



Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών σε τυριά τυρο-
γάλακτος**

MSc Thesis

Survival study of pathogenic microorganisms in whey cheeses



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Παντελοπούλου Χρυσούλα
Pantelopoulou Chryssoula

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Τσάκαλη Ευσταθία
Tsakali Efstathia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science

FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc THESIS

**Survival study of pathogenic microorganisms in whey
cheeses**

PANTELOPOULOU CHRYSOULA

20021

xrusa.pantelopoulou988@gmail.com

SUPERVISOR

TSAKALI EFSTATHIA

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο 'Μελέτη επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών στα τυριά τυρογάλακτος' που παρουσιάσθηκε από την Παντελοπούλου Χρυσούλα, υποψήφιας για το μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία :	Ευσταθία Τσάκαλη Επίκουρη Καθηγήτρια Επιβλέπουσα
Ημερομηνία:	Σπυρίδων Κοντελής Επίκουρος Καθηγητής Μέλος Επιτροπής Αξιολόγησης
Ημερομηνία:	Ανθιμία- Αικατερίνη Μπατρίνου Επίκουρη Καθηγήτρια Μέλος Επιτροπής Αξιολόγησης

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Παντελοπούλου Χρυσούλα

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε από την φοιτήτρια Παντελοπούλου Χρυσούλα, στα πλαίσια του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων» της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2022. Το θέμα της μεταπτυχιακής εργασίας είναι: «Μελέτη Επιβίωσης Παθογόνων Μικροοργανισμών στα Τυριά Τυρογάλακτος», που διεκπεραιώθηκε υπό την επίβλεψη της Δρ. Ευσταθίας Τσάκαλη.

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που συνέβαλαν στην εκπόνηση της, με βοήθησαν να ξεκινήσω και να τη φέρω σε πέρας.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κυρία Ευσταθία Τσάκαλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή με την ανάθεση της εργασίας, την καθοδήγηση, τις υποδείξεις και το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Την ευχαριστώ για τη μετάδοση των επιστημονικών γνώσεων της, την κατανόηση και τη βοήθεια της.

Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή, κύριο Σπυρίδων Κοντελέ και την καθηγήτρια, κυρία Ανθιμία Μπατρίνου, για τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών μελετών καθώς και για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και για όλα τα εφόδια που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια

Παντελοπούλου Χρυσούλα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό πλέον, πως ο ορός γάλακτος ή αλλιώς τυρόγαλα αποτελεί ένα διατροφικά ωφέλιμο παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας για τον άνθρωπο. Το γεγονός ότι το τυρόγαλα είναι ρυπογόνος παράγοντας και η ανεξέλεγκτη απόρριψή του στο περιβάλλον δημιουργεί σοβαρά προβλήματα, σε συνδυασμό με την υψηλή διατροφική του αξία, συνετέλεσαν στην αξιοποίηση αυτού και στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων, όπως τα τυριά τυρογάλακτος. Τα τυριά ανήκουν στις κατηγορίες των τροφίμων με τα πιο ευαλλοιώτα προϊόντα, πόσο μάλλον τα τυριά τυρογάλακτος τα οποία λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε υγρασία και της αρκετά χαμηλής οξύτητάς τους, αυξάνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών και μειώνουν τη διατηρησιμότητά τους.

Σκοπός της μελέτης αποτέλεσε η ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος και κατά πόσο τα μεταβολικά προϊόντα αυτών μπορούν να αυξήσουν την οξύτητα του τροφίμου-υποστρώματος, έτσι ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη του σκοπού αυτού ήταν μέσω κλασσικών μικροβιολογικών αναλύσεων, με στόχο την ανίχνευση, καταμέτρηση και απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που υπήρχαν στα δείγματα των τυριών τυρογάλακτος. Από τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν, διαπιστώθηκε πως σε όλα τα τυριά τυρογάλακτος προϋπήρχαν ικανοποιητικές ποσότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες αυξήθηκαν κατά την παραμονή τους στο ψυγείο. Επίσης, με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη οργανικών οξέων ως μεταβολικά προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και έτσι δικαιολογήθηκε η επακόλουθη οξύτητα των τυριών, η οποία αυξήθηκε αρκετά σημαντικά στη διάρκεια αυτής της παραμονής στο ψυγείο.

Η ύπαρξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος αυξάνει την οξύτητα τους, χωρίς όμως να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Αυτό το γεγονός συμβάλλει στην διατηρησιμότητα των τυριών τυρογάλακτος, αφού το μειωμένο pH δημιουργεί ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μέσω της κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών του τροφίμου-υποστρώματος, που σε αντίθετη περίπτωση θα χρησιμοποιούσαν για την ανάπτυξη τους τα παθογόνα, φέρονται ανταγωνιστικά και σε συνδυασμό με την αύξηση της οξύτητας από τα παραγόμενα οξέα ίσως μπορούν να

παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τυριών τυρογάλακτος.

ABSTRACT

It is now known that whey is a nutritionally beneficial by-product of the dairy industry for humans. The fact that whey is a polluting agent and its uncontrolled discharge into the environment creates serious problems, combined with its high nutritional value, contributed to its utilization and the production of various products, such as whey cheese. Cheeses belong to the category of foods with the most vulnerable products, especially whey cheeses which due to their high moisture content and relatively low acidity, increase the chances of developing pathogenic microorganisms and reduce their shelf life.

The aim of the study was to detect lactic acid bacteria in whey cheeses and whether their metabolic products can increase the acidity of the food-substrate, so that the survival of pathogenic microorganisms can be controlled.

The method used to achieve this purpose was through standard microbiological analyzes, with the aim of detecting, counting and isolating the lactic acid bacteria present in the samples of whey cheese. From the results carried out, it was found that in all whey cheeses there were sufficient amounts of lactic acid bacteria, which increased during their stay in the refrigerator. Also, the use of high-performance liquid chromatography HPLC confirmed the existence of organic acids as metabolic products of lactic acid bacteria and thus proved the subsequent acidity of the cheeses, which increased quite significantly during this stay in the refrigerator.

The presence of lactic acid bacteria in whey cheeses increases their acidity, but without altering the organoleptic characteristics of the product. This contributes to the shelf life of whey cheeses, as the reduced pH creates a more unfavorable environment for the growth of pathogenic microorganisms. In addition, lactic acid bacteria through the consumption of nutrients in the food-substrate, which otherwise would use pathogens for their growth, are competitive and in combination with the increase in acidity from the produced acids may extend the lifespan of whey cheeses.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright	III
Ευχαριστίες	IV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	V
ABSTRACT	VII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΥΡΟΓΑΛΑ	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Ορισμός.....	3
1.3 Τύποι τυρογάλακτος	3
1.4 Σύσταση τυρογάλακτος.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ	9
2.1 Γενικά.....	9
2.2 Ορισμός.....	13
2.3 Παραγωγή τυριών τυρογάλακτος	14
2.4 Μυζήθρα	15
2.5 Ξυνομυζήθρα Κρήτης.....	17
2.6 Ανθότυρος	19
2.7 Μανούρι.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ο ΕΝΙΑΙΟΣ ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΦΕΤ) ΓΙΑ ΤΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ	23
3.1 Περιγραφή τυριών τυρογάλακτος.....	23
3.2 Διάγραμμα Ροής Παραγωγής Τυριών Τυρογάλακτος	24
3.3 Ανάλυση και έλεγχος κινδύνων κατά την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος.....	25
3.4 Σχέδιο HACCP για την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ	30
4.1 Γενικά.....	30
4.2 <i>Listeria Monocytogenes</i>	40

4.2.1 Ιστορικά στοιχεία.....	40
4.2.2 Το γένος <i>Listeria</i> - Ταξινόμηση.....	40
4.2.3 Μορφολογία	41
4.2.4 Καλλιέργεια.....	41
4.2.5 Μεταβολισμός και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά	42
4.2.6 Προέλευση	42
4.2.7 Λιστερίωση.....	45
4.2.8 Παθογένεια	46
4.2.9 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της <i>Listeria monocytogenes</i> σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες	47
4.2.10 <i>Listeria monocytogenes</i> στα τυριά τυρογάλακτος	56
4.3 Staphylococcus Aureus.....	57
4.3.1 Ιστορικά στοιχεία.....	57
4.3.2 Ταξινόμηση.....	58
4.3.3 Μορφολογία	59
4.3.4 Καλλιέργεια.....	59
4.3.5 Μεταβολισμός και Βιοχημικά χαρακτηριστικά	59
4.3.6 Προέλευση	60
4.3.7 Ασθένεια.....	61
4.3.8 Παθογένεια	62
4.3.9 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα του <i>Staphylococcus aureus</i> σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες	63
4.3.10 <i>Staphylococcus aureus</i> στα τυριά τυρογάλακτος	65
4.4 Escherichia Coli	66
4.4.1 Ιστορικά στοιχεία.....	66
4.4.2 Ταξινόμηση - Χαρακτηριστικά.....	66
4.4.3 Καλλιέργεια.....	67
4.4.4 Προέλευση	67
4.4.5 Ασθένεια.....	69
4.4.6 Παθογένεια	70
4.4.7 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της <i>Escherichia coli</i> σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες.....	70
4.4.8 <i>Escherichia coli</i> στα τυριά τυρογάλακτος	72
4.5 Salmonella spp.	73
4.5.1 Ιστορικά στοιχεία.....	73
4.5.2 Ταξινόμηση - Χαρακτηριστικά.....	74
4.5.3 Καλλιέργεια.....	75

4.5.4 Προέλευση	75
4.5.5 Ασθένεια.....	76
4.5.6 Παθογένεια	76
4.5.7 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της <i>Salmonella spp.</i> σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες.....	77
4.5.8 <i>Salmonella spp.</i> στα τυρία τυρογάλακτος	80
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	83
5.1 Ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	86
5.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος	86
5.1.2 Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων	86
5.1.3 Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης	88
5.1.4 Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων	89
5.2 Καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	90
5.2.1 Παρασκευή θρεπτικού ζωμού.....	90
5.2.2 Απομόνωση και καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	90
5.3 Μέτρηση του pH των τυριών με πεχάμετρο	95
5.4 Προσδιορισμός των παραγόμενων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια οργανικών οξέων.....	95
5.5 Έλεγχος ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος.....	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	99
6.1 Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων	99
6.2 Αποτελέσματα μέτρησης του pH των τυριών με πεχάμετρο	102
6.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού παραγόμενων οργανικών οξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια	103
6.4 Αποτελέσματα ελέγχου ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος	104
6.5 Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων και διαγράμματα αυτών	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 : Αποθέματα ορού (σε χιλιάδες τόνους ξηρής ουσίας) (Hans-Dieter Belitz, 2009).....	2
Πίνακας 1.2: Μέση σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών τυριών αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, σύμφωνα με στοιχεία του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.....	4
Πίνακας 1.3: Χημική σύνθεση και pH ορού γάλακτος από διαφορετικούς τύπους βοοειδών τυριών (Κανδαράκης, 1986).....	5
Πίνακας 1.4: Σύνθεση υγρού ορού γάλακτος από διαφορετικές ζωικές πηγές (Fevrier, 1977).....	5
Πίνακας 1.5: Μερικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού (Χρήστος Κεχαγιάς, 2017)	7
Πίνακας 2.1: Τυριά τυρογάλακτος που παράγονται σε διάφορες χώρες.....	10
Πίνακας 2.2: Σύσταση ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (Σβαρνάς, 2012).....	11
Πίνακας 2.3: Σύσταση τυριών τυρογάλακτος (M.E. Pintado).....	12
Πίνακας 2.4: Ποιότητες ελληνικών τυριών τυρογάλακτος που επιτρέπεται να διατίθενται στην αγορά (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 83).....	13
Πίνακας 3.1: Περιγραφή ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ,2012)	23
Πίνακας 3.2: Σχέδιο HACCP για την Παραγωγή Ελληνικών Τυριών Τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ, 2012).....	29
Πίνακας 4.1: Κριτήρια ασφάλειας για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα)	34
Πίνακας 4.2: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας από: ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.....	36
Πίνακας 4.3: Μικροβιολογικές προδιαγραφές για τα τυριά από: Οδηγία 92/46/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 16ης Ιουνίου 1992 για τη θέσπιση των υγειονομικών κανόνων για την παραγωγή και την εμπορία νοπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα	38
Πίνακας 4.4: Διαφορετικά χαρακτηριστικά των γενών της οικογένειας Micrococcaceae. (Δημήτριος Τυμπής, 2017).....	58
Πίνακας 6.1: Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριών αμέσως μετά την αγορά τους.....	100
Πίνακας 6.2: Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριών	

μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για ~1,5 μήνα.....	101
Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα ένδειξης πεχάμετρου.	102
Πίνακας 6.4: Μέτρηση pH του ορού τυρογάλακτος διαφορετικών περιεκτικότητας άλατος μετά από επώαση με διαφορετικές αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	103
Πίνακας 6.5: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων που παράχθηκαν από τα οξυγαλακτικά βακτήρια των δειγμάτων τυριών τυρογάλακτος με χρήση HPL....	103
Πίνακας 6.6: Συγκεντρωτικός πίνακας στοιχείων	105
Πίνακας 6.7: Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων για διεξαγωγή συμπερασμάτων.....	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Τυρόγαλα κατά το στάδιο τυροκόμησης Φέτας.....	2
Εικόνα 2.1: Νωπή Μυζήθρα.....	17
Εικόνα 2.2: Ξηρή Μυζήθρα.....	17
Εικόνα 2.3: Ξυνομυζήθρα Κρήτης.....	19
Εικόνα 2.4: Ξηρός Ανθότυρος	20
Εικόνα 2.5: Νωπός Ανθότυρος.....	20
Εικόνα 2.6: Μανούρι.....	22
Εικόνα 5.1: Ανθότυρος C0.....	83
Εικόνα 5.2: Μυζήθρα C1.....	83
Εικόνα 5.3: Ξυνομυζήθρα C2.....	84
Εικόνα 5.4: Ανθότυρος C3.....	84
Εικόνα 5.5: Ανθότυρος C4.....	84
Εικόνα 5.6: Ανθότυρος C5.....	85
Εικόνα 5.7: Ανθότυρος C6.....	85
Εικόνα 5.8: Κλίβανος υγρής αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκε.....	86
Εικόνα 5.9: Σκόνη MRS Agar που χρησιμοποιήθηκε.....	86
Εικόνα 5.10: MRS Agar αμέσως μετά την παρασκευή και πήξη του.....	86
Εικόνα 5.11: Συσκευή Stomacher και Bag Filters με την πρώτη δεκαδική αραιώση των δειγμάτων.....	87
Εικόνα 5.12: Τρυβλία που έχουν επιστρωθεί επιφανειακά με τις δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων, κοντά σε περιοχή λύχνων.....	88
Εικόνα 5.13: Μηχανή vacuum που χρησιμοποιήθηκε.....	88
Εικόνα 5.14: Επιστρωμένα τρυβλία μέσα σε ειδικές σφραγισμένες σακούλες (αερόβιες συνθήκες).....	88
Εικόνα 5.15: Καταμετρητής αποικιών.....	89
Εικόνα 5.16: Αριθμημένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγμα.....	89
Εικόνα 5.17: MRS Broth που χρησιμοποιήθηκε.....	90
Εικόνα 5.18: Παρασκευασμένο MRS Broth.....	90
Εικόνα 5.19: Φιαλίδια που περιέχουν απομονωμένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων του κάθε δείγματος.....	93
Εικόνα 5.20: Επωαστικός κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε.....	93

Εικόνα 5.21: Μικροφυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα C1 και C2.....	94
Εικόνα 5.22: Φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για το δείγμα C4.....	94
Εικόνα 5.23:Κάψουλες με τις απομονωμένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων πριν τοποθετηθούν στην κατάψυξη.....	94

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα Ροής Παραγωγής Τυριών Τυρογάλακτος από τον Γενικό Οδηγό για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις (ΕΦΕΤ,2012)	24
Διάγραμμα 6.1: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών τυρογάλακτος αμέσως μετά την αγορά τους.	106
Διάγραμμα 6.2: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών τυρογάλακτος μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.	107
Διάγραμμα 6.3: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος (συγκριτικά).....	107
Διάγραμμα 6.4: Ποσοστιαία αύξηση πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων (cfu/ml) στα τυριά τυρογάλακτος από την αγορά τους μέχρι και την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.	108
Διάγραμμα 6.5: pH τυριών τυρογάλακτος στην αρχή της αγοράς τους και μετά από 1,5 μήνα παραμονής στο ψυγείο.	108
Διάγραμμα 6.6: Μονάδες μείωσης pH των τυριών τυρογάλακτος μετά την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΥΡΟΓΑΛΑ

1.1 Γενικά

Ο ορός γάλακτος ή τυρόγαλα αποτελεί ένα παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας που προκύπτει κατά την τυροκόμηση των τυριών από τον διαχωρισμό του τυροπήγματος. Είναι γνωστό πως η ανεξέλεγκτη διάθεση του τυρογάλακτος από τη λειτουργία τυροκομικών μονάδων, μέχρι και πριν από λίγα χρόνια, δημιουργούσε σοβαρό πρόβλημα στο οικοσύστημα λόγω της απόρριψης του στο περιβάλλον. Η αύξηση της παγκόσμιας τυροκομίας για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης του πληθυσμού, έχουν οξύνει το πρόβλημα αυτό εξαιτίας της μεγαλύτερης παραγωγής τυριού και κατ'επέκταση ορού γάλακτος. Το τυρόγαλα είναι ένας ρυπογόνος παράγοντας εξαιτίας της ύπαρξης γαλακτικού οξέος και της παρουσίας υψηλής τιμής του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD), για το οποίο ευθύνεται κατά κύριο λόγο το υψηλό ποσοστό της λακτόζης αλλά και των πρωτεϊνών που περιέχει. Ενδεικτικά, η ρύπανση που προκαλείται από το τυρόγαλα μιας μικρομεσαίας τυροκομικής μονάδας δυναμικότητας π.χ. 20 τόνων/ημέρα σε προς επεξεργασία αγελαδινό γάλα, ισοδυναμεί με τη ρύπανση μίας πόλης 7.370 κατοίκων (S. Marwaha, 1988). Απόρριψη του ορού γάλακτος οδηγεί σε σοβαρά προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος και των υδάτων, θέτει σε κίνδυνο την φυσική και χημική δομή του έδαφος μειώνοντας την απόδοση των καλλιεργειών και μειώνει την υδρόβια ζωή με την εξάντληση του διαλυμένου οξυγόνου (DO) του νερού. Σε πολλές χώρες η αποβολή του ορού στο δίκτυο αποχέτευσης έχει απαγορευτεί εφόσον προηγουμένως δεν έχει γίνει κάποια διεργασία με σκοπό τη μείωση της οργανικής του ουσίας. Για αυτόν τον λόγο, θεσπίζονται περιβαλλοντικά όρια για την ασφαλή απόρριψη ή ανακύκλωση των προϊόντων αυτών σε υδάτινα ή ξηρά περιβάλλοντα και προδιαγράφονται μέθοδοι επεξεργασίας και απόρριψης των απορριμμάτων στις βιομηχανίες, παραδείγματος χάριν διάθεση με άρδευση με ψεκασμό χρησιμοποιείται στη Νέα Ζηλανδία, εναλλασσόμενο διπλό φιλτράρισμα και φίλτρα υψηλής ταχύτητας στο Ηνωμένο Βασίλειο και εκτεταμένος αερισμός στις Κάτω Χώρες, ΟΔΓ, Γαλλία και Πολωνία (Harper, 1984). Επίσης, ο Chambers και Ferretti (1979), αναφέρουν ότι η ασφαλής διάθεση ή απόρριψη του ορού γάλακτος μετά την επεξεργασία του τυριού κόστιζε σε μια γαλακτοβιομηχανία στις Η.Π.Α. επιπλέον 0,6-4,4 λεπτά ανά κιλό επεξεργασμένου τυριού. Επομένως, είναι ευκόλως κατανοητό ότι οι επιπτώσεις από την ανεξέλεγκτη απόρριψη του ορού γάλακτος στους υδάτινους αποδέκτες ή επιφανειακά στο

έδαφος είναι εξαιρετικά βλαβερές για το οικοσύστημα αλλά φέρουν και οικονομικές επιβαρύνσεις στις βιομηχανίες που τον επεξεργάζονται.

Παρά τη μεγάλη ρύπανση που προκαλεί το τυρόγαλα στο περιβάλλον, για τον άνθρωπο αποτελεί χρήσιμο αγαθό για τη διατροφή του λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Η λακτόζη, οι πρωτεΐνες και τα ανόργανα άλατα που περιέχονται στον ορό γάλακτος, καθώς και οι λειτουργικές ιδιότητες που μπορεί να προσδώσει όταν αυτό προστεθεί σε ένα τρόφιμο, το έχουν πλέον συμπεριλάβει σε ένα από τα περιζήτητα παραπροϊόντα της αγοράς. Έτσι, η ανάγκη αξιοποίησης του τυρογάλακτος για μείωση της απόρριψης του στο περιβάλλον, συνδυαστικά με τη θρεπτική αξία του, οδήγησαν στην παραγωγή προϊόντων τυρογάλακτος υψηλής διατροφικής και χρηματικής αξίας όπως σκόνες τυρογάλακτος είτε ως πρόσθετα στην βιομηχανία τροφίμων είτε ως συμπληρώματα διατροφής, τυριά τυρογάλακτος, ζωοτροφές, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, ψωμί, γλυκά, αναψυκτικά, κ.α..



Εικόνα 1.1: Τυρόγαλα κατά το στάδιο τυροκόμησης Φέτας (<https://www.dairy-services.com/%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%BE%CE%B9%CE%BD%CF%8C-%CF%84%CF%85%CF%81%CF%8C%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1/>)

Πίνακας 1.1 : Αποθέματα ορού (σε χιλιάδες τόνους ξηρής ουσίας) (Hans-Dieter Belitz, 2009)

ΠΕΡΙΟΧΗ	1976	1980
Δυτική Ευρώπη	1.617	1.987
Ομοσπονδιακή Γερμανία	258	323
Η.Π.Α.	838	968
Παγκόσμια	2.807	3.362

1.2 Ορισμός

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 625/30-3-1978 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, «Τυρόγαλο είναι το προϊόν που λαμβάνεται με τη χρήση οξέων, πυτιάς και/ή φυσικοχημικών μεθόδων, κατά την παραγωγή τυριών και καζεΐνης» ή πιο απλά ο «ορός» του γάλακτος, το κιτρινοπράσινο υγρό που απομένει μετά την παρασκευή τυριού, μετά την πήξη του οποίου το υγρό διαχωρίζεται από το τυρόπηγμα. Επίσης, η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας FAO (Codex Stan A-7-1978) για τον ορό του γάλακτος (ή τυρόγαλο) ορίζει ότι είναι το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια παρασκευής των τυριών, της καζεΐνης ή παρόμοιων προϊόντων που λαμβάνονται από το τυρόπηγμα μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από το γάλα. Η πήξη επιτυγχάνεται μέσω της δράσης, κυρίως, ενζύμων τύπου πυτιάς.

1.3 Τύποι τυρογάλακτος

Εξαρτωμένης της μεθόδου επεξεργασίας που πραγματοποιείται η λήψη του τυρόγαλου διακρίνεται σε «τυρόγαλο πυτιάς ή γλυκό τυρόγαλο» και σε «όξινο τυρόγαλο». Το όξινο τυρόγαλο (pH 4,3-4,6) δημιουργείται έπειτα από οξίνιση του γάλακτος εφόσον έχουν προστεθεί ανόργανα οξέα έτσι ώστε να πήξει η καζεΐνη, ενώ το γλυκό τυρόγαλο (pH 5,9-6,6) είναι υποπροϊόν της τυροκομίας και δημιουργείται έπειτα από πήξη του γάλακτος με προσθήκη πυτιάς (Ανυφαντάκης, 2004).

Ο γλυκός ορός γάλακτος παρουσιάζεται γενικά περισσότερο πλούσιος σε λακτόζη, σε αντίθεση με τον όξινο που παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση μετάλλων, πιθανόν λόγω της διαλυτοποίησης του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου των μικκυλίων καζεΐνης που λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την οξίνιση. Επίσης, κατά τη λήψη του όξινου ορού γάλακτος ένα μεγάλο ποσοστό λακτόζης μεταβάλλεται σε γαλακτικό οξύ, ενώ ασήμαντη ποσότητα λακτόζης μετατρέπεται σε αυτό κατά τη λήψη του γλυκού ορού γάλακτος.

1.4 Σύσταση τυρογάλακτος

Το τυρόγαλο αποτελείται κυρίως από νερό, λακτόζη και πρωτεΐνες. Περιλαμβάνει περίπου το 50% της λακτόζης του γάλακτος που έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του τυριού, καθώς επίσης μεταλλικά στοιχεία, βιταμίνες και αρκετά άλλα στοιχεία, όπως ενζυμικούς, ορμονικούς και αυξητικούς παράγοντες.

Η σύσταση του διαμορφώνεται ανάλογα με το είδος του γάλακτος που επιλέγεται, τη μέθοδο παρασκευής του τυριού από το οποίο έχει προκύψει και από τις τεχνολογικές

επεμβάσεις που υφίσταται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του. Επίσης, πέραν του είδους εξαρτάται από τη φυλή, τη διατροφή, την υγεία και την αναπαραγωγική κατάσταση του ζώου από το οποίο προέρχεται το γάλα. Όλοι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση του γάλακτος, κατ'επέκταση επηρεάζουν και αυτήν του τυρογάλακτος που λαμβάνεται από αυτό. Επιπλέον, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος πριν από την πήξη του, η μέθοδος πήξης του (πυτιά/ένζυμα, βιολογική οξίνιση, προσθήκη οξέων), ο βαθμός διαίρεσης του πηγματος, καθώς και ο τρόπος και η θερμοκρασία αναθέρμανσης του τυρογάλακτος, επηρεάζουν τελικά τη σύσταση του.

Κατά την τυροκόμηση του αιγοπρόβειου γάλακτος, το 10-20% των συνολικών συστατικών του μεταφέρεται στο τυρί και το 80-90% στο τυρόγαλα, το οποίο είναι το υποπροϊόν. Επίσης, μεταφέρεται στο τυρόγαλα περίπου το 50% των στερεών συστατικών του αγελαδινού γάλακτος, το 45% του γίδινου και το 40% του πρόβειου γάλακτος. Τα συστατικά αυτά δεν κατανέμονται κατά όμοιο τρόπο μεταξύ τυριού και τυρογάλακτος. Στο τυρί μεταφέρονται σε μεγάλο ποσοστό οι πρωτεΐνες και το λίπος, ενώ στο τυρόγαλα το νερό και τα υδατοδιαλυτά συστατικά. Τα ποσοστά αυτά ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του τυριού που παρασκευάζεται και την τεχνολογία που εφαρμόζεται (Ανυφαντάκης, 2004).

Το τυρόγαλο περιέχει μικρό ποσοστό ξηρής ουσίας (6,0-7,5%) και αποτελείται κυρίως από λακτόζη (70-73%), πρωτεΐνες (12-13%) και μεταλλικά άλατα (7-11%). Επιπλέον, περιλαμβάνει μεταβαλλόμενη ποσότητα γαλακτικού οξέος (0,5-10%), κιτρικού οξέος (~1%) και μη πρωτεϊνικού αζώτου (0,5-0,8%). Είναι πλούσιο σε ασβέστιο, φώσφορο, νάτριο, κάλιο και χλώριο. Το ασβέστιο και ο φώσφορος βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο όξινο τυρόγαλο από ότι στο γλυκό, ενώ τα υπόλοιπα παρουσιάζουν σταθερή περιεκτικότητα ανεξάρτητα από την προέλευση.

Πίνακας 1.2: Μέση σύσταση τυρογάλακτος ελληνικών τυριών αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, σύμφωνα με στοιχεία του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΛΜΗΣ		ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ		ΓΡΑΒΙΕΡΑ		
Συστατικά						
(%)	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρόβειο
Ξηρή ουσία	6,44	7,87	6,55	8,1	6,90	8,74
Νερό	93,56	92,13	93,45	91,90	93,10	91,23

Λίπος	0,32	0,39	0,40	0,80	0,60	1,26
Πρωτεΐνες	0,82	1,61	0,80	1,55	0,90	1,52
Λακτόζη	4,80	5,33	4,85	5,25	4,90	5,27
Γαλακτικό οξύ	0,12	0,14	0,11	0,14	0,12	0,14
Ανόργανα άλατα	0,50	0,60	0,50	0,50	0,50	0,50

Πίνακας 1.3: Χημική σύνθεση και pH ορού γάλακτος από διαφορετικούς τύπους βοοειδών τυριών (Κανδαράκης, 1986)

Τύπος Τυριού	Ποσοστό (w/w)					
	Υγρασία	Πρωτεΐνη	Λίπος	Λακτόζη	Τέφρα	Ph
Camembert	93,0	0,9	0,3	5,1	0,6	Δεν είναι διαθέσιμα
Cheddar	93,7	0,8	0,5	4,9	0,5	5,7-6,3
Cottage	93,5	0,8	0,1	4,9	0,5	4,6
Emmental	93,1	0,9	1,0	5,5	0,5	Δεν είναι διαθέσιμα
Φέτα	93,7	0,8	0,3	4,7	0,5	6,3
Γραβιέρα	93,1	0,9	0,6	4,9	0,5	6,3
Κεφαλοτύρι	93,5	0,8	0,4	4,9	0,5	6,4

Πίνακας 1.4: Σύνθεση υγρού ορού γάλακτος από διαφορετικές ζωικές πηγές (Fevrier, 1977)

Συστατικά (g/L)	Αγελάδα		Πρόβατο	Κατσίκα
	Γλυκός	Όξινος	Γλυκός	Όξινος
Ξηρά στερεά	70,84	65,76	83,84	62,91
Πρωτεΐνη	9,24	7,80	18,71	9,35

Άζωτο	1,45	1,22	2,93	1,47
Μη πρωτεϊνικό άζωτο	0,37	0,54	0,80	0,67
Άζωτο αμμωνίου	0,04	0,14	0,13	0,18
Λίπος	5,06	0,85	6,46	0,40
Λακτόζη	51,81	45,25	50,98	39,18
Τέφρα	5,25	7,56	5,65	8,36
Ασβέστιο	0,47	1,25	0,49	1,35

Λακτόζη

Η λακτόζη είναι ένας αναγωγικός δισακχαρίτης, ο οποίος αποτελείται από ένα μόριο D-γλυκόζης και ένα μόριο D-γαλακτόζης. Με τη δράση του ενζύμου λακτάση η λακτόζη υδρολύεται και διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Αποτελεί τον χαρακτηριστικό υδατάνθρακα του γάλακτος -ο οποίος υπάρχει μόνο σε αυτό- και έπειτα το νερό είναι το συστατικό που υπάρχει σε μεγαλύτερη αναλογία στο τυρόγαλα.

Πρωτεΐνες του ορού

Το πρωτεϊνικό τμήμα του τυρογάλακτος δεν περιλαμβάνει καζεΐνες καθώς αυτές κατά κύριο λόγο παραμένουν στο τυρόπηγμα, πράγμα το οποίο διαδραματίζει σημαντικό τεχνολογικό και διατροφικό ρόλο. Σε αυτό κυριαρχούν οι πρωτεΐνες του ορού και πιο συγκεκριμένα η β-γαλακτογλοβουλίνη (50,65%), α-γαλακτογλοβουλίνη (17,32%) και οι ανοσογλοβουλίνες (12,42%). Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αποτελούν αθροιστικά το 80,39% των αζωτούχων ουσιών του τυρογάλακτος, είναι θερμοευαίσθητες και κατακρημνίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες (Ανυφαντάκης, 2004). Οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν διαλυτές σε pH 4,6 στους 20 °C εν αντιθέσει με τις καζεΐνες, θεωρούνται υψηλής βιολογικής και διατροφικής αξίας διότι περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται από τον οργανισμό του ανθρώπου, καθώς είναι και εύκολα αφομοιώσιμα από αυτόν. Κατά αυτόν τον τρόπο αναδομούνται οι ιστοί του, παράγονται αντισώματα, ένζυμα, ορμόνες και παραλαμβάνει ενέργεια. Πέραν των βασικών προαναφερθέντων πρωτεϊνών, το τυρόγαλα

περιέχει και άλλες πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη του ορού, η γαλακτοπεροξειδάση και η λακτοφερρίνη, καθώς και πεπτίδια τα οποία προέκυψαν από την υδρόλυση άλλων πρωτεϊνών του γάλακτος.

Πίνακας 1.5: Μερικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ορού (Χρήστος Κεχαγιάς, 2017)

ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΡΟΥ	Μοριακό βάρος (g/mol)	Συγκέντρωση (g/L)	Ισοηλεκτρικό σημείο pH	Συνολικός αριθμός αμινοξέων
Β-γαλακτογλοβουλίνη	18.362	2.7	5.2	162
Α-γαλακτογλοβουλίνη	14.147	1.2	4.5-4.8	123
Ανοσογλοβουλίνες	150.000-1.000.000	0.65	5.5-8.3	-
Αλβουμίνη του ορού	69.000	0.4	4.7-4.9	-

Μεταλλικά στοιχεία

Τα σημαντικότερα μεταλλικά στοιχεία του τυρογάλακτος είναι τα μονοσθενή ιόντα νατρίου, καλίου και χλωρίου σε συνδυασμό με πιο ενεργά ιόντα, σαν αυτά του ασβεστίου, μαγνησίου, κιτρικά και φωσφορικά. Λαμβάνουν μέρος σε πληθώρα των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού και έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών του ορού. Επίσης, μέσω της διαδικασίας της ώσμωσης, συμβάλλουν στη ρύθμιση του καταμερισμού των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών υγρών του σώματος.

Βιταμίνες

Στον ορό γάλακτος περιλαμβάνονται κυρίως υδατοδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και βοηθούν στην κάλυψη της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης (RDI). Κατά κύριο λόγο παρευρίσκονται βιταμίνες Β2- ριβοφλαβίνη (απαραίτητες για να αναπτύσσονται και να επιδιορθώνονται οι ιστοί), βιταμίνες Β5-παντοθενικό οξύ (συμβάλλουν στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών), βιταμίνες Β6-πυριδοξίνη (συμμετέχουν στο μεταβολισμό πρωτεϊνών και συμβάλλουν στην πρόληψη φλεγμονών) και βιταμίνες C- ασκορβικό οξύ (ισχυρό αντιοξειδωτικό που προστατεύει τον οργανισμό από οξειδωτικούς παράγοντες).

Λίπος

Τα ποσοστά λίπους στο τυρόγαλα είναι μικρότερα του 1,5%, μικρό ποσοστό το οποίο εξαρτάται από το είδος του γάλακτος και από την τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριού. Το λίπος μπορεί να απομακρυνθεί με φυγοκέντρηση και να χρησιμοποιηθεί κατά διάφορους τρόπους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

2.1 Γενικά

Τα τυριά τυρογάλακτος αποτελούν ιδιαίτερη κατηγορία τυριών, με υψηλή διατροφική αξία, όπου συνήθως έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα έναντι άλλων κατηγοριών τυριών και αυτός είναι από τους κυριότερους λόγους που προτιμώνται. Παρασκευάζονται σχεδόν σε όλες τις χώρες, συνήθως σύμφωνα με παραδοσιακά πρότυπα και σε μικρό επίπεδο, μέσω μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και φέρουν ξεχωριστές ονομασίες ανάλογα με τη χώρα και την περιοχή από την οποία προέρχονται. Τα τυριά τυρογάλακτος παρασκευάζονται κυρίως σε μεσογειακές χώρες από ορό γάλακτος προβάτου και αυτό όχι μόνο λόγω της οικονομικής σημασίας αυτών των ζώων στην περιοχή αυτή αλλά και της υψηλής συγκέντρωσής του σε πρωτεΐνες. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του ορού των βοοειδών και αιγοειδών στην πραγματικότητα καταλήγει σε μικρότερες αποδόσεις των αντίστοιχων τυριών.

Περιέχουν πολυάριθμες πρωτεΐνες του ορού, οι οποίες θεωρούνται “πλήρεις” πρωτεΐνες όσον αφορά το προφίλ των αμινοξέων που περιέχουν, διότι περιλαμβάνονται και τα 9 αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τη διατροφή του ανθρώπου, είναι συνήθως τυριά με χαμηλά λιπαρά, διότι στο τυρόγαλα περιέχεται λιγότερο από 1,5% λίπος και το χρώμα τους ποικίλει από λευκό έως ανοιχτό καφετί. Η σύσταση των τυριών τυρογάλακτος εξαρτάται από παράγοντες όπως η πηγή του ορού γάλακτος (βόειο, πρόβειο ή αιγοπρόβειο), η σύσταση του ορού γάλακτος (δηλαδή φυλή, στάδιο γαλουχίας, σίτιση κλπ.), η αναλογία ορού γάλακτος προς γάλα (εάν προστεθεί γάλα ή κρέμα γάλακτος στον ορό πριν από την παρασκευή του τυριού) και τις τεχνολογικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται (θερμοκρασία θέρμανσης, χρόνος θέρμανσης, εναλλαγή παρτίδων υλών κατά τη συνεχόμενη διεργασία και πιθανή χρήση υπερδιήθησης). Λόγω, λοιπόν, διαφορετικής πρώτης ύλης αλλά και τεχνολογίας εφαρμογής, τα τυριά τυρογάλακτος διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύνθεση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.

Το τυρί Ricotta είναι το πιο σημαντικό και γνωστό τυρί τυρογάλακτος με καταγωγή την Ιταλία, αλλά τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αρκετά δημοφιλές και στις Η.Π.Α. Η Ricotta παρασκευάζεται από ορό γάλακτος που λαμβάνεται από βουβαλίσιο αποβουτυρωμένο γάλα, ο οποίος έχει ληφθεί από την παραγωγή τυριού Cheddar και ορό γάλακτος paneer (που

παράγεται από την όξινη καταβύθιση του βουβαλίσσιου γάλακτος σε υψηλή θερμοκρασία) (Prajapati, 1981). Μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει πολλά είδη και παραλλαγές, όπως Ricotta di Bufala Campana και Ricotta Romana, Ricotta salata, Ricotta infornata, Ricotta affumicata, Ricotta forte ή scanta. Στις ανατολικές Η.Π.Α., η υψηλότερη αποδοχή από τους καταναλωτές επιτεύχθηκε όταν η Ricotta παρασκευαζόταν με την προσθήκη πλήρους γάλακτος ή μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος λόγω της πιο κρεμώδους και λεπτής υφής καθώς και της ευχάριστης γεύσης που μοιάζει με καραμέλα στο οποίο προσδιδόταν.

Έπειτα, υπάρχουν και άλλα τυριά τυρογάλακτος όπως το Brousse της Γαλλίας, το Klila της Τυνησίας, το Ziger της Γερμανίας, Scuta Ρουμανίας, Puina της Γιουγκοσλαβίας, Naolugi της Ρωσίας και η Αναρή της Κύπρου.

Στην Ελλάδα παρασκευάζονται η Μυζήθρα και Ξυνομυζήθρα, το Μανούρι και ο Ανθότυρος. Μάλιστα το Μανούρι και η Ξυνομυζήθρα Κρήτης έχουν χαρακτηριστεί και ως τυριά προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ). Συνήθως, η Μυζήθρα προέρχεται από την παρασκευή τυρογάλακτος Φέτας με προσθήκη προσγάλακτος, το Μανούρι από τυρόγαλα σκληρών τυριών με προσθήκη προσγάλακτος και κρέμας και ο Ανθότυρος από τυρόγαλα σκληρών τυριών με προσθήκη προσγάλακτος. Πιο πλούσιο σε υγρασία είναι η Μυζήθρα και ο Ανθότυρος, ενώ σε λίπος το Μανούρι. Οι συστάσεις στον Ανθότυρο και την Μυζήθρα τόσο για την υγρασία όσο και για το λίπος διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν έχουμε νωπά ή ξερά τυριά. Η Μυζήθρα παρασκευάζεται και από άπαχο τυρόγαλα και θεωρείται «άπαχη» ή «διαίτης».

Πίνακας 2.1: Τυριά τυρογάλακτος που παράγονται σε διάφορες χώρες

ΧΩΡΑ	ΤΥΡΙ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ
Ελλάδα	Μυζήθρα, Μανούρι, Ανθότυρος
Γαλλία	Serac, Brousse, Broccio, Greuil
Ιταλία	Ricotta
Κύπρος	Anari
Ισπανία	Requeson
Ελβετία	Schottenziegr, Hudelziger

Πορτογαλία	Requeijao
Μάλτα	Casio-Ricotta
Ρουμανία	Ziger, Urda
Πρώην ΕΣΣΔ	Nadigi, Kaukaz
Ισραήλ	Urda
Αργεντινή	Ricotta
Βραζιλία	Requeijao do Norte
Η.Π.Α	Ricotta, Ricotone
Νορβηγία	Mysot, Primost, Gjestost

Πίνακας 2.2: Σύσταση ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (Σβαρνάς, 2012)

Συστατικά (%)	ΕΙΔΗ ΤΥΡΙΩΝ			
	ΜΥΖΗΘΡΑ (ΝΩΠΗ)		ΜΑΝΟΥΡΙ	ΑΝΘΟΤΥΡΟΣ (ΞΗΡΟΣ)
	Χωρίς πρόσγαλα	Με πρόσγαλα		
Λίπος	10-12	15-19	33-37	20-26
Πρωτεΐνες	12-14	12-13	10-11	10-12
Λακτόζη	3,5	3,5	2,5	3
Άλατα	1,5	1,5	1,5	1,5
Νερό	70-71	64-66	48-52	60-64

Πίνακας 2.3: Σύσταση τυριών τυρογάλακτος (M.E. Pintado)

Τυρί/Τοποθεσία	Πρώτες ύλες/Τεχνική Παρασκευής	Υγρασία (% w/w)	Πρωτεΐνη (% w/w)	Λίπος (% w/w)	Λακτόζη (% w/w)	Τέφρα (% w/w)	Πηγή
Ricotta/Σαρδηνία, Ιταλία	Ορός προβάτου/παρ αδοσιακή	62,9±3,3	8,7±1,3	24,5±3,7	3,1±0,6	0,6±0,1	Vodret,1970
Ricotta/Diano Valley, Ιταλία	Ορός προβάτου/παρ αδοσιακή	56,8	4,1	26,0	-	-	Cavaliere, 1988
Ricotta/Catania, Ιταλία	Ορός προβάτου/παρ αδοσιακή	70-80	6,1-7,0	10,2-27,4	4,1	1,0-1,5	Ziino et al.,1993
Ricotta/Sassari, Ιταλία	Αγελαδινός ορός/παραδοσιακή	76,0±4,2	-	9,7±2,3	-	1,0±0,3	Cossedu et al.,1997
Ricotta/USA	95% αγελαδινός ορός και 5% γάλα/παραδοσιακή	81,63	7,0	3,3	-	-	Weatherup,1986
Ricotta/USA	80% αγελαδινός ορός και 20% γάλα/συνεχόμενη	66,5	16,3	11,6	-	-	Modler,1988
Ricotta/USA	80% αγελαδινός ορός και 20% γάλα/υπερδιήθηση	19,8	15,9	2,4	-	-	Modler and Jones,1987
Ricottone/USA	100% αγελαδινός ορός	82,5	11,3	-	1,5	-	Kosikowski,1982
Requeijao/Portugal	90% πρόβειος ορός και 10% αίγιο γάλα/παραδοσιακή	59,0±0,60	8,5±0,6	29,5±0,4	3,5±0,2	-	Pintado and Malcata,1999

Mysost/Norway	100% βοδινός ορός/παραδοσιακή	16,2±18,5	11,5±12,2	24,7±28,7	34,4±36,7	4,0±4,5	Jelen and Buchheim, 1976
Ανθότυρο/Ελλάδα	Εμπορικά τυριά	66,18	-	18,50	-	1,07	Tzanetakis et al., 1977
Μανούρι/Ελλάδα	90% αίγιος ορός και 10% κρέμα/παραδοσιακή	50,61	-	33,67	-	1,36	Tzanetakis et al., 1977
Μανούρι/Ελλάδα	Εμπορικά τυριά	48,07±2,97	10,86±1,89	36,67±3,70	2,49±0,47	0,83±0,22	Veinoglou et al., 1984
Μυζήθρα/Ελλάδα	Εμπορικά τυριά	80,39	-	1,38	-	0,79	Tzanetakis et al., 1977

2.2 Ορισμός

Σύμφωνα με το Άρθρο 83 (2011) του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση χαρακτηρίζονται τα τυριά, τα οποία λαμβάνονται μετά από ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (πάνω από 85°C), με ή χωρίς οξίνιση και με ή χωρίς προσθήκη: α) γάλακτος (πρόσγαλα), β) γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα), γ) βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα) [μερικά από τα οποία μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξερά) και άλλα κατόπιν ωρίμανσης] και των οποίων η υγρασία δεν ξεπερνά το 70%.

Τα τυριά τυρογάλακτος επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση στις παρακάτω ποιότητες:

Πίνακας 2.4: Ποιότητες ελληνικών τυριών τυρογάλακτος που επιτρέπεται να διατίθενται στην αγορά (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 83)

	Μέγιστη υγρασία	Λίπος υπολογισμένο σε ξηρή ουσία τουλάχιστον
α) Εξαιρετική ποιότητα:	60%	70%
β) Πρώτη ποιότητα:	65%	65%
γ) Δεύτερη ποιότητα:	70%	50%
δ) Μερικώς αποβουτυρωμένα:	70%	33,3% (συμπ/νου) – 50% (ή 10% σε τυρί ως έχει)

2.3 Παραγωγή τυριών τυρογάλακτος

Παρά το γεγονός ότι το τυρόγαλα αποτελεί παραπροϊόν της τυροκομίας, η επαναχρησιμοποίησή του λόγω των ωφέλιμων πρωτεϊνών του είναι χρήσιμη για τις γαλακτοβιομηχανίες. Αυτό μπορεί να προκύψει με την ανάκτηση των πρωτεϊνών του ορού, το οποίο μπορεί να συμβεί με τους τρεις βασικούς ακόλουθους τρόπους:

1. Θέρμανση ή/και οξίνιση του τυρογάλακτος, όπου παράγεται τυρόπηγμα για τυριά όπως η Μυζήθρα, Ricotta και όμοια με αυτά τυριά.
2. Συμπύκνωση του τυρογάλακτος έως ότου δημιουργηθεί πυκνόρρευστος πολτός-τυρόπηγμα για τυριά τύπου Mysost που καταναλώνονται στις Σκανδιναβικές χώρες. Αυτά έχουν πιο γλυκιά γεύση έναντι άλλων και ελαφρώς καφέ χρωματισμό λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε λακτόζη που περιέχουν.
3. Υπερδιήθηση ή αντίστροφη ώσμωση για συμπύκνωση του τυρογάλακτος, με επακόλουθη μετουσίωση των πρωτεϊνών για να μπορέσει να αναμιχθεί με το τυροκομούμενο γάλα για αύξηση της απόδοσή του.

Από τις παραπάνω μεθόδους στη χώρα μας εφαρμόζεται η πρώτη για την παραγωγή Μυζήθρας (Ζερφυρίδης, 2001).

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (Codex Stan A-7-1971), το τυρί ορού γάλακτος που λαμβάνεται μέσω της συγκέντρωσης ορού γάλακτος παράγεται με εξάτμιση θερμότητας ορού γάλακτος, ή από μείγμα ορού γάλακτος και γάλακτος, κρέμας γάλακτος ή άλλων πρώτων υλών γάλακτος, σε συγκέντρωση που επιτρέπει στο τελικό τυρί να πάρει ένα σταθερό σχήμα. Λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λακτόζη, αυτά τα τυριά είναι τυπικά κιτρινωπά έως καφέ και έχουν γλυκιά, μαγειρεμένη ή καραμελωμένη γεύση. Επίσης, τα τυριά ορού γάλακτος μπορούν να ληφθούν μέσω της πήξης του ορού γάλακτος με θερμική καθίζηση ορού γάλακτος, ή από μείγμα ορού γάλακτος και γάλακτος ή κρέμας, με ή χωρίς προσθήκη οξέος. Αυτά τα τυριά ορού γάλακτος έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη και λευκό έως κιτρινωπό χρώμα

Όσον αφορά τα ελληνικά τυριά τυρογάλακτος έχουν κοινό χαρακτηριστικό τις πρωτεΐνες του ορού που λαμβάνονται με θέρμανση του ορού σε θερμοκρασίες άνω των 85°C, με ή χωρίς οξίνισή του. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη θέρμανση του τυρογάλακτος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία αυτών των τυριών. Όπως αναφέρει ο Ανυφαντάκης (1998), καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν κάτω από συνθήκες συνεχόμενης ανάδευσης αρχικά ο ρυθμός είναι σχετικά αργός και έπειτα προς το τέλος επιταχύνεται με σκοπό τη δημιουργία καλού πήγματος. Αρκετές φορές προστίθεται

γάλα (πρόσγαλα) στον ορό και χρησιμοποιείται υπερδιήθηση πριν τη θερμική επεξεργασία, έτσι ώστε να σχηματιστεί σταθερότερο τυρόπηγμα.

2.4 Μυζήθρα

Η μυζήθρα αποτελεί το πιο διαδεδομένο και με τη μεγαλύτερη παραγωγή τυρί τυρογάλακτος στην Ελλάδα. Διατρέχεται από αρκετές παραλλαγές, οι οποίες σχετίζονται με το είδος του γάλακτος που έχει παρασκευαστεί, την περιεκτικότητα σε λιπαρά και υγρασία, καθώς και τις τεχνικές που παρασκευάζεται. Το τυρόγαλα προέρχεται κυρίως από την παραγωγή διάφορων σκληρών τυριών, αλλά και Φέτας, ενώ παλιότερα αποτελούσε και παραπροϊόν της παραδοσιακής διαδικασίας εξαγωγής βουτύρου. Στις παραλλαγές του μπορούν να συμπεριληφθούν η Γκίζα, η Ούρδα, το Μανούρι και η Μανουρομυζήθρα, ενώ έχει στενότερα χαρακτηριστικά με τον Ανθότυρο και τη Ricotta.

Σε γενικές γραμμές, η Μυζήθρα είναι λευκό τυρί τυρογάλακτος, μαλακό, ημίσκληρο ή σκληρό αναλόγως με τη μέγιστη υγρασία που υπάρχει σε εκείνη. Το τυρόγαλα προέρχεται από πρόβειο, κατσικίσιο ή αγελαδινό γάλα ή μείγματα τους, καθώς το ίδιο και το πρόσγαλα, το οποίο ενδεχομένως θα προστεθεί. Παρόλα αυτά, συνηθέστερη είναι η παρασκευή της Μυζήθρας από αιγοπρόβειο τυρόγαλα λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού του σε πρωτεΐνες, γεγονός που καθιστά την παραγωγή της ευκολότερη αλλά και την απόδοσή της μεγαλύτερη.

Η Μυζήθρα διατίθεται στην αγορά σε σφαιρικό σχήμα ή σε σχήμα κόλουρου κώνου είτε ως νωπή είτε ως ξηρή. Τα χαρακτηριστικά της νωπής Μυζήθρας είναι το λευκό έως υπόλευκο χρώμα της, η συνεκτική δομή και η μαλακότητα της και η έλλειψη επιδερμίδας και οπών. Παρά το γεγονός ότι κυκλοφορούν πολλές εκδοχές νωπής Μυζήθρας, το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο υγρασίας είναι 70% κατά βάρος και το ελάχιστο επιτρεπόμενο όριο λιποπεριεκτικότητας είναι 50% επί ξηρού. Όσον αφορά το αλάτι, κυμαίνεται από 0,5 έως 1%. Από την άλλη, τα χαρακτηριστικά της ξηρής Μυζήθρας είναι το υπόλευκο χρώμα της, η συνεκτική και σκληρή της μάζα και η έλλειψη επιδερμίδας και οπών. Το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο υγρασίας της ξηρής Μυζήθρας είναι 40% κατά βάρος και το ελάχιστο όριο λιποπεριεκτικότητας είναι 50% επί ξηρού. Στο τυρί αυτό, το αλάτι μπορεί να γίνει αρκετά αισθητό, αφού κάποιες φορές ξεπερνά το 8%. Η νωπή Μυζήθρα χαρακτηρίζεται από αρώματα ψημένου γάλακτος και γλυκιά γεύση, ενώ η ξηρή από πιο πολύπλοκα αρώματα και αλμυρή γεύση.

Ο ορός γάλακτος που προορίζεται για δημιουργία Μυζήθρας, πριν από τη χρήση

του υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρωση, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι εναπομείναντες κόκκοι πήγματος. Αν αυτοί παραμείνουν, τότε σκληραίνουν κατά τη θέρμανση του τυρογάλακτος και υποβαθμίζουν την ποιότητα της. Έπειτα μεταβιβάζεται σε κυκλικούς τυρολέβητες, όπου πραγματοποιείται θέρμανση μέχρις ότου αλλοδομής των πρωτεϊνών και της δημιουργίας πήγματος. Στον ορό μπορεί να γίνει ενίσχυση με προσθήκη προσγάλακτος από πρόβειο, γίδινο ή αγελαδινό γάλα ή μειγμάτων τους, όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος βρίσκεται στους 65-70°C. Στην συνέχεια, αν χρειάζεται, πραγματοποιείται ρύθμιση του pH με προσθήκη από κιτρικό ή γαλακτικό οξύ. Η θέρμανση γίνεται υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τους 80-82 °C, όπου και εμφανίζονται νιφάδες πήγματος. Στο στάδιο αυτό, επιταχύνεται ο ρυθμός θέρμανσης του τυρογάλακτος μέχρι τη θερμοκρασία των 88-92°C , ενώ εν παραλλήλω μειώνεται ο ρυθμός ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης, όπου και εμφανίζεται ένας λεπτός υμένος πήγματος επιφανειακά του τυρογάλακτος. Το πήγμα για 15 με 30 λεπτά παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία. Για τη παραγωγή ξηρής Μυζήθρας εφαρμόζονται οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες και οι μακρύτεροι χρόνοι θέρμανσης, για να «ξεραθεί» το πήγμα. Το πήγμα μεταφέρεται ακολούθως σε τυρόπανα ή ειδικά καλούπια σχήματος κόλουρου κώνου, για πραγματοποίηση στράγγισης. Αυτή, διαρκεί 3 έως 5 ώρες και έπειτα από την πάροδο αυτών το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους έως την επόμενη ημέρα όπου και προωθείται στην αγορά. Μερικές φορές για να επιτευχθεί μεγαλύτερος χρόνος συντήρησης, το τυρί συσκευάζεται υπό κενό. Όταν επρόκειτο για ξηρή Μυζήθρα, μετά τη στράγγιση ακολουθείται αλάτιση με λεπτόκοκκο αλάτι και ξήρανση σε αεριζόμενο χώρο μέχρις ότου να αποκτήσει υγρασία μικρότερη από 40% κατά βάρος. Στο σημείο αυτό της παραμονής, στην επιφάνεια της αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός μικροβίων – κυρίως μυκήτων- τα οποία απομακρύνονται όταν ολοκληρωθεί η ξήρανση. Ακολουθεί καθάρισμα της επιφανείας και συσκευασία ή παραφίνωση των τυροκεφαλών.



Εικόνα 2.1: Νωπή Μυζήθρα
(<https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/216-myzithra.html>)



Εικόνα 2.2: Ξηρή Μυζήθρα
(<https://opmandamos.gr/product/%CE%B8%CF%85%CE%B6%CE%B7%CE%B8%CF%81%CE%B1-%CE%BE%CE%B5%CF%81%CE%B7/>)

2.5 Ξυνομυζήθρα Κρήτης

Για την Ξυνομυζήθρα Κρήτης ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (άρθρο 83, 2011) αναφέρει: Η ονομασία «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί τυρογάλακτος που παράγεται παραδοσιακά στην Κρήτη, από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών. Για τη παραγωγή του τυριού αυτού, θα πρέπει το γάλα που θα χρησιμοποιηθεί να είναι προερχόμενο από τον Νομό Λασιθίου, Ηρακλείου, Ρεθύμνου ή Χανίων της Κρήτης. Επίσης, έχουν θεσπιστεί προϋποθέσεις για το γάλα που θα τυροκομηθεί, όπως:

- α) Να είναι προερχόμενο από φυλές προβάτων και αιγών που έχουν εκτραφεί παραδοσιακά από τη χλωρίδα αυτής της περιοχής και έχουν προσαρμοστεί σε αυτήν.
- β) Οι αμέλξεις από τις οποίες προέχεται το γάλα να έχουν γίνει 10 ημέρες το λιγότερο μετά από τον τοκετό του ζώου.
- γ) Να είναι απαραίτητως ποιοτικό, παστεριωμένο ή πλήρες νωπό.

Είναι απαγορευτική η παραγωγή τυριού «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» από τυρογάλα που έχει προέλθει από διαφορετικό είδος γάλακτος πλην των καθοριζομένων. Στο προς τυροκόμηση για παραγωγή του τυριού «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» γάλα και τυρογάλα δεν επιτρέπεται η διαδικασία της συμπύκνωσης, η προσθήκη συμπυκνωμένου γάλακτος ή σκόνης, η προσθήκη από πρωτεΐνες γάλακτος, καζεϊνικά άλατα, συντηρητικών, χρωστικών και αντιβιοτικών ουσιών. Τέλος, είναι επιτρεπτή η προσθήκη πυτιάς ή άλλων παρεμφερών ενζύμων.

Η τεχνολογία παρασκευής της Ξυνομυζήθρας Κρήτης πρέπει να ακολουθεί τα εξής:

Ο ορός γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί υποβάλλεται σε διαδικασία της διήθησης ή φυγοκέντρωσης έτσι ώστε να γίνει απομάκρυνση πιθανών κόκκων πήγματος και εν συνεχεία ακολουθείται θέρμανση υπό συνεχόμενη ανάδευση μέχρις ότου φτάσει τους 92°C εντός 30 περίπου λεπτών. Συνήθως, γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας έως 15% κατά βάρος πλήρους αίγειου ή πρόβειου γάλακτος (πρόσγαλα), όταν το τυρόγαλα φτάσει τους 68- 70 °C και υπό συνεχή ανάδευση πραγματοποιείται θέρμανση μέχρι τους 80°C έτσι ώστε να εμφανιστούν νιφάδες πήγματος. Γίνεται επιτάχυνση του ρυθμού θέρμανσης μέχρι τους 92°C, ενώ ταυτόχρονα γίνεται επιβράδυνση του ρυθμού ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Κάτω από αυτές τις συνθήκες εμφανίζεται επιφανειακά του θερμού τυρογάλακτος ένα χοντρό στρώμα από πήγμα, όπου μετά από πλήρη ακινησία για 30 λεπτά περίπου μεταφέρεται για στράγγιση σε καλούπια για 3 έως 5 ώρες. Έπειτα από τη στράγγιση, γίνεται προσθήκη στο πήγμα 1,5-2,0% άλατος (βρώσιμο χλωριούχο νάτριο) και προσεκτική ανάμιξη μέχρις ότου δημιουργηθεί ομοιογενής σύσταση. Πραγματοποιείται πιεστική τοποθέτηση σε υφασμάτινους σάκους για μία εβδομάδα περίπου, κατά την οποία γίνεται αύξηση της οξύτητας του και αποκτάται υπόξινη έως οξινη γεύση. Το υπό πίεση πήγμα μεταφέρεται σε θαλάμους θερμοκρασίας μικρότερης των 10°C, όπου και παραμένει για 2 τουλάχιστον μήνες σε βαρέλια έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν κενά στην μάζα του μέχρι να ωριμάσει και να διατεθεί στο εμπόριο. Κατά τη παραμονή τους αυτή, τα βαρέλια είναι τοποθετημένα ανεστραμμένα με χαλαρό το κάλυμμά τους με σκοπό να μπορεί να απομακρυνθεί η τυχόν υγρασία.

Η παραγωγή και η ωρίμανση του τυριού «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» εκτελείται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται στην περιοχή που οριοθετείται από τον ΚΤΠ.

Όσον αφορά τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού «Ξυνομυζήθρα Κρήτης» (ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιογνωστικά κ.λπ.) πρέπει ως προς τη χημική σύσταση να έχει μέγιστο όριο υγρασίας 55% κατά βάρος και ελάχιστο όριο λιποπεριεκτικότητας επί ξηρού 45%, ως προς τη συνεκτικότητα να είναι μαλακό τυρί, ως προς το σχήμα να έχει άμορφη μάζα, ως προς την υφή να παρουσιάζεται μαλακή, κοκκώδης έως αλοιφώδης, ως προς το χρώμα να είναι λευκό ως υπόλευκο και να μην υπάρχει επιδερμίδα και οπές.



Εικόνα 2.3: Ξυνομυζήθρα Κρήτης (<https://www.dairy-services.com/category/blog/cheeseindustry/cheeses/whey-cheeses/%CE%BE%CF%85%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%AE%CE%B8%CF%81%CE%B1-%CE%BA%CF%81%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%82/>)

2.6 Ανθότυρος

Ο Ανθότυρος αποτελεί ένα είδος Μυζήθρας, το οποίο αρχικά παραγόταν αποκλειστικά στην Κρήτη από τυρογάλα κεφαλοτυριού, το οποίο γινόταν μόνο από πρόβειο και αίγαιο γάλα και πάντα πρόσθεταν μικρή ποσότητα πρόβειου ή αίγειου γάλακτος. Λόγω των πλούσιων λιπαρών του τυρογάλακτος του κεφαλοτυριού, ο Ανθότυρος είχε περισσότερα λιπαρά από την Μυζήθρα και συνεπώς πιο ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Πλέον ο Ανθότυρος παράγεται σε διάφορες περιοχές της χώρας και διακρίνεται σε νωπό και ξηρό. Ο νωπός Ανθότυρος είναι μαλακό τυρί τυρογάλακτος, λευκού χρώματος χωρίς επιδερμίδα, με συμπαγή δομή που δεν φέρει οπές στη μάζα του, διακρίνεται από τη γλυκιά γεύση του με νότες αρωματικών χόρτων, έχει μέγιστο όριο υγρασίας 70% κατά βάρος και ελάχιστο όριο λιποπεριεκτικότητας επί ξηρού 65% κατά βάρος. Ο ξηρός Ανθότυρος μπορεί να φέρνει λίγο προς το υπόλευκο όταν σε αυτόν δεν έχει προστεθεί πρόσγαλα. Διαφέρει από το νωπό στην εμφάνιση και στην ένταση της γεύσης. Είναι ελαφρώς αλατισμένος με επιδερμίδα, ωριμασμένος περίπου 1 έως 2 μήνες και πολλές φορές διατηρείται σε ελαιόλαδο για να του προσδοθεί εντονότερο άρωμα και γεύση. Έχει μέγιστο όριο υγρασίας 40% κατά βάρος και ελάχιστο όριο λιποπεριεκτικότητας επί ξηρού 65% κατά βάρος.

Η τεχνολογία παρασκευής του Ανθότυρου δε διαφέρει από αυτής της κοινής Μυζήθρας, εκτός από το είδος του τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται. Αυτό είναι πρόβειο ή αίγαιο που προέρχεται από την παραγωγή σκληρών τυριών και είναι πλούσιο σε λίπος. Δεν γίνεται να παρασκευαστεί Ανθότυρος από ορό γάλακτος μαλακών τυριών, εκτός εάν

αυτό εμπλουτιστεί με λίπος από την προσθήκη πλήρους γάλακτος ή κρέμας. Για τη λήψη καλύτερης ποιότητας Ανθότυρου χρησιμοποιείται συνήθως τυρόγαλο υψηλής λιποπεριεκτικότητας, στο οποίο προστίθεται πλήρες αίγαιο γάλα κατά τη διάρκεια της θέρμανσης.



Εικόνα 2.4: Ξηρός Ανθότυρος (<https://papagiannaki.gr/product/%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%8C%CF%84%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82-%CE%BE%CE%B7%CF%81%CF%8C%CF%82/>)



Εικόνα 2.5: Νωπός Ανθότυρος (<https://www.dairy-services.com/%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%A%CE%B8%CF%81%CE%B1-vs-%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%8C%CF%84%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82-vs-%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%8D%CF%81%CE%B9/>)

2.7 Μανούρι

Το Μανούρι αποτελεί ένα από τα παραδοσιακά ελληνικά τυριά τυρογάλακτος που παράγεται κυρίως στην Κεντρική και Δυτική Μακεδονία και Θεσσαλία. Έχει χαρακτηριστεί από την Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος ως "το πιο εξαιρετικό παραδοσιακό Ελληνικό τυρί τυρογάλακτος", ενώ ταυτόχρονα αποτελεί προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης. Παρασκευάζεται από τυρόγαλα που προέρχεται από αιγοπρόβειο γάλα, η δομή του είναι συμπαγής και η συνεκτικότητα του μαλακή, η υφή κρεμώδης και ένα από τα χαρακτηριστικά του είναι η ευκολία του αθρυμμάτιστου τεμαχισμού του. Δεν παρουσιάζει εξωτερικό περίβλημα/ επιδερμίδα, δεν έχει οπές και το χρώμα του είναι λευκό. Διακρίνεται λόγω της γλυκιάς και ήπιας λιπαρής γεύσης του και από το ελαφρύ άρωμα γάλακτος του.

Για το Μανούρι ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (άρθρο 83, 2011) αναφέρει: Η ονομασία «Μανούρι» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί τυρογάλακτος που παράγεται παραδοσιακά στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στις περιοχές Θεσσαλίας, Κεντρικής και Δυτικής Μακεδονίας, από τυρόγαλα πρόβειου ή γίδινου γάλακτος ή μιγμάτων τους, στο οποίο μπορεί να προστεθεί πρόβειο ή γίδινο γάλα ή κρέμα τους. Αυτά, είναι απαραίτητο να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις όπως:

α) Η περιεκτικότητα του λίπους τυρογάλακτος να είναι το λιγότερο 2,5% κατά βάρος.

β) Στο γάλα από το οποίο έχει προέλθει το τυρόγαλα πρέπει η πήξη του να έχει γίνει εντός 48 ωρών από την άμελξη του ζώου και μέχρι αυτήν να έχει διατηρηθεί κάτω από ελεγχόμενη θερμοκρασία.

γ) Οι φυλές των προβάτων και αιγών από τις οποίες προέρχεται το γάλα για το τυρόγαλα, το «πρόσγαλα» και η κρέμα να έχουν εκτραφεί παραδοσιακά και να είναι προσαρμοσμένες στις περιοχές παραγωγής του «Μανουριού», καθώς επίσης και η διατροφή τους να βασίζεται στη χλωρίδα αυτών. Επιπλέον, το γάλα, «πρόσγαλα» και η κρέμα να είναι από αμέλξεις που έχουν γίνει τουλάχιστον 10 μέρες μετά τον τοκετό του ζώου, να είναι πλήρες και καλής ποιότητας, παστεριωμένο ή νωπό.

Είναι απαγορευτική η παραγωγή «Μανουριού» από διαφορετικό είδος τυρογάλακτος ή «προσγάλακτος» ή κρέμας, πλην των καθοριζομένων. Στο προς τυροκόμηση για παρασκευή «ΜΑΝΟΥΡΙΟΥ» (MANOURI) «τυρόγαλα», «πρόσγαλα» και κρέμα απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων καθώς η προσθήκη χρωστικών συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Η τεχνολογία παρασκευής του Μανουριού πρέπει να ακολουθεί τα εξής:

Ο ορός γάλακτος που προορίζεται για παραγωγή Μανουριού υποβάλλεται σε διαδικασία διήθησης ή φυγοκέντρωσης με σκοπό την απομάκρυνση πιθανών κόκκων από το πήγμα και έπειτα γίνεται εμπλουτισμός από κρέμα πρόβειου ή γίδινου γάλακτος, μέχρι την απόκτηση περιεκτικότητας λίπους 2,5% τουλάχιστον. Υπό συνεχή ανάδευση εκτελείται θέρμανση στους 88-90°C για 40-45 λεπτά. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, όταν φτάσει τους 70-75 °C, γίνεται προσθήκη 1%, περίπου, χλωριούχου νατρίου και πρόβειου ή γίδινου γάλακτος ή κρέμας τους, σε αναλογία μέχρι 25%. Περίπου στους 80°C παρουσιάζονται οι πρώτες νιφάδες λόγω αποικοδόμησης των πρωτεϊνών ορού, όπου σε αυτό το σημείο γίνεται επιβράδυνση του ρυθμού ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Η θερμοκρασία του πήγματος βρίσκεται στους 88-90°C και συνεχίζει για 15 έως 30 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε υφασμάτινους κυλινδρικούς σάκους για να πραγματοποιηθεί η στράγγιση, διάρκειας 4 έως 5 ωρών. Τέλος, το τυρί τοποθετείται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας 4-5°C, όπου και παραμένει έως ότου διατεθεί στην αγορά. Δεν είναι επιτρεπτή η προσθήκη ουσιών όπως χρωστικές, συντηρητικά και αντιβιοτικά

Τα κύρια χαρακτηριστικά του «Μανουριού» (ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιογνωστικά, κ.λπ.) πρέπει να είναι ως προς τη συνεκτικότητα μαλακό τυρί με συμπαγή δομή με μέγιστο όριο υγρασίας 60% και ελάχιστο όριο λιποπεριεκτικότητας επί ξηρού 70%, ως προς το σχήμα να είναι ,συνήθως, κυλινδρικό, το χρώμα να είναι λευκό, να μην έχει οπές

και επιδερμίδα και η γεύση να είναι ευχάριστη και γλυκιά με χαρακτηριστικό άρωμα.



Εικόνα 2.6: Μανούρι
(<https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/215-manoyri.html>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ο ΕΝΙΑΙΟΣ ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΦΕΤ) ΓΙΑ ΤΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

Ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) κάνει ειδικές αναφορές και περιγραφές τόσο για τη σύνθεση και τα γενικά χαρακτηριστικά των ελληνικών τυριών τυρογάλακτος που πρέπει να έχουν, όσο και για την παραγωγή, την ανάλυση και τους ελέγχους κινδύνων κατά την παραγωγική διαδικασία. Επίσης, παραθέτει το ενδεικτικό Σχέδιο HACCP, το οποίο οφείλουν να εφαρμόζουν οι γαλακτοβιομηχανίες που ασχολούνται με τα τυριά τυρογάλακτος.

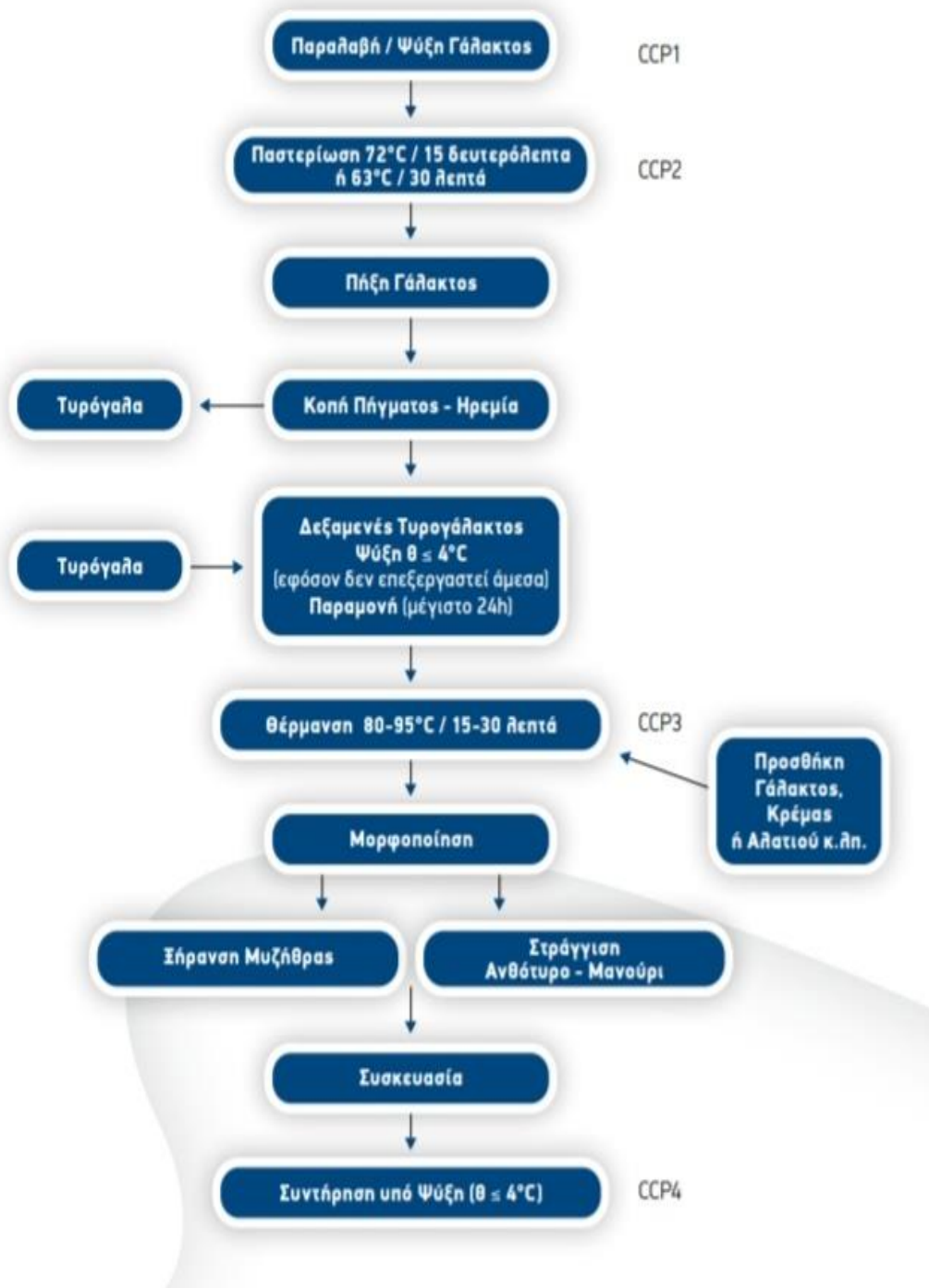
3.1 Περιγραφή τυριών τυρογάλακτος

Στην περιγραφή του ΕΦΕΤ παρουσιάζεται η σύνθεση, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η συσκευασία, οι συνθήκες συντήρησης, διανομής και χρήσης και ο χρόνος ζωής των ελληνικών τυριών τυρογάλακτος.

Πίνακας 3.1: Περιγραφή ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ,2012)

ΟΝΟΜΑ	ΜΥΖΗΘΡΑ (ΞΕΡΗ), ΑΝΘΟΤΥΡΟ, ΜΑΝΟΥΡΙ (Π.Ο.Π.)		
Σύνθεση	Αιγοπρόβειο ή αγελαδινό (μυζήθρα) τυρόγαλα, αιγοπρόβειο ή αγελαδινό γάλα (πρόσαγαλα) ή / και προσθήκη κρέμας, αλάτι		
Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά	ΜΥΖΗΘΡΑ	ΑΝΘΟΤΥΡΟ	ΜΑΝΟΥΡΙ
Ενέργεια	366 Kcal/100gr	191 Kcal/100gr	374 Kcal/100gr
Πρωτεΐνες	20%	11%	10,5%
Λίπος	30%	19,5%	36%
Υγρασία (Μέγιστη)	50%	70%	60%
NaCl (Μέγιστη)	1,2%	1,2%	1,4%
Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	70%	70%	70%
Συσκευασία	Ανάλογα με τον τύπο του τυριού χρησιμοποιείται αεροστεγής συσκευασία των 200 g, 1, 1,5, 2 kg.		
Συνθήκες Συντήρησης	Διατηρείται σε ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ} \text{C}$)		
Συνθήκες Διανομής	Υπό ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ} \text{C}$)		
Συνθήκες Χρήσης	Τα τυριά τυρογάλακτος αποτελούν συνοδευτικό γεύματος και μέρος συνταγής μαγειρικής.		
Χρόνος Ζωής του Προϊόντος	ΜΥΖΗΘΡΑ	ΑΝΘΟΤΥΡΟ	ΜΑΝΟΥΡΙ
	Ένα έτος	30 ημέρες	90 ημέρες

3.2 Διάγραμμα Ροής Παραγωγής Τυριών Τυρογάλακτος



Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα Ροής Παραγωγής Τυριών Τυρογάλακτος από τον Γενικό Οδηγό για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις (ΕΦΕΤ,2012)

3.3 Ανάλυση και έλεγχος κινδύνων κατά την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος

Σε μία γαλακτοκομική μονάδα, η παρασκευή τυριών τυρογάλακτος γίνεται συνήθως παράλληλα με την παρασκευή διαφορετικών ειδών τυριών, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι οι πρακτικές και τα μέτρα πρόληψης των πιθανών κινδύνων για την εξασφάλιση της παραγωγής ασφαλών τυριών που ακολουθούνται, είναι ίδιες με εκείνες που ακολουθούνται μέχρι το στάδιο της πήξεως του γάλακτος και την παραλαβή του τυρογάλακτος για την επακόλουθη επεξεργασία. (ΕΦΕΤ, 2012). Πιο συγκεκριμένα είναι οι εξής:

- Παραλαβή νωπού Γάλακτος (CCP1)

Η παραλαβή του γάλακτος στην εγκατάσταση περιλαμβάνει:

α. Παραλαβή του νωπού γάλακτος (από βυτία ή γαλακτοδοχεία). Εδώ πραγματοποιείται:

➤ Οπτικός έλεγχος του γάλακτος, όπου σε αυτό το στάδιο ο υπεύθυνος εκτελεί έλεγχο της θερμοκρασίας και διακρίβώνει εάν η θερμοκρασία του γάλακτος κατά την παραλαβή είναι μέχρι και 10°C, με την προϋπόθεση ότι αυτό δεν θα υποβληθεί σε επεξεργασία εντός του διαστήματος 2 ωρών από το άρμεγμα. Επίσης, κάνει έλεγχο των οργανοληπτικών ιδιοτήτων (οσμής, χρώματος, πηκτικότητας) και της πιθανής παρουσίας ξένων σωμάτων.

➤ Εργαστηριακός έλεγχος του γάλακτος, όπου ο υπεύθυνος κάνει έλεγχο μέσω υποστήριξης εξωτερικών εργαστηρίων ή με δικά του μέσα:

Για τον συνολικό αριθμό μικροβίων (ΣΑΜ), την πιθανή ύπαρξη αντιβιοτικών ουσιών, την αρίθμηση σωματικών κυττάρων (μόνο στο αγελαδινό γάλα), το είδος (αγελαδινό, γίδινο, πρόβειο), το pH και τη περιεκτικότητα λίπους του γάλακτος.

➤ Τήρηση των κανόνων υγιεινής στο χώρο παραλαβής του γάλακτος, όπου ο υπεύθυνος κάνει έλεγχο καλού καθαρισμού στον εξοπλισμό που μεταφέρεται το γάλα, στα εργαλεία και γενικότερα στους χώρους παραλαβής του γάλακτος.

β. Αποθήκευση / συντήρηση του νωπού γάλακτος ($\theta \leq 6^\circ \text{C}$)

Εφόσον, το νωπό γάλα δεν επεξεργαστεί αμέσως μετά τη διαδικασία του αρμέγματος ή εντός 4 ωρών από την παραλαβή του στους χώρους εγκατάστασης, τότε αποθηκεύεται σε θερμοκρασία $\leq 6^\circ \text{C}$ σε δεξαμενές ψύξεως. Κατά το διάστημα της αποθήκευσης-συντήρησης, συντρέχει κίνδυνος να επιμολυνθεί το γάλα εξαιτίας κακού καθαρισμού των δεξαμενών, εργαλείων και εξοπλισμού, και κίνδυνος να πολλαπλασιαστούν επικίνδυνοι μικροοργανισμοί εξαιτίας μη ορθής θερμοκρασίας συντηρήσεως. Για αυτούς τους λόγους, ο υπεύθυνος κάνει έλεγχο της θερμοκρασίας αποθήκευσης ($\theta \leq 6^\circ \text{C}$), του καλού καθαρισμού και της απολύμανσης των εργαλείων, εξοπλισμού και δεξαμενών (ΕΦΕΤ, 2012).

- Φυγοκέντρηση (CP)

Ο υπεύθυνος, απαιτείται να κάνει καθημερινό έλεγχο στο φυγοκεντρικό φίλτρο-κορυφολόγο ώστε να επιβεβαιώνει την ορθή του λειτουργία. Να πραγματοποιεί έλεγχο του καλού καθαρισμού και της αποβολής ιζημάτων από το φίλτρο. Η συντήρηση και ο καθαρισμός του κορυφολόγου δεν πρέπει να εκτελούνται εντός των χώρων παραγωγής για την αποφυγή επιμολύνσεων. (ΕΦΕΤ, 2012).

- Παστερίωση (CCP2)

Βάσει της ισχύουσας κοινοτικής νομοθεσίας, η παστερίωση του γάλακτος πραγματοποιείται είτε στους 72 °C για 15 δευτερόλεπτα, τουλάχιστον, εντός παστεριωτήρα (συνήθως κλειστός τύπος παστερίωσης) είτε στους 63 °C για 30 λεπτά, τουλάχιστον, (συνήθως ανοιχτός τύπος παστερίωσης) ή σε οποιονδήποτε διαφορετικό συνδυασμό θερμοκρασίας-χρόνου με την προϋπόθεση ότι θα δοθούν τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

Γίνεται έλεγχος μέσω της:

- Συνεχούς παρακολούθησης της θερμοκρασίας και του χρόνου παραμονής σε αυτήν, έτσι ώστε να καταλήξει στην απαιτούμενη-καθορισμένη τιμή..
- Εφαρμογής της δοκιμής αλκαλικής φωσφατάσης, όπου θα πρέπει το αποτέλεσμα αυτής να βγει αρνητικό.

Στην κλειστού τύπου παστερίωση (κλειστοί παστεριωτήρες) πραγματοποιείται:

- Καθημερινός έλεγχος των βαλβίδων αντιστροφής ροής, ώστε να διασφαλιστεί η ορθή λειτουργία της, με σκοπό την επιστροφή του γάλακτος που δεν θερμάνθηκε στον κατάλληλο χρόνο και θερμοκρασία, έτσι ώστε να γίνει σωστή παστερίωση.

- Έλεγχος στις θερμαντικές πλάκες των παστεριωτήρων ώστε να διασφαλιστεί ότι δεν εμφανίζεται διαρροή..

Η διαδικασία της παστερίωσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες διεργασίες του γάλακτος ώστε να διασφαλιστούν ασφαλή γαλακτοκομικά προϊόντα. Σε αυτό το στάδιο γίνεται θανάτωση των επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία βακτηρίων, που πιθανώς βρίσκονται στο γάλα και μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών. Συνήθως, ο εναπομείναντας αριθμός των μικροοργανισμών που επιβίωσαν της παστερίωσης, ελέγχεται μέσω της προσθήκης οξυγαλακτικών καλλιιεργειών.

Όταν δεν πραγματοποιείται η κατάλληλη θερμοκρασία και χρόνος ή ο συνδυασμός αυτών στην παστερίωση, ή όταν αναμιγνύεται νωπό ή ανεπαρκώς παστεριωμένο γάλα με

παστεριωμένο, τότε τα επικίνδυνα βακτήρια επιβιώνουν, αναπτύσσονται και τα τυριά αλλοιώνονται .

Μετά το πέρας της παστερίωσης το γάλα υποβάλλεται σε ψύξη περίπου στους 32°C .

Ο υπεύθυνος, μετά το πέρας της διαδικασίας, ελέγχει τον εξοπλισμό και τις δεξαμενές που έγινε η παστερίωση ώστε να είναι καθαρισμένες και απολυμασμένες, καθώς επίσης κάνει έλεγχο ώστε να διασφαλιστεί ότι δεν έχουν μείνει υπολείμματα από καθαριστικά και απολυμαντικά διότι στην επακόλουθη χρήση του εξοπλισμού το γάλα μπορεί να επιμολυνθεί χημικά. (ΕΦΕΤ, 2012).

- Δεξαμενές αποθήκευσης τυρογάλακτος

Αποτελεί ευθύνη του υπεύθυνου να πραγματοποιεί ελέγχους για τον σωστό καθαρισμό και απολύμανση των δεξαμενών αποθήκευσης του τυρογάλακτος. Εάν, το τυρόγαλα δεν επεξεργαστεί άμεσα, τότε αυτό πρέπει να τοποθετείται σε ψυκτικούς θαλάμους χαμηλής θερμοκρασίας ($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$) με σκοπό την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, η ψύξη δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει τις 24 ώρες. (ΕΦΕΤ, 2012).

- Θέρμανση (80-95°C / 15-20 λεπτά) και προσθήκη προσθέτων (CCP3)

Σε αυτό το σημείο εκτελείται η κύρια επεξεργασία του πήγματος. Γίνεται προσθήκη γάλακτος, κρέμας, αλατιού ή άλλων προσθέτων, αναλόγως με την περίπτωση, αφού η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 60°C. Εξαιτίας της έντονης θερμοκρασίας γίνεται εξυγίανση των παθογόνων βακτηρίων στο πήγμα, δίχως όμως την καταστροφή των θερμοάντοχων σπόρων των σπορογόνων βακτηρίων και των τοξινών αυτών. Για να αποτραπεί η επιμόλυνση του τυρογάλακτος κατά τη διάρκεια της προσθήκης των συστατικών, πρέπει ο υπεύθυνος να πραγματοποιεί έλεγχο της εφαρμογής των ορθών πρακτικών υγιεινής (ΕΦΕΤ, 2012).

- Μορφοποίηση (Στράγγιση - Ξήρανση) - Συσκευασία (CP)

Σε αυτό το στάδιο, ο υπεύθυνος πρέπει να φροντίζει για τον σωστό καθαρισμό στους χώρους εργασίας, στους πάγκους, στα σκεύη και στον ξηραντήρα. Επίσης, πρέπει να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις από το περιβάλλον και η παρουσία εντόμων και τρωκτικών, να ελέγχεται η θερμοκρασία των χώρων και το κατά πόσο κατάλληλα είναι τα υλικά συσκευασίας. Σε αυτό το σημείο τα προϊόντα δεν θα υποβληθούν σε περαιτέρω διαδικασία εξυγίανσης και για αυτόν το λόγο το στάδιο που μορφοποιούνται τα τυριά τυρογάλακτος αποτελεί το πιο κρίσιμο από άποψη επικινδυνότητας και ασφάλειας. (ΕΦΕΤ, 2012).

- Συντήρηση ($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$) (CCP4)

Και πάλι ο υπεύθυνος κάνει έλεγχο της θερμοκρασίας συντηρήσεως (4°C) ώστε να αποτραπεί ο πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών. Κατά το πέρας της διαδικασίας παρασκευής των τυριών τυρογάλακτος, αυτά απαιτείται να μεταφέρονται αμέσως σε θερμοκρασία συντηρήσεως ψύξης και η διακίνησή τους στα σημεία πώλησης να γίνεται σε αντίστοιχες θερμοκρασίες. (ΕΦΕΤ, 2012).

3.4 Σχέδιο HACCP για την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος

Στο Σχέδιο HACCP διευκρινίζονται τα στάδια όπου μπορεί να προκύψει πιθανός κίνδυνος, το είδος του κινδύνου και το είδος του σημείου ελέγχου, τα κρίσιμα όρια, η παρακολούθηση που πρέπει να γίνεται και οι διορθωτικές ενέργειες σε περίπτωση που χρειαστούν.

Πίνακας 3.2: Σχέδιο HACCP για την Παραγωγή Ελληνικών Τυριών Τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ, 2012)

Σχέδιο HACCP για την Παραγωγή Τυριών Τυρογάλακτος								
α/α	ΣΤΑΔΙΟ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΣΗΜΕΙΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	ΚΡΙΣΙΜΟ ΟΡΙΟ	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ			ΔΙΟΡΘΩΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ
					Προληπτικά Μέτρα	Συχνότητα	Υπευθυνότητα	
1	Παραλαβή / αποθήκευση - ψύξη νηπού γάλακτος	Βλέπε σελ. 22	CCP 1			Βλέπε σελ. 27		
2	Φυγοκέντρηση	Ατελής καθαρισμός του φυγοκεντρικού φίλτρου	CP		Έλεγχος καλού καθαρισμού του φυγοκεντρικού φίλτρου	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού
3	Παστερίωση	Επιβίωση μικροβίων λόγω ατελούς παστερίωσης	CCP 2	72°C / 15 δευτερόλεπτα ή 63°C / 30 λεπτά ή οποιοδήποτε άλλο συνδυασμό θερμ./χρόνου για την επίτευξη ισοδύναμου αποτελέσματος	Έλεγχος διαγράμματος παστερίωσης	Συνεχής	Υπεύθυνος παστερίωσης γάλακτος	Επανάληψη παστερίωσης
		Χημική επιμόλυνση από υπολείμματα καθαριστικών και απολυμαντικών	CP		Δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης	Περιοδικά		Μετά το πέρας των διαδικασιών
4	Πλήρωση δεξαμενών τυρογάλακτος	Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό - απολύμανση των μέσων μεταφοράς του και των δεξαμενών υποδοχής	CP		Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού - απολύμανσης	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού
		Πολλαπλασιασμός βακτηρίων από πολύωρη παραμονή σε θερμοκρασία > 4°C (σε περίπτωση μη άμεσης επεξεργασίας)			Τήρηση θερμοκρασίας ψύξης (≤ 4°C) και χρόνου (έως 24 ώρες)	Καθημερινά		
5	Θέρμανση 80-95°C 15 - 20 λεπτά Πρόσθετα	Επιβίωση μικροβίων λόγω ατελούς θερμικής επεξεργασίας	CCP 3	80 - 95°C / 15 - 20 λεπτά	Έλεγχος θερμοκρασίας - χρόνου	Συνεχής	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη διαδικασίας
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό - απολύμανση του βραστήρα			Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού του βραστήρα	Καθημερινά		Επανάληψη καθαρισμού
		Χημική επιμόλυνση από υπολείμματα καθαριστικών και απολυμαντικών			Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού- απολύμανσης	Μετά το πέρας των διαδικασιών		Επανάληψη έκπλυσης του βραστήρα
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ακατάλληλους χειρισμούς του προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής του προσωπικού	Συνεχής		
Αστοχία επιθυμητής δράσης των προσθέτων (καλλιέργεια, πυτιά, κλωριούχο ασβέστιο)	Έλεγχος προσθέτων. Έλεγχος παστερίωσης προσγάλακτος. Αξιολόγηση του προμηθευτή	Κάθε παρτίδα	Ενημέρωση προμηθευτή βοηθητικών υλών					

6	Μορφοποίηση: Ξήρανση - Στράγγισμα	Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό εξοπλισμού	CP		Μακροσκοπικός έλεγχος σκευών και ξηραντήρα	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού	
		Επιμόλυνση από το περιβάλλον, πτώση ξένων σωμάτων, παρουσία εντόμων, τρωκτικών (όταν γίνεται χρήση ημιυπαίθριου ή εξωτερικού χώρου ξήρανσης)			Μέτρα προστασίας από ξένα σώματα, και έντομα, τρωκτικά (ακεραιότητα προστατευτικού πλέγματος - σίτας, ατομική υγιεινή, αποτελεσματική εντομοκτονία και μυοκτονία)	Καθημερινά		Δειγματοληπτικός έλεγχος τελικού προϊόντος (για χαρακτηρισμό μελλοντικών παρτίδων)	
		Αύξηση μικροβιακού φορτίου λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας χώρου			Έλεγχος θερμοκρασίας χώρου	Συνεχής			
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ακατάλληλους χειρισμούς του προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής του προσωπικού	Συνεχής			
7	Συσκευασία	Επιμόλυνση από το περιβάλλον. Πτώση ξένων σωμάτων, εντόμων	CP		Μέτρα προστασίας από ξένα σώματα, αποτελεσματική εντομοκτονία	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Εντείνονται τα μέτρα υγιεινής από το στάδιο 6.	
		Αύξηση μικροβιακού φορτίου λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας χώρου			Έλεγχος θερμοκρασίας χώρου και ολοκλήρωση της διαδικασίας σε σύντομο χρονικό διάστημα	Συνεχής			
		Επιμόλυνση από χειρισμούς του προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής του προσωπικού	Συνεχής			
		Επιμόλυνση από υλικά συσκευασίας			Έλεγχος καταλληλότητας των υλικών συσκευασίας Αξιολόγηση του προμηθευτή	Κάθε παρτίδα		Αλλαγή προμηθευτή υλικών συσκευασίας	
8	Συντήρηση υπό ψύξη	Επιβίωση και ανάπτυξη βακτηρίων λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας θαλάμων συντήρησης	CCP 4	Θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$	Έλεγχος θερμοκρασίας θαλάμων συντήρησης	Συνεχής	Υπεύθυνος παραγωγής	Δειγματοληπτικός έλεγχος του τελικού προϊόντος (βλ. προηγούμενο σφάλμα)	
				Απουσία παθογόνων σε 25 γραμ.	Έλεγχος τελικού προϊόντος	Περιοδικά			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

4.1 Γενικά

Παθογόνα χαρακτηρίζονται τα βακτήρια εκείνα που έχουν τη δυνατότητα, υπό ορισμένες συνθήκες, να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο. Αν αυτά μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω του τροφίμου που θα καταναλώσει, τότε προκαλούν τις λεγόμενες τροφιμογενείς παθήσεις.

Τα παθογόνα βακτήρια ανήκουν σε διάφορα γένη και είναι διάσπαρτα στη φύση. Το γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή τυριών είναι δυνατόν να μολυνθεί με αυτά κατά τη διάρκεια της παραμονής του στο μαστό, καθώς και κατά τη διαδικασία της παραγωγής, μεταφοράς και επεξεργασίας του. Με δεδομένο ότι το γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά παράλληλα και μέρος του ημερήσιου διαιτολογίου των περισσότερων καταναλωτών στις αναπτυγμένες χώρες, είναι προφανές ότι μπορούν να αποτελέσουν μέσο μεταφοράς τους στον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, είναι ιδιαίτερα σημαντικό όσοι ασχολούνται με το γάλα και τα προϊόντα του να γνωρίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς που συνήθως απαντούν σε αυτά, ώστε σε κάθε περίπτωση να μπορούν να πάρουν μέτρα για την πρόληψη και αντιμετώπιση τους.

Σε γενικό πλαίσιο, μπορεί να ειπωθεί ότι τα παθογόνα μικρόβια είναι πιθανόν να φτάσουν στους ανθρώπους κατά πολλούς και διάφορους τρόπους, ένας από αυτούς είναι η κατανάλωση μολυσμένων τυριών. Τα τυριά έχουν ενοχοποιηθεί πολλές φορές για την εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών σε διάφορα μέρη του κόσμου, ως φορείς παθογόνων μικροοργανισμών ή τοξινών. Τα παθογόνα που σχετίζονται σήμερα με αυτές είναι εντελώς διαφορετικά από αυτά που δέσποζαν πριν το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Μέχρι τότε η πλέον συνήθης αιτία ήταν ο τυφοειδής πυρετός, η οστρακιά, η διφθερίτης και η φυματίωση, ενώ σήμερα είναι ο μελιταίος πυρετός, οι σαλμονελάσεις, οι σταφυλοκοκκικές δηλητηριάσεις και η λιστερίωση. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται κυρίως στην εφαρμογή της παστερίωσης στην οποία υποβάλλονται το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Όμως, αλλαγές υπάρχουν και στο είδος των γαλακτοκομικών προϊόντων που ευθύνονται για τις επιδημίες αυτές. Παλαιότερα η κατανάλωση νωπού γάλακτος και κρέμας ήταν συνηθέστερη αιτία των ασθενειών αυτών, ενώ σήμερα ενοχοποιούνται περισσότερο τα παγωτά. Ομοίως, και τα τυριά, ιδιαίτερα αυτά που ωριμάζουν με μύκητες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια

τους ή τυριά που έχουν πολύ υψηλή υγρασία όπως τα τυριά τυρογάλακτος ή τα τυριά κρέμα, αποτελούν συχνά αιτία τροφιμογενών ασθενειών. Εάν τα τυριά παρασκευάζονται από απαστερίωτο γάλα, τότε είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς που προέρχονται από τα ζώα και μπορούν να προκαλέσουν στον άνθρωπο σοβαρή ζωνόσο. Επίσης, μπορούν να επιμολυνθούν με παθογόνα βακτήρια από το περιβάλλον ή τους ανθρώπινους φορείς. Η τύχη των παθογόνων, είτε αυτοί προέρχονται από ζώα είτε είναι αποτέλεσμα επιμολύνσεων, δεν είναι με βεβαιότητα γνωστή.

Τα τυριά μπορούν να επιμολυνθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς είτε στις πρωταρχικές φάσεις της παρασκευής τους είτε αργότερα κατά την επεξεργασία. Ιδιαίτερης σημασίας χρήζει η ποιότητα, το είδος και η θερμική επεξεργασία του γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί. Παραδείγματος χάριν, το αίγαιο γάλα είναι περισσότερο μικροβιολογικά φορτισμένο από ότι το αγελαδινό, ενώ ένα μη παστεριωμένο ή ατελώς παστεριωμένο γάλα περιέχει πληθώρα μικροοργανισμών, εκ των οποίων κάποιοι μπορεί να είναι παθογόνοι ή δυνητικά παθογόνοι. Επιπλέον, κατά τα στάδια επεξεργασίας του τυριού οφείλονται να τηρούνται όλα τα προληπτικά μέτρα που έχουν προκαθοριστεί για αυτά. Συνηθέστερο στάδιο επιμόλυνσης των τυριών κατά την παραγωγή τους αποτελεί το στάδιο του αλατίσματος και του καλουπώματος και για αυτόν το λόγο πρέπει να δίνεται προσοχή σε αυτά. Τέλος, σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζει και ο χρόνος παραμονής από την παρασκευή του τυριού μέχρι τη συσκευασία και εν τέλει τη μεταφορά και διανομή του, σε συνδυασμό πάντα με τις υπόλοιπες συνθήκες περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία.

Τα παθογόνα που παρουσιάζονται συνήθως σε τυριά είναι η *Listeria monocytogenes*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Salmonella spp.*, ο *Clostridium botulinum*, η *Escherichia coli*, η *Yersinia enterocolitica* και η *Brucella spp.* Παρόλα αυτά, στα τυριά τυρογάλακτος τα πιο συνηθισμένα είναι η *Listeria monocytogenes*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Escherichia coli* και η *Salmonella spp.*

Η επιβίωση ή και ανάπτυξη αυτών των παθογόνων στα τυριά εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του παθογόνου δηλαδή η αντοχή στη θερμότητα, τα οξέα και το αλάτι, κλπ., ο αριθμός των μικροβίων που υπάρχει αρχικά στο τυρί και η φυσιολογική του κατάσταση. Επίσης, από το είδος του γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη, την εφαρμογή ή μη της παστερίωσης στην πρώτη ύλη, τα βήματα που θα πραγματοποιηθούν κατά τη διαδικασία παρασκευής όπως οι θερμοκρασίες που θα χρησιμοποιηθούν στην αποθήκευση και την επεξεργασία, η παραγωγή οξέος από

οργανισμούς εκκίνησης, η προσθήκη αλατιού και άλλων αναστολέων, καθώς και από τη διαδικασία σκλήρυνσης και τον τελικό τύπο του τυριού.

Τα τυριά τυρογάλακτος ανήκουν στην κατηγορία των φρέσκων μαλακών τυριών, τα οποία έχουν πολύ υψηλά ποσοστά υγρασίας μέχρι και 70%, υψηλό pH γύρω στο 6-6,5, και χαμηλές, μπορεί και καθόλου, συγκεντρώσεις άλατος. Αυτές οι συνθήκες ευνοούν κατά πολύ την επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών και δημιουργούν πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξή τους. Ένας επιπλέον λόγος που επιτρέπει με ευκολία την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος, είναι η απουσία καλλιέργειας εκκίνησης ή προστατευτικής καλλιέργειας από βακτήρια του γαλακτικού οξέος, εν αντιθέσει με άλλα τυριά, τα οποία αυτά βακτήρια λόγω της ύπαρξής τους σε μεγάλο αριθμό και της επακόλουθης ανάπτυξής τους θα μπορούσαν να δράσουν ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων βακτηρίων.

Είναι γεγονός, ότι τα τυριά τυρογάλακτος επιδέχονται ισχυρή θερμική επεξεργασία του τυρογάλακτος της τάξεως των 85-90 °C και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ασφαλή λόγω αυτού. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα σε τυριά από παστεριωμένο και απαστεριώτο γάλα είτε για τα σκληρά είτε για τα μαλακά τυριά (Dalgaard, 2018). Αυτό, οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι παρόλο που μπορεί να έχει πραγματοποιηθεί μία επαρκής παστερίωση στην πρώτη ύλη, είναι πολύ πιθανό να γίνει επιμόλυνση κατά τα στάδια επεξεργασίας ή μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Κατά συνέπεια, ακόμη και η τόσο ισχυρή θερμική επεξεργασία που υφίστανται τα τυριά τυρογάλακτος δεν μπορεί να τα καταστήσει από μόνη της μικροβιολογικά ασφαλή.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες που αναφέρθηκαν συμβάλλουν στην παρουσία ή/και ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών στα τυριά τυρογάλακτος, κάτι που μπορεί να διαπιστωθεί και από τον μικρό χρόνο ζωής που δίνεται σε αυτά σε σχέση με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η κρισιμότητα της υγιεινής και ασφάλειας των τυριών όσον αφορά το μικροβιολογικό κομμάτι φαίνεται και από τους κανονισμούς και τις οδηγίες που έχουν θεσπιστεί για αυτά ανά κατηγορίες. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα κριτήρια ασφάλειας για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα στα οποία ανήκουν τα τυριά τυρογάλακτος, τα κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια παρασκευής των τυριών αυτών καθώς και υγειονομικοί κανόνες για τη παραγωγή τυριών ανά είδος.

Πίνακας 4.1: Κριτήρια ασφάλειας για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα)

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε

προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς						
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g	EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Όπου οι παράμετροι m, M, n, c:

m : Τιμή κατωφλίου του αριθμού των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό, εάν σε καμία μονάδα δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m.

M = Οριακή τιμή των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται μη ικανοποιητικό, εάν σε μία ή σε περισσότερες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός βακτηρίων είναι τουλάχιστον ίσος προς το M.

n = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα.

c = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας των οποίων ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από m έως M. Το δείγμα θεωρείται ακόμα αποδεκτό, εάν στις άλλες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m.

Πίνακας 4.2: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας από: ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων
		n	c	m	M			
Τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία	<i>E. coli</i>	5	2	100 cfu/g	1.000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή κατά την οποία αναμένεται ο μέγιστος αριθμός <i>E. coli</i>	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
Τυριά από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε							Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών. Εάν βρεθούν τιμές > 105 cfu/g η παρτίδα τυριού πρέπει να ελεγχθεί για

θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης και ωριμασμένα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	100 cfu/g	1.000 cfu/g	EN/ISO 6888-1	παρασκευής, τη στιγμή κατά την οποία αναμένεται ο μέγιστος αριθμός σταφυλόκοκκων	σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες
Μη ωριμασμένα μαλακά τυριά (νωπά τυριά) από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	EN/ISO 6888-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής. Εάν βρεθούν τιμές > 105 cfu/g η παρτίδα τυριού πρέπει να ελεγχθεί για σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες

Όπου οι παράμετροι m, M, n, c:

m : Τιμή κατωφλίου του αριθμού των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό, εάν σε καμία μονάδα δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m.

M = Οριακή τιμή των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται μη ικανοποιητικό, εάν σε μία ή σε περισσότερες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός βακτηρίων είναι τουλάχιστον ίσος προς το M.

n = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα.

c = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας των οποίων ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από m έως M. Το δείγμα θεωρείται ακόμα αποδεκτό, εάν στις άλλες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m.

Πίνακας 4.3: Μικροβιολογικές προδιαγραφές για τα τυριά από: Οδηγία 92/46/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 16ης Ιουνίου 1992 για τη θέσπιση των υγειονομικών κανόνων για την παραγωγή και την εμπορία νωπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα

Είδος μικροβίου	Είδος τυριού	Προδιαγραφές			
		m	M	n	c
<i>Listeria monocytogenes</i>	Σκληρά τυριά		Απουσία σε 1g		
	Όλα τα είδη		Απουσία σε 25g		
Κολοβακτηριοειδή	Μαλακά από παστεριωμένο γάλα	10.000/g	100.000/g	5	2

<i>Escherichia coli</i>	Από απαστερίωτο ή θερμισμένο γάλα	10.000/g	100.000/g	5	2
	Μαλακά από παστεριωμένο γάλα	100/g	1.000/g	5	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Νωπά ή από θερμισμένο γάλα	1.000/g	10.000/g	5	2
	Νωπά από παστεριωμένο γάλα	100/g	1.000/g	5	2
	Νωπά τυριά	10/g	100/g	5	2
<i>Salmonella spp.</i>	Όλα τα είδη		Απουσία σε 1g		

Όπου οι παράμετροι m, M, n, c:

m : Τιμή κατωφλίου του αριθμού των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό, εάν σε καμία μονάδα δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m.

M = Οριακή τιμή των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα θεωρείται μη ικανοποιητικό, εάν σε μία ή σε περισσότερες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός

βακτηρίων είναι τουλάχιστον ίσος προς το M .

n = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα.

c = Αριθμός μονάδων δειγματοληψίας των οποίων ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να κυμαίνεται από m έως M . Το δείγμα θεωρείται ακόμα αποδεκτό, εάν στις άλλες μονάδες δειγματοληψίας ο αριθμός των βακτηρίων δεν υπερβαίνει το m .

4.2 *Listeria Monocytogenes*

4.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Ο Murray, Webb και Swann κάνουν αναφορά πρώτη φορά το 1926 στο βακτήριο *Listeria monocytogenes*, το οποίο αρχικά ονόμασαν *Bacterium monocytogenes* εξαιτίας της μονοκυτταρικής λευκοκυττάρωσης που ανιχνεύθηκε σε μολυσμένα κουνέλια σε εργαστήριο του κτηνοτροφικού ιδρύματος του Τμήματος Παθολογίας στο Κέμπριτζ το 1924. Ο Pirie το 1927 ανακαλύπτει έναν νέο μικροοργανισμό μετά από έρευνα που διεξήγαγε λόγω ασυνήθιστων θανάτων τρωκτικών (γερβίλων) στη Νότια Αφρική, κοντά στο Γιοχάνεσμπουργκ και τον ονόμασε *Listerella hepatolytica* στην μνήμη του ερευνητή-χειρουργού Lord Lister, ο οποίος ανακάλυψε την αντισηψία. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα διαπιστώθηκε από τον Δρ. Leningham στο Ινστιτούτο Lister του Λονδίνου ότι ο *Bacterium monocytogenes* και η *Listerella hepatolytica* αποτελούν τον ίδιο μικροοργανισμό λόγω ίδιας μορφολογίας, φυσιολογίας και βιοχημικών χαρακτηριστικών και ο Murray και Pirie αποφασίζουν να τον ονομάσουν *Listerella monocytogenes*. Παρόλα αυτά, το 1939 η Δικαστική Επιτροπή της Διεθνούς Επιτροπής της Συστηματικής Βακτηριολογίας (International Committee on Systematic Bacteriology) απορρίπτει το όνομα αυτό επειδή είχε ήδη δοθεί σε μια κατηγορία μυξομυκήτων. Εν τέλει, το 1940 ο Pirie δίνει την τελική ονομασία που επικρατεί μέχρι σήμερα, *Listeria monocytogenes*.

Τα τελευταία περίπου 30 χρόνια η *Listeria monocytogenes* αποτελεί έναν από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς εξαιτίας της λιστερίωσης που προκαλεί, η οποία έχει μετατραπεί σε μία σημαντική τροφογενή ασθένεια. Η πρώτη επιβεβαιωμένη διάγνωση σε άνθρωπο ήταν αυτή ενός στρατιώτη που έπασχε από μηνιγγίτιδα στο τέλος του Α' Παγκοσμίου Πολέμου, ενώ ένας ιστορικός έχει αναφέρει ότι η *Listeria monocytogenes* θα μπορούσε να ήταν η αιτία των 17 ανεπιτυχών εγκυμοσύνων της βασίλισσας Άννας (Elliot T. Ryser, 2007).

4.2.2 Το γένος *Listeria* - Ταξινόμηση

Μέχρι και το 1970 η συγγένεια της *Listeria* με άλλα βακτήρια δεν ήταν απολύτως εξακριβωμένη και υπήρχε η θεώρηση ότι ανήκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Βρέθηκε να εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τα βακτήρια *Lactobacillus*,

Brochothrix, *Kurthia*, *Erysipelothrix*, *Renibacterium* και *Caryophanon* (Elliot T. Ryser, 2007). Οι Wilkinson και Jones το 1977 και Feresu και Jones το 1988 καθιστούν σαφές ότι η *Listeria* διαφέρει από άλλα γνωστά είδη, συμπεριλαμβανομένων των *Erysipelothrix* και *Brochothrix thermospecta* και σχετίζεται στενά με τον *Lactobacillus* και τον *Streptococcus*. Εν τέλει, σήμερα η *Listeria monocytogenes* ταξινομείται στο βασίλειο: *Bacteria*, φύλο: *Firmicutes*, κλάση: *Bacilli*, τάξη: *Bacillales*, οικογένεια: *Listeriaceae* και γένος: *Listeria*.

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα από τα δέκα αναγνωρισμένα είδη του γένους *Listeria*. Τα υπόλοιπα είδη είναι τα *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis* και *Listeria fleischmannii*. Από αυτά, παθογόνα είναι η *Listeria monocytogenes*, η οποία είναι παθογόνο του ανθρώπου και η *Listeria ivanovii*, η οποία είναι κυρίως παθογόνο των μηρυκαστικών.

Τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* που απομονώνονται χαρακτηρίζονται σε επιμέρους τύπους του ίδιου είδους, το οποίο μπορεί να γίνει με γενετική αποτύπωση ή οροαποτύπωση. Η *L. monocytogenes*, λοιπόν, ταξινομείται σε 13 ορότυπους με βάση τα σωματικά αντιγόνα O και τα βλεφαριδικά H. Το μεγαλύτερο ποσοστό των θυμάτων της λιστερίωσης οφείλεται στους τρεις από αυτούς τους ορότυπους, δηλαδή τους 1/2a, 1/2b και 4b. Επίσης, ο Paduro και οι συνεργάτες του το 2020 αναφέρουν και τον ορότυπο 1/2c στη λίστα με τις περισσότερες λιστεριώσεις.

4.2.3 Μορφολογία

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα Gram-θετικό βακτήριο σε σχήμα βακίλου (κοντό ραβδί) ή κοκκοειδές, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο, μήκους 1-2 μm και διαμέτρου 0,5μm. Παρουσιάζει κινητικότητα με περιτριχοειδή μαστίγια σε θερμοκρασίες 20°C – 25°C και ακινησία σε θερμοκρασία 37°C.

4.2.4 Καλλιέργεια

Όταν η *Listeria monocytogenes* επωαστεί σε θρεπτικό άγαρ για 24 ώρες, εμφανίζει λείες και στρογγυλεμένες αποικίες διαμέτρου 0,2 έως 0,8 mm, χρώματος μπλε-γκρι ημιδιαφανείς και ελαφρώς ανασηκωμένες με λεπτή υφή επιφάνειας. Αν αυτές οι αποικίες αφεθούν για 5 έως 10 μέρες, τότε διαχωρίζονται πολύ καλά και αποκτούν διάμετρο 5 mm ή και περισσότερο. Όταν καλλιέργειες της *L.monocytogenes* αναπτυχθούν στους 37°C για 18 έως 24 ώρες σε διαυγές μέσο, εμφανίζονται λείες ιριδίζουσες αποικίες χρώματος μπλε-πράσινο, οι οποίες

μπορούν να εξεταστούν με διοφθαλμικό μικροσκόπιο υπό λοξά μεταδιδόμενο φως. Ακόμα και αν ο υπόλοιπος μικροβιακός πληθυσμός είναι αρκετά υψηλός και αυτός της *Listeria* χαμηλός, μπορεί να αναγνωριστεί λόγω αυτών των χαρακτηριστικών. Περιστασιακά έχουν παρατηρηθεί τραχιές αποικίες και διαφορές μεταξύ λειών και τραχιών αποικιών ως προς τη μολυσματικότητα τους.

Η *Listeria* αναπτύσσεται καλά συνήθως στα περισσότερα συχνά χρησιμοποιούμενα βακτηριολογικά μέσα, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξής της αυξάνεται από την παρουσία ζυμωμένης ζάχαρης, ιδιαίτερα της γλυκόζης. Κατά την καλλιέργεια σχηματίζεται χαρακτηριστική οσμή οξέος, η οποία προκύπτει από το σχηματισμό καρβοξυλικών οξέων, υδροξυοξέων και αλκοολών (Daneshvar, et al., 1989).

4.2.5 Μεταβολισμός και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα βακτήριο προαιρετικά αναερόβιο, μικροαερόφιλο, θετικό στην καταλάση και αρνητικό στην οξειδάση. Υπό αερόβιες συνθήκες έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί παρουσία γλυκόζης, μαλτόζης, λακτόζης και ραμνόζης αλλά όχι σακχαρόζης. Όταν χρησιμοποιηθεί γλυκόζη ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε αερόβιες συνθήκες τότε τα κύρια τελικά προϊόντα είναι γαλακτικό άλας, οξικό άλας και ακετοΐνη. Υπό αναερόβιες συνθήκες μόνο οι πεντόζες και οι εξόζες ευνοούν την ανάπτυξή της, ενώ ακετοΐνη δεν μπορεί να παραχθεί. Επιπλέον, το βακτήριο μπορεί να παράξει οξέα από αμυγδαλίνη, φρουκτόζη, μανόζη, κυτταρίνη, σαλικίνη, μαλτόζη, γλυκερόλη, δεξτρίνες, α-μεθυλο-D-γλυκοζίτη, ενώ η παραγωγή οξέος ποικίλει από λακτόζη, γαλακτόζη, μελεζιτόλη, σορβιτόλη, άμυλο, σακχαρόζη και τρεαλόζη. Οξέα δεν παράγονται σχεδόν ποτέ από ατονιτόλη, αραβινόζη, δουλσιτόλη, ερυθριτόλη, γλυκογόνο, ινοσιτόλη, ινουλίνη, μελιβιόζη, ραφινόζη και σορβόζη (Elliot T. Ryser, 2007).

4.2.6 Προέλευση

Περιβάλλον

Η *Listeria monocytogenes* απαντάται παντού στο περιβάλλον καθώς επιβιώνει και αναπτύσσεται στο έδαφος και το νερό. Η αποσύνθεση του φυτικού και περιττωματικού υλικού, το οποίο παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά σε συνδυασμό με το έδαφος που είναι δροσερό και υγρό, συμβάλλουν στην παρουσία και ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Είδη του γένους *Listeria* εντοπίζονται σε πολλά υδατικά περιβάλλοντα, σε επιφανειακά νερά καναλιών και λιμνών, σε αυλάκια αποξηραμένων εκτάσεων, σε

παραποτάμους με γλυκό νερό και σε ακαθαρσίες υπονόμων. Επίσης, υπάρχει στο φρέσκο γρασίδι των βοσκοτόπων και σε ζωοτροφές. *Listeria monocytogenes* έχει απομονωθεί από τα περιττώματα υγιών ζώων και αυτός είναι ένας λόγος που η χρήση περιττωμάτων ως γεωργικά λιπάσματα θεωρείται ότι συμβάλλει στην εξάπλωση της ανθρώπινης λιστερίωσης (Thomas J. Montville, 2010).

Ζώα

Πολλά ζωικά είδη όπως χοίροι, βοοειδή, κοτόπουλα, πρόβατα, κουνέλια, γαλοπούλες και άλλα μπορούν να πάθουν λιστερίωση, η οποία τους προκαλεί μηνιγγιοεγκεφαλίτιδα και αμβλώσεις. Ακόμη και υγιή ζώα, χωρίς κανένα νόσημα, μπορεί να είναι φορείς της *Listeria monocytogenes* και να αποβάλλουν τον οργανισμό μέσω των κοπράνων τους. Αρχικά η λιστερίωση αποτελούσε κτηνιατρική νόσο και για αρκετά χρόνια θεωρείτο ότι η ανθρώπινη λιστερίωση από τον μικροοργανισμό οφειλόταν στην επαφή με μολυσμένα ζώα. Η άποψη αυτή καταρρίφθηκε μετά από την απομόνωση του βακτηρίου από διαφορετικές πηγές όπως το έδαφος, το νερό, τα τρόφιμα και έπειτα από επιδημιολογικά δεδομένα αποφάνθηκε ότι η λιστερίωση είναι τροφική ασθένεια.

Άνθρωποι

Όπως και στα ζώα, έτσι και στους ανθρώπους η είσοδος και η αποβολή του βακτηρίου γίνεται μέσω του γαστρεντερικού συστήματος. Άνθρωποι που έχουν λιστερίωση, αλλά και άνθρωποι που είναι φορείς του οργανισμού χωρίς να έχουν νοσήσει, αποβάλλουν τον οργανισμό μέσω των κοπράνων τους. Η *Listeria monocytogenes* έχει απομονωθεί από το 2 έως 6% των δειγμάτων κοπράνων από υγιείς ανθρώπους, αλλά σε ασθενείς που πάσχουν από λιστερίωση τα νούμερα του βακτηρίου είναι αρκετά υψηλότερα. Έτσι, κάποιος μπορεί να είναι τόσο δέκτης όσο και δότης της *Listeria monocytogenes*. Το βακτήριο εξαπλώνεται από το περιβάλλον στα ζώα και στον άνθρωπο και επιστρέφει πάλι στο περιβάλλον δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο επιμόλυνσης.

Εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων

Πολυάριθμες μικροβιολογικές έρευνες φέρνουν συνεχώς στο προσκήνιο την κρισιμότητα της πρόληψης για την εμφάνιση της *Listeria monocytogenes* εξαιτίας της παρουσίας της σε πολλά περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Το βακτήριο εισέρχεται στα εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων μέσω του εδάφους που προσκολλάται στα παπούτσια, την

ενδυμασία και τα χέρια των εργαζομένων ή σε οχήματα που μεταφέρουν προϊόντα. Τα υψηλά επίπεδα υγρασίας και θρεπτικών ουσιών στα εργοστάσια τροφίμων προωθούν την ανάπτυξη της, η οποία προσκολλάται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε επιφάνειες όπως το ανοξείδωτο ατσάλι, το γυαλί και το λάστιχο. Εντός του περιβάλλοντος επεξεργασίας εντοπίζονται στελέχη της *Listeria* σε υγρές κυρίως περιοχές, όπως σχάρες αποχέτευσης, δάπεδα, απόβλητα, συμπυκνωμένο και στάσιμο νερό, εξοπλισμό επεξεργασίας. Σε εργοστάσια επεξεργασίας προϊόντων κρέατος όπως τα σφαγεία, η *Listeria monocytogenes* μεταφέρεται μέσω κοπρανώδους μόλυνσης κατά τη διάρκεια της σφαγής. Μελέτες που έγιναν σε σφαγεία πουλερικών εντόπισαν το βακτήριο σε σταγόνες νερού που χρησιμοποιείται κατά την αποπτέρωση, σε υπερχειλίσσεις νερού ψύξης και σε ανακυκλούμενο νερό που χρησιμοποιείται για το καθάρισμα. Άλλες αναφορές έγιναν επίσης σε πολλά εργοστάσια παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου ο μικροοργανισμός εισχωρεί από ακατέργαστο γάλα και παραμένει στο περιβάλλον επεξεργασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988).

Η *Listeria monocytogenes* δεν επιβιώνει της θερμικής επεξεργασίας που χρησιμοποιείται για να καταστήσει τα τρόφιμα ασφαλή. Εισέρχεται στα επεξεργασμένα τρόφιμα κυρίως μέσω μόλυνσης μετά τη θερμική επεξεργασία και είναι ιδιαίτερα δύσκολο να εξαφανιστεί καθώς προσκολλάται στις επιφάνειες με τις οποίες έρχονται σε επαφή τα τρόφιμα και δημιουργεί βιοφίλμ σε δύσκολα προσβάσιμες περιοχές. Ακόμη και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση είναι πιθανή η ανάκαμψη του μικροοργανισμού.

Επίσης, το βακτήριο υπάρχει συχνά σε πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στα εργοστάσια επεξεργασίας και έτσι πιθανόν να επαναμολυνθούν με *Listeria* οι εγκαταστάσεις τροφίμων οι οποίες προηγουμένως την είχαν εξαλείψει.

Εν τέλει, αυτό που οξύνει την επιβάρυνση των εργοστασίων με την παρουσία της λιστέρια είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση από την επαφή με ύλες και προϊόντα που περιέχουν το βακτήριο, με μεταφορά από τους εργαζομένους και τα οχήματα, με τον εξοπλισμό επεξεργασίας και γενικά από τις κακές συνθήκες και πρακτικές υγιεινής του εργοστασίου. Όλα αυτά καθιστούν δύσκολη την εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων υγιεινής και απαιτείται συχνός μικροβιολογικός έλεγχος σε διάφορα σημεία των εγκαταστάσεων των εργοστασίων για την επικύρωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης και απουσίας της *Listeria monocytogenes*.

4.2.7 Λιστερίωση

Η λιστερίωση, προκαλείται από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* και αποτελεί μία σημαντική λοίμωξη της κυκλοφορίας του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι μία τροφική ασθένεια, όπου εξαιτίας του μεγάλου χρόνου επώασης της *L.monocytogenes* μέσα στον οργανισμό, η οποία μπορεί να φτάσει και τις 6 εβδομάδες, δημιουργεί αβεβαιότητα για την πηγή της λοίμωξης. Η *Listeria monocytogenes* προκαλεί ασθένεια σε καλά προσδιορισμένες ομάδες ανθρώπων υψηλού κινδύνου. Περίπου το ένα τρίτο των λοιμώξεων από *Listeria* είναι περιγεννητικές και αφορούν έγκυες γυναίκες και τα αγέννητα ή νεογέννητα βρέφη τους και τα άλλα δύο τρίτα εμφανίζονται σε μη έγκυα άτομα όλων των ηλικιών. Οι περισσότερες λοιμώξεις αυτών παρατηρούνται σε άτομα των οποίων η ανοσία έχει μειωθεί λόγω ηλικίας ή σε καταστάσεις όπως ο καρκίνος, μεταμοσχεύσεις οργάνων, χρήση κορτινοστεροειδών, ή AIDS. Οι έγκυες γυναίκες έχουν διαφορετικό ανοσοποιητικό το οποίο μπορεί να συμβάλλει στην ευαισθησία της λοίμωξης, η οποία με τη σειρά της έχει καταστροφικές συνέπειες για το έμβρυο, που οδηγούν σε αποβολή ή γέννηση νεκρού εμβρύου. Σε περιπτώσεις που αφορούν μη έγκυα άτομα, τα δύο τρίτα των ασθενών πάσχουν μόνο από βακτηριαιμία και περίπου το ένα τρίτο από μηνιγγίτιδα με ή χωρίς βακτηριαιμία. Ένα μικρό ποσοστό μπορεί να παρουσιάσει εστιακές βλάβες συμπεριλαμβανομένης της ενδοφλαμίτιδας, της σηπτικής αρθρίτιδας, της οστεομυελίτιδας, της περικαρδίτιδας και της ενδοκαρδίτιδας, χωρίς αναφερόμενη βακτηριαιμία. Παρόλα αυτά, λιστερίωση μπορεί να παρατηρηθεί περιστασιακά και σε ανθρώπους που κατά τα άλλα είναι υγιείς.

Η ανθρώπινη λιστερίωση είναι ελάχιστα κατανοητή. Ορισμένα υγιή άτομα είναι περιττωματικοί φορείς της *L.monocytogenes*, χωρίς να έχουν συμπτώματα και ο κίνδυνος της κλινικής ασθένειας για αυτούς τους φορείς είναι άγνωστος. Αν και οι λιστέριες φαίνεται να στοχεύουν στις έγκυες γυναίκες, υπάρχουν εγκυμονούσες που είναι περιττωματικοί φορείς χωρίς όμως να παρουσιάζουν συμπτώματα και η εγκυμοσύνη ακολουθεί φυσιολογική έκβαση.

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης πιστεύεται ότι οφείλονται σε μόλυνση μέσω της τροφής, υπάρχουν και περιπτώσεις που δεν σχετίζονται με αυτήν. Παραδείγματος χάριν, ορισμένες τοπικές δερματικές βλάβες εμφανίζονται σε άτομα που εργάζονται με μολυσμένα ζώα και σε εργαζομένους σε εργαστήρια που έχουν επιμολυνθεί στα μάτια μετά από χειρισμό καλλιεργειών λιστέριας. Η συχνότητα των αναφερόμενων περιπτώσεων λιστερίωσης ανά έτος κυμαίνεται μεταξύ 1 και 15 ανά εκατομμύριο στον

πληθυσμό (J.M. Farber, 1991). Παρόλα αυτά, λόγω των μικρών ποσοστών αυτών των περιπτώσεων, η λιστερίωση καταγράφεται σαν μία τροφική ασθένεια που προκαλείται κατά κύριο λόγο από τρόφιμα στα οποία ανιχνεύεται λιστέρια.

Σε γενικές γραμμές η λιστερίωση θεωρείται μία σπάνια ασθένεια. Αν και η έκθεση στη *Listeria monocytogenes* είναι συνηθισμένη, η λιστερίωση είναι σπάνια. Δεν έχει καταστεί σαφές αν αυτό το γεγονός οφείλεται στην ανθρώπινη ανθεκτικότητα ή στο ότι τα περισσότερα στελέχη της είναι αδύναμα παθογόνα. Σε ένα έργο ενεργού καταγραφής για τη λιστερίωση στις Η.Π.Α. το 1986 (B G Gellin, 1991), η συχνότητα εμφάνισης λιστερίωσης σε ανηλίκους υπολογίστηκε σε 5 ανά εκατομμύριο και η περίπτωση της περιγεννητικής λιστερίωσης κυμαινόταν μεταξύ 78 και 243 ανά εκατομμύριο. Ο τελευταίος αριθμός αναφέρθηκε για την περιοχή της κομητείας του Λος Άντζελες, όπου η ευαισθητοποίηση πιθανότατα αυξήθηκε από το ξέσπασμα μαλακού τυριού μεξικάνικου τύπου ένα χρόνο περίπου πριν.

Η μολυσματική δόση της *L.monocytogenes* εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως η μολυσματικότητα του μικροβίου και το τρόφιμο καθώς και από την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα που είναι υπεύθυνοι για τα τροφογενή περιστατικά είναι συνήθως >100 CFU/g τροφίμου.

4.2.8 Παθογένεια

Η *Listeria monocytogenes* είναι μοναδική ανάμεσα στα τροφογενή παθογόνα. Είναι ικανή να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί εκτός των ξενιστών και σε πολύ απλά θρεπτικά μέσα. Εν αντιθέσει με άλλα παθογόνα τα οποία εκκρίνουν τοξίνες ή πολλαπλασιάζονται μέσα στο αίμα, εκείνο μπαίνει στα κύτταρα του ξενιστή και πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά και διαδίδεται απευθείας στα διπλανά κύτταρα. Η μεταδοτικότητα από κύτταρο σε κύτταρο μειώνει την έκθεση της *Listeria monocytogenes* σε αντιβιοτικά και αντισώματα που κυκλοφορούν στο αίμα. Αυτή η ικανότητα διάτρησης των μεμβρανών της επιτρέπει να περνάει μέσα στον εγκέφαλο και τον πλακούντα (Thomas J. Montville, 2010). Δεν παρουσιάζονται όλα τα στελέχη της *L.monocytogenes* παθογόνα, αλλά όλα τα παθογόνα στελέχη είναι αιμολυτικά και η παραγωγή αιμολυσίνης είναι μία από τις ιδιότητες που σχετίζονται με την παθογένεια, καθώς όλα τα μη αιμολυτικά στελέχη είναι μη παθογόνα. Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την παθογένεια είναι η παραγωγή πρωτεΐνης 60.000 Da και μιας φωσφολιπάσης (J.M. Farber, 1991).

Στον άνθρωπο, η *L.monocytogenes* αφού εισχωρήσει μέσω της στοματικής οδού,

περνά το εντερικό τοίχωμα, εισάγεται στους μακροφάγους και εκεί διπλασιάζεται. Έπειτα, η μεταφορά των βακτηρίων γίνεται μέσω του αίματος στους λεμφικούς αδένες. Οι περισσότερες λιστέρειες θανατώνονται όταν φτάσουν στο συκώτι και την σπλήνα, ενώ όσες επιβιώσουν ταξιδεύουν μέσω του αίματος στον εγκέφαλο ή τον πλακούντα.

Για την μελέτη της παθογένειας της *Listeria monocytogenes* υπάρχουν αρκετά τεστ, όπως δοκιμές ιστοκαλλιέργειας, τεστ με χρήση γονιμοποιημένου αυγού κότας και τεστ που χρησιμοποιούνται πειραματόζωα και κυρίως ποντίκια. Παρόλα αυτά, ακόμη και ο εμβολιασμός του βακτηρίου σε ζώα, μπορεί να μην αποτελεί αξιόπιστη ένδειξη της ικανότητας ενός στελέχους που μπορεί να επιμολύνει έναν ευαίσθητο άνθρωπο-ξενιστή.

4.2.9 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes* σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες

Η ανάπτυξη αλλά και η επιβίωση της *Listeria monocytogenes*, όπως και κάθε άλλου βακτηρίου, σε ένα τρόφιμο εξαρτάται από τους φυσικούς-περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες που επιδρούν σε αυτό, καθώς και η αλληλεπίδραση αυτών μεταξύ τους. Έτσι, για να μπορέσει να αποφευχθεί ή να διαχειριστεί η μόλυνση της στα τρόφιμα επιβάλλεται η σωστή και πλήρης γνώση και κατανόηση των παραγόντων που είτε την ευνοούν είτε δυσχεραίνουν την ανάπτυξή της στο περιβάλλον επεξεργασίας και κατ'επέκταση στα τρόφιμα.

Η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε ένα τρόφιμο εξαρτάται τόσο από τα ενδογενή χαρακτηριστικά του τροφίμου όπως η οξύτητα – pH, η ενεργότητα ύδατος a_w και η αλατότητα, όσο και από τους εξωγενείς παράγοντες που αφορούν το περιβάλλον στο οποίο επεξεργάζεται, αποθηκεύεται και διανέμεται όπως, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία του.

4.2.9.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί ψυχρότροφο βακτήριο το οποίο αναπτύσσεται καλά σε θερμοκρασίες από 0 έως 45°C αλλά μπορεί να αναπτυχθεί και σε χαμηλότερες με πιο αργό ρυθμό. Ιδανικό εύρος θερμοκρασιών βάσει ερευνών είναι από 30 έως 37°C (Martin & Fisher, 1999). Η ψύξη δεν μειώνει σημαντικά το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού και αυτός είναι και ένας λόγος που την καθιστά αρκετά επικίνδυνη. Κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε κατάψυξη, η επιβίωση και η πρόκληση βλαβών εξαρτώνται από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης. Στους -1,5°C έχει παρατηρηθεί η ελάχιστη θερμοκρασία

ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* εν αντιθέσει με άλλα είδη της *Listeria*. Η θανάτωση του μικροοργανισμού επέρχεται σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη και ο ρυθμός ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού δεν εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία στην οποία θα βρεθεί, αλλά και από το θρεπτικό μέσο, δηλαδή το υπόστρωμα καθώς και από το pH. Είναι ξεκάθαρο πως όσο ελαττώνεται η θερμοκρασία ενός τροφίμου, τόσο επιβραδύνεται η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού αλλά σε αυτές τις χαμηλές θερμοκρασίες πρέπει να δίνεται βάση στο pH και στην αλληλεπίδραση αυτών των συνθηκών.

Ένα άλλο κρίσιμο χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού αυτού είναι η προσαρμοστικότητα στην μεταβλητότητα της θερμοκρασίας και στο ιστορικό συνθηκών αυτής κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Είναι γεγονός, πως οι μικροοργανισμοί περνάνε από διάφορες θερμοκρασίες όταν βρεθούν σε ένα περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και αυτό φέρει συνέπειες στη φάση και τον χρόνο προσαρμογής τους. Η ικανότητα της *Listeria monocytogenes* να προσαρμόζει την μεμβράνη της όταν εκτεθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες την καθιστά επικίνδυνη ακόμα και σε τρόφιμα τα οποία συντηρούνται σε τέτοιες θερμοκρασίες. Εφόσον το βακτήριο έχει αναπτυχθεί και προσαρμοστεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και έτσι αναπτύσσεται ουσιαστικά ο μηχανισμός αντίστασης του, μειώνεται η φάση προσαρμογής του μέσα στο υπόστρωμα-τρόφιμο. Έτσι, η ανάπτυξη του βακτηρίου σε ψυχρά τρόφιμα γίνεται γρηγορότερη, ελαττώνοντας το χρόνο ζωής και την ασφάλεια του τροφίμου. Εν αντιθέσει, αν το βακτήριο έχει αναπτυχθεί σε κανονικές συνθήκες και επιμολύνει το ίδιο ψυχρό τρόφιμο, τότε η φάση προσαρμογής του αυξάνεται και έτσι επιβραδύνεται η ανάπτυξη εντός του τροφίμου.

Ιδιαίτερης προσοχής χρήζει η θερμοανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes*, η οποία μελετήθηκε αρκετά έπειτα από ένα περιστατικό ομαδικής λιστερίωσης το 1983 στη Μασαχουσέτη από κατανάλωση παστεριωμένου γάλακτος. Μελέτες σχετικά με την αδρανοποίηση του βακτηρίου στο γάλα μέσω θέρμανσης έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με τη θερμοανθεκτικότητα του και την ικανότητα του να επιβιώνει μετά την παστερίωση (high temperature, short time, HTST, 71,7°C για 15 sec) (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών μεθόδων ελέγχου, στη χρήση επιπέδων *Listeria* πολύ υψηλότερων από αυτά που συνήθως βρίσκονται στο γάλα, στην πιθανή προστασία των κυττάρων που βρίσκονται μέσα σε φαγοκύτταρα και σε άλλους παράγοντες. Επίσης, τα κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα αν η *Listeria monocytogenes* βρεθεί σε μη θανατηφόρες για αυτήν θερμοκρασίες πριν υποβληθεί στην

τελική θερμοκρασία της παστερίωσης. Παρόλα αυτά, η παστερίωση ακόμα θεωρείται ότι είναι μία επαρκής επεξεργασία εξυγίανσης και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δηλώνει, "Η παστερίωση είναι μια ασφαλής διαδικασία, η οποία μειώνει τον αριθμό της *Listeria monocytogenes* στο ακατέργαστο γάλα σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην αποτελεί έναν υπολογίσιμο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία". Ωστόσο, αφού το βακτήριο αναπτύσσεται καλά μέσα στο παστεριωμένο γάλα, η επιμόλυνση μετά την επεξεργασία (μόλυνση του τροφίμου από βακτήρια του περιβάλλοντος μετά την υποβολή του τροφίμου σε επεξεργασία) αποτελεί την κύρια ανησυχία. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των βακτηρίων μπορεί να αυξηθεί 10 φορές μέσα σε 7 ημέρες στους 4°C. Οι λιστέρειες αναπτύσσονται πιο γρήγορα στο παστεριωμένο γάλα σε σχέση με το ακατέργαστο στους 7 °C. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί σε γάλα που επιμολύνθηκε μετά από παστερίωση και στη συνέχεια ψύχθηκε μπορεί να φτάσουν σε πολύ υψηλά επίπεδα μετά από μια εβδομάδα. Η κακή θερμοκρασιακή μεταχείριση μπορεί στη συνέχεια να συμβάλλει στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* (Thomas J. Montville, 2010).

Από όσα αναφέρθηκαν γίνεται κατανοητό πως η ανάπτυξη και επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε ένα τυρί τυρογάλακτος, αλλά και γενικά σε ένα τρόφιμο, όσον αφορά την επίδραση της από τη θερμοκρασία, δεν είναι μονόπλευρη. Συνδυαστικοί παράγοντες όπως η πρώτη ύλη παρασκευής και η μέθοδος στην οποία έχει υποβληθεί, το pH του και οι συνθήκες του μικροοργανισμού

Πέραν της προσαρμοστικότητας της *Listeria* σε χαμηλές θερμοκρασίες, της θερμοανθεκτικότητας της και της επεξεργασίας που έχει υποστεί το υπόστρωμα-τρόφιμο στο οποίο εμπλέκεται, μία άλλη παράμετρος που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της όσον αφορά τη θερμοκρασία, είναι η θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύεται το τρόφιμο. Αναφορικά με τα τρόφιμα που αποθηκεύονται σε ψύξη, όπως τα τυριά τυρογάλακτος, συνήθης θερμοκρασία είναι αυτή των 4-5°C. Παρόλα αυτά, κατά τα στάδια μεταφοράς και διανομής τους υπάρχουν θερμοκρασιακές διακυμάνσεις οι οποίες αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης και ρυθμού του παθογόνου μικροοργανισμού και κατ'επέκταση μειώνουν την ασφάλεια και ποιότητα του. Σε έρευνα που διεξήγαγε ο Παπαγεωργίου, Μπόρη και Μάντης το 1995 για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε Μυζήθρα, Ανθότυρο και Μανούρι σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης 5, 12 και 22°C που εμβολιάστηκαν με *Listeria monocytogenes* Scott ή California, παραλήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα: οι χρόνοι δημιουργίας της *Listeria* στους 5°C κυμαινόταν μεταξύ 16,16 και 20,16 ωρών και ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι από εκείνους που παρατηρήθηκαν στους 12°C,

οι οποίοι κυμαίνονταν μεταξύ 5,07 και 5,81 ωρών. Οι χρόνοι παραγωγής στους 22°C κυμαίνονταν μεταξύ 1,68 και 2,70 ωρών. Ο χρόνος παραγωγής του *Listeria monocytogenes* Scott στους 5°C στον Ανθότυρο(20,16) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από εκείνους του ίδιου στελέχους στους 5°C στη Μυζήθρα (16,16) και στο Μανούρι (17,81). Επίσης, ο χρόνος δημιουργίας του *Listeria monocytogenes* California στους 22°C στη Μυζήθρα (2,7) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν του στελέχους Scott (1,93). Οι μέγιστοι πληθυσμοί *Listeria monocytogenes* επιτεύχθηκαν μετά από 24 έως 30 ημέρες στους 5°C, μετά από 5 έως 12 ημέρες στους 12°C και μετά από 56 έως 72 ώρες στους 22°C και κυμαίνονταν από 6,92 έως 8,81 log CFU/g. Οι μέγιστοι πληθυσμοί ήταν σημαντικά χαμηλότεροι στο τυρί Μυζήθρα στους 5 και 12°C από τους μέγιστους πληθυσμούς στο τυρί Ανθότυρος και Μανούρι στις ίδιες θερμοκρασίες ανεξάρτητα από το ενοφθαλμισμένο στέλεχος (Demetriou, 1996).

4.2.9.2 Επίδραση της οξύτητας-pH

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και επιβίωση ενός μικροοργανισμού αποτελεί η οξύτητα/ pH του υποστρώματος στο οποίο θα βρεθεί. Η *Listeria monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να επιζήσει και να αυξηθεί σε τιμές pH που άλλα βακτήρια δεν μπορούν και ειδικότερα οι μικρές τιμές στις οποίες επιβιώνει έχουν αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών από διάφορους ερευνητές.

Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα σε ουδέτερες ως αλκαλικές τιμές pH 7.0-7.5, ενώ σε τιμές κάτω από 4,3 τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν αλλά όχι να αναπτυχθούν. Το ελάχιστο pH που απαιτεί η ανάπτυξη της *Listeria* επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες όπως, τον τύπο του στελέχους του μικροοργανισμού, τη θερμοκρασία επώασης, την ενεργότητα ύδατος και την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος, την παρουσία και τη συγκέντρωση αλάτων ή άλλων αντιμικροβιακών ουσιών και την παρουσία οξέων που μπορεί να προστεθούν στο υπόστρωμα (Jay, 2000). Γενικά, τα οργανικά οξέα, όπως το οξικό, κιτρικό και γαλακτικό σε ποσοστό 0,1% μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Παρόλα αυτά, το ελάχιστο pH για την αύξηση του μικροοργανισμού εξαρτάται από τον τύπο του οξέος και τον βαθμό διάσπασής του. Εάν το βακτήριο βρεθεί σε ένα συγκεκριμένο pH, τότε η επίδραση του μηλικού, κιτρικού και γαλακτικού οξέος είναι λιγότερο επιβλαβής για αυτόν από ότι το οξικό, ενώ λιγότερο δραστικό από όλα είναι το υδροχλωρικό οξύ (αύξουσα σειρά δραστικότητας επί του μικροοργανισμού: υδροχλωρικό οξύ < μηλικό οξύ < κιτρικό οξύ < γαλακτικό οξύ <

οξικό οξύ) (Thomas J. Montville, 2010).

Έπειτα από αρκετές έρευνες αποφάνθηκε ότι η *L. monocytogenes* και γενικά τα περισσότερα είδη της *Listeria*, μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH πολύ κάτω από 5.0, υπό την προϋπόθεση ότι οι μικροοργανισμοί επωάζονται σε σχεδόν βέλτιστες θερμοκρασίες και ότι δίνονται σε αυτούς επαρκής χρόνος για να ξεπεραστεί η φάση υστέρησης. Είναι γεγονός όμως, πως η *Listeria* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε ακραίες συνθήκες και να αναπτύσσει την αντοχή του. Έτσι, η προσαρμογή σε ακραίες όξινες συνθήκες μπορεί να προκαλέσει ενίσχυση της αντοχής σε όξινα περιβάλλοντα. Μετά από μελέτη του Lou και Yousef το 1999, βρέθηκε ότι η προεπάση της *L. monocytogenes* σε pH 5, pH 4,5 ή σε pH 5 ακολουθούμενη από επάση σε pH 4,5 αύξησε την αντοχή του βακτηρίου σε θανατηφόρες όξινες συνθήκες (pH 3,5).

Επιπλέον, ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στην επιβίωση του μικροοργανισμού σε όξινες συνθήκες, είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης του τροφίμου. Σε θερμοκρασίες ψύξης η *Listeria monocytogenes* αντέχει περισσότερο τα όξινα περιβάλλοντα από ότι σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, όταν το μέσο έχει υποστεί οξίνιση με κιτρικό οξύ (Yuqian Lou, 1999). Το 1988 ο Ryser και Marth εξέτασαν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε διαφορετικές τιμές pH στον ορό γάλακτος που συλλέχθηκε κατά την παρασκευή του τυριού Camembert και κατέληξαν πως ο οργανισμός ανέπτυξε μικρότερους χρόνους παραγωγής και υψηλότερους τελικούς πληθυσμούς στους ορούς γάλακτος με υψηλότερο pH (6,2 και 6,8) από ότι σε χαμηλότερο (5,6), όπως και αναμενόταν. Επομένως, τα τυριά τυρογάλακτος τα οποία έχουν pH περίπου κοντά στο 6 δίνουν την δυνατότητα στην *Listeria* να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε λίγο χρόνο και σε μεγάλο βαθμό.

4.2.9.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού a_w

Εν αντιθέσει με τους περισσότερους παθογόνους μικροοργανισμούς, η *Listeria monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί σε χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος, γεγονός το οποίο την καθιστά δεύτερο παθογόνο βακτήριο μετά τον *Staphylococcus* που μπορεί να το κάνει αυτό (Yuqian Lou, 1999). Αναπτύσσεται βέλτιστα σε τιμές ενεργότητας ύδατος πλησίον του 0,97, ενώ για τα περισσότερα στελέχη, η ελάχιστη τιμή a_w για την ανάπτυξη είναι 0,93. Παρόλα αυτά ορισμένα στελέχη αναπτύσσονται σε τιμές a_w μέχρι και 0,90. Επίσης, μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους σε χαμηλές a_w μέχρι και 0,83. Τέλος, ένα χαρακτηριστικό το οποίο δυσχεραίνει την επεξεργασία των τροφίμων, είναι ότι η θερμοανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes* αυξάνεται καθώς η a_w του τροφίμου

στο οποίο βρίσκεται μειώνεται. Έτσι, ο συνδυασμός θερμικής επεξεργασίας και χαμηλής aw μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για τη διατήρηση της ασφάλειας του τροφίμου.

Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τη σχέση μεταξύ aw και ανάπτυξης ή επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο Ryser και Marth χρησιμοποίησαν παστεριωμένο πλήρες γάλα που εμβολίασαν με 500 cfu/ml *Listeria monocytogenes* για την παρασκευή τυριού Cheddar (pH 5,0-5,1) με τιμές aw μεταξύ 0,972 και 0,979. Ο οργανισμός επέζησε για 224 ημέρες στους 13°C και περισσότερες από 434 στους 6°C. Η *Listeria* φέρεται να αναπτύσσεται καλά εντός αυτού του εύρους aw, αλλά λόγω της συνδυασμένης επίδρασης του χαμηλού pH και της χαμηλής θερμοκρασίας, η ανάπτυξη των λιστεριών καθυστέρησε αρκετά. Σε τυρί Camembert με τιμές aw από 0,959 έως 0,984 που επιτρέπεται η ανάπτυξη της *L.monocytogenes*, οι πληθυσμοί παρέμειναν σταθεροί ή μειώθηκαν στο τυρί σε Ph 4,6 έως 5,5 κατά τις πρώτες 20-30 ημέρες αποθήκευσης. Η έναρξη της ταχείας ανάπτυξης του βακτηρίου σε pH μεταξύ 5,5 και 6,0 δείχνει ότι το pH είναι πρωταρχικά υπεύθυνο για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, έναντι του aw (Elliot T. Ryser, 2007). Όσον αφορά τα τυριά τυρογάλακτος, στα οποία η ενεργότητα ύδατος είναι αρκετά μεγάλη σε συνδυασμό με το υψηλό pH, η *Listeria monocytogenes* αλλά και πολλά άλλα βακτήρια βρίσκουν ευνοϊκό το έδαφος για την ανάπτυξή τους.

4.2.9.4 Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων

Το αλάτι (χλωριούχο νάτριο ή NaCl) αποτελεί σημαντικό συστατικό για τον καθορισμό της ενεργότητας του νερού καθώς επίσης επιδρά στην μικροβιακή ανάπτυξη και επιβίωση βακτηρίων σε πολλά τρόφιμα. Η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται άριστα όταν βρεθεί σε μέτριες συγκεντρώσεις αλάτων (~6,5%), αλλά μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη ακόμα και υπό την παρουσία 10 έως 12 % χλωριούχου νατρίου. Μάλιστα, μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων, χωρίς όμως να αναπτυχθεί. Έχει βρεθεί ότι η *Listeria monocytogenes* έχει επιβιώσει σε συγκεντρώσεις έως και 30,5% NaCl για 100 ημέρες στους 4°C. Επίσης, πρέπει να δίνεται προσοχή στον συνδυασμό της αλατότητας σε σχέση με τη θερμοκρασία αποθήκευσης και το pH του τροφίμου. Ο συνδυασμός υψηλής αλατότητας και χαμηλής θερμοκρασίας, αυξάνει την επιβίωση της *Listeria* (J.A.Hudson, 1993) . Ο Lang και οι συνεργάτες του, διαπίστωσαν έπειτα από διάφορους συνδυασμούς αλάτων και pH, ότι η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 6% NaCl και pH 5 ήταν πιο αποτελεσματικός στην

αναστολή ανάπτυξης της *Listeria* (Elliot T. Ryser, 2007). Επομένως, η συγκέντρωση αλάτων δεν αποτελεί ουσιαστικό ανταγωνιστή της *Listeria monocytogenes* για την ανάπτυξή της, πόσο μάλλον για τα τυριά τυρογάλακτος τα περισσότερα από τα οποία δεν έχουν καν υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου.

4.2.9.5 Επίδραση αερίων

Η *Listeria monocytogenes* ως αερόβιος ή προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός αναπτύσσεται βέλτιστα κάτω από τον ατμοσφαιρικό αέρα και δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη συσκευασία υπό κενό. Επίσης, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα τρόφιμα αποκάλυψαν ότι οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες δεν παρέχουν ουσιαστική προστασία έναντι της ανάπτυξής της. Παρόλα αυτά, ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου διαφοροποιείται αναλόγως με τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό και εξωτερικό του περιβάλλον.

Κατά γενικό κανόνα, οι συσκευασίες τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση που έχουν σύσταση στο εσωτερικό τους 70% CO₂ και 30% O₂, θεωρούνται αποτελεσματικές για την αδρανοποίηση ή επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Όσον αφορά την *L. monocytogenes*, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα για την αναστολή της ανάπτυξής της. Ωστόσο, θεωρείται αποδεκτό ότι ατμόσφαιρες με υψηλή συγκέντρωση CO₂ (κοντά στο 80%) θα μπορούσαν να αναστείλουν ελάχιστα την ανάπτυξή της (Yuqian Lou, 1999). Αυτό, μπορεί να ενισχυθεί με τη κατάλληλη εφαρμογή θερμοκρασίες επί του τροφίμου. Η θερμοκρασία επηρεάζει την επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και πιο συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή δράση του CO₂ αυξάνεται ελαττούμενης της θερμοκρασίας συντήρησης. Είναι πολύ μεγαλύτερη σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C από ότι στους 15°C ή υψηλότερα. Το γεγονός αυτό, οφείλεται κυρίως στην αύξηση της διαλυτότητας του CO₂ στο τρόφιμο με τη μείωση της θερμοκρασίας. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στο CO₂ από ότι τα θετικά. Αυτό, φέρνει στο στόχαστρο την *Listeria monocytogenes*, η οποία ως προαιρετικά αναερόβιο, θετικό κατά Gram βακτήριο που μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, μπορεί να αναπτυχθεί εν τέλει και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις CO₂. Πιο πρόσφατες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι αν και η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε περιβάλλον 100% CO₂ αναστέλλεται, εντούτοις δεν επηρεάζεται από το CO₂ αν σε μίγματα CO₂/O₂ υπάρχει τουλάχιστον 5% O₂. Προτεινόμενο τυπικό μίγμα αερίων για συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα για μαλακά τυριά κατά τον Blakistone (1998), είναι 70% N₂

και 30% CO₂.

4.2.9.6 Επίδραση ανταγωνιστικής χλωρίδας

Η επίδραση της ανταγωνιστικής χλωρίδας έναντι ενός μικροοργανισμού εξαρτάται από τον ίδιο τον μικροοργανισμό και το πόσο ανθεκτικός είναι σε αυτήν, από το τρόφιμο στο οποίο θα παρουσιαστούν, καθώς και από το είδος και τον συνδυασμό των μικροοργανισμών που στοχεύουν στην ανταγωνιστικότητα του βακτηρίου-στόχου. Η σημαντικότερη και συνηθέστερη ανταγωνιστική χλωρίδα που συναντάται στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αυτή των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Σε αυτό το σημείο, κρίνεται απαραίτητη η παροχή γενικών πληροφοριών που αφορούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έτσι ώστε να γίνει πιο κατανοητή επακόλουθη μελέτη. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (*LAB*) είναι αναερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι μικροοργανισμοί, θετικοί κατά Gram, με μορφολογία είτε κοκκίομορφη είτε ραβδόμορφη και στερούνται κυτοχρωμάτων. Κατά κύριο λόγο, είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-40°C, αλλά κάποιοι μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες κάτω των 5°C ή σε υψηλότερες ως 45°C. Βέλτιστο εύρος pH των περισσότερων οξυγαλακτικών είναι 5.0 έως 7.0, όμως ορισμένα παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε οξέα και σε μειωμένο pH, καθώς έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν σε ακραίες τιμές όπως 3.2 ή πολύ υψηλές αλκαλικές τιμές όπως 9.6. Ωστόσο, όταν ένα τρόφιμο έχει πιο αλκαλικές τιμές, ο ρυθμός ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων μειώνεται (Tappock, 1999). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αρνητικά στο τεστ καταλάσης και μπορούν να μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες προς παραγωγή διαφόρων οξέων και κυρίως γαλακτικού, κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Το γαλακτικό οξύ αποτελεί το κύριο μεταβολικό προϊόν που καθορίζει το μεταβολικό μονοπάτι. Εάν κατά τη ζύμωση παράγεται αποκλειστικά γαλακτικό οξύ, τότε η ζύμωση χαρακτηρίζεται ως ομοιογαλακτική, ενώ σε κάθε άλλη περίπτωση χαρακτηρίζεται ετερογαλακτική. Εντοπίζονται στην εντερική χλωρίδα ανθρώπων και ζώων, στην στοματική κοιλότητα, στον γυναικείο κόλπο, σε φυτά και σε ζυμούμενα τρόφιμα όπως, σε προϊόντα κρέατος, γαλακτοκομικά, λαχανικά, προϊόντα αρτοποιίας και ποτά. Τα κυριότερα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella*. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την πρωταρχική ομάδα μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις τροφίμων εδώ και

πάρα πολλά χρόνια, καθώς υπάρχουν σε πληθώρα στο περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, έχουν χαρακτηριστεί ως “γενικώς αναγνωρισμένα ως ασφαλή” ή GRAS (Generally Recognized As Safe) και βάσει μελετών έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Για αυτούς τους λόγους, η χρήση τους σε τρόφιμα θεωρείται ασφαλής, αν και υπάρχουν ορισμένα είδη οξυγαλακτικών τα οποία μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις στον άνθρωπο λόγω της δυνητικότητας τους ως παθογόνα βακτήρια. Παρόλα αυτά, τα περιστατικά αυτά είναι αρκετά περιορισμένα και δεν λαμβάνονται τόσο υπόψιν. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση τροφίμων καθώς παρέχουν τη δυνατότητα επιμήκυνσης του χρόνου ζωής τους, καθώς διατηρούν τις θρεπτικές ιδιότητες και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αλλοιγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Πέραν, λοιπόν, της φυσικής τους ύπαρξης στα τρόφιμα και της χρησιμοποίησής τους ως καλλιέργειες εκκίνησης ή εναρκτήριες για την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να προστεθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες. Έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν αντιμικροβιακή δράση που οφείλεται στον ανταγωνισμό τους για τις θρεπτικές ουσίες του υποστρώματος έναντι άλλων βακτηρίων, καθώς και στην παραγωγή ουσιών όπως, οργανικά οξέα, υπεροξειδίου του υδρογόνου και βακτηριοσίνες που λειτουργούν ως αναστολείς. Το γαλακτικό και οξικό οξύ που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι υπεύθυνα για τη μείωση του pH των τροφίμων και κατ’επέκταση την επιμήκυνση του χρόνου ζωής τους. Τα διαφορετικά ποσοστά του παραγόμενου γαλακτικού και οξικού οξέος, φέρνουν και διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το τρόφιμο στο οποίο θα προστεθεί η οξυγαλακτική καλλιέργεια, καθώς επίσης μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικά και τον πιθανό στόχο-βακτήριο για τον οποίο στοχεύουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι βακτηριοσίνες έχουν αποτελέσει θέμα πολλών μελετών και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες για τη συμβολή τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Είναι ενώσεις πρωτεϊνικής φύσεως, περιορισμένου αντιμικροβιακού εύρους, οι οποίες διαμορφώνονται από τα ριβοσώματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και εκλύονται στον εξωκυτταρικό χώρο. Το σημείο δράσης των βακτηριοσινών είναι η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και για αυτόν το λόγο η παρεμποδιστική τους δράση είναι αποτελεσματικότερη στα Gram θετικά βακτήρια λόγω της έλλειψης του επιρόσθητου εξωτερικού περιβλήματος έναντι των Gram αρνητικών στα οποία περιέχεται. Βέβαια, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των βακτηριοσινών σε ένα υπόστρωμα-τρόφιμο, όπως η δέσμευσή τους σε συστατικά του τροφίμου (μειωμένη δραστηριότητα παρουσιάζει η νισίνη σε τρόφιμα με υψηλή

λιποπεριεκτικότητα), η διάσπαση τους από πρωτεΐνάσες του τροφίμου ή άλλων βακτηρίων, το pH και η θερμοκρασία συντήρησης. Οι βακτηριοσίνες δείχνουν να έχουν καλύτερη δραστικότητα όσο μειώνεται το pH του υποστρώματος, παρουσιάζοντας άριστη μεταξύ pH 5 και 5.5. Επίσης, όσο η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου είναι μικρότερη της ιδανικής για την ανάπτυξη ενός οξυγαλακτικού βακτηρίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή βακτηριοσινών, λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας ενέργειας για παραγωγή μεταβολιτών. Τέλος, η δραστικότητα της βακτηριοσίνης εξαρτάται από το αντιμικροβιακό φάσμα της και από το βακτήριο-στόχο για το οποίο χρησιμοποιείται.

Η *Listeria monocytogenes*, όπως ήδη έχει προαναφερθεί, αποτελεί ένα Gram θετικό βακτήριο το οποίο αν βρεθεί συνδυαστικά με τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε ένα τρόφιμο, θα μπορούσε ίσως να επιβραδυνθεί η ανάπτυξή της. Αυτό, βάσει όσων έχουν αναφερθεί παραπάνω, οφείλεται στο γεγονός ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν ανταγωνιστικά, αναπτύσσονται γρηγορότερα από την *Listeria* "καταναλώνοντας" αυτά τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος, μειώνοντας έτσι το περιθώριο ανάπτυξης της. Επίσης, τα οργανικά οξέα και οι βακτηριοσίνες που δημιουργούνται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια δυσχεραίνουν ακόμη περισσότερο την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, συμβάλλοντας στην αναστολή της. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην εφαρμογή βακτηριοσινών που παράγονται από βακτήρια του γαλακτικού οξέος στον έλεγχο της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, όπως η *Listeria*. Σε μελέτη που διεξήχθη από τον Coelho, Silva, Ribiero, Rosa και Darkevicius το 2014, μελετήθηκε η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε φρέσκα μαλακά τυριά που περιείχαν οξυγαλακτικά και στόχος ήταν η επιλογή των στελεχών με την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια που παράγουν βακτηριοσίνες μείωσαν τον ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα τυριά σε θερμοκρασίες ψύξης, και πιο συγκεκριμένα μεγαλύτερη μείωση επέφεραν στελέχη του *Enterococcus* εν αντιθέσει του *Lactobacillus* (M.C. Coelho, 2014).

4.2.10 *Listeria monocytogenes* στα τυριά τυρογάλακτος

Η παστερίωση (ή και άλλες εντονότερες θερμικές διεργασίες) είναι επαρκής για να αδρανοποιήσει τα επίπεδα της *L. monocytogenes* που ανευρίσκονται συνήθως στα νωπά τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου και του νωπού γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί και περαιτέρω για άλλα προϊόντα. Ωστόσο, η μεταπαστεριωτική μόλυνση των τροφίμων με *Listeria monocytogenes* κατά τους μετέπειτα χειρισμούς (π.χ. κοπή σε φέτες, συσκευασία),

λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης από μολυσμένες επιφάνειες, εξοπλισμό ή υλικά συσκευασίας, αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο παρουσίας του μικροοργανισμού στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

Το βακτήριο, έχει προκαλέσει επιδημίες μέσω πληθώρας διαφορετικών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του παστεριωμένου γάλακτος και αρκετών μαλακών τυριών. Τυριά που συνδυάζουν υψηλή υγρασία και υψηλή τιμή pH, όπως αυτά του τυρογάλακτος, είναι επίδεκτα προσβολής και ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes*, πόσο μάλλον αν δεν έχουν τηρηθεί οι σωστές πρακτικές υγιεινής στα περιβάλλοντα επεξεργασίας και συσκευασίας.

4.3 Staphylococcus Aureus

4.3.1 Ιστορικά στοιχεία

Ο *Staphylococcus aureus*, που σημαίνει συστάδα από σταφύλια, ονομάστηκε για πρώτη φορά έτσι από τον Σκωτσέζο χειρουργό Sir Alexander Ogston, ο οποίος μεταξύ 1879 και 1882 έκανε αρκετές δημοσιεύσεις για την παρουσία αυτού του μικροοργανισμού σε πύον από ανθρώπινα αποστήματα και απέδειξε ότι προκαλούσε πυογενή νόσο μετά από χορήγησή του σε ποντίκια. Η πρώτη καταγεγραμμένη παρατήρηση που συσχετίζει τους σταφυλόκοκκους με τροφική δηλητηρίαση ήταν πιθανώς από τους Vaughan και Sternberg (Dack, 1956), οι οποίοι το 1884 περιέγραψαν μία έρευνα για μία μεγάλη εστία ασθένειας στο Μίσιγκαν που πιστεύεται ότι προκλήθηκε από την κατανάλωση τυριού (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Με μικροσκοπική εξέταση διαπιστώθηκε ότι το τυρί ήταν μολυσμένο με έναν σφαιρικό οργανισμό που ονόμασαν μικρόκοκκο. Εν τέλει, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δηλητηριώδης αρχή ήταν μία πρωμαΐνη που αναπτύχθηκε στο τυρί ως αποτέλεσμα του προαναφερθέντος μικρόκοκκου ή κάποιων άλλων μικροοργανισμών που είχαν προηγηθεί και ίσως είχαν σκοτωθεί από τα δικά του δηλητηριώδη προϊόντα. Ωστόσο, 30 χρόνια αργότερα, ο Barber το 1914 απέδειξε ξεκάθαρα τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο μετά από κατανάλωση αγελαδινού γάλακτος που είχε αποθηκευτεί εκτός ψυγείου και η αγελάδα έπασχε από σταφυλοκοκκική μαστίτιδα. Η σημασία αυτής της απόδειξης τους Barber δεν αναγνωρίστηκε εκείνη την εποχή και ο ρόλος των σταφυλόκοκκων στην τροφική δηλητηρίαση ανακαλύφθηκε ξανά το 1930 από τον Dack και τους συνεργάτες του. Αυτοί, απέδειξαν ότι το στείρο διήθημα από καλλιέργεια ενός κίτρινου σταφυλόκοκκου που απομονώθηκε από ένα χριστουγεννιάτικο παντεσπάνι με κρέμα, προκάλεσε τυπικά

συμπτώματα τροφικής δηλητηρίασης σε εθελοντές. Έκτοτε, ο *Staphylococcus aureus* έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί έναν κοινό και ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό που μπορεί να προκαλέσει τροφικές δηλητηριάσεις. Από τότε, έχουν διεξαχθεί και δημοσιευτεί πολυάριθμες έρευνες σχετικά με την απομόνωση και την ανίχνευση αυτού του μικροοργανισμού και της εντεροτοξίνης που προκαλεί τροφική δηλητηρίαση.

4.3.2 Ταξινόμηση

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στο είδος του γένους *Staphylococcus* της οικογένειας *Micrococcaceae*, ο οποίος είναι θετικός κατά Gram και θετικός στην καταλάση και οι κόκκοι του διαιρούνται σε περισσότερα από ένα επίπεδα για να σχηματίσουν ακανόνιστες τρισδιάστατες ομάδες κυττάρων.

Ο σταφυλόκοκκος είναι μορφολογικά παρόμοιος με το γένος *Micrococcus* αλλά αναπτύσσεται αναερόβια και επιδεικνύει προαιρετικά αναερόβιο μεταβολισμό, σε αντίθεση με τον αυστηρά αναπνευστικό μεταβολισμό των αερόβιων μικρόκοκκων. Τα δύο αυτά γένη μπορούν να διακριθούν πλήρως από τα χημικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά. Η ταξινόμηση των σταφυλόκοκκων έχει διαφοροποιηθεί αρκετά τα τελευταία 20 χρόνια καθώς μέχρι το 1974 είχαν αναγνωριστεί μόνο τρεις ομάδες ειδών σταφυλόκοκκων, το 1986 αναγνωρίστηκαν 19 είδη, ενώ σήμερα απαριθμούνται 30 είδη. Ο διαχωρισμός αυτών των ειδών πραγματοποιείται με ομολογία DNA και ανοσοχημικές μελέτες. Ο σταφυλόκοκκος μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω σε έναν αριθμό βιο-ή οικό-τυπων με βάση βιοχημικές δοκιμές και πρότυπα αντοχής και ακόμη περισσότερο με ορότυπους και αναλύσεις πλασμιδίου.

Πίνακας 4.4: Διαφορετικά χαρακτηριστικά των γενών της οικογένειας *Micrococcaceae*. (Δημήτριος Τυμπής, 2017)

Χαρακτηριστικό	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Planococcus</i>
Κόκκοι Gram θετικοί	+	+	+
Παραγωγή καταλάσης	+	+	+
Ζύμωση της γλυκόζης (αναερόβια)	-	+	-
Κινητικότητα	-	-	+

4.3.3 Μορφολογία

Ο όρος «σταφυλόκοκκοι» περιγράφει συνήθως μια ομάδα μικρών, σφαιρικών βακτηρίων τα οποία διατάσσονται σε τετράδες ή σταφυλοειδείς σχηματισμούς και παρουσιάζουν ακινησία. Τα κύτταρα τους έχουν διάμετρο που κυμαίνεται από 0,5 έως 1,5 μm περίπου.

4.3.4 Καλλιέργεια

Οι σταφυλόκοκκοι έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα και οι αποικίες που σχηματίζουν είναι κυρτές, αδιαφανείς, υγρές με χρυσοκίτρινο χρωματισμό. Για τον προσδιορισμό τους στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται κυρίως δύο μέθοδοι, ο προσδιορισμός σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και ο προσδιορισμός σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με τη μέθοδο του περισσότερου πιθανού αριθμού MPN. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον αριθμό του *Staphylococcus aureus* ανά γραμμάριο τροφίμου. Πιο συγκεκριμένα, εάν ο αριθμός αναμένεται να είναι μεγαλύτερος από 100/g τότε ο προσδιορισμός γίνεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ αν ο πληθυσμός αναμένεται να είναι μικρότερος τότε πραγματοποιείται η μέθοδος MPN. Για την πρώτη εκδοχή χρησιμοποιείται συνήθως το θρεπτικό υπόστρωμα Baird-Parker Egg Yolk Agar και οι αποικίες που σχηματίζονται είναι μαύρες, κυρτές, γυαλιστερές, διαμέτρου 1-5 mm που περιβάλλονται από διαυγή ζώνη πλάτους 2-5 mm ως αποτέλεσμα πρωτεόλυσης και λιπόλυσης. Στην δεύτερη εκδοχή χρησιμοποιείται συνήθως το υπόστρωμα Tryptone Soya Broth + 9.5% NaCl, όπου στις περιπτώσεις που εμφανίζεται θόλωμα, συνεχίζεται εμβολιασμός σε υπόστρωμα Baird-Parker Agar για την ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών και έπειτα πραγματοποιείται δοκιμή πηκτάσης ή κοαγκουλάσης. Η εμφάνιση θετικού αποτελέσματος της δοκιμής αυτής δείχνει παρουσία του *Staphylococcus aureus* στο τρόφιμο που υποβάλλεται σε εξέταση. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και άλλα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση σταφυλόκοκκων όπως το Zebovitz και το Chapman. Η παρασκευή όλων αυτών των υποστρωμάτων βασίζεται στην αντοχή που έχει ο *Staphylococcus aureus* στα αμινοξέα, στα άλατα και τα αντιβιοτικά.

4.3.5 Μεταβολισμός και Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί έναν προαιρετικά αναερόβιο μικροοργανισμό, ο οποίος όμως αναπτύσσεται γρήγορα και άφθονα κάτω από αερόβιες συνθήκες. Είναι θετικός στην καταλάση, δηλαδή έχει ένζυμα τα οποία διασπούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου, δεν μπορεί να παράξει οξειδάση και ζυμώνει τη γλυκόζη αναερόβια. Οι σταφυλόκοκκοι έχουν

χαρακτηριστικά gram θετικά κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκά οξέα. Επιπλέον χαρακτηριστικά είναι, η ευαισθησία τους στη λυσοσταφίνη αλλά όχι στη λυσοζύμη, ζυμώνουν τη μαννιτόλη, δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη νοβοβιοσίνη και είναι θετικά στην κοαγουλάση, θερμοσταθερή νουκλεάση, υαλουρονιδάση και φωσφατάση.

4.3.6 Προέλευση

Οι σταφυλόκοκκοι είναι πάρα πολύ διαδεδομένοι στο περιβάλλον αλλά την κυριότερη πηγή μόλυνσης την αποτελούν οι άνθρωποι. Τα περισσότερα είδη σταφυλόκοκκων βρίσκονται στην ανθρώπινη επιδερμίδα, στους αδένες του δέρματος και στους βλεννογόνους του ρινοφάρυγγα. Οι άνθρωποι αποτελούν φυσικούς φορείς που μεταδίδουν το βακτήριο σε άλλους ανθρώπους μέσω της εξάπλωσης του με άμεση επαφή των τμημάτων του δέρματος ή μέσω των σταγονιδίων κατά το βήξιμο ή φτέρνισμα.

Όσον αφορά τη μόλυνση τροφίμων από σταφυλόκοκκους που έχουν προκαλέσει τροφικές δηλητηριάσεις, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην επιμόλυνση του τροφίμου από τον άνθρωπο κατά τη διαδικασία παρασκευής του. Επίσης, ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να εισχωρήσει στα τρόφιμα μέσω των εξαρτημάτων των μηχανών όπως τα μαχαιρία και λεπίδες ή από αποθηκευτικά δοχεία και επιφάνειες κοπής. Οι συνθήκες που συχνά συνδέονται με κρούσματα ασθένειας σταφυλόκοκκου είναι η ανεπαρκής ψύξη, η παραγωγή τροφίμων πολύ πριν καταναλωθούν, η ελλιπής προσωπική υγιεινή, το ανεπαρκές μαγείρεμα ή η ανεπαρκής θέρμανση του τροφίμου και η παρατεταμένη χρήση θερμαντικών πλακών για το σερβίρισμα των φαγητών (Thomas J. Montville, 2010).

Μία επιπλέον σημαντική πηγή μόλυνσης του *Staphylococcus aureus* αποτελούν τα ζώα και πιο συγκεκριμένα αρκετά σοβαρό πρόβλημα δημιουργεί η μαστίτιδα των βοοειδών στις γαλακτοβιομηχανίες. Συχνά, η μαστίτιδα προκαλείται από τον σταφυλόκοκκο και προκαλεί ανησυχία για τη δημόσια υγεία καθώς αυτός επιμολύνει το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας επιμόλυνσης είναι απαραίτητος ο έλεγχος των συνθηκών υγιεινής τόσο στα άτομα που μεταχειρίζονται τις πρώτες ύλες και τα προϊόντα όσο και στα μηχανήματα και στις εγκαταστάσεις.

Η πηγή μόλυνσης των τροφίμων από σταφυλόκοκκο για ένα συγκεκριμένο κρούσμα δεν είναι πάντα γνωστή. Τα επίπεδα του συνήθως στην αρχή είναι χαμηλά της τάξεως των 100 CFU/g ή και μικρότερα αλλά μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι και σε επίπεδα $>10^6$ CFU/g και να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση.

4.3.7 Ασθένεια

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση αποτελεί μία από τις συνηθέστερες τροφοδηλητηριάσεις παγκοσμίως. Προκαλείται από την κατανάλωση μίας ή περισσότερων προσχηματισμένων εντεροτοξινών που παράχθηκαν σε μολυσμένα από σταφυλόκοκκους τρόφιμα. Η παραγωγή μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται πηκτάση, από ορισμένα στελέχη σταφυλόκοκκων σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με την ικανότητα τους για παραγωγή εντεροτοξίνης. Όμως, τα τελευταία χρόνια έγινε γνωστό ότι πολλά είδη σταφυλόκοκκων, τόσο πηκτάση-θετικών όσο και πηκτάση-αρνητικών, μπορούν να παράγουν εντεροτοξίνες. Ωστόσο, παρόλο που πολλά είδη ακόμα και πηκτάση-αρνητικών σταφυλόκοκκων μπορούν εν δυνάμει να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδα, στην πράξη η συντριπτική πλειοψηφία των περιστατικών σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης οφείλεται σε στέλεχος του *Staphylococcus aureus*.

Η τροφική δηλητηρίαση από τον *Staphylococcus aureus* εκδηλώνεται σε ασυνήθιστα μικρό χρονικό διάστημα πριν το ξέσπασμα μέσω του εμετού, σε σχεδόν 30 λεπτά μετά την κατανάλωση επιμολυσμένου τροφίμου. Παρόλα αυτά, πολλοί άνθρωποι δεν εκδηλώνουν αυτό το σύμπτωμα αλλά μπορεί να εμφανίσουν ναυτία, διάρροια, πονοκέφαλο ή/και σωματική εξάντληση. Η έλλειψη πυρετού χαρακτηρίζει μια ασθένεια που προκαλείται από τοξίνη και όχι από (τροφο)λοίμωξη (Thomas J. Montville, 2010). Τα συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης παρουσιάζονται μέσα σε 1 έως 7 ώρες (συνήθως από 2 έως 4 ώρες) μετά την κατανάλωση του τροφίμου. Η μέση περίοδος επώασης είναι 4,4 ώρες, αν και η ασθένεια μπορεί να εμφανιστεί σε 30 λεπτά περίπου. Πολύ σπάνια είναι τα περιστατικά όπου έχει προκληθεί θάνατος που να οφείλεται σε τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο. Η θεραπευτική αγωγή είναι συνήθως ελάχιστη και η ανάρρωση είναι ταχεία, συνήθως εντός 2 ημερών.

Η μολυσματική δόση του *Staphylococcus aureus* για να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση είναι όταν τα επίπεδά του είναι $>10^5$ CFU/g τροφίμου, όπου τότε ίσως υπάρχει αρκετή εντεροτοξίνη ώστε να προκαλέσει ασθένεια. Όσον αφορά, την απαιτούμενη δόση της τοξίνης του σταφυλόκοκκου, τα επίπεδα των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών σε τρόφιμα που προκαλούν κρούσματα είναι σχετικά υψηλά σε σχέση με αυτά των υπόλοιπων εξωτοξινών. Πολλά κρούσματα έχουν προκληθεί από 1 έως 5 μg καταναλισκόμενης τοξίνης ανά άτομο (Thomas J. Montville, 2010).

4.3.8 Παθογένεια

Ο *Staphylococcus aureus* σχηματίζει ένα ευρύ φάσμα ουσιών (επιθετικών και εξωτοξινών) που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του και την ασθένεια που προκαλεί. Οι ουσίες αυτές κυμαίνονται από συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως τειχοϊκά οξέα, μέχρι πλήθος εξωενζύμων όπως σταφυλοκινάσες, υαλουρονιδάσες, φωσφατάσες, καταλάσες, κοαγκουλάσες, πρωτεάσες, νουκλεάσες και λιπάσες, λευκοσιδίνες και αιμολυσίνες. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι πρωτεΐνες μονής αλυσίδας, χαμηλού μοριακού βάρους, που περιλαμβάνουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιέχει σχετικά μεγάλες ποσότητες τυροσίνης, λυσίνης και ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος και χαρακτηρίζεται από το ότι περιέχει μόνο δύο υπολείμματα μισής κυστίνης και ένα ή δύο υπολείμματα τρυπτοφάνης. Υπάρχουν επτά κύριοι αντιγονικοί τύποι σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED και SEE) που έχουν αναγνωρισθεί. Παρόλα αυτά υπάρχουν και οι αντιγονικοί τύποι SEG, SHE, SEJ και SEI που αποτελούν πιο πρόσφατες ανακαλύψεις.

Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες παράγονται σε μικρές ποσότητες κατά το μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και η ποσότητα που παράγεται εξαρτάται από το στέλεχος. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες B και C παράγονται στις μεγαλύτερες ποσότητες μέχρι και 350μg/ml καλλιέργειας, ενώ οι A, D και E είναι εύκολα ανιχνεύσιμες μέσω δοκιμών διάχυσης σε πήκτωμα, οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν μέχρι και 100 ng εντεροτοξίνης ανά ml καλλιέργειας. Οι περισσότερες τροφικές δηλητηριάσεις έχουν προκληθεί από τις εντεροτοξίνες A και D, οι οποίες σχηματίζονται σε τρόφιμα σε πολύ μεγαλύτερο εύρος τιμών pH, aw και Eh από ότι οι εντεροτοξίνες B και C.

Ο τρόπος δράσης της τοξίνης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά πιστεύεται ότι τόσο ο εμετός όσο και η διαρροϊκή απόκριση είναι αποτέλεσμα της διέγερσης τοπικών νευροϋποδοχέων στον εντερικό σωλήνα και μετάδοσης ερεθισμάτων στο κέντρο εμετού του εγκεφάλου μέσω του πνευμονογαστρικού σωλήνα και άλλων μερών του νευρικού συστήματος.

Η ποσότητα της εντεροτοξίνης που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια εξαρτάται από το βάρος και την ατομική ευαισθησία του ατόμου, αλλά είναι γενικά αποδεκτό ότι 0,1-1 g/kg μπορεί να παρουσιάσει δηλητηρίαση στον άνθρωπο. Ωστόσο, είναι γεγονός, ότι η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε έναν συγκεκριμένο αντιγονικό τύπο εντεροτοξίνης δημιουργεί ανοχή σε αυτόν.

4.3.9 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα του *Staphylococcus aureus* σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες

4.3.9.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί ένα βακτήριο το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στην κατάψυξη και απόψυξη και μπορεί να επιβιώσει σε τρόφιμα που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ≤ -20 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, για παράδειγμα -10 °C έως 0 °C, η βιωσιμότητα μειώνεται σημαντικά κατά την αποθήκευση σε κατάψυξη. Επιπλέον, οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες είναι πολύ σταθερές σε αποθήκευση υπό κατάψυξη (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988).

Η ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου είναι βέλτιστη μεταξύ 35 και 40 °C, με όρια ανάπτυξης περίπου τους 7 και 48 °C. Στους 10 °C υπάρχει μεγάλος χρόνος καθυστέρησης και η ανάπτυξη είναι αρκετά αργή. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η ανάπτυξη του βακτηρίου περιορίζεται μέσω μείωσης της ενεργότητας του νερού ή του pH και μειώνεται περαιτέρω με αποθήκευση σε αναερόβιες συνθήκες. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες παράγονται κάτω από ένα ελάχιστο πιο περιορισμένο εύρος συνθηκών (10-48 °C) σε σύγκριση με την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου, αλλά οι παράγοντες που τις επηρεάζουν είναι οι ίδιες.

Ο *Staphylococcus aureus* συνήθως θανατώνεται εύκολα σε θερμοκρασίες παστερίωσης και μαγειρέματος, ενώ η αντίσταση του βακτηρίου αυξάνεται σε ξηρά ή πλούσια σε λιπαρά τρόφιμα. Παρόλα αυτά, όλες οι εντεροτοξίνες είναι εξαιρετικά ανθεκτικές στη θερμότητα και μπορούν να επιβιώσουν από τις θερμικές διεργασίες που χρησιμοποιούνται ακόμα και για την αποστείρωση κονσερβοποιημένων τροφίμων (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Η θερμική αντίσταση των κυττάρων επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης και η αντίσταση αυξάνεται από την ανάπτυξη του βακτηρίου σε υψηλές θερμοκρασίες (>37 °C) και μειώνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (<20 °C).

Αν χρησιμοποιηθεί στα τυριά τυρογάλακτος τυρόγαλο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί είτε σε αυτό είτε στο γάλα από το οποίο προήλθε, σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, τότε είναι σχεδόν βέβαιη η μεταφορά τους σε αυτά, πάρα τη θερμική επεξεργασία στην οποία υποβάλλονται.

4.3.9.2 Επίδραση της οξύτητας - pH

Ο *Staphylococcus aureus* παρουσιάζει μεγαλύτερη ανάπτυξη σε pH 6-7 αλλά αν βρεθεί σε βέλτιστες κατά τα άλλα συνθήκες, μπορεί να αναπτυχθεί και σε pH <4,3. Ωστόσο, παρουσία οργανικών οξέων τα όρια pH είναι πολύ υψηλότερα. Για την ανάπτυξη σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών το βέλτιστο pH είναι ελάχιστα αυξημένο σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού της τάξεως του ενός βαθμού, δηλαδή pH 7-8.

Η ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου λοιπόν, είναι πολύ πιθανή στα τυριά τυρογάλακτος λόγω του ότι αυτά βρίσκονται μέσα στο βέλτιστο pH ανάπτυξής του.

4.3.9.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού a_w - άλατος

Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλύτερα σε ενεργότητα ύδατος 0,98, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο άλας και αναπτύσσεται και σε χαμηλές ενεργότητες ύδατος, ακόμη και 0,85 (περιεκτικότητα σε αλάτι 25% w/w), υπό κατά τα άλλα βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, η ενεργότητα ύδατος αλληλεπιδρά σημαντικά και με τις υπόλοιπες παραμέτρους ανάπτυξης του σταφυλόκοκκου, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Η παραγωγή εντεροτοξινών λαμβάνει χώρα κάτω από ένα πιο στενό φάσμα συνθηκών. Η παραγωγή της εντεροτοξίνης A μπορεί να συμβεί σε χαμηλότερες ενεργότητες ύδατος από εκείνη της εντεροτοξίνης B και για αυτόν το λόγο είναι συνηθέστερη η εμφάνισή της στα τρόφιμα.

Το μεγάλο εύρος τιμών ενεργότητας ύδατος που αναπτύσσεται ο *Staphylococcus aureus*, τον κάνει να μπορεί να αναπτυχθεί και με ευκολία στα τυριά τυρογάλακτος τα οποία, μάλιστα, βρίσκονται και εντός των βέλτιστων τιμών του.

4.3.9.4 Επίδραση αερίων

Ο *Staphylococcus aureus* αναπτύσσεται τόσο αερόβια όσο και αναερόβια, αλλά η ανάπτυξη σε αναερόβιες συνθήκες είναι πιο αργή. Αντίθετα, η επιβίωση των κυττάρων μπορεί να βελτιωθεί υπό αναερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με τις αερόβιες. Επομένως, η χρησιμοποίηση συσκευασίας κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας ίσως μπορεί να συμβάλλει στην επιβράδυνση της ανάπτυξης του σταφυλόκοκκου στα τυριά τυρογάλακτος.

4.3.9.5 Επίδραση ανταγωνιστικής χλωρίδας

Η επίδραση άλλων οργανισμών στην ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* είναι πολύ περίπλοκη. Είναι δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ των επιδράσεων που οφείλονται στην παραγωγή μεταβολιτών όπως συγκεκριμένα οξέα, μειωμένο pH, εξάντληση θρεπτικών

συστατικών και στην παραγωγή ειδικών αντισταφυλοκοκκικών παραγόντων.

Η αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών στον έλεγχο της ανάπτυξης (και της παραγωγής εντεροτοξίνης) εξαρτάται από την αναλογία των ανταγωνιστών προς τα κύτταρα του *Staphylococcus aureus*, τον τύπο του ανταγωνιστή, τη θερμοκρασία αποθήκευσης και το υπόστρωμα ανάπτυξης. Η επίδραση των ανταγωνιστών στην αναστολή της ανάπτυξης του σταφυλόκοκκου είναι μεταβαλλόμενη καθώς εξαρτάται από τον οργανισμό και το στέλεχος. Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει ότι η χρησιμοποίηση οξυγαλακτικών καλλιιεργειών και η ταχεία πτώση του pH παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του σταφυλόκοκκου, ο οποίος σταματά σε pH μικρότερο του 5,3. Επίσης, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl στο τυρί στα πρώτα στάδια παρασκευής του, ευνοεί την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων, καθώς παρεμποδίζει τους ανταγωνιστές τους, δηλαδή τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που είναι πιο ευαίσθητα σε αυτό. Ωστόσο, στα τυριά τυρογάλακτος η προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας δεν είναι συνηθισμένη, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επίδραση ανταγωνιστικής χλωρίδας επί του *Staphylococcus aureus*.

4.3.10 *Staphylococcus aureus* στα τυριά τυρογάλακτος

Πολλά είδη σταφυλόκοκκων μπορούν να απομονωθούν από τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και γαλακτοκομικών, ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης τους κυρίως από τον άνθρωπο, αλλά δευτερευόντως και από τα ζώα μέσω της σταφυλοκοκκικής μαστίτιδας στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, ακόμα και από το περιβάλλον δεδομένου ότι οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντοχή στην ξηρασία.

Στην πράξη η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνωση είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης των τροφίμων από ανθρώπους που χειρίζονται/ετοιμάζουν τρόφιμα και μετέπειτα συντήρησης των τροφίμων σε υψηλές θερμοκρασίες (εκτός ψυγείου). Ωστόσο, η ύπαρξη εντεροτοξινογόνων στελεχών *Staphylococcus aureus* στο απαστερίωτο γάλα, ως αποτέλεσμα σταφυλοκοκκικής μαστίτιδας ή επιμόλυνσης από το δέρμα του ζώου ή γενικότερα λόγω μη τήρησης της ορθής υγιεινής πρακτικής κατά την άμελξη, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή εντεροτοξίνης εάν το γάλα δεν συντηρηθεί εγκαίρως σε θερμοκρασία μικρότερη των 5 °C. Την τελευταία δεκαετία, μεταξύ των γαλακτοκομικών τροφίμων που έχουν εμπλακεί σε σταφυλοκοκκικές τροφιοτοξινώσεις είναι το νωπό γάλα, κάποια τυριά από απαστερίωτο γάλα, προϊόντα από παστεριωμένο γάλα και το παγωτό. Ο *Staphylococcus aureus* αδρανοποιείται κατά την παστερίωση, αλλά οι εντεροτοξίνες είναι ιδιαίτερα θερμοάντοχες και δεν αδρανοποιούνται με τους χρονο-θερμοκρασιακούς

συνδυασμούς που χρησιμοποιούνται από τη γαλακτοβιομηχανία για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Έτσι, εάν οι εντεροτοξίνες παραχθούν στο γάλα, περνούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα ανεξάρτητα από την τεχνολογία παρασκευής τους.

Στα τυριά τυρογάλακτος, αν χρησιμοποιηθεί τυρόγαλα το οποίο έχει παρθεί από τυρί του οποίου το γάλα που χρησιμοποιήθηκε είχε αναπτύξει εντεροτοξίνες ή αν παραχθούν εντεροτοξίνες στο τυρόγαλα λόγω κακού χειρισμού ή γενικώς λόγω κακών ορθών υγιεινών πρακτικών, τότε οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες μεταφέρονται και στο τελικό προϊόν. Είναι γεγονός λοιπόν, πως αν πραγματοποιηθούν αυτές οι μη ορθές πρακτικές που προαναφέρθηκαν, τότε είναι σχεδόν βέβαιη η ύπαρξη σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών και στα τυριά τυρογάλακτος ακόμη και μετά την έντονη θερμική επεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί.

4.4 Escherichia Coli

4.4.1 Ιστορικά στοιχεία

Ο οργανισμός, που αρχικά ονομαζόταν *Bacterium coli*, απομονώθηκε αρχικά από τα κόπρανα βρεφών από τον Escherich πριν από έναν αιώνα (Wilson,1983). Το 1920, ο οργανισμός μετονομάστηκε σε *Escherichia coli* (*E.coli*) και από τότε υπήρχαν αυξημένες ενδείξεις ότι το βακτήριο μπορούσε περιστασιακά να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα με σημαντική θνησιμότητα στα βρέφη. Στα μέσα της δεκαετίας του 1940, ο ρόλος της *Escherichia coli* ως εντεροπαθογόνο είχε εδραιωθεί και στη συνέχεια λήφθηκαν μέτρα ελέγχου για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας που προκαλούσε στις ανεπτυγμένες χώρες.

4.4.2 Ταξινόμηση - Χαρακτηριστικά

Το βακτήριο *E.coli* είναι μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και αποτελεί εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδές. Είναι ένας μικροοργανισμός αρνητικός κατά Gram, μη σπορογόνος, αερόβιος ή προαιρετικά αναερόβιος σε ραβδόμορφο σχήμα. Η *Escherichia coli* αποτελεί είδος περιττωματικών κολοβακτηρίων τα οποία, παρουσία αλάτων του χολικού οξέος αναπτύσσονται και παράγουν οξύ και αέριο από λακτόζη μέσα σε 48 ώρες στους 44-45,5 °C.

Τα στελέχη της *E.coli* κατηγοριοποιούνται σε συγκεκριμένες ομάδες βάσει τους μηχανισμούς παθογένειας, τις μολυσματικές ιδιότητες, τα κλινικά σύνδρομα και τους

διαφορετικούς ορότυπους O:H. Αυτά, μπορούν να διαφοροποιηθούν το ένα από το άλλο ορολογικά με βάση τρία βασικά αντιγόνα επιφάνειας, τα σωματικά (O), τα μαστιγιακά (H) και τα καψιδιακά (K). Οι κατηγορίες της διαρροϊκής *E.coli* είναι η εντεροπαθογόνος *E.coli* (EPEC), η εντεροτοξική *E.coli* (ETEC), η εντεροδιεισδυτική *E.coli* (EIEC), η εντεροδιαχεόμενη *E.coli* (DAEC), η εντεροσυσσωρευόμενη *E.coli* (EAEC) και η εντεροαιμορραγική *E.coli* (EHEC), η οποία προκαλεί τις πιο σοβαρές ασθένειες και πιο συγκεκριμένα ο ορότυπος O157:H7. Ο ορότυπος O157:H7 προκαλεί γαστρεντερίτιδα μέσω τοξινών που παράγει και καλούνται «βεροτοξίνες» (*verotoxin* – VTI) ή τοξίνες του τύπου «Shiga», διότι μοιάζουν με τις τοξίνες που παράγει το βακτήριο *Shigella dysenteriae*. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο ορότυπος μπορεί να προκαλέσει νοσηρές καταστάσεις ακόμα και σε πολύ μικρούς αριθμούς 1-15 cfu/g. Η *E.coli* O157:H7 έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως ότι δεν αναπτύσσεται καλά, ή και καθόλου σε θερμοκρασίες $\geq 44,5$ °C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα για *E.coli*, δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες, δεν παράγει β-γλυκουρονιδάση, έχει ένα γονίδιο πρόσδεσης και συρρίκνωσης των εντεροκυττάρων και φέρει ένα πλασμίδιο μεγέθους 60 MDa. Τέλος, έχει αρκετά υψηλή ανθεκτικότητα σε οξέα και αντιβιοτικά.

4.4.3 Καλλιέργεια

Η ανίχνευση και αρίθμηση των κολοβακτηριοειδών και της εντερικής προέλευσης *E.coli*, μπορεί να πραγματοποιηθεί με περισσότερες από μία μεθόδους και με χρήση διαφορετικών συνδυασμών θρεπτικών υποστρωμάτων. Επειδή όμως μόνο η θετικότητα στη δοκιμή κολοβακτηριοειδών είναι δυνατόν να υποδηλώνει θετικότητα στην *E.coli*, η μεθοδολογία ανίχνευσης και αρίθμησης εξελίσσεται σε συνεχόμενα στάδια. Για αυτόν το λόγο, από τη στιγμή που επιδιώκεται η εξαγωγή αποτελεσμάτων τόσο για κολοβακτηριοειδή όσο και για εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή, συνήθως επιλέγεται η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων (MPN).

Επίσης, για την ταυτοποίηση της *E.coli* μπορούν να πραγματοποιηθούν αρκετές βιοχημικές /φυσιολογικές δοκιμές, οι οποίες περιλαμβάνουν χρώση Gram (αρνητική), θετική ινδόλη, θετική αναγωγή νιτρικών, αρνητική κυτοχρωμική οξειδάση, θετική μαννιτόλη, θετική στη λακτόζη, αρνητική σε κιτρικό, αρνητική σε HS και πολλές άλλες.

4.4.4 Προέλευση

Η *Escherichia coli* είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στο περιβάλλον, όπου κύρια δεξαμενή στη

φύση είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων, καθώς αποτελεί μέρος του μικροβιώματος του εντερικού σωλήνα τους. Συνήθως, συνδέεται με ύδατα μολυσμένα με περιττώματα ανθρώπων και ζώων, τα οποία αποτελούν πηγές μόλυνσης. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στην *E.coli O157:H7* η οποία έχει ανευρεθεί σε αρκετά τρόφιμα και προκαλεί τροφολοίμωξη. Συχνότερα, έχει βρεθεί σε ανεπαρκώς μαγειρεμένο ή ακατέργαστο κρέας, σε φρέσκα λαχανικά, απαστερίωτο χυμό φρούτων, αποξηραμένο σαλάμι, στο τυρόπηγμα και το ωμό γάλα.

Η μεταφορά του μικροοργανισμού από τους ανθρώπους στα τρόφιμα είναι από τα πιο συνηθισμένα φαινόμενα στις βιομηχανίες τροφίμων. Η ύπαρξη της συνήθως υποδηλώνει άμεση ή έμμεση μόλυνση από τον εντερικό σωλήνα και τα περιττώματα ανθρώπου ή ζώου και για αυτό η *E.coli* αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης ενός τροφίμου. Η απροσεξία στην προσωπική υγιεινή, ιδιαίτερα μετά τη χρήση τουαλέτας, μπορεί να μεταφέρει το παθογόνο μέσω μολυσμένων χεριών, καταλήγοντας έτσι σε δευτερογενή μετάδοση (επιμολύνσεις).

Τα αγροκτήματα αποτελούν σοβαρή πηγή ανίχνευσης της *E.coli O157:H7*, όπου τα νεαρά απογαλακτισμένα ζώα είναι συχνότερα φορείς της σε σχέση με τα ενήλικα βοοειδή. Σε πολλά βοοειδή, η *E. coli O157:H7* μεταφέρεται προσωρινά στο γαστρεντερικό σύστημα και εκκρίνεται περιοδικά από μερικές εβδομάδες έως μήνες από νεαρά μοσχάρια και νεαρές αγελάδες. Σημαντικό είναι ότι οι αγελάδες είναι δυνατό να μεταφέρουν περισσότερα του ενός στελέχους της *E. coli O157:H7*. Η *E. coli O157:H7* δεν αποτελεί παθογόνο των απογαλακτισμένων μοσχαριών και των ενήλικων βοοειδών. Συνεπώς, τα ζώα που φέρουν το παθογόνο δεν ασθενούν. Επίσης, τα βοοειδή είναι πιο πιθανό να βρεθούν θετικά στον έλεγχο για *E. coli O157:H7* κατά τη διάρκεια των πιο ζεστών μηνών του έτους λόγω της εποχιακής μεταβολής στη συχνότητα της ανθρώπινης ασθένειας. Συνεπώς, είναι αρκετά επίφοβη η επιμόλυνση του γάλακτος κατά την άμελξη των αγελάδων που είναι φορείς και η μεταφορά της *E.coli O157:H7* στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, αν και τα βοοειδή θεωρούνται ότι είναι η κύρια πηγή του παθογόνου στην τροφική αλυσίδα, έχουν απομονωθεί στελέχη του και σε άλλα ζώα. Μάλιστα, η επικράτηση της *E.coli O157:H7* σε πρόβατα είναι μεγαλύτερη από ότι είναι σε άλλα ζώα. Σε μία έρευνα που έγινε σε επτά ζωικά είδη στη Γερμανία, απομονώθηκαν στελέχη της *EHEC* πιο συχνά από πρόβατο (66,6%), κατσίκες (56,1%), και βοοειδή (21,1%), με χαμηλότερα ποσοστά επικράτησης σε κοτόπουλα (0,1%), γουρούνια (7,5%), γάτες (13,8%) και σκύλους (4,8%) (Thomas J. Montville, 2010).

Αυτό το γεγονός, ίσως να φέρνει στην επιφάνεια την κρισιμότητα για την τήρηση

των ορθών συνθηκών υγιεινής και του σωστού χειρισμού επεξεργασίας των τυριών τυρογάλακτος, καθώς αυτά είναι παρασκευασμένα κυρίως από αιγοπρόβειο τυρόγαλα. Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως είναι οι πηγές νερού και τροφής, ή οι πρακτικές διαχείρισης των αγροκτημάτων, όπως είναι οι χειρισμοί της κοπριάς, παίζουν σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας την επικράτηση της *E. coli O157:H7* σε γαλακτοπαραγωγικά αγροκτήματα. Το παθογόνο εντοπίζεται συχνά στις ποτίστρες των αγροκτημάτων και μπορεί να επιζήσει για εβδομάδες ή μήνες σε περιττώματα βοοειδών και στο νερό.

4.4.5 Ασθένεια

Τα περισσότερα είδη του βακτηρίου *Escherichia coli* είναι αβλαβή ή και επωφελή για τον οργανισμό καθώς μία μικρή ομάδα των ειδών της είναι άμεσα συνδεδεμένη με παθογένεια προκαλώντας ασθένεια στον άνθρωπο με διαφορετικούς μηχανισμούς. Το κέντρο βάρους πέφτει στην εντεροαιμορραγική *E.coli* και συγκεκριμένα στον ορότυπο *O157:H7*.

Τα συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης από αυτόν εμφανίζονται συνήθως μέσα σε κάποιες ώρες έως και 10 ημέρες μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου. Μια μικρή δόση του βακτηρίου είναι αρκετή για να προκαλέσει σοβαρή ασθένεια. Η ασθένεια εμφανίζεται με κοιλιακούς πόνους και διάρροια, που εξελίσσονται σε αιμορραγική διάρροια. Η περιττωματική αποβολή της *E. coli O157:H7* από ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα ή HUS (ουραιμικό σύνδρομο) διαρκεί συνήθως από 13 έως 21 ημέρες από την αρχική εκδήλωση των συμπτωμάτων. Παρόλα αυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις το παθογόνο μπορεί να εκκρίνεται στα περιττώματα για εβδομάδες. Ένα παιδί που μολύνθηκε κατά τη διάρκεια ενός κρούσματος σε ένα κέντρο ολοήμερης φροντίδας συνέχισε να εκκρίνει το παθογόνο για 62 ημέρες. Είναι αξιοσημείωτο ότι άτομα που ζουν σε γαλακτοπαραγωγικά αγροκτήματα έχουν αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων κατά της *E. coli O157:H7*, ακόμα κι αν το παθογόνο δεν απομονώνεται από τα περιττώματα. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναγνωριστεί κάποια ασυμπτωματική κατάσταση φορέα μακράς διάρκειας. Το να είναι ένας άνθρωπος φορέας της *E. coli O157:H7* και να το γνωρίζει είναι σημαντικό για τη μείωση της πιθανότητας μετάδοσης της από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Ένας παράγοντας που συνεισφέρει στην μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι η εξαιρετικά χαμηλή μολυσματική δόση του βακτηρίου διότι λιγότερα από 100 κύτταρα, και ίσως ακόμη και μόλις 10 κύτταρα, μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια. Η ηλικία, η ανοσολογική κατάσταση και τυχόν εξασθενημένος οργανισμός μπορούν να επηρεάσουν μεμονωμένα ή αθροιστικά το αν ένα άτομο θα αρρωστήσει.

4.4.6 Παθογένεια

Ο ακριβής μηχανισμός παθογένειας του *EHEC* δεν είναι γνωστός. Οι γενικότερες γνώσεις σε σχέση με την παθογένεια του *EHEC* δείχνουν ότι τα βακτήρια προκαλούν ασθένεια μέσω της ικανότητάς τους να προσδένονται στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή και να αποικίζουν το παχύ έντερο, όπου τότε παράγουν μία ή περισσότερες τοξίνες Stxs. Οι ρόλοι διαφόρων άλλων πιθανών μολυσματικών παραγόντων και των παραγόντων του ξενιστή μένει να προσδιοριστούν.

4.4.7 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της *Escherichia coli* σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες

4.4.7.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Το θερμοκρασιακό εύρος που μπορεί να αναπτυχθεί η *Escherichia coli* κυμαίνεται μεταξύ 7 °C και 46 °C, με άριστη τιμή επώασης τους 30-42 °C. Ωστόσο, η *E. coli* O157:H7 έχει ελαφρώς πιο περιορισμένο εύρος ανάπτυξης, με ελάχιστη θερμοκρασία τους 8 °C, μέγιστη περίπου 44-45 °C και βέλτιστη τους 37 °C. Το παθογόνο γενικά επιβιώνει καλά στα τρόφιμα σε θερμοκρασίες ψύξης (3-7 °C) με μία μείωση από $10^{0,5}$ έως $10^{1,5}$ σε διάστημα αποθήκευσης 1 έως 5 εβδομάδων. Παρόλα αυτά, για την *E. coli* O157:H7 έχει παρατηρηθεί ακόμα πιο μικρή ή και καθόλου μείωση στον πληθυσμό της (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Η καταστροφή της *Escherichia coli* επέρχεται με θερμοκρασίες παστερίωσης. Μελέτες θερμικής αδρανοποίησης έχουν αποκαλύψει ότι η *E. coli* O157:H7 είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα από την τυπική *Salmonella spp.* και ως εκ τούτου οι θερμικές επεξεργασίες που προορίζονται να θανατώσουν την *Salmonella* στα τρόφιμα, θανατώνουν και την *E. coli* O157:H7.

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση της *Escherichia coli* σε ένα τρόφιμο, διαδραματίζει και η θερμοκρασία αποθήκευσης του. Σε έρευνα του Γκόβαρη, Κωΐδη και Παπαθεοδώρου το 2001 σε ελληνικά τυριά τυρογάλακτος (Μυζήθρα, Ανθότυρος, Μανούρι) που είχαν εμβολιαστεί με *Escherichia coli* O157:H7 και αποθηκεύτηκαν στους 2 °C και 12 °C για 30 και 20 μέρες αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ότι στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης στους 12 °C ο πληθυσμός αυξήθηκε ($1,3 \log 10$ cfu/g), ενώ στους 2 °C μειώθηκε ($2,5 \log 10$ cfu/g). Αυτό έδειξε πως η *Escherichia coli* O157:H7 μπορεί να αναπτυχθεί στους 12 °C και να επιβιώσει στους 2 °C στα τυριά τυρογάλακτος και επομένως η μόλυνση μετά την παρασκευή με αυτό το παθογόνο πρέπει να αποφευχθεί με προγράμματα ελέγχου υγιεινής

όπως το HACCP. Αξίζει να σημειωθεί ότι παράλληλα καταγράφηκαν και οι τιμές pH, οι οποίες μειώθηκαν από μια αρχική τιμή περίπου 6,20 έως 5,83 ή 5,60 (Μυζήθρα), 5,75 ή 5,20 (Ανθότυρος) και 5,80 ή 5,30 (Μανούρι) μέχρι το τέλος των περιόδων αποθήκευσης στους 2 και 12 °C, αντίστοιχα (Α. Govaris1, 2001).

4.4.7.2 Επίδραση της οξύτητας - pH

Η *Escherichia coli* βρίσκει άριστη περιοχή ανάπτυξης σε pH 7,0-7,2, χαρακτηρίζεται ως οξυάντοχη, καθώς έχει ανθεκτικότητα ακόμη και σε pH<4,3 και θανατώνεται σε τιμές < 4,0. Η επίδραση του pH στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξαρτάται από τον τύπο του οξέος που υπάρχει στο τρόφιμο. Η *E. coli O157:H7* μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 4,5 σε ρυθμιστικό μέσο με HCl αλλά όχι σε ρυθμιστικό μέσο με γαλακτικό οξύ. Δεν μπορεί, λοιπόν, να αναπτυχθεί σε τυριά που έχουν υποστεί ζύμωση (pH≤5,4) λόγω ύπαρξης αρκετής ποσότητας γαλακτικού οξέος. Διαπιστώνεται, ότι το αυξημένο pH και η απουσία οξυγαλακτικής καλλιέργειας, η οποία μειώνει το pH μέσω του παραγόμενου γαλακτικού οξέος, στα τυριά τυρογάλακτος, δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη ή/και επιβίωση της *Escherichia coli*.

4.4.7.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού a_w – άλατος

Το παθογόνο, συνήθως δεν αναπτύσσεται σε τιμές a_w <0,95, ενώ είναι ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (7-10%). Έχουν υπάρξει λίγες αναφορές για την επίδραση των συντηρητικών όπως το NaCl στην *E. coli O157:H7*. Ωστόσο, έχει προσδιοριστεί ότι αυτά τα βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν σε 6% NaCl και είναι πιο ανεκτικά στο χλωριούχο νάτριο και το νιτρώδες νάτριο από τα τυπικά στελέχη της *Salmonella spp.* και μπορούν να αναπτυχθούν, αν και αργά, σε ζυμό που περιέχει 6,5% NaCl αλλά όχι 8,5%.

Τα τυριά τυρογάλακτος τα οποία έχουν υψηλή ενεργότητα ύδατος και χαμηλή ή και καθόλου προσθήκη άλατος είναι αρκετά επίφοβα για την ανάπτυξη και επιβίωση της *Escherichia coli*, αν δεν τηρηθούν οι σωστές συνθήκες υγιεινής κατά τα στάδια επεξεργασίας τους.

4.4.7.4 Επίδραση αερίων

Η *Escherichia coli* είναι ένα αερόβιο ή δυνητικά αναερόβιο βακτήριο, επομένως έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί ακόμα και υπό συνθήκες κενού. Αναφορικά με τα τυριά τυρογάλακτος, η Παπαϊωάννου και οι συνεργάτες της το 2005 πραγματοποίησαν έρευνα για

το τυρί Ανθότυρος σε συσκευασία υπό κενό (VP) και σε δύο διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες MAP (M1: 30%/70% CO₂/N₂ και M2: 70%/30% CO₂/N₂) σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 4°C και 12°C. Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το M1 και το M2 καθυστέρησαν την μικροβιακή ανάπτυξη Εντεροβακτηρίων σε σύγκριση με τη συσκευασία υπό κενό. Από τις δύο τροποποιημένες ατμόσφαιρες, το μείγμα αερίων M1 ήταν πιο αποτελεσματικό για την αναστολή της ανάπτυξης μεσόφιλων βακτηρίων. Τέλος, με βάση κυρίως την αισθητηριακή αξιολόγηση, η χρήση και των δύο συνθηκών MAP επέκτεινε τη διάρκεια ζωής του Ανθότυρου που αποθηκεύτηκε στους 4°C για 10 ημέρες (M1) ή για 20 ημέρες (M2) συγκριτικά με το VP και 2 ημέρες (M1) ή 4 ημέρες (M2) στους 12°C, με το τυρί να διατηρεί καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Georgia Papaioannou, 2005).

4.4.7.5 Επίδραση ανταγωνιστικής χλωρίδας

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η επίδραση της ανταγωνιστικής χλωρίδας έναντι ενός μικροοργανισμού, εξαρτάται τόσο από τον ίδιο τον μικροοργανισμό και το τρόφιμο στο οποίο ανευρίσκεται όσο και από τον μικροοργανισμό ή την μίξη των μικροοργανισμών που θα δράσουν ανταγωνιστικά.

Σε τυριά τυρογάλακτος δεν έχουν πραγματοποιηθεί ιδιαίτερες έρευνες όσον αφορά αυτό το κομμάτι για την *Escherichia coli*. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει μελέτες σε γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα όπου φαίνεται ότι η ύπαρξη ανταγωνιστικής χλωρίδας και κυρίως μίξεις μικροοργανισμών μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη της *Escherichia coli*. Κρίσιμης σημασίας για αυτή την αναστολή αποτελούν και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπου λόγω του γαλακτικού οξέος που παράγουν και μειώνεται το pH, δυσχεραίνεται η ανάπτυξη του παθογόνου.

4.4.8 *Escherichia coli* στα τυριά τυρογάλακτος

Στην περίπτωση τόσο των τυριών γενικά όσο και των τυριών τυρογάλακτος, η εξέλιξη των εντεροπαθογόνων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικοί είναι το είδος του τυριού, ο αρχικός πληθυσμός τους στο γάλα, το στέλεχος του μικροοργανισμού, ο τύπος και η ποσότητα (αν χρησιμοποιηθεί) της οξυγαλακτικής καλλιέργειας, η τεχνολογία του τυριού, το pH, το αλάτι, η θερμοκρασία και η διάρκεια ωρίμανσης. Στελέχη της *Escherichia coli* και πιο συγκεκριμένα της *E. coli* O157:H7, έχουν απομονωθεί συχνά από νωπό γάλα και διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ περισσότερες από τις επιδημίες στις οποίες τα εμπλεκόμενα προϊόντα ήταν γαλακτοκομικά οφείλονταν

στην κατανάλωση είτε νωπού γάλακτος και προϊόντων που είχαν παρασκευαστεί από νωπό γάλα, είτε σε μεταπαστεριωτική μόλυνση.

Η παστερίωση του γάλακτος θανατώνει περισσότερα από 10^4 κύτταρα *E. coli* O157:H7 ανά ml γάλακτος (Αντώνιος Ι. Μάντης, 2015). Δεδομένης της ικανότητας της παστερίωσης να αδρανοποιεί τους πληθυσμούς της *E. coli* O157:H7 που μπορεί να υπάρχουν στο νωπό γάλα, προβλήματα για τη Δημόσια Υγεία μπορεί να προκύψουν κατά την τυροκόμηση μολυσμένου απαστερίωτου γάλακτος ή σε περιπτώσεις ατελούς παστερίωσης του γάλακτος ή μεταπαστεριωτικής μόλυνσης του γάλακτος ή του τυριού κατά την ωρίμανση. Αναφορικά με τα τυριά τυρογάλακτος λόγω της υψηλής θέρμανσης που υποβάλλεται το τυρόγαλο, ακόμη και απαστερίωτο ή επιμολυσμένο να ήταν το γάλα ή το τυρί από το οποίο προήρθε, οι περισσότερες πιθανότητες, αν ανευρεθεί *Escherichia coli*, είναι να οφείλεται σε επιμόλυνση από το προσωπικό ή από μολυσμένο νερό κατά τα στάδια της τυροκόμησης. Η υγιεινή του προσωπικού που απασχολείται στην παραγωγή έχει ιδιαίτερη σημασία, για αυτό και θα πρέπει να υποβάλλεται σε ειδική εκπαίδευση και ελέγχους.

4.5 *Salmonella* spp.

4.5.1 Ιστορικά στοιχεία

Ο Budd το 1874 ήταν ο πρώτος που συμπέρανε ότι ο τυφοειδής πυρετός μεταδιδόταν μέσω του νερού και των τροφίμων. Η *Salmonella typhi*, ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου, ανακαλύφθηκε από τον Eberth το 1880 και απομονώθηκε το 1884 από τον Gaffky. Η *Salmonella cholerae-suis* απομονώθηκε από χοίρους που είχαν διαγνωστεί κλινικά με χολέρα γουρουνιού (Salmon και Smith, 1885). Το όνομα του γένους επινοήθηκε από τον Lignieres το 1900 προς τιμήν του έργου του Dr Salmon, ο οποίος ασχολήθηκε επισταμένως με τον μικροοργανισμό. Το πρώτο εργαστηριακά επιβεβαιωμένο ξέσπασμα τροφιμογενούς σαλμονέλλωσης αφορούσε 57 άτομα που κατανάλωσαν κρέας από νοσούσα αγελάδα (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Επίσης, η *Salmonella enteritidis* απομονώθηκε από τα όργανα ενός θύματος που είχε καταναλώσει μολυσμένο κρέας, καθώς και από το ίδιο το κρέας και το αίμα του ζώου. Έκτοτε, οι σαλμονέλες έχουν αναγνωρισθεί ως κύρια αιτία εντερικού πυρετού και γαστρεντερίτιδας και αποτελούν έναν από τους κύριους και σημαντικότερους μικροοργανισμούς που απασχολούν τις βιομηχανίες τροφίμων αλλά και τους ίδιους τους

καταναλωτές σε οικιακό επίπεδο χειρισμού των τροφίμων.

4.5.2 Ταξινόμηση - Χαρακτηριστικά

Η *Salmonella* είναι ένας μικροοργανισμός που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, τα μέλη της οποίας χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, χωρίς έλυτρο ραβδόμορφα βακτήρια. Παρόλο που τα μέλη του γένους μπορούν να κινούνται με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων, υπάρχουν και παραλλαγές χωρίς μαστίγια, όπως τα *S. enterica*, ορότυποι *Pullorum* και *Gallinarum*, καθώς και μη κινητά στελέχη τα οποία προκύπτουν λόγω δυσλειτουργικών μαστιγίων.

Επίσης, οι σαλμονέλλες είναι χημειοοργανότροφες (ικανές να χρησιμοποιούν ένα μεγάλο εύρος οργανικών υποστρωμάτων), με την ικανότητα να μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά μέσω του αναπνευστικού και του ζυμωτικού μονοπατιού (Thomas J. Montville, 2010). Παράγουν οξύ και μερικές φορές αέριο από τη γλυκόζη, είναι συνήθως αρνητικές στην οξειδάση και την καταλάση, δεν αποικοδομούν τη λακτόζη και τη σακχαρόζη, ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη και χρησιμοποιούν κιτρικά ιόντα ως πηγή άνθρακα. Γενικώς, αυτά τα βακτήρια παράγουν υδρόθειο, αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και την ορνιθίνη και δεν υδρολύουν την ουρία.

Σύμφωνα με το Κέντρο Συνεργασίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO) για την Αναφορά και την Έρευνα στη *Salmonella* (Ινστιτούτο Παστέρ, Παρίσι, Γαλλία), οι *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori* περιλαμβάνουν 2.443 και 20 ορότυπων, αντίστοιχα. Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει αυτά τα δύο είδη καθένα από τα οποία περιλαμβάνει διαφορετικούς ορότυπους. Το κυριότερο παθογόνο είδος είναι η *Salmonella enterica* που διαιρείται σε ορότυπους (serovar), πχ *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (ή αλλιώς *Salmonella Typhimurium*) και *Salmonella Enteritidis*, η *Salmonella Typhi*, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με τη βοήθεια των τύπων φάγων. Αυτοί οι ορότυποι περιγράφονται με έναν αριθμό π.χ. *Salmonella Typhimurium* DT 140 ή ένα όνομα (π.χ. *Salmonella Λονδίνου* ή *Salmonella Μαδρίτης*) το οποίο απεικονίζει το όνομα της πόλης όπου η *Salmonella* απομονώθηκε αρχικά. Είναι σημαντικής σημασίας ότι ορισμένοι ορότυποι είναι ιδιαίτερα παθογόνοι για τους ανθρώπους. Όσον αφορά την ορολογική ταυτοποίηση, ο σκοπός των διαδικασιών ορολογικού ελέγχου είναι ο προσδιορισμός των πλήρων αντιγονικών τύπων των μεμονωμένων στελεχών *Salmonella*. Στα αντιγονικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται: οι σωματικοί (O) λιποπολυσακχαρίτες (LPS) της εξωτερικής επιφάνειας της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης, τα αντιγόνα του

μαστιγίου (H) που συνδέονται με το περίτριχο μαστίγιο και το αντιγόνο της κάψουλας (έλκτρου) (Vi – [από τη λέξη “virulence”-μολυσματικό]), το οποίο συναντάται μόνο στους ορότυπους *Typhi*, *Paratyphi C* και *Dublin* (Thomas J. Montville, 2010).

4.5.3 Καλλιέργεια

Για τον προσδιορισμό των βακτηρίων του γένους *Salmonella* στα τρόφιμα με κλασική μικροβιολογική μέθοδο, απαιτούνται διάφορα στάδια και είναι περίπλοκος, εξαιτίας του χαμηλού αριθμού τους σε σύγκριση με την λοιπή μικροβιακή χλωρίδα. Τα στάδια περιλαμβάνουν τον προεμπλουτισμό, τον εμπλουτισμό, τον προσδιορισμό σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, την απομόνωση πιθανών καλλιεργειών σαλμονελλών και τις επιβεβαιωτικές δοκιμές με βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές. Ο προεμπλουτισμός στοχεύει στην επαναδραστηριοποίηση των κυττάρων που έχουν τραυματιστεί κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του τροφίμου και συνήθως χρησιμοποιείται ο θρεπτικός ζωμός Lactose Broth, ενώ ο εμπλουτισμός στοχεύει στην αύξηση του αριθμού των σαλμονελλών με τη χρήση εκλεκτικού υποστρώματος, συνήθως του Selenite Cystine Broth ή Tetrathionate Broth με προσθήκη ποσότητας διαλύματος ιωδίου/ιωδιούχου καλίου και brilliant green. Για την ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών χρησιμοποιούνται υποστρώματα Brilliant Green Agar, *Salmonella Shigella* Agar και Bismouth Sulfite Agar.

4.5.4 Προέλευση

Οι σαλμονέλλες απαντώνται παγκοσμίως και αποτελούν πολύ σημαντικό παθογόνο για την παγκόσμια τροφική αλυσίδα. Τα βακτήρια της *Salmonella* αποτελούν μέρος του μικροβιώματος του εντέρου καθώς και των κοπράνων ζώων και ανθρώπων. Αυτός είναι και ένας λόγος όπου λόγω κακών υγιεινών χειρισμών από τους εργαζόμενους κατά την επεξεργασία τροφίμων, είναι εύκολη η επιμόλυνση τους.

Η εμφάνιση της *Salmonella* παρατηρήθηκε αρχικά στα βοοειδή και επεκτάθηκε και σε άλλα ζώα μέσω των περιττωμάτων και των λυμάτων. Σήμερα, συναντάται συχνότερα στα πουλερικά, στα αυγά και στους χοίρους, ενώ περιβαλλοντικές πηγές του μικροοργανισμού περιλαμβάνουν το νερό, το χώμα, τα έντομα, τις επιφάνειες των κουζινών και των μονάδων επεξεργασίας, τα περιττώματα ζώων, τα ακατέργαστα κρέατα, τα πουλερικά και τα θαλασσινά.

Όσον αφορά το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, κυρίως φορέας κρουσμάτων σαλμονέλλωσης αποτελεί το νωπό γάλα και η μετέπειτα εκμετάλλευση του για άλλα προϊόντα.

Συνήθως, το γάλα μολύνεται μέσω του μαστού και των θηλών των γαλακτοπαραγωγικών ζώων ή μέσω των χειριστών του γάλακτος και σπανιότερα από λοιμώξεις των ζώων. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν αναγνωριστεί ως μέσα επιμόλυνσης του ανθρώπου από σαλμονέλλες είναι η σκόνη γάλακτος, όλων των ειδών τα τυριά, το παγωτό και σπανιότερα το βούτυρο (Marth, 1983).

4.5.5 Ασθένεια

Τροφική δηλητηρίαση από *Salmonella* μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως ο εντερικός (τυφοειδής) πυρετός, η απλή εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Η πρόσδεση και εισβολή της *Salmonella* σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου έχει την ικανότητα για έκκριση διαρροϊκών εντεροτοξινών: (α) Τυφοειδής (εντερικός) πυρετός: διάρροια με διαρκή πυρετό, κοιλόπονος, κεφαλόπονος και πλήρη σωματική εξάντληση, με χρόνο επώασης 7-28 μέρες, ενώ αντιμετωπίζεται με αντιβίωση και (β) Εντεροκολίτιδα: μη αιματώδη διάρροια, κοιλόπονος, με χρόνο επώασης 8-72 ώρες. Επιπλέον, η *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει χρόνιες καταστάσεις, όπως ασηπτική αρθρίτιδα, σύνδρομο Reiter και αγκυλωτική σπονδυλίτιδα.

Ένας πολύ κρίσιμος παράγοντας που συμβάλλει στην σημαντικότητα της τροφικής δηλητηρίασης από *Salmonella*, είναι ότι η κατανάλωση έστω και λίγων κυττάρων μπορεί να είναι μολυσματική. Άλλωστε, αυτό φαίνεται και από την μηδενική ανοχή (απουσία σε 25g τροφίμου) του Κανονισμού 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

4.5.6 Παθογένεια

Οι σαλμονέλλες έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στο λεπτό έντερο και να πολλαπλασιάζονται εντός του. Στην συνέχεια, διεισδύουν στον ειλεό (τελικό τμήμα του λεπτού εντέρου) και σε μικρότερο βαθμό στο κόλον, όπου εμφανίζεται μια φλεγμονώδης αντίδραση. Τα λεμφοειδή ωσθυλάκια μπορεί να διογκωθούν, όπως επίσης και οι μεσεντερικοί όζοι. Οι σαλμονέλλες μερικές φορές υπερκαλύπτουν τους βλεννογόνους και λεμφικούς φραγμούς και φτάνουν στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας αποστήματα. Η εγκατάσταση μιας μόλυνσης από *Salmonella* στον άνθρωπο εξαρτάται από την ικανότητα του βακτηρίου να προσδένεται (αποίκιση) και να εισέρχεται (εισβολή) στα εντερικά κύτταρα. Η σαλμονέλλα πρέπει να ανταγωνιστεί με επιτυχία την υπάρχουσα μικροχλωρίδα του εντέρου ώστε να εντοπίσει τις κατάλληλες περιοχές πρόσδεσης πάνω στο τοίχωμα του

εντέρου. Όταν είναι σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα, η *Salmonella* παράγει πρωτεϊνούχες αποφύσεις στην επιφάνεια των κυττάρων της. Έπειτα από τη βακτηριακή πρόσδεση, η ανταλλαγή σημάτων μεταξύ του παθογόνου και του κυττάρου ξενιστή οδηγεί στην εισβολή της *Salmonella* στα εντερικά κύτταρα (Thomas J. Montville, 2010). Κάποια στελέχη του βακτηρίου, όπως η *Salmonella typhi*, διεισδύουν στον εντερικό βλεννογόνο, περνούν το λεμφικό σύστημα και ρέουν μέσω φαγοκυττάρων, στα οποία πολλαπλασιάζονται. Αργότερα, αυτά τα βακτήρια εισέρχονται ξανά στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας σηψαιμία. Από ιστολογικής άποψης, η εισβολή της *Salmonella* χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία πτυχώσεων στις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) των επιθηλιακών κυττάρων και των φαγοκυττάρων. Η διάρροια που συνδέεται με τη σαλμονέλλα φαίνεται ότι προκαλείται περισσότερο ως αντίδραση στη βακτηριακή εισβολή στα εντερικά κύτταρα παρά ως η δράση μιας πιθανής εντεροτοξίνης.

4.5.7 Ευαισθησία και ανθεκτικότητα της *Salmonella spp.* σε φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες

4.5.7.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η *Salmonella spp.* παρουσιάζει ένα πολύ μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει ακόμα και σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και αυτός είναι ένας λόγος που την καθιστά αρκετά επικίνδυνη για τα τρόφιμα. Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι πολύ σημαντική για τα τρόφιμα τα οποία αποθηκεύονται στο ψυγείο. Ο ρυθμός ανάπτυξης της σαλμονέλας μειώνεται σημαντικά στους $1\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η ανάπτυξη των περισσότερων σαλμονελλών αποτρέπεται στους $7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η αργή αλλά σταθερή ανάπτυξη της σε τρόφιμα που αποθηκεύονται για παρατεταμένες περιόδους σε θερμοκρασίες ψυγείου προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία και για αυτό κρίνεται σκόπιμη η τοποθέτηση αυτών των ευπαθών τροφίμων σε θερμοκρασίες κάτω από την ελάχιστη για ανάπτυξη, έτσι ώστε να αυξηθεί η ασφάλεια.

Επίσης, η *Salmonella* μπορεί να επιβιώνει για παρατεταμένες περιόδους σε τρόφιμα που βρίσκονται αποθηκευμένα σε θερμοκρασίες κατάψυξης ή δωματίου. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τροφίμων στην κατάψυξη, όπως η σύνθεση του υποστρώματος, η κινητική της διαδικασίας ψύξης, η φυσιολογία της τροφογενούς σαλμονέλας, οι αντιδράσεις του

κάθε ορότυπου σε διαφορετικές συνθήκες. Αν και η κατάψυξη για πολλά βακτήρια θεωρείται επιζήμια, δεν εγγυάται την ασφάλεια καθώς ορισμένα κύτταρα της *Salmonella* καταστρέφονται, αλλά παραμένει επαρκής αριθμός κυττάρων ικανός για να μολύνει το τρόφιμο μετά το ξεπάγωμα.

Από την άλλη μεριά, οι σαλμονέλλες παρουσιάζουν ευαισθησία στη θερμότητα και τα ανθεκτικά στελέχη είναι ελάχιστα. Ένα παράδειγμα είναι το στέλεχος 775W της *Salmonella senftenberg* η οποία παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα σε τρόφιμα με υψηλή υγρασία. Η αντίσταση στη θερμότητα επηρεάζεται από το ποσοστό υγρασίας του τροφίμου, τη φύση των διαλυμένων ουσιών και το pH. Μελέτες σε διάφορα τρόφιμα έχουν αποκαλύψει ότι καθώς μειώνεται η ενεργότητα νερού του υποστρώματος (τροφίμου) που θερμαίνεται, η θερμοανθεκτικότητα της *Salmonella spp.* αυξάνεται, ενώ η μείωση του pH μειώνει την αντίσταση στη θερμότητα.

Στα τυριά τυρογάλακτος τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία άνω της θερμοκρασίας καταστροφής της τυπικής *Salmonella* και αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψύξης, είναι σπάνια η επιβίωση του βακτηρίου. Παρόλα αυτά, η πολύ συχνή διασταυρούμενη επιμόλυνση μετά τη διαδικασία της θέρμανσης κατά τα στάδια επεξεργασίας και συσκευασίας είναι ένα φαινόμενο το οποίο σε συνδυασμό με την απευθείας κατανάλωση, χωρίς μαγείρεμα, των τυριών αυτών, συμβάλλει στην πιθανότητα παρουσίας του βακτηρίου. Πολύ σημαντική είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης των τυριών τυρογάλακτος να μην ξεπερνά αυτήν της ψύξης καθώς και να μην υπάρχουν διακυμάνσεις κατά τη μεταφορά και διανομή τους. Μελέτη της Erica Tirloni και των συνεργατών της το 2021 για τη δημιουργία ενός προγνωστικού μοντέλου για την ανάπτυξη της *Salmonella spp.* στο ιταλικό τυρί τυρογάλακτος Ricotta, διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο στους 10,3 °C αυξήθηκε κατά μέσο όρο από 2,91 log CFU/g σε 5,54 log CFU/g σε 238 ώρες, στους 13,4 °C από 3,88 log CFU/g σε 7,66 log CFU/g σε 92 ώρες, ενώ , στους 20,6 °C από 4,04 log CFU/g σε 7,98 log CFU/g σε 91 ώρες (Erica Tirloni, 2021).

4.5.7.2 Επίδραση της οξύτητας-pH

Η προσαρμοστικότητα της *Salmonella spp.* φαίνεται και από την ικανότητα που έχει να αναπτύσσεται σε τιμές που κυμαίνονται από 4,5 έως 9,5, με βέλτιστες τιμές από 6,5 έως 7,5. Παρόλα αυτά, υπάρχει και καταγραφή ανάπτυξης σε χαμηλότερο pH 3,8 (Keng Chee Chung, 1970). Καθώς το pH υπερβαίνει το βέλτιστο ή πέφτει κάτω από αυτό, ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου μειώνεται και μπορεί να επέλθει ακόμη και θάνατος όταν ξεπεραστούν οι

ακραίες τιμές.

Είναι σημαντικό, πως η φύση του οξέος που θα χρησιμοποιηθεί ή θα δημιουργηθεί σε ένα τρόφιμο επηρεάζει κατά πολύ το ελάχιστο pH στο οποίο ξεκινά η ανάπτυξη. Το προπιονικό και το οξικό οξύ παρουσιάζονται ως πιο βακτηριοκτόνα από ότι το κοινό γαλακτικό και κιτρικό οξύ που σχετίζεται με τα τρόφιμα. Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση των οργανικών οξέων μειώνεται καθώς αυξάνεται το μήκος αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Όσον αφορά τα τυριά τυρογάλακτος με pH γύρω στο 6, φαίνεται πως αποτελούν βέλτιστη συνθήκη για ανάπτυξη της *Salmonella spp.*

4.5.7.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού a_w – άλατος

Η ενεργότητα νερού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των σαλμονελλών. Το κατώτερο όριο ανάπτυξης είναι 0,93, ενώ ιδανική τιμή παρουσιάζεται η 0,99. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να επιβιώσει ακόμα και σε διάστημα ενός χρόνου ή και περισσότερο σε τρόφιμα με χαμηλή a_w . Παρόλα αυτά, είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα περισσότερα είδη της *Salmonella spp.* δεν επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Αν και το βακτήριο παρεμποδίζεται γενικά από την παρουσία 3 έως 4% NaCl, η ανθεκτικότητά του στα άλατα αυξάνει καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία σε εύρος από 10 έως 30 °C. Η σαλμονέλλες, λοιπόν, έχουν ικανότητα ανάπτυξης υπό όξινες συνθήκες ή σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας με αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως είναι φανερό, η υψηλή ενεργότητα ύδατος σε συνδυασμό με το μειωμένο έως και καθόλου προστιθέμενο NaCl στα τυριά τυρογάλακτος, αποτελούν ακόμα έναν παράγοντα συμβολής στην παρουσία της *Salmonella spp.* σε αυτά.

4.5.7.4 Επίδραση αερίων

Η *Salmonella spp.* είναι αερόβιος ή προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, γεγονός το οποίο δυσκολεύει τον έλεγχο αναστολής της ανάπτυξης του. Ο προβληματισμός λόγω της ικανότητας του να επιβιώνει κάτω από ακραίες τιμές θερμοκρασίας, pH, και αλατότητας, οξύνεται από την ευρεία διάδοση των συντηρούμενων υπό ψύξη τροφίμων, τα οποία συσκευάζονται υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ώστε να παραταθεί η διάρκεια ζωής τους. Επιβράδυνση της ανάπτυξης της *Salmonella spp.* μπορεί να γίνει με αέρια μίγματα που περιέχουν από 60 έως 80 % w/w CO_2 με διάφορες αναλογίες N_2 και/ή O_2 .

Σε τυριά τα οποία έχουν υψηλά επίπεδα αλάτων η συμβολή της τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή του κενού είναι μηδαμινή καθώς οι αναερόβιες συνθήκες μπορούν να

ενισχύσουν την ανθεκτικότητα της *Salmonella* στα άλατα (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1988). Στα τυριά τυρογάλακτος από την άλλη, η συσκευασία υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα φαίνεται πως μπορεί να μειώσει έως ένα βαθμό την ανάπτυξη της.

4.5.7.5 Επίδραση ανταγωνιστικής χλωρίδας

Η ύπαρξη ανταγωνιστικής χλωρίδας μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της *Salmonella spp.*, αναλόγως βέβαια και με τους παράγοντες που ήδη έχουν αναφερθεί και στους άλλους μικροοργανισμούς. Σημαντικής σημασίας όσον αφορά τη μείωση ανάπτυξης των σαλμονελλών στη γαλακτοβιομηχανία, για ακόμα μία φορά, φαίνεται να παρουσιάζουν τα γαλακτικά βακτήρια. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να επηρεάσει περισσότερο την ευαισθησία της *Salmonella* είναι το είδος του οξέος και οι βακτηριοσίνες που θα παραχθούν από την οξυγαλακτική καλλιέργεια. Όσο μεγαλύτερο ποσοστό οξικού οξέος παράγεται, τόσο καλύτερα είναι τα αποτελέσματα για την επιβράδυνση της ανάπτυξης του βακτηρίου. Επομένως, το είδος και ο συνδυασμός των γαλακτικών βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν στο τυρί αποτελούν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη μοίρα της *Salmonella spp.* Τα τυριά τυρογάλακτος στερούνται οξυγαλακτικής καλλιέργειας και αυτός είναι ένας επιπρόσθετος λόγος πιθανής παρουσίας του μικροοργανισμού σε αυτά.

4.5.8 *Salmonella spp.* στα τυριά τυρογάλακτος

Η κατανάλωση μολυσμένου νωπού γάλακτος, τυριού και βουτύρου υπήρξε πολλές φορές στο παρελθόν αιτία προσβολής σαλμονελλών και τροφικών δηλητηριάσεων. Η εφαρμογή της παστερίωσης έχει συμβάλει κατά πολύ στην μείωση των περιστατικών αυτών. Παρόλα αυτά, η μεταπαστεριωτική μόλυνση του γάλακτος και των προϊόντων του είναι αυτή που ευθύνεται στο μεγαλύτερο βαθμό για περιστατικά τροφικών λοιμώξεων. Αρκετά κρούσματα σαλμονέλωσης λόγω κατανάλωσης μολυσμένου τυριού έχουν αποδοθεί σε λανθασμένο έλεγχο της διαδικασίας τυροκόμησης ή χρήση μολυσμένου νωπού γάλακτος. Η εξέλιξη των σαλμονελλών στα τυριά εξαρτάται από τις συνθήκες παρασκευής, ωρίμανσης και διατήρησής τους. Στα φρέσκα τυριά που το pH είναι χαμηλό, περίπου 4,4 έως 4,5, δεν επιβιώνουν, ενώ αντίθετα σε υψηλότερα pH όχι μόνο επιβιώνουν αλλά και αναπτύσσονται.

Στην περίπτωση των τυριών τυρογάλακτος που το pH είναι ακόμα υψηλότερο και το τυρόγαλα αναθερμαίνεται, υπάρχει ταχεία ανάπτυξη, ώστε μια επιμόλυνση της τάξης των 100 CFU/ml στο τυρόγαλα της τυροκόμησης να φθάσει στις 10⁴ CFU/ml στο τυρόπηγμα

(Ανυφαντάκης, 2004). Επίσης, σημασία έχει και το μέγεθος της αρχικής επιμόλυνσης, όπου όταν υπάρχουν στο γάλα σε μεγάλο αριθμό, $>10^5$ CFU/ml, επιβιώνει και αναπτύσσεται και στο τυρί. Αρκετές είναι οι φορές που κατσικίσια τυρία και το τυρί Cheddar έχουν κατηγορηθεί για παρουσία σαλμονέλλας και την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων. Τα ελληνικά τυριά τυρογάλακτος συνηθέστερα παρασκευάζονται από κατσικίσιο τυρόγαλο, ενώ ξένα τυριά τυρογάλακτος από τυρόγαλο που έχει δημιουργηθεί κατά την παρασκευή τυριού Cheddar. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να συσχετιστεί με την πιθανή παρουσία *Salmonella spp.* στα τυριά τυρογάλακτος, ωστόσο όμως κύρια πηγή επιμόλυνσης αυτών αποτελεί η μεταπαστεριωτική μεταχείριση, δηλαδή οι κακές συνθήκες υγιεινών πρακτικών κατά τα στάδια επεξεργασίας και συσκευασίας.

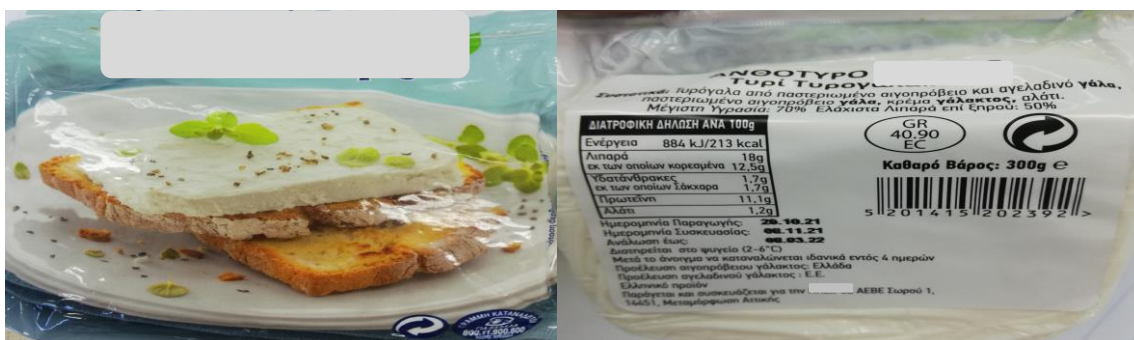
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος και κατά πόσο τα μεταβολικά προϊόντα αυτών μπορούν να αυξήσουν την οξύτητα του τροφίμου-υποστρώματος, έτσι ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κλασσικές άμεσες μικροβιολογικές αναλύσεις για την ανίχνευση και αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και για την απομόνωσή τους. Η δημιουργία " τράπεζας" των απομονωμένων οξυγαλακτικών αποικιών, η επακόλουθη ταυτοποίηση αυτών καθώς επίσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων οργανικών οξέων, μέσω της χρήσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC, θα αποτελέσουν αντικείμενο έρευνας με σκοπό την εξακρίβωση της πιθανότητας τα οξυγαλακτικά βακτήρια να μειώνουν την συγκέντρωση παθογόνων μικροοργανισμών και πιο συγκεκριμένα της *Listeria monocytogenes*. Επιπλέον, θα δοθεί η δυνατότητα να αποδοθεί ακριβές συμπέρασμα για την ποσότητα, τον πιθανό συνδυασμό και το είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να εκπληρώσουν τον σκοπό αυτό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΓΑΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

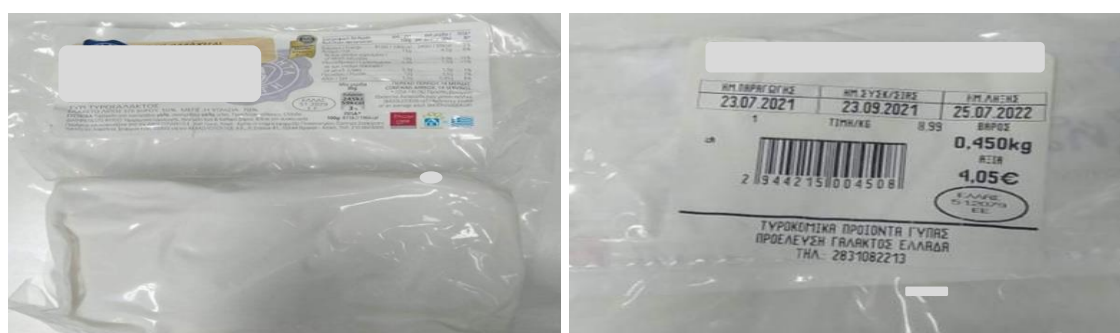
Για τη διεξαγωγή του πειράματος πάρθηκαν από την αγορά 7 δείγματα, 2 δείγματα Μυζήθρας και 5 Ανθότυρου και δόθηκαν κωδικές ονομασίες C₀, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ και C₆. Από το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε ένα κομμάτι αυτού για τη μέτρηση του pH του, ένα για την μικροβιολογική ανάλυση και το υπόλοιπο σφραγίστηκε καλά, μπήκε σε αποστειρωμένες σακούλες και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους -80°C.

Το τυρί με κωδική ονομασία C₀ είναι Ανθότυρος (αιγοπρόβειος και αγελαδινός) με ημερομηνία παραγωγής 20/10/2021, ημερομηνία συσκευασίας 8/11/2021 και ημερομηνία λήξης 8/3/2022.



Εικόνα 5.1: Ανθότυρος C₀

Το τυρί με κωδική ονομασία C₁ είναι Μυζήθρα (αιγοπρόβεια) με ημερομηνία παραγωγής 23/7/2021, ημερομηνία συσκευασίας 23/9/2021 και ημερομηνία λήξης 25/7/2022.



Εικόνα 5.2: Μυζήθρα C₁

Το τυρί με κωδική ονομασία C₂ είναι Ξυνομυζήθρα (αιγοπρόβεια) με ημερομηνία παραγωγής 29/5/2021, ημερομηνία συσκευασίας 29/7/2021 και ημερομηνία λήξης 30/5/2022.



Εικόνα 5.3: Ξινομυζήθρα C2

Το τυρί με κωδική ονομασία C3 είναι Ανθότυρος (αιγοπρόβειος) με ημερομηνία παραγωγής 23/11/2021 και ημερομηνία λήξης 18/12/2021.



Εικόνα 5.4: Ανθότυρος C3

Το τυρί με κωδική ονομασία C4 είναι Ανθότυρος (αγελαδινός ή αιγοπρόβειος) με ημερομηνία συσκευασίας 9/11/2021 και ημερομηνία λήξης 8/1/2022.



Εικόνα 5.5: Ανθότυρος C4

Το τυρί με κωδική ονομασία C5 είναι Ανθότυρος (κατσικίσιος) με ημερομηνία παραγωγής 15/11/2021, ημερομηνία ζύγισης 10/12/2021 και ημερομηνία λήξης 15/12/2021.



Εικόνα 5.6: Ανθότυρος C5

Το τυρί με κωδική ονομασία C6 είναι Ανθότυρος (αγοπρόβειος) με ημερομηνία παραγωγής 1/12/2021, ημερομηνία ζύγισης 10/12/2021 και ημερομηνία λήξης 1/1/2022.



Εικόνα 5.7: Ανθότυρος C6

5.1 Ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων

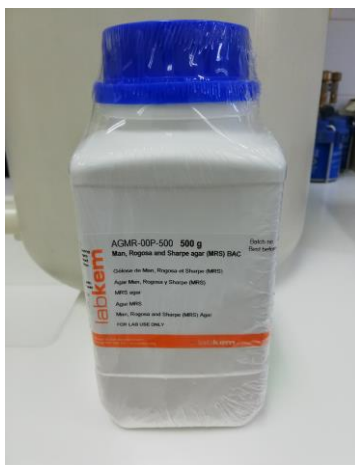
5.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

Για την ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα της Μυζήθρας και του Ανθότυρου, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα MRS Agar. Δεν υπάρχει θρεπτικό υπόστρωμα ούτε μέθοδος που να επιτρέπουν την αρίθμηση όλων των ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων που μπορεί να υπάρχουν σε ένα τρόφιμο. Όλα τα υποστρώματα έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτρέπουν, κυρίως, την ανάπτυξη των λακτοβακίλλων και σε μικρότερο ποσοστό, ειδών των *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Micrococcus* και *Streptococcus*.

Εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε έτοιμο MRS Agar σε μορφή σκόνης, όπου για την παρασκευή του απαιτούνται 62 gr αυτού για 1000 ml νερό και το οποίο έχει pH 6,0-6,4 στους 25°C. Το υλικό ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και προστέθηκε μαζί με 1000ml απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι διαλύσεως όλων των συστατικών και έως ότου το διάλυμα καταστάθηκε απόλυτα διαυγές. Το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121,1 °C, για 15 min.



Εικόνα 5.8: Κλίβανος υγρής αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 5.9: Σκόνη MRS Agar που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 5.10: MRS Agar αμέσως μετά την παρασκευή και πήξη του.

5.1.2 Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

Για τις δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων τυριού χρησιμοποιήθηκε ισότονο αραιωτικό υγρό APHA. Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν 34,0 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) σε 500,0 ml απιονισμένο νερό. Έγινε διόρθωση

του pH στο 7,2 και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000,0 ml. Αποστειρώθηκε στους 121,1°C, για 15 min και διατηρήθηκε στο ψυγείο. Για το κυρίως αραιωτικό διάλυμα παρελήφθησαν 1,25 ml μητρικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 1000,0 ml. Συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000,0 ml και έπειτα έγινε αποστείρωση στους 121,1°C, για 15 min .

Ακολούθως, κόπηκε κομμάτι τυριού 10 γραμμαρίων, από το κάθε δείγμα, με αποστειρωμένο μαχαίρι και ζυγίστηκε, σε αναλυτικό ζυγό, μέσα σε αποστειρωμένη σακούλα Bag Filter, η οποία περιείχε 90 ml από το ισότονο αραιωτικό υγρό. Η Bag Filter σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε για μηχανική ανακίνηση στο Stomacher για 30 sec έτσι ώστε να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Η σύνθλιψη και ομογενοποίηση των δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη για την απελευθέρωση των μικροβίων και την ισομερή, όσο είναι δυνατό, κατανομή τους μέσα στο αραιωτικό υγρό. Το περιεχόμενο της Bag Filter αποτελεί την πρώτη αραιώση του δείγματος (10^{-1}). Έπειτα, έγινε λήψη ασηπτικά με πιπέτα 1 ml και τοποθέτηση σε σωλήνα που περιείχε 9,0 ml ισότονο αραιωτικό υγρό και έτσι δημιουργήθηκε η δεύτερη αραιώση (10^{-2}). Από την αραιώση αυτή παρασκευάστηκε η επόμενη δεκαδική αραιώση (10^{-3}) και η διαδικασία επαναλήφθηκε διαδοχικά μέχρι την τελική πέμπτη αραιώση (10^{-5}).

Πριν από την κάθε λήψη δείγματος από τα φιαλίδια πραγματοποιήθηκε ανακίνηση της κάθε αραιώσης για 15 sec σε συσκευή ανακίνησης Vortex. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε καινούργιο τιπ της πιπέτας για κάθε παραλαβή δείγματος και γενικά τηρήθηκαν όλα όσα προβλέπονται για την ορθή παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων μέσα στα πλαίσια των σωστών χειρισμών της διαδικασίας.



Εικόνα 5.11: Συσκευή Stomacher και Bag Filters με την πρώτη δεκαδική αραιώση των δειγμάτων.

5.1.3 Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης

Για την ανίχνευση και μέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μάζα στερεού θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία, πραγματοποιήθηκε αρχικά η ρευστοποίηση του θρεπτικού υλικού που είχε παρασκευαστεί προηγουμένως. Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο που βράζει και ψύχθηκε στους 45-47 °C. Ακολούθως, έγινε προσθήκη 12-15 ml αυτού σε διπλή σειρά τρυβλίων για την κάθε αραιώση των δειγμάτων, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία ανακινήθηκαν προσεκτικά με περιστροφικές κινήσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις, καθώς επίσης και με σταυροειδείς κινήσεις και παρέμειναν σε απόλυτη οριζόντια θέση μέχρι την πλήρη σταθεροποίησή τους. Μετά την πήξη του υποστρώματος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός επιφανειακά με 0,1 ml ενοφθαλμίσματος από τις αντίστοιχες αραιώσεις. Με τη βοήθεια κεκαμμένης γυάλινης ράβδου εξαπλώθηκε το ενοφθάλμισμα επί της επιφανείας του υποστρώματος της κάθε αραιώσης. Πριν από κάθε χρήση της ράβδου, αυτή εμβαπτιζόταν σε αλκοόλη και έπειτα αποστειρωνόταν σε φλόγα από λύχνο. Στην συνέχεια, έγινε τοποθέτηση των τρυβλίων σε σακούλες, οι οποίες μπήκαν σε μηχάνημα vacuum για σφράγιση και δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 3 ημέρες.

Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα.



Εικόνα 5.12: Τρυβλία που έχουν επιστρωθεί επιφανειακά με τις δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων, κοντά σε περιοχή λύχνων.



Εικόνα 5.13: Μηχανή vacuum που χρησιμοποιήθηκε.



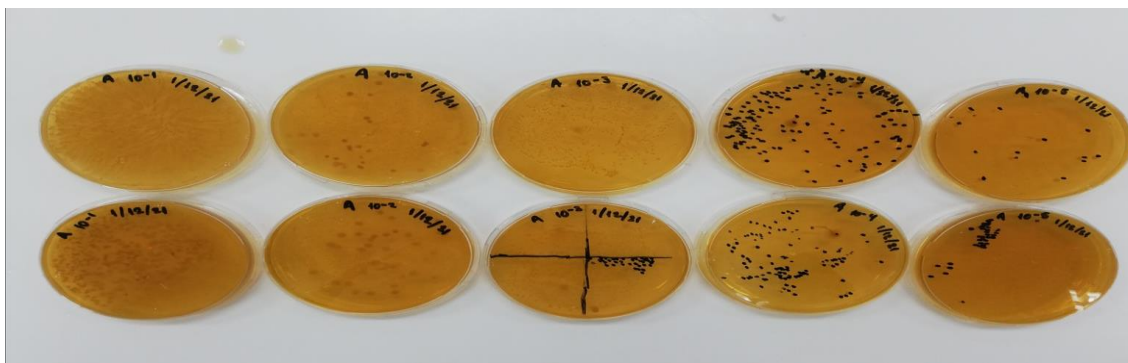
Εικόνα 5.14: Επιστρωμένα τρυβλία μέσα σε ειδικές σφραγισμένες σακούλες (αερόβιες συνθήκες).

5.1.4 Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μετά το πέρας της επώασης των δειγμάτων, η αρίθμηση των αποικιών έγινε με ειδικό μηχάνημα για την καταμέτρηση αποικιών, το οποίο φέρει μεγεθυντικό φακό και ειδικό φωτισμό. Αριθμήθηκαν όλες οι ορατές, με φακό, αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων, ακόμη και οι πιο μικρές και για τις δύο σειρές των αραιώσεων των δειγμάτων.



Εικόνα 5.15: Καταμετρητής αποικιών.



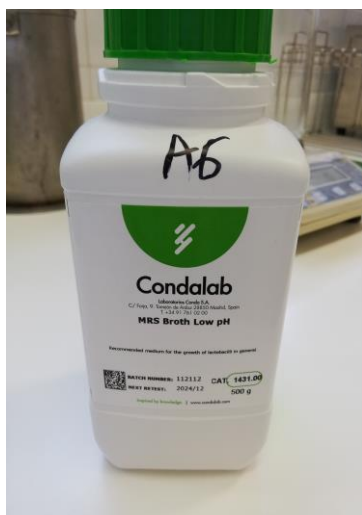
Εικόνα 5.16: Αριθμημένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγμα.

Η όλη διαδικασία της παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος, παρασκευής δεκαδικών αραιώσεων, μεθόδου επιφανειακής επίστρωσης και καταμέτρησης των αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε ακριβώς με τα ίδια βήματα στα δείγματα των τυριών και αμέσως μετά την αγορά τους αλλά και μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για περίπου 1,5 μήνα.

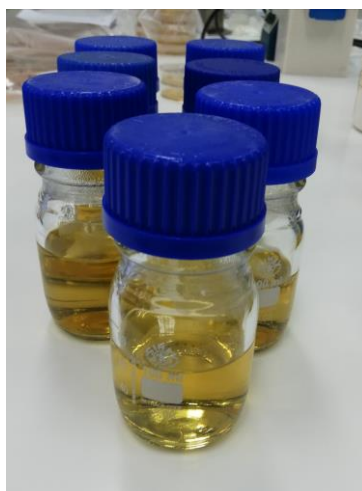
5.2 Καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων

5.2.1 Παρασκευή θρεπτικού ζωμού

Για την καλλιέργεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν και καταμετρήθηκαν από τα δείγματα της Μυζήθρας και του Ανθότυρου, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός MRS Broth. Εργαστηριακά χρησιμοποιήθηκε έτοιμο MRS Broth σε μορφή σκόνης, όπου για την παρασκευή του απαιτούνται 54 gr αυτού για 1000 ml νερό. Η σκόνη ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και προστέθηκε μαζί με 1000ml απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι διαλύσεως όλων των συστατικών και έως ότου το διάλυμα καταστάθηκε απόλυτα διαυγές. Ο θρεπτικός ζωμός τοποθετήθηκε σε μικρά φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης στους 121,1 °C, για 15 min.



Εικόνα 5.17: MRS Broth που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 5.18: Παρασκευασμένο MRS Broth.

5.2.2 Απομόνωση και καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η τελική επιλογή των τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω απομόνωση και καλλιέργεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έγινε σύμφωνα με τους κανόνες που έχει θεσπίσει η APHA (American Public Health Association). Έτσι, για την απομόνωση άλλα και την επιλογή του αριθμού των αποικιών των μικροβίων του κάθε δείγματος, επιλέχθηκε η κατάλληλη αραιώση. Ο αριθμός των αποικιών που επιλέχθηκε από κάθε αραιώση έγινε μετά από υπολογισμό της προσθήκης των αριθμών που προκύπτουν από τον υποδιπλασιασμό της τετραγωνικής ρίζας της κάθε καταμέτρησης. Πιο αναλυτικά, ο αριθμός αποικιών που πάρθηκε από το κάθε δείγμα ήταν ο εξής:

- Για το δείγμα C1, από την τέταρτη αραίωση: $\sqrt{109}/2 \approx 5$

⇒

$$\sqrt{148}/2 \approx 6$$

$$5 + 6 = 11 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C1 που δόθηκαν είναι: C101, C102, C103, C104, C105, C106, C107, C108, C109, C110 και C111.

- Για το δείγμα C2, από την τρίτη αραίωση: $\sqrt{91}/2 \approx 5$

⇒

$$\sqrt{78}/2 \approx 4$$

$$5 + 4 = 9 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C2 που δόθηκαν είναι: C201, C202, C203, C204, C205, C206, C207, C208 και C209.

- Για το δείγμα C3, από την τρίτη αραίωση: $\sqrt{156}/2 \approx 6$

⇒

$$\sqrt{111}/2 \approx 5$$

$$6 + 5 = 11 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C3 που δόθηκαν είναι: C301, C302, C303, C304, C305, C306, C307, C308, C309, C310 και C311.

- Για το δείγμα C4, από την τέταρτη αραίωση: $\sqrt{214}/2 \approx 7$

⇒

$$\sqrt{113}/2 \approx 5$$

$$7 + 5 = 12 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C4 που δόθηκαν είναι: C401, C402, C403, C404, C405, C406, C407, C408, C409, C410, C411 και C412.

- Για το δείγμα C5, από την πέμπτη αραίωση: $\sqrt{180}/2 \approx 7$

⇒

$$7 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C5 που δόθηκαν είναι: C501, C502, C503, C504, C505, C506 και C507.

- Για το δείγμα C6, από την τέταρτη αραίωση: $\sqrt{116}/2 \approx 5$

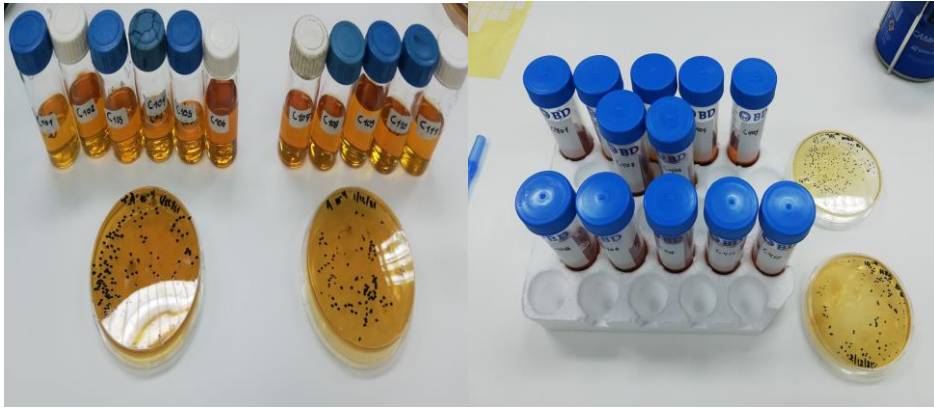
⇒

$$\sqrt{134}/2 \approx 6$$

$$5 + 6 = 11 \text{ αποικίες}$$

Οι κωδικές ονομασίες των απομονωμένων αποικιών για το δείγμα C6 που δόθηκαν είναι: C601, C602, C603, C604, C605, C606, C607, C608, C609, C610 και C611.

Έπειτα, πάρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο οι αποικίες της κάθε σειράς από την προεπιλεγμένη αραίωση του κάθε δείγματος και ενσωματώθηκαν στα φιαλίδια που περιείχαν το MRS Broth. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε για το καθένα ασηπτικά δίπλα σε περιοχή φλόγας λύχνου, όπου για κάθε αποικία χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός αποστειρωμένος κρίκος. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε δίσκο του επωαστικού κλιβάνου και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.



Εικόνα 5.19: Φιαλίδια που περιέχουν απομονωμένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων του κάθε δείγματος.



Εικόνα 5.20: Επωαστικός κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε.

Μετά το τέλος της επώασης των απομονωμένων αποικιών των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων, παρατηρήθηκε στον πυθμένα των φιαλιδίων ίζημα ή αλλιώς βιομάζα. Έπειτα, όλα τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα φυγοκέντρησης με σκοπό τον διαχωρισμό της βιομάζας από το υπερκείμενο διάλυμα. Δεν χρησιμοποιήθηκε η ίδια φυγοκεντρική συσκευή για όλα τα δείγματα διότι η κάθε μία διαθέτει διαφορετικές θήκες τοποθέτησης των δειγμάτων για διαφορετικά φιαλίδια. Για τα δείγμα C1 και C2 χρησιμοποιήθηκε μικροφυγόκεντρος στις 5.000 στροφές για 3 λεπτά λόγω του ότι τα αυτά περιέχονταν σε μικρά φιαλίδια erpendorf, ενώ για το δείγμα C4 χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος στις 4.000 στροφές για 10 λεπτά λόγω του ότι αυτό βρισκόταν σε φιαλίδια falcon. Τέλος για τα δείγματα C3, C5 και C6 χρησιμοποιήθηκε διαφορετική φυγόκεντρος στις 2.500 στροφές για 5 λεπτά λόγω του ότι αυτά περιέχονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθησε, για κάθε ένα ξεχωριστά, διαχωρισμός του ιζήματος από το υπερκείμενο διάλυμα, χύνοντας το σε ποτήρι ζέσεως με σκοπό την παραμονή του ιζήματος στο φιαλίδιο.

Στο κάθε φιαλίδιο (είτε erpendorf είτε falcon) που περιείχε πλέον μόνο το ίζημα, προστέθηκε διάλυμα αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού MRS Broth με 20% γλυκερόλη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με σκοπό την αποφυγή τυχόν ρευμάτων αέρα. Με χρήση πιπέτας πάρθηκε ποσότητα του προαναφερθέντος διαλύματος 500μl και αναδεύτηκε χειροκίνητα και τέλος έγινε μεταφορά όλου του περιεχομένου σε ειδικές κάψουλες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε επί 3 φορές για κάθε φιαλίδιο έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η βιομάζα από τα φιαλίδια. Τέλος, οι κάψουλες τοποθετήθηκαν σε στατό και μπήκαν στο ψυγείο στους -80 °C.

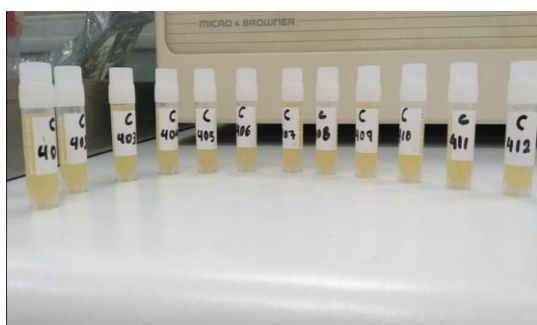
Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν η απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που ανευρέθηκαν στα τυριά τυρογάλακτος και η δημιουργία μίας "τράπεζας" αυτών για την επακόλουθη ανακαλλιέργεια τους.



Εικόνα 5.21: Μικροφυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα C1 και C2.



Εικόνα 5.22: Φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για το δείγμα C4.



Εικόνα 5.23: Κάψουλες με τις απομονωμένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων πριν τοποθετηθούν στην κατάψυξη.

5.3 Μέτρηση του pH των τυριών με πεχάμετρο

Για τη μελέτη της επιβίωσης ή/και ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού σε ένα τρόφιμο είναι απαραίτητη η γνώση του pH του . Η μέτρηση του pH έγινε αμέσως μετά την αγορά των τυριών και μετά την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα και πραγματοποιήθηκε με πεχάμετρο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Άνοιγμα του πεχάμετρου με πάτημα του κουμπιού ON
- Αναμονή ελάχιστων δευτερολέπτων μέχρι η συσκευή να είναι έτοιμη για μέτρηση
- Διαδικασία μέτρησης: Αρχικά μετρήθηκε η θερμοκρασία του κάθε τυριού τοποθετώντας μέσα σε αυτό θερμομόμετρο. Έπειτα, ρυθμίστηκε στο πεχάμετρο η θερμοκρασία που μετρήθηκε για το κάθε δείγμα. Βυθίστηκε το ηλεκτρόδιο στο κάθε τρόφιμο και διαβάστηκε η ένδειξη που εμφανίστηκε στην οθόνη.

5.4 Προσδιορισμός των παραγόμενων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός των οργανικών οξέων που έχουν παραχθεί από τα οξυγαλακτικά βακτήρια στα τυριά τυρογάλακτος, αποσκοπεί στην επιβεβαίωση της ύπαρξης τους καθώς και στη δικαιολογημένη μείωση του pH των τυριών από αυτά κατά την ανάπτυξή τους. Ο προσδιορισμός αυτός είναι ποιοτικός και ποσοτικός και πραγματοποιείται μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Για να εκτελεστεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αρχικά γίνεται εμβολιασμός του ορού τυρογάλακτος με τα απομονωμένα οξυγαλακτικά βακτήρια σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 1,0% και 1,4%. Αυτό συμβαίνει διότι είναι ωφέλιμο οι υπολογισμοί να πραγματοποιηθούν στις μέγιστες περιεκτικότητες άλατος που μπορεί να έχει ένα τυρί τυρογάλακτος, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα θα λάβουν μέρος σε ακραίες συνθήκες.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Παρασκευή του ορού τυρογάλακτος:
 - Ζύγιση 250 gr τυριού τυρογάλακτος σε αναλυτικό ζυγό μέσα σε αποστειρωμένη σακούλα Bag Filter και προσθήκη 1170 gr απιονισμένου νερού.
 - Τοποθέτηση της Bag Filter στο ειδικό μηχάνημα ομογενοποίησης Stomacher για 30 sec μέχρις ότου τη δημιουργία ορού.
 - Μεταφορά ποσότητας ορού σε κωνική φιάλη με σιφόνιο. Η λήψη του ορού πραγματοποιείται από το ειδικό πέρασμα - φίλτρο της Bag Filter, με σκοπό

τη διήθηση και παραλαβή καθαρού ορού και όχι μέρος πιθανών αδιάλυτων κομματιών τυριού.

- Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης, που περιέχει τον ορό, σε θερμαντική πηγή, μαζί με θερμόμετρο, μέχρι τους 70 °C και τον σχηματισμό κροκιδωμάτων. Ο σχηματισμός κροκιδωμάτων υποδηλώνει την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του τυριού λόγω της υψηλής θέρμανσης.
 - Μεταφορά του ορού πάλι στην Bag Filter έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διήθηση μέσω του φίλτρου της.
 - Λήψη περίπου 150 ml ορού με σιφόνιο και μεταφορά τους σε ποτήρι ζέσεως.
 - Μέτρηση του pH του ορού με πεχάμετρο (5,4).
 - Διαμοιρασμός του ορού σε 2 κωνικές φιάλες (175 ml η κάθε μία).
 - Προσθήκη διαφορετικής ποσότητας μαγειρικού άλατος σε κάθε μία από τις 2 κωνικές φιάλες. Σε αυτό το σημείο δημιουργούνται 2 διαφορετικά υποστρώματα με 2 διαφορετικές αλατοπεριεκτικότητες. Είναι επιθυμητό το τελικό pH του ορού να είναι 5,7 έτσι ώστε να αντιπροσωπεύει όσο το δυνατόν καλύτερα τα τυρία τυρογάλακτος. Για αυτόν το λόγο, πέραν του άλατος γίνεται προσθήκη καυστικού νατρίου NaOH με σκοπό την εξισορρόπηση του pH στο 5,7. Επομένως:
Για αλατοπεριεκτικότητα 1,0 % προστίθενται 1,750 gr άλατος και 3 σταγόνες NaOH.
Για αλατοπεριεκτικότητα 1,4 % προστίθενται 2,450 gr άλατος και 3 σταγόνες NaOH.
 - Επανάληψη μέτρησης του pH του ορού με πεχάμετρο (5,7).
 - Αποστείρωση στους 121,1 °C.
2. Παραλαβή των καλλιιεργειών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που είχαν απομονωθεί από τα δείγματα τυριών τυρογάλακτος και είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη στους -80°C.
 3. Μεταφορά του ορού από τις κωνικές φιάλες σε μικρά φιαλίδια υπό ασηπτικές συνθήκες και εμβολιασμός μίας κρικιάς από τα οξυγαλακτικά βακτήρια.
 4. Επώαση στους 37°C για 5 μέρες.
 5. Μέτρηση pH. Τα αποτελέσματα είναι καταγεγραμμένα στον πίνακα 6.4.

6. Μεταφορά σε σωληνίσκους με πιπέτα (από κάθε φιαλίδιο πάρθηκαν 1 ml × 2 φορές, άρα 2 σωληνίσκοι για κάθε φιαλίδιο).
7. Φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές για 8 λεπτά.
8. Μεταφορά υπερκείμενου υγρού σε σωληνάρια και κατάψυξη. Το υπερκείμενο υγρό είναι αυτό που περιέχει τα οργανικά οξέα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε αντίθεση με τη βιομάζα που περιέχει περισσότερο πρωτεΐνες.
9. Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των οργανικών οξέων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC.

5.5 Έλεγχος ανάπτυξης *Listeria monocytogenes* και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος

Πραγματοποιήθηκε δοκιμαστικός έλεγχος ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο φυσικό υπόστρωμα του ορού τυρογάλακτος, έτσι ώστε να διαπιστωθεί με βεβαιότητα ότι το περιβάλλον των τυριών τυρογάλακτος αποτελεί άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους. Το βήμα αυτό θα αποτελέσει αντικείμενο επακόλουθης έρευνας για τον έλεγχο ανταγωνιστικότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην *Listeria monocytogenes* στα τυριά τυρογάλακτος.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τον δοκιμαστικό έλεγχο ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φυσικό υπόστρωμα τυριού τυρογάλακτος ήταν η εξής:

Για την παρασκευή του ορού τυρογάλακτος:

1. Ζύγιση 25 gr τυριού τυρογάλακτος σε αναλυτικό ζυγό μέσα σε αποστειρωμένη σακούλα Bag Filter και προσθήκη 225 gr απιονισμένου νερού.
2. Τοποθέτηση της Bag Filter στο ειδικό μηχάνημα ομογενοποίησης Stomacher για 30 sec μέχρις ότου τη δημιουργία ορού.
3. Μεταφορά ποσότητας ορού σε κωνική φιάλη με σιφώνιο. Η λήψη του ορού πραγματοποιείται από το ειδικό πέρασμα - φίλτρο της Bag Filter, με σκοπό τη διήθηση και παραλαβή καθαρού ορού και όχι μέρος πιθανών αδιάλυτων κομματιών τυριού.
4. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης, που περιέχει τον ορό, σε θερμαντική πηγή, μαζί με θερμόμετρο, μέχρι τους 70 °C και τον σχηματισμό κροκιδωμάτων. Ο σχηματισμός

κροκιδωμάτων υποδηλώνει την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του τυριού λόγω της υψηλής θέρμανσης.

5. Μεταφορά του ορού πάλι στην Bag Filter έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί διήθηση μέσω του φίλτρου της.
6. Λήψη περίπου 150 ml ορού με σιφόνιο και μεταφορά τους σε ποτήρι ζέσεως.
7. Μέτρηση του pH του ορού με πεχάμετρο (5,6).
8. Προσθήκη 2,55 gr μαγειρικού άλατος.
9. Επανάληψη μέτρησης του pH του ορού με πεχάμετρο (5,5).
10. Μεταφορά του ορού σε δοκιμαστικούς σωλήνες.
11. Αποστείρωση στους 121,1 °C.

Έπειτα, πάρθηκαν μικρές ποσότητες από κάποιες από τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες που είχαν απομονωθεί και είχαν τοποθετηθεί στους -80°C και ανακαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό MRS Broth στους 37°C για 2 ημέρες. Αυτές αναμίχθηκαν με τον ορό τυρογάλακτος και δημιουργήθηκαν οκτώ διαδοχικές αραιώσεις σε ισότονο αραιωτικό υγρό. Τρυβλία που περιείχαν MRS Agar εμβολιάστηκαν με το μίγμα οξυγαλακτικών-ορού και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 5 ημέρες.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον έλεγχο ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στο φυσικό ορό του τυρογάλακτος. Ο ορός τυρογάλακτος που είχε φτιαχτεί, αναμίχθηκε με ποσότητα *Listeria monocytogenes*, δημιουργήθηκαν οκτώ διαδοχικές αραιώσεις σε ισότονο αραιωτικό υγρό και το μίγμα εμβολίασε τρυβλία που περιείχαν CHROMagar *Listeria* Base και έγινε επώαση στους 37°C για 5 ημέρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μετά το τέλος της επώασης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των ορατών αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων και για τις δύο σειρές των αραιώσεων των δειγμάτων. Έγινε καταμέτρηση των αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών αμέσως μετά την αγορά τους και καταμέτρηση των αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για ~1,5 μήνα. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν με τη χρήση ειδικού καταμετρητή αποικιών ακολουθούν στον πίνακα 6.1 και στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.1: Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριών αμέσως μετά την αγορά τους.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ										CFU/ml	
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵			
C0 Ανθότυρος	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1 Μυζήθρα	>300	>300	>300	>300	>300	>300	109	148	36	16		1,3 × 10 ⁶
C2 Ξυνομυζήθρα	>300	>300	>300	>300	91	78	8	5	1	-		8,5 × 10 ⁴
C3 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	111	156	26	7	18	-		1,3 × 10 ⁵
C4 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	214	113	30	38		1,8 × 10 ⁷
C5 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	400	180		2,9 × 10 ⁷
C6 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	134	116	51	40		1,6 × 10 ⁷

Πίνακας 6.2: Καταμέτρηση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα τυριών μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για ~1,5 μήνα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ										CFU/ml	
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵			
C1 Μυζήθρα	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	163	3,3 × 10 ⁸
C2 Ξυνομυζήθρα	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	107	90	9,9 × 10 ⁶
C3 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	30	72	5,1 × 10 ⁶
C4 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	190	250	2,2 × 10 ⁷
C5 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>6,5 × 10 ⁸
C6 Ανθότυρος	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>6,5 × 10 ⁸

6.2 Αποτελέσματα μέτρησης του pH των τυριών με πεχάμετρο

Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα ένδειξης πεχάμετρου.

ΔΕΙΓΜΑ	pH (Αμέσως μετά την αγορά τους)	pH (Μετά από παραμονή των δειγμάτων στο ψυγείο για 1,5 μήνα περίπου)
C1 Μυζήθρα	5,59 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	4,28 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)
C2 Ξυνομυζήθρα	5,12 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	3,90 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)
C3 Ανθότυρος	5,23 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	4,59 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)
C4 Ανθότυρος	6,40 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	5,10 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)
C5 Ανθότυρος	5,21 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	4,65 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)
C6 Ανθότυρος	5,45 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)	4,90 (μέτρηση με εμβύθιση του ηλεκτροδίου απευθείας στο δείγμα)

6.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού παραγόμενων οργανικών οξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια

Πίνακας 6.4: Μέτρηση pH του ορού τυρογάλακτος διαφορετικών περιεκτικότητας άλατος μετά από επώαση με διαφορετικές αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Ορός τυρογάλακτος με περιεκτικότητα άλατος 1,0 %		Ορός τυρογάλακτος με περιεκτικότητα άλατος 1,4 %	
Κωδική ονομασία αποικίας οξυγαλακτικού βακτηρίου	pH	Κωδική ονομασία αποικίας οξυγαλακτικού βακτηρίου	pH
C105	3,28	C109	3,55
C108	3,35	C110	3,46
C304	3,51	C205	3,41
C308	3,47	C206	3,48
C309	3,59	C207 + C305	3,24
C311	3,42	C307	3,46
C507	3,38	C403	3,93
C606	3,21	C404	3,90
C607	3,38	C405	3,94
C608	3,34	C408	3,90
C609	3,37	C412	3,92
C611	3,43		

Πίνακας 6.5: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός οργανικών οξέων που παράχθηκαν από τα οξυγαλακτικά βακτήρια των δειγμάτων τυριών τυρογάλακτος με χρήση HPLC.

A/A	Κωδικός οξυ- γαλακτικού βακτηρίου	Περιεκτικότητα άλατος	ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΑΛΛΑ- ΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	ΠΡΟΠΙΟ- ΝΙΚΟ ΟΞΥ	ΜΥΡΜΗΚΙΚΟ ΟΞΥ
			mg / L			
1	C607	1,0%	2478,8	12281,5	185,3	-
2	C608	1,0%	1065,7	9870,5	95,5	-
3	C609	1,0%	1049,6	14017,4	-	-
4	C611	1,0%	1209,3	9581,1	-	-
5	C309	1,0%	1213,5	6742,0	419,7	-
6	C311	1,0%	852,3	6953,4	-	-

7	C304	1,0%	911,1	6385,6	-	-
8	C606	1,0%	866,2	11224,9	96,4	-
9	C105	1,0%	1212,1	10582,6	-	-
10	C108	1,0%	1108,4	7180,1	-	-
11	C308	1,0%	1619,9	8431,6	467,2	-
12	C507	1,0%	1114,7	7990,3	-	-
13	C405	1,4%	874,9	4948,7	1129,7	-
14	C408	1,4%	1008,6	5513,1	766,4	-
15	C412	1,4%	767,0	4052,3	578,7	-
16	C207 + C305	1,4%	1070,0	12640,2	-	-
17	C307	1,4%	923,3	5720,9	-	-
18	C403	1,4%	807,3	5433,4	508,6	-
19	C404	1,4%	857,0	5947,5	682,0	-
20	C109	1,4%	864,5	7021,2	-	-
21	C110	1,4%	513,7	3476,2	-	-
22	C205	1,4%	801,2	8192,9	-	-
23	C206	1,4%	836,2	7040,8	144,3	-

6.4 Αποτελέσματα ελέγχου ανάπτυξης *Listeria monocytogenes* και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος

Για τον έλεγχο ανάπτυξης των οξυγαλακτικών καλλιεργειών σε φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος, τα αποτελέσματα που πάρθηκαν μετά το πέρας της επώασης ήταν θετικά σε όλα, δηλαδή είχαν αναπτυχθεί αποικίες, εκτός από την όγδοη αραιώση.

Το ίδιο συνέβη και με τον έλεγχο ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στο φυσικό υπόστρωμα ορού τυρογάλακτος, όπου τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν θετικά για όλες τις αραιώσεις, με αριθμό αποικιών μεγαλύτερο των 300 σε όλες.

Ο δοκιμαστικός έλεγχος για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της *Listeria monocytogenes* στον φυσικό ορό τυρογάλακτος, απέδειξε ότι αυτός αποτελεί ένα άριστο υπόστρωμα ανάπτυξης καθώς περιέχει όλα τα διατροφικά στοιχεία που μπορούν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί αυτοί. Τα αποτελέσματα αυτά, δίνουν με σιγουριά την σκυτάλη για την πραγματοποίηση της επακόλουθης έρευνας για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων οργανικών οξέων και τον έλεγχο ανταγωνιστικότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην *Listeria monocytogenes* στα τυριά τυρογάλακτος

6.5 Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων και διαγράμματα αυτών

Πίνακας 6.6: Συγκεντρωτικός πίνακας στοιχείων

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΤΑΣΗ	ΗΜ/ΝΙΑ ΠΑΡΑ- ΣΚΕΥΗΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥΑ- ΣΙΑΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΛΗΞΗΣ	pH (15/12/2021)	pH (2/2/2022)	Οξυγαλακτικά cfu/ml (20/12/2021)	Οξυγαλακτικά cfu/ml (2/2/2022)
C1	Αιγοπρόβεια	23/07/2021	23/09/2021	25/07/2022	5,59	4,28	$1,3 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$
C2	Αιγοπρόβεια	29/05/2021	29/07/2021	30/05/2022	5,12	3,90	$8,5 \times 10^4$	$9,9 \times 10^6$
C3	Αιγοπρόβειο	23/11/2021	-	18/12/2021	5,23	4,59	$1,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$
C4	Αγελαδινό ή αιγοπρόβειο	-	9/11/2021	8/1/2022	6,40	5,10	$1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
C5	Κατσικίσιο	15/11/2021	10/12/2021	15/12/2021	5,21	4,65	$2,9 \times 10^7$	$>6,5 \times 10^8$
C6	Αιγοπρόβειο	1/12/2021	10/12/2021	1/1/2022	5,45	4,90	$1,6 \times 10^7$	$>6,5 \times 10^8$

Πίνακας 6.7: Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων για διεξαγωγή συμπερασμάτων

Δείγμα	Διάρκεια ζωής τυριού	Οξυγαλακτικά cfu/ml (20/12/2021)	pH (15/12/2021)	Οξυγαλακτικά cfu/ml (2/2/2022)	pH (2/2/2022)	Αύξηση πληθυσμού οξυγαλακτικών (cfu/ml)	Ποσοστία (%) αύξηση πληθυσμού οξυγαλακτικών (cfu/ml)	Μονάδες πτώσης pH
C1 Μυζήθρα	~ 1 έτος	$1,3 \times 10^6$	5,59	$3,3 \times 10^8$	4,28	$3,287 \times 10^8$	25284,61	1,31
C2 Ευνομυζήθρα	~ 1 έτος	$8,5 \times 10^4$	5,12	$9,9 \times 10^6$	3,9	$9,815 \times 10^6$	11547,06	1,22
C3 Ανότυρος	26 ημέρες	$1,3 \times 10^5$	5,23	$5,1 \times 10^6$	4,59	$4,97 \times 10^6$	3823,07	0,64
C4 Ανότυρος	~ 2 μήνες	$1,8 \times 10^7$	6,4	$2,2 \times 10^7$	5,1	$4,00 \times 10^6$	22,22	1,3
C5 Ανότυρος	1 μήνας	$2,9 \times 10^7$	5,21	$6,5 \times 10^8$	4,65	$6,21 \times 10^8$	2141,38	0,56
C6 Ανότυρος	1 μήνας	$1,6 \times 10^7$	5,45	$6,5 \times 10^8$	4,9	$6,34 \times 10^8$	3962,50	0,55



Διάγραμμα 6.1: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών τυρογάλακτος αμέσως μετά την αγορά τους.

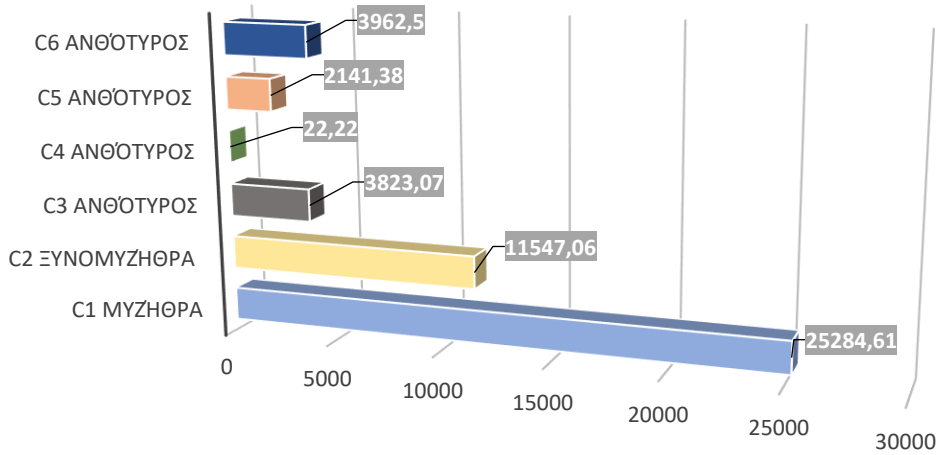


Διάγραμμα 6.2: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα των τυριών τυρογάλακτος μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.



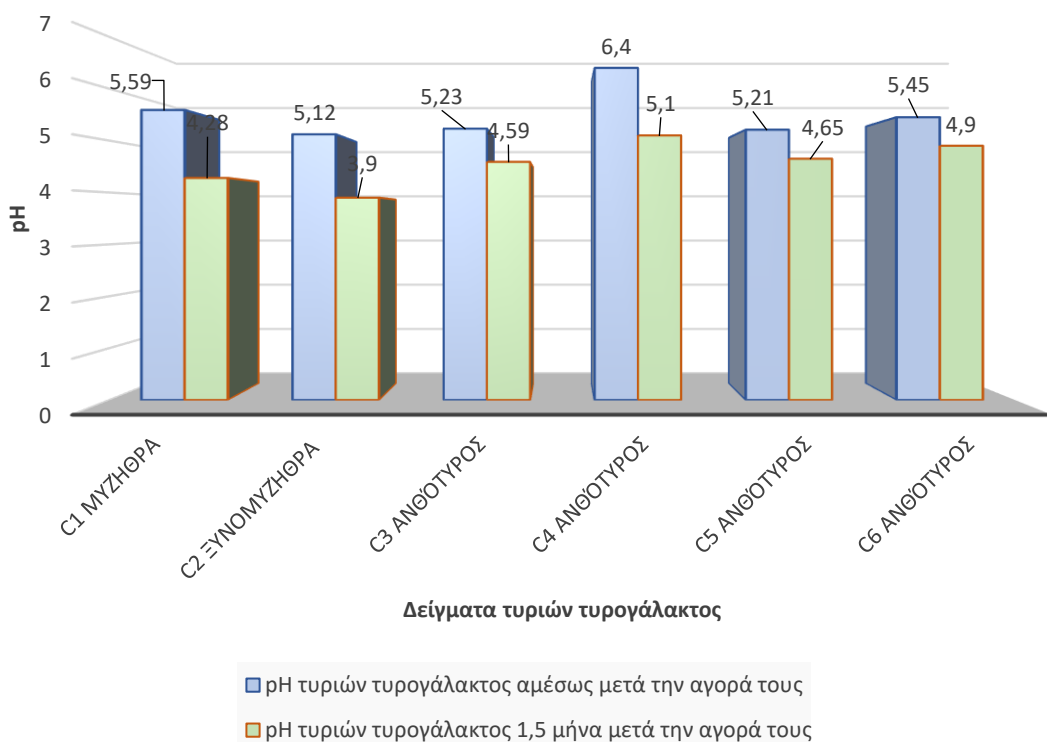
Διάγραμμα 6.3: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος (συγκριτικά)

Ποσοστιαία (%) αύξηση πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων (cfu/ml) στα τυριά τυρογάλακτος μετά από την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα



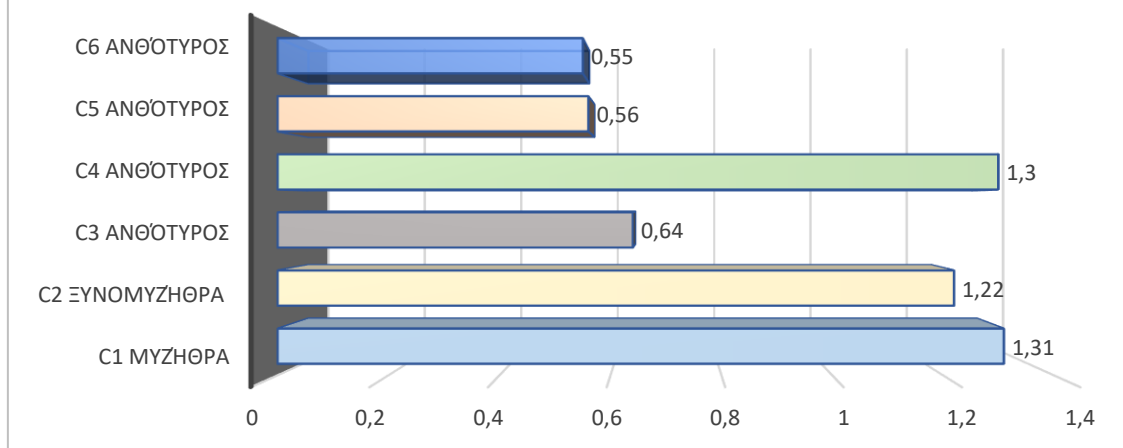
Διάγραμμα 6.4: Ποσοστιαία αύξηση πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων (cfu/ml) στα τυριά τυρογάλακτος από την αγορά τους μέχρι και την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.

pH τυριών τυρογάλακτος



Διάγραμμα 6.5: pH τυριών τυρογάλακτος στην αρχή της αγοράς τους και μετά από 1,5 μήνα παραμονής στο ψυγείο.

Μονάδες μείωσης pH των τυριών τυρογάλακτος μετά την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα



Διάγραμμα 6.6: Μονάδες μείωσης pH των τυριών τυρογάλακτος μετά την παραμονή τους στο ψυγείο για 1,5 μήνα.

Δείγματα C1 & C2 (Μυζήθρες)

Κατά την παραμονή του δείγματος C1 στο ψυγείο για 1,5 μήνα, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε από $1,30 \times 10^6$ cfu/ml σε $3,30 \times 10^8$ cfu/ml, δηλαδή αύξηση $3,287 \times 10^8$ cfu/ml. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση του pH του από 5,59 σε 4,28, δηλαδή κατά 1,31 μονάδες. Η μείωση αυτή του pH είναι λογική εφόσον υπήρξε αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και κατ'επέκταση αύξηση των παραγόμενων οργανικών οξέων που προέρχονται από αυτά, με αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας του τυριού.

Το δείγμα C2 μετά από 1,5 μήνα στο ψυγείο, αύξησε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων του κατά $9,815 \times 10^6$ cfu/ml, δηλαδή από $8,50 \times 10^4$ cfu/ml σε $9,90 \times 10^6$ cfu/ml και μείωσε το pH κατά 1,22 μονάδες, δηλαδή από 5,12 σε 3,90.

Και τα δύο αυτά τυριά ανήκουν στην ίδια κατηγορία τυριών τυρογάλακτος και στο ίδιο είδος της Μυζήθρας, με ίδια διάρκεια ζωής (1 έτος), με τη μόνη διαφορά ότι το δείγμα C2 είναι Ξυνομυζήθρα και έχει από την αρχή ελάχιστα πιο όξινο pH. Το δείγμα C1 συγκριτικά με το C2 από την αρχή της αγοράς του ξεκίνησε με μεγαλύτερο πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων, αύξησε σε μεγαλύτερο ποσοστό τον πληθυσμό αυτό κατά την παραμονή του στο ψυγείο και μείωσε πιο πολύ το pH του. Το δείγμα C2 όταν αγοράστηκε

είχε και μικρότερο πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων και μικρότερο pH σε σχέση με το C1, γεγονός που μπορεί να δικαιολογήσει τη μικρότερη αύξηση του πληθυσμού αυτού και κατ'επέκταση τη μικρότερη πτώση του pH.

Θα μπορούσε να είναι πιθανό, ότι ο αρχικά αυξημένος πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δείγμα C1 συγκριτικά με το C2, είναι σκόπιμος διότι το δείγμα Μυζήθρας έχει αρχικά μεγαλύτερο pH έναντι της Ξυνομυζήθρας, και έτσι με τον μεγαλύτερο πληθυσμό μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη αύξηση της οξύτητας και κατ'επέκταση επιμήκυνση του χρόνου ζωής στην προβλεπόμενη διάρκεια του ενός έτους. Από την άλλη πλευρά, η Ξυνομυζήθρα έχει από την αρχή παρασκευής της μικρότερο pH, πράγμα που την καθιστά λιγότερο ευαίσθητη στις αλλοιώσεις και ισχυρότερη στον χρόνο ζωής και για αυτόν το λόγο δεν είναι τόσο απαραίτητη η ύπαρξη μεγαλύτερου πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Δείγματα C3, C4, C5 & C6 (Ανθότυρα)

Κατά την παραμονή του δείγματος C3 στο ψυγείο για 1,5 μήνα, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε από $1,30 \times 10^5$ cfu/ml σε $5,10 \times 10^6$ cfu/ml, δηλαδή αύξηση $4,97 \times 10^6$ cfu/ml. Παράλληλα, παρατηρήθηκε πτώση του pH του από 5,23 σε 4,59, δηλαδή κατά 0,64 μονάδες.

Το δείγμα C4 μετά από 1,5 μήνα παραμονής στο ψυγείο παρουσίασε αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων από $1,80 \times 10^7$ cfu/ml σε $2,20 \times 10^7$ cfu/ml, δηλαδή αύξηση $4,00 \times 10^6$ cfu/ml και μείωση του pH από 6,4 σε 5,1, δηλαδή 1,3 μονάδες.

Το δείγμα C5 μετά από 1,5 μήνα στο ψυγείο, αύξησε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων του κατά $6,21 \times 10^8$ cfu/ml, δηλαδή από $2,90 \times 10^7$ cfu/ml σε $6,50 \times 10^8$ cfu/ml και μείωσε το pH κατά 0,56 μονάδες, δηλαδή από 5,21 σε 4,65.

Τέλος, το δείγμα C6 κατά την φύλαξη του για 1,5 μήνα στο ψυγείο, αύξησε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων του κατά $6,34 \times 10^8$ cfu/ml, δηλαδή από $1,60 \times 10^7$ cfu/ml σε $6,50 \times 10^8$ cfu/ml και μείωσε το pH κατά 0,55 μονάδες, δηλαδή από 5,45 σε 4,90. C5

Από αυτά τα δείγματα τυριών που ανήκουν στην ίδια κατηγορία τυριών τυρογάλακτος στο είδος του Ανθότυρου, μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό διαπιστώθηκε ότι είχε το δείγμα C5, ακολουθεί το δείγμα C4, C6 και τέλος το C3. Μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση παρατηρήθηκε στο δείγμα C6, έπειτα στο C3, C5 και τέλος στο C4. Παρόλα αυτά,

ο τελικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μεγαλύτερος στο δείγμα C6 και C5, ακολουθεί το C4 και τέλος το C3. Όσον αφορά το pH των δειγμάτων αυτών, αρχικά κατά την αγορά τους μεγαλύτερη τιμή έχει το C4, και ακολουθούν C6, C3 και C5, ενώ μετά το πέρας του 1,5 μήνα μεγαλύτερη τιμή pH εμφανίζεται στο C4, έπειτα στο C6, C5 και τέλος στο C3. Από αυτό διαπιστώθηκε πως μεγαλύτερη πτώση μονάδων του pH έχει το C4, ακολουθεί το C3, C5 και τέλος το C6.

Το δείγμα C3 παρουσίασε μικρότερο αρχικό και τελικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων και μέτρια αύξηση της οξύτητας του συγκριτικά με τα υπόλοιπα Ανθότυρα. Είναι το τυρί που έχει την μικρότερη διάρκεια ζωής (26 μέρες) και παρά το γεγονός ότι η μέτρηση των τελικών οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε μετά το πέρας αυτής, δηλαδή μετά από 46 μέρες δεν παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση πληθυσμού σε σχέση με τα άλλα δείγματα τυριών. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει πως υπάρχει περίπτωση το τυρί να έχει δεχτεί ισχυρότερη θερμική επεξεργασία πριν τη συσκευασία του ή επιπλέον θερμική επεξεργασία μετά τη συσκευασία με σκοπό τη μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών.

Το δείγμα C4 παρουσίασε έναν αρκετά αυξημένο αρχικό πληθυσμό αλλά την μικρότερη αύξηση αυτού μέχρι την τελική μέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, δηλαδή 25 μέρες αφού είχε λήξει. Επίσης, εμφάνισε τη μεγαλύτερη πτώση του pH συγκριτικά με τα άλλα Ανθότυρα, παρά το γεγονός ότι δεν παρουσίασε τον μεγαλύτερο τελικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αποτελεί το τυρί που έχει την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των 2 μηνών έναντι των υπολοίπων Ανθότυρων, γεγονός που συμβάλλει στη σκέψη ότι ο αυξημένος αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και το είδος αυτών, πιθανόν να είναι σκόπιμος έτσι ώστε να δημιουργηθεί ανταγωνιστικό περιβάλλον έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν και εν τέλει να παραταθεί ο χρόνος ζωής του τυριού.

Τα δείγματα C5 και C6 κινήθηκαν στα ίδια πλαίσια αφού από αρκετά μεγάλους αρχικούς αριθμούς πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων, κατέληξαν στους μεγαλύτερους τελικούς, χωρίς όμως να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εκατοστιαία αύξηση αλλά ούτε και την μεγαλύτερη πτώση του pH. Αντιθέτως, η πτώση των μονάδων του pH ήταν μικρότερη και στο δείγμα C5 μετά από 49 μέρες αφού είχε παρέλθει η λήξη του αλλά και στο C6 μετά από 32 μέρες σε σχέση με τα υπόλοιπα Ανθότυρα.

Εν κατακλείδι, διαπιστώνεται πως σε όλα τα τυριά τυρογάλακτος προϋπήρχαν ικανοποιητικές ποσότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες αυξήθηκαν κατά την

παραμονή τους στο ψυγείο καθώς επίσης και ότι η οξύτητα των τυριών αυξήθηκε αρκετά σημαντικά στη διάρκεια αυτής της παραμονής. Από ότι φαίνεται και από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των οργανικών οξέων στον πίνακα 6.5, ακόμη και σε υψηλά επίπεδα άλατος υπήρξε υψηλό ποσοστό συγκέντρωσης τόσο οξικού οξέος όσο και γαλακτικού οξέος στα περισσότερα δείγματα. Αρκετά ήταν και αυτά που πέραν του οξικού και γαλακτικού οξέος, εμφάνισαν και συγκέντρωση προπιονικού οξέος. Σε ποσοστό άλατος 1%, μεγαλύτερη συγκέντρωση οξικού οξέος παρατηρήθηκε στην αποικία 607 του δείγματος C6, καθώς επίσης και από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και ύπαρξη προπιονικού. Σε γενικές γραμμές όλες οι αποικίες του δείγματος C6 εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αυτών των οργανικών οξέων. Επίσης, η αποικία 308 του δείγματος C3 και οι αποικίες 105 και 108 του δείγματος C1 συμπεριφέρθηκαν κατά ανάλογο τρόπο. Σε ποσοστό άλατος 1,4%, μεγαλύτερη συγκέντρωση οξικού οξέος αλλά και αρκετή γαλακτικού και προπιονικού παρουσίασε τόσο η αποικία 408 όσο και οι υπόλοιπες του δείγματος C4. Οι αποικίες 205 και 206 του δείγματος C2 εμφάνισαν από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος αλλά και αρκετή του οξικού. Ακόμη και σε ποσοστό άλατος 1,4%, το οποίο θεωρείται αρκετά υψηλό, πόσο μάλλον για νωπά τυριά τυρογάλακτος, οι αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπόρεσαν να μεταβολίσουν προϊόντα και πιο συγκεκριμένα να παράξουν αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων. Μάλιστα, αυτό επιβεβαιώνεται και στα δείγματα C4 και C2 που παρουσίασαν κατά την παραμονή τους για 1,5 μήνα στο ψυγείο από τις μεγαλύτερες πτώσεις του pH. Καθίσταται, λοιπόν, σαφές πως η ύπαρξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά τυρογάλακτος αυξάνει την οξύτητα τους λόγω των οργανικών οξέων που παράγονται, χωρίς όμως να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Αυτό το γεγονός μπορεί να συμβάλλει στην παράταση του χρόνου διάρκειας ζωής των τυριών τυρογάλακτος, αφού το μειωμένο pH δημιουργεί ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γεγονός, πως για να διεξαχθούν ακριβή αποτελέσματα για ένα τρόφιμο θα πρέπει να υπάρχει γνώση πίσω από όλες τις πιθανές παραμέτρους που μπορεί να συμβάλλουν είτε στη μείωση των αλλοιώσεων που μπορεί να προκληθούν είτε απλά στην παράταση της διάρκειας ζωής του. Πιο συγκεκριμένα, για τα τυριά τυρογάλακτος καθίσταται σαφές πως πολύπλευροι παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν την "τύχη" του προϊόντος.

Πέραν των όσων έχουν αναφερθεί για την προέλευση και το είδος του τυρογάλακτος καθώς και την επεξεργασία του, ένας σημαντικός παράγοντας που θα κρίνει το τυρί είναι και οι συνθήκες υγιεινής μέσα στο περιβάλλον επεξεργασίας αλλά και το κατά πόσο μέσα σε αυτό το περιβάλλον παρασκευάζονται και άλλα είδη τυριών στα οποία εν γένει χρησιμοποιούνται οξυγαλακτικά βακτήρια και γενικά καλλιέργειες εκκίνησης ή προστατευτικές. Υπάρχει περίπτωση αν στο ίδιο εξάρτημα, μηχανήμα, περιβάλλον που θα παρασκευαστεί ένα διαφορετικού τύπου τυρί, περάσει ένα τυρί τυρογάλακτος, να επιμολυνθεί με βακτήρια που δεν προορίζονταν για αυτό. Το γεγονός αυτό δεν είναι πάντα επικίνδυνο διότι αν απλά επιμολυνθεί με οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία θεωρούνται "γενικώς αναγνωρισμένα ως ασφαλή" και πάρα πολλές φορές χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες λόγω της ανταγωνιστικότητας που προσφέρουν έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, τότε απλώς παρέχεται στο τυρί μια επιπλέον προστασία και ίσως παράταση του χρόνου ζωής του.

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τα διάφορα δείγματα τυριών τυρογάλακτος διαπιστώνεται πως η ύπαρξη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αυτά είναι σίγουρη και πιθανώς να μπορεί να συμβάλλει στη διατηρησιμότητα τους μέσω της κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών, που σε αντίθετη περίπτωση θα χρησιμοποιούσαν παθογόνα βακτήρια, και της αύξησης της οξύτητας των τυριών από τα παραγόμενα οξέα των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Πρέπει να σημειωθεί, πως η αύξηση της οξύτητας των τυριών και η πτώση του pH δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της αύξησης του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των παραγόμενων οργανικών οξέων, αλλά εξαρτάται και από το είδος αυτών. Για αυτόν το λόγο, δεν είναι βέβαιο πως όσο μεγαλύτερο πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει αναπτύξει ένα δείγμα συγκριτικά με ένα άλλο κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ότι θα έχει και ανάλογη μεγαλύτερη αύξηση οξύτητας. Είναι απαραίτητο να λαμβάνεται υπόψιν το είδος

των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ο πιθανός συνδυασμός συνύπαρξης αυτών σε ένα δείγμα, καθώς και το είδος των οργανικών οξέων (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, κ.α.) που έχουν παραχθεί από τα οξυγαλακτικά αυτά διότι δεν έχουν όλα την ίδια δραστηριότητα στη μείωση του pH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Govaris¹, P. K. (2001). The fate of *Escherichia coli* O157: H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12°C.
- B G Gellin, C. V. (1991). The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group.
- Dalgaard, M.-R. &. (2018). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses. Στο R. W. Hutkins, *Microbiology and Technology of Fermented Foods*.
- Demetrios Papageorgiou, M. B. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* in the Whey Cheeses. *Journal of Food Protection*.
- European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. (1999). Opinion of the scientific committee on veterinary measure relating to public health on *Listeria monocytogenes*
- Elliot T. Ryser, E. H. (2007). *Listeria. Listeriosis and Food Safety* (3rd Edition εκδ.). Boca Raton: CRC Press.
- Erica Tirloni, S. S. (2021). A new predictive model for the description of the growth of *Salmonella* spp. in Italian fresh ricotta cheese.
- FAO/WHO. (2011). Codex Alimentarius, Milk and milk products, Second edition
- Fevrier, C. a. (1977). *Utilisation du lactoserum et des produits lactoses*. Les Lactoserul"tls, une Richesse Ali11lelltaire.
- Food and Drug Administration (FDA). (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready To Eat Foods; Draft Guidance
- Georgia Papaioannou, I. C. (2005). Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging.
- Jones, S., Drouin, P., Wilkinson, B. and Morse, P.D. II. (2002). Correlation of long-range membrane order with temperature-dependent growth characteristics of parent and a cold sensitive, branched-chain-fatt yacid- deficient mutant of *Listeria monocytogenes*, *Archives of Microbiology*.
- Leite, P., Rodrigues, P., Ferreira, M., Ribeiro, G., Jacqet, C., Martin, P. and Brito, L. (2006). Comparative characterisation of *Listeria monocytogenes* isolated from

- Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, pp. 111- 121
- Lekkas, G., Kakouri, A., Palaiologos, E., Voutsinas, L.P., Kontominas, M.G. and Samelis, J. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 oC, *Food Microbiology*.
 - Hans-Dieter Belitz, W. G. (2009). *Food Chemistry* (4η εκδ.).
 - Harper, M. &. (1984). Properties of Whey Protein Concentrates. Στο M. E. Mangino, *Whey and Lactose Processing*.
 - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1988). *Microorganisms in Foods: Volume One: Their Significance and Methods of Enumeration*. University of Toronto Press.
 - J.A.Hudson, S. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse.
 - J.M. Farber, P. P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen.
 - Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology* (Sixth Edition εκδ.). Gaithersburg, Maryland: AN ASPEN PUBLICATION.
 - Keng Chee Chung, J. M. (1970). GROWTH OF SALMONELLA AT LOW pH. Institute of Food Technologists.
 - M.C. Coelho, C. S. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic. *International Journal of Food Microbiology*.
 - M.E. Pintado, A. M. (χ.χ.). Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses.
 - Marth, F. E.-G. (1983). *Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods*. University of Wisconsin-Madison: Department of Food Science and The Food Research Institute.
 - Prajapati, P. M. (1981). Manufacture of Ricotta cheese from different whey systems and its utilization for Indian varieties of sweets. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
 - S. Marwaha, J. F. (1988). Whey—pollution problem and potential utilization. *Institute of Food Science and Technology*. Ανάκτηση από Insti.
 - Stiles, M.E. and Holzappel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*.

- Tannock, G. W. (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. Στο W. N. Veld, *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Veldhoven, The Netherlands.
- Tamime, A.Y. (2002). Microbiology of starter cultures. In. Dairy Microbiology Handbook, Third Ed., Wiley-Interscience Inc. Canada
- Thomas J. Montville, K. R. (2010). *микροβιολογία τροφίμων*. (Ι. Γ. Βασίλης Σπηλιώτης, Επιμ.) Όμιλος ίων.
- Vamam, A.H. and Sutherland, J.P. (1994). Milk and Milk Products, Technology, chemistry and microbiology, Chapman & Hall, London.
- Yuqian Lou, A. E. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. Στο E. H. Elliot T. Ryser, *Listeria: Listeriosis and Food Safety* (Second Edition εκδ.).
- A.Govaris, P. a. (2001). *The fate of Escherichia coli O157:H7 in Myzithra, Anthotyros and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12 oC*.
- Anastasia E.Kapetanakou, M. A. (2016). *Assessing the capacity of growth, survival and acid adaptive response of Listeria monocytogenes during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion*. Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science & Human Nutrition, Agricultural University of Athens.
- Demetrios K. Papageorgiou, M. B. (1995). *Growth of Listeria monocytogenes in the Whey Cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during Storage at 5,12 and 22oC*. Department of Food Hygiene and Technology School of Veterinary Medicine, Laboratory of Milk Hygiene and Technology, Aristotle University of Thessaloniki.
- Erica Tirloni, S. S. (χ.χ.). *A new predictive model for the description of the growth of Salmonella spp. in Italian fresh ricotta cheese*. Denmark: Department of Health, Animal Science and Food Safety, University of Milan.
- Evanthia Litopoulou-Tzanetaki, N. T. (2011). *Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses*. Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki.
- Felice Panebianco. Filippo Giarratana, A. C. (χ.χ.). *Lactic acid bacteria isolated from*

traditional Italian dairy products: activity against Listeria monocytogenes and modelling of microbial competition in soft cheese. Turin, Italy: Department of Veterinary Sciences, University of Turin.

- Georgia Papaioannou, I. C. (2006). *Shelf-life of a Greek whey cheeses under modified atmosphere packaging.* Laboratory of Food Chemistry and Food Microbiology, Department of Chemistry, University of Ioannina.
- H.-D.Belitz, W. P. (2011). *Χημεία Τροφίμων* (4η Έκδοση εκδ.). (Σ. Ν. Ραφαηλίδης, Επιμ., & Α. Ι. Μαρία Δ. Παπαγεωργίου, Μεταφρ.) ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΖΙΟΛΑ.
- Irene Martin, A. R.-O. (2021). *Control of Listeria monocytogenes growth and virulence in a traditional soft cheese model system based on lactic acid bacteria and a whey protein hydrolysate with antimicrobial activity.* International Journal of Food Microbiology.
- J.F.Kennedy, S. a. (1988). *Whey-pollution problem and potential utilization.* International Journal of Food Science and Technology.
- J.Y.Lim, C. G. (2020). *Using lactic acid bacteria and packaging with grapefruit seed extract for controlling Listeria monocytogenes growth in fresh soft cheese.* Seoul, Republic of Korea: Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Kyung Hee University.
- Josip Vrdoljak, V. D. (2015). *Microbiological Quality of Soft, Semi-Hard and Hard Cheeses during the Shelf-life.* Zagreb, Croatia: Economic Zone Caporice, Department of Hygiene, Technology and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb.
- M.C.Coelho, C. S. (2014). *Control of Listeria monocytogenes in fresh cheese using protective lactic acid bacteria.*
- M.E.Pintado, A. a. (2000). *Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses.* Portugal: Escola Superior de Biotechnologia, Universidade Catolica Portuguesa, Rua Dr. Antonio Bernardino de Almeida.
- Marie R. Lawton, K. G. (2020). *Evaluation of commercial meat cultures to inhibit Listeria monocytogenes in a fresh cheese laboratory model.* American Dairy Science Association. .
- Standards, I. F. (2018). *CODEX ALIMENTARIUS-Standard for Whey Cheeses.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health

Organization.

- Sulaiman F.Aljasir, C. G. (χ.χ.). *The efficacy of individual and combined commercial protective cultures against Listeria monocytogenes, Salmonella, O157 and non-O157 shiga toxin-producing Escherichia coli in growth medium and raw milk.*
- Theodoridis A., A. A. (1998). *Prevalence and significance of Listeria monocytogenes in Greek whey cheeses.*
- U.S. Food and Drug Administration, C. F. (2006, June 16). Hazards & Controls Guide For Dairy Foods HACCP.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2008)
- Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2005). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα
- ΕΦΕΤ (2012). Γενικός Οδηγός για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις. Κεντρική Υπηρεσία ΕΦΕΤ Διεύθυνση Ελέγχων Επιχειρήσεων, Αθήνα.
- Οδηγία 92/46/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 16ης Ιουνίου 1992 για τη θέσπιση των υγειονομικών κανόνων για την παραγωγή και την εμπορία νωπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα, 1992
- Αντώνιος Ι. Μάντης, Δ. Κ. (2015). *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του* (Αναθεωρημένη Έκδοση εκδ.). Αφοί Κυριακίδη ΕΚΔΟΣΕΙΣ Α.Ε.
- Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (2004). *Τυροκομία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα*
- Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (1989). *Τυροκομία, Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα.*
- Βεινόγλου, Β. και Ανυφαντάκης, Ε. (1981). *Γαλακτοκομία, Τόμος Β΄, Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα*
- Δημήτριος Τυμπής, Ελευθέριος Πετράκης, Σπυρίδων Κοντελής (2017). *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ. ΔΙΣΙΓΜΑ.*
- Ζερφυρίδης, Γ.Κ. (2001). *Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος - Τυροκομία.* Γιαχούδη Γιαπούλη., Θεσσαλονίκη

- Ζερφυρίδης, Γ.Κ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου, Δ΄ Έκδοση. Εκδόσεις Για-χούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη
- Σβαρνάς, Χ. (2012). *Παραγωγή και Αξιοποίηση Υποπροϊόντων Αιγοπρόβειου Γάλακτος στο Νομό Ιωαννίνων*. Ιωάννινα.
- Χρήστος Κεχαγιάς, Ευσταθία Τσάκαλη (2017). *Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων*. Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών.
- Αικατερίνη, Π. (2019). *Η ανταγωνιστική σχέση της Listeria monocytogenes και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε υπόστρωμα τυριών τυρογάλακτος, με χρήση μοντέλων προορατικής μικροβιολογίας διαθέσιμων στο Διαδίκτυο*. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής - Σχολή Επιστημών Τροφίμων-Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Γεωργία, Χ. (2018). *Ορρός Γάλακτος και οι Χρήσεις του στη Βιομηχανία Τροφίμων*. Καλαμάτα: Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου.
- Δέσποινα, Τ. (2018). *Ανάπτυξη Προϊόντος, Αξιοποίηση του Τυρογάλακτος ως Διαιτητικό Προϊόν*. Καλαμάτα: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου-Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Δημαρέλη, Π. (2013). *Μελέτη της ανάπτυξης του ψυχρότροφου παθογόνου βακτηρίου Listeria monocytogenes σε τυρί και ελιά*. Αθήνα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.
- Δημήτριος, Μ. Θ.-Ψ. (2013). *Μελέτη της μεταβολής της μικροβιακής χλωρίδας του μανουριού κατά την διάρκεια της συντήρησής του στην ψύξη*. Θεσσαλονίκη: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης-Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής- Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Ελληνική Δημοκρατία, Υ. Π. (2005, 03 08). Διαχείριση Τυρογάλακτος από τυροκομικές μονάδες της χώρας. Αθήνα.
- Ευαγγελία, Φ. (2011). *Μικροβιολογική Ασφάλεια τυριών τυρογάλακτος στην Κρήτη*. Ηράκλειο: Πανεπιστήμιο Κρήτης-Τμήμα Ιατρικής.
- Ηλίας-Δημόπουλος, Ε. (2013). *Παρασκευή και Μελέτη Τυριών Τυρογάλακτος Μειωμένης Λιποπεριεκτικότητας*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών .
- Καλογριδίου-Βασιλειάδου, Δ. (1999). *Κανόνες Ορθής Υγιεινής Πρακτικής για τις Επιχειρήσεις Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: UNIVERSITY STUDIO PRESS-Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών.

- Κατσιμιλή, Μ. (2021). *Listeria monocytogenes στα τυριά*. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Κωνσταντίνος, Σ. (2017). *Βιολειτουργικά συστατικά & Πρόσθετα τροφίμων*. Κορωπί Αττικής: Εκδόσεις ΝΟΤΑ.
- Κωνσταντίνος, Σ. (2017). *Χημεία Τροφίμων - Θεωρία και Ασκήσεις*. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΝΟΤΑ.
- Σβαρνάς, Χ. (2012). *Παραγωγή και Αξιοποίηση Υποπροϊόντων Αιγοπρόβειου Γάλακτος στο Νομό Ιωαννίνων*. Ιωάννινα: Παντεπιστήμιο Ιωαννίνων-Τμήμα Χημείας.
- Τσάκνης, Γ. (2020). *ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ*. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΖΙΟΛΑ.
- Χαράλαμπος, Γ. (2009). *Συνδυασμός μεθόδων βιο-προστασίας και τεχνολογίας εδώδιμων μεμβρανών για την βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

- <https://www.cretans.gr/2019/10/01/myzithra-kai-anthotyros-poiies-einai-oi-diafores-kai-poiies-oi-omoiotites-tous/>
- <https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/572-anthotyros-ksiros.html#search-results>
- <https://www.dairy-services.com/%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%AE%CE%B8%CF%81%CE%B1-vs-%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%8C%CF%84%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82-vs-%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%8D%CF%81%CE%B9/>

- <https://www.kathimerini.gr/life/environment/759287/kainotomos-diadikasia-katharismoy-ton-apovliton-ton-tyrokomeion/>

Πηγές Εικόνων

Εικόνα1.1:<https://www.dairyservices.com/%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%BE%CE%B9%CE%BD%CF%8C-%CF%84%CF%85%CF%81%CF%8C%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1/>

Εικόνα 2.1: <https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/216-myzithra.html>

Εικόνα2.2:<https://opmandamos.gr/product/%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%B7%CE%B8%CF%81%CE%B1-%CE%BE%CE%B5%CF%81%CE%B7/>

Εικόνα2.3:<https://www.dairyservices.com/category/blog/cheeseindustry/cheeses/wheycheeses/%CE%BE%CF%85%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%AE%CE%B8%CF%81%CE%B1-%CE%BA%CF%81%CE%AE%CF%84%CE%B7%CF%82/>

Εικόνα2.4:<https://papagiannaki.gr/product/%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%8C%CF%84%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82-%CE%BE%CE%B7%CF%81%CF%8C%CF%82/>

Εικόνα2.5:<https://www.dairyservices.com/%CE%BC%CF%85%CE%B6%CE%AE%CE%B8%CF%81%CE%B1vs-%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%8C%CF%84%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%82vs-%CE%BC%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CF%8D%CF%81%CE%B9/>

Εικόνα 2.6: <https://www.cheeselovers.gr/tyria-tou-kosmou/cheese/215-manoyri.html>

Εικόνα 5.1-5.23: Προσωπικό Αρχείο.