



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
**“Μελέτη υγιεινής επιφανειών με τη μέθοδο της ATP
βιοφωταύγειας”**

MSc Thesis

“Monitoring surface hygiene with ATP bioluminescence method”

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κουτρούλη Στεφανία
Koutrouli Stefania

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Δρ. Μπατρίνου Ανθιμία
Dr.Batrinou Anthimia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Food Sciences

Department of Food Science and Technology

Master of Science

FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc Thesis

Monitoring surface hygiene with ATP bioluminescence method

KOUTROULI STEFANIA

21016

stefaniakout@outlook.com.gr

SUPERVISOR

Dr.Batrinou Anthimia

AIGALEO 2023

Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **‘Μελέτη υγιεινής επιφανειών με τη μέθοδο της ΑΤΡ βιοφωταύγειας’** που παρουσιάστηκε από την **Κουτρούλη Στεφανία**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα επιβλέποντος: Μπατρίνου Ανθιμία

Βαθμίδα/Ιδιότητα: Επίκουρη Καθηγήτρια

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα μέλους επιτροπής: Κοντελής Σπυρίδων

Βαθμίδα/Ιδιότητα: Επίκουρος Καθηγητής

Ψηφιακή Υπογραφή

Όνομα μέλους επιτροπής: Τσάκαλη Ευσταθία

Βαθμίδα/Ιδιότητα: Επίκουρη Καθηγήτρια

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κουτρούλη Στεφανία του Δημητρίου Κουτρούλη, με αριθμό μητρώου 21016 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η δηλούσα,



Κουτρούλη Στεφανία

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Κουτρούλη Στεφανία

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefania Koutrouli', written in a cursive style.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κα. Μπατρίνου Ανθιμία για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε το διάστημα αυτό. Επιπλέον, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους για την στήριξη και κατανόηση που μου προσέφεραν.

Περίληψη

Η διασφάλιση της υγιεινής των επιφανειών διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη διατήρηση τόσο της ασφάλειας όσο και της ποιότητας των τροφίμων . Τον τελευταίο καιρό, για την αξιολόγηση της καθαριότητας των επιφανειών και της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών και των μέσων καθαρισμού και απολύμανσης έχει παρατηρηθεί μια ολοένα αυξανόμενη χρήση της μεθόδου της ATP βιοφωταύγειας, μία ταχεία μέθοδος εκτίμησης της υγιεινής επιφανειών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος της υγιεινής επιφανειών και της δράσης δύο απολυμαντικών παραγόντων (χλωρίνης 10% και ενός βιομηχανικού απολυμαντικού χωρίς χλώριο) με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας, κάνοντας παράλληλα μια σύγκριση με την κλασική μέθοδο μικροβιολογικής καλλιέργειας σε τρυβλία.

Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε δύο επιμέρους πειράματα χρησιμοποιώντας ως βασική επιφάνεια μελέτης, ένα μεταλικό ορθογώνιο ταψί στο οποίο μελετήθηκε το ποσοστό αποτελεσματικότητας της απολύμανσης στην λεία επιφάνεια και στις γωνίες του πειραματικού αυτού μοντέλου. Οι επιφάνειες (λεία επιφάνεια και γωνίες) εμβολιάστηκαν με τον μικροοργανισμό-στόχο, την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Στο ένα από τα δύο πειράματα έγινε προσθήκη ελαίου για την μελέτη της δράσης των απολυμαντικών παραγόντων και της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης παρουσία πιθανών υπολειμάτων τροφίμων. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά πως οι λείες επιφάνειες ευνοούν τη διαδικασία της απολύμανσης, ανεξαρτήτου απολυμαντικού παράγοντα καθώς παρατηρήθηκαν ποσοστά αποτελεσματικότητας απολύμανσης >98% σε όλες τις περιπτώσεις, απουσία ή παρουσία λιπαρής ύλης και με τις δύο μεθόδους μέτρησης. Αντίθετα, οι γωνίες είχαν χαμηλότερα ποσοστά αποτελεσματικότητας απολύμανσης που ήταν κατά μέσο όρο 84,2% παρουσία λαδιού και 94,4% απουσία λαδιού με την καλλιεργητική μεθοδο και 93,7% και 88,5% αντίστοιχα με την μέθοδο βιοφωταύγειας. Η παρουσία λαδιού στις γωνίες φάνηκε να δυσκολεύει την απολύμανση σύμφωνα με τα αποτελέσματα της καλλιεργητικής μεθόδου. Σχετικά με τους απολυμαντικούς παράγοντες, η χλωρίνη 10% φαίνεται να αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό παράγοντα σε σχέση με το βιομηχανικό

απολυμαντικό έχοντας συγκριτικά σε όλες τις μετρήσεις την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα απολύμανσης. Επίσης, μία σημαντική παρατήρηση ήταν ότι μετά την απολύμανση, η μέθοδος βιοφωταύγειας μετρούσε υπολειμματικό βιολογικό φορτίο >10.000 RLU ειδικά στις γωνίες, γεγονός που δείχνει ότι η επιφάνεια δεν έχει καθαριστεί επαρκώς και μπορεί να αποτελέσει εστία επαναμόλυνσης. Συμπερασματικά, α) οι επιφάνειες με γωνίες απολυμαίνονται δυσκολότερα από ότι οι λείες επιφάνειες και β) η μέθοδος της ATP βιοφωταύγειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τις βιομηχανίες για έλεγχο της υγιεινής επιφανειών λόγω του άμεσου αποτελέσματος που παρέχει, ωστόσο συστήνεται ο συνδιασμός της μεθόδου αυτής με την κλασσική μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία για την πιο αποτελεσματική εκτίμηση της υγιεινής.

Abstract

Ensuring the cleanliness of surfaces plays a vital role in preserving both the safety and quality of food. Lately, there has been an increasing use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence detection to assess surface cleanliness and the effectiveness of cleaning and disinfection procedures.

The aim of this study is to examine surface hygiene and the action of two different disinfectants agents (bleach 10% and an industrial disinfectant without chlorine) using the ATP bioluminescence method, while making a comparison with the conventional agar plate culture method.

The experimental procedure was divided into two sub-experiments using as a basic study surface, a metal rectangular pan on which the disinfection efficiency rate on the smooth surface and corners of this experimental model was studied. The surfaces (smooth surface and corners) were inoculated with the target microorganism, *Saccharomyces cerevisiae* yeast. In one of the two experiments, oil was added to study the action of disinfectants and the effectiveness of disinfection in the presence of possible food residues. The results initially showed that smooth surfaces favoured the disinfection process, regardless of the disinfectant agent as disinfection efficiencies >98% were observed in all cases, in the absence or presence of fatty matter by both measurement methods. In contrast, corners had lower disinfection efficiencies which averaged 84.2% in the presence of oil and 94.4% in the absence of oil with the culture method and 93.7% and 88.5% respectively with the bioluminescence method. The presence of oil in the corners seemed to make disinfection more difficult according to the results of the culture method. Regarding the disinfectants, 10% bleach seemed to be the most effective disinfectant compared to the industrial disinfectant having comparatively in all measurements the highest disinfection efficiency. Also, an important observation was that after disinfection, the bioluminescence method measured a residual biological load >10,000 RLU especially in the corners, indicating that the surface has not been adequately cleaned and may be a source of re-contamination. In conclusion, a) surfaces with corners are more difficult to disinfect than smooth surfaces and b) the

ATP bioluminescence method can be used by industries to monitor the hygiene of surfaces due to the direct result it provides, however, it is recommended to combine this method with the conventional agar plate culture method for the most effective hygiene assessment.

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright.....	5
Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract	9
Εισαγωγή	15
Κεφάλαιο 1. Ζύμες.....	17
1.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά των ζυμών	17
1.2 Ταυτοποίηση και ταξινόμηση ζυμών	20
1.3 Ζύμες αλλοίωσης τροφίμων	21
1.4 Ενδείξεις αλλοίωσης από ζύμες.....	25
1.4.1 Παραγωγή αερίων	26
1.4.2 Ορατές ενδείξεις ζυμών αλλοίωσης	27
1.4.3 Off-flavors and off-odors.....	28
1.5 Κατηγορίες ζυμών αλλοίωσης	29
1.5.1 <i>Zygosaccharomyces spp</i>	30
1.5.2 <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	32
1.5.3 <i>Yarrowia lipolytica (Candida lipolytica)</i>	34
Κεφάλαιο 2. Υγιεινή επιφανειών και μέθοδοι καθαρισμού-απολύμανσης.....	36
2.1 Υγιεινή επιφανειών	36
2.1.1 Τρόπος δράσης καθαριστικών και απολυμαντικών μέσων	38
2.2 Καθαρισμός και ενώσεις καθαρισμού	40
2.2.1 Κατηγορίες καθαριστικών.....	40
2.2.2 Μέθοδοι καθαρισμού.....	45
2.3 Απολύμανση και απολυμαντικά μέσα	50
2.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά απολυμαντικού μέσου	50
2.3.2 Απολυμαντικά μέσα.....	52
Κεφάλαιο 3. Μέθοδος ATP Βιοφωταύγειας.....	59

3.1 Βιοφωταύγεια	59
3.2 5'-Αδενοσινιο-τριφωσφορικό οξύ (ATP).....	59
3.3 Η αντίδραση ATP βιοφωταύγειας.....	61
3.3.1 Η σημασία της λουσιφερίνης στην αντίδραση βιοφωταύγειας	62
3.4 Χρήση της μεθόδου ATP βιοφωταύγειας στη βιομηχανία τροφίμων	65
3.4.1 Χρήση μεθόδου ATP βιοφωταύγειας για τον έλεγχο μεθόδων καθαρισμού	66
3.4.2 Συσχέτιση μονάδων RLU με CFU	68
3.5 Προϋποθέσεις- Περιορισμοί της μεθόδου	70
Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος	73
4.1 Σκοπός.....	73
4.2 Υλικά και μέθοδοι.....	74
4.2.1 Λουμινόμετρο.....	75
4.2.2 Μεταλλικό ταψί – μοντέλο επιφανειών	76
4.2.3 Turbo yeast.....	77
4.3 Μεθοδολογία πειράματος.....	78
4.3.1 Προετοιμασία αρχικού εμβολίου του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
4.3.2 Παρασκευή υποστρωμάτων	78
4.3.3 Διαδοχικές αραιώσεις και εμβολιασμός τρυβλίων.....	79
4.3.4 Μεθοδολογία πειράματος με απουσία λαδιού	81
4.3.5 Μεθοδολογία πειράματος με χρήση λιπαρής ύλης	82
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα	83
5.1 Αποτελέσματα πειράματος παρουσία λαδιού	83
5.1.1 Αποτελέσματα μεθόδου Βιοφωταύγειας	83
5.1.2 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία	84
5.2 Αποτελέσματα πειράματος απουσία λαδιού	87
5.2.1 Αποτελέσματα μεθόδου Βιοφωταύγειας	87
5.2.2 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία	88
Κεφάλαιο 6. Σχολιασμός-Συζήτηση	91

6.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία.....	91
6.2 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μεθόδου βιοφωταύγειας.....	92
6.3 Συμπεράσματα.....	93
Βιβλιογραφία.....	95

Εισαγωγή

Η μέθοδος της ATP βιοφωταύγειας έχει κερδίσει σημαντική αναγνώριση στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της αποτελεσματικότητας και της αποδοτικότητάς της στην παρακολούθηση των προγραμμάτων υγιεινής. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση του ATP, του πρωταρχικού φορέα ενέργειας που βρίσκεται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών. Χρησιμοποιώντας το ένζυμο λουσιφεράση ως καταλύτη, το ATP αντιδρά με τη λουσιφερίνη, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση ενός λουμινομέτρου. Η αντίδραση αυτή είναι ενδεικτική της παρουσίας μικροβιακής βιομάζας στο δείγμα, δημιουργώντας άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ATP και της μικροβιακής μόλυνσης. Η μέθοδος βιοφωταύγειας για τη διερεύνηση του ATP σε στερεές επιφάνειες έχει υιοθετηθεί ευρέως στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων, ιδίως στο πλαίσιο μετρήσεων ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP). Η μέθοδος αυτή προσφέρει μια πολύτιμη εναλλακτική λύση σε σχέση με τις χρονοβόρες και ενεργοβόρες παραδοσιακές μικροβιολογικές δοκιμές, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση της καθαριότητας των επιφανειών, που περιλαμβάνει την ανίχνευση οργανικών υπολειμμάτων και μικροβιακών προσμίξεων.

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία εξετάστηκαν οι ζυμομύκητες τροφίμων καθώς είναι γνωστό πως έχουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο ως μικροβιακοί εταίροι σε διάφορους τύπους τροφίμων και ποτών, τόσο στην ακατέργαστη όσο και στην επεξεργασμένη μορφή τους, καθώς και κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ζύμωσης. Ωστόσο, οι μολυσματικές ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν και να επηρεάσουν δυσμενώς τρόφιμα προκαλώντας δυσάρεστες γεύσεις και οσμές.

Με σκοπό την πρόληψη της εξάπλωσης επιβλαβών μικροοργανισμών είναι πολύ σημαντικός παράγοντας η διασφάλιση της υγιεινής των επιφανειών με τη χρήση των πιο κατάλληλων απολυμαντικών μέσων αλλά και μεθόδων καθαρισμού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της δράσης δυο διαφορετικών απολυμαντικών παραγόντων κατά του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο μικροοργανισμού, η

οποία εξετάζεται με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας συγκριτικά με την κλασσική μέθοδο καλλιέργειας σε τρυβλία.

Κεφάλαιο 1. Ζύμες

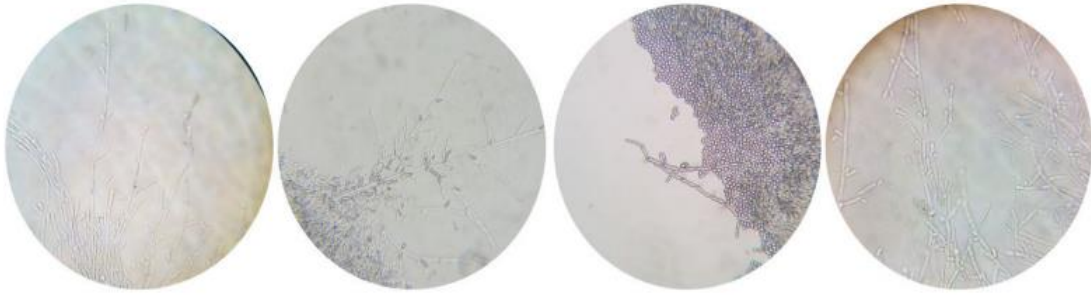
1.1 Ορισμός και χαρακτηριστικά των ζυμών

Οι ζύμες είναι ένας τύπος ευκαρυωτικών οργανισμών που ανήκουν στην ομάδα οργανισμών που είναι γνωστή ως "μύκητες", η οποία περιλαμβάνει επίσης τις μούχλες και τα μανιτάρια (Kurtzman & Fell, 1998).

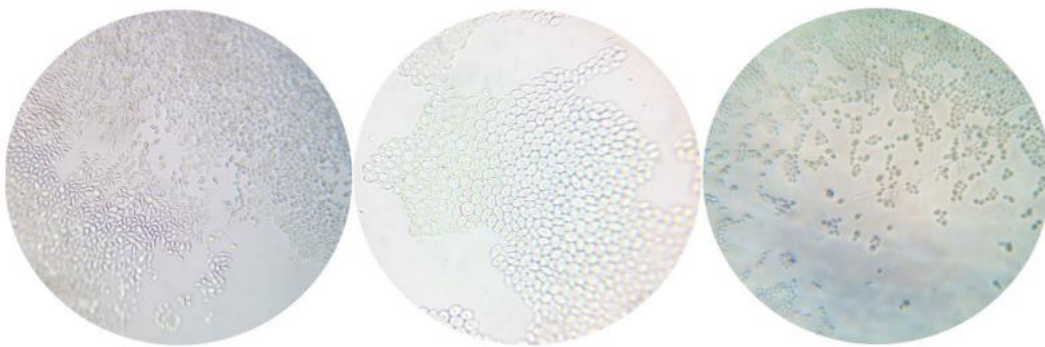
Το κύτταρο των ζυμών είναι τυπικό ευκαρυωτικό το οποίο μοιάζει με κύτταρο των ανωτέρων φυτών. Παρουσιάζει μια διαφορά στη σύσταση της κύριας ουσίας του κυτταρικού τοιχώματος, η οποία στις ζύμες είναι η γλυκάνη ενώ στα ανώτερα φυτά είναι η κυτταρίνη. Επιπλέον, διαφέρει ως προς την κατανομή των ριβοσωματίων, καθώς τα ριβοσωμάτια των ζυμών βρίσκονται διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τα ριβοσωμάτια των ανωτέρων φυτών τα οποία είναι προσαρτημένα στο ενδοπλασμικό δίκτυο (Walker, 1998). Οι ζύμες έχουν ένα σύνθετο κυτταρικό τοίχωμα με πάχος 100-200nm το οποίο αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, μαννάνη, γλυκάνη και σε μικρότερο ποσοστό από χιτίνη και ποσότητες πρωτεϊνών, λιπιδίων και φωσφόρου σε ανόργανη μορφή. Η αναλογία των προαναφερθέντων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος της εκάστοτε ζύμης, την ηλικία του κυττάρου και τις συνθήκες ανάπτυξης (Walker, 1998).

Μελετώντας την αναπαραγωγή των ζυμομυκήτων διακρίνουμε πως γίνεται με δύο τρόπους, είτε με τον αγενή τρόπο πολλαπλασιασμού 'asexual', είτε πολλαπλασιάζονται εγγενώς (φυλετική αναπαραγωγή). Ο αγενής πολλαπλασιασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την διαδικασία της εκβλάστησης (budding), κατά την οποία βλαστικά με τη βοήθεια μεμονωμένων κυττάρων που εκκολάπτονται ή, σπανιότερα, διαιρούνται με κυτταρική διαίρεση είτε ακόμα με σχηματισμό κωνιδίων, είτε μέσω κυτταρικής διαίρεσης (Madigan et al., 2015).

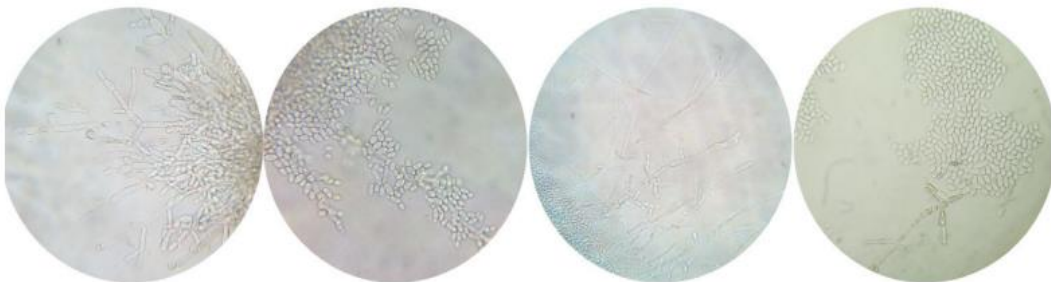
Η αναπαραγωγή με κυτταρική διαίρεση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των *Endomycetaceae* και των *Schizosaccharomycoides* (Βλ.Εικ.1.1). Τα γένη *Saccharomyces* και *Candida* παρουσιάζουν το μοτίβο εκβλάστησης (Βλ.Εικ.1.2). Η αναπαραγωγή με σχηματισμό κωνιδίων είναι χαρακτηριστικό του γένους *Sterigmatomyces* (Βλ.Εικ.1.3) (Phale, 2018).



Εικόνα 1.1 Πολλαπλασιασμός ζυμομυκήτων με κυτταρική διαίρεση (Phale, 2018)

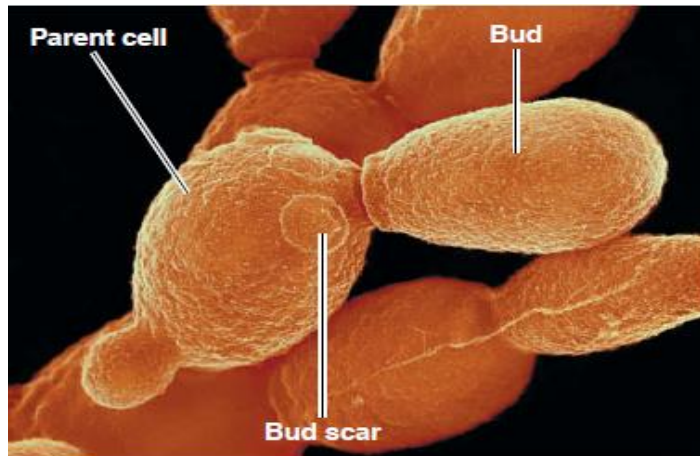


Εικόνα 1.2 Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με εκβλάστηση (Phale, 2018)



Εικόνα 1.3 Αναπαραγωγή ζυμομυκήτων με σχηματισμό κονιδίων (Phale, 2018)

Πιο αναλυτικά, σχετικά με την αναπαραγωγική διαδικασία, στην εκβλάστηση το μητρικό κύτταρο σχηματίζει μια προεξοχή (οφθαλμός) στην εξωτερική του επιφάνεια. Καθώς ο οφθαλμός επιμηκύνεται, ο πυρήνας του μητρικού κυττάρου διαιρείται και ο ένας πυρήνας μεταναστεύει στο οφθαλμό. Έπειτα, υλικό του κυτταρικού τοιχώματος τοποθετείται μεταξύ του οφθαλμού και του μητρικού κυττάρου και ο οφθαλμός τελικά αποσπάται. Με τον καιρό, ένα κύτταρο ζύμης, είναι ικανό να παράξει έως και 24 θυγατρικά κύτταρα με εκβλάστηση (Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018).



Εικόνα 1.4 Μια εκκολαπτόμενη ζύμη: Μικρογραφία του *Saccharomyces cerevisiae* κατά την εκβλάστιση (Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018)

Οι ζυμομύκητες που αναπαράγονται με κυτταρική διαίρεση (fission), όπως ο *Schizosaccharomyces*, διαιρούνται ομοιόμορφα για την παραγωγή δύο νέων κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, το μητρικό κύτταρο επιμηκύνεται, ο πυρήνας του διαιρείται και έτσι παράγονται δύο νέα κύτταρα απόγονοι. Αύξηση του αριθμού των ζυμομυκήτων κυττάρων σε ένα στερεό μέσο παράγει μια αποικία παρόμοια με μια βακτηριακή αποικία (Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018).

Στα διάφορα στάδια της εγγενής αναπαραγωγής (ή αλλιώς αναπαραγωγή φυλετικά), η οποία πραγματοποιείται με την διαδικασία σύζευξης, δύο κύτταρα συγχωνεύονται δημιουργώντας έτσι ένα νέο κύτταρο, τον ζυγωτή. Από τον ζυγωτή αυτόν, στη συνέχεια παράγονται τα νέα κύτταρα των ζυμομυκήτων (Madigan et al., 2015).

Ωστόσο, οι ζύμες διαφοροποιούνται από τα βακτήρια από το μεγαλύτερο μέγεθος τους, από το σφαιρικό, κυλινδρικό ή ελλειπτικό σχήμα του κυττάρου τους καθώς και από την παρουσία εσωτερικών κυτταρικών δομών. Ένα τυπικό κύτταρο ζύμης έχει διάμετρο 5-8μm, όμως, κάποια είδη παρουσιάζουν διαφορετικό μέγεθος που μπορεί να φτάσει τα 20-50μm (Jay, 2000).

Όντας ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι ζυμομύκητες αναπαράγονται με πιο αργό ρυθμό από τα περισσότερα βακτήρια και, συνεπώς, δεν ανταγωνίζονται σε περιβάλλοντα που ευνοούν τα βακτήρια, δηλαδή, τιμές pH κοντά στο ουδέτερο ή σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Από κοινού με τους νηματοειδείς μύκητες, πολλοί ζυμομύκητες είναι ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι πιο πιθανό να είναι ενεργοί σε όξινα και υγρά περιβάλλοντα

από αλλού. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει στους ζυμομύκητες να αυξάνουν γρήγορα τον αριθμό τους σε υγρά περιβάλλοντα, τα οποία ευνοούν τη διασπορά των μονοκύτταρων μικροοργανισμών χωρίς όμως να παράγουν επιβλαβείς τοξίνες, σε αντίθεση με ορισμένες μούχλες και μανιτάρια. Από την άλλη πλευρά, η αναπαραγωγή ως μονοκύτταρα περιορίζει την εξάπλωση ή τη διείσδυση σε στερεές επιφάνειες, όπου οι νηματοειδείς μύκητες πλεονεκτούν (Bevilacqua et al., 2017).

Επιπλέον, παρατηρείται πως αρκετοί ζυμομύκητες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο φως του ήλιου και στην αποξήρανση και απαντώνται συχνά στη φύση στις επιφάνειες των φύλλων, των φρούτων και των λαχανικών (I.Pitt & Hocking, 2009).

1.2 Ταυτοποίηση και ταξινόμηση ζυμών

Τα είδη των ζυμών μπορούν να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν σύμφωνα με διάφορα κριτήρια τα οποία βασίζονται στη μορφολογία των κυττάρων (π.χ. τρόπος κυτταρικής διαίρεσης και σχήμα σπορίων), τη φυσιολογία (π.χ. δοκιμές ζύμωσης σακχάρων), τη μοριακή βιολογία (π.χ., φυλογένεση του ριβοσωμικού DNA, επανασύνδεση DNA, σύνθεση βάσεων DNA και υβριδισμός, καρυότυπος, τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD) και ενισχυμένος πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων (AFLP) των αλληλουχιών D1/D2 του 26S rDNA) και την ανοσολογία (π.χ. ανοσοφθορισμός). Για την κατηγοριοποίηση νέων ειδών, οι ταξινομητές ζύμης βασίζονται όλο και περισσότερο σε αναλύσεις μοριακής αλληλουχίας (Walker, 2009).

Σύμφωνα με τους Pitt και Hocking, οι ζυμομύκητες είναι ένα ετερογενές σύνολο συχνά αρκετά άσχετων μυκήτων. Ειδικότερα, οι συγκεκριμένοι ανέφεραν σχεδόν 680 είδη ζυμομυκήτων, χωρισμένα σε πάνω από 90 γένη εκ των οποίων: 57 ταξινομήθηκαν ως ασκομύκητες, 36 ως βασιδιομύκητες και 2 μη ταξινομημένα. Επιπλέον, βάση βιβλιογραφίας απαριθμούνται 99 είδη ζυμομυκήτων που υπάρχουν στα τρόφιμα φυσικά, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των ποτών, του κρασιού, της μπύρας, του κρέατος, των γαλακτοκομικών προϊόντων, των προϊόντων που έχουν χαμηλή aw αλλά και χαμηλό pH. Βέβαια, αρκετές από αυτές τις ζύμες αναπτύσσονται περιορισμένα σε επεξεργασμένα τρόφιμα, λόγω της μηδενικής

τους ανοχής στη μειωμένη aw, τη θερμική επεξεργασία ή και τα συντηρητικά. Έξαιρούνται όμως ορισμένα είδη, τα οποία διαθέτουν μία ή περισσότερες ανεπιθύμητες ιδιότητες στα τρόφιμα, και λόγω αυτού ταξινομούνται ως ζυμομύκητες αλλοίωσης (I.Pitt & Hocking, 2009).

1.3 Ζύμες αλλοίωσης τροφίμων

Οι ζύμες είναι ευραίως γνωστό πως αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα μικροοργανισμών που αξιοποιούνται ευρέως από τον άνθρωπο και τη βιομηχανία τροφίμων. Από τα ζυμωμένα τρόφιμα και ποτά μέχρι τα αρτοσκευάσματα, οι ζύμες αποτελούν βασικό μέρος της τροφικής αλυσίδας και συνεχίζουν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της βιομηχανίας τροφίμων.

Ορισμένες από τις χρήσεις των ζυμών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Εφαρμογή	Ζύμη
Ζύμωση μπύρας	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιού	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiginnis</i> , <i>Saccharomyces rosei</i>
Παραγωγή κρασιού	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Γαλακτωματοποίηση	<i>Candida lipolytica</i>
Παραγωγή αιθανόλης	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Παραγωγή πρωτεΐνης	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i>
Παραγωγή μαννιόλης	<i>Torulopsis mannifaciens</i>
Παραγωγή D-αραβιτόλης	<i>Candida diddensiae</i>
Παραγωγή ξυλιτόλης	<i>Torulopsis candida</i>
Ζύμωση D-ξυλόζης	<i>Candida sheatae</i> ,

	<i>Pichia stipitis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>
--	---

Πίνακας 1.1 Χρήσεις των ζυμών στα τρόφιμα, ποτά και σε ζυμώσεις (Kurtzman & Fell, 1998).

Οι ζυμομύκητες μπορούν να έχουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιδράσεις στα προϊόντα ζύμωσης που καταναλώνονται από ανθρώπους και ζώα. Είναι βασικά μέρη της καθημερινής ζωής του ανθρώπου με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε τυριά και ψωμί, καθώς και σε κρασί, μπίρα και άλλα αλκοολούχα προϊόντα ζύμωσης (Bevilacqua et al., 2017). Πέρα από το γεγονός ότι έχουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ζυμωμένων (ζυμούμενων) τροφίμων και ποτών, οι ζύμες αποτελούν επίσης την πηγή ενός ευρέου φάσματος πολύτιμων προϊόντων και χρήσιμων συστατικών που παρασκευάζονται από τους διάφορους κλάδους της βιοτεχνολογίας (Bevilacqua et al., 2017) (Deak, 2007). Ωστόσο, τα οφέλη τους για τον άνθρωπο, αντισταθμίζονται σε κάποιο βαθμό από τον επιβλαβή ρόλο που διαδραματίζουν στην αλλοίωση των τροφίμων παράγοντας δυσάρεστες γεύσεις, οσμές και άλλα ανεπιθύμητα αισθητηριακά χαρακτηριστικά, με παραδείγματα το γιαούρτι, του χυμούς φρούτων, τις σαλάτες και τη μαγιονέζα (Bevilacqua et al., 2017).

Παρακάτω βλέπουμε αναλυτικά κάποιες σημαντικές ζύμες αλλοίωσης τροφίμων με τις αντίστοιχες ιδιότητές τους.

Ζύμες	Σημαντικές Ιδιότητες
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Παραγωγή αρωματικών ουσιών σε μπίρα, μηλίτη και αναψυκτικά
<i>Candida krusei</i>	Ανθεκτικότητα στα συντηρητικά: σχηματισμός φιλμ σε ελιές, τουρσιά και σάλτσες
<i>C. parapsilosis</i>	Λιπόλυση, ζυμωτική- προκαλεί αλλοίωση σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των

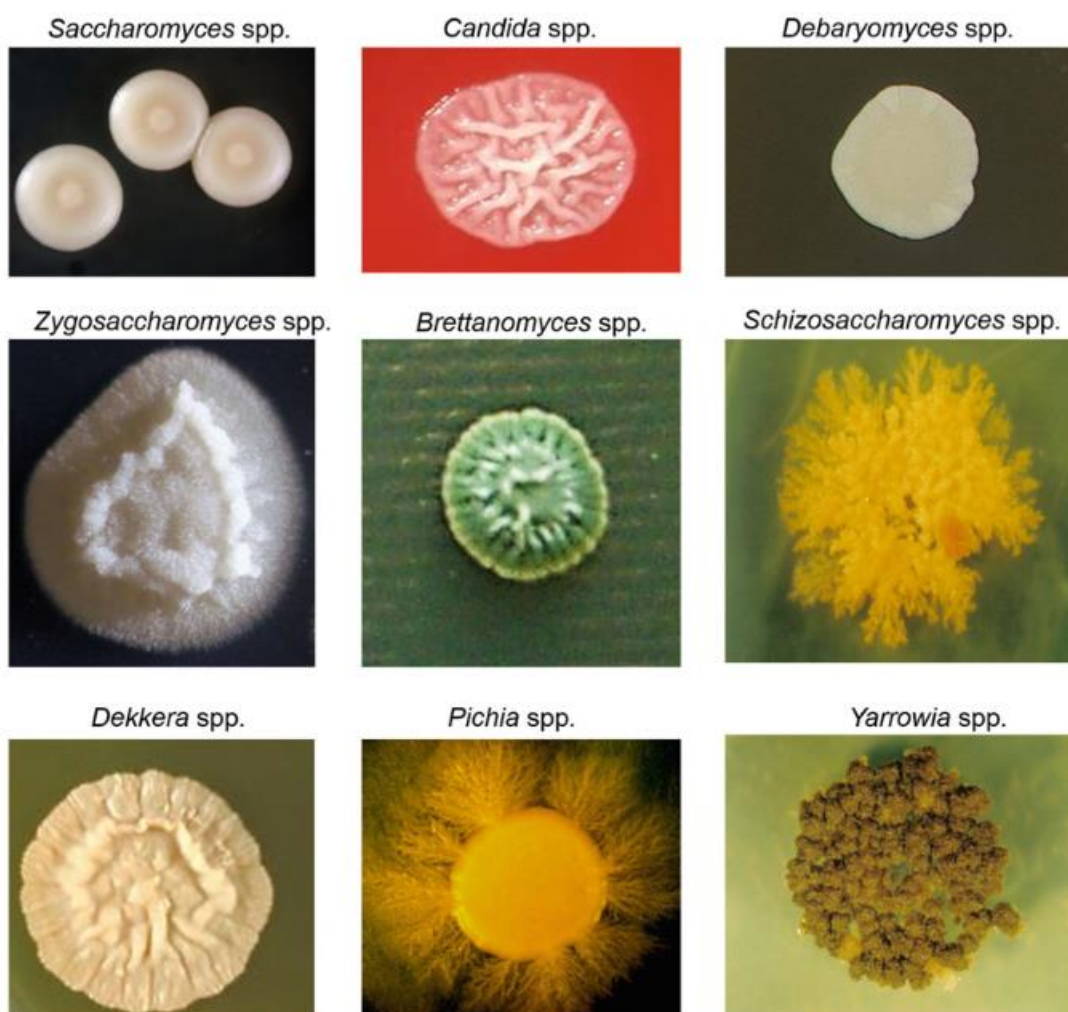
	τυριών, των μαργαρίνων, γαλακτοκομικά και οπωροκηπευτικά
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ανάπτυξη σε χαμηλές υδατικές δραστηριότητες σε τρόφιμα συντηρημένα με NaCl, ιδίως αλατισμένο κρέας
<i>Kazachstania exigua</i>	Μέτρια ανθεκτικότητα στα συντηρητικά-συχνή παρουσία σε άλμες ελιάς, σπάνια αιτία αλλοίωσης του ξινολάχανου, των χυμών, των γαλακτοκομικών προϊόντων ή των αναψυκτικών.
<i>Kloeckera apiculata</i>	Αλλοίωση νωπών και μεταποιημένων φρούτων
<i>Pichia anomala</i>	Αλλοίωση επεξεργασμένων φρούτων και γιαουρτιών που περιέχουν φρούτα
<i>P. membranifaciens</i>	Ανθεκτικότητα στα συντηρητικά, σχηματισμός φιλμ σε ελιές, τουρσιά και σάλτσες
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Αλλοίωση γαλακτοκομικών προϊόντων-περιστασιακή αλλοίωση φρέσκων φρούτων
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Κοινή επιμόλυνση τροφίμων- μερικές φορές ζυμωτική αλλοίωση αναψυκτικών- ορισμένα στελέχη ανθεκτικά στα συντηρητικά
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ανθεκτικότητα στα συντηρητικά- σχετικά σπάνια ζύμη αλλοίωσης
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Ανθεκτικότητα στα συντηρητικά-ζυμωτική αλλοίωση όξινων, υγρών συντηρημένων προϊόντων, όπως χυμοί,

	σάλτσες, μηλίτες και κρασιά
<i>Z. bisporus</i>	Ιδιότητες ενδιάμεσες μεταξύ των <i>Z. bailii</i> και <i>Z. rouxii</i> .
<i>Z. rouxii</i>	Ανάπτυξη σε εξαιρετικά χαμηλές υδατικές δραστηριότητες- ζυμωτική αλλοίωση συμπυκνωμάτων χυμού, μελιού, μαρμελάδες, ζαχαρωτά, συσκευασμένα αποξηραμένα φρούτα κ.λπ.

Πίνακας 1.2 Σημαντικές ζύμες αλλοίωσης και οι ιδιότητές τους (I.Pitt & Hocking, 2009)

Οι ζύμες είναι ικανές να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, εάν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές. Υπό αυτές τις συνθήκες, η ανάπτυξη και οι μεταβολικές δραστηριότητες των ζυμομυκήτων στα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσουν σε εκτεταμένες οικονομικές απώλειες για τη βιομηχανία τροφίμων. Για τον έλεγχο της αλλοίωσης των τροφίμων από ζύμες, οι φυσικοχημικές και βιολογικές παράμετροι που σχετίζονται με διάφορα τρόφιμα θα πρέπει να προσαρμόζονται ώστε να αδρανοποιούν ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη των ζυμών. Πιο ειδικά, η ανάπτυξη των ζυμών εξαρτάται από διάφορους φυσικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η οξύτητα, η συγκέντρωση του νερού και ο αερισμός. Τα περισσότερα είδη ζυμομυκήτων προτιμούν ζεστά, αραιά, ζαχαρούχα, όξινα και αερόβια περιβάλλοντα. Οι βιομηχανικές και εργαστηριακές ζύμες, όπως τα στελέχη *S. cerevisiae*, αναπτύσσονται καλύτερα μεταξύ 20 και 30 βαθμών Κελσίου. Το εύρος θερμοκρασιών για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 50°C. Η υψηλή συγκέντρωση νερού είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων. Ωστόσο, ορισμένες ζύμες, όπως η *Zygosaccharomyces spp.*, είναι ανεκτικές στο χαμηλό δυναμικό νερού που προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ή αλάτων και είναι γνωστές ως οσμοανεκτικές ή ξηροανεκτικές ζύμες. Επιπλέον, οι ζύμες ευδοκιμούν σε όξινο pH μεταξύ 4,5 και 6,5. Τα οργανικά οξέα, όπως το οξικό και το γαλακτικό οξύ, είναι πιο επιβλαβή για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων από ό,τι τα ανόργανα οξέα, όπως το

υδροχλωρικό οξύ, επειδή τα μη διαχωρισμένα οργανικά οξέα μπορούν να μειώσουν το ενδοκυτταρικό pH (Walker, 2009).



Εικόνα 1.5 Μορφολογία αποικιών των κύριων γενών ζυμομυκήτων που σχετίζονται με την αλλοίωση υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (Magnani, 2021).

1.4 Ενδείξεις αλλοίωσης από ζύμες

Η αλλοίωση των τροφίμων από ζύμες είναι μια δυσάρεστη και ανεπιθύμητη συνθήκη, η οποία γίνεται αντιληπτή από τον άνθρωπο καθώς παρουσιάζει κάποιες εμφανείς ενδείξεις. Το πιο συχνό πρόβλημα είναι η αλλοίωση που συνδέεται με την υπερβολική παραγωγή αερίων (διοξείδιο του άνθρακα) και συνδέεται άμεσα με ζυμωτικά είδη όπως *Zygosaccharomyces bailii*, *S. cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces ludwigii*, ή *Candida parapsilosis* και *Candida pseudointermedia*.

Έπειτα, στα πιο εμφανή συμπτώματα αλλοίωσης συγκαταλέγονται η δημιουργία ιζήματος και θολότητας/ θολότητας, ο σχηματισμός επιφανειακής μεμβράνης και οι μεταβολές στην υφή και το χρώμα του τροφίμου, ενώ ο σχηματισμός επιφανειακής μεμβράνης είναι χαρακτηριστικό της πλειονότητας των ειδών ζύμης που αλλοιώνονται. Η κακή γεύση και η κακή οσμή είναι οι συνέπειες της παραγωγής πρωτογενών και παράγωγων μεταβολιτών από τις ζύμες, όπως η αιθανόλη, η ακεταλδεΐδη, το οξικό οξύ, ο οξικός αιθυλεστέρας, το υδρόθειο και πιο χαρακτηριστικές πτητικές ενώσεις, όπως η 4-αιθυλοφαινόλη που παράγεται από το *D. Bruxellensis* (Perricone et al., 2017).

1.4.1 Παραγωγή αερίων

Η αλλοίωση από ζυμομύκητες μπορεί εύκολα να γίνει αντιληπτή από την παραγωγή περίσσειας αερίου, η οποία προκαλεί την διόγκωση σε δοχεία (Βλ.Εικόνα 1.6). Σε σοβαρές περιπτώσεις, η αλλοίωση της ζύμης μπορεί ακόμη και να προκαλέσει έκρηξη των γυάλινων φιαλών, με αποτέλεσμα τη σωματική βλάβη ατόμων .

Η παραγωγή αυτής της περίσσειας αέρα συμβαίνει γιατί όταν τα κύτταρα της ζύμης καταναλώνουν ζάχαρη ή άλλους ζυμώσιμους υδατάνθρακες, παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα ως παραπροϊόντα. Στις κανονικές διαδικασίες ζύμωσης, το παραγόμενο αέριο αφήνεται να διαφύγει, είτε φυσικά είτε μέσω ενός συστήματος εξαερισμού, και η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών όπως η μπύρα και το κρασί. Ωστόσο, στην αλλοίωση της ζύμης, το αέριο παγιδεύεται μέσα στο δοχείο και συνεπώς μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση πίεσης, προκαλώντας αυτή τη διόγκωση ή ακόμη και διάρρηξη του δοχείου. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν υπάρχουν πάρα πολλά κύτταρα ζύμης στο προϊόν ή όταν το προϊόν έχει μολυνθεί με ένα ιδιαίτερα ισχυρό στέλεχος ζύμης (Stratford, 2006).

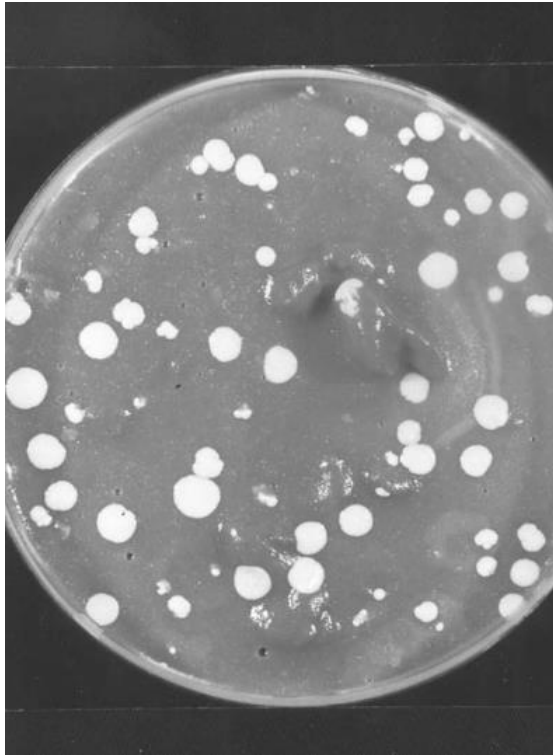
Ενδεικτικά, ορισμένοι ζυμομύκητες που είναι ικανοί να σχηματίσουν επαρκή πίεση αερίου με τη ζύμωση ώστε να εκραγούν οι φιάλες περιλαμβάνουν τους *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis* και *Saccharomyces ludwigii*.



Εικόνα 1.6 "Φουσκωμένη" συσκευασία ροφήματος από *Zygosaccharomyces bailii* (Stratford, 2006).

1.4.2 Ορατές ενδείξεις ζυμών αλλοίωσης

Η οπτική εμφάνιση των κυττάρων ζύμης είναι ίσως ο δεύτερος πιο εμφανής δείκτης ζυμών αλλοίωσης. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί στα στερεά τρόφιμα με το σχηματισμό αποικιών ζύμης στην επιφάνεια του τροφίμου, τον αποχρωματισμό της επιφάνειας, τις μεμβράνες ή τις βλενώδεις γλίτσες, ιδίως σε ζύμες που παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Βέβαια, ο βαθμός στον οποίο είναι ορατή η αλλοίωση από τη ζύμη στα τρόφιμα ή στα ποτά εξαρτάται τόσο από το είδος της ζύμης αλλά και από το είδος και τη σύνθεση του τροφίμου (Perricone et al., 2017). Ειδικότερα, οι ροζ ή κόκκινες ζύμες, όπως οι *Sporobolomyces* ή *Rhodotorula spp.*, είναι συνήθως πιο ορατές στα στερεά τρόφιμα από ό,τι οι λευκές αποικίες ζύμης. Από την άλλη πλευρά, στα ποτά, η αλλοίωση των ζυμομυκήτων μπορεί να παρατηρηθεί ως ομίχλες, σύννεφα, σωματίδια, επιφανειακές μεμβράνες, αποικίες ή ιζήματα. Ένα αχνό θόλωμα μπορεί να είναι ορατό σε διαυγή υγρά εάν η συγκέντρωση των κυττάρων ζύμης είναι περίπου 10⁵ κύτταρα/ml, αλλά το θόλωμα μπορεί να γίνει πυκνό (clouds) όταν η συγκέντρωση αυξάνεται σε 10⁷ έως 10⁸ CFU/ml (Walker, 2009).



Εικόνα 1.7 Ορατά σημάδια αλλοίωσης από ζύμες (λευκές αποκίες) σε τοματοχυμό(Stratford, 2006).

1.4.3 Off-flavors and off-odors

Ακόμα μια ένδειξη αλλοίωσης των τροφίμων και των ποτών από ζύμες αλλοίωσης αποτελεί η παραγωγή off-flavors και off-odors.

Γενικότερα, ως off-flavor ορίζεται μια άτυπη οσμή ή γεύση που προκαλείται από επιμόλυνση με μια ξένη προς το τρόφιμο χημική ουσία(Baigrie, 2003). Στην περίπτωση των ζυμών αλλοίωσης, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός τους μπορεί να επηρεάσουν τη γεύση και την οσμή των τροφίμων με ποικίλους τρόπους: είτε με την αφαίρεση της γεύσης ορισμένων συστατικών των τροφίμων, είτε με την παραγωγή off-flavors και of-odors. Πρακτικά, η αλλοίωση από ζύμες προκαλείται από την παραγωγή μικρών αλλά οργανοληπτικά ισχυρών μορίων μέσω του πρωτογενούς ή δευτερογενούς μεταβολισμού- τα μόρια αυτά είναι πτητικά και δίνουν αυτή την άτυπη οσμή ή γεύση στα τρόφιμα.

Σε γενικές γραμμές, η κακοσμία που παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι φυσικά αυτή της αιθανόλης, η οποία έχει μια ασυνήθιστη ελαφρώς γλυκιά γεύση. Επιπλέον, άλλες χαρακτηριστικές πτητικές οσμές που σχηματίζονται από τις ζύμες μαζί με τις επιγεύσεις που αφήνουν στα τρόφιμα περιλαμβάνουν:

ακεταλδεΐδη με γεύση πικάντικου μήλου, οξικό οξύ με γεύση ξυδιού, οξικό αιθυλεστέρα (νότα ανανά), διακετύλιο και ακετοΐνη (γλυκό βούτυρο)(Perricone et al., 2017).

Ακόμα η αλλοίωση από συγκεκριμένες ζύμες προσδίδει χαρακτηριστικές και ιδιαίτερες off-flavors. Συγκεκριμένα, ο *Saccharomyces ludwigii* σχηματίζει υψηλά επίπεδα ακετοΐνης και ακεταλδεΐδης, ενώ η *Kloeckera apiculata* παράγει υψηλά επίπεδα εστέρων και πτητικών οξέων. Η ανάπτυξη λιπολυτικών ζυμών, όπως η *Yarrowia lipolytica*, σε υποστρώματα όπως το τυρί ή το κρέας, μπορεί να προκαλέσει δυσάρεστες οσμές, όπως το τάγγισμα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία συντηρητικών στα τρόφιμα μπορεί να τα καταστήσει πιο ευάλωτα σε αλλοίωση από off-flavors, επειδή, αν η ζύμη είναι ανθεκτική στο συντηρητικό που προστίθεται, αποικοδομείται. Για παράδειγμα, το σορβικό οξύ μπορεί να αποικοδομηθεί από τους *Zygosaccharomyces rouxii* και *D. hansenii* σε 1,3-πενταδιένιο, προσδίδοντας μια οσμή που μοιάζει με πετρέλαιο (I. Pitt & Hocking, 2009).

1.5 Κατηγορίες ζυμών αλλοίωσης

Γενικότερα, οι ζύμες αλλοίωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις βασικές ομάδες:

Zygosaccharomyces spp. και τα συγγενικά γένη είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και αλατιού και είναι οι συνήθεις οργανισμοί αλλοίωσης σε τρόφιμα όπως το μέλι, τα αποξηραμένα φρούτα, οι μαρμελάδες και η σάλτσα σόγιας. Η ανάπτυξή τους συνήθως είναι αργή, παράγοντας δυσάρεστες οσμές και γεύσεις, καθώς και διοξείδιο του άνθρακα που μπορεί να οδηγήσει σε διόγκωση και διάρρηξη των δοχείων τροφίμων. Ο *D. hansenii* μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις αλατιού έως και 24%, γεγονός που δικαιολογεί τη συχνή απομόνωσή του από άλμες που χρησιμοποιούνται για παστά κρέατα, τυριά και ελιές. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει επίσης τους σημαντικότερους οργανισμούς αλλοίωσης σε σάλτσες (dressing) σαλάτας.

Οι *Saccharomyces spp.* είναι περισσότερο γνωστοί για το ρόλο τους στην παραγωγή ψωμιού και κρασιού, ωστόσο ορισμένα στελέχη τους αλλοιώνουν τα κρασιά και άλλα αλκοολούχα ποτά παράγοντας αέρια, θολερότητα και δυσάρεστες

γεύσεις που σχετίζονται με το υδρόθειο και το οξικό οξύ. Ορισμένα είδη αναπτύσσονται σε φρούτα, ακόμα και σε γιαούρτια που περιέχουν φρούτα, ενώ ορισμένα είναι ανθεκτικά στη θερμική επεξεργασία.

Η *Candida* και τα συναφή γένη είναι μια ετερογενής ομάδα ζυμομυκήτων, ορισμένοι από τους οποίους είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση λοιμώξεων στους ανθρώπους, και εμπλέκονται στην αλλοίωση φρούτων, ορισμένων λαχανικών και γαλακτοκομικών προϊόντων.

Οι *Dekkera/Brettanomyces* ευθύνονται κυρίως για την αλλοίωση ζυμωμένων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των αλκοολούχων ποτών και ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι πως μπορούν να παράγουν πτητικές φαινολικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τις δυσάρεστες γεύσεις.

Όπως γίνεται κατανοητό, η αλλοίωση οφείλεται στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, όμως είναι δύσκολο να βρεθεί η συσχέτιση μεταξύ της έναρξης της αλλοίωσης και της συγκέντρωσης των ζυμομυκήτων. Αυτό συμβαίνει επειδή η αλλοίωση είναι αποτέλεσμα της βιομάζας των ζυμομυκήτων και της παραγωγής μεταβολιτών των ζυμομυκήτων στα τρόφιμων. Βέβαια, τα συμπτώματα της αλλοίωσης εμφανίζονται όταν ο αριθμός των κυττάρων της ζύμης αυξάνεται σε περίπου 5 log CFU/g ή mL και γίνεται εμφανής εάν ο αριθμός των κυττάρων αυξηθεί σε περίπου 7 log CFU/g ή mL. Η παραγωγή μεταβολιτών που προκαλούν αλλοίωση εξαρτάται από τον τύπο του τροφίμου και το μεταβολικό χαρακτηριστικό της ζύμης. Συνεπώς, το ίδιο είδος ζύμης μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά συμπτώματα αλλοίωσης σε περιπτώσεις διαφορετικών τύπων τροφίμων, καθώς και διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων να μπορούν να προκαλέσουν παρόμοια συμπτώματα αλλοίωσης (Perricone et al., 2017)

1.5.1 *Zygosaccharomyces spp*

Οι ζύμες του γένους *Zygosaccharomyces* αποτελούν χρόνιο πρόβλημα στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών λόγω των αλλοιώσεων που προκαλούν σε αυτά, με ορισμένα είδη να είναι ιδιαίτερα προβληματικά ως παράγοντες αλλοίωσης τροφίμων. Είναι ευραίως διαδεδομένες οι αλλοιώσεις που προκύπτουν από την ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα των ειδών *Zygosaccharomyces* οι

οποίες οδηγούν σε σημαντικές οικονομικές απώλειες στη βιομηχανία τροφίμων και σε μείωση των αποθεμάτων τροφίμων παγκοσμίως. Μεταξύ των ειδών που έχουν ταξινομηθεί σήμερα στο γένος, τα είδη *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bisporus* και *Zygosaccharomyces lentus* είναι αυτά που αποτελούν τη σοβαρότερη απειλή αλλοίωσης των επεξεργασμένων τροφίμων (Sá-Correia et al., 2014).

Συγκεκριμένα, από αυτά τα είδη, ο *Zygosaccharomyces bailii* θεωρείται το πιο προβληματικό είδος καθώς προκαλεί αλλοιώσεις σε ένα ευρύ φάσμα όξινων ή υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη προϊόντων, όπως η μαγιονέζα, σάλτσες, κέτσαπ, μουστάρδες, τουρσιά, ανθρακούχα ποτά και ορισμένα κρασιά. Αντίθετα, οι αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον *Z. rouxii* συμβαίνουν συνήθως σε προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, όπως συμπυκνώματα φρούτων, υγρά γλυκαντικά και ζαχαρωτά. Ο *Zygosaccharomyces bisporus* παρουσιάζει ένα προφίλ αλλοίωσης ενδιάμεσο μεταξύ των *Z. bailii* και *Z. rouxii*, αλλά εμφανίζεται λιγότερο συχνά, ενώ ο *Z. lentus* αποτελεί μια πρόσθετη απειλή για τα τρόφιμα που διατηρούνται στο ψυγείο.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, οι αλλοιώσεις των τροφίμων και των ποτών προκύπτουν από τη μεταβολική δράση των ζυμομυκήτων. Στο συγκεκριμένο γένος λοιπόν, ο μεταβολισμός των *Zygosaccharomyces* χαρακτηρίζεται από ζύμωση, η οποία οδηγεί στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Το γεγονός αυτό προκαλεί πρόβλημα στο εκάστοτε τρόφιμο εάν αυτό αποθηκεύεται σε σφραγισμένο δοχείο, καθώς η συσσώρευση του παραγόμενου αερίου μπορεί να οδηγήσει σε διαρροή ή ακόμη και σε έκρηξη. Επιπλέον, όσον αφορά τα ποτά, η συσσώρευση κυτταρικής βιομάζας μπορεί να προκαλέσει θολότητα ή ίζημα, ενώ στην επιφάνεια μπορεί να σχηματιστούν βιοφίλμ. Η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως το οξικό οξύ, οι εστέρες και οι ανώτερες αλκοόλες, μπορεί επίσης να μεταβάλει τη γεύση του τροφίμου ή του ποτού, με πιθανές αισθητηριακές επιπτώσεις (Escott et al., 2018).

Όπως έχει μελετηθεί, στις βιομηχανίες τροφίμων, η πρόληψη της επιμόλυνσης από *Zygosaccharomyces* είναι ζωτικής σημασίας και, ως εκ τούτου, ο ενδεδειγμένος καθαρισμός, η αποχέτευση και τα μέτρα καραντίνας για τον εξοπλισμό πρωτογενούς επεξεργασίας είναι απαραίτητα. Τα βιοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά για τον έλεγχο αυτού του είδους, αλλά είναι

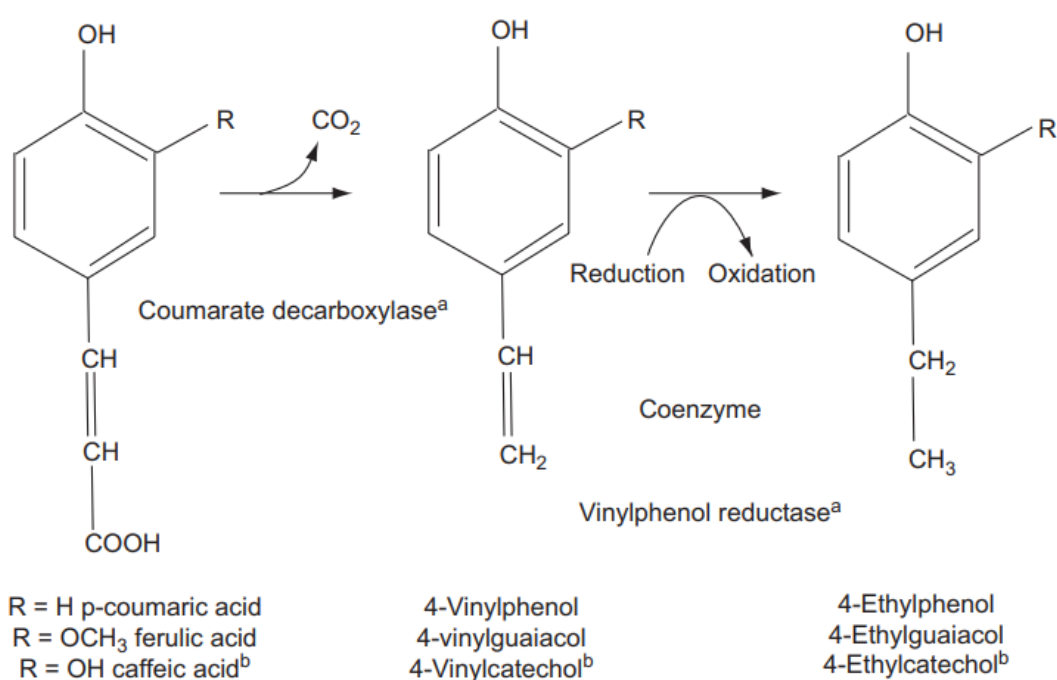
σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στελεχών όσον αφορά την ανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα, ο *Z. bailii* έχει επιδείξει υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζοϊκά και σορβικά άλατα που χρησιμοποιούνται συνήθως ως συντηρητικά και οι ελάχιστες συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την αποτροπή της ανάπτυξής του είναι συχνά υψηλότερες από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια που καθορίζονται από τη νομοθεσία για τα τρόφιμα. Από την άλλη πλευρά, ο *Z. rouxii* εμφανίζει παρόμοιο προφίλ ανθεκτικότητας με τον *Z. bailii* αλλά είναι ευαίσθητο στο βενζοϊκό οξύ, ενώ ο *Z. bisporus* παρουσιάζει ενδιάμεση ανθεκτικότητα. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να λαμβάνονται υπόψη αυτές οι διαφορές στην ανθεκτικότητα κατά την επιλογή των κατάλληλων μέτρων για τον έλεγχο και την πρόληψη της μόλυνσης από *Zygosaccharomyces* κατά την επεξεργασία τροφίμων(Howell, 2016).

1.5.2 *Dekkera/Brettanomyces*

Οι ζύμες του είδους *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* έχουν αναφερθεί ως κύρια αιτία μόλυνσης από ζύμες που επηρεάζουν την ποιότητα του οίνου. Η ανάπτυξη των ζυμών αυτών στον οίνο έχει συσχετιστεί άμεσα με διάφορες μορφές αλλοίωσης, όπως η θόλωση, ο σχηματισμός φιλμ (λιγότερο συνηθισμένο) και μια σειρά από αλλοιωμένες γεύσεις. Η γενική επίδραση της μόλυνσης από *Brettanomyces*, που συνήθως ονομάζεται φαινολική off-flavour, έχει περιγραφεί με διάφορα χαρακτηριστικά, όπως "δερματώδης", "φαρμακευτική", "καμένο πλαστικό", "Band-Aid®", "καπνιστή". Οι χημικές ουσίες που ταυτίζονται ευρύτερα με τα off-flavors οι 4-αιθυλογουαϊακόλες (4EG) και οι 4-αιθυλοφαινόλες (4EP). Η τελομορφή του είναι το *Brettanomyces* και οι ζύμες αυτές είναι ευρέως γνωστές ως "Brett" στην οινοβιομηχανία, όπου προκαλούν μια ανεπιθύμητη αλλοίωση του κρασιού που ωριμάζει. Ο *Dekkera bruxellensis* είναι βραδείας ανάπτυξης παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στην αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, γεγονός που επιτρέπει το σχηματισμό σημαντικών πληθυσμών σε σταθερούς οίνους που ωριμάζουν σε κελάρια(Conterno et al., 2010).

Πιο ειδικά, η *Dekkera* είναι ένας προαιρετικός αναερόβιος μικροοργανισμός, ο οποίος ταιριάζει στο περιβάλλον αποθήκευσης κρασιού, όπου ο μικροαερισμός μέσω των δρύινων βαρελιών μπορεί να βοηθήσει στην ωρίμανση του κρασιού.

Μικρές ποσότητες οξυγόνου είναι ικανές να διεγείρουν την ανάπτυξη και την παραγωγή off-flavor μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού (Howell, 2016). Μετά την αρχική ζύμωση με αιθανόλη, ο ερυθρός οίνος σταθεροποιείται με διοξείδιο του θείου και παλαιώνεται σε δρύινα βαρέλια ή δεξαμενές πριν αναμειχθεί και εμφιαλωθεί προς πώληση. Επειδή αυτή η περίοδος ωρίμανσης μπορεί να διαρκέσει χρόνια, η *Dekkera* έχει πολλές ευκαιρίες να ευδοκιμήσει στους επηρεασμένους οίνους. Με τον δευτερογενή μεταβολισμό, η *Dekkera* αναπτύσσει αξιοσημείωτα off-taints με φαινολικά και μουχλιασμένα αρώματα που μπορεί να μειώσουν το άρωμα και την ελκυστικότητα του κρασιού. Επιπλέον, οι ιδανικές θερμοκρασίες για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης ζύμης κυμαίνεται μεταξύ 25 και 28 C, ωστόσο έχει ανυχνευθεί αλλοίωση και στους 15 και 20 C. Η μόλυνση ενός κρασιού από *Dekkera* είναι ένα σοβαρό πρόβλημα καθώς μόλις μολυνθεί με αυτές τις μυρωδιές, ένας οίνος δεν μπορεί να αποκατασταθεί, φέροντας έτσι μεγάλες οικονομικές απώλειες (Howell, 2016).



Εικόνα 1.8 Μεταβολικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή 4-αιθυλοφαινολών από *Brettanomyces bruxellensis*.

Η πρόληψη της μόλυνσης των οίνων με *Dekkera* αφορά κυρίως την επαρκή καθαριότητα και υγιεινή του οινοποιείου, ώστε να αποφευχθεί εξαρχής η εμφάνισή της. Οι εγγενείς ιδιότητες του οίνου μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη του

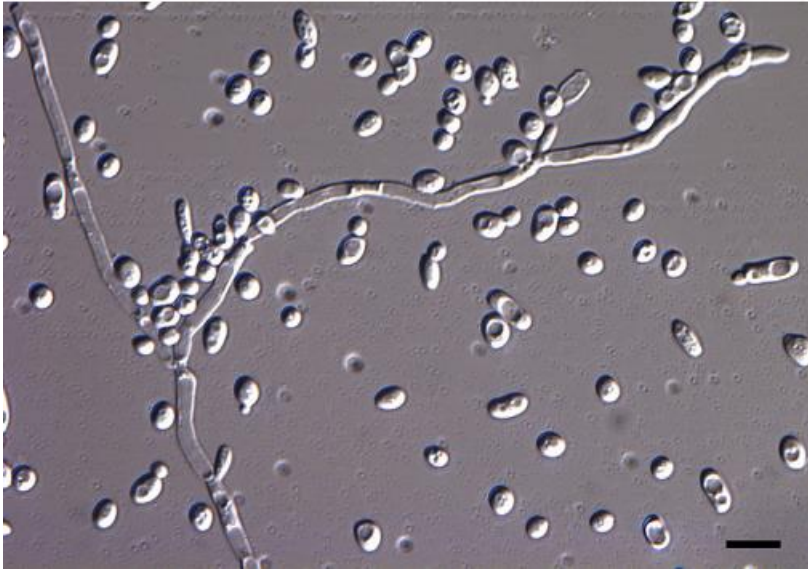
Dekkera, καθώς ορισμένα στελέχη επηρεάζονται από συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 9% και ορισμένα μπορεί να προσαρμοστούν σε ποσότητες μεγαλύτερες από 12%.

1.5.3 *Yarrowia lipolytica (Candida lipolytica)*

Η *Yarrowia lipolytica* (πρώην *Candida lipolytica*) είναι ένας διμορφικός μύκητας που μπορεί να ευδοκιμήσει σε υδρόφοβα υποστρώματα και συνδέεται με την αλλοίωση του κρέατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων ιδίως λουκάνικα και τυριά. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH 2.0-8.0, το γαστρικό υγρό και τα χολικά άλατα και μπορεί να απομονωθεί από το στόμα, τους πνεύμονες και τον εντερικό σωλήνα, αλλά βρίσκεται επίσης στο έδαφος, θαλασσινό νερό και σε υπεραλατούχες λίμνες (Sutherland et al., 2014).

Αυτός ο ζυμομύκητας έχει σημαντικά εξωκυτταρικά πρωτεολυτικά και λιπολυτικά χαρακτηριστικά που μπορούν να αλλάξουν το περιβάλλον, με αποτέλεσμα την αυξημένη ανάπτυξη. Οι εξωκυτταρικές ενζυμικές δραστηριότητες μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά το άρωμα, τη γεύση και την υφή του υποστρώματος τροφίμων, παράγοντας μοναδικά σημάδια αλλοίωσης (Howell, 2016).

Ειδικότερα, η *Yarrowia lipolytica* σχετίζεται με την αλλοίωση ποικίλων προϊόντων όπως κρέας, κρέμα γάλακτος, βούτυρο, μαργαρίνη, μαγιονέζα, ψυγμένα ψάρια και οστρακοειδή, ιχθυέλαια, χυμός καρότου, ραπανάκι λαχανάκια, σταφίδες, φυτικά έλαια και τυριά. Η αλλοίωση προκρίπτει καθώς μεταβολίζει τις πρωτεΐνες σε αυτά τα προσβεβλημένα τρόφιμα σε ελεύθερα αμινο οξέα και τα λίπη σε γλυκερόλη συν ελεύθερα λιπαρά οξέα, παράγοντας διάφορες δυσάρεστες οσμές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα δείγματα τυριών που περιέχουν *Y. lipolytica* και παρουσιάζουν δυσάρεστη οσμή λόγω της παραγωγής της αμμωνίας, πτητικών ενώσεων του θείου και ελεύθερων αμινοξέων. Η αμμωνία αυξάνει σημαντικά το pH. Όταν μεταβολίζει την L-τυροσίνη, η *Y. lipolytica* παράγει μια καφέ χρωστική ουσία σε διάφορα τυριά και επιπλέον προκαλεί αλλοίωση της γεύσης τους (Sutherland et al., 2014).



Εικόνα 1.9 Μικρογραφία διαφορικής αντίθεσης παρεμβολής εκπτυσσόμενων κυττάρων και υφών, που απομονώθηκαν από ψυχόμενο κρέας(Sutherland et al., 2014)

Η ανάπτυξη της *Y. lipolytica* μπορεί να ελεγχθεί με συντηρητικά, καθώς η ζύμη αυτή παρουσιάζει ευαισθησία στα βενζοϊκά και τα σορβικά άλατα σε λογικές συγκεντρώσεις. Ακόμη, έχει βρεθεί πως η επιφανειακή εφαρμογή γαλακτικού οξέος, καθώς και νέων αναστολέων, όπως εκχυλίσματα βοτάνων, αιθέρια έλαια και ναταμυκίνη, είναι αποτελεσματική στον έλεγχο της ανάπτυξης της (Howell, 2016).

Κεφάλαιο 2. Υγιεινή επιφανειών και μέθοδοι καθαρισμού-απολύμανσης

2.1 Υγιεινή επιφανειών

Η υγιεινή των επιφανειών είναι μια σημαντική πρακτική για την πρόληψη της εξάπλωσης επιβλαβών μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, είναι η διαδικασία που περιλαμβάνει τον καθαρισμό και την απολύμανση των επιφανειών για την απομάκρυνση της βρωμιάς, των υπολειμμάτων τροφών και των μικροοργανισμών που μπορούν να οδηγήσουν σε τροφιμογενείς λοιμώξεις. Η υγιεινή των επιφανειών, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τελικών προϊόντων καθώς και για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων μόλυνσης, με τις πιο συχνές να είναι οι βλαστικές μορφές των βακτηρίων και τα σπόρια τους, οι ζύμες αλλοίωσης τροφίμων αλλά και οι μύκητες (Otto et al., 2011).

Ιδιαίτερα στη βιομηχανία τροφίμων, οι επιφάνειες μπορούν να μολυνθούν με αυτούς τους μικροοργανισμούς από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των πρώτων υλών, των χειριστών τροφίμων και του εξοπλισμού. Επομένως, είναι σημαντικό να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται τακτικά όλες οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, όπως οι επιφάνειες προετοιμασίας, ο εξοπλισμός και τα σκεύη.

Ακόμα πιο ειδικά, ο καθαρισμός και η απολύμανση γίνονται με σκοπό την απομάκρυνση μικροοργανισμών ή υλικών που ευνοούν την ανάπτυξη μικροβίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς και η μείωση αυτή με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει στην παράταση της διάρκειας ζωής μερικών προϊόντων. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, μπορούν να απομακρυνθούν υλικά που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μόλυνση από ξένα σώματα ή θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροφή για πολλά παράσιτα. Επίσης, αφαιρούνται υλικά τροφίμων που παραμένουν στις γραμμές παραγωγής, τα οποία μπορεί να αλλοιωθούν και να επανέλθουν σε επόμενες σειρές παραγωγής, βλάπτοντας έτσι την ποιότητα του προϊόντος. Ακόμα μια σημαντική δράση της υγιεινής των επιφανειών είναι πως παρέχεται ένα ασφαλές και καθαρό περιβάλλον εργασίας για τους εργαζομένους ενώ παράλληλα αποτελεί και μια «καλή» εικόνα στους επισκέπτες ή κατά την διάρκεια ενός ελέγχου (Lelieveld, 2003).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι για την απομάκρυνση και την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών βασίζονται σε θερμικές, μηχανικές ή χημικές μεθόδους.

Η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού και της απολύμανσης, ύστερα από ένα καλοσχεδιασμένο και σωστά τηρούμενο πρόγραμμα υγιεινής, όπως έχει μελετηθεί σε οκτώ εργοστάσια κατεψυγμένων τροφίμων στον εξοπλισμό επεξεργασίας, διαφαίνεται στο πίνακα 2.1.

	Πριν τον καθαρισμό	Μετά τον καθαρισμό	Μετά την απολύμανση
Αριθμητικός μέσος όρος	1,32 x 10 ⁶	8,67 x 10 ⁴	2,5 x 10 ³
Μέσος όρος λογαρίθμου	3,62	2,35	1,14
Αριθμός παρατηρήσεων	498	1090	3147

Πίνακας 2.1 Αριθμητικός και λογαριθμητικός μέσος όρος βακτηρίων σε εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων πριν και μετά τον καθαρισμό και μετά την απολύμανση(Lelieveld, 2003).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως τόσο ο καθαρισμός όσο και η απολύμανση συμβάλλουν εξίσου στη μείωση των επιπέδων των μικροοργανισμών που υπάρχουν. Επομένως, είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται ποιοτικά χημικά καθαρισμού τα οποία όχι μόνο να απομακρύνουν την ορατή βρωμιά αλλά και να είναι ικανά να απομακρύνουν τα μικρόβια. Επιπλέον, όπως φαίνεται είναι πιθανό να υπάρχουν επαρκή βιώσιμοι μικροοργανισμοί μετά από τον καθαρισμό οι οποίοι παραμένουν στην επιφάνεια συνεπώς δικαιολογείται η μετέπειτα εφαρμογή απολυμαντικού. Έτσι, γίνεται κατανοητό πως ο στόχος της απολύμανσης είναι η περαιτέρω μείωση του επιφανειακού πληθυσμού των βιώσιμων μικροοργανισμών, μέσω της απομάκρυνσης ή της καταστροφής, και/ή η αποτροπή της επιφανειακής μικροβιακής ανάπτυξης(Lelieveld, 2003).

2.1.1 Τρόπος δράσης καθαριστικών και απολυμαντικών μέσων

Η διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης μπορεί να χωριστεί σε διάφορα στάδια τα οποία μπορούν να περιγραφούν ως εξής:

Το αρχικό βήμα περιλαμβάνει τη διασφάλιση ότι τόσο τα υπολείμματα όσο και η επιφάνεια του εξοπλισμού έχουν εμποτιστεί καλά και έχουν διεισδύσει στο διάλυμα καθαρισμού. Αυτό διευκολύνει τη βέλτιστη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύματος και των παρόντων ρύπων. Στη συνέχεια, το διάλυμα καθαρισμού υφίσταται αντίδραση με το χώμα και την επιφάνεια, επιτρέποντας την πεπτιση των οργανικών υλικών, τη διάλυση των διαλυτών οργανικών ουσιών και των ανόργανων συστατικών, τη γαλακτωματοποίηση των λιπών, καθώς και τη διασπορά και την επακόλουθη απομάκρυνση των στερεών συστατικών του χώματος από την επιφάνεια. Αυτή η χημική αντίδραση παίζει καθοριστικό ρόλο στην επίτευξη αποτελεσματικών αποτελεσμάτων καθαρισμού.

Μια άλλη σημαντική πτυχή της διαδικασίας είναι η αποτροπή της επανατοποθέτησης των διασκορπισμένων σωματιδίων του χώματος στη φρεσκοκαθαρισμένη επιφάνεια. Αυτό διασφαλίζει ότι η επιφάνεια παραμένει απαλλαγμένη από τυχόν υπολειμματικούς ρύπους, παρέχοντας ένα καθαρό και υγιεινό περιβάλλον. Μόλις ολοκληρωθεί η φάση του καθαρισμού, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την ύγρανση των υπολειπόμενων μικροοργανισμών από το διάλυμα απολύμανσης. Η διαδικασία αυτή διευκολύνει την αλληλεπίδραση του απολυμαντικού με τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών ή τη διείσδυσή τους στα μικροβιακά κύτταρα, ασκώντας έτσι βιοκτόνο ή βιοστατικό αποτέλεσμα. Η επιτυχία αυτού του σταδίου εξαρτάται από παράγοντες όπως η συμπερίληψη επιφανειοδραστικών ουσιών στο απολυμαντικό και η επιλεγμένη μέθοδος απολύμανσης, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει ή όχι ξέπλυμα.

Μετά την εφαρμογή του απολυμαντικού διαλύματος, μπορεί να ακολουθήσει διασπορά των μικροοργανισμών από την επιφάνεια, ανάλογα με τη συγκεκριμένη σύνθεση του απολυμαντικού και την εφαρμοζόμενη πρακτική απολύμανσης. Αυτό το πρόσθετο βήμα διασφαλίζει ότι τυχόν εναπομείναντες μικροοργανισμοί απομακρύνονται αποτελεσματικά από την επιφάνεια, ενισχύοντας περαιτέρω τη συνολική διαδικασία απολύμανσης.

Για την αποτελεσματική εκτέλεση αυτών των σταδίων, τα προγράμματα απολύμανσης χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό τεσσάρων σημαντικών παραγόντων:

- ✚ Μηχανική ή κινητική ενέργεια
- ✚ Χημική ενέργεια
- ✚ Θερμοκρασία ή θερμική ενέργεια
- ✚ Χρόνος

Αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν συνεργικά στην επιτυχία της διαδικασίας καθαρισμού και απολύμανσης, εξασφαλίζοντας βέλτιστα αποτελέσματα όσον αφορά την υγιεινή και τον έλεγχο των μικροβίων(Lelieveld, 2003).

Η μηχανική ή κινητική ενέργεια παίζει ζωτικό ρόλο στη φυσική εξάλειψη των ρύπων και μπορεί να περιλαμβάνει μεθόδους όπως η απόξεση, το χειροκίνητο βούρτσισμα, το αυτοματοποιημένο τρίψιμο (με χρήση φυσικής τριβής) και το πλύσιμο με πίδακα πίεσης (με χρήση υγρής τριβής). Η χημική ενέργεια, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των ρύπων, καθιστώντας ευκολότερη την απομάκρυνσή τους, και για την αιώρηση τους σε διάλυμα για καλύτερη δυνατότητα έκπλυσης. Η αποτελεσματικότητα της χημικής δράσης αυξάνεται αναλογικά με τη θερμοκρασία, με περίπου διπλασιασμό της επίδρασης για κάθε αύξηση κατά 10°C. Στην περίπτωση λιπαρών και ελαιωδών ρύπων, χρησιμοποιούνται αυξημένες θερμοκρασίες πάνω από τα σημεία τήξης τους για να διασπάσουν και να γαλακτωματοποιήσουν αυτές τις αποθέσεις, διευκολύνοντας την απομάκρυνσή τους. Όταν οι διαδικασίες καθαρισμού ενσωματώνουν τη χρήση μηχανικής, χημικής και θερμικής ενέργειας, παρατηρείται γενικά ότι η μεγαλύτερη διάρκεια καθαρισμού οδηγεί σε αυξημένη αποτελεσματικότητα της συνολικής διαδικασίας καθαρισμού(Melo et al., 1992).

Κατανοώντας λοιπόν, πως η υγιεινή των επιφανειών αποτελείται από δύο πολύ βασικές μεθόδους, τον καθαρισμό και την απολύμανση, παρακάτω θα γίνει αναλυτική περιγραφή των μεθόδων αυτών καθώς και των απολυμαντικών και καθαριστικών μέσων που χρησιμοποιούνται ευρέως σε μια βιομηχανία τροφίμων.

2.2 Καθαρισμός και ενώσεις καθαρισμού

Στη βιομηχανία τροφίμων, μια από τις σημαντικότερες διεργασίες είναι ο καθαρισμός κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση υπολειμμάτων τροφών, βρωμιάς, λίπους και άλλων ανεπιθύμητων υπολειμμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται με φυσική ενέργεια, θερμότητα ή/και χημικές ουσίες (απορρυπαντικά). Ο καθαρισμός απομακρύνει μόνο τη βρωμιά από την επιφάνεια- αλλά δεν σκοτώνει όλα τα βακτήρια. Ο σωστός καθαρισμός είναι απαραίτητος για την παραγωγή υψηλής ποιότητας τροφίμων, ιδίως εκείνων με παρατεταμένη διάρκεια ζωής (Varzakas & Tzia, 2015). Είναι πολύ σημαντική διεργασία καθότι εάν ο εξοπλισμός και οι εγκαταστάσεις δεν είναι κατάλληλα καθαρισμένοι, παρέχουν ιδανικό περιβάλλον για ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορεί να μεταφερθούν στο τρόφιμο, καθώς και να προσελκύσουν τρωκτικά και έντομα.

Οι συνήθεις εφαρμογές καθαρισμού, δεν είναι ποτέ απολύτως αποτελεσματικές. Ακόμη και μετά από επαναλαμβανόμενες διεργασίες καθαρισμού, ένα ποσοστό ρύπων παραμένει. Με την αύξηση των ρύπων η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού μειώνεται. Οι ενώσεις καθαρισμού, δεν θα πρέπει απλώς να απομακρύνουν τις προσμίξεις, αλλά και να μειώνουν ένα μέρος των μικροοργανισμών (Marriott N. G., 2006). Για το λόγο αυτό, πάντοτε η διαδικασία του καθαρισμού θα πρέπει να συμπληρώνεται από την διαδικασία της απολύμανσης, αποτελώντας η μία αναπόσπαστο κομμάτι της άλλης (Stanga, 2010).

2.2.1 Κατηγορίες καθαριστικών

Τα απορρυπαντικά και οι ενώσεις καθαρισμού αποτελούνται συνήθως από συνδυασμούς συστατικών που εμπλέκονται με τα ρύπους με διάφορους τρόπους, δίνοντας προτεραιότητα στην ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες:

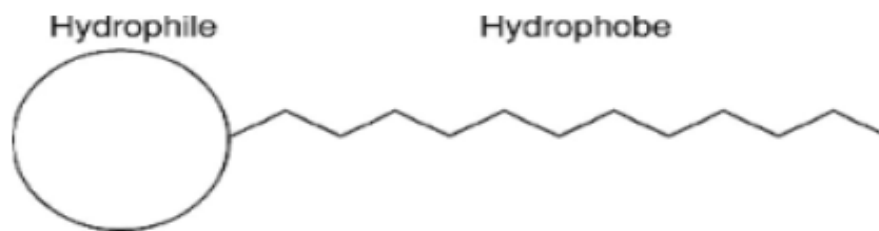
- ✚ Φυσικά ενεργά συστατικά: Τα συστατικά αυτά επιφέρουν αλλαγές στα φυσικά χαρακτηριστικά των τροφικών υποστρωμάτων, όπως η διαλυτότητα ή η κολλοειδής σταθερότητα. Μεταβάλλοντας αυτές τις ιδιότητες, διευκολύνουν την απομάκρυνση των ρύπων από τις επιφάνειες, καθιστώντας τη διαδικασία καθαρισμού πιο αποτελεσματική.

- ✚ Χημικά ενεργά συστατικά: Τα συστατικά αυτά λειτουργούν τροποποιώντας τα συστατικά του τροφικού υποστρώματος, αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους και διευκολύνοντας την απομάκρυνσή τους. Αυτή η χημική τροποποίηση συμβάλλει στη διάσπαση και τη διάλυση των ρύπων, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα καθαρισμού του απορρυπαντικού ή της ένωσης καθαρισμού.

Επιπλέον, ορισμένα απορρυπαντικά μπορεί να ενσωματώνουν ειδικά ένζυμα. Αυτά τα ένζυμα προστίθενται με σκοπό να αντιδρούν καταλυτικά με συγκεκριμένα συστατικά του τροφικού υποστρώματος, αποδομώντας τα αποτελεσματικά. Αυτή η ενζυμική δράση βοηθά στη διάσπαση και την απομάκρυνση συγκεκριμένων τύπων ρύπων, συμβάλλοντας στη συνολική απόδοση του καθαρισμού (Schmidt, n.d.).

2.2.1.1 Φυσικά ενεργά συστατικά

Τα κύρια ενεργά συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις φυσικές επιδράσεις είναι γνωστά ως επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες είναι επιφανειοδραστικές ενώσεις. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες, επίσης γνωστές ως "επιφανειοδραστικοί παράγοντες", είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από τουλάχιστον μία ομάδα που έχει συγγένεια προς τους διαλύτες (γνωστή ως λυόφιλη ή "διαλυτοφοβική" ομάδα) και τουλάχιστον μία ομάδα που έχει αποστροφή προς τους διαλύτες (γνωστή ως λυόφοβη ή "διαλυτοφοβική" ομάδα) εντός της μοριακής τους δομής. Όταν η επιφανειοδραστική ουσία προορίζεται για χρήση σε νερό ή υδατικό διάλυμα, οι όροι "υδρόφιλη" και "υδρόφοβη" χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν αυτές τις αντίστοιχες ιδιότητες (Karsa & Houston, 2006). Ουσιαστικά, μια επιφανειοδραστική ουσία περιέχει τουλάχιστον μία μη πολική ομάδα και μία πολική ή ιοντική ομάδα, η δομή της οποία αναπαρίσταται στο Σχημα . Τα μόρια αυτά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στα απορρυπαντικά διευκολύνοντας διάφορες φυσικές διαδικασίες καθαρισμού, όπως η γαλακτωματοποίηση, η διείδυση, η εξάπλωση, ο αφρισμός και η διαβροχή (Schmidt, n.d.).



Εικόνα 2.1 Απλουστευμένη δομή επιφανειοδραστικής ουσίας(Karsa & Houston, 2006)

Οι κατηγορίες επιφανειοδραστικών ουσιών μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

Οι ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν αρνητικό φορτίο όταν διαλύονται στο νερό, είναι γνωστές ως ανιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Από την άλλη πλευρά, οι θετικά φορτισμένες ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες αναφέρονται ως κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες. Εάν το φορτίο του υδατοδιαλυτού μέρους εξαρτάται από το pH του διαλύματος, ονομάζεται αμφοτερική επιφανειοδραστική ουσία. Αυτού του είδους οι επιφανειοδραστικές ουσίες δρουν ως κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες υπό όξινες συνθήκες και ως ανιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες υπό αλκαλικές συνθήκες. Οι ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες αναγνωρίζονται γενικά για την υψηλή αφριστική τους ικανότητα.

Οι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, από την άλλη πλευρά, δεν διαχωρίζονται όταν αναμιγνύονται με νερό και οι ιδιότητές τους ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την ισορροπία μεταξύ υδρόφιλων και υδρόφοβων συστατικών. Η ισορροπία αυτή μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, οι ιδιότητες αφρισμού των μη ιονικών απορρυπαντικών επηρεάζονται από τη θερμοκρασία του διαλύματος. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, η υδρόφοβη φύση τους και η διαλυτότητά τους μειώνονται. Στο σημείο θολώματος (ελάχιστη διαλυτότητα), αυτά τα επιφανειοδραστικά τείνουν να λειτουργούν ως αποαφριστικά, ενώ κάτω από το σημείο θολώματος, τα χαρακτηριστικά αφρισμού τους ποικίλλουν. Είναι κοινή πρακτική η ανάμειξη διαφορετικών επιφανειοδραστικών συστατικών προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι ιδιότητές τους. Ωστόσο, λόγω προβλημάτων κατακρήμνισης, δεν είναι εφικτό να αναμιγνύονται κατιονικά και ανιονικά επιφανειοδραστικά(Schmidt, n.d.).

2.2.1.2 Χημικά ενεργά συστατικά

Αλκαλικοί δομικοί παράγοντες

Οι αλκαλικοί δομικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα απορρυπαντικά. Γενικά, τα αλκαλικά καθαριστικά είναι ενώσεις με $pH > 7,0$, όταν διαλυθούν στο νερό. Ουσιαστικά παρουσιάζουν ικανότητα καθαρισμού σε $pH > 8,3$. Σ' αυτό το σημείο είναι που τα ελεύθερα ιόντα υδροξυλίου είναι διαθέσιμα στο διάλυμα. Σύμφωνα με την ικανότητα καθαρισμού η αλκαλικότητα των καθαριστικών χωρίζεται σε 4 κατηγορίες (Marriott N. G., 2006).

- ✚ 7,0 < pH < 8,3: ακατέργαστο νερό, ουδέτερα καθαριστικά.
- ✚ 8,3 < pH < 10: ήπια αλκαλικότητα
- ✚ 10 < pH < 12: μέση αλκαλικότητα.
- ✚ 12 < pH < 14: μέγιστη αλκαλικότητα.

Τα υψηλά αλκαλικά απορρυπαντικά, γνωστά και ως απορρυπαντικά βαρέως τύπου, χρησιμοποιούν ουσίες όπως καυστική σόδα (υδροξείδιο του νατρίου) ή καυστική ποτάσα (υδροξείδιο του καλίου). Αυτά τα ισχυρά απορρυπαντικά διαθέτουν μια αξιοσημείωτη ιδιότητα: σαπωνοποιούν τα λίπη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σαπουνιού. Χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες εφαρμογές, όπως σε συστήματα Clean-in-Place (CIP) ή σε διαδικασίες πλύσης φιαλών.

Από την άλλη πλευρά, τα μέτρια αλκαλικά απορρυπαντικά περιλαμβάνουν άλατα φωσφορικών, πυριτικών ή ανθρακικών αλάτων νατρίου, καλίου ή αμμωνίου. Το φωσφορικό τρισθενές νάτριο (Tri-sodium phosphate -TSP) ξεχωρίζει ως μία από τις παλαιότερες και πιο αποτελεσματικές επιλογές αυτής της κατηγορίας. Τα πυριτικά άλατα χρησιμοποιούνται συνήθως ως αναστολείς διάβρωσης. Ωστόσο, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με το ασβέστιο και το μαγνήσιο και του σχηματισμού φιλμ, τα απορρυπαντικά με βάση τα ανθρακικά άλατα έχουν περιορισμένη χρησιμότητα σε πρωτόκολλα καθαρισμού για την επεξεργασία τροφίμων (Schmidt, n.d.).

Όξινοι δομικοί παράγοντες

Τα όξινα απορρυπαντικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για διάφορους σκοπούς καθαρισμού, αποτελούνται τόσο από οργανικά όσο και από ανόργανα οξέα. Τα ανόργανα οξέα, δηλαδή το φωσφορικό, το νιτρικό, το σουλφαμικό, το

θεικό νάτριο και το υδροχλωρικό οξύ, χρησιμοποιούνται συνήθως σε αυτό το πλαίσιο. Επιπλέον, οργανικά οξέα, όπως το υδροξυοξικό, το κιτρικό και το γλυκονικό οξύ, χρησιμοποιούνται επίσης σε όξινα απορρυπαντικά. Αυτά τα απορρυπαντικά συχνά ενσωματώνονται σε ένα σχήμα διαδοχικού καθαρισμού δύο βημάτων μαζί με αλκαλικά απορρυπαντικά για να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού τους.

Επιπλέον, τα όξινα απορρυπαντικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη ή την εξάλειψη των πέτρινων μεμβρανών που μπορεί να σχηματιστούν στις επιφάνειες. Αυτές οι πέτρινες μεμβράνες μπορεί να περιλαμβάνουν πέτρα ορυκτών, πέτρα μύρας ή πέτρα γάλακτος και τα όξινα απορρυπαντικά χρησιμεύουν ως αποτελεσματικοί παράγοντες για την πρόληψη και την απομάκρυνσή τους. Με την ενσωμάτωση των όξινων απορρυπαντικών στη διαδικασία καθαρισμού, καθίσταται δυνατή η διατήρηση των επιφανειών σε άψογη και υγιεινή κατάσταση, απαλλαγμένες από τις ανεπιθύμητες συνέπειες των πέτρινων υμενίων(Schmidt, n.d.).

Water Conditioners

Τα βελτιωτικά νερού είναι βασικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της συσσώρευσης διαφόρων ορυκτών αποθέσεων, ιδίως εκείνων που σχετίζονται με τη σκληρότητα του νερού. Ο πρωταρχικός σκοπός αυτών των χημικών ουσιών είναι να δρουν ως παράγοντες δέσμευσης ή χηλικοί παράγοντες. Οι δεσμευτικοί παράγοντες λειτουργούν δημιουργώντας διαλυτά σύμπλοκα με ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου, εμποδίζοντας έτσι την ανεπιθύμητη καθίζησή τους. Συνήθη παραδείγματα δεσμευτικών παραγόντων περιλαμβάνουν τριπολυφωσφορικό νάτριο, πυροφωσφορικό τετρακάλιο, οργανοφωσφορικά και πολυηλεκτρολύτες.

Εκτός από τους δεσμευτικούς παράγοντες, οι χηλικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται επίσης συνήθως στην επεξεργασία του νερού. Οι χηλικοί παράγοντες, όπως το γλυκονικό νάτριο και το τετραοξικό οξύ αιθυλενοδιαμίνης (EDTA), διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό σταθερών συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα. Η διαδικασία αυτή μειώνει αποτελεσματικά την αντιδραστικότητα των μεταλλικών ιόντων και συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση των βλαβερών επιπτώσεών τους. Με την ενσωμάτωση αυτών των χηλικών παραγόντων

στις διεργασίες επεξεργασίας νερού, μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά τα πιθανά προβλήματα που προκύπτουν από την παρουσία ιόντων μετάλλων(Schmidt, n.d.).

2.2.2 Μέθοδοι καθαρισμού

Οι παραδοσιακές μέθοδοι υγρού καθαρισμού μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες για να καλύψουν τις διάφορες ανάγκες καθαρισμού του εξοπλισμού. Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν:

Καθαρισμός επί τόπου (Cleaning-in-place-CIP): Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τον καθαρισμό του εξοπλισμού χωρίς εκτεταμένη αποσυναρμολόγηση. Το διάλυμα καθαρισμού μπορεί να κυκλοφορήσει μέσα στον εξοπλισμό, απομακρύνοντας αποτελεσματικά το χώμα και τους ρύπους. Το CIP προσφέρει το πλεονέκτημα της μείωσης του χρόνου διακοπής λειτουργίας και της διευκόλυνσης του αποτελεσματικού καθαρισμού, ενώ ο εξοπλισμός παραμένει σε λειτουργία.

Καθαρισμός εκτός χώρου (Cleaning-out-of-place-COP): Σε αυτή τη μέθοδο, ο εξοπλισμός αποσυναρμολογείται εν μέρει και βυθίζεται σε δεξαμενές ή καθορισμένα δοχεία καθαρισμού. Αυτό επιτρέπει τον ενδεδειγμένο καθαρισμό των εξαρτημάτων του εξοπλισμού που δεν μπορούν να καθαριστούν αποτελεσματικά στις εγκατεστημένες θέσεις τους. Ο COP παρέχει ειδικές συνθήκες καθαρισμού, εξασφαλίζοντας εντατικότερη απομάκρυνση του χώματος και αυξημένη αποτελεσματικότητα του καθαρισμού.

Καθαρισμός με αφρό ή τζελ: Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός χημικού παράγοντα με τη μορφή αφρού ή γέλης στην επιφάνεια του εξοπλισμού. Ο αφρός ή το τζελ προσκολλάται στην επιφάνεια, παρατείνοντας το χρόνο επαφής μεταξύ του καθαριστικού παράγοντα και του ρύπου. Αυτή η παρατεταμένη επαφή ενισχύει τη διαδικασία καθαρισμού, απομακρύνοντας αποτελεσματικά τους ρύπους. Ο καθαρισμός με αφρό ή τζελ είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για πολύπλοκες γεωμετρικές εξοπλισμού ή δυσπρόσιτες περιοχές.

Χειρονακτικός ή χειροκίνητος καθαρισμός: Αυτή η μέθοδος απαιτεί την πλήρη αποσυναρμολόγηση του εξοπλισμού, ακολουθούμενη από χειροκίνητο καθαρισμό που εκτελείται με το χέρι. Κάθε εξάρτημα καθαρίζεται ξεχωριστά για να διασφαλιστεί η σχολαστική απομάκρυνση του χώματος και των ρύπων. Ο

χειρωνακτικός καθαρισμός επιτρέπει τη λεπτομερή προσοχή στην καθαριότητα και χρησιμοποιείται συχνά όταν ο εξοπλισμός απαιτεί υψηλότερο επίπεδο υγιεινής ή όταν η αυτοματοποίηση δεν είναι εφικτή.

Με την κατηγοριοποίηση των μεθόδων υγρού καθαρισμού σε αυτές τις τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις, οι βιομηχανίες έχουν μια σειρά επιλογών για να επιλέξουν με βάση τις συγκεκριμένες απαιτήσεις καθαρισμού του εξοπλισμού τους. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη αυτές οι κατηγορίες και να προσαρμόζονται ανάλογα με τις ανάγκες για την αντιμετώπιση των μοναδικών προκλήσεων που σχετίζονται με διαφορετικές βιομηχανίες και τύπους εξοπλισμού (Gabrić et al., 2016).

2.2.2.1 Επιτόπιος καθαρισμός (CIP)

Ο επιτόπιος καθαρισμός (CIP) είναι η πιο ευνοϊκή διαδικασία από τις ανωτέρω καθώς χρησιμοποιείται ευρέως, ιδίως για συστήματα καθαρισμού κατά την επεξεργασία υγρών προϊόντων που έχουν μορφή βρωμιάς που απομακρύνεται εύκολα (γαλακτοβιομηχανίες, βιομηχανίες παραγωγής μεταλλικού νερού και αναψυκτικών). Προορίζεται κυρίως για τον καθαρισμό συστημάτων με κλειστά μέρη (σωληνώσεις, δεξαμενές, αντλίες, βαλβίδες, θερμοκούς εναλλάκτες, ομογενοποιητές κ.λπ.) στα οποία δεν είναι δυνατή η άμεση πρόσβαση. Το βασικό χαρακτηριστικό του, στο οποίο βασίζεται η ονομασία του, είναι ότι δεν απαιτείται αποσυναρμολόγηση των μηχανικών τμημάτων του συστήματος. Οι τεχνικές απολύμανσης που χρησιμοποιούνται στο CIP είναι οι εξής: πρόπλυση, απόπλυση, ξέπλυμα, απολύμανση και τελικό ξέπλυμα (Sansebastiano et al., 2007).

2.2.2.2 Καθαρισμός εκτός χώρου (COP)

Για να επιτευχθεί επιτυχής καθαρισμός εκτός χώρου (COP), είναι ζωτικής σημασίας η πλήρης κατανόηση όλων των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν ή να θέσουν σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας καθαρισμού. Μια διαδικασία, σύμφωνα με τον ορισμό της, αποτελείται από προσεκτικά σχεδιασμένες δραστηριότητες που αποσκοπούν στην επίτευξη συγκεκριμένων στόχων ή αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση του καθαρισμού COP, οι πρωταρχικοί στόχοι περιλαμβάνουν την εξάλειψη ανεπιθύμητων οσμών, την απομάκρυνση υπολειμμάτων τροφίμων, ξένων υπολειμμάτων και ανεπιθύμητων

μικροοργανισμών από τις επιφάνειες επαφής του εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων.

Με μια πρώτη ματιά, ο καθαρισμός COP μπορεί να φαίνεται να είναι μια απλή διαδικασία, που περιλαμβάνει πέντε βασικές λειτουργίες μονάδας: προπλύση, πλύση, ξέπλυμα μετά τον καθαρισμό, απολύμανση και τελικό ξέπλυμα. Αυτές οι θεμελιώδεις διαδικασίες αποτελούν τα δομικά στοιχεία όλων των διαδικασιών υγρού καθαρισμού, συμπεριλαμβανομένου του χειροκίνητου καθαρισμού, του Clean-in-Place (CIP) και του COP. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ τα βήματα της διαδικασίας παραμένουν τα ίδια, τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά (Keener, 2005).

Η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα του καθαρισμού COP μπορεί συχνά να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο τύπος του ρύπου που πρέπει να αφαιρεθεί, η χημεία του νερού καθαρισμού, ο τύπος του απορρυπαντικού που χρησιμοποιείται, οι θερμοκρασίες επεξεργασίας, οι χρόνοι έκθεσης, ο τύπος του απολυμαντικού παράγοντα που χρησιμοποιείται και η διάρκεια έκθεσης στην απολυμαντική ένωση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μεταβλητότητα της διαδικασίας μπορεί να προκύψει είτε από συνθήκες "κοινής αιτίας" είτε από συνθήκες "ειδικής αιτίας", οι οποίες συμβάλλουν περαιτέρω στις διαφορές που παρατηρούνται στην αποτελεσματικότητα του καθαρισμού COP

2.2.2.3 Καθαρισμός με αφρό ή τζελ

Ο καθαρισμός με αφρό είναι μια μέθοδος καθαρισμού όπου το κύριο απορρυπαντικό εφαρμόζεται με τη μορφή αφρού, ενώ ο καθαρισμός με γέλη περιλαμβάνει την εφαρμογή απορρυπαντικού με βάση τη γέλη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι γέλες μπορούν να αερίζονται κατά την εφαρμογή, με αποτέλεσμα να έχουν μια σύσταση που μοιάζει με μους. Ο καθαρισμός με αφρό είναι διαδεδομένος λόγω της αποτελεσματικότητας, της αποδοτικότητας και της ευελιξίας του στον καθαρισμό τόσο των χώρων όσο και του εξοπλισμού. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία του αφρού, όπως η ανάπτυξη αφρών μακράς προσκόλλησης, και η διαθεσιμότητα διαφορετικών τύπων απορρυπαντικών αφρού τον έχουν καταστήσει μια πολύτιμη διαδικασία καθαρισμού που εφαρμόζεται σε διάφορα σενάρια.

Για τη δημιουργία του αφρού, νερό, απορρυπαντικό και αέρας αναμειγνύονται μαζί και στη συνέχεια εφαρμόζονται σε επιφάνειες και εξοπλισμό χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο ακροφύσιο ή μια λόγχη που συνδέεται με έναν εύκαμπτο σωλήνα. Το απορρυπαντικό αφρού χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκέντρωση 3-5% v/v, η οποία μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του προς απομάκρυνση ρύπου και τη σκληρότητα του χρησιμοποιούμενου νερού. Ο καθαρισμός με αφρό και τζελ προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τον χειροκίνητο καθαρισμό. Μερικά από αυτά αποτελούν:

- ✚ Ταχεία εφαρμογή του διαλύματος απορρυπαντικού σε μεγάλες και δυσπρόσιτες περιοχές.
- ✚ Παρατεταμένος χρόνος επαφής μεταξύ του απορρυπαντικού και των λερωμένων επιφανειών, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού.
- ✚ Μειωμένος συνολικός χρόνος καθαρισμού.
- ✚ Χαμηλότερες απαιτήσεις σε εργατικό δυναμικό.
- ✚ Ενισχυμένος έλεγχος της χρήσης του απορρυπαντικού.
- ✚ Ασφαλέστερη εφαρμογή δυνητικά επικίνδυνων απορρυπαντικών.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να διαλυθεί μια κοινή παρανόηση σχετικά με τον καθαρισμό με αφρό και τζελ, η οποία είναι ότι εξαλείφουν την ανάγκη για σωματική δράση, όπως το τρίψιμο με βούρτσα ή ξέστρο. Ενώ ο χρόνος επαφής του απορρυπαντικού είναι κρίσιμος, η φυσική ενέργεια πρέπει να εξακολουθεί να εφαρμόζεται για την αποτελεσματική απομάκρυνση της επίμονης βρωμιάς και της βρωμιάς. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τρίψιμο ή με τη χρήση της δύναμης που παράγεται από έναν πίδακα νερού, συνήθως σε υψηλή ή μεσαία πίεση (Coutts & Fielder, 2009).

2.2.2.4 Χειρωνακτικός καθαρισμός

Ο χειρωνακτικός καθαρισμός είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων για τη διατήρηση της καθαριότητας των μηχανημάτων, του εξοπλισμού και των επιφανειών. Περιλαμβάνει την εφαρμογή απορρυπαντικού με τη χρήση διαφόρων εργαλείων καθαρισμού, όπως πανιά καθαρισμού, τρίφτες ή βούρτσες. Επιπλέον, ο χειροκίνητος καθαρισμός μπορεί να

περιλαμβάνει και εμβάπτιση των εξαρτημάτων σε διάλυμα απορρυπαντικού πριν από οποιαδήποτε φυσική ενέργεια.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα του χειροκίνητου καθαρισμού είναι η ευελιξία του, που του επιτρέπει να χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εξοπλισμού και επιφανειών. Ελαχιστοποιεί επίσης τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης που προκαλείται από αερολύματα ή υπερψεκασμό. Ωστόσο, είναι ζωτικής σημασίας ο έλεγχος των εργαλείων καθαρισμού για την αποφυγή πιθανής διασταυρούμενης μόλυνσης (Coutts & Fielder, 2009).

Δεδομένου ότι ο χειρωνακτικός καθαρισμός συνεπάγεται άμεση επαφή μεταξύ του χειριστή και των χημικών καθαρισμού, η επιλογή του απορρυπαντικού καθίσταται κρίσιμο ζήτημα. Συνήθως χρησιμοποιείται ένα προσεκτικά επιλεγμένο διάλυμα απορρυπαντικού, το οποίο αποτελείται από συγκέντρωση περίπου 1-2% v/v. Το διάλυμα αυτό συνήθως θερμαίνεται σε θερμοκρασίες 40-45°C. Οι επιλογές απορρυπαντικών που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν ουδέτερα απορρυπαντικά, απορρυπαντικά με βάση τεταρτοταγή ένωση αμμωνίου (QAC) ή αλκαλικά απορρυπαντικά ελαφρού/μέσου βαθμού χρήσης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, ενώ τα ελαφρού τύπου απορρυπαντικά μπορεί να είναι κατάλληλα για γενικούς σκοπούς καθαρισμού, μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματικά όσο τα προϊόντα υψηλότερης αλκαλικότητας όταν αντιμετωπίζουν επίμονα λιπαρά ή πρωτεϊνικά εδραζόμενα ρύπους.

2.3 Απολύμανση και απολυμαντικά μέσα

Ενώ η αρχική φάση καθαρισμού ενός προγράμματος εξυγίανσης εξαλείφει αποτελεσματικά ένα σημαντικό μέρος της μικροβιακής μόλυνσης, παρατηρείται σε αρκετές επιχειρήσεις επεξεργασίας τροφίμων η διατήρηση και επιβίωση σημαντικού αριθμού βιώσιμων μικροοργανισμών στις επιφάνειές τους, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη χρήση απολυμαντικών. Ο σκοπός της απολύμανσης, σε αυτό το πλαίσιο, είναι η περαιτέρω μείωση του πληθυσμού των βιώσιμων μικροοργανισμών στις επιφάνειες μέσω της εξάλειψης ή της καταστολής. Επιπλέον, χρησιμεύει για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης μικροβίων στις επιφάνειες αυτές κατά τη διάρκεια των διαστημάτων μεταξύ των κύκλων παραγωγής. Με τη χρήση απολυμαντικών, στόχος είναι η δημιουργία ενός περιβάλλοντος που ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης και εξασφαλίζει την ασφάλεια των προϊόντων (Melo et al., 1992).

2.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά απολυμαντικού μέσου

Είναι πολύ σημαντικό, στις βιομηχανίες τροφίμων να γίνεται χρήση κατάλληλων και αποτελεσματικών απολυμαντικών παραγόντων οι οποίοι να πληρούν κάποια βασικά επιθυμητά χαρακτηριστικά ώστε παρέχουν αποτελεσματική μικροβιακή καταστροφή, ευελιξία, ασφάλεια και πρακτικότητα για διάφορες απαιτήσεις απολύμανσης. Έτσι, όταν πρόκειται για ένα ιδανικό απολυμαντικό, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής βασικά χαρακτηριστικά:

Πρώτον, θα πρέπει να διαθέτει τη δύναμη να εξαλείφει γρήγορα ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ζυμομυκήτων και της μούχλας. Αυτό εξασφαλίζει μια ενδεδειγμένη και αποτελεσματική καταστροφή των μικροοργανισμών, χωρίς να αφήνει περιθώρια για πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες.

Δεύτερον, το απολυμαντικό θα πρέπει να είναι ανθεκτικό απέναντι σε διάφορες περιβαλλοντικές προκλήσεις. Θα πρέπει να διατηρεί την αποτελεσματικότητά του ακόμη και όταν έρχεται αντιμέτωπο με οργανική ύλη, υπολείμματα απορρυπαντικών, υπολείμματα σαπουνιού ή διακυμάνσεις στα επίπεδα σκληρότητας και pH του νερού.

Επιπλέον, θα πρέπει όχι μόνο να απολυμαίνει αλλά και να βοηθά στη διαδικασία καθαρισμού. Το απολυμαντικό θα πρέπει να διαθέτει καλές ιδιότητες καθαρισμού, διευκολύνοντας την απομάκρυνση της βρωμιάς, των υπολειμμάτων και άλλων ανεπιθύμητων ουσιών από τις επιφάνειες.

Η ασφάλεια είναι υψίστης σημασίας, επομένως το απολυμαντικό θα πρέπει να είναι μη τοξικό και απαλό για το δέρμα, αποφεύγοντας κάθε πιθανό ερεθισμό ή βλάβη. Αυτό επιτρέπει τη χρήση του σε διάφορα περιβάλλοντα χωρίς να διακυβεύεται η ευημερία των ατόμων.

Όσον αφορά τη χρηστικότητα, το απολυμαντικό θα πρέπει να διαλύεται εύκολα στο νερό, δημιουργώντας ένα απρόσκοπτο διάλυμα ανεξάρτητα από τις αναλογίες που χρησιμοποιούνται. Αυτό εξασφαλίζει ευκολία και αποτελεσματικότητα κατά την εφαρμογή. Ειδικά στην περίπτωση των απολυμαντικών "χωρίς ξέπλυμα", θα πρέπει να είναι μη μολυσματικό, δηλαδή να μην αφήνει πίσω του ανεπιθύμητες οσμές ή γεύσεις στις επιφάνειες που υποβάλλονται σε επεξεργασία.

Η σταθερότητα είναι το κλειδί. Το απολυμαντικό θα πρέπει να διατηρεί την αποτελεσματικότητά του τόσο σε συμπυκνωμένη μορφή όσο και όταν αραιώνεται για χρήση. Αυτό εξασφαλίζει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ευκολία στην προετοιμασία. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι φιλικό προς το χρήστη, με σαφείς οδηγίες εφαρμογής και ελάχιστη πολυπλοκότητα στο χειρισμό ή την ανάμιξη. Δεν θα πρέπει να απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, καθιστώντας το προσιτό σε όποιον το χρειάζεται.

Η διαθεσιμότητα και η οικονομική προσιτότητα είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες. Το απολυμαντικό θα πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμο στην αγορά, επιτρέποντας την ευρεία χρήση του χωρίς να επιβαρύνει σημαντικά οικονομικά τους χρήστες. Τέλος, θα πρέπει να είναι εύκολη η μέτρηση της επιθυμητής συγκέντρωσης του απολυμαντικού κατά την παρασκευή του διαλύματος. Αυτό επιτρέπει την ακριβή και συνεπή δοσολογία, εξασφαλίζοντας βέλτιστα αποτελέσματα απολύμανσης(Lelieveld, 2003).

2.3.2 Απολυμαντικά μέσα

Ενώ υπάρχουν πολυάριθμες χημικές ουσίες που διαθέτουν βιοκτόνες ιδιότητες, ορισμένα απολυμαντικά που βρίσκονται συνήθως σε καθημερινή χρήση δεν είναι κατάλληλα για εφαρμογές σε τρόφιμα λόγω ανησυχιών σχετικά με την ασφάλεια ή πιθανών προβλημάτων μόλυνσης. Παραδείγματα τέτοιων απολυμαντικών περιλαμβάνουν φαινολικά ή προϊόντα με βάση ιόντα μετάλλων. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται σε περιορισμένο βαθμό στο πλαίσιο της παρασκευής τροφίμων και προορίζονται κυρίως για συγκεκριμένους σκοπούς. Ορισμένα από αυτά τα απολυμαντικά περιλαμβάνουν τα διοξείδιο του χλωρίου και τις ενώσεις βρωμίου.

Μεταξύ των επιτρεπόμενων χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες τροφίμων, αρκετά προϊόντα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα:

- ✚ Συστατικά που απελευθερώνουν χλώριο
- ✚ Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (Quats)
- ✚ Αμφότερικά
- ✚ Ενώσεις ιωδίου (ιωδοφόρα)
- ✚ Περακετικό οξύ
- ✚ Όξινες ανιονικές ενώσεις

Αυτά τα απολυμαντικά είναι ευρέως γνωστά λόγω της αποτελεσματικότητας και της καταλληλότητάς τους για χρήση σε περιβάλλοντα που σχετίζονται με τρόφιμα. Έχουν επιλεγεί προσεκτικά με βάση την ικανότητά τους να καταπολεμούν τη μικροβιακή μόλυνση, τηρώντας παράλληλα τους κανονισμούς ασφαλείας και ελαχιστοποιώντας τις πιθανές επιπτώσεις στην ποιότητα ή τη γεύση των τροφίμων(Lelieveld, 2003).

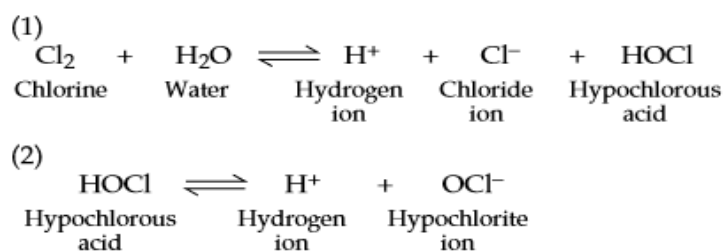
Property	Chlorine	QAC	Amphoterics	Iodophors	Peracetic acid	Acid anionics
<i>Microorganism control</i>						
Gram-positive	++	++	++	++	++	++
Gram-negative	++	++	++	++	++	++
Spores	+	-	-	+	++	-
Yeast	++	++	++	++	++	++
Developed microbial resistance	-	+	+	-	-	-
<i>Other characteristics</i>						
Inactivation by organic matter	++	+	+	+	+	+
Water hardness	-	+	-	-	-	-
Detergency properties	-	++	+	+	-	++
Surface activity	-	++	++	+	-	-
Foaming potential	-	++	++	-	-	+
Problems with taints	±	-	-	±	±	-
Stability	±	-	-	±	±	-
Corrosion	+	-	-	+	-	-
Safety	+	-	-	+	++	-
Other chemicals	-	+	-	-	-	+
Potential environmental impact	++	±	±	±	-	-
Cost	-	++	++	+	+	+

- No effect/poor effectiveness
+ Effect/medium effectiveness
++ Large effect/strong effectiveness

Εικόνα 2.2 Χαρακτηριστικά ορισμένων κοινών απολυμαντικών παραγόντων(Lelieveld, 2003).

2.3.2.1 Χλώριο

Το χλώριο, είτε σε αέρια μορφή (Cl₂) είτε σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό. Η αποτελεσματικότητά του στην καταπολέμηση των μικροβίων οφείλεται στο σχηματισμό υποχλωριώδους οξέος (HOCl) όταν το χλώριο εισάγεται στο νερό όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση. Αυτό το υποχλωριώδες οξύ δρα ως ο κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για τις μικροβιοκτόνες ιδιότητές του(Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018).



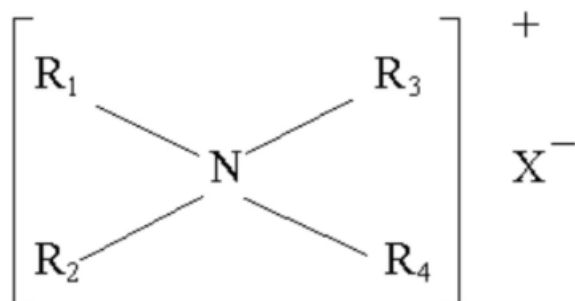
Το χλώριο ξεχωρίζει ως προσιτή επιλογή απολύμανσης, η οποία είναι εύκολα διαθέσιμη σε διάφορες μορφές, όπως υποχλωριώδες ή περιστασιακά ως αέριο χλώριο. Μπορεί επίσης να βρεθεί σε σκευάσματα βραδείας αποδέσμευσης όπως οι χλωραμίνες και η διχλωροδιμεθυλοϋδαντοΐνη. Το χλώριο έχει αναγνωριστεί για την αποτελεσματικότητά του στην μηχανική απολύμανση γυαλισμένου ανοξειδωτού χάλυβα, μη λειασμένου ηλεκτρολυμένου ανοξειδωτού χάλυβα και πολυκαρβονικών επιφανειών, μειώνοντας σημαντικά τους μικροβιακούς πληθυσμούς σε λιγότερο από 1,0 log CFU/cm². Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά του είναι κάπως μειωμένη

όταν χρησιμοποιείται σε λειασμένες επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και επιφάνειες από ορυκτές ρητίνες, όπου οι μικροβιακοί πληθυσμοί τείνουν να υπερβαίνουν το 1,0 log CFU/cm² (Lelieveld, 2003).

Οι πιο κοινές ενώσεις χλωρίου που χρησιμοποιούνται στην απολύμανση είναι το υποχλωριώδες, οι χλωραμίνες και η διχλωροδιμεθυλοϋδαντοΐνη. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης, συμπεριλαμβανομένης κάποιας αποτελεσματικότητας κατά των σπορίων, και είναι σχετικά οικονομικά αποδοτικές. Η αποτελεσματικότητα του χλωρίου ως απολυμαντικού επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες, όπως τα επίπεδα pH, η θερμοκρασία και η παρουσία οργανικού φορτίου. Συνεπώς, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μπορούν εύκολα να απενεργοποιηθούν οι ενώσεις του χλωρίου από οργανική ύλη ενώ υπάρχει πιθανότητα δυσμενών περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Είναι ζωτικής σημασίας να γίνεται με προσοχή ο χειρισμός των μη αραιωμένων ενώσεων χλωρίου, καθώς είναι διαβρωτικές για τον εξοπλισμό, μπορούν να προκαλέσουν κινδύνους για την υγεία και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις (Schmidt, n.d.).

2.3.2.2 Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου

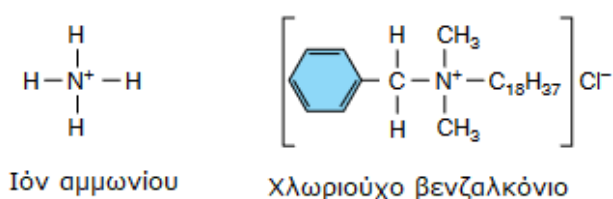
Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συχνότερα σε διάφορες εφαρμογές είναι τα κατιονικά απορρυπαντικά, και ιδιαίτερα οι τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (quaternary ammonium compounds, QUACs), οι οποίες αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία ενώσεων που παρουσιάζουν ένα γενικό δομικό πρότυπο.



Εικόνα 2.3 Βασική δομή των τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου (Schmidt, n.d.).

Οι μοναδικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων επηρεάζονται κυρίως από τις αλκυλικές ομάδες (ομάδες R) που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στη δομή. Οι εν λόγω αλκυλομάδες μπορούν να ποικίλλουν σημαντικά, με αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα

χαρακτηριστικών και λειτουργιών που παρουσιάζουν οι διάφορες QAC. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν τις καθαριστικές τους ικανότητες μέσω του θετικά φορτισμένου τμήματος, γνωστού ως κατιόν, εντός της μοριακής τους δομής. Η ονομασία "τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου" προέρχεται από την τροποποίηση του τετραδύναμου ιόντος αμμωνίου, NH_4^+ όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018).



Εικόνα 2.4 Το ιόν αμμωνίου και μια τεταρτοταγής ένωση αμμωνίου, χλωριούχο βενζαλκόνιο (Gerard J., Berdell R., & Christine L., 2018).

Λόγω της θετικά φορτισμένης κατιονικής τους φύσης, οι τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (QAC) ασκούν τον τρόπο δράσης τους προσελκύοντας αρνητικά φορτισμένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριακών πρωτεϊνών. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο πρωταρχικός τους στόχος είναι η λειτουργία της μεμβράνης των μικροοργανισμών. Το μήκος της πλευρικής αλυσίδας της ομάδας R στις QACs συσχετίζεται γενικά με την απολυμαντική τους δράση. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι QACs με μεγαλύτερες αλυσίδες άνθρακα ενδέχεται να παρουσιάζουν χαμηλότερη διαλυτότητα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη δραστηριότητα σε σύγκριση με τις QACs με μικρότερες δομές αλυσίδων. Επομένως, το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας παίζει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό της αποτελεσματικότητας των απολυμαντικών QAC, με την ισορροπία να είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί τόσο η διαλυτότητα όσο και η επιθυμητή αντιμικροβιακή δράση (Schmidt, n.d.).

Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι ορισμένες αλκαλικές ενώσεις, συγκεκριμένα ανιονικά διαβρεκτικά, έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τη βακτηριοκτόνο δράση των τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου (QACs). Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα σημεία:

- ✚ Οι QACs παρουσιάζουν σταθερότητα και διατηρούν την αποτελεσματικότητά τους όταν βρίσκονται σε συμπυκνωμένη μορφή, επιτρέποντας μεγάλη διάρκεια ζωής.
- ✚ Σε σύγκριση με τα διαλύματα υποχλωριώδους, τα συμπυκνωμένα QAC είναι ασφαλέστερα στο χειρισμό και έχουν μικρότερη τάση να διαβρώνουν τα μέταλλα.
- ✚ Λόγω της υψηλής επιφανειακής δραστηριότητάς τους, η χρήση των QACs μπορεί μερικές φορές να οδηγήσει στην παραγωγή υπερβολικού αφρού κατά την κυκλοφορία, γεγονός που μπορεί να καταστήσει την έκπλυσή τους πιο δύσκολη.
- ✚ Διάφοροι παράγοντες μπορούν να παρεμποδίσουν τη βακτηριοκτόνο αποτελεσματικότητα των QACs, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας οργανικής ύλης, της σκληρότητας του νερού (η οποία μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητά τους) και του συγκεκριμένου τύπου οργανισμού που στοχεύεται. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα κολοβακτηρίδια και οι ψυχρότροφοι οργανισμοί, ενδέχεται να επηρεάζονται λιγότερο, ιδίως σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (π.χ. <math>< 50 \text{ ppm QAC}</math> στους 10°C), σε σύγκριση με τα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως οι σταφυλόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι.

Η συνεκτίμηση αυτών των παραγόντων είναι ζωτικής σημασίας κατά τη χρήση των QACs για σκοπούς απολύμανσης, καθώς συμβάλλει στη διασφάλιση της βέλτιστης αποτελεσματικότητας και των επιθυμητών αποτελεσμάτων σε διάφορες εφαρμογές(Lelieveld, 2003).

2.3.2.3 Ενώσεις ιωδίου

Η χρήση του ιωδίου ως αποτελεσματικού αντιμικροβιακού παράγοντα μπορεί να εντοπιστεί από το 1800. Το ιώδιο είναι ένα εξαιρετικά ευέλικτο απολυμαντικό, το οποίο παρουσιάζει ευρύ φάσμα δράσης, καθώς στοχεύει τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια, μαζί με τους ακτινομύκητες. Επιπλέον, όταν η συγκέντρωση του ιωδίου αυξάνεται κατάλληλα και παρέχεται επαρκής χρόνος επαφής, εμφανίζει σποροκτόνα και ιοκτόνα αποτελέσματα(Sansebastiano et al., 2007).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του ιωδίου το καθιστούν αποτελεσματικό έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών, καθιστώντας το πολύτιμο εργαλείο σε διάφορες εφαρμογές απολύμανσης. Με τη ρύθμιση της συγκέντρωσης και του χρόνου επαφής, το ιώδιο μπορεί να βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει αυξημένη αποτελεσματικότητα έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, ακτινομυκήτων, σπορίων και ιών, συμβάλλοντας σε ολοκληρωμένα πρωτόκολλα απολύμανσης. Χρησιμοποιείται συνήθως σε διάφορες μορφές, συχνά σε συνδυασμό με ένα επιφανειοδραστικό που χρησιμεύει ως φορέας. Αυτά τα μείγματα είναι συνήθως γνωστά ως ιωδοφόρα. Μεταξύ των διαφόρων μορφών, το διαλυμένο ελεύθερο ιώδιο είναι ο πιο δραστικός παράγοντας, αν και είναι λιγότερο σταθερός. Αυτή η μορφή είναι πιο διαδεδομένη σε περιβάλλοντα με χαμηλά επίπεδα pH. Ο βαθμός διάσπασης από την επιφανειοδραστική ουσία εξαρτάται από τον συγκεκριμένο τύπο επιφανειοδραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται (Schmidt, n.d.). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ιώδιο έχει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό.

Για βέλτιστα αποτελέσματα, τα ιωδοφόρα συνιστάται γενικά να χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 12,5 έως 25 ppm για διάρκεια ενός λεπτού. Αυτό εξασφαλίζει επαρκή χρόνο επαφής για αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση.

Κατά την εξέταση των ιωδοφίλων, είναι σημαντικό να σημειωθούν τα ακόλουθα:

- ✚ Το οξύ στο ιωδοφόρο μπορεί να εξουδετερωθεί από το σκληρό νερό.
- ✚ Τα ιωδοφόρα επιδεικνύουν ικανοποιητική διάρκεια ζωής σε θερμοκρασία δωματίου, αν και μπορεί να εμφανιστεί κάποια εξάτμιση ιωδίου. Ωστόσο, παρατηρείται υπερβολική απώλεια σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 50°C.
- ✚ Ορισμένα πλαστικά υλικά, όπως οι φλάντζες, μπορούν να αντιδράσουν με το ιώδιο, οδηγώντας σε πιθανή αλλοίωση του προϊόντος με ιώδιο.
- ✚ Το ιώδιο έχει την ικανότητα να βάφει τυχόν υπολείμματα ρύπων στις επιφάνειες του εξοπλισμού, επιτρέποντας την οπτική επιθεώρηση για την αξιολόγηση των προτύπων υγιεινής (Lelieveld, 2003).

Υπολείμματα όπως το γάλα μπορούν να απενεργοποιήσουν το ιώδιο και η εξασθένιση του κεχριμπαρένιου χρώματος χρησιμεύει ως πρώιμη ένδειξη απώλειας

ιωδίου. Είναι ζωτικής σημασίας να αξιολογείται περιοδικά η ισχύς του διαλύματος ιωδοφόρου, ιδίως όταν αυτό ανακυκλώνεται.

Η συνεκτίμηση αυτών των πτυχών συμβάλλει στη διασφάλιση της αποτελεσματικής χρήσης των ιωδοφόρων για σκοπούς απολύμανσης και διευκολύνει τη διατήρηση των κατάλληλων προτύπων υγιεινής σε διάφορα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων.

Κεφάλαιο 3. Μέθοδος ATP Βιοφωταύγειας

3.1 Βιοφωταύγεια

Φωταύγεια είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο απορροφά ένα κβάντο ενέργειας και ανέρχεται σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Όταν το μόριο βρίσκεται σε αυτήν την υψηλή ενεργειακή κατάσταση, μπορεί να εκπέμψει φως, καθιστώντας ορατή την φωταύγεια. Ανάλογα με τον τρόπο που η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται, το φαινόμενο μπορεί να είναι είτε φθορισμός (fluorescence) είτε φωσφορισμός (phosphorescence). Αντίθετα, όταν η ενέργεια προέρχεται από χημική αντίδραση, τότε το φαινόμενο αποκαλείται χημειο-(βιο)-φωταύγεια (Roda, 2011).

Η βιοφωταύγεια αποτελεί ένα είδος φωταύγειας όπου οι αντιδράσεις συμβαίνουν μέσα στα κύτταρα ζωντανών οργανισμών. Αυτές οι αντιδράσεις συνήθως εξαρτώνται από ενζύμες και εμπλέκονται υποστρώματα οργανικής προέλευσης. Η βιοφωταύγεια συναντάται σε πληθώρα οργανισμών στη φύση, περιλαμβανομένων φωτοβακτηρίων, μυκητών, σκουληκιών, μελανών μέδουσων, θαλάσσιων ανεμώνων, μυδιών, ψαριών και πυγολαμπίδων. Κάθε οργανισμός χρησιμοποιεί διαφορετικά ενζυμικά συστήματα για να καταλύσει τις αντιδράσεις της βιοφωταύγειας.

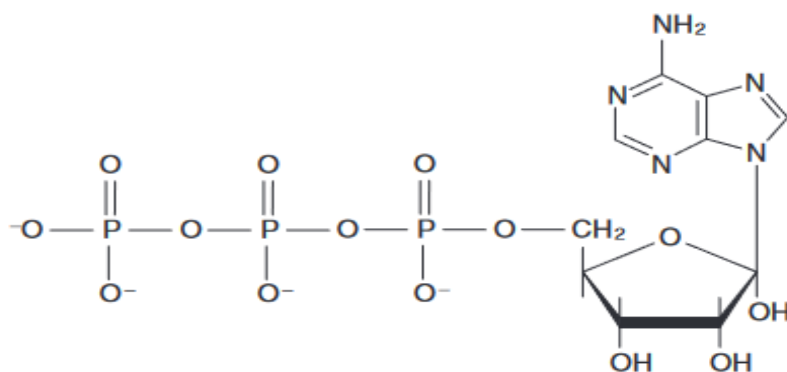
3.2 5'-Αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ (ATP)

Το ATP, ή τριφωσφορική αδενοσίνη, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο ως το πρωταρχικό μόριο μεταφοράς ενέργειας στα κύτταρα, καθιστώντας το απαραίτητο για την κυτταρική ζωή. Χρησιμεύει ως δεξαμενή για την αποθήκευση χημικής ενέργειας που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια ορισμένων χημικών αντιδράσεων και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τις αντιδράσεις που την απαιτούν. Δομικά, το ATP αποτελείται από μια μονάδα αδενοσίνης, η οποία αποτελείται από αδερίνη και ριβόζη, με τρεις φωσφορικές ομάδες (συντομογραφία P) συνδεδεμένες με αυτήν. Ουσιαστικά, το ATP μπορεί να θεωρηθεί ως ένα νουκλεοτίδιο αδερίνης, επίσης γνωστό ως μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), με δύο επιπλέον φωσφορικές ομάδες (Gerard J., Berdell R., Christine L., et al., 2018).

Το ATP αναφέρεται συχνά ως μόριο υψηλής ενέργειας, επειδή απελευθερώνει σημαντική ποσότητα αξιοποιήσιμης ενέργειας όταν υδρολύεται η τρίτη φωσφορική ομάδα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP). Αυτή η αντίδραση υδρόλυσης μπορεί να παρασταθεί ως εξής:



Εδώ, το P_i αντιπροσωπεύει ένα μόριο ανόργανου φωσφορικού άλατος. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιείται από το κύτταρο για την κίνηση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών και την εκτέλεση έργου.



Εικόνα 3.1 Χημική δομή της 5'-τροφοσφορικής αδενοσίνης (Bautista, 1999)

Οι ερευνητές έχουν διερευνήσει τη δυνατότητα χρήσης των επιπέδων ATP ως μέτρησης της βιομάζας. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή προϋποθέτει αρκετούς παράγοντες όταν εφαρμόζεται σε βακτήρια:

- ✚ Πρώτον, υποθέτει ότι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί περιέχουν ATP, που χρησιμεύει ως αξιόπιστος δείκτης βιομάζας.
- ✚ Δεύτερον, υποθέτει ότι το ATP δεν συνδέεται με νεκρά κύτταρα ή δεν απορροφάται σε επιφάνειες, εξασφαλίζοντας ακριβή μέτρηση.
- ✚ Τέλος, υποθέτει ότι το επίπεδο του ATP παραμένει σχετικά σταθερό σε διαφορετικά taxa υπό καθορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και μεταβολικές δραστηριότητες (Bautista, 1999).

Ο προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP σε ένα δείγμα παρέχει ένα έμμεσο μέσο ποσοτικοποίησης του αριθμού των παρόντων κυττάρων. Μια βολική

προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ATP περιλαμβάνει τη χρήση της ανάλυσης βιοφωταύγειας, η οποία βασίζεται στην παραγωγή φωτός.

Η βιοφωταύγεια αναφέρεται στη βιολογική παραγωγή φωτός που παρατηρείται σε διάφορα ζώα και μύκητες. Ένα γνωστό παράδειγμα βιοφωταύγειας εμφανίζεται στην αμερικανική οικιακή πυγολαμπίδα (*Photinus pyralis*), όπου παρατηρείται διαλείπουσα λάμψη (Bautista, 1999).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα όρια εντοπισμού υπολειμμάτων διαφόρων τροφίμων σε επιφάνειες εξοπλισμού, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της βιοφωταύγειας:

Τρόφιμο	Ποσότητα(mg)
Κιμάς κρέατος	94
Κιμάς γαλοπούλας	549
Φιλέτο βακαλάου	8
Μπρόκολο	2459
Πατάτα	5249
Παστεριωμένο γάλα	179
Γιαούρτι	394
Ανθότυρο	8
Μαγιονέζα	24153
Μπύρα από λυκίσκο	145
Μπύρα lager	5
Χυμός πορτοκάλι	3
Τοματοπολτός	15

Πίνακας 3.1 Αωίχνευση τροφίμων με ATP (Corbitt et al., 2000)

3.3 Η αντίδραση ATP βιοφωταύγειας

Η μέθοδος βιοφωταύγειας βασίζεται στην ικανότητα της οργανικής ύλης να απελευθερώνει τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η οποία χρησιμεύει ως η κύρια πηγή ενέργειας σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Το χαρακτηριστικό αυτό παρατηρείται σε διάφορους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των μυκήτων, καθώς και σε τρόφιμα και υπολείμματα τροφίμων,

ακόμη και σε απολυμασμένες επιφάνειες. Η αρχή της ανάλυσης βασίζεται σε μια ενζυμική αντίδραση που είναι γνωστή ως εξής:

ATP + λουσιφερίνη/λουσιφεράση → AMP + PP + φως.

Σε αυτή την αντίδραση, το ATP αλληλεπιδρά με τα ένζυμα λουσιφερίνη και λουσιφεράση για την παραγωγή μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), ανόργανου πυροφωσφορικού άλατος (PP) και φωτός. Η απελευθέρωση του φωτός είναι άμεσο αποτέλεσμα αυτής της ενζυμικής αντίδρασης. Με τη μέτρηση του εκπεμπόμενου φωτός καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση της ποσότητας ATP που υπάρχει στο δείγμα (Syguła-Cholewińska et al., n.d.)

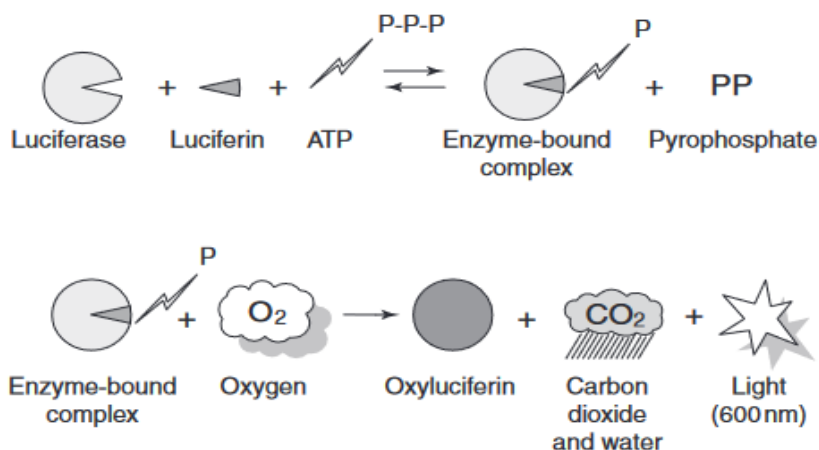
3.3.1 Η σημασία της λουσιφερίνης στην αντίδραση βιοφωταύγειας

Τα σκαθάρια, ιδίως εκείνα που ανήκουν στις οικογένειες Elateridae, Phengodidae (σκουλήκια του σιδηρόδρομου) και Lampyridae (πυγολαμπίδες), είναι τα κύρια παραδείγματα βιοφωτεινών εντόμων. Μεταξύ αυτών, οι πυγολαμπίδες της οικογένειας Lampyridae είναι γνωστές για τις φωτεινές τους επιδείξεις. Η χημική αντίδραση που είναι υπεύθυνη για τον βιοφωτισμό θεωρείται ότι είναι παρόμοια σε όλα τα είδη σκαθαριών, καθώς οι λουσιφεράσες τους παρουσιάζουν παρόμοια ικανότητα να αντιδρούν με τη λουσιφερίνη των πυγολαμπίδων και να εκπέμπουν φως (Wilson & Hastings, 1998).

Η λουσιφερίνη των πυγολαμπίδων και η λουσιφερίνη των κολεόπτρων είναι διαφορετικές ουσίες με διαφορετική χημική δομή. Η λουσιφερίνη της πυγολαμπίδας ταξινομείται ως βενζοθειαζοϋλο-θειαζόλη, ενώ η λουσιφερίνη του κοιλεντεροειδούς ανήκει σε ξεχωριστή κατηγορία. Ωστόσο, και οι δύο αντιδράσεις περιλαμβάνουν ένα κρίσιμο ενδιάμεσο προϊόν, γνωστό ως διοξετανόνη, το οποίο διαθέτει υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο. Κατά τη διαδικασία, το ένζυμο λουσιφεράση ξεκινά τη συμπύκνωση της λουσιφερίνης με το ATP, η οποία διευκολύνεται από την παρουσία ιόντων μαγνησίου (Mg²⁺). Στη συνέχεια, το αδενυλικό αντιδρά με οξυγόνο, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός υπεροξειδίου και στην επακόλουθη κυκλοποίησή του. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης, το ATP

δρα ως πάροχος AMP, το οποίο χρησιμεύει ως ευνοϊκή αποχωρούσα ομάδα (Wilson & Hastings, 1998).

Η λουσιφεράση χρησιμεύει ως καταλύτης για την αντίδραση οξείδωσης της λουσιφερίνης, μετατρέποντάς την σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Η αντίδραση αυτή είναι δυνατή μόνο όταν το ATP παρέχει την απαραίτητη ενέργεια. Το ATP υφίσταται υδρόλυση, διασπώμενο σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) και φωσφορικά κατάλοιπα (PP). Η οξειδωμένη μορφή της λουσιφερίνης επανέρχεται στην πρωτογενή ενεργειακή της κατάσταση εκπέμποντας φως με μήκος κύματος 562 nm. Η ακριβής μέτρηση αυτού του εκπεμπόμενου φωτός επιτρέπει την έμμεση εκτίμηση της συγκέντρωσης ATP. Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης ATP, υποδηλώνοντας ότι η ποσότητα ATP σε ένα δείγμα συσχετίζεται με την υπάρχουσα μικροβιακή βιομάζα (Jane-Marie Hawronskyj & John Holah, 1997).



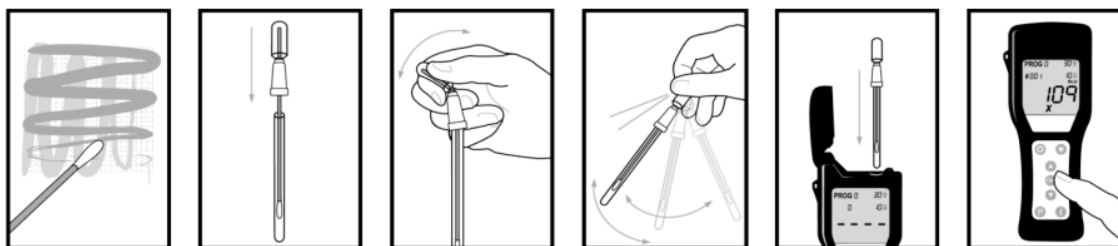
Εικόνα 3.2 Αντίδραση βιοφωταύγειας (Bautista, 1999).

Για τη μέτρηση του εκπεμπόμενου φωτός που προκύπτει από την αντίδραση φωταύγειας, χρησιμοποιείται ένα λουμινόμετρο. Η συσκευή αυτή περιλαμβάνει ένα θάλαμο μέτρησης που είναι απομονωμένος από εξωτερικές πηγές φωτός και έναν ανιχνευτή που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό, εκφρασμένο σε μονάδες σχετικού φωτός (RLU). Η δοκιμή ATP χρησιμοποιείται σε διάφορες εφαρμογές, όπως κλινικές δοκιμές, περιβαλλοντικές εξετάσεις πηγών νερού (π.χ. χώροι κολύμβησης και υπόγεια ύδατα) και στη βιομηχανία τροφίμων.

Στις πρακτικές εφαρμογές, συλλέγονται δείγματα από στερεά υλικά όπως το κρέας, καθώς και από υγρά όπως το νερό, το γάλα ή τα λύματα. Ωστόσο, είναι

σημαντικό να σημειωθεί ότι τα τρόφιμα περιέχουν εγγενώς σημαντικές ποσότητες ATP, οι οποίες ενδέχεται να υπερβαίνουν το σήμα που λαμβάνεται από τη μικροβιακή μόλυνση, ιδίως όταν τα επίπεδα μόλυνσης είναι χαμηλά. Για παράδειγμα, 1 γραμμάριο κρέατος ή χυμού πορτοκαλιού περιέχει περίπου 10-7 γραμμάρια ATP, ενώ ένα μεμονωμένο βακτηριακό κύτταρο περιέχει συνήθως 10-15 γραμμάρια ATP. Η ποσότητα του ATP που απελευθερώνεται ποικίλλει ανάλογα με τον μικροβιακό τύπο και τη φυσιολογική κατάσταση. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν γενικά υψηλότερα επίπεδα ATP σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ενώ η παρουσία ATP στα σπόρια είναι συχνά ελάχιστα ανιχνεύσιμη (Syguta-Cholewińska et al., n.d.)

Στην παρακάτω εικόνα αναπαρίσταται τα διαδοχικά στάδια της λήψης δείγματος από μια επιφάνεια χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας.



Εικόνα 3.3 Διαδοχικά βήματα λήψης δείγματος με την μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας.

Κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας, οι επιφάνειες καθαρίζονται με έναν στυλεό από βαμβακερή ίνα, ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στην κυψέλη του λουμινόμετρου. Στην κυψέλη αυτή περιέχεται ένα διάλυμα ή μια άλλη ουσία που μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση του ATP από τα μικροβιακά κύτταρα καθώς και από τυχόν υπολείμματα τροφίμων που υπάρχουν στο δείγμα. Για την προσδιορισμό του ATP, προστίθεται ένα σύστημα λουσιφεράσης/λουσιφερίνης στο διάλυμα, το οποίο προκαλεί την εκπομπή φωτός (φωταύγεια). Το εκπεμπόμενο φως μετρείται στη συνέχεια από το όργανο, και έτσι υπολογίζεται η ποσότητα ATP που περιέχεται στην εξεταζόμενη επιφάνεια (Bartoszcze & Bielawska-Drozd, 2004).

Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως λόγω του γεγονότος ότι όλα τα κύτταρα εξαρτώνται από την χρήση της αδενοσίνης τριφωσφορικής (ATP), η παρουσία ATP σε μια επιφάνεια εργασίας ή σε ένα εξάρτημα μηχανήματος αποτελεί ένδειξη της παρουσίας μικροοργανισμών. Ωστόσο, η ανίχνευση της ATP, παρά το γεγονός ότι

αποτελεί ένδειξη της υγιεινής του χώρου, δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα του εντοπισμένου οργανισμού (ο οποίος μπορεί να είναι οποιοδήποτε βακτήριο, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων όπως η Salmonella, μύκητας, κύτταρα τροφίμων, ανθρώπινα κύτταρα, κ.λπ.). Για παράδειγμα, εάν ανιχνευθούν υψηλά επίπεδα ATP σε μια επιφάνεια, αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης δεν είναι αρκετά αποτελεσματική και χρειάζεται αναθεώρηση. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε ορισμένους βιομηχανικούς κλάδους ιδιαίτερα τροφίμων(Bakke, 2022).

Ωστόσο, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση μικροβιακών πληθυσμών, η ανάλυση ATP θεωρείται ταχεία μέθοδος, καθώς παρέχει αποτελέσματα εντός δευτερολέπτων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες απαιτούν αναμονή για την ανάπτυξη μικροβίων για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στο DNA, αν και ευαίσθητες και αξιόπιστες, μπορεί να είναι χρονοβόρες και δαπανηρές λόγω των απαιτούμενων αντιδραστηρίων. Οι μικροσκοπικές μέθοδοι προσδιορίζουν τον συνολικό αριθμό των μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων, και απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις μικροβίων.

3.4 Χρήση της μεθόδου ATP βιοφωταύγειας στη βιομηχανία τροφίμων

Όπως έχει αναλυθεί εκτενέστερα στα παραπάνω κεφάλαια η υγιεινή των επιφανειών στις βιομηχανίες τροφίμων αποτελεί ένα από τα πιο βασικά και σημαντικά στάδια για την παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών προϊόντων. Η τακτική παρακολούθηση και αξιολόγηση των επιπέδων καθαριότητας είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας των προγραμμάτων καθαρισμού και απολύμανσης. Αυτό περιλαμβάνει την εφαρμογή μεθόδων και προτύπων δοκιμών για την αξιολόγηση του μικροβιακού φορτίου και της παρουσίας υπολειμματικών μολυσματικών ουσιών στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Με τη συνεπή παρακολούθηση της καθαριότητας, οι επιχειρήσεις τροφίμων μπορούν να εντοπίζουν τις περιοχές που απαιτούν βελτίωση και να λαμβάνουν διορθωτικά μέτρα για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων υγιεινής(Syguła-Cholewińska et al., n.d.)

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αποτελεσματικές πρακτικές καθαρισμού και υγιεινής πρέπει να συμπληρώνονται από άλλα προληπτικά μέτρα, όπως η σωστή αποθήκευση, ο έλεγχος της θερμοκρασίας και οι πρακτικές υγιεινής των εργαζομένων. Μαζί, τα μέτρα αυτά συμβάλλουν σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων, μειώνοντας τον κίνδυνο τροφιμογενών ασθενειών και εξασφαλίζοντας την παράδοση ασφαλών και υψηλής ποιότητας τροφίμων στους καταναλωτές.

Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως σε συνθήκες παραγωγής, υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη για μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο αξιολόγησης της μικροβιολογικής καθαριότητας όπως είναι η μέθοδος της ATP βιοφωταύγειας η οποία παρέχει αποτελέσματα εντός λίγων δευτερολέπτων χωρίς την ανάγκη πολύωρης αναμονής των παραδοσιακών μεθόδων (καλλιέργεια), που διαρκούν συνήθως 24-72 ώρες (Bartoszcze & Bielawska-Drozd, 2004). Η απαίτηση αυτή προκύπτει από τα συστήματα ασφάλειας τροφίμων που αποσκοπούν στην εξασφάλιση της ασφάλειας της παραγωγής τροφίμων. Τα συστήματα αυτά τονίζουν την ανάγκη για άμεση και αποτελεσματική ανίχνευση και εκτίμηση των κινδύνων στα κρίσιμα σημεία ελέγχου στο πλαίσιο του συστήματος Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) (Costa et al., 2006).

Το σύστημα HACCP είναι μια προληπτική προσέγγιση που εντοπίζει, αξιολογεί και ελέγχει τους πιθανούς κινδύνους σε όλη τη διαδικασία παραγωγής τροφίμων. Είναι σχεδιασμένο για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων και τη διασφάλιση της παραγωγής ασφαλών και υψηλής ποιότητας τροφίμων. Τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (CCP) είναι συγκεκριμένα σημεία της παραγωγικής διαδικασίας όπου οι κίνδυνοι μπορούν να προληφθούν, να εξαλειφθούν ή να μειωθούν σε αποδεκτό επίπεδο (Ropkins & Beck, 2000).

3.4.1 Χρήση μεθόδου ATP βιοφωταύγειας για τον έλεγχο μεθόδων καθαρισμού

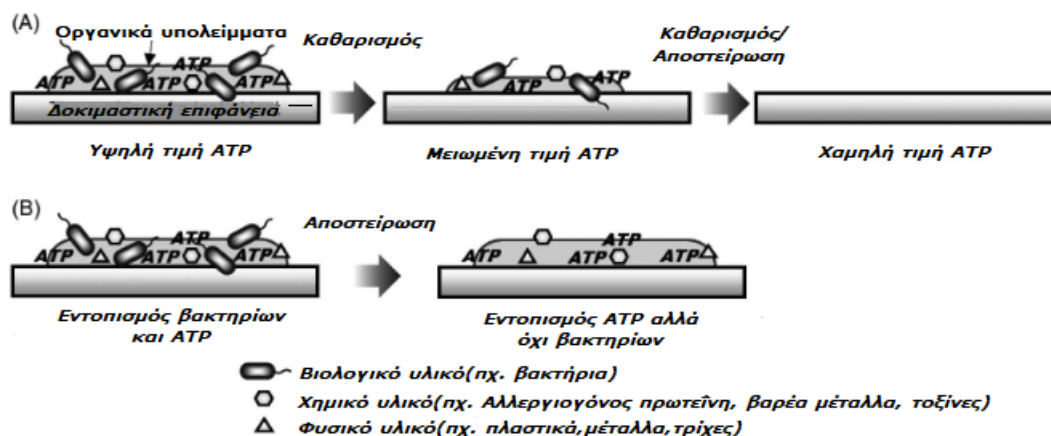
Οι δοκιμές ATP χρησιμεύουν ως πολύτιμο εργαλείο για τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων για τις συνήθεις μεθόδους καθαρισμού εκτός χώρου (Cleaning-out-of-place-COP). Οι δοκιμές αυτές επιτρέπουν την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού με τη μέτρηση των επιπέδων του ATP, το οποίο αποτελεί δείκτη οργανικών υπολειμμάτων. Αναλύοντας τις μετρήσεις ATP,

μπορεί κανείς να καθορίσει την ιδανική διάρκεια για την εμβάπτιση με απορρυπαντικό (αλκαλικό υγρό) και τον καθαρισμό με υπερήχους, εξασφαλίζοντας την ενδεδειγμένη απομάκρυνση των ρύπων (Bakke, 2022).

Επιπλέον, οι δοκιμές ATP μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των συνθηκών *cleaning-in-place*, οι οποίες περιλαμβάνουν καθαρισμό χωρίς αποσυναρμολόγηση του εξοπλισμού ή των γραμμών παραγωγής. Κατά την αξιολόγηση των σεναρίων καθαρισμού στη θέση τους, υπεισέρχονται παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διάρκεια, ο ρυθμός ροής και η συγκέντρωση αλκαλικού υγρού. Για την προσομοίωση πραγματικών συνθηκών, μπορεί να εισαχθεί αντιπροσωπευτική "βρωμιά" (πραγματικό προϊόν) σε συγκεκριμένες περιοχές ή επιφάνειες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία καθαρισμού εντός του χώρου και η επακόλουθη αξιολόγηση της καθαριότητας πραγματοποιείται με τη χρήση δοκιμών ATP.

Η προσέγγιση αυτή όχι μόνο επιτρέπει τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων καθαρισμού στη θέση, αλλά διασφαλίζει επίσης ότι η διαδικασία καθαρισμού απομακρύνει αποτελεσματικά τυχόν οργανικά υπολείμματα ή ρύπους. Προσαρμόζοντας τη θερμοκρασία, τη διάρκεια, τον ρυθμό ροής και τη συγκέντρωση αλκαλικού υγρού με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών ATP, οι κατασκευαστές μπορούν να διατηρήσουν υψηλά πρότυπα καθαριότητας και υγιεινής, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης (Jane-Marie Hawronskyj & John Holah, 1997).

Στην παρακάτω εικόνα αναπαρίσταται η αρχή της δοκιμής ATP για την αξιολόγηση της καθαριότητας των επιφανειών και της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού.



Εικόνα 3.4 Δοκιμή ATP για αξιολόγηση καθαριότητας και αποτελεσματικότητας καθαρισμού. (A) Μελέτη περίπτωσης καθαρισμού και στη συνέχεια καθαρισμού και αποστείρωσης. (B) Μελέτη περίπτωσης αποτελεσματικής αποστείρωσης αλλά όχι καθαρισμού (Bakke, 2022).

Αναλυτικότερα, η δοκιμή ATP χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί η καθαριότητα των επιφανειών και η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών καθαρισμού. Η περίπτωση (A) υποδεικνύει πως κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, μπορεί να γίνει μείωση της ποσότητας ATP και των οργανικών, χημικών και φυσικών υλικών. Όταν η συγκεκριμένη ποσότητα ATP που είναι συνδεδεμένη με την επιφάνεια μειώνεται κάτω από ένα ορισμένο όριο, τότε η επιφάνεια μπορεί να θεωρηθεί ως καθαρή, πράγμα που υποδηλώνει ότι οι οργανικές, χημικές και φυσικές ακαθαρσίες έχουν απομακρυνθεί. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η δοκιμή ATP δεν μπορεί να ανιχνεύσει απευθείας την παρουσία οργανικών, χημικών και φυσικών υλικών. Ενώ η περίπτωση (B) παρουσιάζει αποτελέσματα κατά τα οποία η διαδικασία αποστείρωσης είναι αποτελεσματική, αλλά ο καθαρισμός δεν είναι επαρκής, οι μικροβιακές δοκιμές μπορεί να υποδείξουν ότι ο καθαρισμός έχει πραγματοποιηθεί, ενώ η δοκιμή ATP μπορεί να αποδείξει αποτυχία. Σε τέτοιες περιπτώσεις, υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης βακτηριακής μόλυνσης, καθώς τα οργανικά υπολείμματα μπορούν να αποτελέσουν πηγή θρεπτικών ουσιών για τα μικρόβια.

3.4.2 Συσχέτιση μονάδων RLU με CFU

Η αντίδραση της βιοφωταύγειας μπορεί να ξεκινήσει από εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα ATP. Αυτό το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό έχει ανοίξει το δρόμο για την εφαρμογή αυτής της αντίδρασης, σε συνδυασμό με κατάλληλα πρωτόκολλα προετοιμασίας, στην αξιολόγηση της μικροβιακής παρουσίας σε ένα ευρύ φάσμα τύπων δειγμάτων. Αυτό που καθιστά την προσέγγιση αυτή ιδιαίτερα πολύτιμη είναι

η ικανότητά της να ανιχνεύει μικροοργανισμούς σε δείγματα με ελάχιστο ή μη ανιχνεύσιμο βαθμό μόλυνσης. Αξιοποιώντας τη δύναμη του ATP ως δείκτη, καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση της μικροβιακής βιομάζας σε ένα δεδομένο δείγμα.

Στην πραγματικότητα, οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει αδιάσειστα στοιχεία για την άμεση σχέση μεταξύ των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP και του συνολικού αριθμού μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (CFU) τόσο για τα βακτήρια όσο και για τις ζύμες. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι όσο υψηλότερη είναι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ATP, τόσο μεγαλύτερος είναι ο μικροβιακός πληθυσμός που υπάρχει στο δείγμα. Τα ευρήματα αυτά όχι μόνο καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης του ATP ως μέτρο της μικροβιακής βιομάζας, αλλά επίσης υπογραμμίζουν την ευελιξία του στην αξιολόγηση της μικροβιακής μόλυνσης σε διάφορους τύπους οργανισμών (Bottari et al., 2015).

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η διάκριση των ειδών με βάση αποκλειστικά τη συγκέντρωση ATP δεν είναι εφικτή. Η ποσότητα ATP ανά κύτταρο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ βακτηριακών ειδών, ακόμη και εντός του ίδιου είδους, και σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής των βακτηρίων. Η εκτεταμένη ποσοτικοποίηση των επιπέδων ATP σε διάφορους μικροοργανισμούς έχει δείξει ότι οι συγκεντρώσεις ATP κυμαίνονται από 0,1 έως 4,0 femtograms (fg) ανά μονάδα σχηματισμού αποικιών (CFU) στα βακτήρια, με μέσο όρο περίπου 1 fg ή 10^{-15} γραμμάρια ανά CFU. Στις ζύμες, οι συγκεντρώσεις ATP κυμαίνονται συνήθως από 10 έως 100 fg ανά CFU (Vogel et al., 2014).

Από την άλλη πλευρά, αξίζει να αναφερθεί ότι ορισμένες μελέτες έχουν επισημάνει ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων των μονάδων σχηματισμού αποικιών (CFU) και των σχετικών μονάδων φωτός (RLU) (Moore & Griffith, 2002). Ο καθορισμός τυποποιημένων κατευθυντήριων γραμμών για τον καθαρισμό των επιφανειών των τροφίμων αποτέλεσε πρόκληση, καθώς ο καθορισμός ενός ορίου στο οποίο μια δοκιμή θεωρεί μια επιφάνεια "αποτυχημένη" αποδείχθηκε δύσκολος. Ωστόσο, οι ερευνητές έχουν προτείνει μια γενική μικροβιακή τιμή-στόχο μικρότερη από 2,5 μονάδες που σχηματίζουν αποικίες (CFU) ανά τετραγωνικό εκατοστό μετά την απολύμανση, και ο στόχος αυτός έχει επιτευχθεί με επιτυχία για διάφορους τύπους επιφανειών (Moore & Griffith, 2002).

Επιπλέον, όσον αφορά τις βέλτιστες πρακτικές για τον καθαρισμό και την απολύμανση, έχει προταθεί ότι μια τιμή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) 500 σχετικών φωτεινών μονάδων (RLU) αποτελεί ένα ανώτερο κρίσιμο όριο για μια καθαρή επιφάνεια.

Η έλλειψη σταθερής συσχέτισης μεταξύ υψηλών τιμών RLU και υψηλών μετρήσεων CFU μπορεί να αποδοθεί σε δύο κύριους παράγοντες. Πρώτον, οι δοκιμές ATP έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν ταυτόχρονα ATP τόσο από μικροβιακές πηγές όσο και από υπολείμματα τροφίμων, χωρίς να μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ των δύο. Σε περιπτώσεις όπου οι διαδικασίες καθαρισμού είναι ανεπαρκείς, αλλά η αποστείρωση είναι αποτελεσματική, μπορεί να μην υπάρχουν μικροοργανισμοί, αλλά να εξακολουθούν να ανιχνεύονται υψηλές τιμές RLU που προέρχονται από οργανικά υπολείμματα.

Δεύτερον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι βιώσιμοι μικροοργανισμοί μπορεί να μην είναι πάντα καλλιεργήσιμοι υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως η επιλογή του μέσου καλλιέργειας, η θερμοκρασία ή η παρουσία αναερόβιου ή αερόβιου περιβάλλοντος. Ωστόσο, οι δοκιμές ATP έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν ATP από αυτούς τους μη καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, οι χαμηλές τιμές RLU δεν υποδηλώνουν απαραίτητα απουσία ή πολύ χαμηλό αριθμό CFUs, δεδομένου ότι η δοκιμασία ATP μπορεί να μην ανιχνεύει βακτήρια εκτός εάν η συγκέντρωσή τους υπερβαίνει περίπου τα 10^2 έως 10^4 CFUs (Bakke, 2022).

3.5 Προϋποθέσεις- Περιορισμοί της μεθόδου

Η βιοφωταύγεια του ATP, ως ενζυμική αντίδραση, εκδηλώνεται βέλτιστα υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Επομένως, κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης, το pH θα πρέπει να είναι 7,75, ενώ η ιδανική θερμοκρασία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 - 22 βαθμών Κελσίου. Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι υπάρχουν ουσίες που μπορεί εύκολα να βρεθούν στο περιβάλλον από όπου πραγματοποιείται η δειγματοληψία και μπορούν να επηρεάσουν τη μέτρηση ή να παρεμποδίσουν την αντίδραση. Οι συνηθέστεροι παρεμποδιστές της αντίδρασης μπορεί να είναι ιόντα μετάλλων, οξέα ή βάσεις που επηρεάζουν το pH, ισχυρές χρωστικές ουσίες, ενεργά συστατικά χλωρίνης που παραμένουν σε διάφορες επιφάνειες μετά τον καθαρισμό,

απορρυπαντικά ή ουσίες που μπορεί να προκαλέσουν θόλωμα του διαλύματος στο οποίο γίνεται η μέτρηση (Leach and Webster, 1986)

Η ύπαρξη παραγόντων που μπορούν να παρεμποδίσουν τη μέτρηση ή να προκαλέσουν απόκλιση είναι ένας από τους λόγους που είναι αναγκαίο το εσωτερικό σταντάρισμα των λουμιόμετρων πριν από τη χρήση τους. Τα φαινόμενα παρεμπόδισης που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να υπολογιστούν και, συνεπώς, να αντισταθμιστούν αργότερα μέσω της διεξαγωγής μετρήσεων μετά την προσθήκη γνωστής ποσότητας ATP. Με αυτόν τον τρόπο, ο βαθμός παρεμπόδισης μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της σχετικής ποσότητας φωτός που παράγεται από την προκαθορισμένη ποσότητα ATP και να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση της μετρούμενης ποσότητας ATP στο δείγμα. Έτσι, είναι δυνατόν να ληφθούν υπόψη οι πιθανές παρεμβολές και να διορθωθούν τα αποτελέσματα μέτρησης, εξασφαλίζοντας έτσι ακριβείς και αξιόπιστες αναλύσεις της ποσότητας ATP στο δείγμα.

Η παρακολούθηση της υγιεινής των επιφανειών μέσω της ανίχνευσης βιοφωταύγειας ATP έχει ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Οι περιορισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την πιθανή παρεμβολή χημικών υπολειμμάτων που παραμένουν από τον καθαρισμό, την απουσία άμεσης συσχέτισης μεταξύ των μονάδων σχετικού φωτός (RLU) και της πραγματικής ποσότητας των μικροοργανισμών που υπάρχουν, καθώς και ανησυχίες σχετικά με τα όρια ανίχνευσης και την ερμηνεία των ενδείξεων RLU.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα όρια ανίχνευσης που θέτουν οι κατασκευαστές βασίζονται συνήθως στην ανίχνευση καθαρού ATP και όχι στην ανίχνευση ζωντανών βακτηρίων ή άλλου οργανικού υλικού. Τα αναφερόμενα όρια ανίχνευσης για ζωντανά βακτήρια μπορεί να ποικίλλουν και να κυμαίνονται από 10 έως 105 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU), ανάλογα με τον συγκεκριμένο οργανισμό που εξετάζεται. Ορισμένοι κατασκευαστές συστημάτων βιοφωταύγειας ATP παρέχουν κατευθυντήριες γραμμές για την ερμηνεία των ενδείξεων RLU, ενώ άλλοι αφήνουν στους χρήστες να καθορίσουν τα δικά τους αποδεκτά όρια. Έχουν προταθεί διάφορες ερμηνευτικές οδηγίες και όρια αποκοπής για διάφορες εφαρμογές, όπως νοσοκομειακές επιφάνειες, εύκαμπτα γαστρικά ενδοσκόπια και επιφάνειες σε σχολεία (Vogel et al., 2014).

Για παράδειγμα, στην περίπτωση των νοσοκομειακών επιφανειών ύστερα από μελέτες βρέθηκε ότι οι μετρήσεις κάτω από 500 RLU με τη χρήση του φωτοφωτόμετρου 3M Clean-Trace θα θεωρούνταν καθαρές, ενώ προτάθηκε ένα όριο κάτω από 250 RLU. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μπορεί να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στα προτεινόμενα όρια ανάλογα με τη συγκεκριμένη συσκευή που χρησιμοποιείται και την προβλεπόμενη εφαρμογή. Η έλλειψη συνέπειας στον ορισμό του τι συνιστά αποδεκτή ένδειξη σε διάφορες συσκευές μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση και σε πιθανή παρερμηνεία ή ακατάλληλη χρήση αυτών των συσκευών. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να εξετάζονται προσεκτικά και να τηρούνται οι κατευθυντήριες γραμμές που παρέχονται από τους κατασκευαστές και τους σχετικούς ρυθμιστικούς φορείς, ώστε να διασφαλίζεται η ακριβής ερμηνεία και η κατάλληλη εφαρμογή των συστημάτων βιοφωταύγειας ATP σε διάφορες συνθήκες (Vogel et al., 2014)

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος

4.1 Σκοπός

Η εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μικροβιολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Αρχικά, ο σκοπός του πειράματος ήταν η δημιουργία μιας επιφάνειας η οποία να παρουσιάζει πολλές διαφορετικές δομές, στις οποίες θα εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης δυο απολυμαντικών μέσων. Πιο συγκεκριμένα, έχοντας ως βασική σκέψη τις επιφάνειες των βιομηχανιών τροφίμων που έχουν αρκετές ανομοιομορφίες όπως οι ρωγμές και οι πτυχώσεις, οι οποίες κάνουν τη διαδικασία της απολύμανσης πιο δύσκολη, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο επιφάνειας τόσο με γωνίες όσο και λεία σημεία. Έπειτα, γνωρίζοντας πως αρκετές ζύμες μπορούν να επιμολύνουν τα τρόφιμα και να προκαλέσουν αλλοιώσεις χρησιμοποιήθηκε σαν παράγοντας μικροβιακού φορτίου και σαν μοντέλο μικροοργανισμού που συναντάται συχνά στις βιομηχανίες τροφίμων, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*, με τον οποίο εμβολιάστηκαν όλες οι γωνίες και οι επιφάνειες του μοντέλου. Για την μελέτη της επίδρασης στην απολύμανση πιθανών υπολειμμάτων τροφών, έγινε επιπρόσθετη χρήση ελαίου στις επιφάνειες και εξετάστηκε συγκριτικά με τη μη χρήση αυτού. Μετά από την άσκηση μηχανικής τριβής σε συνδιασμό με τα δύο διαφορετικά είδη απολυμαντικών, έγινε έλεγχος της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης με τη χρήση της μεθόδου της ATP βιοφωταύγειας αλλά και της κλασσικής μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία. Για κάθε πείραμα (πείραμα με παρουσία λαδιού στις επιφάνειες, πείραμα με απουσία λαδιού στις επιφάνειες) πραγματοποιήθηκαν τρεις ξεχωριστές δοκιμές. Τέλος, έγινε σύγκριση των δύο αυτών μεθόδων και σχολιασμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν καθώς και πως αυτά επιδρούν στη σωστή επιλογή του κατάλληλου απολυμαντικού παράγοντα για την ορθή και αποτελεσματική απολύμανση των επιφανειών τροφίμων.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

Για την εκτέλεση των πειραμάτων (πείραμα με παρουσία λαδιού στις επιφάνειες, πείραμα με απουσία λαδιού στις επιφάνειες) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά μέσα:

Υλικά-αντιδραστήρια

- ✓ Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* σε ξηρή μορφή (turbo yeast)
- ✓ BHI Broth(Brain Heart Infusion Broth)
- ✓ Αραιωτικό υγρό (Ringer)
- ✓ Rose Bengal Agar + Cholamphenicol + Dichloran (DRBC Agar)
- ✓ Chloramphenicol glucose yeast extract agar
- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Ελαιόλαδο
- ✓ Αλκοόλη
- ✓ Χλωρίνη 10%
- ✓ Βιομηχανικό απολυμαντικό

Όργανα

- ✓ Λουμινόμετρο
- ✓ Μεταλλικό ταψί-μοντέλο επιφανειών
- ✓ Ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων
- ✓ Μεταλλική σπάτουλα
- ✓ Επωαστικός κλίβανος
- ✓ Υγρός κλίβανος αποστείρωσης
- ✓ Αναδευτήρας-Vortex
- ✓ Πιπέτα 1000 μl
- ✓ Κρίκος ενοφθαλμισμού
- ✓ Τρυβλία petri
- ✓ Γυάλινα συφώνια
- ✓ Ποτήρια ζέσεως
- ✓ Counter καλλιιεργειών

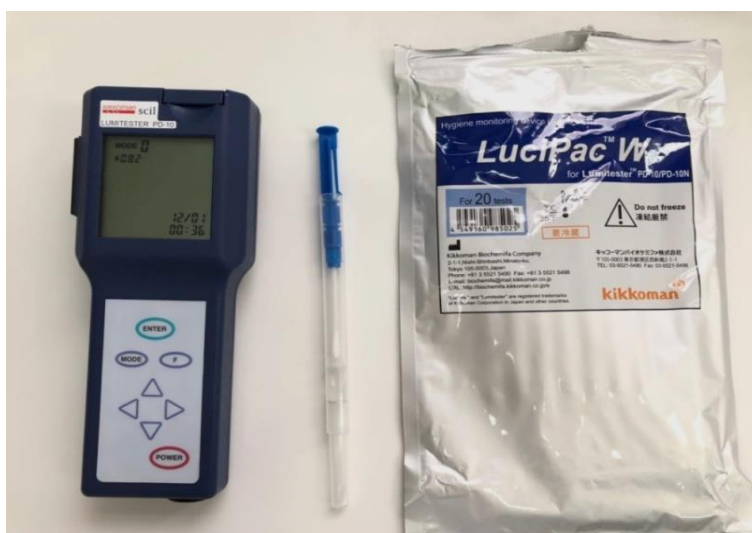
4.2.1 Λουμινόμετρο

Το Λουμινόμετρο (Lumitester Kikkoman) χρησιμοποιήθηκε ως μια από τις μεθόδους μέτρησης της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης. Ο μετρητής φωταύγειας χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα κιτ αντιδραστηρίου για τη μέτρηση των επιπέδων μόλυνσης στις λείες επιφάνειες και στις γωνίες του μεταλλικού ταψιού που χρησιμοποιήθηκε σαν μοντέλο επιφανειών.

Η τεχνολογία που χρησιμοποιείται είναι η βιοφωταύγεια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η ATP, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, είναι μία ουσία που είναι παρούσα σε κάθε ζωική και φυτική ύλη, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων απορριμμάτων τροφίμων, βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών. Η μέτρηση της ATP γίνεται με τη χρήση μιας αντίδρασης ενζύμου που σημειώνεται φυσιολογικά στην ουρά των πυρολαμπίδων.

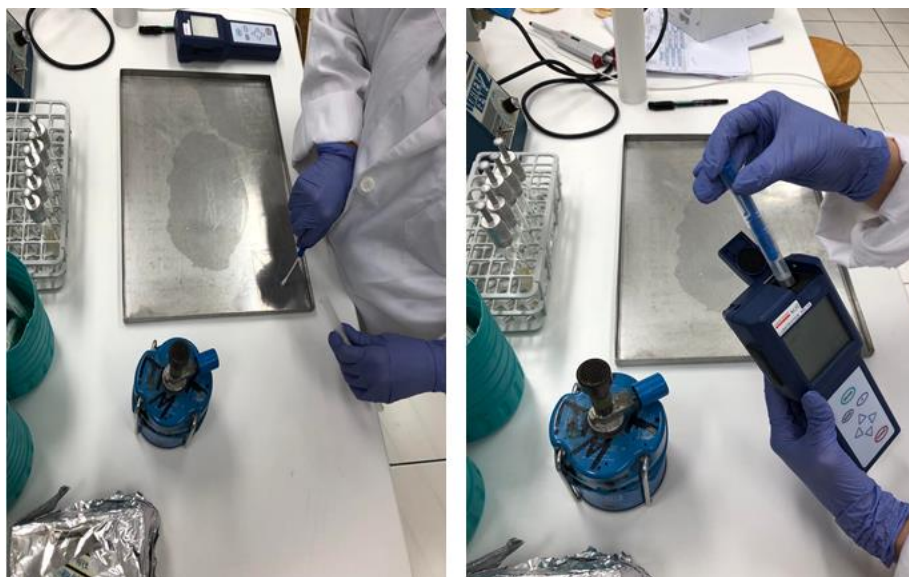
**Λουσιφερίνη/Λουσιφεράση (αντιδραστήριο πυρολαμπίδων) + ATP = AMP + PP
Φως**

Το φως που εκπέμπεται είναι ανάλογο της ποσότητας της ATP. Η ένταση του φωτός που εκπέμπεται από ένα δείγμα μετράται από τον μετρητή φωταύγειας και παρουσιάζεται σε Μονάδες Σχετικής Φωταύγειας (RLU- RELATIVE LUMINESCENT UNITS).



Εικόνα 4.1 Κιτ ATP, Λουμινόμετρο και βαμβακοφόρο στυλεό (swab) με ενσωματωμένο αντιδραστήριο

Γενικότερα, ο μετρητής φωταύγειας είναι ένα ελαφρύ, πλήρως φορητό όργανο με αλφαριθμητική οθόνη υγρών κρυστάλλων. Το όργανο αυτό προορίζεται για χρήση σε περιοχές παραγωγής, εγκαταστάσεις υγείας και εργαστήρια και μπορεί να διατεθεί με θήκη μεταφοράς. Στο συγκεκριμένο πείραμα γίνεται χρήση του λουμινόμετρου για την μέτρηση του αρχικού μικροβιακού φορτίου του ταψιού πριν την απολύμανση καθώς και μετά από αυτή για τον έλεγχο του εναπομείναντος μικροβιακού φορτίου.



Εικόνα 4.4.2 Χρήση λουμινόμετρου. Λήψη δείγματος με swab από γωνία (αριστερά). Τοποθέτηση δείγματος στο λουμινόμετρο για λήψη αποτελεσμάτων (δεξιά).

4.2.2 Μεταλλικό ταψί – μοντέλο επιφανειών

Όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο επιφανειών για την πειραματική διαδικασία, ένα μεταλλικό ταψί διαστάσεων το οποίο σχηματίζει 4 γωνίες (Α, Β, Γ, Δ) και 2 λείες επιφάνειες (E_1 , E_2) όπως φαίνονται χαρακτηριστικά στην παρακάτω φωτογραφία. Το μικροβιακό φορτίο, πριν και μετά τη μέθοδο απολύμανσης των γωνιών Α, Γ και της λείας επιφάνειας E_1 μετρήθηκε με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας. Αντίστοιχα το μικροβιακό φορτίο πριν και μετά την απολύμανση των γωνιών Β, Δ και της λείας επιφάνειας E_2 υπολογίστηκε με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία petri.



Εικόνα 4.4.3 Μεταλικό ταψί- μοντέλο επιφάνειων με αριθμημένες γωνίες και επιφάνειες

4.2.3 Turbo yeast

Σαν μοντέλο μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε ο *Saccharomyces cerevisiae* σε ξηρή μορφή με την εμπορική ονομασία “Turbo yeast”. Ειδικότερα, 0,1 γραμμάρια του μικροοργανισμού προστέθηκαν σε 9 ml BHI broth και ύστερα από ανάμειξη και ομογενοποίηση με τη χρήση του vortex το μείγμα τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο για 30 λεπτά.

Για την παρασκευή του BHI broth, απαιτούνται 37gr σε 1000ml απιονισμένου νερού. Η ποσότητα του υγρού θρεπτικού υποστρώματος ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και προστέθηκε μαζί με τα 1000ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως το οποίο θερμάνθηκε μέχρι να γίνει το μείγμα διαυγές. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε γυάλινα σωληνάρια των 9ml και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά.



Εικόνα 4.4.4 Turbo yeast αναλυτική ετικέτα

4.3 Μεθοδολογία πειράματος

4.3.1 Προετοιμασία αρχικού εμβολίου του *Saccharomyces cerevisiae*

Για τη δημιουργία του αρχικού εμβολίου του *Saccharomyces cerevisiae*, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, παίρνουμε 0,1 gr της σκόνης του μικροοργανισμού με εμπορική ονομασία “ Turbo yeast” και με τη βοήθεια αποστειρωμένη μεταλλικής σπάτουλας, τα προσθέτουμε σε γυάλινο φιαλίδιο με 9ml BHI broth. Έπειτα, πραγματοποιούμε ανάδευση με το vortex ώστε να ενεργοποιηθεί ο μικροοργανισμός και στη συνέχεια τοποθετούμε το φιαλίδιο με τον μικροοργανισμό στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου επώασης το αρχικό εμβόλιο είναι έτοιμο για χρήση στο εκάστοτε πείραμα.

4.3.2 Παρασκευή υποστρωμάτων

Για την ανίχνευση του αρχικού εμβολίου, το οποίο αποτελεί και το αρχικό μικροβιακό φορτίο των επιφανειών, καθώς και του εναπομείναντος μικροβιακού φορτίου μετά τη δράση των απολυμαντικών παραγόντων, χρησιμοποιήθηκαν δυο εκλεκτικά υποστρώματα.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακά το Rose Bengal Agar + Cholamphenicol + Dichloran σε μορφή σκόνης, για την παρασκευή του οποίου απαιτούνται 31,6 gr αυτού σε 1000ml απιονισμένου νερού. Έτσι, σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζεται η ποσότητα του θρεπτικού υλικού και προστίθεται μαζί με τα 1000ml απιονισμένου νερού σε ποτηρί ζέσεως. Το μείγμα αυτό θερμένεται εως ώτου διαλυθεί πλήρως και γίνει διαυγές, και στη συνέχεια τοποθετείται σε φιάλες των 500 ml και αποστειρώνεται σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά.

Ύστερα, κρίθηκε ως ακόμα πιο εκλεκτικό και κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae*, το Chloramphenicol glucose yeast extract agar, το οποίο επίσης εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε σε μορφή σκόνης. Για την παρασκευή του χρειάστηκαν 40,1gr σε 1000ml απιονισμένου νερού. Έτσι, σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζεται η ποσότητα του θρεπτικού υλικού και προστίθεται μαζί με τα 1000ml απιονισμένου νερού σε ποτηρί ζέσεως. Το μείγμα αυτό θερμένεται εως ώτου διαλυθεί πλήρως και γίνει διαυγές, και στη

συνέχεια τοποθετείται σε φιάλες των 500 ml και αποστειρώνεται σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά.

4.3.3 Διαδοχικές αραιώσεις και εμβολιασμός τρυβλίων

4.3.3.1 Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος σε σύντομο χρονικό διάστημα παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις. Οι διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού εμβολίου *Saccharomyces cerevisiae* είναι δεκαδικές και γίνονται σε σωλήνες που περιέχουν 9ml ισότονο αραιωτικό υγρό.

Για την παρασκευή του ισότονου αραιωτικού υγρού 1,25 ml του μητρικού διαλύματος APHA μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 1000ml. Στη συνέχεια συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000ml και το υγρό διαμοιράστηκε σε γυάλινα φιαλίδια διαδοχικών αραιώσεων των 9ml όπου τοποθετήθηκαν σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις με τον εξής τρόπο:

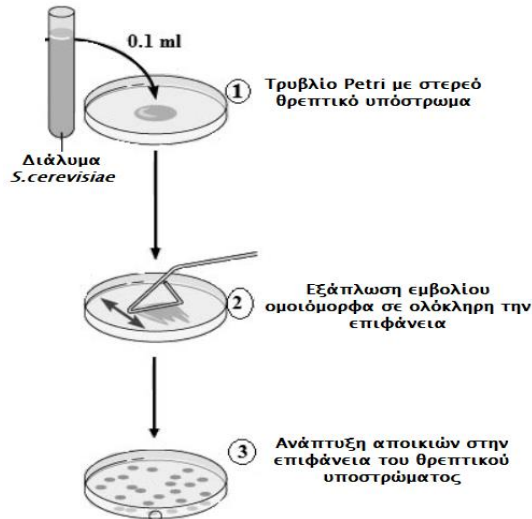
Μεταφέρεται 1ml από κάθε προηγούμενη αραιώση σε 9ml αραιωτικού υγρού και προκύπτει η επόμενη αραιώση, φτάνοντας με αυτή την μέθοδο στις 5 διαδοχικές αραιώσεις (10^{-5}). Η μεταφορά του εκάστοτε αραιωμένου δείγματος στον επόμενο σωλήνα με αραιωτικό υγρό γίνεται έπειτα από ανακίνηση στο Vortex, όπως επίσης γίνεται χρήση νέου αποστειρωμένου τιπ για την πιπέτα σε κάθε νέα αραιώση με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων και την τήρηση των ορθών πρακτικών.



Εικόνα 4.4.5 Διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.3.2 Μέθοδος εμβολιασμού

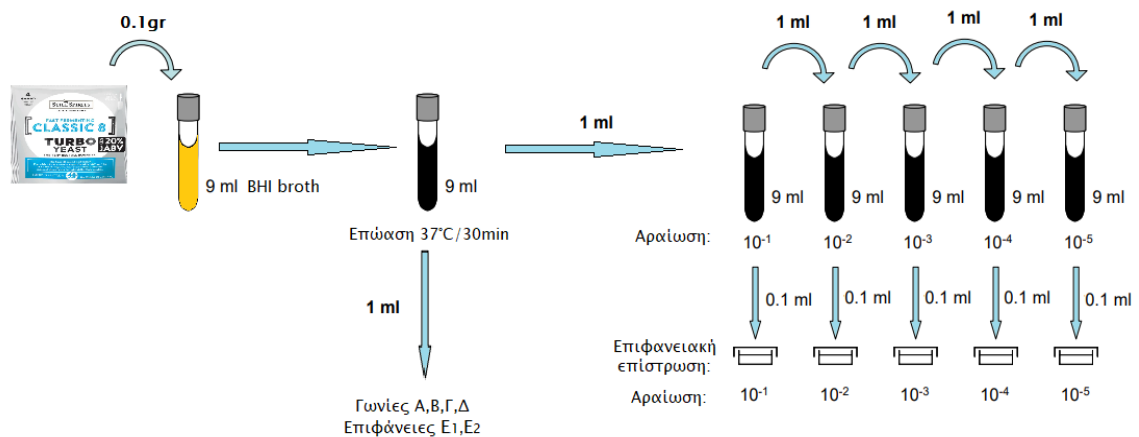
Έπειτα από κάθε αραιώση γίνεται εμβολιασμός σε τρυβλία, που περιέχουν Chloramphenicol glucose yeast extract agar θρεπτικό υπόστρωμα, με τη μέθοδο της επίστρωσης. Ειδικότερα, 0,1 ml από κάθε σωληνάριο διαδοχικής αραιώσης μεταφέρεται με την πιπέτα στο τριβλίο της αντίστοιχης αραιώσης. Η εξάπλωση γίνεται με τον κρίκο ενοφθαλμισμού σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος κάνοντας κυκλικές κινήσεις (βλ. Εικόνα 4.0.6). Έπειτα τα τρυβλία τοποθετούνται σε ανάποδη θέση στον επωαστικό κλίβανο στους 37 ° C για 48 ώρες. Πριν από την κάθε λήψη δείγματος από τους σωλήνες αραιώσης πραγματοποιήθηκε ανακίνηση με Vortex, όπως επίσης γίνεται χρήση νέου αποστειρωμένου τιπ για την πιπέτα για κάθε διαφορετική λήψη δείγματος. Τέλος ο κρίκος ενοφθαλμισμού μετά από κάθε εξάπλωση διαβρέχεται με αλκοόλη και πυρακτώνεται σε λυχνία και είναι έτοιμος για επαναχρησιμοποίηση.



Εικόνα 4.4.6 Απεικόνιση διαδικασίας επιφανειακής εξάπλωσης

4.3.4 Μεθοδολογία πειράματος με απουσία λαδιού

Έχοντας πραγματοποιήσει τις προαναφερθέντες διαδικασίες για την προετοιμασία του αρχικού εμβολίου του *Saccharomyces cerevisiae*, το λαμβάνουμε μόλις βγει από τον επωαστικό κλίβανο, και με τη χρήση του vortex πραγματοποιείται ομογενοποίηση. Χρησιμοποιείται 1ml εμβολίου για τις διαδοχικές αραιώσεις για τον υπολογισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου. Στη συνέχεια, γίνεται εμβολιασμός των γωνιών (Α, Β, Γ, Δ) και των λείων επιφανειών (E₁, E₂) με 1 ml του αρχικού εμβολίου το οποίο με τη χρήση swab απλώνεται.



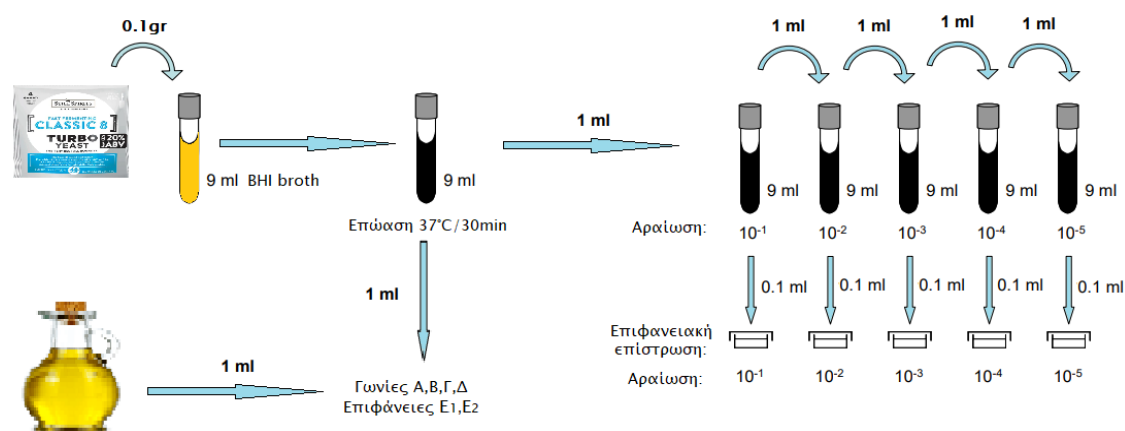
Εικόνα 4. 7 Απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας με απουσία ελαίου.

Αναμένουμε 5 λεπτά και λαμβάνουμε δείγμα με το swab του κιτ από τις γωνίες Α, Γ και την λεία επιφάνεια E₁ για μέτρηση αρχικού δείγματος ATP. Ακολουθεί η απολύμανση των επιφανειών με δυο απολυμαντικούς παράγοντες. Η χλωρίνη 10% χρησιμοποιήθηκε στις γωνίες Α, Β και στην επιφάνεια E₁ και το βιομηχανικό

απολυμαντικό εφαρμόστηκε στις γωνίες Γ,Δ και E₂ επιφάνεια. Εφαρμόστηκαν 3 ψεκασμοί από τον κάθε απολυμαντικό παράγοντα στις γωνίες και επιφάνειες που αυτός αντιστοιχεί, και ακολούθησε μηχανική τριβή με χαρτί για 5 λεπτά. Έπειτα περιμένουμε 5 λεπτά και λαμβάνουμε δείγμα από τις επιφάνειες. Έτσι, γίνεται καταμέτρηση του υπολοιπούμενου, μετά την απολύμανση, ATP με το λουμινόμετρο από τις γωνίες Α, Γ και την επιφάνεια E₁ ενώ παράλληλα λαμβάνουμε δείγμα από τις γωνίες Β, Γ και την επιφάνεια E₂ για καλλιέργεια σε Chloramphenicol glucose yeast extract υπόστρωμα. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης στους 37 ° C για 48 ώρες. Τέλος, μόλις περάσει ο απαραίτητος χρόνος επώασης, τα τρυβλία βγαίνουν από τον κλίβανο και καταταμετρούνται τόσο οι αποικίες του αρχικού εμβολίου του *S.cerevisiae* όσο και οι αποικίες που έχουν επιβιώσει και αναπτυχθεί μετά το πέρας της απολύμανσης με χλωρίνη 10% και το βιομηχανικό απολυμαντικό.

4.3.5 Μεθοδολογία πειράματος με χρήση λιπαρής ύλης

Με σκοπό να εξεταστεί η δράση των απολυμαντικών παραγόντων στις επιφάνειες όπου πιθανόν να υπάρχουν υπολείμματα τροφίμων, πραγματοποιήθηκε ένα δεύτερο πείραμα κατά το οποίο έγινε χρήση ελαιόλαδου στο μοντέλο επιφανειών. Ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος με την παραπάνω πειραματική διαδικασία με τη σημαντική διαφορά της προσθήκης ελαίου. Πιο συγκεκριμένα, ακριβώς πριν τον εμβολιασμό των γωνιών και των επιφανειών με 1 ml από τον μικροοργανισμό, προστέθηκε από 1ml ελαίου σε κάθε γωνία και στις δύο λείες επιφάνειες το οποίο με τη βοήθεια swab απλώθηκε ομοιόμορφα σε αυτές. Στη συνέχεια, όλα τα βήματα έγιναν όπως και στο πείραμα χωρίς τη χρήση ελαίου.



Εικόνα 4.4.8 Απεικόνιση πειράματος με χρήση ελαίου.

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

Στην παρούσα ενότητα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των τριών δοκιμών των δυο πειραμάτων (πείραμα απουσία λαδιού, πείραμα παρουσία λαδιού). Συγκεκριμένα, θα παρατεθούν τα αποτελέσματα των επωασμένων τρυβλίων τόσο του αρχικού εμβολίου του *S.cerevisiae* όσο και των τρυβλίων που αντιστοιχούν στις γωνίες και στις επιφάνειες μετά το πέρας της απολύμανσης με τους δυο διαφορετικούς απολυμαντικούς παράγοντες. Επίσης, θα παρουσιαστούν οι μετρήσεις του ATP πριν από την απολύμανση με τους ίδιους απολυμαντικούς παράγοντες, αλλά και μετά από αυτή, όπως αυτές εκφράζονται σε RLU. Σκοπός των πειραματικών μετρήσεων ήταν η εύρεση του πιο αποτελεσματικού απολυμαντικού μέσου έναντι του μικροοργανισμού μοντέλου- *S.cerevisiae*, ο οποίος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους και πιο συχνότερα παρευρισκόμενους μικροοργανισμούς στην βιομηχανία τροφίμων προκαλώντας σημαντικές αλλοιώσεις σε αυτά.

5.1 Αποτελέσματα πειράματος παρουσία λαδιού

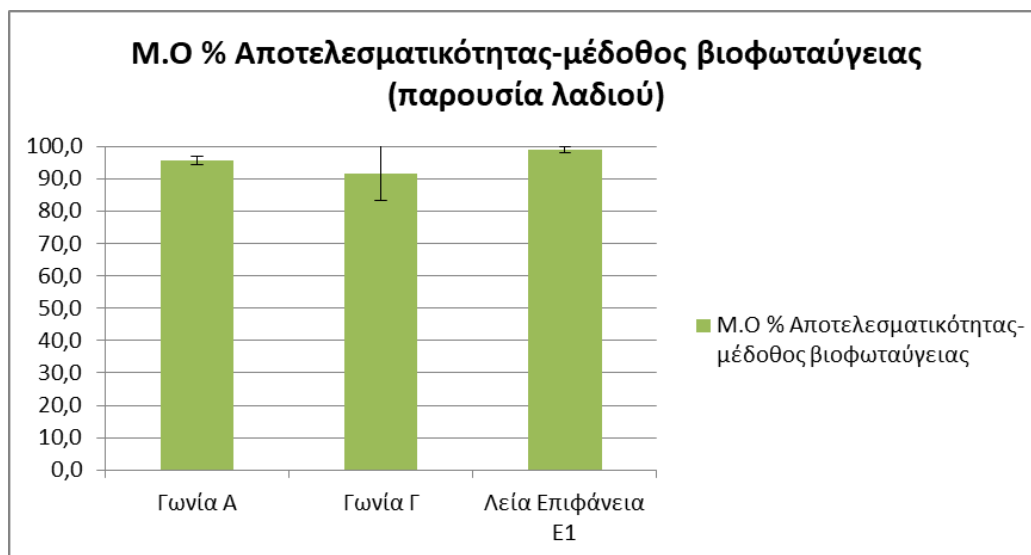
5.1.1 Αποτελέσματα μεθόδου Βιοφωταύγειας

Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις 3 πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λαδιού στο μοντέλο επιφανειών, μέσω της μεθόδου της βιοφωταύγειας εκφρασμένο σε μονάδες RLU. Επιπλέον, έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αυτές τις δοκιμές όπως και η αποτελεσματικότητα του κάθε απολυμαντικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε ειδικά για κάθε γωνία και επιφάνεια.

Παρουσία Λαδιού στις επιφάνειες (Μέθοδος Βιοφωταύγειας-μονάδες RLU)																
	Α δοκιμή				Β δοκιμή				Γ δοκιμή				Μέσος Όρος αποτελεσμάτων			
	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα
Γωνία Α	475612	25577		94,6	181827	5142		97,2	304286	10697		96,5	320575	13805		95,7
Γωνία Γ	631559		108974	82,7	387716		14769	96,2	560448		8871	98,4	526574		44205	91,6
Λεία Επιφάνεια Ε1	783123	6427		99,2	382755	556		99,9	486279	9321		98,1	550719	5435		99,0

Πίνακας 5.5.1 Αποτελέσματα τριών μετρήσεων πειράματος παρουσία λαδιού με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation) των μέσων όρων της αποτελεσματικότητας των τριών πειραματικών δοκιμών και προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 1. Μέσος όρος % αποτελεσματικότητας απολύμανσης από τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας (παρουσία λαδιού)

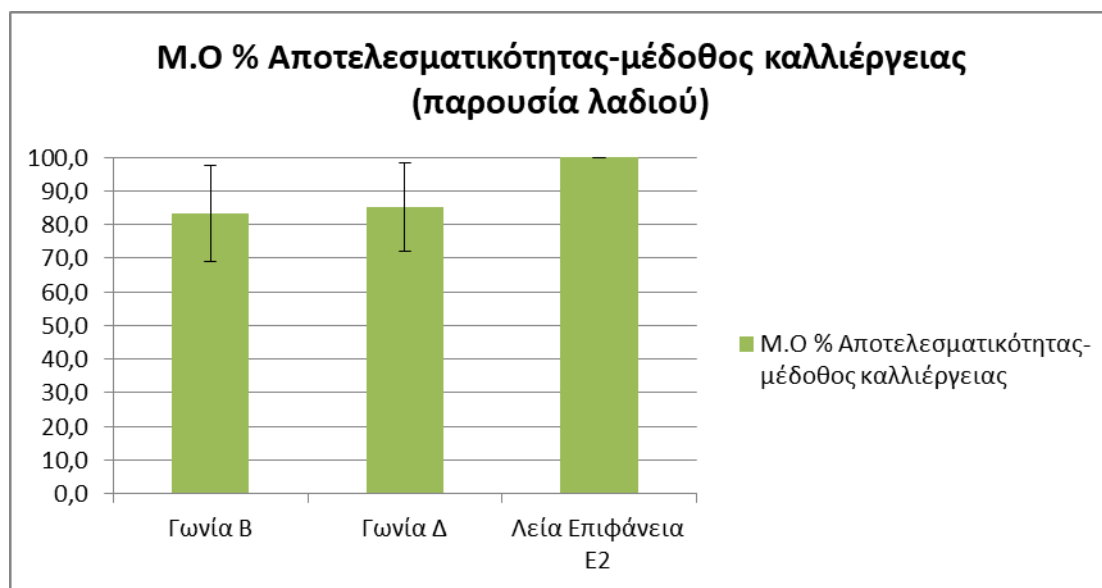
5.1.2 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία

Στον πίνακα 5.2 ακολουθούν τα αποτελέσματα των τριών αυτών δοκιμών εκφρασμένα με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία και σε logcfu/ml μονάδες όπως και η αποτελεσματικότητα του κάθε απολυμαντικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε ειδικά για κάθε γωνία και επιφάνεια. Επίσης, παρουσιάζονται αναλυτικά τα τρυβλία από αυτές τις δοκιμές στα οποία διαφέρεται τόσο το αρχικό μικροβιακό φορτίο των επιφανειών αλλά και η δράση της χλωρίνης 10% και του βιομηχανικού απολυμαντικού.

Παρουσία Λαδιού στις επιφάνειες (Μέθοδος Καλλιέργειας σε τρυβλία-μονάδες logcfu/mL)																
	Α δοκιμή				Β δοκιμή				Γ δοκιμή				Μέσος Όρος αποτελεσμάτων			
	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα
Γωνία Β	7,84	0,3		96,2	7,78	2,50		67,9	7,71	1,11		85,6	7,78	1,30		83,2
Γωνία Δ	7,84		0	100,0	7,78		1,95	74,9	7,71		1,52	80,3	7,78		1,16	85,1
Λεία Επιφάνεια Ε2	7,84	0		100,0	7,78	0		100,0	7,71	0		100,0	7,78	0		100,0

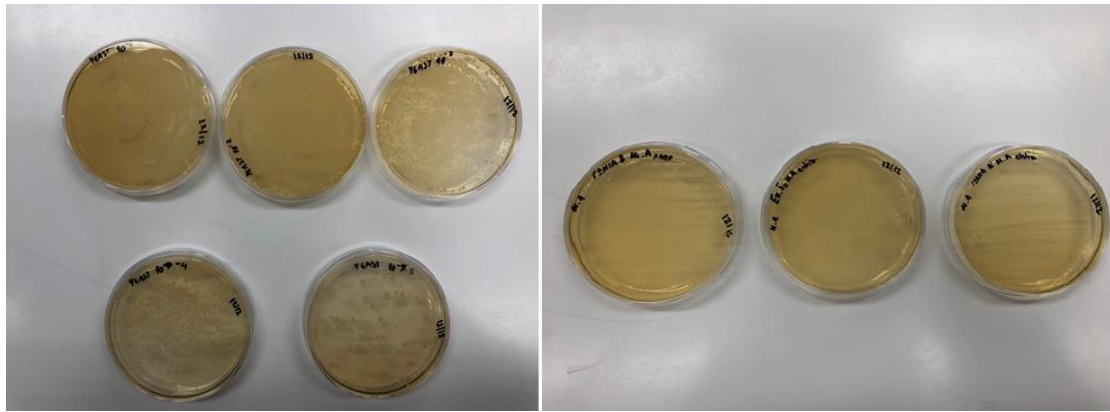
Πίνακας 5.2 Αποτελέσματα μετρήσεων τριών δοκιμών πειράματος παρουσία λαδιού με την μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία

Επίσης, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation) των μέσων όρων της αποτελεσματικότητας των τριών πειραματικών δοκιμών και προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα.

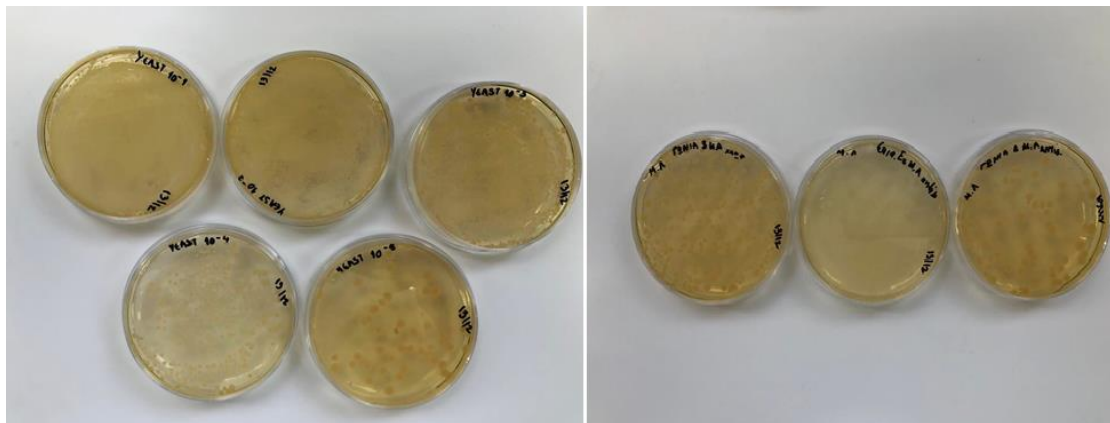


Διάγραμμα 2. Μέσος όρος % αποτελεσματικότητας απολύμανσης από τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία (παρουσία λαδιού).

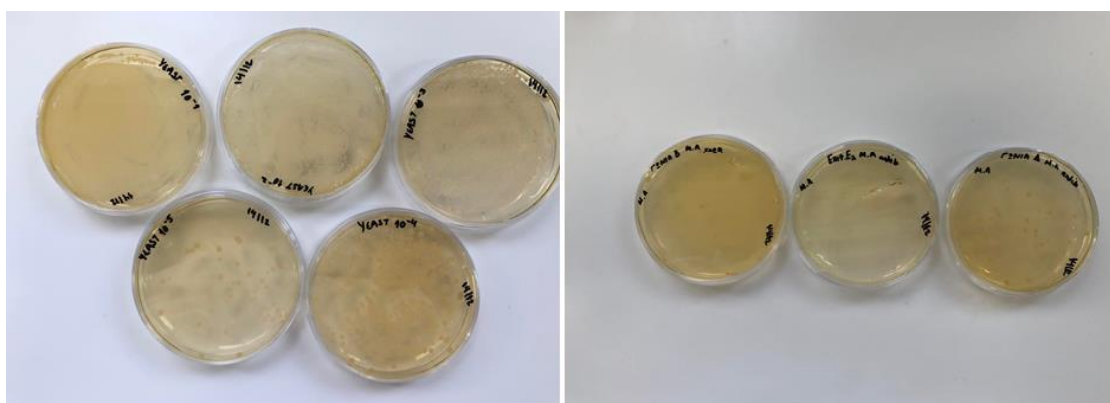
Ακολουθούν τα επωασμένα τρυβλία των τριών διαφορετικών δοκιμών του πειράματος, όπως αυτά προκείμεν υστερα από επώαση στους 37 ° C για 48 ώρες.



Εικόνα 5.1 Απεικόνιση αποτελεσμάτων Α δοκιμής του πειράματος παρουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Chloramphenicol glucose yeast extract agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ με λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).



Εικόνα 5.2 Απεικόνιση αποτελεσμάτων Β δοκιμής του πειράματος παρουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Chloramphenicol glucose yeast extract agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ με λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).



Εικόνα 5.3 Απεικόνιση αποτελεσμάτων Γ δοκιμής του πειράματος παρουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Chloramphenicol glucose yeast extract agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ με λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).

5.2 Αποτελέσματα πειράματος απουσία λαδιού

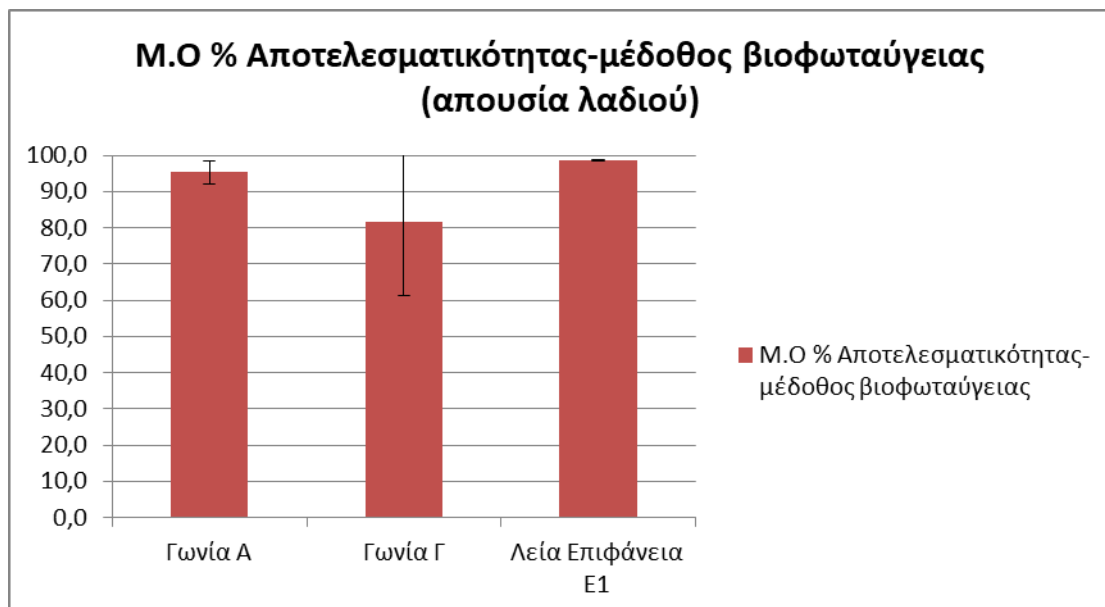
5.2.1 Αποτελέσματα μεθόδου Βιοφωταύγειας

Ο πίνακας 5.2 παρέχει τα αποτελέσματα από τις 3 πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν χωρίς τη χρήση λαδιού στο μοντέλο επιφανειών, μέσω της μεθόδου της βιοφωταύγειας εκφρασμένο σε μονάδες RLU. Επιπλέον έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αυτές τις δοκιμές όπως και η αποτελεσματικότητα του κάθε απολυμαντικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε ειδικά για κάθε γωνία και επιφάνεια.

Απουσία Λαδιού στις επιφάνειες (Μέθοδος Βιοφωταύγειας-μονάδες RLU)																
	Α δοκιμή				Β δοκιμή				Γ δοκιμή				Μέσος Όρος αποτελεσμάτων			
	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα
Γωνία Α	613616	47313		92,3	620396	9239		98,5	568138	27355		95,2	600717	27969		95,3
Γωνία Γ	361257		160825	55,5	596334		30676	94,9	525389		78534	85,1	494327		90012	81,8
Λεία Επιφάνεια E1	474206	8153		98,3	429638	6299		98,5	536304	5717		98,9	480049	6723		98,6

Πίνακας 5.2.5.3 Αποτελέσματα τριών μετρήσεων πειράματος απουσία λαδιού με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας.

Και στη συγκεκριμένη περίπτωση, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation) των μέσων όρων της αποτελεσματικότητας των τριών πειραματικών δοκιμών και προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 3. Μέσος όρος % αποτελεσματικότητας απολύμανσης από τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας (απουσία λαδιού).

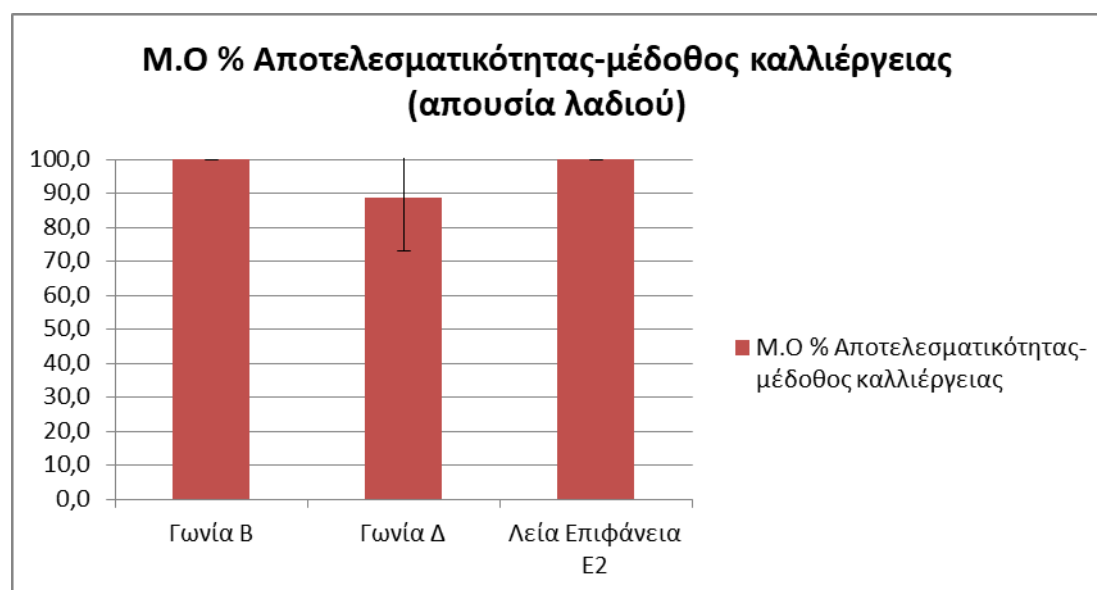
5.2.2 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία

Στον πίνακα 5.4 ακολουθούν τα αποτελέσματα των τριών αυτών δοκιμών εκφρασμένα με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία και σε logcfu/ml μονάδες όπως και η αποτελεσματικότητα του κάθε απολυμαντικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε ειδικά για κάθε γωνία και επιφάνεια. Επίσης, παρουσιάζονται αναλυτικά τα τρυβλία από αυτές τις δοκιμές στα οποία διαφέρεται τόσο το αρχικό μικροβιακό φορτίο των επιφανειών αλλά και η δράση της χλωρίνης 10% και του βιομηχανικού απολυμαντικού.

Απουσία Λαδιού στις επιφάνειες (Μέθοδος Καλλιέργειας σε τρυβλία-μονάδες logcfu/ml)																
	Α δοκιμή				Β δοκιμή				Γ δοκιμή				Μέσος Όρος αποτελεσμάτων			
	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα	Χωρίς απολύμανση	Χλωρίνη	Βιομηχανικό Απολυμαντικό	% Αποτελεσματικότητα
Γωνία Β	7,04	0,0		100,0	8,00	0,00		100,0	7,86	0,00		100,0	7,63	0,00		100,0
Γωνία Δ	7,04		0,3	95,7	8,00		0,00	100,0	7,86		2,29	70,9	7,63		0,86	88,7
Λεία Επιφάνεια E2	7,04	0		100,0	8,00	0		100,0	7,86	0		100,0	7,63	0		100,0

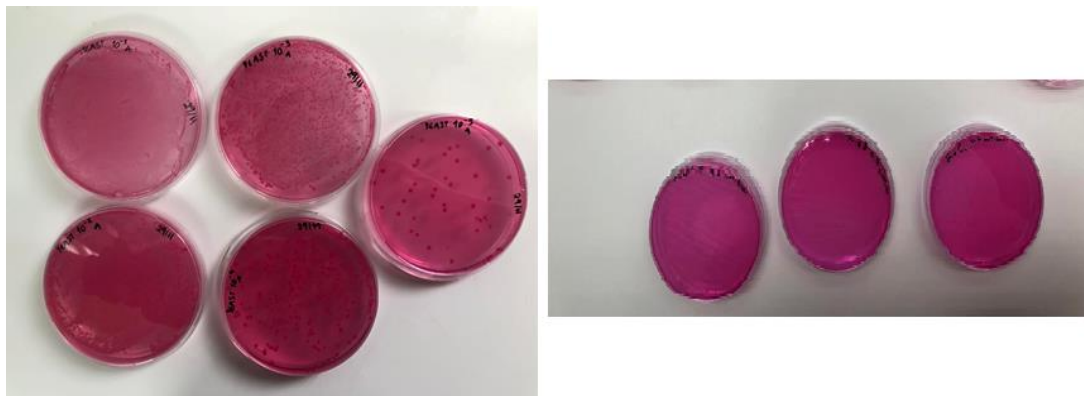
Πίνακας 5.4 Αποτελέσματα μετρήσεων τριών δοκιμών πειράματος απουσία λαδιού με την μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία

Αφού υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation) των μέσων όρων της αποτελεσματικότητας των τριών πειραματικών δοκιμών και προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα.

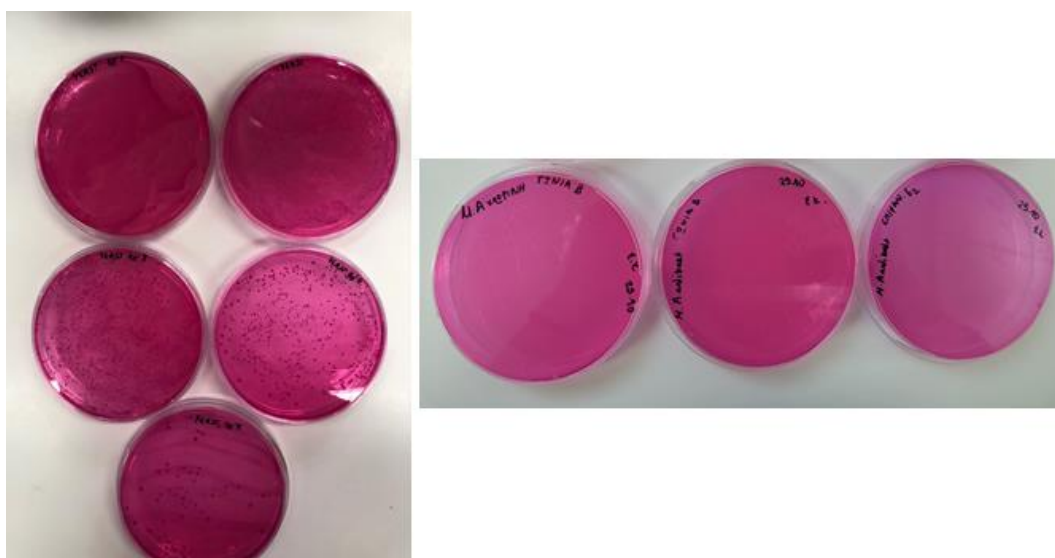


Διάγραμμα 4. Μέσος όρος % αποτελεσματικότητας απολύμανσης από τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία (απουσία λαδιού).

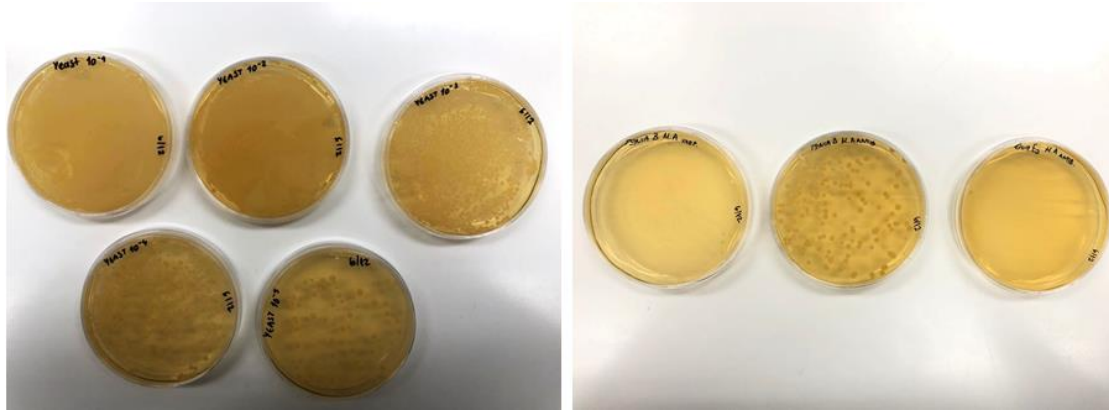
Ακολουθούν τα επωασμένα τρυβλία των τριών διαφορετικών δοκιμών του πειράματος, όπως αυτά προκείπτον ύστερα από επώαση στους 37 ° C για 48 ώρες.



Εικόνα 5.4 Απεικόνιση αποτελεσμάτων A δοκιμής του πειράματος απουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Rose Bengal Agar agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ χωρίς λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).



Εικόνα 5.5 Απεικόνιση αποτελεσμάτων Β δοκιμής του πειράματος απουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Rose Bengal Agar agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ χωρίς λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).



Εικόνα 5.6 Απεικόνιση αποτελεσμάτων Γ δοκιμής του πειράματος απουσία λαδιού με τη μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία σε Chloramphenicol glucose yeast extract agar υπόστρωμα. Αρχικό μικροβιακό φορτίο-διαδοχικές αραιώσεις του *Saccharomyces cerevisiae* (αριστερά). Αποτελέσματα δράσης απολυμαντικών παραγόντων στις γωνίες Β και Δ και στη λεία επιφάνεια Ε₂ χωρίς λιπαρή ύλη κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (δεξιά).

Κεφάλαιο 6. Σχολιασμός-Συζήτηση

Μελετώντας τα δεδομένα των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις πειραματικές διαδικασίες, όπως αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποιες βασικές παρατηρήσεις

6.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία

Όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά στην μεθοδολογία της πειραματικής διαδικασίας των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, όλες οι επιφάνειες εμβολιάστηκαν με το ίδιο αρχικό μικροβιακό φορτίο το οποίο όπως προκύπτει από τα τρυβλία και τους πίνακες παραπάνω αντιστοιχεί σε 7,7-8 log CFU. Μετά την άσκηση μηχανικής τριβής και τον καθαρισμό των επιφανειών με τους δυο απολυμαντικούς παράγοντες (χλωρίνη 10% και βιομηχανικό απολυμαντικό) παρατηρήθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ειδικά στην περίπτωση του πειράματος απουσίας λαδιού. Συγκεκριμένα, η γωνία Β και η επιφάνεια Ε2 που απολυμάνθηκαν με χλωρίνη έδειξαν 100% ποσοστό αποτελεσματικότητας καθώς δεν αναπτύχθηκαν καθόλου αποικίες στα τρυβλία. Κατά το πείραμα της απουσίας λαδιού επίσης, μόνο στη γωνία Δ στην οποία χρησιμοποιήθηκε βιομηχανικό απολυμαντικό ως απολυμαντικός παράγοντας παρατηρήθηκε στις 2 από τις 3 δοκιμές ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία από το δείγμα που συλλέχθηκε μετά την απολύμανση, έχοντας έτσι μέσο όρο αποτελεσματικότητας 88,7%.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως οι αντίστοιχες μετρήσεις με τη μέθοδο της βιοφωταύγειας δεν έβγαλαν σε καμία από τις 3 δοκιμές μηδενικές τιμές ή 100% αποτελεσματικότητα.

Ακόμα ένα σημείο που πρέπει να σχολιαστεί, είναι πως η παρουσία λαδιού στις γωνίες φαίνεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης τους όπως φαίνεται από τη μείωση της επί της % αποτελεσματικότητας στις γωνίες Β και Δ (83,2% και 85,1% αντίστοιχα). Αντιθέτως, η λεία επιφάνεια Ε2 απολυμάνθηκε επαρκώς με 100% αποτελεσματικότητα καθώς δεν αναπτύχθηκαν αποικίες στα τρυβλία. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι επιφάνειες που δεν είναι λείες αλλά σχηματίζουν γωνίες, ρωγμές ή άλλες πιο πολύπλοκες δομές μπορούν ευκολότερα

να παγιδεύσουν μικροβιακό φορτίο και η απολυμανσή τους είναι περισσότερο απαιτητική. Επίσης, η παρουσία λαδιού πιθανόν δρα προστατευτικά στους μικροοργανισμούς που καταφέρνουν να επιβιώνουν μετά την επίδραση και των δύο απολυμαντικών παραγόντων. Επομένως, σε επιφάνειες παραγωγικών χώρων τροφίμων που υπάρχουν λιπαρές ενώσεις θα πρέπει να απολυμαίνονται με περισσότερη σχολαστικότητα.

6.2 Σχολιασμός αποτελεσμάτων μεθόδου βιοφωταύγειας

Αναφορικά με την μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας και την υγιεινή των επιφανειών που έρχονται σε επαφή τα τρόφιμα, η βιβλιογραφία έχει δείξει πως οι υψηλές τιμές CFU σχετίζονται με υψηλές τιμές RLU (Bakke, 2022). Έτσι, μελετώντας τις τιμές RLU που προκύπτουν στις επιμολυσμένες επιφάνειες με τον μικροοργανισμό, φαίνεται πως είναι πολύ υψηλές (>300.000 RLU) γεγονός το οποίο είναι λογικό γιατί αυτές οι τιμές αντιστοιχούν σε μικροβιακό φορτίο 7,7-8 log CFU όπως φαίνεται από τους πίνακες της μεθόδου καλλιέργειας σε τρυβλία. Επίσης, δεδομένου ότι η διαδικασία της προετοιμασίας του αρχικού εμβολίου γινόταν ξεχωριστά για κάθε διαφορετική δοκιμή των δυο πειραμάτων, παρατηρούμε πως υπάρχει σταθερότητα αυτού καθώς κυμαίνεται από 7-8 log CFU.

Μετά την επίδραση των απολυμαντικών παραγόντων παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές RLU δε μειώνονται σε επίπεδα που θα μπορούσαν να είναι αποδεκτά (<500 RLU). Μόνο η λεία επιφάνεια E1 στη Β δοκιμή κατά την παρουσία λαδιού είναι αρκετά κοντά σε αυτά τα επίπεδα καθώς μετά από τη δράση της χλωρίνης φτάνει τα 556 RLU. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις οι τιμές RLU παραμένουν αρκετά υψηλές (>10.000 RLU). Αυτό σημαίνει πως στα σημεία αυτά των επιφανειών υπάρχει ακόμα βιολογικό φορτίο, το οποίο είναι πιθανόν να αποτελέσει εστία επαναμόλυνσης.

Παρατηρώντας τόσο τους συγκεντρωτικούς πίνακες όσο και τα διαγράμματα της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης παρατηρείται πως η λεία επιφάνεια E1 έχει σταθερά και στις 3 δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν και για τα δυο πειράματα (παρουσία και απουσία λαδιού) υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας καθαρισμού (>98%) και στον μέσο όρο έχει το υψηλότερο % ποσοστό αποτελεσματικότητας (99%). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η λεία επιφάνεια

διευκολύνει την καλύτερη απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου σε σχέση με επιφάνειες που παρουσιάζουν διαφορετική δομή όπως οι γωνίες. Σε συνέχεια αυτής της παρατήρησης, βλέπουμε πως οι γωνίες Α και Γ έχουν μικρότερα ποσοστά αποτελεσματικότητας με την γωνία Γ να παρουσιάζει μικρότερη απόδοτικότητα από τη γωνία Α, σημειώνοντας στην πρώτη δοκιμή του πειράματος απουσία λαδιού αποτελεσματικότητα 55,5%, ενώ ο μέσος όρος αποτελεσματικότητας στο συγκεκριμένο πείραμα είναι 88,7%. Αυτά τα αποτελέσματα ίσως συσχετίζονται με τον απολυμαντικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση των γωνιών. Ειδικότερα, η γωνία Γ που παρουσιάζει χαμηλότερη αποτελεσματικότητα και στις 3 δοκιμές και συνεπώς και μέσος όρος επί της % αποτελεσματικότητας (88,7% για απουσία λαδιού, 91,6% για παρουσία λαδιού) απολυμάνθηκε με βιομηχανικό απολυμαντικό, ενώ η γωνία Α που έχει υψηλότερη αποτελεσματικότητα από την Γ και μέσο όρο % αποτελεσματικότητας αρκετά υψηλό (95,3% για απουσία λαδιού, 95,7% για παρουσία λαδιού) απολυμάνθηκε με χλωρίνη 10%.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα RLU στις επιφάνειες παρουσία ή απουσία λαδιού.

6.3 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης μας οδηγούν σε κάποια βασικά συμπεράσματα.

- ✓ Οι λείες επιφάνειες κάνουν τη διαδικασία της απολύμανσης πιο εύκολη και αποδοτική ανεξαρτήτως απολυμαντικού παράγοντα, συγκριτικά με τις γωνίες που έχουν πιο πολύπλοκη δομή και δυσχαιρένουν την απολύμανση μειώνοντας παράλληλα και την αποτελεσματικότητα αυτής. Ειδικότερα, τόσο με τη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας όσο και με την κλασσική μέθοδο της καλλιέργειας στα τρυβλία η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης λείων επιφανειών είναι σε όλες τις δοκιμές μεγαλύτερη από 98,1 % αγγίζοντας πολλές φορές το 100%.
- ✓ Η παρουσία λαδιού, που στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της περίπτωσης υπολειμμάτων τροφίμων στις επιφάνειες,

φάνηκε να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην αποτελεσματικότητα της απολύμανσης αυτών. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα πως επιφάνειες με υπολείμματα τροφών θα πρέπει να απολυμένονται πολύ σχολαστικά.

- ✓ Η χλωρίνη 10% φαίνεται να αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό παράγοντα σε σχέση με το βιομηχανικό απολυμαντικό έχοντας συγκριτικά με όλες τις μετρήσεις την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα απολύμανσης. Παρουσιάζει σχεδόν σε όλα τα τρυβλία μηδενική ανάπτυξη και στη μέθοδο της ATP βιοφωταύγειας φέρει τη μοναδική μέτρηση κοντά στα 500 RLU (556 RLU) που αποτελεί βασική ένδειξη υγιεινής. Ακόμα και ανάμεσα σε δύο γωνίες Α και Γ ο μέσος μέσος όρο επί της % αποτελεσματικότητας για την δεύτερη που απολυμάνθηκε με βιομηχανικό απολυμαντικό είναι 88,7% για απουσία λαδιού, 91,6% για παρουσία λαδιού, ενώ η γωνία Α που απολυμάνθηκε με χλωρίνη 10% παρουσιάζει υψηλότερη αποτελεσματικότητα και μέσο όρο % αποτελεσματικότητας αρκετά υψηλό (95,3% για απουσία λαδιού, 95,7% για παρουσία λαδιού).
- ✓ Στις περισσότερες δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, τόσο με λάδι όσο και χωρίς, το υπολειμματικό RLU είναι πολύ υψηλό (> 10.000) με αποτέλεσμα η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης να μην φτάνει στο 100% (όπως προκύπτει με την κλασική μέθοδος της καλλιέργειας σε τρυβλία), παρουσιάζοντας έτσι τον κίνδυνο της πιθανής επαναμόλυνσης.
- ✓ Συνεπώς, μπορούμε να διαπιστώσουμε πως η μέθοδος της ATP βιοφωταύγειας αποτελεί μια ταχεία και άμεση μέθοδο ανίχνευσης της υγιεινής των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων. Ωστόσο, γνωρίζοντας πως η ανίχνευση ATP δεν μας δίνει πληροφορίες για την ταυτότητα του οργανισμού που ανιχνεύεται (παθογόνος ή μη, υπολείμματα τροφίμων κ.α) αλλά υποδεικνύει γενικά επιμόλυνση, συστήνεται ο συνδιασμός της μεθόδου αυτής με την κλασική μέθοδο της καλλιέργειας σε τρυβλία με τη βοήθεια εκλεκτικών υποστρωμάτων για την πιο αποτελεσματική εκτίμηση της υγιεινής.

Βιβλιογραφία

- Baigrie, B. (2003). *Taints and Off-flavours in Food*.
- Bakke, M. (2022). A Comprehensive Analysis of ATP Tests: Practical Use and Recent Progress in the Total Adenylate Test for the Effective Monitoring of Hygiene. *Journal of Food Protection*, 85(7), 1079–1095. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-384>
- Bartoszcze, M., & Bielawska-Drozd, A. (2004). ATP Bioluminescence for the Detection and Identification of Biological Threats. In P. J. Stopa & Z. Orahovec (Eds.), *Technology for Combating WMD Terrorism* (pp. 67–74). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2683-6_7
- Bautista, D. A. (1999). ATP BIOLUMINESCENCE | Application in Meat Industry. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 80–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0075>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2017). *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-04133-0>
- Bottari, B., Santarelli, M., & Neviani, E. (2015). Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP. *Trends in Food Science & Technology*, 44(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.012>
- Conterno, L., Fondazione, E., & Henick-Kling, T. (2010). Brettanomyces/Dekkera off-flavours and other wine faults associated with microbial spoilage. In *Managing Wine Quality* (pp. 346–387). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845699987.346>
- Corbitt, A. J., Bennion, N., & Forsythe, S. J. (2000). Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology*, 30(6), 443–447. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00744.x>
- Costa, P. D., Andrade, N. J., Brandão, S. C. C., Passos, F. J. V., & Soares, N. de F. F. (2006). ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian*

Journal of Microbiology, 37(3), 345–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300026>

- Coutts, J., & Fielder, R. (Eds.). (2009). *Management of food allergens*. Blackwell.
- Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts* (second edition). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Escott, C., del Fresno, J., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. *Fermentation*, 4(3), 69. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030069>
- Gabrić, D., Galić, K., & Timmerman, H. (2016). Cleaning of Surfaces. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (pp. 447–463). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00031-5>
- Gerard J., T., Berdell R., F., & Christine L., C. (2018). *Microbiology: An introduction* (13th edition). Serina Beauparlant.
- Gerard J., T., Berdell R., F., Christine L., C., Derek, W., & Warner, B. (2018). *Microbiology: An Introduction* (13th edition). Pearson.
- Howell, K. (2016). Spoilage: Yeast Spoilage of Food and Beverages. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 113–117). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00650-4>
- I.Pitt, J., & Hocking, A. D. (2009). Yeasts. In J. I. Pitt & A. D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage* (pp. 357–382). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_10
- Jane-Marie Hawronskyj, & John Holah. (1997). ATP: A universal hygiene monitor. 8(3), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01009-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01009-1)
- Jay, J. M. (2000). *Modern food microbiology* (6th ed). Aspen Publishers.
- Karsa, D. R., & Houston, J. (2006). What are Surfactants? In R. J. Farn (Ed.), *Chemistry and Technology of Surfactants* (pp. 1–23). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988596.ch1>
- Keener, L. (2005). Improving cleaning-out-of-place (COP). In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (pp. 445–467). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845690533.3.445>

- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998). *The Yeasts, A taxonomic study* (4th Edition). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81312-1.X5000-X>
- Leach FR and Webster JJ (1986) Commercially available firefly luciferase reagents. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., Orlando: 51-70.
- Lelieveld, H. L. M. (2003). *Hygiene in food processing* ([Online-ausg.]). CRC Press.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of microorganisms* (14th edition).
- Magnani, M. (Ed.). (2021). *Detection and Enumeration of Bacteria, Yeast, Viruses, and Protozoan in Foods and Freshwater*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1932-2>
- Marriott N. G., 2006, Principles of Food Sanitation, Chapman & Hall, pp. 141 -189
- Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M., & Capdeville, B. (Eds.). (1992). *Biofilms— Science and Technology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8>
- Moore, G., & Griffith, C. (2002). A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: An industry trial. *International Journal of Environmental Health Research*, 12(4), 317–329. <https://doi.org/10.1080/0960312021000056429>
- Otto, C., Zahn, S., Rost, F., Zahn, P., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Physical Methods for Cleaning and Disinfection of Surfaces. *Food Engineering Reviews*, 3(3–4), 171–188. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9038-4>
- Perricone, M., Gallo, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Yeasts. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 121–131). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X>
- Phale, S. (2018). Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 08(05). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000337>
- Roda, A. (Ed.). (2011). *Chemiluminescence and bioluminescence: Past, present and future*. Royal Society of Chemistry.
- Ropkins, K., & Beck, A. J. (2000). *Use of HACCP to control food safety*.

- Sá-Correia, I., Guerreiro, J. F., Loureiro-Dias, M. C., Leão, C., & Côrte-Real, M. (2014). Zygosaccharomyces. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 849–855). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00364-5>
- Sansebastiano, G., Zoni, R., & Bigliardi, L. (2007). Cleaning and Disinfection Procedures in the Food Industry General Aspects and Practical Applications. In A. McElhatton & R. J. Marshall (Eds.), *Food Safety* (pp. 253–280). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33957-3_13
- Schmidt, R. H. (n.d.). *Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food Processing and Handling Operations*.
- Stanga, M. (2010). *Sanitation: Cleaning and Disinfection in the Food Industry* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527629459>
- Stratford, M. (2006). Food and Beverage Spoilage Yeasts. In A. Querol & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages* (pp. 335–379). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_11
- Sutherland, J. B., Cornelison, C., & Crow, S. A. (2014). CANDIDA | Yarrowia lipolytica (Candida lipolytica). In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 374–378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00056-2>
- Syguła-Cholewińska, J., Lech, T., Szostak-Kot, J., Błyskal, B., & Sawoszczuk, T. (n.d.). *ATP BIOLUMINESCENCE METHOD IN SURFACE HYGIENE MONITORING*.
- Varzakas, T., & Tzia, C. (Eds.). (2015). *Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality, and Manufacturing Processes* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19398>
- Vogel, S. J., Tank, M., & Goodyear, N. (2014). Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system. *Letters in Applied Microbiology*, 58(4), 370–375. <https://doi.org/10.1111/lam.12199>
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. In *Desk encyclopedia of microbiology* (2nd ed., pp. 1174–1187). Moselio Schaechter.
- Wilson, T., & Hastings, J. W. (1998). *BIOLUMINESCENCE*.

