. Επεξεργασία τομάτας με υψηλές υδροστατικές πιέσεις προκάλεσε την έντονη οξείδωση του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος και προσέδωσε στο προϊόν έντονη ταγκή γεύση. Επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων στα 600 MPa προκάλεσε έντονη οξείδωση σε φιλέτο μπακαλιάρου λόγω της περιεκτικότητάς του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. [11]

Άμυλο

Η εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων προκαλεί την ομοιόμορφη διάνοιξη και τη μερική αποδιοργάνωση στα μόρια του αμύλου, γεγονός που αυξάνει τη γλυκύτητα του αμύλου και καθιστά τα μόριά του περισσότερο ευαίσθητα στη δράση των αμυλολυτικών ενζύμων, όπως η α-αμυλάση. Το άμυλο πατάτας, καλαμποκιού και σίτου ζελατινοποιείται με την επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων και σχετικά υψηλών θερμοκρασιών. Τα άμυλα που υφίστανται την επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων έχουν μοναδικές ιδιότητες, διαφορετικές από εκείνες που σχηματίζονται με τη ζελατινοποίηση του αμύλου με θέρμανση. Με τη θέρμανση καταστρέφονται οι αμυλόκοκκοι και το άμυλο διαλύεται για να σχηματίσει ένα διαφανές διάλυμα. Αντίθετα, με την εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων οι αμυλόκοκκοι διογκώνονται, αλλά παραμένουν άθικτοι. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη σταθεροποίηση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι διατηρούν τους αμυλόκοκκους στην αρχική τους κατάσταση. [11]

2.5.2.5 Επίδραση της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης στα ένζυμα

Οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν αντιστρεπτές ή μη μεταβολές σε διάφορα ένζυμα, με αποτέλεσμα την πλήρη ή τη μερική αδρανοποίησή τους και σε ορισμένες περιπτώσεις την εντονότερη ενεργοποίησή τους. Έτσι, η εφαρμογή υπερυψηλών υδροστατικών πιέσεων αυξάνει τη δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων. Για παράδειγμα, η ενζυμική μελάνωση της

πατάτας, των αχλαδιών και των μήλων επιταχύνεται με την εφαρμογή υπερυψηλών πιέσεων.

Η πηκτινестεράση είναι ένα πηκτινολυτικό ένζυμο υπεύθυνο για την αποσταθεροποίηση του αρώματος των χυμών, για το σχηματισμό πηκτώματος στους συμπυκνωμένους χυμούς και για την απώλεια της συνεκτικότητας στα προϊόντα τομάτας. Το ένζυμο αυτό είναι λιγότερο ανθεκτικό στην επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων από την πολυφαινολοξειδάση. Η εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων προκαλεί τρυφεροποίηση του κρέατος και επιταχύνει την ωρίμασή του. Το γεγονός αυτό αποδίδεται κυρίως στα πρωτεολυτικά ένζυμα του κρέατος, όπως οι καθεψίνες και φωσφατάση. Η δράση των ενζύμων αυτών αυξάνει, όταν το κρέας υποβληθεί σε υδροστατικές πιέσεις μεταξύ 100 και 500 MPa για 5 min στους 2 °C. [11]

2.5.2.6 Επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στους μικροοργανισμούς

Την επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στους μικροοργανισμούς μελέτησε για πρώτη φορά ο Certes το 1983, όταν διαπίστωσε την ύπαρξη ζωντανού βακτηρίου σε δείγμα θαλασσινού νερού που πάρθηκε από βάθος 5100 μέτρων υπό πίεση 50 MPa.

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί μπορούν να αντέξουν σε χαμηλές υδροστατικές πιέσεις, αλλά αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλον ατμοσφαιρικής πίεσης. Έτσι, τα περισσότερα βακτήρια μπορούν να αντέξουν υδροστατικές πιέσεις από 20 έως 30 MPa. Η καταστροφή των βλαστικών κυττάρων των μικροοργανισμών επέρχεται σε υδροστατικές πιέσεις κοντά στα 400 MPa. Αναφέρεται ότι υδροστατικές πιέσεις μέχρι 240 MPa για 40 min στους 23 °C δεν ανέστειλαν επαρκώς την ανάπτυξη της *Listeria Monocytogenes*, ενώ η αύξηση της υδροστατικής πίεσης στα 310 MPa για 20 min μείωσε τον πληθυσμό της μόνο κατά τρεις λογαρίθμους.

Την επίδραση των υψηλών υδροστατικών πιέσεων στις βλαστικές μορφές των μικροοργανισμών επηρεάζουν και άλλοι παράγοντες, όπως η διάρκεια εφαρμογής των υδροστατικών πιέσεων, το στάδιο ανάπτυξης των μικροοργανισμών, η σύνθεση του μέσου ανάπτυξης, η θερμοκρασία, το pH και η δραστηριότητα του νερού (a_w). Κατά κανόνα η αύξηση του χρόνου άσκησης των υδροστατικών πιέσεων αυξάνει την καταστροφή των βλαστικών μορφών των μικροοργανισμών. Εφαρμογή υψηλών

υδροστατικών πιέσεων σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση στους 45-50 °C αυξάνει το ρυθμό καταστροφής των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

Τα κύτταρα των βακτηρίων που καταστρέφονται με εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων, σε αντίθεση με αυτά που καταστρέφονται με θέρμανση, διατηρούν την ικανότητά τους να ενεργούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης.

Σε αντίθεση με τις βλαστικές μορφές των μικροοργανισμών, τα σπόρια των βακτηρίων είναι ανθεκτικά στην επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων και επιζούν ακόμη και σε υδροστατικές πιέσεις υψηλότερες από 1200 MPa. Για το λόγο αυτό οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις ως μέθοδος συντήρησης εφαρμόζονται κυρίως σε προϊόντα με χαμηλό pH, στα οποία τα σπόρια δεν δημιουργούν κανένα πρόβλημα, επειδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Η μεγάλη αντοχή των σπορίων στις υψηλές υδροστατικές πιέσεις σχετίζεται με τον τρόπο κατασκευής και το πάχος του περιβλήματος που απαρτίζει το σπόριο. Όμως, υδροστατικές πιέσεις κοντά στα 400 MPa, όταν εφαρμόζονται σταδιακά αυξανόμενες παράλληλα με ήπια θέρμανση, προκαλούν την καταστροφή των σπορίων. Σπόρια του *C. sporogenes* που υποβλήθηκαν σε υδροστατικές πιέσεις στα 300 MPa στους 70 °C υπέστησαν μείωση του πληθυσμού τους κατά 10 λογαριθμικούς κύκλους σχεδόν αμέσως με την εφαρμογή της πίεσης. Ωστόσο το 0,01% των σπορίων που επέζησαν παρέμειναν ζωντανά. Υδροστατικές πιέσεις στα 400 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες θέρμανσης μεταξύ 45 και 60 °C προκάλεσαν την πλήρη καταστροφή των σπορίων.

Κατά συνέπεια, η εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων, σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση, μπορεί να εξασφαλίσει την εμπορική αποστείρωση των τροφίμων και να διασφαλίσει την υγεία του καταναλωτή με την προϋπόθεση ότι θα προκαλέσει την καταστροφή των σπορίων του *C. botulinum* κατά 12 λογαριθμικούς κύκλους. [11]

2.5.2.7 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα υψηλής υδροστατικής πίεσης

2.5.2.8 Πλεονεκτήματα

Τα πλεονεκτήματα της υψηλής υδροστατικής πίεσης ως μεθόδου επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων είναι τα παρακάτω:

- Επειδή οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις μεταφέρονται στιγμιαία και ομοιόμορφα προς όλες τις κατευθύνσεις στο συσκευασμένο τρόφιμο, τις καθιστούν ανεξάρτητες από το μέγεθος και το σχήμα του προϊόντος και ελαχιστοποιούν το χρόνο επεξεργασίας του.
- Επειδή οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις δεν καταστρέφουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς στις χημικές ενώσεις, δεν λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις Maillard και η ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών και δεν καταστρέφονται οι βιταμίνες, με αποτέλεσμα το προϊόν να διατηρεί τη θρεπτική του αξία και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Πουρές καρότου που υποβλήθηκε σε υδροστατικές πιέσεις από 300-600 MPa για 10-40 min σε συνδυασμό με θέρμανση στους 75 °C διατήρησε σχεδόν αμετάβλητη τη συγκέντρωσή του σε β-καροτένιο. Επίσης, χυμός από πορτοκάλι, λεμόνι και καρότο που υποβλήθηκε σε υψηλή υδροστατική πίεση στα 500 MPa για 5 min διατήρησε αμετάβλητη τη γενική του αποδοχή από τους δοκιμαστές για 21 ημέρες σε θερμοκρασία 4 °C, σε αντίθεση με το μάρτυρα που παρουσίασε σημαντική υποβάθμιση έπειτα από 7 ημέρες.
- Επειδή οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις εφαρμόζονται σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες ψύξης ή σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση, εξοικονομείται σημαντική ποσότητα ενέργειας σε σχέση με τη θέρμανση και δεν προκαλούνται ανεπιθύμητες μεταβολές στην υφή, τη θρεπτική αξία και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.
- Με την εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων δεν είναι απαραίτητη η χρήση συντηρητικών, προκειμένου να εξασφαλισθεί επαρκής χρόνος συντήρησης των τροφίμων.
- Ο χρόνος επεξεργασίας των τροφίμων με υψηλές υδροστατικές πιέσεις είναι πολύ μικρός σε σύγκριση με το χρόνο που απαιτείται για τη θερμική επεξεργασία.

2.5.2.9 Μειονεκτήματα

Στα μειονεκτήματα της εφαρμογής υψηλών υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα αναφέρονται το υψηλό κόστος εγκατάστασης και η μικρή δυναμικότητα παραγωγής του συστήματος. [11]

2.5.2.10 Εφαρμογές των υψηλών υδροστατικών πιέσεων

Οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις βρίσκουν τις παρακάτω εφαρμογές στα τρόφιμα:

- Στην συντήρηση των τροφίμων σε θερμοκρασίες μικρότερες από 0 °C χωρίς το σχηματισμό παγοκρυστάλλων, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η υποβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων που προκαλεί η κατάψυξη και ιδίως η βραδεία κατάψυξη στα προϊόντα με κυτταρική οργάνωση.
- Στην αδρανοποίηση των ενζύμων στα λαχανικά και τα φρούτα όπου περιορίζουν τα προβλήματα μόλυνσης του περιβάλλοντος από το μεγάλο όγκο αποβλήτων κατά το ζεμάτισμα με θερμό νερό.
- Στην παστερίωση και την εμπορική αποστείρωση τροφίμων σε μικρές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ενέργειας και την καλύτερη διατήρηση στην ποιότητα των τροφίμων.
- Στην τροποποίηση πρωτεϊνών, οπότε δίνεται η δυνατότητα ανάπτυξης πολλών νέων προϊόντων.
- Στη γρήγορη τήξη των λιπών και την απόψυξη κατεψυγμένων προϊόντων. Για παράδειγμα, η απόψυξη βοδινού κρέατος βάρους 2 κιλών σε συνθήκες δωματίου διαρκεί 7 ώρες, ενώ με την επίδραση υδροστατικής πίεσης στα 200 MPa διαρκεί μόνο 80 min.
- Στην βελτίωση της αποτελεσματικότητας άλλων επεξεργασιών. Η υποβολή τεμαχισμένων μήλων με τη μορφή κυλίνδρων στην επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων πριν την αφυδάτωσή τους αυξάνει σημαντικά το ρυθμό αφυδάτωσης, γεγονός που αποδίδεται στην αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών.
- Στην τρυφεροποίηση του κρέατος. Ο μυϊκός ιστός εισέρχεται μετά τη σφαγή των ζώων στη μυϊκή ακαμψία κατά την οποία βραχύνεται και γίνεται σκληρός και δυσμάσητος κατά το μαγείρεμα. Για να γίνει το κρέας

τρυφερό και ευμάσητο, πρέπει να υποστεί ωρίμαση σε συνθήκες ψύξης για δύο περίπου εβδομάδες. Η εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων κάνει τρυφερό το κρέας σε χρόνο μόνο 10 min. Η τρυφεροποίηση του κρέατος αποδίδεται στις φυσικές και χημικές μεταβολές που προκαλούν οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις στις μυϊκές ίνες και στην ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων.

- Στην παραγωγή νέων προϊόντων που διατηρούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης. Αναφέρεται ότι η μαρμελάδα φράουλας που παρασκευάστηκε με εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων διατήρησε το χρώμα και το άρωμα της νωπής φράουλας καθώς και το 95% της περιεκτικότητας σε ασκορβικό οξύ σε σύγκριση με τη μαρμελάδα που παρασκευάστηκε με εφαρμογή θέρμανσης. Ο χυμός πορτοκαλιών που δέχθηκε την επίδραση υψηλών υδροστατικών πιέσεων διατήρησε το άρωμα του φρέσκου πορτοκαλιού για 17 μήνες χωρίς απώλεια ασκορβικού οξέος.
- Άλλες εφαρμογές. Στην απομάκρυνση εγκλωβισμένων αερίων από τα τρόφιμα, στην εκχύλιση τροφίμων ή μικροβιακών συστατικών, στην κάλυψη επιφανειών διαφόρων προϊόντων κ.α. [11]

2.5.2.11 Επίδραση του pH, Ενεργότητας του νερού (a_w) και Θερμοκρασίας

Η συμπίεση των τροφίμων μπορεί να μετατοπίσει το pH του τροφίμου ως συνάρτηση της πίεσης. Ο Heremans (1995) ανέφερε ταπείνωση του pH μηλοχυμού κατά 0,2 μονάδες ανά 100 MPa αύξηση στην πίεση. Η κατεύθυνση μετατόπισης του pH και το μέγεθός της θα πρέπει να καθορίζονται για κάθε επεξεργασία.

Το μέγεθος και η κατεύθυνση της μετατόπισης της ενεργότητας ύδατος, αν υπάρχει, δεν έχει αναφερθεί ακόμη. Οι Oxen και Knorr (1993) έδειξαν ότι μια μείωση της a_w από 0,98-1,0 σε 0,94-0,96 οδηγούσε σε μια σημαντική μείωση της ταχύτητας αδρανοποίησης μικροβίων τα οποία αιωρούντο σε τρόφιμο. Η μείωση της a_w φαίνεται ότι προστατεύει τα μικρόβια από την αδρανοποίηση με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (ΥΥΠ). Όμως, πρέπει να αναμένεται ότι τα μικρόβια πρέπει να βλάπτονται από την ΥΥΠ και η ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων πρέπει να

ανασταλεί από την μειωμένη a_w . Συνεπώς παραμένει να καθορισθεί η καθαρή επίδραση της a_w .

Ο Linton (1999) απέδειξε ότι το pH έχει μια σημαντική επίδραση στην ταχύτητα αδρανοποίησης της *Escherichia Coli*. Καθώς το pH μειώνεται, τα περισσότερα μικρόβια καθίστανται πιο ευαίσθητα στην αδρανοποίηση από ΥΥΠ και τα τραυματισμένα κύτταρα αποτυγχάνουν να επανέλθουν. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι το pH και η a_w είναι κρίσιμοι παράγοντες της επεξεργασίας για την αδρανοποίηση μικροβίων σπουδαίων από άποψη δημόσιας υγείας. Η παρακολούθηση και ο έλεγχός τους πρέπει να περιλαμβάνεται στα σχέδια HACCP της ΥΥΠ επεξεργασίας τροφίμων. Οι ΥΥΠ επεξεργασίες, με την απουσία σημαντικών αυξήσεων της θερμοκρασίας, δεν διασπών τους ομοιοπολικούς χημικούς δεσμούς. Οι ιοντικοί δεσμοί, όπως αυτοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, μπορούν να διασπαστούν. Ο Pagan (1999) απέδειξε ότι όξινες τιμές pH μπορούν να προκαλέσουν αδρανοποίηση των κυττάρων τα οποία υπέστησαν βλάβη από την πίεση.

Η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από τη θερμοκρασία δωματίου και σε μικρότερη έκταση ή μείωση κάτω αυτής, αυξάνει την ταχύτητα αδρανοποίησης των μικροοργανισμών κατά την επεξεργασία με ΥΥΠ. Θερμοκρασίες στην περιοχή των 45-50 °C φαίνεται ότι αυξάνουν την ταχύτητα αδρανοποίησης των παθογόνων και των αλλοιούντων τα τρόφιμα μικροοργανισμών και έτσι αξίζει να αναπτυχθούν επεξεργασίες οι οποίες εξασφαλίζουν ομοιόμορφη αρχική θερμοκρασία τροφίμου στην περιοχή αυτή.

Θερμοκρασίες επεξεργασίας στην περιοχή των 90-110 °C σε συνδυασμό με πιέσεις 500-700 MPa έχει αποδειχθεί ότι αδρανοποιούν σπορογόνα βακτήρια όπως το *Clostridium botulinum*. Η χρήση αυξημένων θερμοκρασιών ως μέρος της ΥΥΠ επεξεργασίας απαιτεί καταγραφή της θερμοκρασίας κατά την επεξεργασία για να εξασφαλισθεί ότι κάθε στοιχείο του τροφίμου βρίσκεται σε επίπεδο άνω της εξειδικευμένης τιμής. [12]

2.5.2.12 Αδρανοποίηση των μικροοργανισμών

Η εφαρμογή της ΥΥΠ ως μεθόδου μικροβιακής αδρανοποίησης τράβηξε το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα της ΥΥΠ επι της μικροβιακής αδρανοποίησης πρέπει να μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια για να διασφαλισθεί η ασφάλεια των τροφίμων τα οποία υφίστανται τέτοιου είδους επεξεργασία. Σήμερα, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στις επιδράσεις της ΥΥΠ πάνω στους σπόρους και τις βλαστικές μορφές παθογόνων βακτηρίων. Διαπιστώθηκε, μια αύξηση στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και πιθανή αναστολή των ενζύμων τα οποία είναι ζωτικά για την επιβίωση και αναπαραγωγή των βακτηριακών κυττάρων (Farr, 1990). Για το σχεδιασμό κατάλληλων συνθηκών για την επεξεργασία των τροφίμων με ΥΥΠ, είναι βασικό να γνωρίζουμε τα ακριβή επίπεδα αντοχής των διαφόρων μικροβιακών ειδών στην ΥΥΠ και τους μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί το επίπεδο αυτό να ελαχιστοποιηθεί. Η γνώση της αντίστασης στην πίεση των διαφόρων μικροβιακών ειδών θα βοηθήσει στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικού και ακριβούς εξοπλισμού υψηλής πίεσης. Η μη κατάλληλη χρήση μιας ποικιλίας παραμέτρων, όπως περιοχή πίεσης, θερμοκρασία επεξεργασίας, αρχική θερμοκρασία, χρόνος παραμονής και τύπος συσκευασίας, μπορεί να επηρεάσει αντίθετα το αποτέλεσμα της ΥΥΠ. Έτσι, η καλή κατανόηση της επίδρασης της διακύμανσης των κρίσιμων παραγόντων στις ενδοκυτταρικές μεταβολές λόγω υψηλής πίεσης είναι βασική για τη διασφάλιση της ασφάλειας της ΥΥΠ. Το φυσικοχημικό περιβάλλον μπορεί να μεταβάλει την αντίσταση των βακτηριακών ειδών στην πίεση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η επίδραση της ΥΥΠ επί των Gram θετικών βακτηρίων είναι εκτεταμένη σε σχέση με την επίδραση που υπάρχει στα Gram αρνητικά βακτήρια. Παράγοντες όπως η ενεργότητα ύδατος και το pH επηρεάζουν την έκταση στην οποία τα τρόφιμα πρέπει να επεξεργασθούν για να εξαλειφθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Ο Hoover (1989) ανέφερε ότι τα περισσότερα βακτήρια μπορούν να αντέξουν την υψηλή πίεση, δηλαδή μπορούν να αντέξουν τις υψηλές πιέσεις, αλλά αναπτύσσονται καλά σε ατμοσφαιρική πίεση.

Ο Maggi (1994) μελέτησε τις επιδράσεις της ΥΥΠ επί της θερμικής αντίστασης των μυκήτων σε νέκταρ από βερίκοκο και αλεσταγμένο νερό. Ανέφερε πλήρη αδρανοποίηση των ασκοσπορίων του *T. Flavus* στα 900 MPa επί 20 min στους 20 °C, μια μείωση δύο λογαριθμικών κύκλων για τη *N. Fischeri* και καμμία επίδραση στους πληθυσμούς της *B. Fulva* και *B. Nivea*. Σε αντίθεση, η προθέρμανση του νέκταρος

βερικόκου στους 50 °C ακολουθούμενη απο επεξεργασία πίεσεως 800 MPa επί 1-4 min οδήγησε σε πλήρη αδρανοποίηση και των 4 ειδών. Στο απεσταγμένο νερό παρατηρήθηκε μικρότερη αντίσταση στην πίεση. [12]

2.5.2.13 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αδρανοποίηση

Οι συνθήκες επεξεργασίας (αρχική θερμοκρασία, θερμοκρασία νερού, μέσο πίεσεως, χρόνος παραμονής) κάτω απο τις οποίες εφαρμόζεται η υψηλή πίεση επηρεάζουν σημαντικά το επίπεδο αδρανοποίησης, καθώς επίσης και τη συνολική δράση επι των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων. Ο Ye (1996) μελέτησε την αντοχή στην πίεση των *Sacchromyces cerevisiae*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermidis* σε διάφορα υποστρώματα, με υποβολή των δειγμάτων σε πίεση στα 300 MPa στους 5-25 °C επί 1-20 min. ανέφερε οτι το pH των υποστρωμάτων παίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στην καταστροφή των μικροβίων.

Η διακύμανση στο pH και την ενεργότητα του ύδατος των τροφίμων μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα επίπεδα θανάτωσης ενός ιδιαίτερου βακτηρίου για τις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας με υψηλή πίεση. Οι Timson και Short έδειξαν οτι ο *B. subtilis* παρουσίαζε μείωση της αντίστασης στην πίεση καθώς το pH του γάλακτος μειωνόταν ή αυξανόταν απο μια τιμή pH 8. Η τιμή αυτή δεν είναι σταθερή για όλους τους μικροοργανισμούς και η επιβίωση του *B. Subtilis* σε κάποιο ειδικό pH μπορεί να ποικίλει με την πίεση και τη θερμοκρασία της επεξεργασίας. Ο τύπος του υποστρώματος για την ανάπτυξη των μικροβιακών ειδών μπορεί επίσης να έχει μια σημαντική επίδραση επι της θερμικής αντίστασης και της αντίστασης στην πίεση κάθε μικροοργανισμού. Γενικώς, όσο πλουσιότερο είναι το υπόστρωμα ανάπτυξης, τόσο καλύτερη είναι η αντίσταση των μικροοργανισμών στην πίεση. Αυτό θεωρείται ότι συμβαίνει λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και αμινοξέων στο συμπεζόμενο κύτταρο. Θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι οι παράγοντες, που διέπουν την αντοχή στην πίεση, δεν είναι σταθεροί για κάθε βακτηριακό είδος και ποικίλουν απο βακτήριο σε βακτήριο και επίσης είναι διαφορετικοί για το είδος το οποίο αναπτύχθηκε κάτω απο διαφορετικές συνθήκες ή διαφορετικά υποστρώματα. Είναι πολύ πιθανό, η εφαρμογή της πίεσης να επηρεάζει τις λειτουργίες του κυττάρου κατά πολλαπλό τρόπο και έτσι να επιβραδύνει ή και να θανατώνει το κύτταρο. Κατά συνέπεια οι μελέτες των βακτηρίων που έχουν

υποβληθεί σε ΥΥΠ θα πρέπει να περιγράφουν και να πιστοποιούν τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έλαβε χώρα η αδρανοποίηση.

Ο Patterson (1995) μελέτησε την ευαισθησία των βλαστικών παθογόνων *Yersinia enterocolitica*, *Salomonella typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria Monocytogenes* και *Escherichia Coli* σε ρυθμιστικό (pH 7,0), γάλα UHT και κρέας πουλερικών και πιέσεις μέχρι 700 MPa στους 20 °C. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκαν μειώσεις 10^5 στην περιοχή των 275-700 MPa επί 15 min όταν εφαρμόστηκαν στους 20 °C. Τα διαφορετικά στελέχη των *Listeria Monocytogenes* και *Escherichia Coli* έδειξαν σημαντική διακύμανση στην αντίσταση στην πίεση. Για τους μικροοργανισμούς αυτούς σημαντική ήταν επίσης και η επίδραση του υποστρώματος.

Το pH του τροφίμου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της έκτασης στην οποία η ΥΥΠ επηρεάζει τους μικροοργανισμούς. Οι Roberts και Hoover (1996), μελέτησαν τις επιδράσεις των μεταβολών του pH σε συνδυασμό με ένα σύνολο άλλων παραγόντων επί της αντίστασης του *B. Coagulans* στην πίεση. Ανέφεραν μια αύξηση της αποτελεσματικότητας της ΥΥΠ καθώς το pH του ρυθμιστικού μέσου μειωνόταν. Επίσης παρατηρήθηκε μια επιπλέον μείωση κατά 1,5 λογαριθμικό κύκλο καθώς το pH μειωνόταν από το 7,0 στο 4,0. Η μεταβολή στο pH θεωρείται ότι επηρεάζει την ΑΤΡαση της μεμβράνης και τις ενδοκυτταρικές λειτουργίες των σπορίων και για αυτό αποσταθεροποιείται ο μικροοργανισμός. Η επίδραση αυτή του pH στην αντίσταση στην πίεση οποιουδήποτε μικροοργανισμού ενισχύεται από άλλους παράγοντες, όπως η προσθήκη αλάτων, οι συνθήκες θερμοκρασίας και γενικώς οι παράμετροι της επεξεργασίας.

Η ενεργότητα του νερού (a_w) των κυττάρων επηρεάζει την αντίσταση στην πίεση. Έχει αναφερθεί ότι όσο χαμηλότερη είναι η ενεργότητα του νερού, τόσο υψηλότερη είναι η αντίσταση των κυττάρων στην υψηλή πίεση. Ο Palou (1996) μελέτησε τη συνδυασμένη δράση της ΥΥΠ και της ενεργότητας του νερού επί της αναστολής του *Zygosaccharomyces bailii*. Ανέφερε πλήρη αναστολή της ζύμης σε $a_w > 0,98$ και μια αύξηση του κλάσματος επιβίωσης με αύξηση της a_w . Συμπέρανε επίσης, ότι η προσθήκη σακχαρόζης για τη μείωση της ενεργότητας του νερού δρα ως προστατευτικό έναντι της πίεσης, παρεμποδίζοντας την αναστολή της ζύμης ακόμη και σε υψηλές πιέσεις. [11]

2.5.2.14 Μικροβιακή αδρανοποίηση με θερμότητα και πίεση

Όταν τα τρόφιμα υποβάλλονται σε υψηλή πίεση, η συμπίεση μεταφέρεται στιγμιαία μέσω του υδροστατικού μέσου στα μικρόβια του τροφίμου. Η συμπίεση φαίνεται ότι επηρεάζει τη μικροβιακή αδρανοποίηση με μεταβολή των πρωτεϊνών οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό, την ακεραιότητα και το μεταβολισμό. Η υψηλή πίεση δεν διασπά τους ομοιοπολικούς δεσμούς, αλλά μεταβάλλει τους δεσμούς υδρογόνου και τους ιοντικούς δεσμούς που είναι υπόθυνοι για τη διατήρηση των πρωτεϊνών στη βιολογικώς δραστική τους μορφή. Έτσι, η παρατηρηθείσα κινητική της μικροβιακής αδρανοποίησης μπορεί να υποστηριχθεί ότι είναι το αποτέλεσμα της μη αντιστρεπτής μετουσίωσης μιας ή περισσότερων κρίσιμων πρωτεϊνών στο μικρόβιο. Εφ' όσον η ευκολία ή η δυσκολία της μη αντιστρεπτής μετουσίωσης της πρωτεΐνης είναι συνάρτηση της δομής της πρωτεΐνης, πρέπει να αναμένεται μια ευρεία περιοχή των αντιστάσεων μεταξύ των βλαστικών μικροβίων. Ο Smelt (1998) έδειξε μία εξαπλάσια περιοχή στις τιμές D μεταξύ 100 στελεχών της *L. Monocytogenes*.

Επίσης, μπορεί να λάβει χώρα και επιδιόρθωση του κυττάρου μετά την πίεση ή την ήπια θερμική επεξεργασία. Αυτό δείχνει ότι μετουσιώνεται μια κρίσιμη πρωτεΐνη, αλλά οι επισκευασθείσες πρωτεΐνες δεν υπέστησαν βλάβη, έτσι ώστε η κρίσιμη πρωτεΐνη να μπορούσε να επιδιορθωθεί. Η επιδιόρθωση μπορεί να επηρεαστεί από τη σύνθεση του τροφίμου. Τα οξέα του τροφίμου μπορούν να αναστείλουν την επιδιόρθωση των πρωτεϊνών του κυττάρου, και έτσι φαίνεται να καθιστά το μικρόβιο πιο ευαίσθητο στην πίεση ή την θερμότητα.

Η έρευνα των επιδράσεων της πίεσης επί των πρωτεϊνών φανερώνει μια στενή παράλληλη σχέση μεταξύ θερμικής αδρανοποίησης και αδρανοποίησης με πίεση, καθώς και αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή αδρανοποίηση των πρωτεϊνών. [11]

2.5.2.15 Συσκευασία τροφίμων για επεξεργασία με υψηλή πίεση

Η εκλογή των υλικών συσκευασίας για επεξεργασία με υψηλή πίεση είναι τόσο σπουδαία όσο και η γεύση των τροφίμων. Ο τύπος της συσκευασίας του τροφίμου παίζει σπουδαίο ρόλο στην ΥΥΠ. Δύο βασικά γνωρίσματα τα οποία πρέπει να έχει το υλικό συσκευασίας, είναι η ικανότητα να αντέχει στο μέγεθος της εφαρμοζόμενης πίεσης και η καλή σφράγιση με θέρμανση. Σήμερα, στα προϊόντα τα οποία έχουν επεξεργαστεί με ΥΥΠ, χρησιμοποιείται μια ποικιλία υλικών, όπως

πλαστικές σακούλες stomacher, αποστειρωμένοι σωλήνες, σωλήνες πολυεστέρα, σακίδια πολυαιθυλενίου, σακίδια πολυπροπυλενίου επιστρωμένα με nylon και διάφορα άλλα συστήματα εύκαμπτων σακιδίων. Οι φυσικές και μηχανικές ιδιότητες του υλικού, επηρεάζουν αρκετά την αποτελεσματικότητα της ΥΥΠ στα τρόφιμα. Ο Nachamanson (1995), περιγράφοντας τα υλικά συσκευασίας για ΥΥΠ, σημείωσε ότι οι συσκευασίες πρέπει να έχουν την ικανότητα να περιορίζουν κάθε υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος κατά την εφαρμογή ΥΥΠ. Τα τρόφιμα που πρόκειται να υποστούν επεξεργασία με ΥΥΠ μπορούν να τοθετηθούν ή σε συσκευασίες χονδρεμπορίου ή σε συσκευασίες επιπέδου καταναλωτή πριν ή μετά την επεξεργασία. Ο Nachamanson επίσης σημειώνει ότι ο ελεύθερος χώρος στη συσκευασία θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερος, επειδή ο αέρας και τα άλλα αέρια συμπιέζονται σε όγκο μηδέν περίπου κατά την υψηλή πίεση, καταλείποντας τάσεις αποσχηματισμού στις συσκευασίες. Έτσι, κάθε συσκευασία θα πρέπει να εξετάζεται ως προς το επιτρεπτό μέγεθος του ελεύθερου χώρου, γιατί ο τελευταίος δεν είναι δυνατόν πρακτικά να αποφευχθεί. Οι ιδιότητες φράγματος και τα δομικά χαρακτηριστικά των υλικών που βασίζονται στα πολυμερή παραμένουν ανεπηρέαστα όταν υφίστανται επεξεργασία σε 400 MPa επί 30 min στους 25 °C.

Ο Masuda, επίσης μελέτησε τις επιδράσεις της ΥΥΠ επί των υλικών συσκευασίας των τροφίμων και κυρίως τις ιδιότητες φράγματος αυτών. Εξέτασε τη διαπερατότητα υδρατμών και οξυγόνου και την αποτελεσματικότητα της σφράγισης με θέρμανση σύνθετων πλαστικών φιλμ.

Ανέφερε ότι η επεξεργασία των 600 MPa στους 40 °C για 10 min και η επεξεργασία των 300 MPa στους 20 °C για 2 min δεν επηρέαζαν τις ιδιότητες φράγματος. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις ιδιότητες παρεμπόδισης εισόδου ανωτέρων αρωματικών. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι οι ιδιότητες των υλικών των τροφίμων που μελετήθηκαν επηρεάζονται πολύ λίγο από την εφαρμογή ΥΥΠ και τα υλικά αυτά μπορούν να υιοθετηθούν για την διατήρηση της φρεσκάδας των τροφίμων. [12]

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της συμπεριφοράς δυο παθογόνων μικροοργανισμών υπό την εφαρμογή ΥΥΠ στο γάλα. Τα συμπεράσματα που εξάγονται από μια τέτοια μελέτη είναι χρήσιμα τόσο από μικροβιολογικής άποψης, όσο και από βιομηχανικής. Στην πρώτη περίπτωση αφορά στο να γνωρίσουμε καλύτερα δυο τόσο επικίνδυνους και συχνά εμφανιζόμενους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα, καθώς και να μελετήσουμε την συμπεριφορά τους σε σχέση με την ΥΥΠ. Πολύ σημαντική, όμως, είναι και η συνεισφορά της μελέτης σε βιομηχανικό επίπεδο, αφού η ΥΥΠ είναι μια σχετικά νέα τεχνική επεξεργασίας η οποία συνάδει με την γενικότερη αντίληψη περί στρόφης σε τρόφιμα λιγότερο επεξεργασμένα και πιο υγιεινά.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Προετοιμασία εμβολίων

Για τη διεξαγωγή της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. monocytogenes* Scott A (ορολογικός τύπος 4b) και *S. enteritidis*, τα οποία παρελήφθησαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου διατηρούνται σε θερμοκρασία -30°C , αφού πρώτα έχουν προσκολληθεί σε πλαστικά σφαιρίδια (beads).

Η προετοιμασία του εμβολίου γινόταν σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο: αρχικά ο μικροοργανισμός μεταφερόταν ασηπτικά από το φιαλίδιο (bead) όπου διατηρείτο στους -30°C , μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml BHI broth (Merck) (1^η ανανέωση). Ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες σε θερμοκρασία 35°C για την *S. enteritidis* και στους 30°C για την *L. monocytogenes*. Την επόμενη ημέρα, λαμβάνονταν ασηπτικά 0,1 ml του μικροοργανισμού από τον δοκιμαστικό σωλήνα

και τοποθετείτο σε μια κωνική φιάλη με 100 ml BHI broth, ακολουθούσε επώαση του μικροοργανισμού για 18 ώρες στους 35°C και 30°C για τη *S. enteritidis* και *L. monocytogenes* αντίστοιχα (2^η ανανέωση). Μετά το πέρας των 18 ωρών επώασης του μικροοργανισμού, 45 ml εναιωρήματος μεταφερόταν ασηπτικά σε σωλήνα φυγοκέντρου (Universal 16A, Hettich, Tuttlingen, Germany) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 6.500 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρυνόταν το υπερκείμενο υγρό και στο σωλήνα φυγοκέντρησης παρέμενε το ίζημα του μικροοργανισμού στο οποίο προστίθετο αρχικά 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer pH 6,7. Ακολουθούσε διαλυτοποίηση με τη βοήθεια του Vortex. Στο διάλυμα που είχε δημιουργηθεί με τον μικροοργανισμό μέσα στη σωλήνα φυγοκέντρησης, προσθέταμε άλλα 35 ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer pH 6,7 και ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 6.500 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο υγρό απομακρυνόταν. Στο σωλήνα φυγοκέντρησης όπου είχε παραμείνει το ίζημα του μικροοργανισμού, προσθέταμε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer pH 6,7 ώστε να διαλυτοποιήσουμε το μικροοργανισμό με τη βοήθεια του Vortex. Στη συνέχεια προσθέταμε ανάλογη ποσότητα Phosphate Buffer pH 6,7 ώστε η δύναμη του εμβολίου μετά απο μέτρηση στο μικροσκόπιο και στην πλάκα Neubauer να είναι περίπου 10⁶.

3.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων γάλακτος

Τα δείγματα πρόβειου γάλακτος, πριν τον εμβολιασμό τους με το κατάλληλο εμβόλιο του παθογόνου, ήταν αποθηκευμένα στους -30 °C. Μία ημέρα πριν το κάθε πείραμα μεταφέρονταν σε θερμοκρασία 4 °C για την ηπιότερη απόψυξή τους. Έτσι, τα δείγματα πρόβειου γάλακτος ήταν έτοιμα, σε υγρή μορφή πλέον, για τον εμβολιασμό τους με τον μικροοργανισμό.

3.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων εμβολιασμένου γάλακτος

Ύστερα απο την προετοιμασία του εμβολίου και των δειγμάτων του πρόβειου γάλακτος ακολουθούσε ο εμβολιασμός των δειγμάτων με τον εκάστοτε μικροοργανισμό. Σε μικρά πλαστικά σακουλάκια, μεταφέρονταν 3 ml γάλακτος και 0,3 ml απο κάθε μικροοργανισμό σε δύο επαναλήψεις. Μόλις ολοκληρωνόταν η

μεταφορά σε όλα τα δείγματα που θέλουμε να εφαρμόσουμε υπερηχηλή πίεση, κλείναμε τα σακουλάκια με θερμοκόλληση και τα δείγματα ήταν έτοιμα. Να σημειωθεί εδώ, ότι σε κάθε εφαρμογή ΥΥΠ, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ένα σακουλάκι το οποίο είχε παρασκευασθεί όπως και τα παραπάνω, με τη διαφορά ότι δεν του εφαρμόζαμε πίεση, για να μας δείξει την ακριβή δύναμη του κάθε αρχικού εμβολίου.

3.2.4 Προετοιμασία μηχανήματος πίεσης

Μόλις, τα δείγματά μας ήταν έτοιμα για εφαρμογή ΥΥΠ, προετοιμάζαμε το μηχάνημα της ΥΥΠ.

Ξεβιδώναμε προσεκτικά ένα - ένα τα έξι Vessel του μηχανήματος, τα καθαρίζαμε από την γλυκερόλη που πιθανόν είχε μείνει από προηγούμενα πειράματα. Τοποθετούσαμε τα δείγματά μας μέσα στα Vessel και συμπληρώναμε με γλυκερόλη μέχρι την κορυφή. Ξαναβιδώναμε τα Vessel, αφού τα είχαμε αλείψει με γράσο, και όλα ήταν έτοιμα για εφαρμογή ΥΥΠ.

3.2.5 Εφαρμογή Πίεσης

Για όλα τα πειράματα της κινητικής απενεργοποίησης μικροοργανισμών στο γάλα με ΥΥΠ χρησιμοποιήθηκε η μονάδα εργαστηριακής κλίμακας Food Pressure Unit LO1, (Resato International BV, Roden, Holland), η οποία παρέχει τη δυνατότητα μέγιστης πίεσης και θερμοκρασίας λειτουργίας 1000 MPa και 100 °C αντίστοιχα, σε ένα σύστημα έξι μικροθαλάμων χωρητικότητας 45 ml ο καθένας.

Και στους δύο μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήσαμε (*S. enteritidis* και *L. monocytogenes*), εφαρμόστηκαν πιέσεις της τάξεως των 350, 400, 450, 500 και 550 MPa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε διαφορετικούς χρόνους.

Απο τη στιγμή που τελείωνε η εφαρμογή της ΥΥΠ στα δείγματά μας, τα βγάzaμε από τα Vessel, τα καθαρίζαμε και είμασταν έτοιμοι για τον εμβολιασμό τους στα τρυβλία ανάπτυξης με εκλεκτικό υπόστρωμα BHI Agar.

3.2.6 Εμβολιασμός μικροοργανισμού

Μετά την εφαρμογή ΥΥΠ στα δείγματά μας ακολουθούσε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού στα τρυβλία τα οποία ήταν επιστρωμένα με BHI Agar.

Αρχικά σε αυτό το στάδιο, κόβαμε ένα-ένα τα σακουλάκια με ψαλίδι, παίρναμε 1 ml δείγματος γάλακτος με μικροοργανισμό απο το κάθε σακουλάκι, και το προσθέταμε σε 9 ml Ringer το οποίο ήταν τοποθετημένο σε γυάλινα σωληνάκια, έτσι ώστε να πραγματοποιήσουμε δεκαδικές αραιώσεις, ανάλογα βέβαια σε ποια αραιώση θέλαμε να φέρουμε τον μικροοργανισμό για να τον εμβολιάσουμε. Μόλις ολοκληρωνόντουσαν οι διαδοχικές αραιώσεις, παίρναμε 0,1 ml απο το κάθε σωληνάκι, απο την κάθε αραιώση που θέλαμε να εμβολιάσουμε, και το εμβολιάζαμε σε τρυβλία στρωμένα με BHI Agar εκλεκτικού υποστρώματος με τη μέθοδο streaking. Ύστερα, και για να ολοκληρωθεί η διαδικασία του πειράματος, τοποθετούσαμε όλα τα εμβολιασμένα τρυβλία μας σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 35°C για την *S. Enteritidis* και στους 30°C για την *L. monocytogenes*.

3.2.7 Καταμέτρηση των Αποικιών και Υπολογισμοί

Μετά απο επώαση 24 ωρών στην κατάλληλη θερμοκρασία, βγάσαμε τα τρυβλία απο τον επωαστικό θάλαμο και αρχίζαμε την καταγραφή των αποτελεσμάτων μας. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν είχαν περισσότερες από 30 αποικίες και λιγότερες από 300 (Meynel and Meynel, 1970). Στην περίπτωση που δύο αραιώσεις έδωσαν κατάλληλο αριθμό αποικιών επιλέχθηκε ο μέσος όρος τους.

Μετά την πρώτη καταμέτρηση ξανατοποθετήσαμε τα τρυβλία στον επωαστικό θάλαμο για ακόμα 24 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία για να παραγματοποιηθεί δεύτερη καταμέτρηση των αποικιών την επόμενη ημέρα. Αυτό γίνεται επειδή η ΥΥΠ ενδέχεται απλά να τραυματίσει κάποια κύτταρα και να παρεμποδίσει την ανάπτυξή τους την πρώτη ημέρα. Τα εν λόγω κύτταρα μπορεί να ανακάμψουν και να εμφανιστούν τη δεύτερη ημέρα και για το λόγο αυτό πραγματοποιείται και δεύτερη καταμέτρηση. Μετά το πέρας της δεύτερης καταμέτρησης των αποικιών προκύπτουν τα τελικά αποτελέσματα για το κάθε πείραμα.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιορίζεται σε κάθε δείγμα πριν και μετά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση και μετράται σε CFU/ml. Η καταμέτρηση των αποικιών του κάθε μικροοργανισμού στα τρυβλία γίνεται 24 ώρες μετά την εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης και αφού έχουμε επώσει τον μικροοργανισμό σε ανάλογη θερμοκρασία.

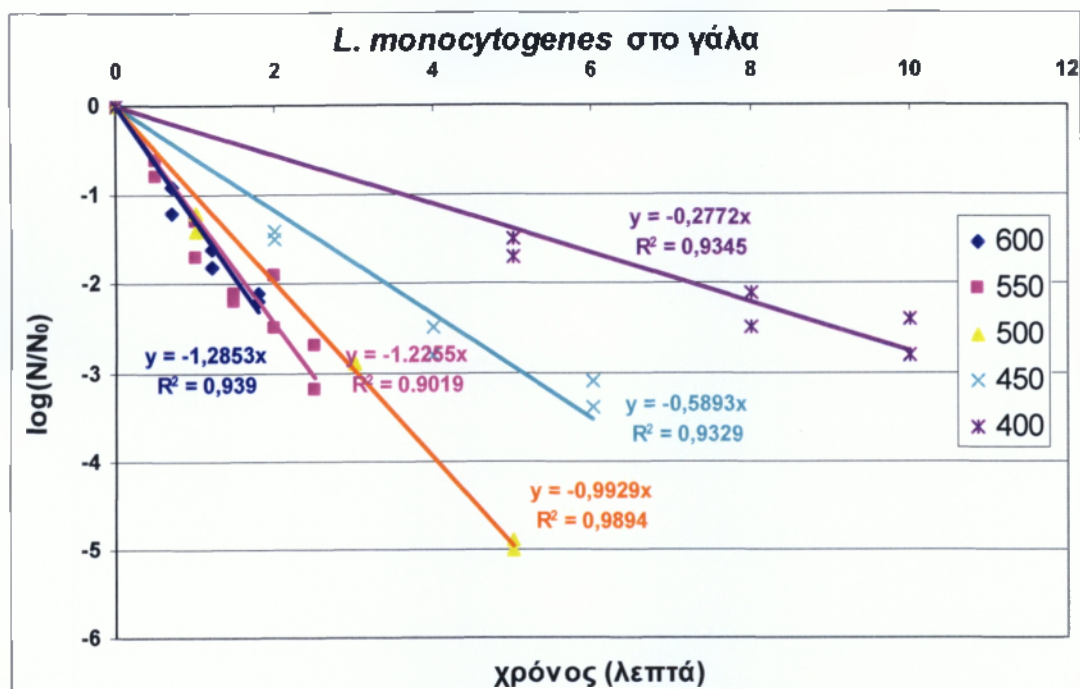
Τα δείγματα στα οποία ο αριθμός των τελικά παρατηρούμενων αποικιών υπερέβαινε το 300 ή ήταν μικρότερος από 30 κρίθηκαν ως ακατάλληλα για την παρούσα μελέτη και δεν συμπεριλήφθηκαν στις μετρήσεις. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκε το φάσμα των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων των μικροοργανισμών μας.

Ο μικροοργανισμός θεωρείται πλήρως απενεργοποιημένος όταν μετά την καλλιέργειά του στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν δεν παρατηρείται ανάπτυξη καμίας αποικίας.

Στην περίπτωση μας δεν παρατηρήθηκε πλήρης θανάτωση του μικροοργανισμού (λόγω περιορισμού στο χρόνο επιβολής της υπερυψηλής πίεσης), αλλά για σχετικά μεγάλες τιμές πιέσεων (≥ 500 MPa για τη *Listeria Monocytogenes* και ≥ 450 MPa για τη *Salmonella Enteritidis*) η συγκέντρωση του μικροοργανισμού ήταν εξαιρετικά μικρή, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με ήδη υπάρχουσες μελέτες. [17]

Ο λόγος επιλογής του συγκεκριμένου χρονικού πλαισίου εφαρμογής της μεθόδου ήταν το γεγονός ότι κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διευκρίνιση του τρόπου και της ταχύτητας απόκρισης των μικροοργανισμών στην επιβολή υπερυψηλής πίεσης, η μοντελοποίηση της συμπεριφοράς αυτής και ο εντοπισμός πιθανών παρεκλίσεων από τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

3.3.1 *Listeria monocytogenes*



Σχήμα 1: Γραφική απεικόνιση της λογαριθμικής μείωσης της τελικής προς την αρχική συγκέντρωσης ($\log[N/N_0]$) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής υπερηχηλής πίεσης σε *mip* για ένα εύρος πέντε πιέσεων.

Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της επιβαλλόμενης πίεσης από 400 έως 600 MPa ο ρυθμός μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού αυξάνεται. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι για πιέσεις 550 και 600 MPa ο ρυθμός θανάτωσης των μικροοργανισμών ο οποίος εκφράζεται με την κλίση της γραφικής παράστασης $\log[N/N_0] = f(t)$ δεν μεταβάλλεται σημαντικά, ενώ για μικρότερες πιέσεις παρατηρείται σαφής αύξησή του με άνοδο της επιβαλλόμενης πίεσης.

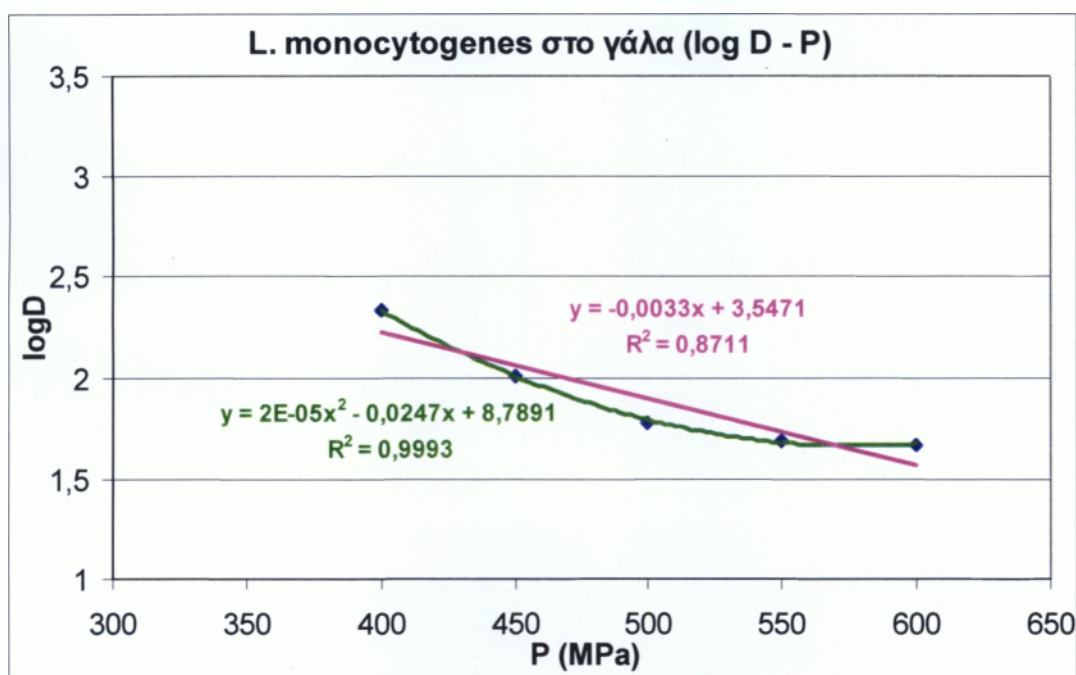
Πρακτικά δηλαδή η συμπεριφορά της *Listeria monocytogenes* φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά στο εύρος πιέσεων μεταξύ 550 και 600 MPa. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι παράγοντες εξαρτώμενοι σε μικρότερο βαθμό από την εξωτερική πίεση υπεισέρχονται στην αντίσταση του μικροοργανισμού και τη διατήρησή του και στις δύο πιέσεις για συγκρίσιμα χρονικά διαστήματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Oxen και Knorr (1993) έδειξαν ότι μείωση της ενεργότητας του ύδατος a_w οδηγούσε σε μια σημαντική μείωση της ταχύτητας αδρανοποίησης μικροβίων τα οποία αιωρούντο σε τρόφιμο.

Η μείωση δηλαδή της a_w φαίνεται ότι προστατεύει τα μικρόβια από την αδρανοποίηση με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (ΥΥΠ). Αναμένεται βεβαίως ότι τα μικρόβια πρέπει να βλάπτονται από την ΥΥΠ και η ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων πρέπει να αναστέλεται από την μειωμένη a_w .

Στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes*, που εξετάζεται εδώ, η αντίσταση στην αδρανοποίηση που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί σε πιέσεις άνω των 550 MPa θα μπορούσε να αποδοθεί σε μείωση της ενεργότητας του ύδατος που περιέχουν τα ίδια λόγω αποβολής οξυγόνου από τον όγκο τους. Η συμπεριφορά αυτή ήταν επαναλήψιμη για διαφορετικές καλλιέργειες στις ίδιες πιέσεις, η υπόθεση όμως για την επίδραση αυτή του a_w χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Ritz et al. (2001) απέδειξαν ότι η φυσιολογική φθορά των κυττάρων της *Listeria monocytogenes* κάτω από συνθήκες υπερυψηλής πίεσης δεν είναι ομογενής, αλλά κάποια ανθεκτικά στην πίεση κύτταρα συνεχίζουν να επιβιώνουν στον βακτηριακό πληθυσμό. [1]



Σχήμα 2: Γραφική απεικόνιση του λογάριθμου του χρόνου υποδεκαπλασιασμού ($\log[D]$) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει της εφαρμοζόμενης τιμής υπερυψηλής πίεσης σε MPa. Η εξίσωση που ικανοποιούν οι πειραματικές τιμές έχει προσεγγιστεί με δύο διαφορετικές μεθόδους ώστε να καταδειχθεί η μέθοδος με τη μικρότερη στατιστική απόκλιση και τη μεγαλύτερη ακρίβεια. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει μία γραμμική προσέγγιση των πειραματικών αποτελεσμάτων, ενώ

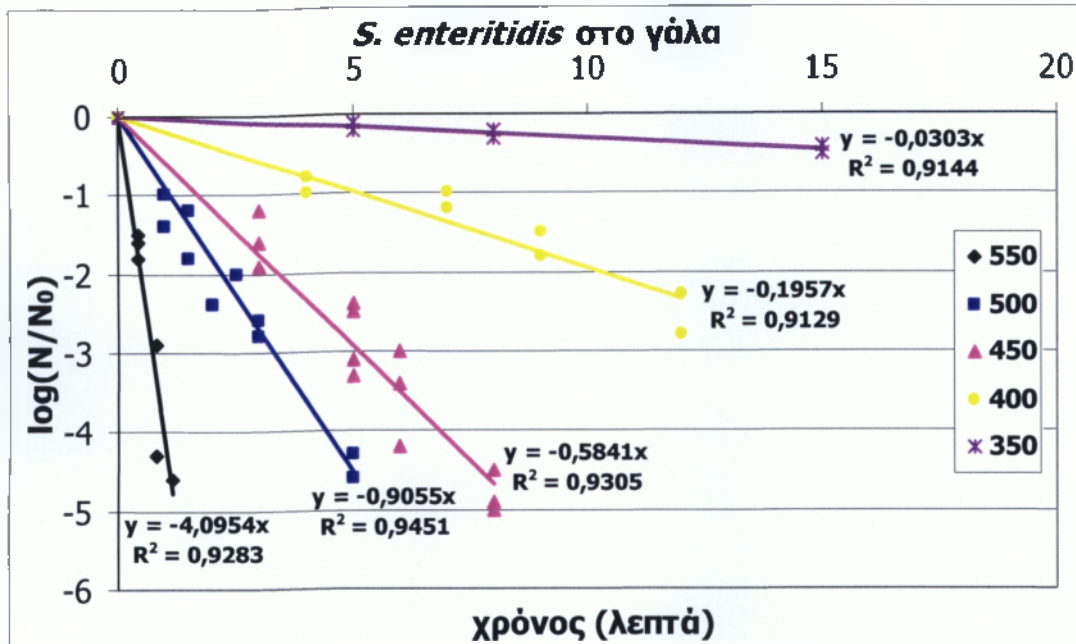
για το πράσινο χρώμα εφαρμόζεται εναλλακτικά μία προσέγγιση πολυωνυμικού τύπου 2^{ου} βαθμού.

Παρατηρείται με το πράσινο χρώμα στο Σχήμα 2 ότι ο λογάριθμος του χρόνου υποδεκαπλασιασμού συναρτήσει της επιβαλλόμενης πίεσης προσεγγίζεται αποδοτικότερα με μία συνάρτηση πολυωνυμικού τύπου δεύτερης τάξης.

Αυτό γίνεται εμφανές μέσω της σύγκρισης του μέσου στατιστικού σφάλματος (R^2) το οποίο είναι επιθυμητό να προσεγγίζει την τιμή 1, μια τιμή η οποία υποδηλώνει ομοιόμορφη κατανομή των πειραματικών σημείων μας γύρω από την αντιπροσωπευτική τους καμπύλη. Βλέπουμε δηλαδή ότι για μια γραμμική προσέγγιση (βλ. κόκκινη καμπύλη στο Σχήμα 2) το μέσο στατιστικό σφάλμα αποκλίνει από την τιμή 1 κατά 0,1282 μονάδες περισσότερο από ότι κατά την χρησιμοποιούμενη πολυωνυμική προσέγγιση (βλ. πράσινη καμπύλη στο Σχήμα 2).

Επίσης γίνεται κι εδώ εμφανές ότι μετά την κρίσιμη πίεση των 550 MPa δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στον ρυθμό θανάτωσης των μικροοργανισμών, εφόσον το $\log(D)$ παραμένει περίπου σταθερό.

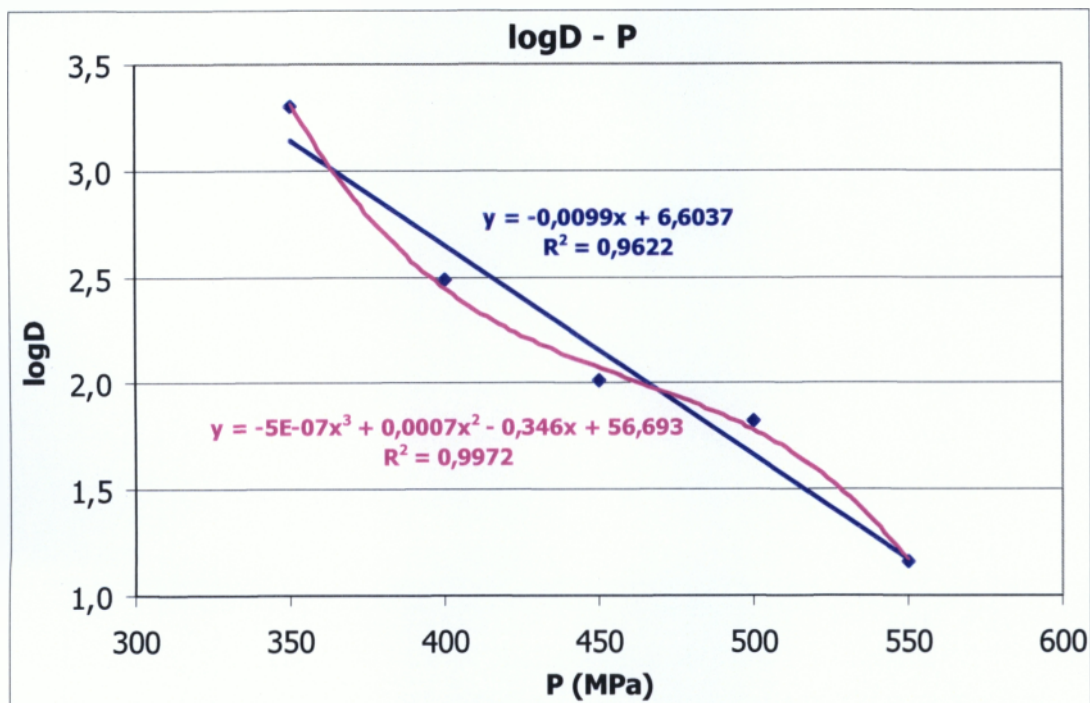
3.3.2 *Salmonella* Enteritidis



Σχήμα 3: Γραφική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης τελικής προς αρχική συγκέντρωση ($\log[N/N_0]$) του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* συναρτήσεως του χρόνου εφαρμογής υπερηχηλής πίεσης σε *min* για ένα εύρος πέντε πιέσεων.

Σε αναλογία με την περίπτωση της *L. monocytogenes* παρατηρείται και για τον μικροοργανισμό *Salmonella* Enteritidis μία γραμμική μείωση του λογαρίθμου της σχετικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού με την πάροδο του χρόνου και με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (βλ. καμπύλες Σχήματος 3).

Με αύξηση της επιβαλλόμενης πίεσης από 400 έως 550 MPa ο ρυθμός μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού ($\log(N/N_0)$) αυξάνεται. Σε αντιδιαστολή με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* ο προαναφερθής ο ρυθμός μείωσης, ο οποίος εκφράζεται από την κλίση της γραφικής παράστασης $\log(N/N_0) = f(t)$, αυξάνεται σταδιακά και ευδιάκριτα για αυξανόμενες πιέσεις.



Σχήμα 4: Γραφική απεικόνιση του λογάριθμου του χρόνου υποδεκαπλασιασμού ($\log[D]$) του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* συναρτήσει της εφαρμοζόμενης τιμής υπερηχητικής πίεσης σε MPa. Η εξίσωση που ικανοποιούν οι πειραματικές τιμές έχει προσεγγιστεί με δύο διαφορετικές μεθόδους ώστε να καταδειχθεί η μέθοδος με τη μικρότερη στατιστική απόκλιση και τη μεγαλύτερη ακρίβεια. Το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει μία γραμμική προσέγγιση των πειραματικών αποτελεσμάτων, ενώ για το κόκκινο χρώμα εφαρμόζεται εναλλακτικά μία προσέγγιση πολυωνυμικού τύπου 3^{ου} βαθμού.

Όσον αφορά τον χρόνο υποδεκαπλασιασμού, παρατηρείται στο σχήμα 4 ότι ο λογάριθμός του συναρτήσει της επιβαλλόμενης πίεσης προσεγγίζεται αποδοτικότερα με μία συνάρτηση πολυωνυμικού τύπου τρίτης τάξης. Αυτό γίνεται εμφανές μέσω της σύγκρισης του μέσου στατιστικού σφάλματος (R^2) το οποίο είναι επιθυμητό να προσεγγίζει την τιμή 1, μια τιμή η οποία υποδηλώνει ομοιόμορφη κατανομή των πειραματικών σημείων μας γύρω από την αντιπροσωπευτική τους καμπύλη. Βλέπουμε δηλαδή ότι για μια γραμμική προσέγγιση το μέσο στατιστικό σφάλμα αποκλίνει από την τιμή 1 κατά 0,0250 μονάδες περισσότερο από ότι κατά την χρησιμοποιούμενη πολυωνυμική προσέγγιση.

Μία σύγκριση της κινητικής απενεργοποίησης των δύο μικροοργανισμών, *S. enteritidis* και *L. monocytogenes*, μπορεί να πραγματοποιηθεί με σύγκριση των

λογαριθμικών γραμμικών καμπυλών $\log[N/N_0] = f(t)$ για τις διάφορες εφαρμοζόμενες πιέσεις. Αναφέρεται ενδεικτικά ότι σε μια μέση πίεση των 500 MPa φαίνεται ότι ο χρόνος για μια απενεργοποίηση πληθυσμού της τάξεως των 5log μονάδων είναι ελαφρά μεγαλύτερος για την περίπτωση της *S. enteritidis*, στην περίπτωση όμως μιας πίεσεως της τάξης των 550 MPa είναι εμφανές ότι ο χρόνος απενεργοποίησης του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis* για μια μείωση της τάξεως των 5log μονάδων είναι δραματικά μικρότερη του αντίστοιχου χρόνου απενεργοποίησης για τη *L. monocytogenes*. Αυτή η προσέγγιση χρόνων απενεργοποίησης που αναφέρεται είναι μια μέθοδος σύγκρισης καλής πιστότητας μιας και οι μεταβολές είναι γραμμικές. [15]

3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπερασματικά η μελέτη της συμπεριφοράς των δυο παθογόνων μικροοργανισμών *S. enteritidis* και *L. monocytogenes* υπό την εφαρμογή ΥΥΠ στο γάλα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος ενδείκνυται για εφαρμογές στον τόσο ευαίσθητο τομέα της επεξεργασίας των τροφίμων.

Τα αποτελέσματα που διεξάγονται είναι τόσο επαναλήψιμα όσο και ενθαρρυντικά για την απενεργοποίηση των παθογόνων αυτών μικροοργανισμών και μάλιστα η διαδικασία μπορεί να γίνει αρκετά σύντομη ανάλογα με το maximum της πίεσης που τεχνικά μπορεί να επιτευχθεί στις εκάστοτε εγκαταστάσεις.

Βεβαίως είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι, όπως προκύπτει στην περίπτωση της *L. monocytogenes*, πιέσεις υψηλότερες των 500 MPa χρίζουν κάποιας προσοχής ως προς την αποτελεσματικότητα τους συναρτήσει του χρόνου επιβολής, καθώς ο μικροοργανισμός ενδέχεται να εμφανίσει ένα είδος αδράνειας ως προς την απόκρισή του στην υπερηχηλή πίεση.

Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την πειραματικά επιβεβαιωμένη παρατήρηση ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ο παράγοντας χρόνος επηρεάζει το βαθμό απενεργοποίησης ορισμένων μικροοργανισμών πολύ πιο δραστικά από ότι η ίδια η πίεση. [16]

Είναι δηλαδή θεμιτό να επιλέγεται το κατάλληλο εύρος πιέσεων για τον εκάστοτε οργανισμό σε κόστος ίσως χρόνου και κατανάλωσης ενέργειας, το οποίο

όμως θα μας δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα και θα διασφαλίσει την ποιότητα του προϊόντος μας και την υγεία του καταναλωτικού κοινού.

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 2: Συντελεστές μοντελοποίησης της αδρανοποίησης των 2 παθογόνων.

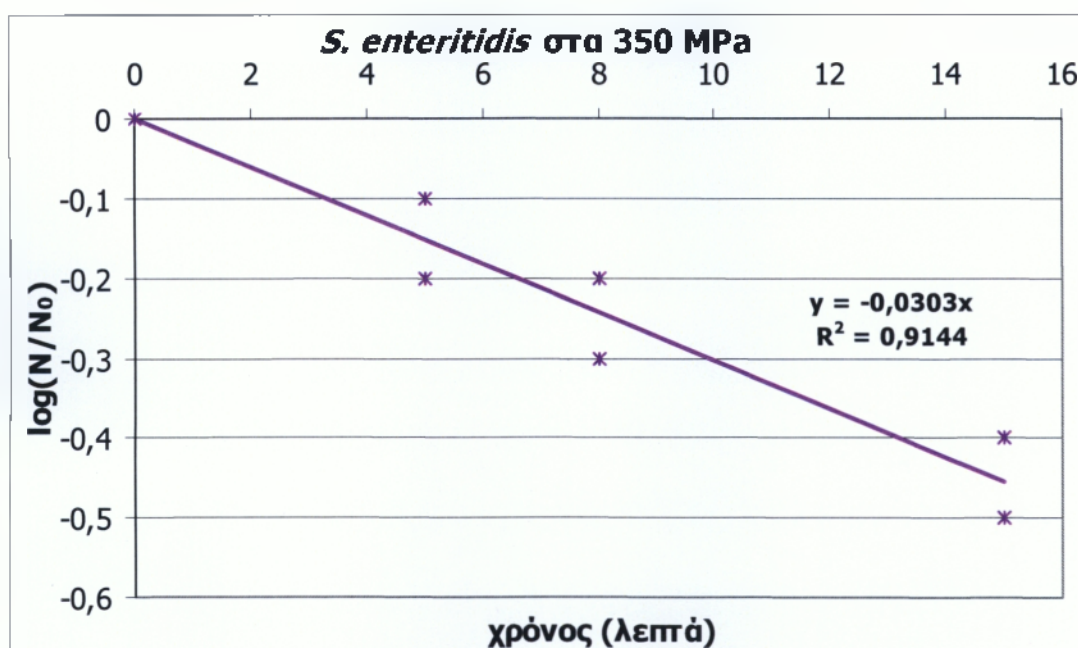
P (MPa)	Listeria				Salmonella			
	LRM ¹	R ²	D(min)	logD(sec)	LRM ¹	R ²	D(min)	logD(sec)
600	$y = -1.2853x$	0,939	0,78	1,669				
550	$y = -1.2255x$	0,901	0,82	1,689	$y = -4.0954x$	0,928	0,24	1,158
500	$y = -0.9929x$	0,989	1,01	1,781	$y = -0.9055x$	0,945	1,10	1,819
450	$y = -0.5893x$	0,932	1,70	2,007	$y = -0.5841x$	0,930	1,71	2,011
400	$y = -0.2772x$	0,934	3,61	2,335	$y = -0.1957x$	0,912	5,11	2,486
350					$y = -0.0303x$	0,914	33,00	3,296

¹ LRM = Linear Regression Model (Μοντέλο Γραμμικής Παλινδρόμησης)

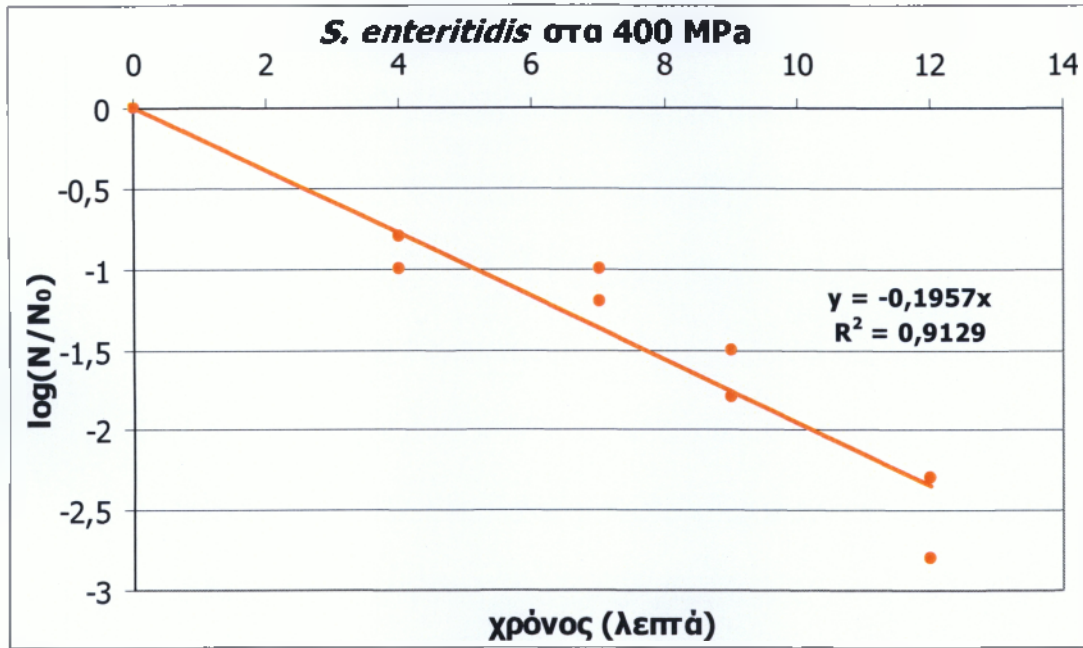
Στον πίνακα 1, παρατηρούμε ότι ο χρόνος αδρανοποίησης (D[min]) των 2 παθογόνων μικροοργανισμών που μελετήσαμε διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι κατά την εφαρμογή ακριβώς ίδιων πιέσεων, στις πιέσεις με μικρότερη ισχύ (400, 450, 500 MPa), η αντοχή της *Salmonella* Enteritidis είναι μεγαλύτερη από ότι είναι της *Listeria monocytogenes*. Ενώ κατά την εφαρμογή πιέσεων μεγαλύτερης ισχύος (550, 600 MPa), παρατηρούμε ότι τα δεδομένα αλλάζουν και η *Listeria monocytogenes* αποκτά σημαντικά μεγαλύτερη αντοχή στην υπερυψηλή πίεση σε σχέση με την *Salmonella* Enteritidis. Αυτό σημαίνει ότι ο χρόνος αδρανοποίησης (D[min]) της *Listeria monocytogenes* επέρχεται μέχρι ένα συγκεκριμένο εύρος πιέσεων (περίπου 550 MPa) και από εκεί και πέρα δεν παρατηρείται σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του μικροοργανισμού. Παράλληλα παρατηρούμε ότι η επίδραση πιέσεων μεγαλύτερης ισχύος (>500MPa) στη *Salmonella* Enteritidis επιφέρουν σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του μικροοργανισμού σε σχέση με τη *L. monocytogenes*.

4.1 *Salmonella* Enteritidis

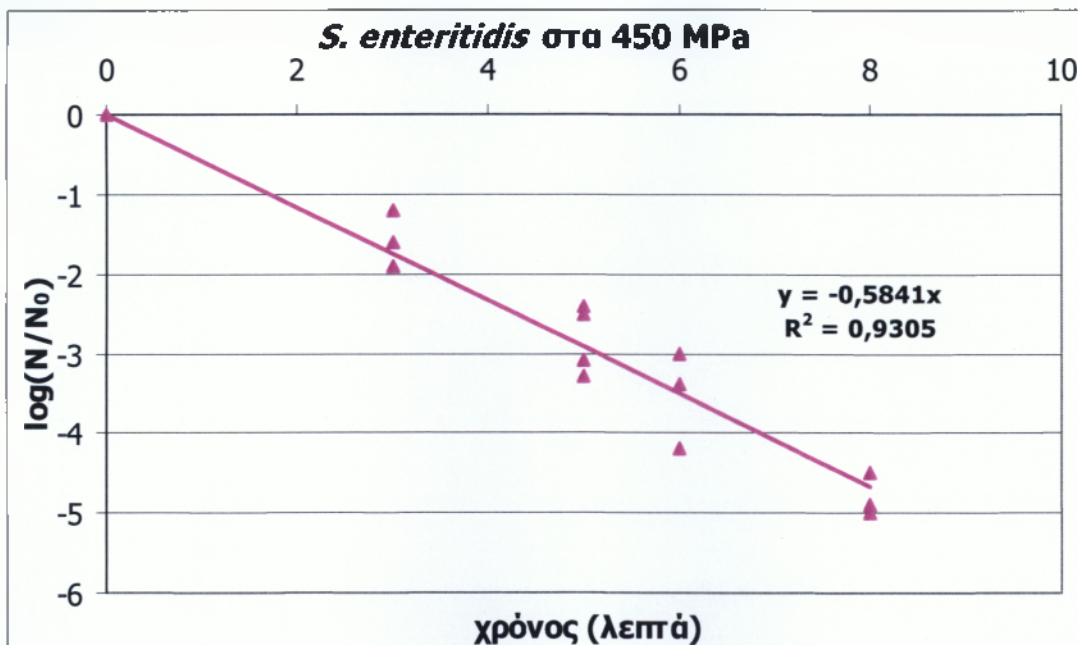
Στα σχήματα 1 έως 5 παρουσιάζονται οι καμπύλες αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis ξεχωριστά για κάθε εφαρμογή πίεσης. Στα γραφήματα αυτά φαίνεται επίσης και η γραμμή τάσης που εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης το οποίο εφαρμόζει καλύτερα στα δεδομένα μας. Μαζί με την γραμμική εξίσωση παρουσιάζεται και η αξιοπιστία του μοντέλου σύμφωνα με τον στατιστικό όρο R^2 .



Σχήμα 1 : Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis σε πίεση 350 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.

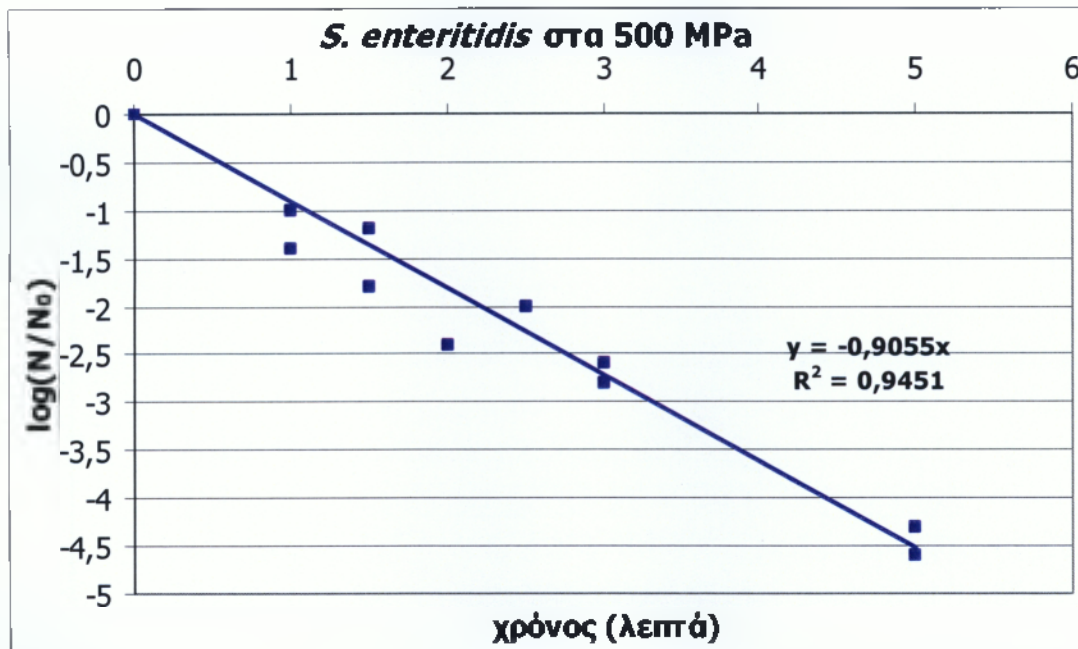


Σχήμα 2: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis σε πίεση 400 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.

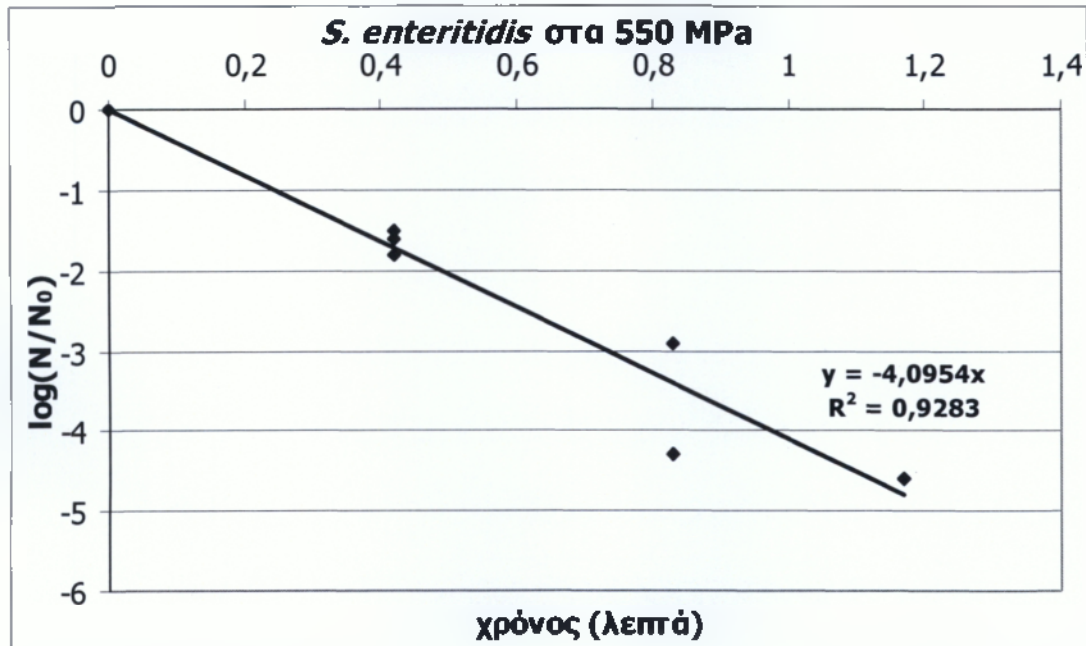


Σχήμα 3: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis σε πίεση 450 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο

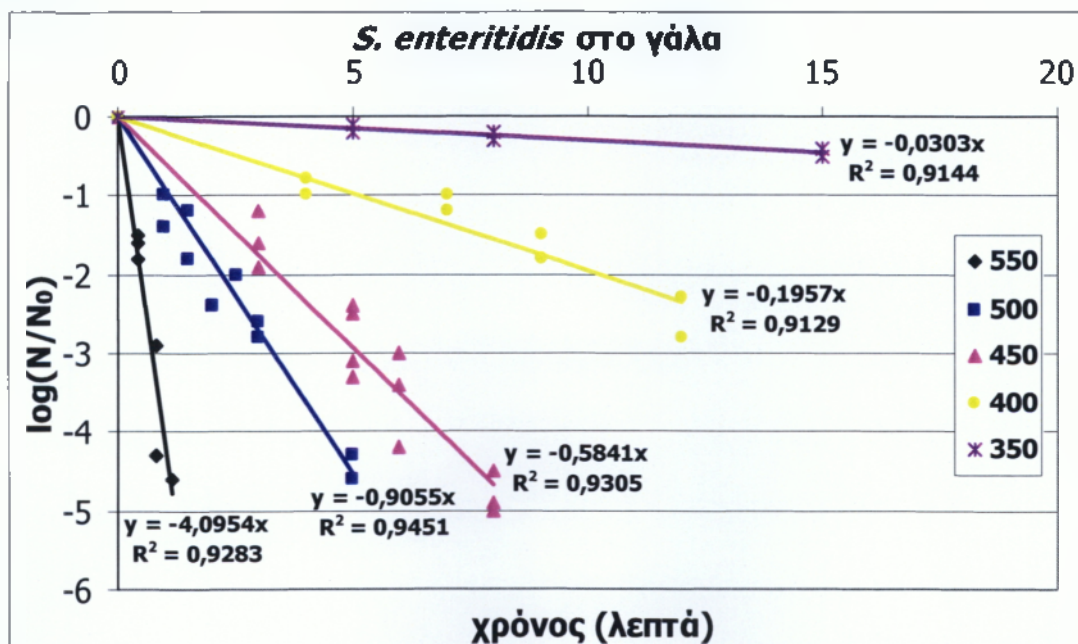
παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



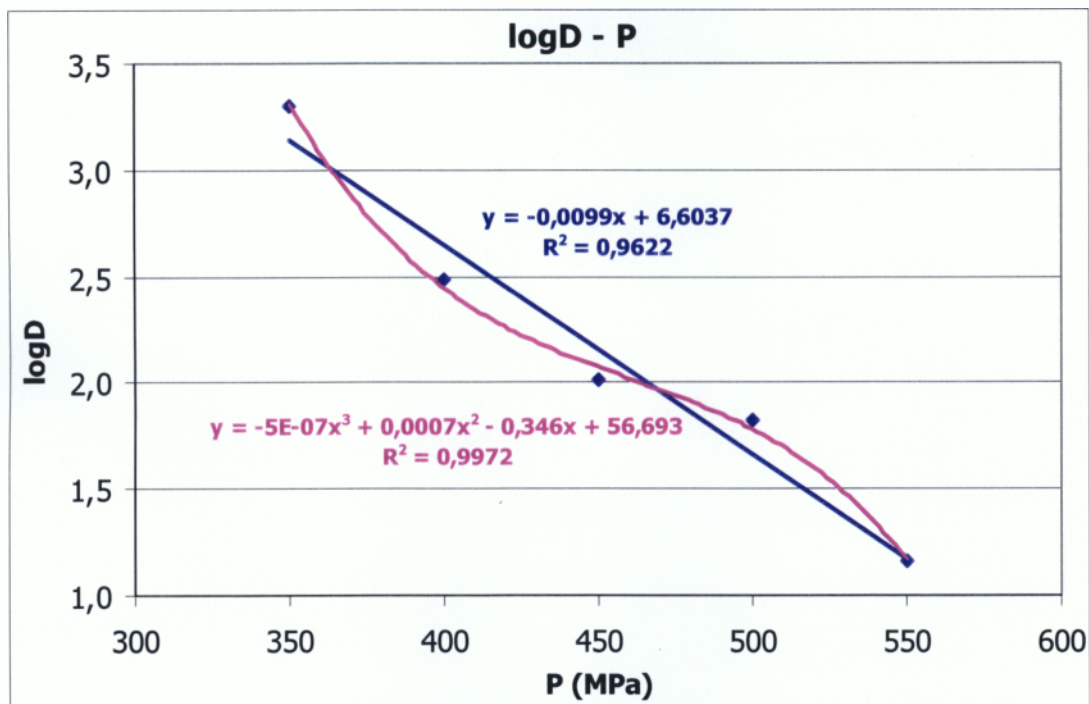
Σχήμα 4: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis σε πίεση 500 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



Σχήμα 5: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis σε πίεση 550 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



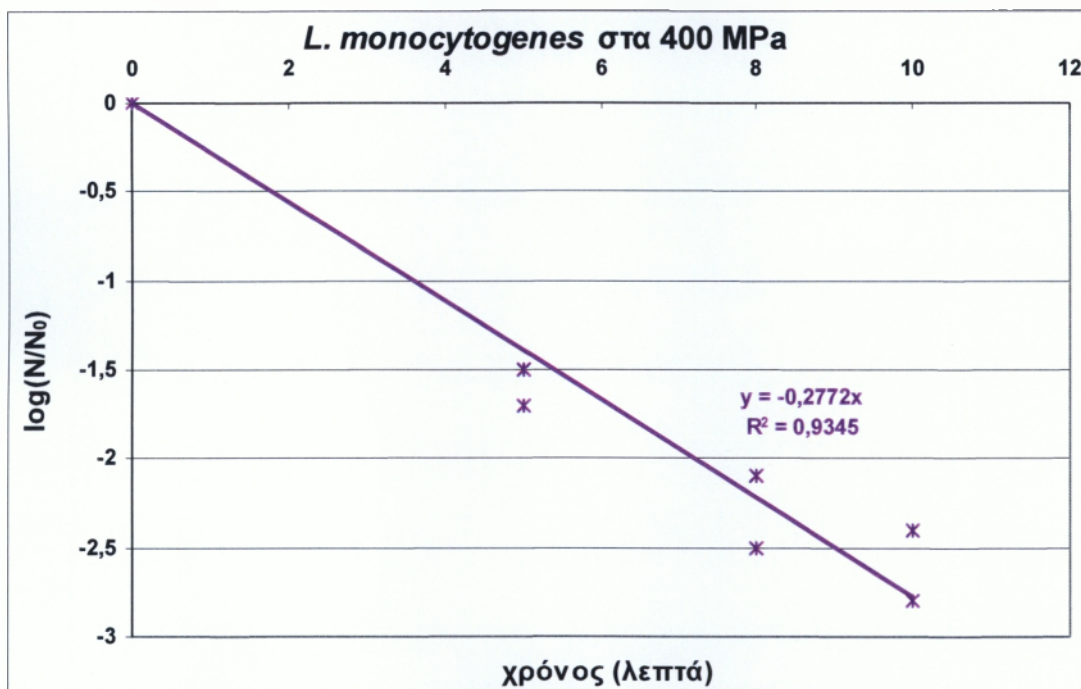
Σχήμα 6: Γραφική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης τελικής προς αρχική συγκέντρωση ($\log[N/N_0]$) του μικροοργανισμού *Salmonella* Enteritidis συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής υπερηχηλής πίεσης σε mlm για ένα εύρος πέντε πιέσεων.



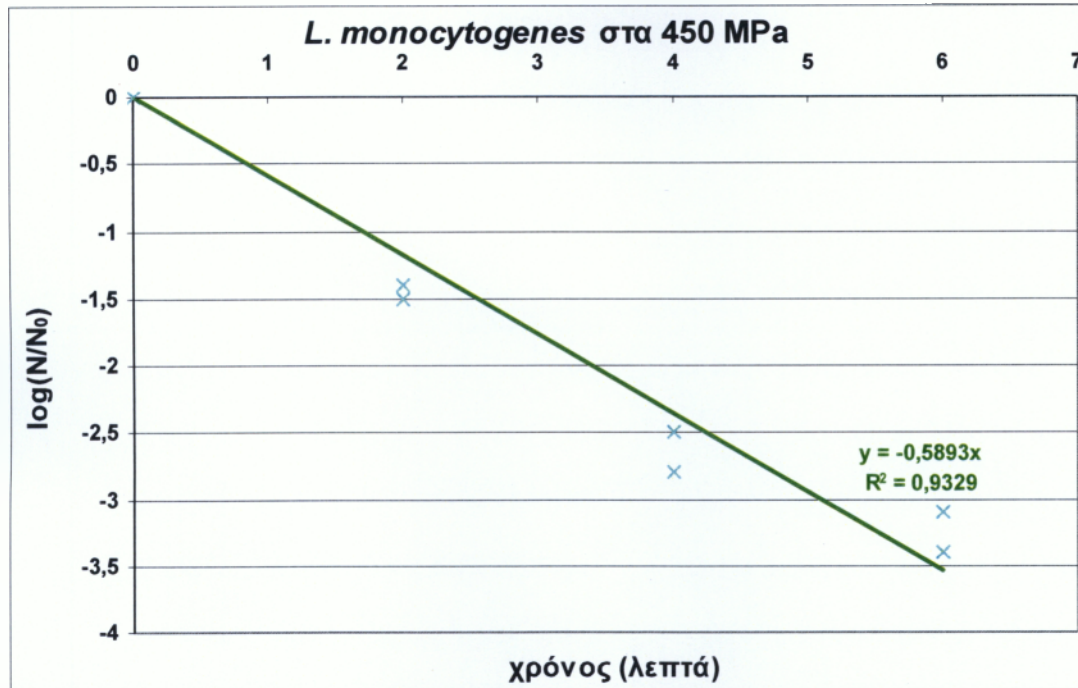
Σχήμα 7: Γραφική απεικόνιση του λογάριθμου του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (log[D]) του μικροοργανισμού *Salmonella Enteritidis* συναρτήσει της εφαρμοζόμενης τιμής υπερηχητικής πίεσης σε MPa.

4.2 *Listeria monocytogenes*

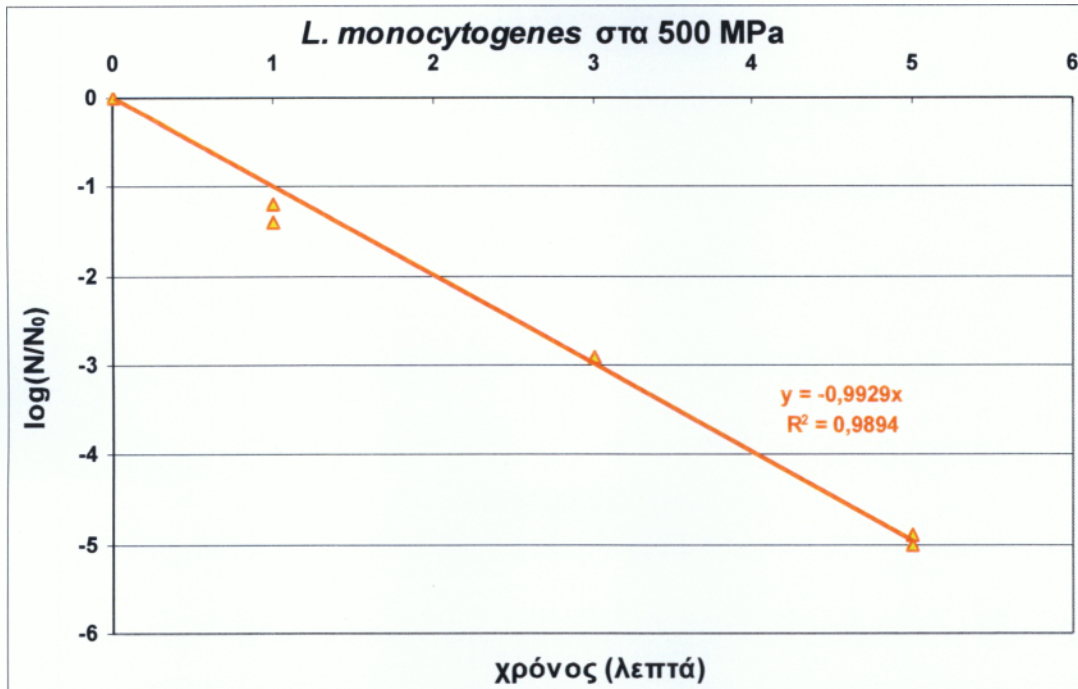
Στα σχήματα 1 έως 5 παρουσιάζονται οι καμπύλες αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria Monocytogenes* ξεχωριστά για κάθε εφαρμογή πίεσης. Στα γραφήματα αυτά φαίνεται επίσης και η γραμμή τάσης που εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης το οποίο εφαρμόζει καλύτερα στα δεδομένα μας. Μαζί με την γραμμική εξίσωση παρουσιάζεται και η αξιοπιστία του μοντέλου σύμφωνα με τον στατιστικό όρο R^2 .



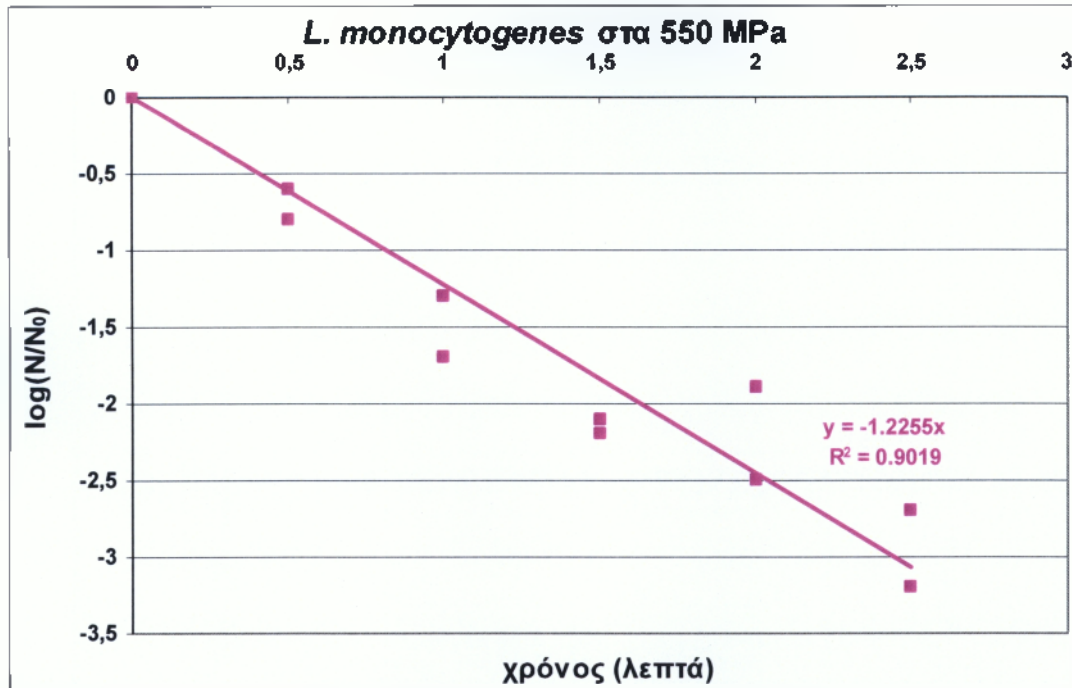
Σχήμα 1: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε πίεση 400 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



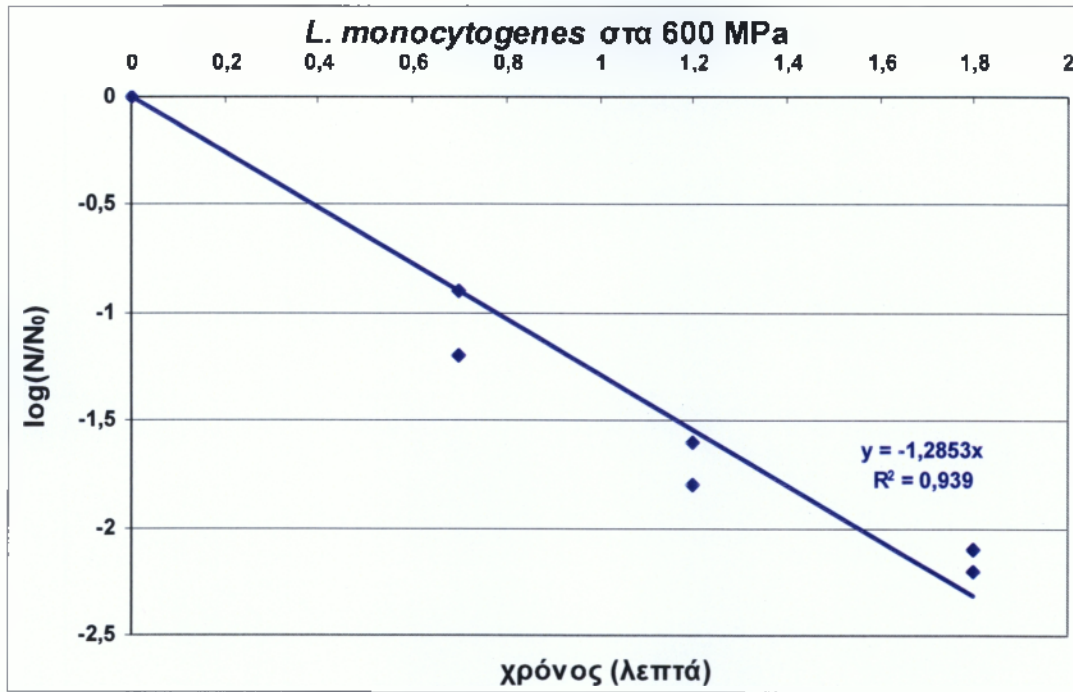
Σχήμα 2: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε πίεση 450 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



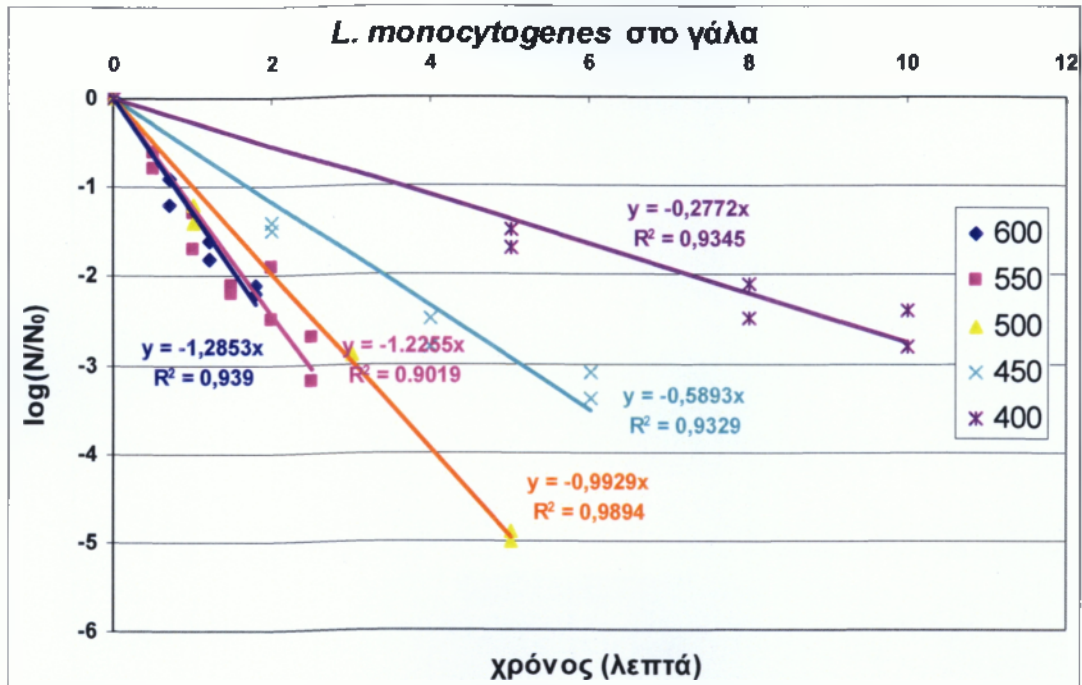
Σχήμα 3: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε πίεση 500 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



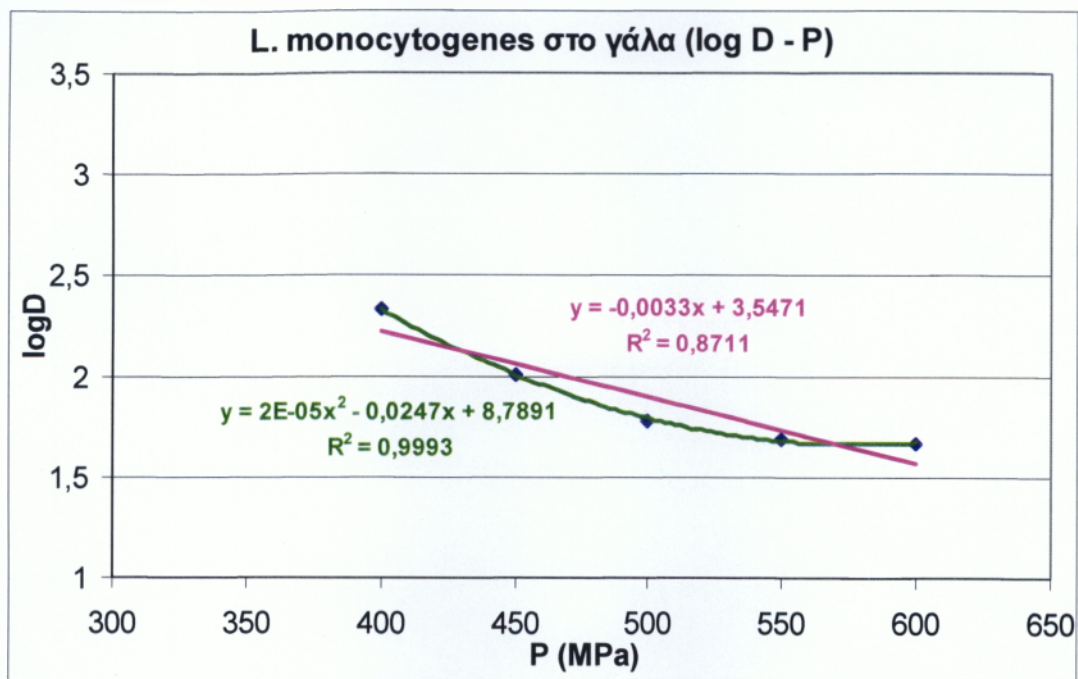
Σχήμα 4: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε πίεση 550 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



Σχήμα 5: Καμπύλη αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε πίεση 600 MPa. Σημειώνεται η γραμμή τάσης η οποία εκφράζει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης και προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα μας.



Σχήμα 6: Γραφική απεικόνιση λογαριθμικής μείωσης τελικής προς αρχική συγκέντρωση ($\log[N/N_0]$) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής υπερηχητικής πίεσης σε milk για ένα εύρος πέντε πιέσεων.



Σχήμα 7: Γραφική απεικόνιση του λογάριθμου του χρόνου υποδεκαπλασιασμού ($\log[D]$) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει της εφαρμοζόμενης τιμής υπερηχητικής πίεσης σε MPa.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Ritz, M.F. Pilet, F. Jugiau, F. Rama and M. Federighi, *Inactivation of Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress*, Letters in Applied Microbiology, ISSN 0266-8254, 17 November 2005.
- [2] Michelle K. Bull, Melinda M. Hayman, Cynthia M. Stewart, Elizabeth A. Szabo, Stephen J. Knabel, *Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery on Listeria monocytogenes following high pressure processing of milk*, Science Direct, International Journal of Food Microbiology, www.sciencedirect.com, October 2004.
- [3] Π. Κοτζεκίδου – Ρούκα, *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη 1993
- [4] *Encyclopedia of Food Microbiology*, volume three, edited by Richard and Robinson, Carl A. Batt, Prapid D. Patel, 2000 by Academic Press.
- [5] George J. Banwart, *Basic food microbiology*, second edition, άνευ ονόματος εκδότη.
- [6] <http://www.food-info.net/gr/qa/listeria.htm>
- [7] <http://www.food-info.net/uk/bact/limon.htm>, Overview of food-borne bacteria, *Listeria monocytogenes*
- [8] *Encyclopedia of Food Microbiology*, volume two, edited by Richard and Robinson, Carl A. Batt, Prapid D. Patel, 2000 by Academic Press.
- [9] Γιώργος Μπαλατσούρας, *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2006.
- [10] Grahame W. Gould, *The Evolution of High Pressure Processing of Foods*, 1989.
- [11] Ιωάννη Γ. Μπλούκα, *Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα 2004.
- [12] Ευάγγελος Λάζος Dr, *Σημειώσεις Επεξεργασίας Τροφίμων 2*, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα 2002

- [13] [http://www.mednutrition.gr/content/view/818/147/θρεπτική αξία του γάλακτος](http://www.mednutrition.gr/content/view/818/147/θρεπτική_αξία_του_γάλακτος), Παπαχρήστος Παρασκευάς, Χονδρογιάννη Μαρία, Δεκέμβριος 2007
- [14]http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/ILCA_Manual4/Microbiology.htm#P122_10360 milk microbiology, milk pasteurization, Rural dairy technology, Frank O'Mahony, Dairy Technology Unit, International Livestock Centre for Africa, First published in March 1988, Designed and printed Typeset on Linotype CRTronic 360.
- [15] Melinda M.Hayman, Ramaswamy C.Anantheswaram, Stephen J.Knabel, *International Journal of Food Microbiology* **115**, 220-226, 2007.
- [16] Josep Yuste, Marta Capellas, Daniel Y.C.Fung, Montserrat Mor-Mur, *Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method*, *Food Research International* **37** (2004)861.866, 6 May 2004.