

ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ *BACILLUS COAGULANS* ΚΑΙ *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

ΚΑΡΑΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΣΟΦΙΑ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2008

## Ευχαριστίες

Η παραπάνω πτυχιακή διατριβή έλαβε χώρα στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. υπό την επίβλεψη του ερευνητή κ. Σαμαρά Φώτη. Η συμβολή του στην καθοδήγηση και ολοκλήρωση της εργασίας ήταν πολύ σημαντική. Θέλω να τον ευχαριστήσω επίσης για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου να αναλάβω μια πειραματική μελέτη στο εργαστήριό του.

Ακόμα ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Παντελή Νατσκούλη χωρίς τη βοήθεια του οποίου η επίτευξη αυτής της πτυχιακής μελέτης θα ήταν αδύνατη. Η συνεργασία μας ήταν καθοριστική καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας μελέτης, όπως και η εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου και η πολύτιμη συμβουλευτική του καθοδήγηση.

Επίσης, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων για τη σημαντική συμβολή τους την πραγμάτωση αυτής της μελέτης. Το κλίμα εντός του εργαστηρίου ήταν ιδιαίτερα φιλικό που με βοήθησε στην ήρεμη και αποδοτική πραγμάτωση του πειραματικού έργου.

Η Καθηγήτριά μου κα Παπαδέλλη Μαρίνα αποτέλεσε επίσης πολύτιμο συνεργάτη και σύμβουλό μου κατά τη διάρκεια της συγγραφής και διόρθωσης της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ, τέλος, την οικογένεια μου για την ψυχολογική υποστήριξη και την υπομονή τους μέχρι την κατάθεση και παρουσίαση της παρούσας μελέτης.

## Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	σελ 4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ 5
1.1. Θερμικές επεξεργασίες.....	σελ 5
1.1.1. Παστερίωση.....	σελ 5
1.1.2. Αποστείρωση.....	σελ 5
1.2. Σπορογόνα βακτήρια.....	σελ 6
1.2.1. <i>Bacillus</i> spp.....	σελ 7
1.2.2. <i>Clostridium</i> spp.....	σελ 8
1.3. Βακτηριακά ενδοσπόρια.....	σελ 9
1.3.1. Σχηματισμός σπορίων.....	σελ 10
1.3.2. Δομή ενδοσπορίων.....	σελ 12
1.4. Θερμοανθεκτικότητα.....	σελ 13
1.4.1. Θερμοανθεκτικότητα των βλαστικών κυττάρων.....	σελ 13
1.4.2. Θερμοανθεκτικότητα ενδοσπορίων.....	σελ 14
1.5. Βασικοί ορισμοί για τη θερμική καταστροφή των μικροοργανισμών...σελ 21	
1.6. Μοντέλο Baranyi.....	σελ 22
1.6.1. Εφαρμογές του μοντέλου Baranyi.....	σελ 24
1.7. Οι μικροοργανισμοί <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> και <i>Bacillus coagulans</i>	
1.7.1. <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	σελ 25
1.7.1.1. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	σελ 25
1.7.1.2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	σελ 26
1.7.2. <i>Bacillus</i> spp.....	σελ 27
1.7.2.1. <i>Bacillus coagulans</i> .....	σελ 28
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	σελ 30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ 31

3.1. Υλικά.....	σελ 31
3.2. Αναλυτική περιγραφή μεθοδολογίας.....	σελ 31
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....</b>	<b>σελ 36</b>
4.1. Αποτελέσματα για τον <i>Alicyclobacillus acidoterresris</i> .....	σελ 36
4.2. Αποτελέσματα για τον <i>Bacillus coagulans</i> .....	σελ 44
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>σελ 51</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>σελ 53</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα σπορογόνα βακτήρια και τα ενδοσπόρια τους είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη Μικροβιολογία και γενικότερα την Τεχνολογία Τροφίμων, γιατί η ύπαρξή τους συχνά δημιουργεί πολλά προβλήματα στην κονσερβοποίηση των τροφίμων, που μεταφράζονται σε τεράστιες οικονομικές ζημιές. Τα ενδοσπόρια των βακτηρίων χρησιμοποιούνται για την ενδελεχή μελέτη της συμπεριφοράς των σπορογόνων φθοροποιών παραγόντων έναντι της θερμότητας και για την τελειοποίηση τόσο του μηχανολογικού εξοπλισμού των κονσερβοποιείων όσο και των μεθόδων θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων, έτσι ώστε να μηδενισθεί πρακτικά ο κίνδυνος, είτε αλλοιώσεως των κονσερβών με μικρόβια, είτε της ρυπάνσεώς τους με θανατηφόρες για τον άνθρωπο τοξίνες.

Τα σπορογόνα βακτήρια λόγω της θερμοανθεκτικότητας των σπορίων τους και της ικανότητας ορισμένων από αυτά (π.χ.: *Clostridium* spp.) να αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες (μέσα στους μεταλλικούς περιέκτες) είναι τα κυριότερα αλλοιωγόνα αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις παθογόνα βακτήρια των κονσερβών. Έτσι είναι σημαντική για την κονσερβοποιεία η μελέτη των ιδιοτήτων αλλά και της συμπεριφοράς των σπορογόνων βακτηρίων.

Για τους προαναφερθέντες λόγους θεωρήθηκε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Στην εν λόγω εργασία μελετήθηκε η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων του *Bacillus coagulans* και του *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν οι 95, 98 και 100 °C για τον πρώτο και οι 100, 105 και 108 °C για τον δεύτερο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της καμπύλης θερμικού θανάτου των δύο μικροοργανισμών.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Θερμικές επεξεργασίες

Η χρήση των υψηλών θερμοκρασιών στη συντήρηση των τροφίμων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στηρίζεται στην ιδιότητα τους να καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς. Τα κυριότερα σχήματα θερμικής επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση των τροφίμων η παστερίωσης και η αποστείρωση.

### 1.1.1. Παστερίωση

Η παστερίωση είναι μια θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται για να περιορίζει τον μικροβιακό πληθυσμό σε ευαίσθητα στην θερμοκρασία προϊόντα όπως είναι το γάλα ή οι χυμοί φρούτων. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της είναι, είτε η καταστροφή των παθογόνων (π.χ. στο γάλα), είτε η μείωση ή / και καταστροφή των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (π.χ. στους χυμούς). Μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολλοί συνδυασμοί θερμοκρασίας / χρόνου θέρμανσης για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα αλλά οι συνηθέστεροι είναι οι: 63 °C / 30 min, 72 °C / 15 sec, 89 °C / 1 sec κ.α. (Jay 2005, Αρβανιτογιάννης 2001). Ονομάστηκε παστερίωση από τον Luis Pasteur, που ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε θέρμανση για να περιορίσει την αλλοίωση στο κρασί. Η παστερίωση δεν είναι συνώνυμη με την αποστείρωση γιατί δεν θανατώνονται όλοι οι μικροοργανισμοί. Αρχικά, την παστερίωση του γάλακτος την χρησιμοποιούσαν για να θανατώσουν τα παθογόνα βακτήρια, ειδικότερα τους μικροοργανισμούς που προκαλούσαν φυματίωση, βουρκέλωση, πυρετό Q και τυφοειδή πυρετό. Σήμερα, το γάλα σπάνια προέρχεται από μολυσμένες αγελάδες με παθογόνα και η παστερίωση χρησιμοποιείται κυρίως γιατί βελτιώνει τη διάρκεια αποθήκευσης του γάλακτος και των προϊόντων του (Brock et al. 2006).

### 1.1.2. Αποστείρωση

Η αποστείρωση έχει ως σκοπό την καταστροφή όλων των ειδών ζωντανών κυττάρων που βρίσκονται σε ένα τρόφιμο (βλαστικά κύτταρα και σπόρια). Τα συσκευασμένα σε κονσέρβα τρόφιμα πολλές φορές αποκαλούνται «εμπορικά αποστειρωμένα» τρόφιμα που σημαίνει απουσία ζωντανών κυττάρων (αυτά που καταμετρώνται με τη μέθοδο της καταμέτρησης σε στερεό θρεπτικό υλικό) ή παρουσία κάποιων

ζωντανών κυττάρων τα οποία όμως δεν μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα είτε λόγω χαμηλού πληθυσμού είτε λόγω των συνθηκών που επικρατούν στη κονσέρβα (pH, αλάτι κ.λπ.) ή κατά τη συντήρησή της (θερμοκρασία). Η θερμοκρασία αποστείρωσης είναι συνήθως στους 121°C για 15min αλλά τελευταία χρησιμοποιούνται νεότερες θερμικές επεξεργασίες όπως είναι η Αποστείρωση Υπερυψηλής Θερμοκρασίας (Ultra High Temperature, UHT) οι οποίες χρησιμοποιούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες επεξεργασίας, αλλά για πολύ μικρά χρονικά διαστήματα (π.χ.: 140-150°C / 1-5sec) (Jay 2005).

Βλαστικά κύτταρα και βακτηριακά ενδοσπόρια από τον ίδιο μικροοργανισμό ποικίλουν σημαντικά στην θερμοανθεκτικότητα. Στους 121°C τα ενδοσπόρια μπορεί να χρειάζονται 4-5 λεπτά για μια δεκαδική μείωση, ενώ τα βλαστικά κύτταρα μπορεί να χρειάζονται μόλις 0,1-0,5 λεπτά στους 65°C για την αντίστοιχη μείωση. Συνεπώς, ουσιαστικά, η θερμική αποστείρωση πρέπει να περιλαμβάνει διαδικασίες που να εξασφαλίζουν τη θανάτωση των ενδοσπορίων.

Η σύσταση του μέσου στο οποίο λαμβάνει χώρα η θερμική επεξεργασία επηρεάζει τη θανάτωση και των βλαστικών κυττάρων και των ενδοσπορίων. Ο μικροβιακός θάνατος είναι πιο γρήγορος σε όξινο pH και σε όξινα τρόφιμα όπως είναι η τομάτα, τα φρούτα, οι πίκλες, και έτσι είναι πολύ πιο εύκολο να αποστειρωθούν από τα τρόφιμα με ουδέτερο pH όπως το καλαμπόκι και τα φασολάκια. Χαμηλές συγκεντρώσεις σε ζάχαρη, πρωτεΐνες και λίπη μειώνει τη διείσδυση της θερμότητας και συνήθως αυξάνεται η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην θέρμανση. Αντίθετα, υψηλή συγκέντρωση σε αλάτι μπορεί είτε να αυξήσει είτε να μειώσει τη θερμοανθεκτικότητα, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Αφυδατωμένα κύτταρα (και σπόρια) είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα ενυδατωμένα. Επομένως, θερμική αποστείρωση των σπορίων, τα οποία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα νερού, απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες και περισσότερο χρόνο σε σχέση με τα βλαστικά κύτταρα. (Brock et al. 2006).

## **1.2. Σπορογόνα βακτήρια**

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των σπορογόνων βακτηρίων είναι ο σχηματισμός σπορίων στο εσωτερικό του κυττάρου τους ώστε να αντεπεξέρχονται μη ευνοϊκές καταστάσεις για την επιβίωσή τους. Τα σπόρια αυτά καλούνται ενδοσπόρια. Σε ακραίες συνθήκες όπως θέρμανση, ξήρανση, εφαρμογή αντισηπτικών ουσιών κ.ά.

όπου οι βλαστικές μορφές των κυττάρων δεν επιβιώνουν, τα ενδοσπόρια εμφανίζονται ιδιαίτερα ανθεκτικά.

Βακτήρια που παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο και ενδιαφέρουν την τεχνολογία και ασφάλεια των τροφίμων είναι τα γένη *Bacillus* και *Clostridium*. Χαρακτηριστικό τους είναι ο σχηματισμός ενδοσπορίου μέσα στο μητρικό κύτταρο, που θεωρείται ως «κοιμώμενο» (dormant cell), και είναι αυτό που τα διαχωρίζει από όλα τα άλλα βακτήρια, γνωστά ως «ασποριογόνα».

Τα σπορογόνα βακτήρια στα πρώτα στάδια αναπτύξεώς τους (μέχρι τη φάση της εκθετικής αύξησεως του αριθμού των κυττάρων) είναι θετικά κατά Gram. Στις μετέπειτα όμως φάσεις αναπτύξεως πολλά από αυτά εμφανίζονται αρνητικά ή ποικίλλοντας ως προς την χρώση Gram. Τα κύτταρα, σχεδόν στο σύνολό τους, κινούνται με βλεφαρίδες που είναι είτε περιτριχες είτε πλευρικής εκφύσεως. Δυνατόν όμως να είναι ορισμένα σπορογόνα βακτήρια ανάκανα για κίνηση.

Ο μεταβολισμός τους είναι είτε αυστηρά οξειδωτικός είτε αυστηρά ζυμωτικός. Υπάρχουν όμως όλες οι διαβαθμίσεις γιατί υπάρχουν μικροαερόφιλοι Βάκιλοι και Κλωστρίδια που ανέχονται μικροποσότητες οξυγόνου στο χώρο της αναπτύξεώς τους. Γενικά τα σπορογόνα βακτήρια δεν είναι δύστροπα στην ανάπτυξη τους, παρά το γεγονός ότι ορισμένα έχουν την ανάγκη από εξεζητημένους τροφικούς παράγοντες (αμινοξέα και βιταμίνες).

Το ενδιαίτημα των σπορογόνων βακτηρίων είναι κυρίως το έδαφος. Από εκεί βρίσκουν τον δρόμο τους προς τα τρόφιμα τα οποία αλλοιώνουν στα διάφορα στάδια της επεξεργασίας τους. Ορισμένα σπορογόνα είναι παθογόνα για τα έντομα και τα σπονδυλωτά. Στον άνθρωπο και τα ανώτερα ζώα προξενούν βαριές ασθένειες, είτε με τοξίνες τις οποίες εκκρίνουν, είτε με την εγκατάσταση και τον ταχύ πολλαπλασιασμό τους στους ιστούς και στο αίμα των ασθενών προξενώντας βακτηραιμία (Adams & Moss 1999, Μπαλατσούρας 2006).

### 1.2.1. *Bacillus* spp.

Τα κυριότερα αερόβια σπορογόνα βακτήρια που απαντώνται στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα είναι του γένους *Bacillus*. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα περισσότερα βακτήρια του γένους *Bacillus* είναι μεταξύ 28°C και 40°C εκτός μερικών εξαιρέσεων βακτηρίων αυτού του γένους που είναι θερμόφιλα και έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 55°C ενώ άλλα έχουν τους 70°C. Ορισμένα βακτήρια είναι



αυστηρά αερόβια ενώ άλλα είναι προαιρετικά αναερόβια. Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* προκαλούν αλλοιώσεις στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας γνωστή ως επίπεδη οξίνιση και συνήθως είναι είτε μεσόφιλα είτε προαιρετικά θερμοφιλα είτε αυστηρά θερμοφιλα. Τα μεσόφιλα δεν προκαλούν συχνά επίπεδη οξίνιση στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα για τον λόγο του ότι καταστρέφονται με την θερμική επεξεργασία. Τα σπόρια των θερμοφίλων ειδών είναι πιο θερμοανθεκτικά σε σχέση με τα προαναφερθέντα γιατί μπορούν και επιζούν ύστερα από την θερμική επεξεργασία. Οι πηγές μόλυνσης των κονσερβοποιημένων προϊόντων με βακτήρια που προκαλούν επίπεδη οξίνιση είναι τα μηχανήματα επεξεργασίας όπως η συσκευή που γίνεται η λεύκανση του προϊόντος, το έδαφος, η ζάχαρη και το άμυλο. Η σημαντικότερη αλλοίωση που προκαλεί το γένος *Bacillus* είναι η επίπεδη οξίνιση αλλά ορισμένα ήδη έχουν την ικανότητα να παράγουν αέριο κατά την αποικοδόμηση των υδατανθράκων. Τα βακτήρια *Bacillus polymyxa* και *Bacillus macerans* παράγουν αέριο σε κονσερβοποιημένα μπιζέλια, σπανάκι και σπαράγγι. Η παρουσία τους οφείλεται σε ανεπαρκή θερμική επεξεργασία (Κοτζεκίδου 1993).

### 1.2.2. *Clostridium* spp.

Πρόκειται για αναερόβια σπορογόνα βακτήρια που εμφανίζονται στα κονσερβοποιημένα προϊόντα κυρίως λόγω μόλυνσης των προϊόντων από το έδαφος. Προκαλούν επίσης αλλοιώσεις στα κονσερβοποιημένα κρεατοσκευάσματα λόγω του ότι βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα των θηλαστικών με αποτέλεσμα να μολύνονται τα σφαγεία. Τα αναερόβια σπορογόνα βακτήρια του γένους *Clostridium* διακρίνονται σε μεσόφιλα και θερμοφιλα βακτήρια. Τα βακτήρια που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον από τα θερμοφιλα αναερόβια βακτήρια είναι τα σακχαρολυτικά βακτήρια που δεν παράγουν υδρόθειο με αντιπροσωπευτικότερο είδος το *Clostridium thermosaccharolyticum*. Οι μικροοργανισμοί αυτής της ομάδας είναι σακχαρολυτικοί, παράγουν μεγάλη ποσότητα αερίου, κυρίως CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub> από την αποικοδόμηση των υδατανθράκων που προκαλούν διόγκωση των κοντιών.

Μια άλλη ομάδα βακτηρίων που παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον για τα χαμηλής οξύτητας κονσερβοποιημένα τρόφιμα είναι τα μεσόφιλα αναερόβια βακτήρια εκ των οποίων ο σημαντικότερος μικροοργανισμός είναι το *Clostridium botulinum*. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, όπως και τα περισσότερα μεσόφιλα βακτήρια, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης γύρω στους 37°C άλλοι μπορούν και αναπτύσσονται

σε θερμοκρασίες μικρότερες των 20°C και άλλοι αναπτύσσονται γύρω στους 50°C. Τα μεσόφιλα αναερόβια βακτήρια χωρίζονται σε δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα εμπεριέχει τα πρωτεολυτικά είδη όπως είναι το *Clostridium histolyticum*, το *Clostridium sporogenes*, και το *Clostridium bifermentans* και η άλλη ομάδα εμπεριέχει το *Clostridium butyricum*, το *Clostridium pasteurianum*, το *Clostridium perfringens* κ.α. Το *C. perfringens* προκαλεί πολλές φορές αλλοιώσεις σε κονσερβοποιημένο χοιρομέρι. Τα πρωτεολυτικά στελέχη προκαλούν αλλοιώσεις στα χαμηλής οξύτητας κονσερβοποιημένα προϊόντα. Το *C. perfringens* αλλοιώνει συνήθως το κονσερβοποιημένο κρέας, ψάρια και τα κρεατοσκευάσματα. Όταν τα πρωτεολυτικά βακτήρια αλλοιώνουν ένα προϊόν τότε παράγεται υδρόθειο, μερκαπτάνες, αμμωνία, ινδόλιο και σκατόλιο. Επίσης παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο με αποτέλεσμα να έχουμε διόγκωση των κουτιών. Τα σπόρια των πρωτεολυτικών αναερόβιων βακτηρίων είναι πολύ θερμοανθεκτικά (Κοτζεκίδου 1993).

### 1.3. Βακτηριακά ενδοσπόρια

Δεκατρία γένη βακτηρίων σχηματίζουν ενδοσπόρια. Το ενδοσπόριο των βακτηρίων είναι μια μορφή ανθεκτική στις αντιξοότητες του περιβάλλοντος, κάτι παρόμοιο με τα σκληρώτια των ανώτερων μυκήτων, τις κύστεις των πρωτόζωων κ.λπ. Τα ενδοσπόρια είναι πολύ ανθεκτικότερη μορφή, ιδιαίτερα στην θέρμανση αφού μπορεί να υποστούν θερμική επεξεργασία για ώρες χωρίς να χάσουν την ζωτικότητα τους (Adams & Moss 1999, Μπαλατσούρας 2006).

Τα ενδοσπόρια μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με απλή μικροσκόπηση από τα βλαστικά κύτταρα, γιατί είναι μεγάλης διαθλαστικότητας και δεν βάφονται με τις χρωστικές της ανιλίνης. Συνήθως μετά την φάση της εκθετικής αναπτύξεως, όπου και σημειώνεται έλλειψη των θρεπτικών συστατικών, έχουμε και τον σχηματισμό των ενδοσπορίων. Σε κάθε κύτταρο υπάρχει η δυνατότητα να σχηματιστεί ένα ενδοσπόριο και για αυτό και ονομάζεται και σποριαγγείο. Για να δημιουργηθεί ένα βλαστικό κύτταρο έχουμε την λύση του σποριαγγείου για να αποδεσμευτεί το ενδοσπόριο έπειτα από πολλαπλασιασμό του με κυτταρική διαίρεση (fission). Τα ενδοσπόρια μπορούν να παραμείνουν σε αδράνεια για πάρα πολύ καιρό μέχρι να υπάρξουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις για να μπορέσουν να εκβλαστήσουν (Dahl 1999, Μπαλατσούρας, 2006). Η εξωτερική επιφάνειά τους διαφέρει ανάλογα με το είδος του βακτηρίου και μπορεί να είναι λεία, ελαφρά παραμορφωμένη ή πτυχωτή. Χρωματίζονται σχετικά

δύσκολα ενώ μια πιο εκτενής αναφορά στις διαφορές τους σε σχέση με το μητρικό τους βλαστικό κύτταρο παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 (Βασιλειάδου 1996, [www.textbookbacteriology.net](http://www.textbookbacteriology.net)).

**Πίνακας 1.** Διαφορές μεταξύ ενδοσπορίων και βλαστικών κυττάρων

Ιδιότητα	Βλαστικές μορφές	Ενδοσπόρια
Κυτταρικό περιβλήμα	Τυπικό Gram-θετικό πολυμερές κυτταρικού τοιχώματος	Παχύ κυτταρικό περιβλήμα, φλοιός και μοναδικό πυρηνικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνων
Μικροσκοπική εμφάνιση	Μη διαθλαστικό	Διαθλαστικό
Ασβεστούχο Διπικολινικό Οξύ	Απουσία	Παρουσία στον πυρήνα
Κυτοπλασματική $\mu_w$	Υψηλή	Πολύ χαμηλή
Ενζυματική δραστηριότητα	Παρουσία	Απουσία
Μακρομοριακή σύνθεση	Παρουσία	Απουσία
Θερμοανθεκτικότητα	Χαμηλή	Υψηλή
Ανθεκτικότητα σε χημικές ενώσεις και οξέα	Χαμηλή	Υψηλή
Ανθεκτικότητα σε ακτινοβολίες	Χαμηλή	Υψηλή
Ανθεκτικότητα σε λυσοζύμη	Μερικά ευαίσθητα – μερικά ανθεκτικά	Ανθεκτικά
Ανθεκτικότητα σε χρωστικές	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά

Πηγή: [www.textbookbacteriology.net](http://www.textbookbacteriology.net)

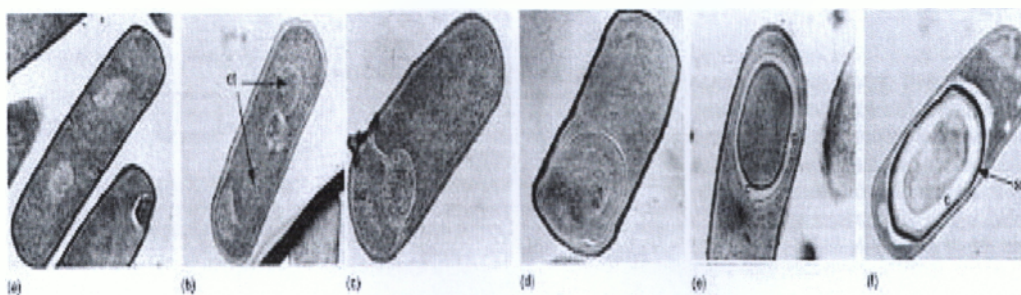
Η σημαντικότητα των ενδοσπορίων ξεκινά από την ακραία ανθεκτικότητά τους στη θέρμανση. Είναι επίσης πολύ ανθεκτικότερα από τα βλαστικά κύτταρα σε νέες τεχνικές συντήρησης περιλαμβάνοντας την εφαρμογή της υψηλής υδροστατικής πίεσης. Δευτερευόντως μερικά σπόρια προκαλούν δηλητηρίαση που μπορεί να είναι ήπια (*Bacillus subtilis* και *Bacillus licheniformis*), σοβαρή (*Bacillus cereus*, *C. perfringens*), ή θανατηφόρα (*C. botulinum*) (Gould 1999).

### 1.3.1. Σχηματισμός σπορίων

Τα ενδοσπόρια σχηματίζονται υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες δεν επιτρέπουν στα βλαστικά κύτταρα να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Το πιο συχνό ερέθισμα στη φύση για το σχηματισμό των ενδοσπορίων είναι πιθανόν η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών.

Η αλληλουχία των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που σημειώνονται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των σπορίων και των γενετικών ρυθμίσεων έχουν μελετηθεί εκτενώς. Το πρώτο γεγονός που λαμβάνει χώρα μετά την διακοπή της ανά-

πτυξης του βλαστικού κυττάρου είναι η *ασύμμετρη διαίρεση* του μητρικού κυττάρου κατά την οποία σχηματίζεται μια μεμβράνη που χωρίζει το κύτταρο σε δύο τμήματα διαφορετικού μεγέθους το καθένα. Ακολουθεί *εγκόλπωση* (engulfment), κατά την διάρκεια του οποίου το μεγαλύτερο τμήμα αναπτύσσεται γύρω από το μικρότερο. Αυτό το μικρό τμήμα αργότερα θα γίνει το κεντρικό πρωτόπλασμα (ή πυρήνας) του σπορίου, αλλά σε αυτό το στάδιο είναι διαχωρισμένο από το περιβάλλον με τρεις μεμβράνες η διάταξη των οποίων θεωρείται μοναδική στα προκαρυωτικά κύτταρα και οδηγεί σε απώλεια νερού από το εσωτερικό του σχηματιζόμενου σπορίου, λόγω οσμωτικών φαινομένων. Την ίδια ώρα το pH εντός αυτού του μελλοντικού πρωτοπλάσματος ελαττώνεται κατά μία μονάδα. Καθώς αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν ο μεταβολισμός μειώνεται και το κύτταρο μετατρέπεται σε «κοιμώμενο». Στη συνέχεια, *ιόντα ασβεστίου και διπικολινικό οξύ συσσωρεύονται και εναποτίθενται στο πρωτόπλασμα του σπορίου* σε επίπεδα πάνω από 10% του ξηρού βάρους, όπου και υπόκειται σε περαιτέρω *αφυδάτωση*. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της διαθλαστικότητας των σπορίων με αποτέλεσμα να εμφανίζονται φωτεινά όταν τα βλέπουμε από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (phase-contrast). Ταυτόχρονα, *πεπτιδογλυκάνη συσσωρεύεται ανάμεσα στις μεμβράνες του μελλοντικού πρωτοπλάσματος* σχηματίζοντας τον αναπτυσσόμενο *φλοιό*. Τέλος, *πρωτεϊνικό στρώμα τοποθετείται εξωτερικά των μεμβρανών*. Ακολουθεί *λύση του μητρικού κυττάρου και απελευθέρωση του σχηματισμένου πλέον σπορίου*. Η θερμοανθεκτικότητα του αναπτυσσόμενου σπορίου αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της αφυδάτωσης του πρωτοπλάσματος και σχηματισμού του φλοιού γύρω του (Gould 1999). Στην Εικόνα 1 φαίνεται ο σχηματισμός ενδοσπορίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



**Εικόνα 1:** Σχηματισμός ενδοσπορίου (πηγή: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)).

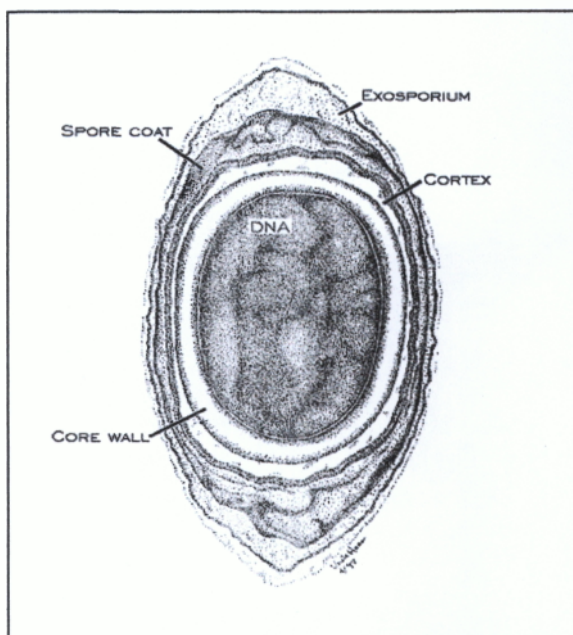
Η δομή του ώριμου σπορίου επομένως χαρακτηρίζεται από ένα είδος διαμερισματοποίησης που είναι συνηθισμένη στα προκαρυωτικά κύτταρα. Ο κεντρικός πρωτοπλάστης περιέχει ολόκληρο το «χρωμόσωμα», ριβοσώματα, κυττοπλασματικά έν-

ζυμα κ.α., ωστόσο παραμένουν κοιμώμενα σε περιβάλλον με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό και με υψηλά επίπεδα διπικολινικού ασβεστίου (Ca-DPA), και άλλων συστατικών όπως χαρακτηριστικές των σπορίων μικρές όξινες πρωτεΐνες (SASPs) που σταθεροποιούν το DNA του σπορίου. (Gould 1999, Jay 2005).

### 1.3.2. Δομή ενδοσπορίων

Τα ενδοσπόρια (αποκαλούνται έτσι επειδή το σπόριο σχηματίζεται μέσα στο κύτταρο) εύκολα διακρίνονται κάτω από το μικροσκόπιο σαν ισχυρά διαθλαστικά σώματα. Είναι αδιαπέραστα στις χρωστικές, έτσι περιστασιακά διακρίνονται σαν αχρωμάτιστη περιοχή μέσα στο κύτταρο που έχει χρωματιστεί με βασικές χρωστικές όπως μπλε του μεθυλενίου. Για να χρωματιστούν τα σπόρια, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ειδικές χρωστικές. Η δομή των σπορίων όπως διακρίνεται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι πολύ διαφορετική από αυτή των βλαστικών κυττάρων και αποτελείται από πολλά στρώματα. Όπως δείχνει και η σχηματική απεικόνιση στην Εικόνα 2, το εξωτερικό στρώμα καλείται **εξωσπόριο (exosporium)** και είναι μια λεπτή στρώση φτιαγμένη από πρωτεΐνες. Μέσα από αυτό είναι τα **περιβλήματα (spore coats)** των σπορίων, φτιαγμένα από στρώματα πρωτεΐνης. Κάτω από αυτά είναι ο **φλοιός (cortex)**, ο οποίος αποτελείται από ένα χαλαρό πλέγμα μορίων πεπτιδογλυκάνης και μέσα από το φλοιό είναι ο **πυρήνας (core) ή πρωτοπλάστης (spore protoplast)** του σπορίου, που αποτελείται από κυτταρικό τοίχωμα, κυτοπλασματική μεμβράνη, κυτόπλασμα, νουκλεοτίδια κ.ά. Έτσι τα σπόρια διαφέρουν από τα βλαστικά κύτταρά ως προς τις δομές που φέρουν εξωτερικά του πρωτοπλάσματος.

Ένα συστατικό που είναι χαρακτηριστικό των ενδοσπορίων και δεν παρατηρείται στα βλαστικά κύτταρα είναι το **διπικολινικό οξύ**. Αυτό το συστατικό έχει βρεθεί σε όλα τα ενδοσπόρια και εντοπίζεται στον πυρήνα. Τα σπόρια έχουν υψηλή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου, που τα περισσότερα από αυτά είναι συνδεδεμένα με διπικολινικό οξύ. Το σύμπλεγμα ασβεστίου-διπικολινικού οξέος του πυρήνα αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του ξηρού βάρους του ενδοσπορίου (Gould 1999, Brock et al. 2006).



Εικόνα 2. Διαγραμματική παράσταση της δομής ενός βακτηριακού σπορίου (πηγή: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)).

#### 1.4. Θερμοανθεκτικότητα

##### 1.4.1. Θερμοανθεκτικότητα των βλαστικών κυττάρων

Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σχετίζεται με την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους. Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην θέρμανση σε σύγκριση με τους μεσόφιλους και τους θερμόφιλους. Τα σπορογόνα βακτήρια είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα μη σπορογόνα και τα θερμόφιλα σπορογόνα βακτήρια είναι γενικά περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα μεσόφιλα σπορογόνα. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα αρνητικά κατά Gram. Γενικά, σχετικά με την θερμοανθεκτικότητα των βλαστικών μορφών των βακτηρίων ισχύουν τα παρακάτω:

1. Τα βακτήρια σχήματος κόκκου είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα μη σπορογόνα ραβδία.
2. Όσο μεγαλύτερη είναι η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου τόσο μεγαλύτερη είναι η θερμοανθεκτικότητά του.
3. Βακτήρια τα οποία βρίσκονται σε συσσωματώματα ή σχηματίζουν καψίδιο είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά.

4. Βακτηριακά κύτταρα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά.

Η θερμική ανθεκτικότητα όπως αυτή μετράται από την D τιμή μπορεί να διαφέρει και λόγω άλλων παραγόντων πέρα των ενδογενών. Για παράδειγμα, τα κύτταρα στην φάση στασιμότητας είναι γενικά πιο ανθεκτικά σε σχέση με αυτά του σταδίου της λογαριθμικής αύξησης. Η θερμοανθεκτικότητα επίσης επηρεάζεται από την σύσταση του μέσου στο οποίο λαμβάνει χώρα το φαινόμενο. Για παράδειγμα, τα κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοευαισθησία όταν το pH βρίσκεται πάνω από 8 ή κάτω από 6 (Adams and Moss, 1999). Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών επηρεάζεται από την οξύτητα. Τρόφιμα πολύ χαμηλής οξύτητας χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες, ενώ όξινα τρόφιμα χρειάζονται πιο χαμηλές θερμοκρασίες (WHO, 1988). Το λίπος επίσης ενισχύει την θερμοανθεκτικότητα καθώς μειώνει την δραστηριότητα ύδατος, όπως συμβαίνει και με την προσθήκη διαλυτών στερεών όπως είναι η σακχαρόζη.

Ο μηχανισμός της θερμικής καταστροφής των βακτηρίων δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Πιθανά αίτια της θερμικής καταστροφής των βακτηριδίων θεωρούνται:

1. η αποικοδόμηση ή μετουσίωση των πρωτεϊνών,
2. η διάσπαση του DNA και του RNA,
3. και η καταστροφή των κυτοπλασματικών μεμβρανών (Κοτζεκίδου 1993).

#### 1.4.2. Θερμοανθεκτικότητα ενδοσπορίων

Τα σπόρια των βακτηριδίων που αναπτύσσονται σε υψηλή θερμοκρασία είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα σπόρια των βακτηρίων που αναπτύσσονται σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα σπόρια ορισμένων βακτηρίων είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικά π.χ. Τα σπόρια του *Bacillus stearothermophilus* μπορεί να επιζήσουν μετά από θέρμανση στους 100°C για 20 h αν ο αρχικός πληθυσμός τους στο υπόστρωμα είναι  $10^5$ - $10^6$  σπόρια/g. Τα σπόρια του *B. stearothermophilus* έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην κονσερβοποίηση επειδή είναι πολύ θερμοανθεκτικά και προκαλούν επίπεδη οξίνιση στα χαμηλής οξύτητας κονσερβοποιημένα τρόφιμα.

Ενώ η θερμοανθεκτικότητα διαφορετικών βακτηρίων παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα, τα περισσότερο ανθεκτικά παρουσιάζουν τεράστια θερμοανθεκτικότητα. Για παράδειγμα, μερικά στελέχη του αναερόβιου βακτηρίου *Desulfotomaculum nigrificans* έχουν τιμή  $D_{121^\circ\text{C}}$  55 λεπτά (υγρή θερμότητα). Τα σπόρια που είναι πιο

ανθεκτικά στην υγρή θέρμανση είναι αυτά του θερμοφίλου αναερόβιου βακτηρίου *C. thermosaccharolyticum* με τιμή  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  περίπου 5 ώρες. Από την άλλη μεριά σπόρια ψυχρότροφων στελεχών όπως είναι το *C. botulinum* τύπου E έχουν τιμές  $D_{80^{\circ}\text{C}}$  που κυμαίνονται σε μερικά λεπτά. Η ανθεκτικότητα στην ξηρή θερμότητα είναι πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη στην υγρή. Έχουν αναφερθεί τιμές D τόσο υψηλές όσο τα 3,5 λεπτά στους  $160^{\circ}\text{C}$ . Για το λόγο αυτόν, τα συστήματα αποστείρωσης με εφαρμογή ξηρής θερμότητας απαιτούν θερμοκρασίες περίπου  $50^{\circ}\text{C}$  υψηλότερες σε σχέση με τα συστήματα αποστείρωσης με κορεσμένο ατμό (υγρή θερμότητα) προκειμένου να έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα.

Κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η θερμοανθεκτικότητα των ενδοσπορίων των βακτηρίων, η οποία μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη περιεκτικότητα νερού του περιβλήματος και του εσωτερικού του σπορίου. Τα ενδοσπόρια περιέχουν DNA, RNA, νερό, διάφορα ένζυμα, ιόντα μετάλλων, διπικολινικό οξύ (DPA) και άλλες ενώσεις. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της θερμοανθεκτικότητας των ενδοσπορίων δεν είναι πλήρως γνωστός, πολλοί ερευνητές συσχετίζουν την θερμοανθεκτικότητα των σπορίων με την περιεκτικότητα σε DPA και σε ασβέστιο. Τα ενδοσπόρια περιέχουν DPA σε αναλογία 5-15% του ξηρού βάρους τους, ενώ η περιεκτικότητα τους σε ασβέστιο είναι 2-10 φορές μεγαλύτερη από την βλαστική τους μορφή. Γενικά αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητα όσο αυξάνει η αναλογία κατιόντων προς DPA. Η προσθήκη χημικών ενώσεων που δεσμεύουν το ασβέστιο και το μαγγάνιο μειώνουν την θερμοανθεκτικότητα των ενδοσπορίων, ενώ η προσθήκη ασβεστίου και μαγγανίου αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα (Gould 1999).

Τα βακτηριακά σπόρια είναι συνήθως πολύ πιο θερμοανθεκτικά από τα βλαστικά κύτταρα. Τα θερμοφιλά βακτήρια παράγουν τα περισσότερα θερμοανθεκτικά σπόρια ενώ τα ψυχρόφιλα και ψυχρότροφα τα πιο ευαίσθητα.

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών, ο συνδυασμός των οποίων μπορεί να δώσει διάφορα αποτελέσματα.

Τουλάχιστον τέσσερις παράγοντες φαίνεται να συμβάλουν στη θερμοανθεκτικότητα των σπορίων. Ο πρώτος παράγοντας θεωρείται ότι είναι η έμφυτη θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και των συστατικών τους, όσο αυτά βρίσκονται μέσα στα απροστάτευτα βλαστικά κύτταρα. Για παράδειγμα, βλαστικά κύτταρα των θερμοφίλων μικροοργανισμών όπως είναι ο *C. thermosaccharolyticum* είναι πολύ πε-



ρισσότερο θερμοανθεκτικά από αυτά που είναι μεσόφιλα όπως αυτά του *B. cereus*, και αυτά με τη σειρά τους είναι πολύ περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα βλαστικά κύτταρα ψυχρότροφων βακτηρίων όπως του *C. botulinum* τύπου E. Τα συστατικά είναι προσθέτως ανθεκτικά αποτελούμενα και επωφελούμενα από μηχανισμούς διαχείρισης των σπορίων. Δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει τη θερμοανθεκτικότητα είναι η επιπρόσθετη ανθεκτικότητα των κυτταρικών συστατικών που οφείλεται σε μηχανισμούς των σπορίων. Αυτή η επιπρόσθετη ανθεκτικότητα συχνά αφορά 40-55°C, κάνοντας τα σπόρια πιο θερμοανθεκτικά από τα αντίστοιχα βλαστικά κύτταρα από τα οποία σχηματίζονται (αντέχουν σε θερμοκρασίες υψηλότερες κατά 40-55 °C). Τρίτος παράγοντας θεωρείται η σχετική υγρασία, η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) και η ωσμωτική πίεση που επικρατούν στο περιβάλλον την ώρα της θερμικής επεξεργασίας. Γενικά χαμηλή σχετική υγρασία, χαμηλή ενεργότητα νερού και υψηλή ωσμωτική πίεση (λόγω αυξημένης συγκέντρωσης διαλυτών συστατικών) αυξάνουν τη θερμοανθεκτικότητα. Τέταρτος παράγοντας θεωρείται η θερμοκρασία σπορογένεσης: σπόρια που παράγονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες γενικότερα έχουν υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά που έχουν δημιουργηθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Jay 2005, Gould 1999).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό επιδρά στην προστασία των συστατικών του πρωτοπλάστη από την μετουσίωση που προέρχεται από την θέρμανση, και μπορεί να βοηθά στην προστασία του DNA των σπορίων από την ζημιά της οξειδωσης. Παρ'όλα αυτά ο κύριος μηχανισμός για την προστασία του DNA των σπορίων, θεωρείται ότι σχετίζεται με μικρές πρωτεΐνες (διαλυτές σε οξέα) που βρίσκονται μέσα στα σπόρια (SASPs, Small Acid Soluble Proteins). Αυτές συντίθεται νωρίς στην διαδικασία σπορογένεσης και παραμένουν συνδεδεμένες στα χρωμοσώματα των κοιμώμενων σπορίων. Μέσα στα πρώτα λεπτά της βλάστησης των σπορίων αυτές οι πρωτεΐνες αποδομούνται. Η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων υπολογίζεται συνήθως με την καταμέτρηση των κυττάρων που επιβιώνουν ύστερα από εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας (Brock et al. 2006).

Ακολουθούν διάφοροι παράγοντες που θεωρείται ότι επηρεάζουν τη θερμοανθεκτικότητα τόσο των βλαστικών κυττάρων των μικροοργανισμών όσο και των σπορίων τους:

1. **Χρόνος και θερμοκρασία θέρμανσης.** Γενικά όσο αυξάνεται ο χρόνος θέρμανσης σε μια ορισμένη θερμοκρασία αυξάνεται το ποσοστό καταστροφής των μικροοργανισμών. Έτσι για να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την

καταστροφή ενός ορισμένου πληθυσμού μικροοργανισμών, πρέπει να αυξη-  
σουμε την θερμοκρασία. Ιδιαίτερη σημασία έχει το μέγεθος του δοχείου στο  
οποίο γίνεται η θερμική επεξεργασία και η σύνθεσή του (γυαλί, μέταλλο,  
πλαστικό, κ.λπ.). Στα μεγάλου μεγέθους δοχεία απαιτείται μεγαλύτερο χρονι-  
κό διάστημα για να επιτευχθεί η παστερίωση ή αποστείρωση σε σύγκριση με  
τα μικρά μεγέθους δοχεία.

- 2. Αριθμός μικροοργανισμών.** Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μικροορ-  
γανισμών, τόσο μεγαλύτερη είναι η θερμοανθεκτικότητα τους όπως π.χ. για  
να καταστραφούν  $72 \times 10^9$  σπόρια του *C. botulinum* χρειάζεται να γίνει θερμι-  
κή επεξεργασία στους  $100^\circ\text{C}$  για 240 min, ενώ για να καταστραφούν 328  
σπόρια του ίδιου μικροοργανισμού χρειάζονται 40 min. Σύμφωνα με ορισμέ-  
νους ερευνητές η ανθεκτικότητα στην θέρμανση του υψηλού πληθυσμού των  
μικροοργανισμών οφείλεται είτε στην παραγωγή από τα κύτταρα προστατευ-  
τικών ουσιών, συνήθως πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα των  
μικροοργανισμών κατά την θέρμανση ή στην ύπαρξη μικροοργανισμών με δι-  
αφορετική θερμοανθεκτικότητα (Jay 2005, Κοτζεκίδου 1993, Αρβανιτογιάν-  
νης 2001).
- 3. Είδος μικροοργανισμού.** Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε υψηλές  
θερμοκρασίες έχουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα ενώ οι μικροοργανισμοί που  
αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες έχουν μικρή θερμοανθεκτικότητα.  
Γενικά θεωρείται ότι με θέρμανση στους  $40^\circ\text{C}$  καταστρέφονται οι ψυχρότρο-  
φοι μικροοργανισμοί, με θέρμανση στους  $50^\circ\text{C}$  καταστρέφονται οι ψυχρό-  
τροφοι και μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, ενώ με θέρμανση στον  $60^\circ\text{C}$  κατα-  
στρέφονται οι περισσότεροι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί εκτός από τα θερμο-  
ανθεκτικά μεσόφιλα βακτήρια όπως είναι οι εντερόκοκκοι οι οποίοι κατα-  
στρέφονται με θέρμανση στους  $70^\circ\text{C}$  (Jay 2005, Κοτζεκίδου 1993, Αρβανιτο-  
γιάννης 2001).
- 4. Θερμοκρασία επώασης.** Η θερμοκρασία ανάπτυξης των βλαστικών κυττά-  
ρων και η θερμοκρασία σχηματισμού σπορίων επηρεάζουν την θερμοανθεκτι-  
κότητα των μικροοργανισμών. Γενικά η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών  
αυξάνει όταν η θερμοκρασία επώασης πλησιάζει την άριστη ή για πολλούς

μικροοργανισμούς όταν πλησιάζει την μέγιστη. Τα σπόρια των μικροοργανισμών που σχηματίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα σπόρια που σχηματίζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι τα σπόρια που παράγονται από θερμοφίλους μικροοργανισμούς είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα σπόρια που παράγονται από μεσόφιλους ή ψυχρότροφους μικροοργανισμούς.

**5. Φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού.** Η θερμοανθεκτικότητα των βλαστικών κυττάρων των βακτηριδίων διαφέρει ανάλογα με την φάση ανάπτυξης, ενώ των σπορίων ανάλογα με την ηλικία τους. Αναφέρεται ότι τα κύτταρα στην φάση της προσαρμογής είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από την φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης γεγονός που στην περίπτωση της *Escherichia coli* αποδίδεται σε μεταβολές του κυτταρικού τοιχώματος στην διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης. Τα κύτταρα του *Enterococcus faecalis* παρουσιάζουν την μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα στη φάση της στασιμότητας. Γενικά θεωρείται ότι τα κύτταρα των βακτηρίων παρουσιάζουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα στη φάση της προσαρμογής και στην φάση της στασιμότητας ενώ είναι λιγότερο θερμοανθεκτικά στην φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης. Τα σπόρια αμέσως μετά τον σχηματισμό τους παρουσιάζουν μικρή θερμοανθεκτικότητα. Στην διάρκεια των πρώτων εβδομάδων μετά τον σχηματισμό των σπορίων αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητά τους αλλά αργότερα αρχίζει να μειώνεται (Jay 2005, Κοτζεκιδου 1993, Αρβανιτογιάννης 2001).

**6. pH.** Οι μικροοργανισμοί είναι περισσότερο θερμοανθεκτικοί σε τιμές pH περίπου 7.0. Σε τιμές μεγαλύτερες του 8.0 ή μικρότερες του 6.0 μειώνεται η θερμοανθεκτικότητά των μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Στα όξινα τρόφιμα για την καταστροφή των μικροοργανισμών και των σπορίων τους απαιτείται σχετικά ήπια θερμική επεξεργασία σε σύγκριση με τα τρόφιμα που έχουν ουδέτερο pH π.χ. σε pH 3.9 οι τομάτες πρέπει να υποστούν θερμική επεξεργασία στους 100 °C για 34min για να καταστραφεί ένας συγκεκριμένος αριθμός σπορίων, ενώ σε pH 4.8 το ίδιο προϊόν πρέπει να υποστεί θέρμανση στους 100 °C για 110 min. Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει και το οξύ που χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH του υποστρώματος θέρμανσης. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι όταν προσθέτονται οργανικά οξέα, όπως οξί-

κό, γαλακτικό ή κιτρικό οξύ επέρχεται ταχεία μετουσίωση της θερμοανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε σύγκριση με τις περιπτώσεις που το pH ρυθμίζεται με HCl.

**7. Ενεργότητα νερού ( $a_w$ ).** Γενικά οι μικροοργανισμοί είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην θέρμανση στα τρόφιμα με υψηλή ενεργότητα νερού. Μειούμενης της ενεργότητας νερού του τροφίμου, αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών. Με την θέρμανση επέρχεται μετουσίωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα των μικροοργανισμών. Σε υψηλές τιμές ενεργότητας νερού επέρχεται ταχεία μετουσίωση των πρωτεϊνών ενώ μειούμενης της τιμής της ενεργότητας του νερού μειώνεται και ο ρυθμός μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων του *B. stearothermophilus* σε σκόνη αυγού και σε αλεύρι σιταριού βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη σε τιμή ενεργότητας νερού 0.33 παρά σε ενεργότητα νερού 0.68 ή 0.99 (Jay 2005, Κοτζεκιδου 1993, Αρβαντιογιάννης 2001).

**8. Σύσταση του προϊόντος.** Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από την σύσταση του προϊόντος που υφίστανται θερμική επεξεργασία. Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση των διαφόρων συστατικών ενός προϊόντος στην θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών:

*α) Υδατάνθρακες.* Η παρουσία των σακχάρων στο υπόστρωμα θέρμανσης προκαλεί αύξηση της θερμοανθεκτικότητας των μικροοργανισμών. Η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων του *C. botulinum* εξαρτάται από την συγκέντρωση της σακχαρόζης στο υπόστρωμα θέρμανσης. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της σακχαρόζης, αυξάνεται και η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων. Η προστατευτική επίδραση της σακχαρόζης στα κύτταρα των μικροοργανισμών πιθανόν οφείλεται στη μείωση της τιμής της ενεργότητας του νερού, του θρεπτικού υποστρώματος που περιβάλλει τα κύτταρα και στην αφυδάτωση των κυττάρων.

*β) Πρωτεΐνες.* Οι πρωτεΐνες προστατεύουν τους μικροοργανισμούς κατά την θερμική επεξεργασία. Οι πεπτόνες, το εκχύλισμα ζύμης και η αλβουμίνη έχουν προστατευτική επίδραση στους μικροοργανισμούς. Έτσι τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη πρέπει να υποστούν μεγαλύτερη θερμική επεξεργασία για την καταστροφή του ίδιου πληθυσμού μικροοργανισμών σε σύγκριση με τα τρόφιμα που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

γ) *Λίπη*. Οι μικροοργανισμοί που υφίστανται θερμική επεξεργασία σε υποστρώματα που περιέχουν λίπη ή έλαια καταστρέφονται πολύ δυσκολότερα από τους μικροοργανισμούς που υφίστανται θερμική επεξεργασία σε υπόστρωμα που δεν περιέχει λίπη ή έλαια.

δ) *Άλατα*. Η επίδραση των αλάτων στη θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ποικίλλει και εξαρτάται από το είδος του άλατος, τη συγκέντρωσή του κ.α. Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα άλατα έχουν προστατευτική επίδραση στους μικροοργανισμούς στη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας, ενώ άλλα καθιστούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών περισσότερο ευαίσθητα στη θέρμανση. Ορισμένα άλατα μειώνουν την δραστηριότητα του νερού του τροφίμου και έτσι αυξάνουν την θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών, ενώ άλλα αυξάνουν τη δραστηριότητα του νερού με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοανθεκτικότητας των μικροοργανισμών.

**9. Ανασταλτικές ουσίες.** Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών μειώνεται, όταν η θέρμανση γίνεται παρουσία βακτηριοστατικών ουσιών όπως νιτρικά άλατα, υπεροξείδιο του υδρογόνου,θειικό οξύ, κ.ά. Αν σ' ένα τρόφιμο προστεθούν νιτρικά άλατα και γίνει θερμική επεξεργασία το προϊόν θα συντηρηθεί καλύτερα. Η προσθήκη θειικού οξέος στα φρούτα και στα προϊόντα τους αποβλέπει στην μείωση της θερμοανθεκτικότητας των μικροοργανισμών. Η επίδραση του θειικού οξέος είναι περισσότερο εμφανής στα βακτήρια παρά στις ζύμες επειδή οι ζύμες είναι γενικότερα πιο ανθεκτικές στο θειικό οξύ (Κοτζεκίδου 1993).

**10. Αντιβιοτικά.** Πολλές μελέτες έχουν γίνει σχετικά με την πιθανότητα μείωσης της υψηλής θερμικής επεξεργασίας που απαιτείται για την αποστείρωση των κονσερβοποιημένων τροφίμων χαμηλής οξύτητας με την προσθήκη αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν περισσότερο είναι η σουμπτιλίνη, η νισίνη και η τυροσίνη. Τα παραπάνω αντιβιοτικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των спорίων μετά την εκβλάστησή τους. Τα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της θερμικής επεξεργασίας που απαιτείται για την επίτευξη εμπορικά αποστειρωμένων κονσερβοποιημένων τροφίμων χαμηλής οξύτητας. Στα όξινα κονσερβοποιημένα τρόφιμα τα αντιβιοτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της αλλοίωσης από το *Bacillus coagulans*,

ενώ στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας για τον έλεγχο της αλλοίωσης από θερμοφιλα σπορογόνα βακτήρια (Jay 2005, Κοτζεκίδου 1993, Αρβανιτογιάννης 2001).

### 1.5. Βασικοί ορισμοί για τη θερμική καταστροφή των μικροοργανισμών

**D-τιμή ή χρόνος δεκαδικής μείωσης.** Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να ελαττωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού κατά 90% ή κατά ένα δεκαδικό λογάριθμο, μετά από θέρμανση σε μια ορισμένη θερμοκρασία. π.χ.  $D_{121^{\circ}\text{C}}=1.0$  min σημαίνει ότι το 90% των σπορίων ή των κυττάρων ενός μικροοργανισμού καταστρέφονται με θέρμανση στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 1 min. Δηλαδή, ένας πληθυσμός π.χ.  $10^5$  κυττάρων ενός μικροοργανισμού μειώνεται στα  $10^4$  κύτταρα μετά από θέρμανση στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 1 min.

Η τιμή D είναι το μέτρο του ρυθμού καταστροφής ενός μικροοργανισμού και προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

όπου:

t, ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας σε min

a, ο αρχικός αριθμός κυττάρων

b, ο αριθμός κυττάρων που παραμένει μετά από χρόνο t

Όταν η διαφορά μεταξύ του a και b είναι ένας δεκαδικός λογάριθμος τότε  $(\log a - \log b)$  είναι ίσο με 1 και κατά συνέπεια  $D=t$ . Η τιμή D δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλει ανάλογα με το είδος και με το στέλεχος του μικροοργανισμού, την θερμοκρασία και άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την θερμοανθεκτικότητα.

**z-τιμή** είναι η αύξηση της θερμοκρασίας σε  $^{\circ}\text{C}$  που απαιτείται για να μειωθεί η D-τιμή στο 1/10 ή για να διανύσει η καμπύλη θερμικής καταστροφής ένα λογαριθμικό κύκλο. π.χ. z-τιμή= $6^{\circ}\text{C}$  σημαίνει ότι αν η  $D_{65^{\circ}\text{C}}$  τιμή ενός μικροοργανισμού είναι 20 sec, για να μειωθεί η D-τιμή στα 2 sec, πρέπει η θερμοκρασία θέρμανσης να αυξηθεί στους  $71^{\circ}\text{C}$  δηλαδή  $z=71-65=6^{\circ}\text{C}$ .

$$z = (T_2 - T_1) / (\log D_1 - \log D_2)$$

**Χρόνος θερμικού θανάτου (TDT-Thermal Death Time)** είναι ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί αποστείρωση ενός υποστρώματος που περιέχει γνωστό αριθμό βλαστικών κυττάρων ή σπορίων σε μια ορισμένη θερμοκρασία. Με αυτή τη μέθοδο διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία και προσδιορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για να καταστραφούν όλοι οι μικροοργανισμοί. Για μια ορισμένη θερμοκρασία, ο χρόνος θερμικής καταστροφής εξαρτάται από την ανθεκτικότητα των κυττάρων και τον αριθμό τους.

**F τιμή** είναι ο ισοδύναμος χρόνος σε λεπτά στους 250 °F (ή 121 °C) της θερμικής επεξεργασίας που απαιτείται για να καταστραφούν τα σπόρια ή τα βλαστικά κύτταρα ενός μικροοργανισμού. Το ολοκλήρωμα της τιμής της θερμικής επεξεργασίας που δέχονται όλα τα σημεία του κουτιού ώστε να επέλθει καταστροφή του μικροοργανισμού παριστάνεται με  $F_s$  ή  $F_0$  και εκφράζει την ικανότητα της θερμικής επεξεργασίας να μειώσει τον αριθμό των σπορίων ή των βλαστικών κυττάρων ενός ορισμένου μικροοργανισμού ανά κουτί (Κοτζεκίδου 1993, Jay 2005).

**Επεξεργασία 12D.** Χρησιμοποιείται κυρίως στην κονσερβοποίηση και αποβλέπει στο να μειωθεί η πιθανότητα επιβίωσης των πιο ανθεκτικών σπορίων του *C. botulinum* σε  $10^{-12}$  σπόρια με την ελάχιστη δυνατή θερμική επεξεργασία. Επειδή τα σπόρια του *C. botulinum* δεν εκβλαστάνουν και δεν παράγουν τοξίνη σε  $pH < 4.6$  η 12D επεξεργασία έχει σημασία στα χαμηλής οξύτητας τρόφιμα. Αν υποθεθεί ότι κάθε κουτί κονσέρβας περιέχει μόνο 1 σπόριο *C. botulinum* τότε η θερμική επεξεργασία στους 121°C για 2.52 min μειώνει τα σπόρια του *C. botulinum* σε ένα σπόριο σε ένα κουτί ανά  $10^{12}$  κουτιά.

### 1.6 Μοντέλο Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994)

Η εφαρμογή ενός γραμμικού μοντέλου ( $y=ax+b$ ) επιβίωσης μικροοργανισμών είναι ανεπαρκής όταν πρέπει να περιγράψει καμπύλες επιβίωσης στις οποίες παρατηρείται το φαινόμενο της «ουράς» (tailing), που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μικροοργανισμών ή ενός υποπληθυσμού με πιο ανθεκτικούς μικροοργανισμούς (Xiong et al., 1999). Γι' αυτό το λόγο ένα πιο πρόσφατο μοντέλο που αναπτύχθηκε για καμπύλες σε σιγμοειδή μορφή είναι το μοντέλο του Baranyi. Το μοντέλο του Baranyi έχει τη φιλοσοφία του γραμμικού μοντέλου επιβίωσης, με τη διαφορά ότι

έχει καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα εφόσον η γραμμή της καμπύλης δεν είναι υποχρεωτικά ευθεία. Η εξίσωση του μοντέλου Baranyi είναι η εξής:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left( e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} + e^{-\mu_{\max} t - h_0} \right)$$

Όπου  $y_0$  είναι ο αρχικός πληθυσμός,  $\mu_{\max}$  είναι ο μέγιστος ειδικός αριθμός αύξησης,  $A(t)$  είναι ένας παράγοντας «καθυστέρησης» που σχετίζεται με τη φάση προσαρμογής του μικροοργανισμού στο καινούριο περιβάλλον (lag phase),  $m$  είναι ένας συντελεστής που εκφράζει την μετάβαση από την φάση προσαρμογής στην εκθετική φάση ανάπτυξης,  $h_0$  είναι ο όρος ( $\text{lag} \times \mu_{\max}$ ) και σχετίζεται με το έργο που πρέπει να καταβάλει το κύτταρο για να προσαρμοστεί στο νέο του περιβάλλον (work to be done) (Grijnspeerdt and Varnolleghem, 1999)

Οι καμπύλες επιβίωσης με βάση το μοντέλο Baranyi υπολογίστηκαν με βάση το λογισμικό Dmfit, το οποίο προσαρμόζει μια τυπική σιγμοειδή καμπύλη στα πειραματικά δεδομένα (Baranyi and Roberts, 1994). Στο λογισμικό πρόγραμμα Dmfit καταγράφονται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα (χρόνος θέρμανσης και αντίστοιχος μικροβιακός πληθυσμός) και με βάση παραμέτρους που εξάγει (rate, sefit,  $R^2$ ) γίνεται ανάλυση των καμπυλών θερμικού θανάτου των μικροοργανισμών.

Έχει 4 κύριες παραμέτρους: rate, lag,  $y_0$ ,  $y_{\text{end}}$ . Η πρώτη παράμετρος, rate, εκφράζει το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης ή θανάτωσης του μικροοργανισμού. Ουσιαστικά πρόκειται για την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης και χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των τιμών  $D$  ( $D = -1/\text{rate}$ ). Η παράμετρος, lag, εκφράζει το χρόνο προσαρμογής του μικροοργανισμού στο νέο περιβάλλον (Baranyi and Roberts, 1994). Το  $y_0$  είναι η αρχική πληθυσμιακή πυκνότητα του μικροοργανισμού, και  $y_{\text{end}}$  είναι η ανώτερη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης (ή η κατώτερη ασύμπτωτη στην περίπτωση θανάτωσης του μικροοργανισμού). Για την προσαρμογή της καμπύλης επιβίωσης, το μοντέλο λαμβάνει υπόψη όλα τα πειραματικά σημεία, αλλά για τον



υπολογισμό το χρόνου δεκαδικής μείωσης (D) λαμβάνεται μόνο το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης. Το λογισμικό πρόγραμμα Dmfit και υπολογίζει και άλλες παράμετρους όπως είναι το:

SE(fit): είναι το τυπικό σφάλμα της προσαρμογής και το

$R^2_{stat}$ : ο συντελεστής συσχέτισης.

Και τα δύο αυτά μεγέθη χρησιμοποιούνται ως στοιχεία καλής προσαρμογής των σημείων επάνω στην καμπύλη.

### 1.6.1. Εφαρμογές του μοντέλου Baranyi:

Από την εισαγωγή του, στις αρχές της δεκαετίας του 1990, το μοντέλο Baranyi χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για τη μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης. Η δημοφιλία αυτού του μοντέλου διευκολύνθηκε από τη χρήση δύο προγραμμάτων: του DMFit, ένα πρόσθετο πρόγραμμα του Excel, και του MicroFit, ένα μοναδικό και ασυναγώνιστο πρόγραμμα προσαρμογής δεδομένων, το οποίο διανέμεται από το Institute of Food Research στο Ηνωμένο Βασίλειο (<http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/Safetv/DMFit/default.html>). Το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για μοντελοποίηση της ανάπτυξης μιας μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, τα αποτελέσματα των οποίων συμπεριλήφθηκαν στο Food Micromodel software (McClure, et al., 1994). Κάποιες πρόσφατες εφαρμογές αναφέρονται για τους *Listeria monocytogenes*, *B.cereus*, *E. coli* (Sutherland, et al., 1996), *Y. Enterocolitica* (Pin, et al., 2000), για την αύξηση της διαμέτρου θερμο-ανθεκτικών μυκήτων (Valik and Pieckova, 2001), για την αλλοίωση πράσινων σπαραγγιών και σαλατών με λαχανικά (Garcia-Gimeno and Zurera-Cosano, 1997, Garcia-Gimeno et al., 1998).

Ένα πλεονέκτημα του μοντέλου Baranyi αποτελεί η εύκολη διάθεση του σε μία σειρά διαφορετικών εξισώσεων, που επιτρέπουν την κατασκευή μοντέλων σε δυναμικές συνθήκες, γενικά σε μη-ισόθερμα προφίλ θερμοκρασίας. Αυτή η μορφή του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τη συμπεριφορά της *E.coli* σε μη ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας (Bernaerts et al., 2000), και για την κατασκευή και αξιολόγηση σε δυναμικές συνθήκες ενός μοντέλου ανάπτυξης για την *L.monocytogenes* σε υγρό πλήρες γάλα (Alani et al., 2001). Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για την μελέτη της επίδρασης είτε αργών, είτε γρήγορων μεταβολών της θερμοκρασίας (Bovill et al., 2001) για την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* και της *Salmonella*.

## 1.7. Οι μικροοργανισμοί *Alicyclobacillus acidoterrestris* και *Bacillus coagulans*

### 1.7.1. *Alicyclobacillus* spp.

Ο πρώτος *Alicyclobacillus* spp. απομονώθηκε το 1982, και αρχικά θεωρήθηκε ότι βρισκόταν μόνο σε όξινα και θερμά περιβάλλοντα. Δύο χρόνια αργότερα, ένας άλλος *Alicyclobacillus* sp., ο *A. acidoterrestris*, αναγνωρίστηκε ως αλλοιωγόνος μικροοργανισμός για παστεριωμένο χυμό μήλου. Επακόλουθη μελέτη σύντομα έδειξε ότι τα *Alicyclobacillus* spp. είναι βακτήρια που προέρχονται από το έδαφος, και δεν απαιτούν αυστηρά θερμά και όξινα περιβάλλοντα. Επίσης, έχουν διάφορα σαφή χαρακτηριστικά με κύριο τη δυνατότητα να επιβιώνουν στις μεθόδους της εμπορικής παστερίωσης και να παράγουν δυσάρεστες οσμές σε χυμούς φρούτων. Η βιομηχανία των χυμών φρούτων αναγνωρίζει τα *Alicyclobacillus* spp. ως τον κύριο στόχο-μικροοργανισμό για τον ποιοτικό έλεγχο.

Τα είδη *Alicyclobacillus* spp. θεωρούνται μικροοργανισμοί υψηλής σημασίας για τις βιομηχανίες φρουτοχυμών. Τα θερμοφιλα και οξεόφιλα χαρακτηριστικά των *Alicyclobacillus* spp. προσδίδουν ανθεκτικότητα στα σχήματα παστερίωσης και δίνουν τη παραγωγής δυσάρεστων οσμών σε χυμούς, πράγμα που δημιουργεί σοβαρή οικονομική απώλεια στις βιομηχανίες. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν αλλοιώσεις που σχετίζονται με *Alicyclobacillus* spp. επικεντρώνονται στον *A. acidoterrestris*. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει και άλλα είδη *Alicyclobacillus* εξίσου ικανά να προκαλέσουν δυσάρεστες οσμές (Chang and Kang, 2004).

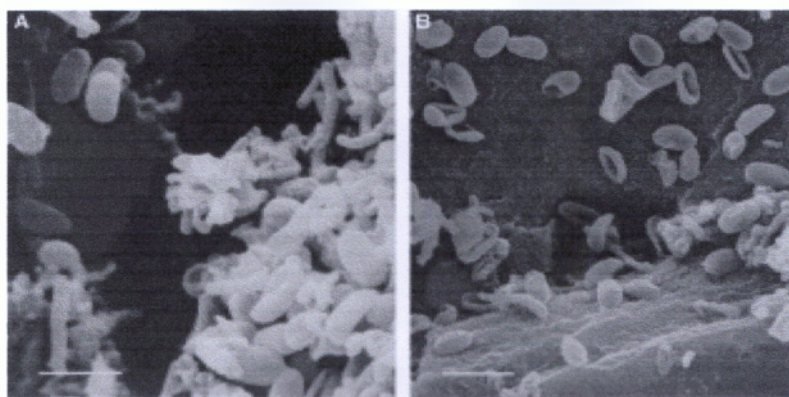
#### 1.7.1.1. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Ο *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι ένα θερμοφιλο, οξεόφιλο, μη παθογόνο σπορογόνο βακτήριο που έχει απομονωθεί από πολλούς αλλοιωμένους παστεριωμένους χυμούς φρούτων π.χ. χυμούς πορτοκαλιού και μήλου. Αρκετοί ερευνητές είχαν αναφερθεί σε αλλοιώσεις χυμών φρούτων από θερμοοξεόφιλα βακτήρια, ενώ άλλοι ερευνητές απομόνωσαν οξεόφιλους σπορογόνους βακίλους από αλλοιωμένο χυμό μήλων που αργότερα χαρακτηρίστηκε ως *A. acidoterrestris* από τους Pontius *et al.* (1998). Οι Yamazaki *et al.* (1996) επίσης ανίχνευσαν αυτό το βακτήριο σε αλλοιωμένους όξινους χυμούς. Αργότερα, μελετήθηκε η βλάστηση των σπορίων του

*A.acidoterresris* κάτω από όξινες συνθήκες σε χυμό πορτοκαλιού (Petitpher *et al.* 1997) και επίσης σε χυμούς μήλου, πορτοκαλιού και grapefruit αποθηκευμένους στους 30 °C (Komitoroulou *et al.* 1999). Λαμβάνοντας αυτές τις αναφορές υπόψιν οι Silva *et al.* (1999) πρότειναν τη χρήση των σπορίων του *A.acidoterresris* ως στόχο στη διαδικασία της παστερίωσης σε πολύ όξινα προϊόντα φρούτων.

#### 1.7.1.2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Alicyclobacillus acidoterresris*

Ο μικροοργανισμός έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: είναι gram-θετικός, αερόβιος βάκιλος που κινείται και σχηματίζει υπό αερόβιες συνθήκες ενδοσπόριο σχήματος ωοειδές. Δεν αναπτύσσεται παρουσία 5% w/v NaCl. Το στέλεχος αναφοράς (GD3B ή DSM 3922 ή NCIMB 13137 ή ATCC 49025) απομονώθηκε από έδαφος κήπου το 1981 (Hirpchen *et al.*, 1981). Ο *A. acidoterresris* αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 25 και 60 °C και τιμές pH μεταξύ 2,5-5,5 (Deinhard *et al.*, 1987, Pinhatti *et al.*, 1997 και Yamazaki *et al.*, 1996). Τα βλαστικά κύτταρα του *A.acidoterresris* έχουν γρήγορο κύκλο ανάπτυξης, και φτάνει στη στατική φάση μετά από 8-12 ώρες επώασης σε optimum pH (Baumgart *et al.* 1997, Silva 2001, Baumgart 2003).



**Εικόνα 3.** Στην αριστερή φωτογραφία (A) βλέπουμε τον *Alicyclobacillus acidoterrestriis* σε μορφή σπορίων ενώ στην δεξιά (B) βλέπουμε τα σπόρια κατεστραμμένα.

Μια μέθοδο ανίχνευσης του βακτηρίου σε χυμούς φρούτων αναφέρει ο Petitpher *et al.* (1997) όπου συστήνει την παρακάτω μεθοδολογία:

1. Επώαση του προϊόντος στους 44°C για 48 ώρες,
2. Εμβολιασμός με τεχνική “streaking” του προ-επωασμένου προϊόντος σε υπόστρωμα Orange Serum Agar,
3. Έλεγχος των τρυβλίων για ανάπτυξη μετά από 48 ώρες στους 44°C,

#### 4. Επιβεβαίωση οποιασδήποτε ύποπτης αποικίας.

Στην εικόνα 3 φαίνονται κύτταρα και σπόρια του βακτηρίου σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

#### 1.7.2. *Bacillus* spp.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι συνήθως Gram θετικά ραβδία, αλλά καμιά φορά γηραιότερες καλλιέργειες μπορεί να εμφανιστούν ως Gram αρνητικά. Η πλειοψηφία κινείται, παράγουν καταλάση, επίσης παράγουν οξύ αλλά όχι αέριο από τη γλυκόζη.

Τα κύτταρα αυτού του γένους ποικίλουν από αυστηρά αερόβια μέχρι προαιρετικά αναερόβια. Οι θρεπτικές απαιτήσεις ποικίλλουν από απλές σε σύνθετες. Υπάρχουν ψυχρότροφα, μεσόφιλα και θερμόφιλα. Γι'αυτό το λόγο, για την ανάπτυξη τους, η ελάχιστη θερμοκρασία ποικίλει από τους  $-5^{\circ}\text{C}$  μέχρι τους  $45^{\circ}\text{C}$ . Η μέγιστη θερμοκρασία για κάποια είδη είναι  $25^{\circ}\text{C}$  και για άλλα είδη είναι πάνω από τους  $75^{\circ}\text{C}$ . Το ελάχιστο pH για ανάπτυξη ποικίλει από pH 2.0 για τον *B.acidocaldarius* μέχρι 7.5 με 8.0 για τον *B.alcalophilus*. Η ανθεκτικότητα σε αλάτι είναι 2% ή λιγότερο για κάποια είδη. Άλλα μπορούν να αναπτυχθούν σε 25% αλάτι.

Τα *Bacillus* spp. μπορεί να βρεθούν στο έδαφος, στο νερό, σε περιττώματα και σε διάφορα τρόφιμα. Διάφορα συστατικά που προστίθενται στα τρόφιμα μπορεί να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης με *Bacillus* spp. Για παράδειγμα μπαχαρικά, αλεύρι, άμυλο και ζάχαρη έχουν ενοχοποιηθεί ως πηγές μόλυνσης ζυμούμενων αλλαντικών, ψωμιού και κονσερβοποιημένων τροφίμων, με σπόρια τέτοιων βακτηρίων. Η αντίσταση των σπορίων των *Bacillus* σε ποικίλους παράγοντες καθιστά αυτούς τους μικροοργανισμούς ιδιαίτερα σημαντικούς στη συντήρηση των τροφίμων. Μερικά είδη όπως ο *B. subtilis* αποσυνθέτει την πηκτίνη και πολυσακχαρίτες στους φυτικούς ιστούς, προκαλώντας αλλοίωση σε φρέσκα φυτικά προϊόντα. Κονσερβοποιημένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας αλλοιώνονται από τον *B. stearothermophilus* και ο *B. coagulans* προκαλεί αλλοίωση σε προϊόντα τομάτας. Ο *B. cereus* εμπλέκεται σε γαστρεντερίτιδες και ο *Bacillus anthracis* προκαλεί τη λοίμωξη του άνθρακα σε ζώα και ανθρώπους.

Εκτός από τη δυνατότητα που έχουν να προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων αλλά και να προκαλούν ασθένειες, μερικά *Bacillus* spp. μπορούν να είναι χρήσιμα στην παραγωγή των τροφίμων. Αποτελούν για παράδειγμα πηγή πρωτεολυτικών εν-

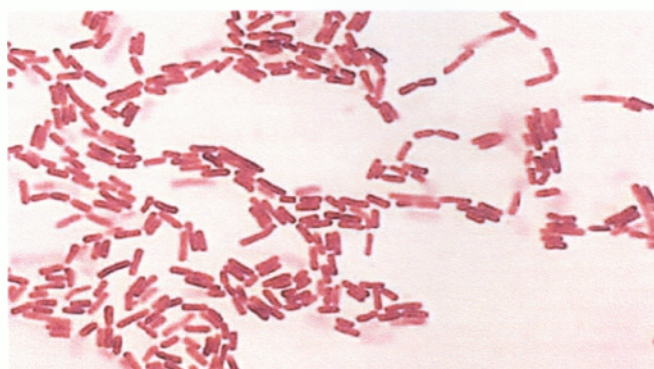
ζύμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να πήξουν το γάλα στην παραγωγή τυριού. Μερικοί βάκλιοι έχουν προταθεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μονοκυτταρικών πρωτεϊνών. Μερικά είδη είναι παθογόνα εντόμων που τα κάνει χρήσιμα στην βιομηχανία τροφίμων (Banwart 1981).

#### 1.7.2.1. *Bacillus coagulans*

Ανακαλύφθηκε το 1915 από τον Hammer και απομονώθηκε από αλλοιωμένες κονσέρβες τοματοχυμού και τοματοπολτού. Σχηματίζει ενδοσπόρια ωσειδή και κυλινδρικά τα οποία δεν διογκώνουν καταφανώς το σποριαγγείο. Αναπτύσσεται υπό αερόβιες αλλά και υπό αναερόβιες συνθήκες. Ζυμώνει την γλυκόζη και παράγει κατά κύριο λόγο L(+) γαλακτικό οξύ και μικρές ποσότητες 2,3-βουτανοδιόλης, ακετοΐνης, οξεικού οξέος και αιθανόλης, όχι όμως CO<sub>2</sub> ή H<sub>2</sub>. Μειώνει την τιμή του pH μέχρι την τιμή 4.0-5.0 ανάλογα με τα στελέχη που αναπτύσσονται μέσα στις κονσέρβες, αν η θερμική επεξεργασία δεν είναι ενδεδειγμένη. Προκαλεί το ξίνισμα της κονσέρβας χωρίς διόγκωση που είναι γνωστό στην κονσερβοποίηση με το όνομα flat sour από το 1920.



Εικόνα 4. Ανάπτυξη του *B. coagulans* σε στερεό θρεπτικό υλικό



Εικόνα 5. Χρώση Gram κυττάρων του *Bacillus coagulans*.

Μη επαρκείς επεξεργασίες προϊόντων τομάτας μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση «επίπεδης οξύνησης». Η αλλοίωση του τοματοχυμού από τον *B. coagulans* συνοδεύεται από πτώση του pH του τροφίμου, αλλά όχι από παραγωγή αερίου, ενώ η γεύση τέτοιων προϊόντων έχει χαρακτηριστεί ως «φαρμάκου», «φαινολική», και «φρουτώδης». Ο *B. coagulans* είναι κοινός στο χώμα και έτσι μπορεί να μολύνει άμεσα την γραμμή επεξεργασίας της τομάτας. Υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων χώματος και του αριθμού των σπορίων *B. coagulans* στις δεξαμενές νερού πλύσης των τοματών. Αυτά τα είδη μπορούν να πολλαπλασιαστούν πάνω σε εξοπλισμό πλυσίματος, εάν η διοχέτευση κρύου νερού δεν είναι κατάλληλη να προκαλέσει την αύξηση της θερμοκρασίας σε επίπεδα 27-32°C. Τα βλαστικά κύτταρα μερικών στελεχών του *B. coagulans* να αναπτυχθούν σε χυμό τομάτας με pH 4.2 αν και τα θερμικά επεξεργασμένα σπόρια μπορούν μόνο να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν εφόσον το pH του χυμού είναι πάνω από 4.3 (Roberts *et al.* 1998).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός των τιμών D και z των σπορίων των σπορογόνων μικροοργανισμών *B. coagulans* και *A. acidoterrestris*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μικροοργανισμούς στόχους της θερμικής επεξεργασίας των προϊόντων τομάτας και φρουτοσκευασμάτων αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι καμπύλες θερμικού θανάτου των σπορίων των μικροοργανισμών. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες θερμοκρασίες και χρόνοι θέρμανσης, σε εναιωρήματα σπορίων με διαφορετικές τιμές pH. Επίσης ο *B. coagulans* μελετήθηκε και σε προϊόντα τομάτας ενώ ο *A. acidoterrestris* σε πούλπα ροδάκινου. Οι μικροοργανισμοί αυτοί προκαλούν αλλοιώσεις στα εν λόγω προϊόντα. Ο *B. coagulans* αναπτύσσεται και σπορογονεί σε θερμοκρασία 55 °C και pH 4-5 και προκαλεί ομογαλακτική ζύμωση ενώ ορισμένα στελέχη του *A. acidoterrestris* παράγουν ουσίες που προσδίδουν δυσάρεστη οσμή στα φρουτοσκευάσματα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Υλικά και εξοπλισμός

- Φακός μικροσκοπίου Phase contrast
- Αντικειμενοφόρος πλάκα “NEUBAUER”
- Καλλιέργειες μικροοργανισμών
- Βαζάκια με 9.9 ml Ringer για διαδοχικές αραιώσεις (1/100)
- Δοκιμαστικά σωληνάκια με 9 ml Ringer για διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις
- Πιπέτες
- Tips
- Πιπέτες Paster
- Σωλήνες Φυγόκεντρου
- Μικροσύριγγες
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Ομογενοποιητής Vortex
- Υδατόλουτρο Polyscience 8002A12E

#### 3.2. Αναλυτική περιγραφή μεθοδολογίας:

##### A. Μικροοργανισμοί

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *B.coagulans* και *A. acidoterrestis* τα οποία παρελήφθησαν από την τράπεζα DSMZ (German Resource Centre for Biological Material) μικροοργανισμών της Γερμανίας (DSMZ – GmbH, Inhoffenstrab 7 B 38124 Braunschweig, GERMANY).

##### B. Προετοιμασία εμβολίου

Η προμήθεια των μικροοργανισμών έγινε σε λυοφιλιωμένη μορφή. Για την αναγέννηση των καλλιεργειών έγινε ενυδάτωση με την προσθήκη κατάλληλου, για τον εκάστοτε μικροοργανισμό, θρεπτικού υποστρώματος. Μετά από περίπου 30 λεπτά ακολουθούσε ανάδευση με Vortex και από το εναιώρημα πραγματοποιείτο κάτω από ασηπτικές συνθήκες εμβολιασμός. Ο *B. coagulans* επώαστηκε για 2 ημέρες στους 37 °C σε σωληνάκι που περιείχε 10 ml Nutrient broth και ο *A. acidoterrestis* επώαστηκε σε 10 ml medium 402 για 24-48 h στους 42 °C.



### **Γ. Εμβολιασμός – Έλεγχος σπορογένεσης:**

Αφού έγινε η επώαση και αναπτύχθηκαν τα στελέχη των μικροοργανισμών εμβολιάστηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για να σπορογενήσουν. Ο *B.coagulans* εμβολιάστηκε σε nutrient agar στο οποίο προστέθηκαν 0,06 g/l  $MnSO_4$  και 0,25 g/l  $K_2HSO_4$  και επώαστηκε στους 37 °C για 7-10 ημέρες. Για τον *A. acidoterrestris* χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα medium 402 agar ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.25 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g/l,  $(NH_4)_2SO_4$  0.2g/l, Yeast extract 2g/l, Glucose 5g/l,  $KH_2PO_4$  15 gr agar) το pH του οποίου ρυθμίστηκε στο 4. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 42 °C για 4-5 ημέρες. Μετά από την επώασή τους γινόταν έλεγχος του ποσοστού της σπορογένεσης τους με τη βοήθεια μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας το φακό αντίθετης φάσης (Phase contrast) (εξάρτημα το οποίο δημιουργεί δέσμη φωτός που διαθλάται από τα σπόρια με αποτέλεσμα να φαίνονται στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου πιο φωτεινά από τα βλαστικά κύτταρα).

### **Δ. Πειραματική διαδικασία δοκιμών θερμοανθεκτικότητας**

#### **1. Θερμοκρασία, χρόνος, pH, και μέσον**

Οι δοκιμές θερμοανθεκτικότητας των σπορίων του *A.acidoterrestris* πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 95, 98, και 100 °C, σε δύο διαφορετικά pH, 6.7 και 4, καθώς και σε ορό ροδάκινου σε θερμοκρασίες 90, 95 και 100 °C . Οι αντίστοιχες θερμοκρασίες για τη δοκιμή θερμοανθεκτικότητας των σπορίων του *B.coagulans* ήταν 100, 105 και 108 °C σε pH 6.7 και 4 καθώς και σε ορό τομάτας.

#### **2. Προετοιμασία ορού**

Ο ορός προέκυπτε από τοματοπολτό ή αντίστοιχα από πουρέ ροδάκινου οπού προστέθηκε ορισμένη ποσότητα πηκτινοληπτικού ενζύμου. Ακολούθησε διήθηση και ο ορός που προέκυψε συντηρήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία.

#### **3. Συλλογή σπορίων**

Μετά τη διαπίστωση ότι οι μικροοργανισμοί είχαν σπορογενήσει σε ικανοποιητικό ποσοστό (από 70% και πάνω) ακολουθούσε συλλογή των σπορίων που γινόταν με απόξυση των αποικιών του μικροοργανισμού από την επιφάνεια των τρυβλίων όπου είχαν αναπτυχθεί με στείρα αντικειμενοφόρο πλάκα και τη βοήθεια διάλυμα Ringer. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε η αρχική συγκέντρωση σπορίων η ο-

ποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη δημιουργία των εναιωρημάτων σπορίων με σκοπό τη μελέτη της θερμοανθεκτικότητας αυτών.

#### 4. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος

Μετά τη συλλογή των σπορίων (αρχική συγκέντρωση), με τον τρόπο που προαναφέρεται, παρασκευάζονταν εναιώρημα σπορίων (ενοφθάλμισμα) περιεκτικότητας  $10^7$ - $10^8$  σπόρια/ ml. Το ενοφθάλμισμα παρασκευάζονταν με φυγοκέντριση της αρχικής συγκέντρωσης σπορίων του μικροοργανισμού (6500 rpm για 10λεπτά). Μετά τη φυγοκέντριση γινόταν αραιώση του σχηματισθέντος ιζήματος σπορίων με την προσθήκη του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος.

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου των σπορίων του ενοφθαλμίσματος για την προετοιμασία του εναιωρήματος αυτών για τον προσδιορισμό της καμπύλης θερμοανθεκτικότητας έγινε με δυο τρόπους:

- a. Καταμέτρηση των σπορίων μετά από καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα και επώαση όπως προαναφέρεται στο κεφάλαιο εμβολιασμός και
- b. Με την τεχνική της απευθείας αρίθμησης με μικροσκόπιο

Στην πρώτη περίπτωση για να ενεργοποιηθεί η βλαστική ικανότητα των σπορίων αλλά και για θανάτωση των βλαστικών κυττάρων του μικροοργανισμού, ο κάθε μικροοργανισμός θερμαινόταν σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 80 °C. Στη συνέχεια έγιναν δεκαδικές αραιώσεις, εμβολιασμός σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και επώαση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο εμβολιασμός. Όσον αφορά την τεχνική της απευθείας αρίθμησης με μικροσκόπιο (άμεσος τρόπος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου) έγινε με τη βοήθεια της πλάκας neubauer. Ποσότητα 0.1 ml από την καλλιέργεια του μικροοργανισμού τοποθετείτο πάνω στην πλάκα neubauer και γινόταν με την τεχνική της απευθείας αρίθμησης με μικροσκόπηση η μέτρηση του φορτίου των σπορίων.

Όταν η απόκλιση του μικροβιακού φορτίου που μετρήθηκε με τον άμεσο τρόπο στο μικροσκόπιο και αυτού με έμμεσο τρόπο την καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα δεν ήταν μεγαλύτερη από ένα λογάριθμο θεωρήθηκε ότι το πειραματικό σφάλμα δεν ήταν μεγάλο και λήφθηκε υπόψη το φορτίο που μετρήθηκε με τον άμεσο τρόπο ως πραγματικό για την προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος. Στις περιπτώσεις όπου διαπιστώθηκε ότι η διαφορά ήταν μεγαλύτερη από ένα λογάριθμο έγινε προσαρμογή

της καμπύλης θερμικού θανάτου στο μικροβιακό φορτίο των σπορίων που μετρήθηκε με τον έμμεσο τρόπο.

#### **5. Προετοιμασία για την επίδραση της θερμοκρασίας.**

Από γυάλινες πιπέτες Paster αποσπάστηκε το ρύγχος μήκους περίπου 10 cm και σφραγίστηκε στη φλόγα από την μια πλευρά. Στη συνέχεια από την άλλη πλευρά του ρύγχους, με τη βοήθεια γυάλινης μικροσύριγγας, μεταφέρθηκε ποσότητα 0.1 ml ενοφθαλμισμού. Αμέσως κλείνονταν ερμητικά με τη βοήθεια φλόγας και τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο με την επιθυμητή θερμοκρασία. Η ευαισθησία του υδατόλουτρου ήταν 0.05 °C και ως μέσο θέρμανσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό λάδι το οποίο είχε την ικανότητα ανόδου της θερμοκρασίας μέχρι τους 170 °C. Οι χρόνοι θέρμανσης ήταν συνάρτηση της θερμοκρασίας προκειμένου να προκύψει ομαλή μείωση του αριθμού των σπορίων του εκάστοτε μικροοργανισμού. Για το σκοπό των πειραμάτων επιλέχθηκε ο προαναφερόμενος τρόπος θέρμανσης του εναιωρήματος των σπορίων διότι επέτρεπε μικρή ποσότητα υλικού να έρχεται σε επαφή με μεγάλη επιφάνεια με αποτέλεσμα την γρήγορη μεταφορά της θερμότητας.

#### **6. Μελέτη της καμπύλης θερμικού θανάτου των μικροοργανισμών**

Για τη μελέτη της καμπύλης θερμικού θανάτου σε κάθε θερμοκρασία έγιναν δειγματοληψίες σε έξι διαφορετικούς χρόνους, όπως φαίνεται στα διαγράμματα 1 – 24, με δυο επαναλήψεις σε κάθε χρόνο. Οι χρόνοι δειγματοληψίας καθώς και η συνολική διάρκεια της εφαρμογής καθορίζονταν από τη θερμοκρασία θέρμανσης του μικροοργανισμού. Σε χαμηλές θερμοκρασίες τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας και η διάρκεια εφαρμογής ήταν μεγαλύτερα σε σχέση με τα αντίστοιχα στις υψηλές θερμοκρασίες λόγω έντονης μείωσης του μικροβιακού φορτιού.

Σε κάθε δειγματοληψία έγινε καταμέτρηση του μικροβιακού φορτίου των σπορίων που επιβίωσαν από την επίδραση της θερμότητας.

#### **7. Καταμέτρηση των σπορίων μετά τη θερμική επεξεργασία**

Τα ρύγχη Paster στην συνέχεια τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινα, αποστειρωμένα σωληνάκια τα οποία περιείχαν 9.9 ml Ringer. Με αποστειρωμένη γυάλινο ράβδο γινόταν θραύση του γυάλινου ρύγχους και ομογενοποίηση του εναιωρήματος των σπορίων στο υλικό αραιώσης. Στην συνέχεια γίνονταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και ακολουθούσε εμβολιασμός στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για τον κά-

θε μικροοργανισμό. Τέλος γινόταν επώαση (η θερμοκρασία και οι χρόνοι για κάθε μικροοργανισμό προαναφέρονται), με σκοπό την ανάπτυξη των σπορίων που επιβίωσαν από τη θερμική επεξεργασία ώστε να μπορούν να καταμετρηθούν.

Η καταμέτρηση των σπορίων που επιβίωσαν από τη θερμική επεξεργασία έγινε στις δεκαδικές αραιώσεις στις οποίες ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν ήταν από 30 έως 300.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

### 4.1. Αποτελέσματα για τον *Alicyclobacillus acidoterresris*

Στον πίνακα 2 δίνονται οι τιμές D και z που προέκυψαν από τις καμπύλες θερμικού θανάτου του *A. acidoterrestis*. Παρατηρούμε πως σε σταθερό pH με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται το D. Αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία θέρμανσης του μικροοργανισμού τόσο μειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος θέρμανσης για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά ένα λογάριθμο. Επίσης παρατηρούμε ότι επίδραση στις τιμές D έχει το pH του εναιωρήματος των σπορίων αφού στις ίδιες θερμοκρασίες θέρμανσης των σπορίων σε αλκαλικό pH οι τιμές D ήταν μικρότερες. Στον ορό ροδάκινου, που προήλθε από το φυσικό προϊόν που επεξεργάζεται η βιομηχανία, παρατηρούμε ότι οι τιμές D στις θερμοκρασίες 95 και 100 °C, είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές του D σε pH 4 και 6.7. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στη σκέψη ότι για την επιλογή εφαρμογής της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στο προϊόν πρέπει να λάβουμε υπόψη τις τιμές του D έχει ο μικροοργανισμός στον ορό. Οι τιμές z είναι μεταξύ 8 και 10, στο εύρος αυτό κυμαίνονται οι τιμές z των μικροοργανισμών. Εξάιρεση αποτελεί η τιμή z σε pH 6.7. Στην περίπτωση αυτή έχουμε πολύ χαμηλή τιμή z και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ο μικροοργανισμός είναι οξεόφιλος και αναπτύσσεται καλύτερα σε όξινο pH.

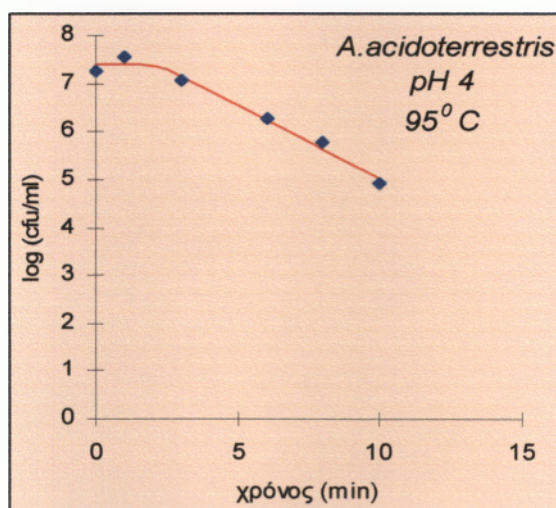
**Πίνακας 2.** Τιμές D και z του *A. Acidoterrestriis* σε διαφορετικές θερμοκρασίες και pH:

pH	T	D	z
4	95	3.34	9.17
4	98	1.13	
4	100	0.99	
6,7	95	3.57	5.95
6,7	98	0.95	
6,7	100	0.52	
Ορός ροδάκινου	90	22.47	8.16
Ορός ροδάκινου	95	7.22	
Ορός ροδάκινου	100	1.34	

Διάγραμμα 1

Καμπύλη θερμικού θανάτου του *A. acidoterrestriis* σε pH 4 στους 95°C:

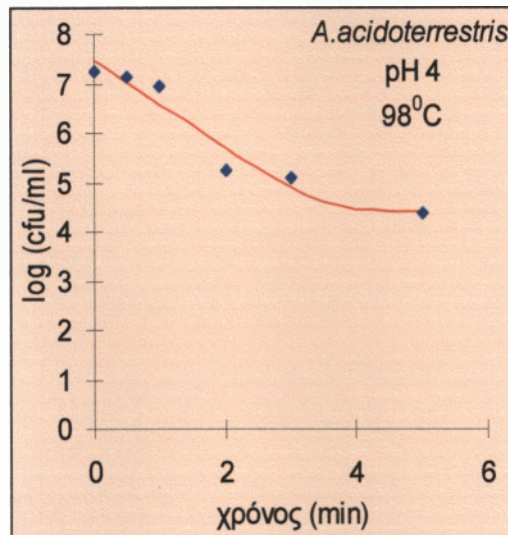
rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
0,29927	0.160034	0.9745	3.34



Διάγραμμα 2

Καμπύλη θερμικού θανάτου του *A. acidoterrestris* σε pH 4 στους 98°C:

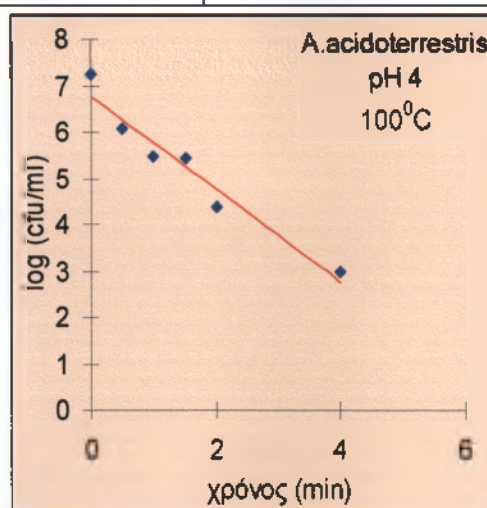
rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
0.8821	0.382783	0.906487	1.13



Διάγραμμα 3

Καμπύλη θερμικού θανάτου του *A. acidoterrestris* σε pH 4 στους 100°C:

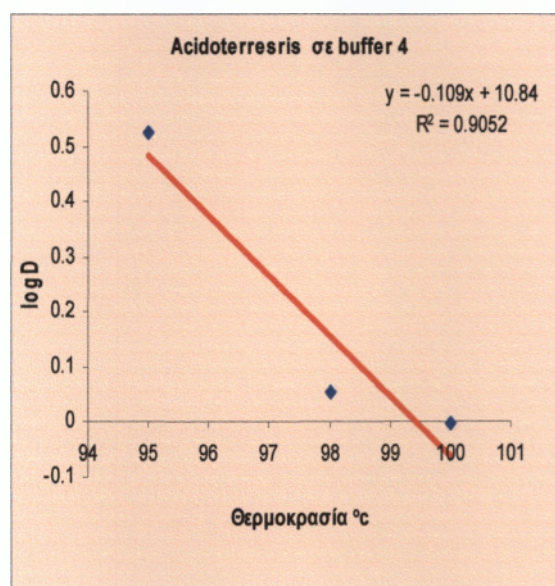
rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
1.00124	0.392887	0.927478	0.99



Στα τρία παραπάνω διαγράμματα βλέπουμε την καμπύλη επιβίωσης του *A. acidoterrestis* σε pH 4. Το  $se(\text{fit})$  είναι το τυπικό σφάλμα,  $R^2 \text{ stat}$  είναι ο συντελεστής συσχέτισης, και το  $rate$  εκφράζει το μέγιστο ρυθμό θανάτωσης του μικροοργανισμού. Η τιμή  $R^2 \text{ stat}$  δείχνει το κατά πόσο καλή είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην καμπύλη ενώ η τιμή  $rate$  χρησιμοποιείται για την εξαγωγή της τιμής  $D$  ( $D = 1/rate$ ).

#### Διάγραμμα 4

*A. acidoterrestis* σε buffer 4 διαγραμματική απεικόνιση, τιμές z:  
 $z = 1/0,109 = 9.17$

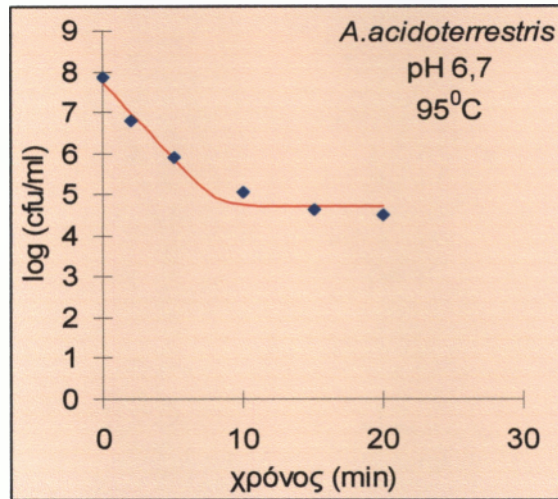


Η τιμή  $R^2$  είναι κοντά στην μονάδα που σημαίνει ότι η γραμμική προσαρμογή των τιμών  $D$  είναι ικανοποιητική και η τιμή  $z$  ανταποκρίνεται στις αντίστοιχες τιμές  $D_1$ .



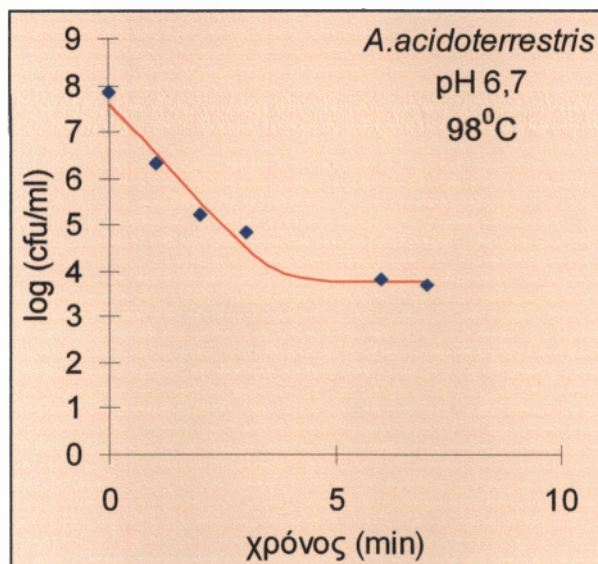
Διάγραμμα 5  
*A. acidoterrestis* σε pH 6.7 στους 95°C:

rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
0.37201	0.248249	0.964793	3.57



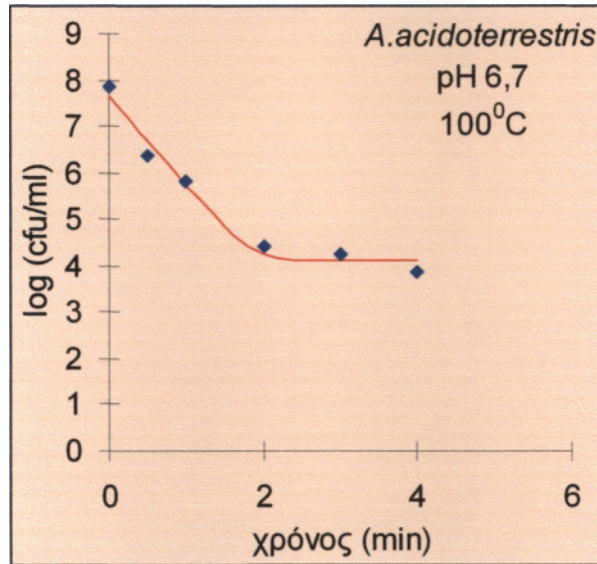
Διάγραμμα 6  
*A. acidoterrestis* σε pH 6.7 στους 98°C:

rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
1.04451	0.329217	0.956671	0.95



Διάγραμμα 7  
*A.acidoterrestis* σε pH 6.7 στους 100°C:

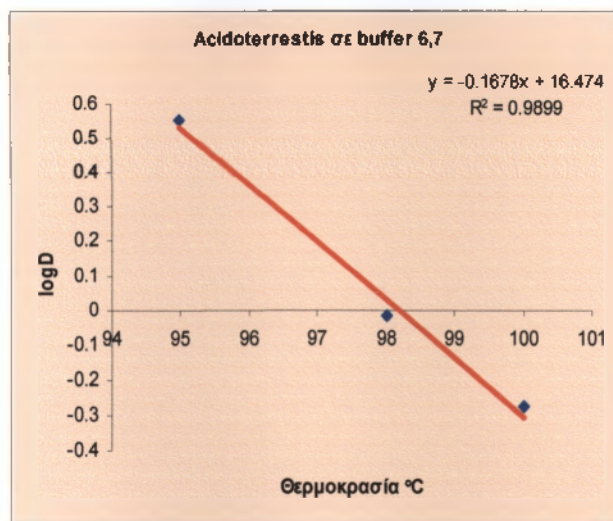
rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
1.88877	0.287222	0.964951	0.52



Ομοίως στα παραπάνω τρία διαγράμματα παρατηρούμε την σταδιακή μείωση του *A. acidoterrestis* σε pH 6.7. Παρατηρούμε ότι και στις τρεις περιπτώσεις αρχικά ο μικροοργανισμός μειώνεται και μετά ο πληθυσμός από κάποιο σημείο και μετά σταθεροποιείται.

Διάγραμμα 8  
*A.acidoterrestis* σε buffer 6.7 διαγραμματική απεικόνιση τιμές z:

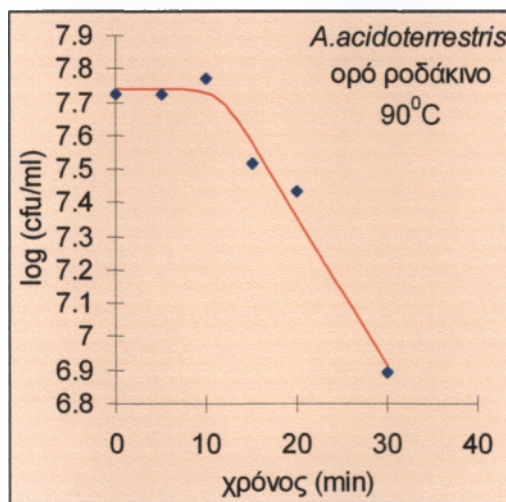
$$z = 1/0.1678 = 5.95$$



Όπως και στην περίπτωση του pH 4 (όξινο) έτσι και σε αυτή την περίπτωση η τιμή  $R^2$  είναι κοντά στην μονάδα που σημαίνει ότι η γραμμική προσαρμογή των τιμών D είναι ικανοποιητική και η τιμή z ανταποκρίνεται στις αντίστοιχες τιμές  $D_z$ .

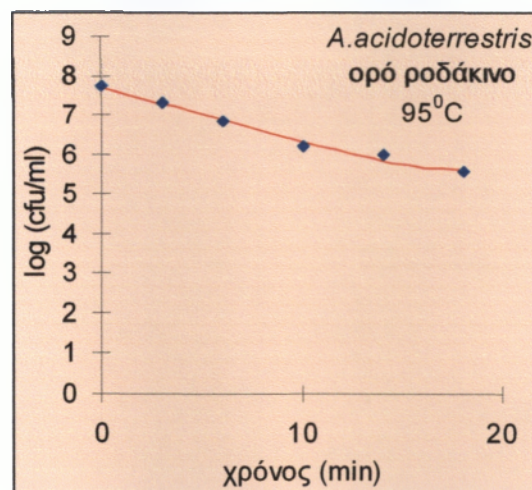
Διάγραμμα 9  
*A.acidoterrestris* σε ορό ροδάκινο στους 90°C:

rate	Se(fit)	$R^2_{stat}$	D
0.0445	0.062722	0.964101	22.47



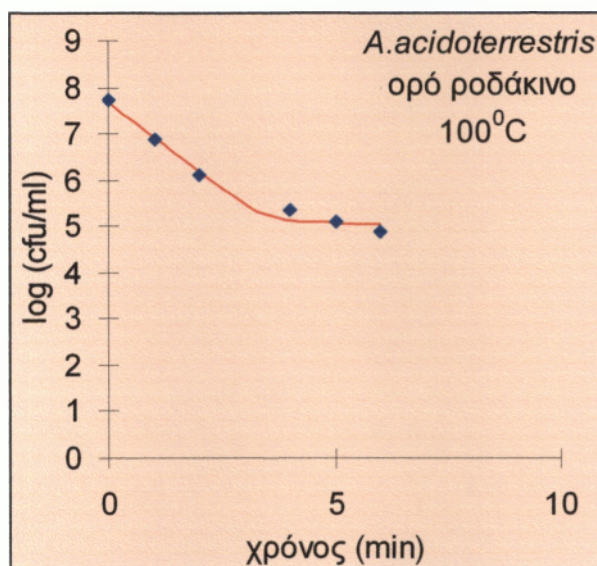
Διάγραμμα 10  
*A.acidoterrestris* σε ορό ροδάκινο στους 95°C:

rate	Se(fit)	$R^2_{stat}$	D
0.13845	0.109394	0.982538	7.22



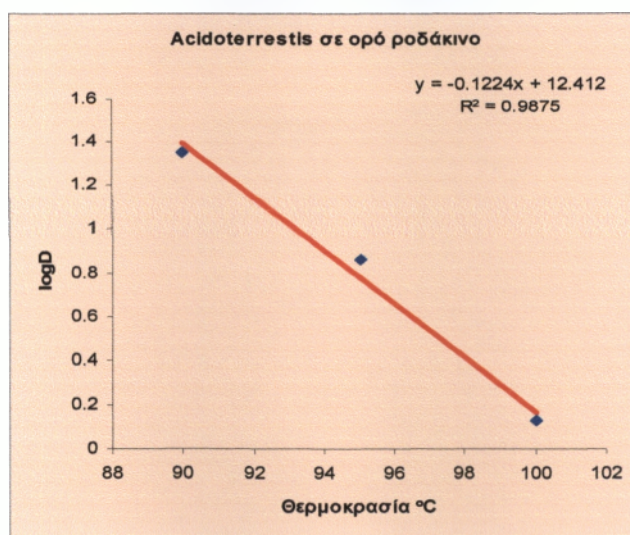
Διάγραμμα 11  
*A.acidoterrestriis* σε ορό ροδάκινο στους 100°C:

rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> _stat	D
0.7459	0.184224	0.972684	1.34



Στα τρία παραπάνω διαγράμματα βλέπουμε τη θανάτωση των σπορίων σε ορό ροδάκινου. Στην περίπτωση των 90 °C βλέπουμε ότι παρόλο που το πείραμα έγινε για 20 min ο πληθυσμός μειώνεται μόνο έναν λογάριθμο. Το ίδιο συμβαίνει και στους 95 °C ενώ αντίθετα οι 100 °C φαίνεται να επηρεάζουν πιο πολύ τον εν λόγω μικροοργανισμό αφού μειώνεται ο πληθυσμός κατά τρεις λογαρίθμους.

Διάγραμμα 12  
*A.acidoterrestriis* σε ορό ροδάκινο διαγραμματική απεικόνιση, τιμή z:  
 $z=1/0.1224=8.16$



Ομοίως με τις προηγούμενες περιπτώσεις η τιμή  $R^2$  είναι κοντά στην μονάδα που σημαίνει ότι η γραμμική προσαρμογή των τιμών D είναι ικανοποιητική και η τιμή z ανταποκρίνεται στις αντίστοιχες τιμές D

#### 4.2. Αποτελέσματα για τον *Bacillus coagulans*

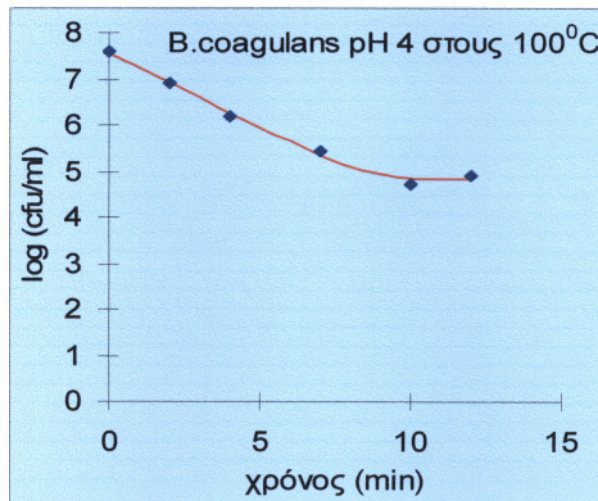
Στον πίνακα 3 φαίνονται οι τιμές D και z που προκύπτουν από την καμπύλη θερμικού θανάτου. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται η τιμή του D για το ίδιο pH. Οι τιμές z βλέπουμε ότι κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα.

**Πίνακας 3.** Τιμές D και z των καμπυλών θερμικού θανάτου του *B.coagulans*

pH	T	D	z
4	100	3.14	9.8
4	105	0.8	
4	108	0.50	
6.7	100	10.07	8.75
6.7	105	2.96	
6.7	108	1.21	
Ορός τομάτας	100	4.88	7.72
Ορός τομάτας	105	0.98	
Ορός τομάτας	108	0.459	

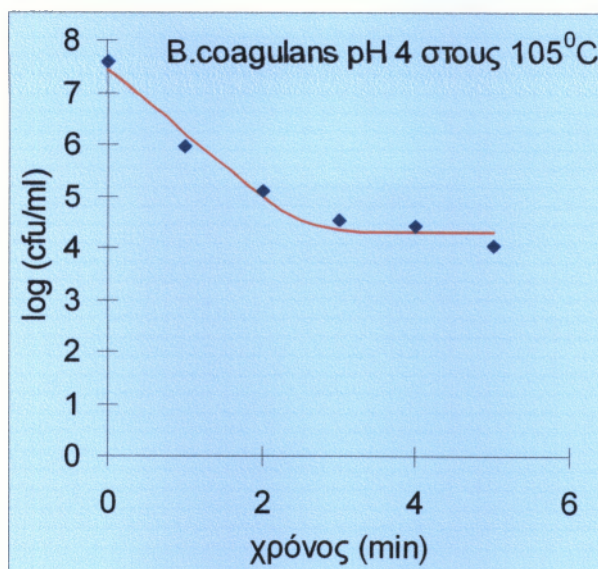
Διάγραμμα 13  
*B.coagulans* σε pH 4 στους 100°C:

rate	se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
0.31821	0.120088	0.988759	3.14



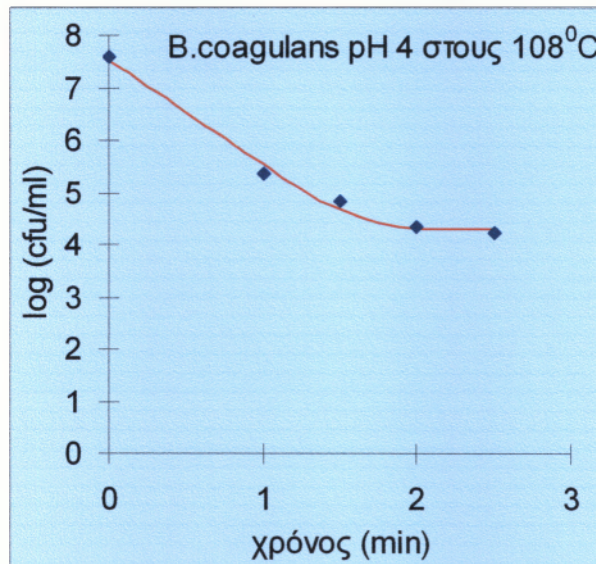
Διάγραμμα 14  
*B.coagulans* σε pH 4 στους 105°C:

rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
1.24917	0.247061	0.964678	0.8



Διάγραμμα 15  
*B.coagulans* σε pH 4 στους 108°C:

rate	Se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
1.98761	0.18041	0.982473	0.50

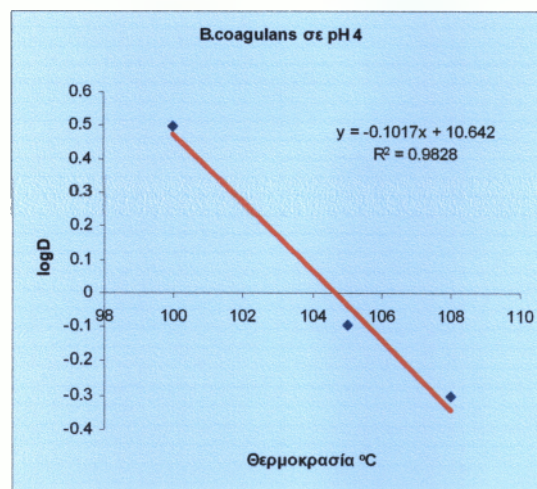


Στα παραπάνω διαγράμματα βλέπουμε την σταδιακή πτώση του μικροοργανισμού (καμπύλη θερμικού θανάτου) σε pH 4. Το se(fit) είναι το τυπικό σφάλμα, R<sup>2</sup> stat είναι ο συντελεστής συσχέτισης, και το rate εκφράζει το μέγιστο ρυθμό θανάτωσης του μικροοργανισμού.

Διάγραμμα 16

*B.coagulans* σε pH 4 διαγραμματική απεικόνιση, τιμές z:

$$z=1/0.1017=9.8$$

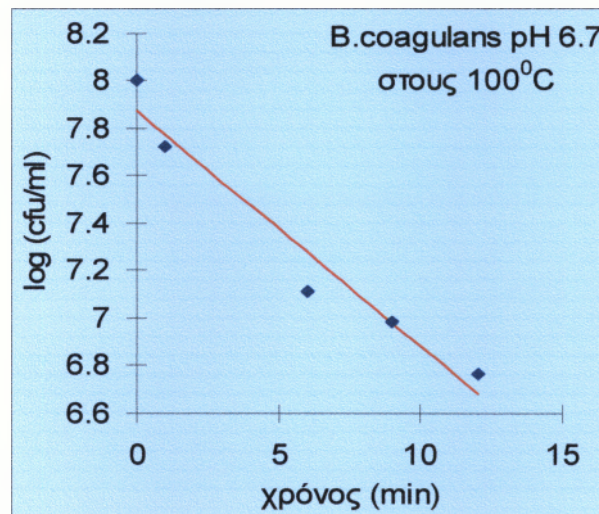


Οι τιμές D εμφανίζουν καλή προσαρμογή και δείκτης της καλής γραμμικής ανάλυσης αποτελεί η τιμή  $R^2$  που είναι κοντά στην μονάδα

Διάγραμμα 17

*B.coagulans* σε pH 6.7 στους 100°C:

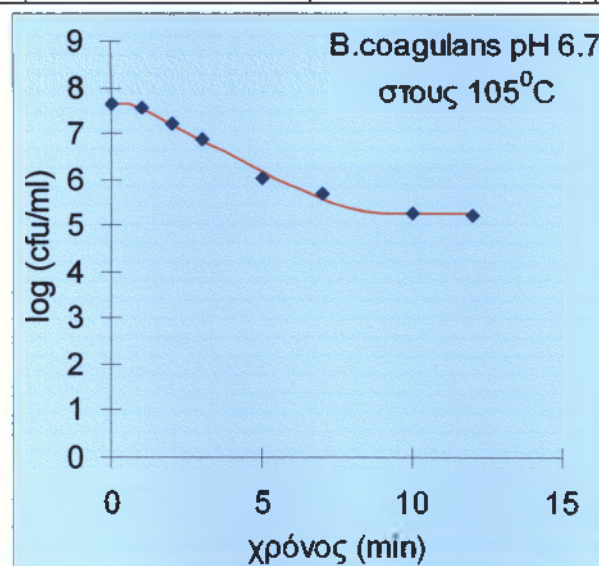
Rate	se(fit)	$R^2$ stat	D
0.09929	0.131664	0.936331	10.07



Διάγραμμα 18

*B.coagulans* σε pH 6.7 στους 105°C:

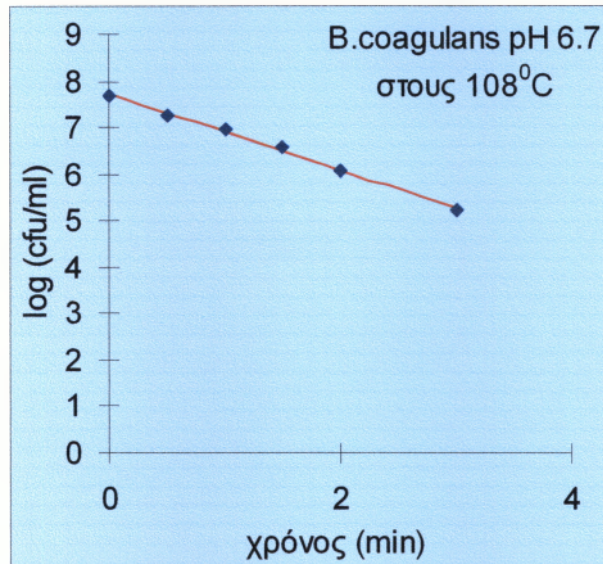
Rate	se(fit)	$R^2$ stat	D
0.33686	0.092985	0.991344	2.96





Διάγραμμα 19  
*B.coagulans* σε pH 6.7 στους 108°C:

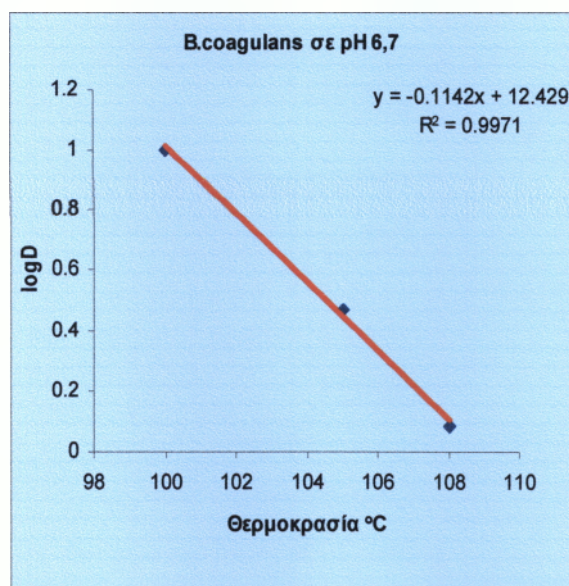
Rate	se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
0.82349	0.069948	0.993846	1.21



Ομοίως στα παραπάνω τρία διαγράμματα φαίνεται η σταδιακή θανάτωση του μικρο-οργανισμού σε buffer 6,7.

Διάγραμμα 20  
*B.coagulans* σε pH 6.7 διαγραμματική απεικόνιση, τιμές z:

$$z=1/0.1142=8.75$$

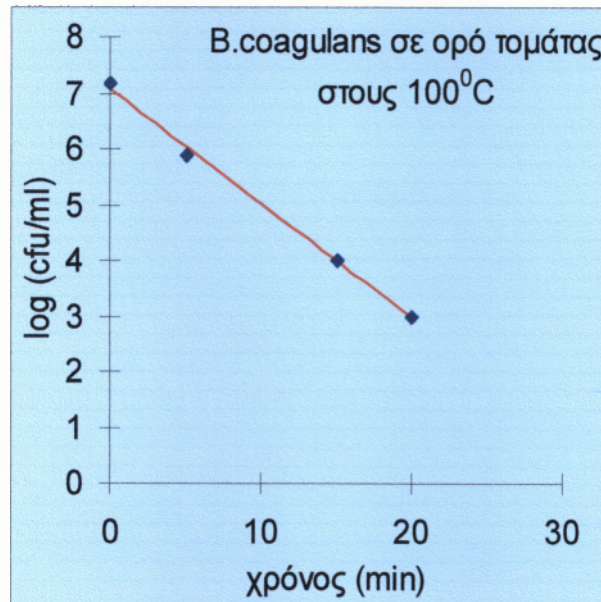


Η τιμή R<sup>2</sup> είναι 0,99 που σημαίνει ότι η προσαρμογή των τιμών είναι ικανοποιητική

Διάγραμμα 21

B.coagulans σε ορό τομάτας στους 100°C:

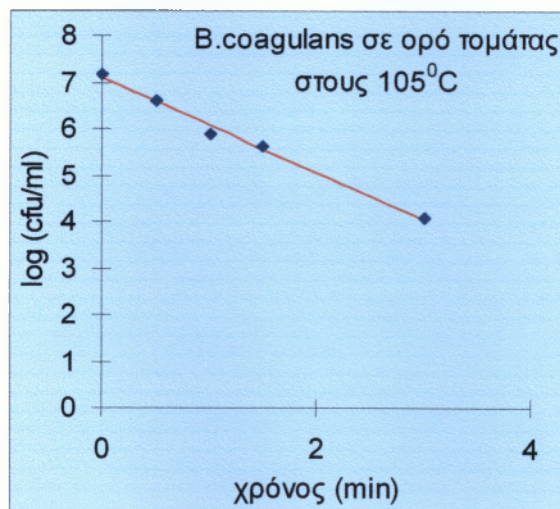
rate	se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
0.20477	0.136413	0.994694	4.88



Διάγραμμα 22

B.coagulans σε ορό τομάτας στους 105°C:

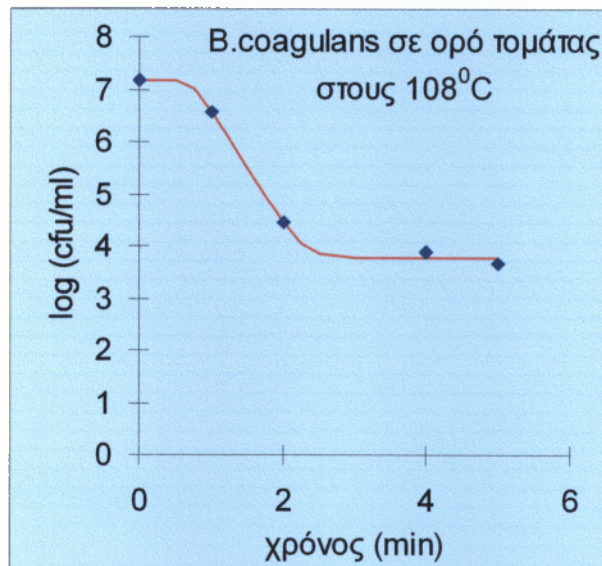
rate	se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
1.01536	0.130313	0.987683	0.98



Διάγραμμα 23

*B.coagulans* σε ορό τομάτας στους 108°C:

rate	se(fit)	R <sup>2</sup> stat	D
2.17534	0.176686	0.987999	0.459

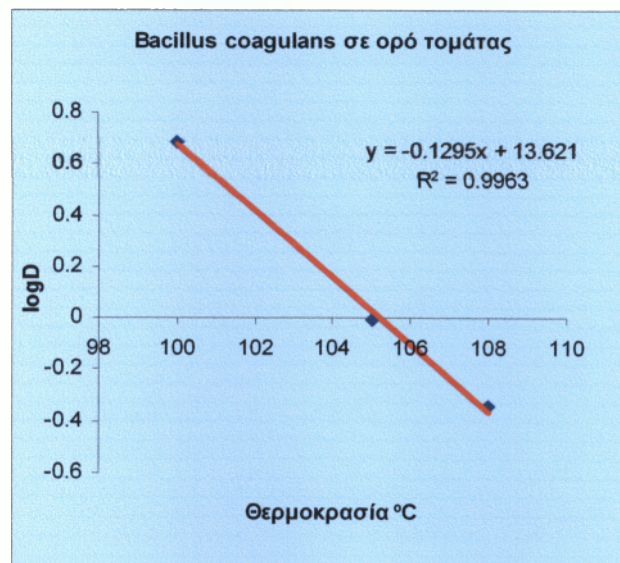


Στα παραπάνω τρία διαγράμματα μελετήθηκε ο *Bacillus coagulans* σε ορό τομάτας.

Διάγραμμα 24

*B.coagulans* σε ορό τομάτα διαγραμματική απεικόνιση, τιμές z:

$$z=1/0.1295=7.72$$



Η τιμή  $R^2$  είναι 0,99 που σημαίνει ότι η προσαρμογή των τιμών είναι ικανοποιητική.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για τον προσδιορισμό των τιμών D και z των μικροοργανισμών *A.acidoterrestis* επιλέχθηκαν οι θερμοκρασίες 90, 98 και 100° C και για τον *B.coagulans* 100, 105 και 108° C. Η επιλογή των θερμοκρασιών αυτών έγινε με κριτήριο τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες επεξεργασίας φρούτων και τομάτας για την εμπορική αποστείρωση των προϊόντων που παρασκευάζουν. Συγκεκριμένα για την παρασκευή πούλπας ροδάκινου στο σύστημα ασηπτικής συσκευασίας η θερμοκρασία της θερμικής επεξεργασίας κυμαίνεται στους 98 με 100° C. Ορισμένες βιομηχανίες εφαρμόζουν θερμοκρασίες 105-108 °C και για χρονικό διάστημα θέρμανσης 2-3 min. Στις βιομηχανίες παραγωγής προϊόντων τομάτας, και κυρίως τοματοπολτού, η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλότερη και κυμαίνεται στους 108-112° C και για χρονικό διάστημα 3 min ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσης του προϊόντος.

Οι Komitoroulou et. al. (1999) που μελέτησαν τον *A.acidoterrestis* σε χυμό πορτοκαλιού που είχε pH 3.9 στους 80 °C, 90 °C και 95 °C βρήκαν τιμές D 37.9, 10.3 και 3.59 με τιμή z=12.9. Οι Baumgart et al. (1997) μελέτησαν τον μικροοργανισμό σε χυμό πορτοκαλιού με pH 4.1 στους 95 °C με τιμή D=5.3 και z=9.5. Οι Splittstoesser et. al. (1997) που μελέτησαν τον μικροοργανισμό σε χυμό μήλου με pH 3.5 σε θερμοκρασίες 85 °C, 90 °C και 95 °C βρήκαν τιμές D 56, 23 και 2.8 αντίστοιχα και τιμή z =7.7. Από τους ίδιους ερευνητές μελετήθηκε ο μικροοργανισμός σε χυμό Grape fruit με pH 3.3 σε θερμοκρασίες 85 °C, 90 °C και 95 °C με τιμές D 57, 16 και 2.4 αντίστοιχα και z=7.2. Στη συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρούμε από τον πίνακα 2, ότι οι τιμές D και z που υπολογίσθηκαν δεν διαφέρουν από τα αποτελέσματα των άλλων ερευνητών λαμβάνοντας σημαντικά υπόψη ότι η μελέτη μας έγινε σε διαφορετικό προϊόν, pH εναιωρήματος και θερμοκρασίες.

Επίσης από τον πίνακα 2 διαπιστώνουμε ότι στις θερμοκρασίες 98 και 100 °C τόσο στην περίπτωση που το pH του εναιωρήματος ήταν 4 αλλά και στον ορό οι απαιτούμενοι χρόνοι θέρμανσης για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά ένα log δεν υπερβαίνουν τα 80 sec (1 min και 20 sec D=1.34). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τόσο οι θερμοκρασίες θερμικής επεξεργασίας όσο και οι χρόνοι εφαρμογής τους που συνήθως εφαρμόζονται στην πούλπα ροδάκινου είναι πολύ μεγάλοι και θα μπορούσαν να μειωθούν επιτυγχάνοντας το ίδιο αποτέλεσμα της εμπορικής αποστείρωσης. Όπως προαναφέρεται οι εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες είναι

συχνά 105-108 °C για χρονικό διάστημα 2-3 min. Προτείνεται η διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης με σκοπό την διερεύνηση του μικροβιακού φορτίου των σποριών του μικροοργανισμού *A.acidoterrestris* στα φρούτα που επεξεργάζονται από τις βιομηχανίες φρούτων. Η γνώση αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μελέτης μας θα συμβάλουν άμεσα στον ακριβή καθορισμό των θερμοκρασιών και του χρόνου θέρμανσης για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα της εμπορικής αποστείρωσης με το χαμηλότερο ενεργειακό κόστος.

Από τη μελέτη του μικροοργανισμού *B.coagulans* από τον πίνακα 3 διαπιστώνουμε ότι η αύξηση του pH έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού. Οι τιμές D σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν σε pH 6.7 είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές D σε pH 4 και στον ορό τομάτας. Η αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε σχέση με την αύξηση του pH παρατηρήθηκε και από τους ερευνητές Palop et. al. (1996), οι οποίοι μελέτησαν επίσης τον μικροοργανισμό σε pH 4, 6, και 7 σε διάφορες θερμοκρασίες. Στο pH 4 στους 105.1 °C βρήκαν D=1.7 στους 107.9 °C βρήκαν τιμή D=0.88. Στο pH 6 στους 108°C βρήκαν τιμή D=1.8 και στους 111 °C βρήκαν τιμή D=0.50. Τέλος στο pH 7 στους 107 °C βρήκαν τιμή D=4.2 και στους 111 °C βρήκαν τιμή D=1.7. Οι Mallidis et. al. (1991) μελέτησαν τον *B.coagulans* σε τοματοχυμό σε τρεις θερμοκρασίες: στους 100 °C βρήκαν τιμή D=4.15 στους 105 °C βρήκαν τιμή D=1.15 και στους 108°C βρήκαν τιμή D=0.55. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα της μελέτης μας προσομοιάζουν με τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων ερευνητών. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και αυτά των άλλων ερευνητών (Mallidis et al. 1991) γίνεται φανερό ότι οι βιομηχανίες επεξεργασίας τομάτας μπορούν να μειώσουν τη θερμοκρασία και το χρόνο θέρμανσης που εφαρμόζουν κατά τη θερμικής επεξεργασίας του τοματοπολτού. Όπως προαναφέρεται οι εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες είναι 108-112 °C για χρονικό διάστημα 3 min. Η πρόταση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ρεαλιστική λαμβάνοντας υπόψη ότι τα δοχεία αναμονής πριν την θερμική επεξεργασία στα συστήματα ασηπτικής συσκευασίας έχουν καταργηθεί με αποτέλεσμα το μικροβιακό φορτίο του τοματοπολτού να είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτό πριν καταργηθούν τα δοχεία αναμονής.

## 6. Βιβλιογραφία

### A) Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Αρβανιτογιάννης, Ι.Σ., 2001. Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης και Συσκευασίας Τροφίμων. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Βασιλειάδου, Δ., 1996. Σημειώσεις μαθήματος «Γενική Μικροβιολογία». Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- Κοτζεκίδου-Ρούκα, Π., 1993, Μικροβιολογία Τροφίμων, Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
- Μπαλατσούρας, Γ., 2006, Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις: Έμβρυο, Αθήνα.

### B) Ξενόγλωσση βιβλιογραφία:

- Alavi, S.H., Puri, V.M., and Mohtar, R.H., 2001. A model for predicting the growth of *Listeria monocytogenes* in packaged whole milk, *Journal of Food Process Engineering* 24:231.
- Adams M.R. and Moss M.O., 1999, *Food Microbiology*, Royal Society of Chemistry.
- Banwart, G.J. 1981. Basic Food Microbiology (2nd Ed.). 65.
- Baranyi J., Roberts T. A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277.
- Baumgart, J. 2003. Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In: Handbook of culture media for food microbiology. Eds: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. and Baird, R.M. Elsevier B.V.
- Baumgart, J., Husemann, M. and Schmidt, C. 1997. *Alicyclobacillus acidoterrestris* occurrence, importance, and detection in beverages and raw materials for beverages. *Flussiges Obst* 64:178.
- Bernaerts, K., Versyck, K.J., and Van Impe, J.F., 2000. On the design of optimal dynamic experiments for parameter estimation of a Ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperatures, *International Journal of Food Microbiology* 54:27.
- Bovill, R.A., Bew, J., and Baranyi, J., 2001. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. II. Rapidly changing temperatures, *International Journal of Food Microbiology* 67:131.

- Brock, T.D., Martinko, J.M., and Madigan, M.T., 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Pearson Prentice Hall
- Chang S. and Kang D., 2004. *Alicyclobacillus* spp in the Fruit Juice Industry: History, Charecteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. *Critical Reviews in Microbiology* **30**:55.
- Dahl K. M., 1999. Encyclopedia of food microbiology (1<sup>st</sup> Ed.).
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., & Altan, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology* **10**:47.
- Garcia-Gimeno, R.M. and Zurera-Cosano, G., 1997. Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life, *International Journal of Food Microbiology* **36**:31.
- Garcia-Gimeno, R.M., Castillejo-Rodriguez, A.M., Barco-Alcala, E., and Zurera-Cosano, G., 1998. Determination of packaged green asparagus shelf-life, *Food Microbiology* **15**:191.
- Gould W. G., 1999. Encyclopedia of food microbiology (1<sup>st</sup> Ed.).
- Grijspeerdt, K. and Varnolleghem, P., 1999. Estimating the Parameters of the Baranyi-model for Bacterial Growth. *Food Microbiology* **16**(6):593.
- Hippchen, B., Roll, A., & Poralla, K., 1981. Occurrence in soil of thermoacidophilic Bacilli possessing  $\omega$ -cyclohexane fatty acid and hopanoids. *Archives of Microbiology* **129**:53.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology. Springer.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., and Adams, M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juice and its control by nicin. *International Journal of Food Science Technology* **12**: 68.
- Mallidis, C.G., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G. and Katsaboxakis, C., 1991. Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science and Technology* **25**:442.
- McClure, P.J., Blackburn, C.W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P., and Walker, S.J., 1994. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *International Journal of Food Microbiology* **23**:265.

- Palop, A., Raso, J., Condon, S. and Sala, F.J., 1996. Heat resistance of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*: Effect of sporulation temperature in food with various acidulants. *Journal of Food Protection* **59**(5):487.
- Pettipher, G.L., Osmudson, M.E, and Murphy, J.M. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* **24**:185.
- Pin, C., Baranyi, J., and de Fernando, G., 2000. Predictive model for the growth of *Yersinia enterocolitica* under modified atmospheres, *Journal Applied Microbiology* **88**:521.
- Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguchi, S.Y., and Manfio, G.P. 1997. Detection of acidothermophilic Bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing* **7**:350.
- Pontius, A.J., Rushing, J.E., and Foegeding, P.M. 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores as affected by various pH values and organic acid. *Journal of Food Protection* **61**:41.
- Roberts, T.A., Pitt, J.I. and Farkas, A. 1998. Microorganisms in foods. ICMSF. Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic and Professional Publishers, London.
- Silva F.V.M. and Gibbs P., 2001, *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit product and design of pasteurization processes, *Trends in Food Science and Technology* **12**:68.
- Silva, F.M. and Silva., C.L.M., 1999. Color changes in thermally processed cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) puree: critical times and kinetics modeling. *International Journal of Food Science and Technology* **34**(1):87.
- Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C. & Silva, C.L.M.. 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology* **51**(2/3):95.
- Splitstoeser, D.F., Lee, C.Y., and Churey, J.J. 1997. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food, Environment and Sanitation* **18**:585.
- Sutherland, J.P., Aherne, A., and Beaumont, A.L., 1996. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride, and carbon dioxide, *International Journal of Food Microbiology* **30**:359.



- Valik, L. and Pieckova, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity, *International Journal of Food Microbiology* **63**:11.
- WHO (World Health Organisation), 1988. Food Irradiation, A technique for preserving and improving the safety of food. WHO, Geneva.
- Xiong R., Xie G., Edmondson A.S., Linton R.H., Sheard M.A., (1999) Comparison of Baranyi model with the modified Gompertz equation for modeling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology* 16, 269.
- Yamazaki, K., Teduka, H., and Shinano, H. 1996. Isolation and identification of  *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60**:534.

### **Ιστοσελίδες:**

[www.ifr.bbsrc.ac.uk/safety/DMfit/default.html](http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/safety/DMfit/default.html)

[www.textbookbacteriology.net](http://www.textbookbacteriology.net)