ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΤΥΡΙΟΥ

ΜΑΡΙΑ Α. ΓΚΕΡΕΚΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκανδάμης Π., Επ. Καθηγητής

Αθήνα, Ιούνιος 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΤΥΡΙΟΥ

ΜΑΡΙΑ Α. ΓΚΕΡΕΚΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκανδάμης Π., Επ. Καθηγητής

Αθήνα, Ιούνιος 2015

<u>ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ</u>

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΤΥΡΙΟΥ

ΜΑΡΙΑ Α. ΓΚΕΡΕΚΟΥ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Π., Επ. Καθηγητής

Τσακαλίδου Ε., Καθηγήτρια

Ακτύπης Α., Λέκτορας

Αθήνα, Ιούνιος 2015

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα πρόσωπα που συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών και επιβλέπων της παρούσας μελέτης κ. Παναγιώτη Σκανδάμη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και μου ανέθεσε την παρούσα εργασία, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και των εργαστηριακών αναλύσεων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια κ. Έφη Τσακαλίδου και τον Λέκτορα κ. Αναστάσιο Ακτύπη, του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας για τις συμβουλές και διορθώσεις τους κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, κ. Αναστασία Καπετανάκου για τη πολύτιμη βοήθειά της, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και των εργαστηριακών αναλύσεων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό και τους φοιτητές, του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών που βοήθησαν σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, στην επιτυχή έκβαση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου, Αθανασίου Αναστάση, Ανδρουτσόπουλο Νίκο, Βουζίκα Παναγιώτα, Βουτέρου Δήμητρα, Γιουρμετάκη Άννα, Κατσιαδράμη Γιάννα, Λιάκο Άκη, Λύκο Νίκο, Μακκά Γιοβάννα, Μπατζίνα Άλκηστη, Ταγκούλη Δήμητρα, Ταγκούλη Ειρήνη, Ταγκούλη Ιγνάτιο, Ταγκούλη Νίκο, Παπαδάκη Κατερίνα και Πρωτονοταρίου Στέλλα, για την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν, καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος και τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μοτάκη Ελευθερία και Γκερέκο Απόστολο, καθώς και τον αδελφό μου Γκερέκο Χαρίδημο, για τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση που δείχνουν σε όλες μου, τις αποφάσεις.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΤΥΡΙΟΥ

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55

Περίληψη

Η μεγάλη ποικιλία, όσον αφορά τα φυσικοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των τυριών, μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο την απόκριση του *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια της συντήρησης και πέψης των τυριών.

Στόχοι της μελέτης ήταν i) η σύγκριση έντεκα τυριών ως προς τη δυνατότητα να υποστηρίξουν ανάπτυξη του *L. monocytogenes,* ii) η αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε διάφορα τυριά και iii) η εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης, με έκθεση διαφορετικών κατηγοριών τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου.

Τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή (mascarpone, cottage), μαλακά (mozzarella, camembert, ricotta, ανθότυρο, μανούρι, μαστέλο) και ημίσκληρα τυριά (edam, gouda, χαλούμι) εμβολιάστηκαν με 100 CFU/cm^2 ή g του *L. monocytogenes* και συντηρήθηκαν υπό κενό ή αερόβιες συνθήκες στους 7^{o}C. Επιπλέον, αξιολογήθηκε και η επίδραση της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας των τυριών (διαφορετικός πληθυσμός αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας - ΟΜΧ) ενώ ταυτόχρονα παρακολουθούνταν το pH και η ενεργότητα νερού (a_w). Τέλος, καταμετρούνταν η επιβίωση του παθογόνου κατά τη διάρκεια της έκθεσης των τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό (pH 1.50, 60 λεπτά) με τη μέθοδο thin layer agar. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνταν και εμπλουτισμός για ανίχνευση του παθογόνου σε περίπτωση που ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Η δυνατότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes* φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά ($p<0.005$) από τον αρχικό πληθυσμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας και τη μείωση του pH και της a_{w}. Συγκεκριμένα, τα τυριά χαλούμι, mozzarella, camembert, ricotta και mascarpone με χαμηλή αρχική ΟΜΧ (1.8 – 3.6 log CFU/ cm^2 ή g) υποστηρίζουν ανάπτυξη του *L. monocytogenes* με αύξηση 0.5 – 0.8 log CFU/ cm^2 ή g ανά ημέρα, ενώ ο παθογόνος παρέμεινε στον πληθυσμό του επιπέδου του αρχικού εμβολίου για τα υπόλοιπα τυριά. Στις παρτίδες με την υψηλή αρχική ΟΜΧ (5.0 – 6.0 CFU/cm^2 ή g) η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* περιορίστηκε σημαντικά ($p<0.005$) ανεξαρτήτως του τυρί.

Όσον αφορά την έκθεση στο γαστρικό υγρό, ο παθογόνος παρουσίασε αύξηση της αντοχής του κατά τη διάρκεια της συντήρησης για τα τυριά που υποστηρίζουν ανάπτυξη, ενώ για τα τυριά που υποστηρίζουν επιβίωση υπήρχε ανίχνευση του παθογόνου (16-33%) ακόμα και μετά από 60 λεπτά έκθεσης.

Η μελέτη της δυνατότητας ανάπτυξης του *L. monocytogenes* στα διάφορα τυριά κατά τη διάρκεια της συντήρησης και της επιβίωσης μετά από έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες στη βιομηχανία τυροκομικών προϊόντων.

Λέξεις κλειδιά: *L. monocytogenes*, ημίσκληρα τυριά, μαλακά τυριά, φρέσκα τυριά με αλοιφώδη υφή, παραλλακτικότητα παρτίδων και συνθετικό γαστρικό υγρό.

GROWTH POTENTIAL OF *Listeria monocytogenes* DURING STORAGE OF VARIOUS CHEESES AND SUBSEQUENT TOLERANCE AFTER SIMULATED DIGESTION

GKEREKOU MARIA

Department of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece.

Abstract

The wide variety of cheeses described by different physicochemical and microbiological characteristics may differentiate the response of *Listeria monocytogenes* during storage and digestion.

The aims were: i) to evaluate *L. monocytogenes* growth potential of various cheeses during storage and ii) to estimate the impact of storage on pathogen reduction during their exposure to simulated gastric fluid.

Cream (mascarpone, cottage), soft (mozzarella, camembert, mastelo, anthotyros, manouri, ricotta), and semi-hard (halloumi, gouda, edam) cheeses were inoculated with 100 CFU/cm^2 or g of *L. monocytogenes* and stored under vacuum or aerobic conditions at 7°C (*n=4*). The effect of competition (different initial population of endogenous microbiota-TVC) was also tested, while pH and a_w were monitored. Survivors of pathogen were enumerated during exposure to simulated gastric fluid (SGF) (pH 1.50, HCl, 60 min) using thin agar layer method, while its presence/absence was also investigated through enrichment in cases in which population levels were below the enumeration limit (*n=6*).

Growth potential of *L. monocytogenes* was significantly influenced ($p<0.05$) by the initial TVC level and pH/a_w decrease. Specifically, halloumi, mozzarella, camembert, ricotta, and mascarpone of low initial TVC (1.8-3.6 log CFU/cm^2 or g), supported *L. monocytogenes* growth by increasing 0.5-0.8 log CFU/cm^2 or g per day, while the pathogen was maintained close to the initial inoculation level to the rest cheeses. On batches of high level of initial TVC (5.0-6.0 log CFU/cm^2 or g), *L.*

monocytogenes growth was significantly suppressed ($p<0.05$), regardless of cheese. Regarding simulated digestion challenge, the pathogen showed increased tolerance during storage of cheeses which supported growth, while on those that only survival was recorded, presence of *L. monocytogenes* (16-33%) was verified, even after a 60 min exposure on SGF.

Mapping growth potential of *L. monocytogenes* on various cheeses during storage and the tolerance after simulated digestion may provide significant information to cheese industry.

Key words: *L. monocytogenes*, semi-hard cheeses, soft cheeses, cream cheeses, different cheese batches and simulated gastric fluid.

1.1 Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα

Οι διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών είναι αποτέλεσμα ετών εξέλιξης, τεχνολογικής ανάπτυξης και τεχνολογικών επιρροών, δημογραφικών αλλαγών και αλλαγής του τρόπου ζωής. Εξαιτίας του λιγοστού ελεύθερου χρόνου οι καταναλωτές θέλουν το φαγητό που αγοράζουν να είναι εύκολο και γρήγορο ως προς προετοιμασία του έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της ζήτηση για “έτοιμα προς κατανάλωση” τρόφιμα. Ο ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, ορίζει ως “έτοιμα προς κατανάλωση” (ΕΚΤ) (Ready-To-Eat) τα τρόφιμα εκείνα που προορίζονται από τον παραγωγό ή τον παρασκευαστή για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς να χρειάζονται μαγείρεμα ή άλλη επεξεργασία, αποτελεσματική για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους ανησυχητικούς μικροοργανισμούς. Ενώ σύμφωνα με το FDA (Food and Drug Administration) τα ΕΚΤ είναι τρόφιμα, τα οποία δύναται να καταναλωθούν χωρίς να είναι απαραίτητη οποιαδήποτε επιπλέον προετοιμασία τους, για να θεωρηθούν ασφαλή προς κατανάλωση. Παρόλα αυτά, δύναται να δεχτούν επιπλέον επεξεργασία με στόχο την οργανοληπτική βελτιστοποίηση (FDA, Food Code 2009: Chapter 1 - Purpose & Definitions). Επιπλέον, από την σκοπιά των εταιρειών που παρασκευάζουν και εμπορεύονται ΕΚΤ δεν υφίσταται καμία νομοθετική υποχρέωση για ενσωμάτωση οδηγιών ή άλλης επισήμανσης στην ετικέτα ως προς χειρισμούς π.χ. θερμική επεξεργασία (μαγείρεμα) που θα καταστήσουν το εκάστοτε ΕΚΤ ασφαλές (FSIS (Food Safety Inspection Service): Ready to Eat and Shelf Stable Products Process Familiarization, 2014). Συγκεκριμένα, στα ΕΚΤ περιλαμβάνονται:

- τα νωπά προϊόντα ζωικής προέλευσης, τα οποία είναι μαγειρεμένα σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA
- τα νωπά φρούτα και λαχανικά
- τα φρούτα και λαχανικά που είναι μαγειρεμένα στον ατμό
- τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης για τα οποία δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία, όπως πλύσιμο, μαγείρεμα για να θεωρηθούν ασφαλή και στα οποία έχει αφαιρεθεί η φυσικά υφιστάμενη φλούδα ή το κέλυφος.
- οι ουσίες που προέρχονται από φυτά όπως μπαχαρικά, καρυκεύματα, ζάχαρη
- τα προϊόντα αρτοποιίας, όπως ψωμί, κέικ, πίτες, γεμίσεις, παγωτά

- τα αλλαντικά (π.χ. σαλάμι αέρος, πεπερόνι), τα παστά προϊόντα κρέατος και πουλερικών (π.χ. προσούτο, καπνιστό ζαμπόν, ζαμπόν τύπου Πάρμας), τα αποξηραμένα προϊόντα με βάση το κρέας ή τα πουλερικά (π.χ. στικ βόειου κρέατος)
- τα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας, που βρίσκονται σε ερμητικά κλειστές συσκευασίες (FDA, Food Code 2009: Chapter 1 - Purpose & Definitions).

1.2 Ορισμοί τυριού

Τα τυροκομικά προϊόντα καταλαμβάνουν σημαντική θέση στις διατροφικές προτιμήσεις του Έλληνα καταναλωτή και ως εκ τούτου παρουσιάζουν αυξημένη ζήτηση. Η ζήτηση αυτή επηρεάζεται ως ένα βαθμό σημαντικά τόσο από την τιμή του εκάστοτε τυροκομικού προϊόντος όσο και το διαθέσιμο εισόδημα των καταναλωτών. Συγκεκριμένα για τα τυριά που είναι και το τρόφιμο- στόχος της παρούσας μελέτης, σύμφωνα με τον FAO, η παγκόσμια παραγωγή για το 2010, ανέρχεται περίπου στα 20 είκοσι εκατομμύρια τόνους, η ευρωπαϊκή παραγωγή περίπου στους 10 εκατομμύρια τόνους, ενώ ειδικότερα η ελληνική παραγωγή ανέρχεται σε 223.000 τόνους (http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e03.pdf). Τα μαλακά τυριά (π.χ. φέτα) αποσπούν το μεγαλύτερο μερίδιο της συνολικής εγχώριας κατανάλωσης αγγίζοντας το 50%, ακολουθούν τα ημίσκληρα και σκληρά τυριά με ποσοστό κατανάλωσης 11.6%, τα τυριά τυρογάλακτος με 5.4% και τελευταία στην προτίμηση των καταναλωτών βρίσκονται τα ανακατεργασμένα που παρουσιάζουν συνεχή πτωτική τάση (SymphonylIRI, 2010).

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1973), “τυρί είναι το νωπό ή ώριμο προϊόν που προέρχεται από στράγγιση, ύστερα από πήξη του πλήρους ή μερικώς αποβουτυρωμένου ή άπαχου γάλακτος ή βουτυρογάλακτος ή μίγματος ορισμένων ή όλων αυτών των προϊόντων”. Ειδικότερα, το 2011, σε μια δεύτερη έκδοσή του, που αφορούσε το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ο Codex Alimentarius, όρισε το τυρί ως “το μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό προϊόν ωρίμανσης ή μη, το οποίο μπορεί να περιέχει επικαλύψεις και στο οποίο ο λόγος πρωτεΐνης ορού/καζεΐνης δεν υπερβαίνει αυτόν του γάλακτος. Το προϊόν αυτό λαμβάνεται από :

- την πήξη, μερική ή ολική, πρωτεΐνης γάλακτος, αποβουτυρωμένου γάλακτος, μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος, κρέμας, κρέμας ορού γάλακτος ή βούτυρο γάλακτος ή οποιονδήποτε συνδυασμό των παραπάνω, μέσω της δράσης πυτιάς ή άλλων πηκτικών παραγόντων, καθώς και με μερική αποστράγγιση του τυρογάλακτος που προκύπτει από την πήξη, ακολουθώντας την αρχή ότι η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο τυρί θα είναι σαφώς υψηλότερη από ότι στα παραπάνω προϊόντα γάλακτος από τα οποία μπορεί να παρασκευαστεί και / ή
- τεχνικές επεξεργασίας που περιλαμβάνουν την πήξη πρωτεΐνης γάλακτος και / ή προϊόντων που παράγονται από γάλα, τα οποία δίνουν ένα τελικό προϊόν παρόμοιων φυσικών, χημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών με το προϊόν που ορίζεται στην παράγραφο (α)”.

Όπως αναφέρεται στον παραπάνω ορισμό, το τυρί μπορεί να καταναλωθεί είτε αμέσως μετά την παρασκευή του (μη ωριμασμένο τυρί), είτε αφού περάσει ορισμένο διάστημα (τυρί ωρίμανσης). Ο όρος, “μη ωριμασμένο τυρί”, αναφέρεται στο φρέσκο προϊόν που είναι έτοιμο προς κατανάλωση αμέσως μετά την παρασκευή του ενώ όρος, “τυρί ωρίμανσης” αναφέρεται το προϊόν που δεν είναι έτοιμο για κατανάλωση αμέσως μετά την παρασκευή του, αλλά πρέπει να παραμείνει για ορισμένο χρονικό διάστημα σε ορισμένη θερμοκρασία και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες προκειμένου να λάβουν χώρα βιοχημικές και φυσικές μεταβολές που θα οδηγήσουν στην απόκτηση συγκεκριμένων οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Μια υποκατηγορία των τυριών ωρίμανσης είναι αυτά η ωρίμανση επιτυγχάνεται κυρίως από την ανάπτυξη χαρακτηριστικών ειδών μυκήτων σε ολόκληρο το εσωτερικό του ή/και στην επιφάνειά του (FAO / WHO, 2011:Codex Standard 283-1978).

Επιπροσθέτως, ο ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (1988, 2011), ορίζει το τυρί ως το προϊόν που παράγεται από γάλα και αποτελεί προϊόν ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν με την επενέργεια της πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα)”. Ο ορισμός αναφέρεται σε τυριά από γάλα με ωρίμανση, τα οποία χωρίζονται σε πολύ σκληρά, σκληρά, ημίσκληρα και μαλακά τυριά.

Στην πράξη, το τυρί προέρχεται από την ολική ή μερική πήξη του γάλακτος με την επενέργεια της πυτιάς ή άλλων κατάλληλων πηκτικών μέσων (οξίνιση, θέρμανση) κι αφού γίνει μερική στράγγιση του ορού του γάλακτος που προκύπτει μετά από μια τέτοια πήξη. Στην παρασκευή του τυριού εκτός από τις παραδοσιακές τεχνικές πήξης του γάλακτος (πυτιά, θερμοκρασία, οξίνιση) μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και πιο εξελιγμένες τεχνικές επεξεργασίας που περιλαμβάνουν πήξη του γάλακτος ή/και προϊόντων που λαμβάνονται από γάλα και δίνουν ένα τελικό προϊόν παρόμοιο, με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτό το οποίο έχει προκύψει με τις παραδοσιακές τεχνικές (Fox et al. 1999).

1.3 Κατηγορίες και τεχνολογία παρασκευής τυριών

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τυριά που ανήκουν στις κατηγορίες των ημίσκληρων (edam, gouda και χαλούμι), μαλακών (mozzarella, camembert και ένα λευκό αγελαδινό τυρί με την εμπορική ονομασία «μαστέλο»), τυριών από τυρόγαλα (ricotta, ανθότυρο, μανούρι) και τυριών από γάλα χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή (cottage και mascarpone).

1.3.1 Ημίσκληρα τυριά

Ως ημίσκληρα τυριά χαρακτηρίζονται τα τυριά, των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 46% και είτε ωριμάζουν με βακτήρια (π.χ. Brick, Munster), είτε ωριμάζουν με βακτήρια και μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τυριών (π.χ. Limburger, Port du Salut, Trappist), είτε ωριμάζουν με μπλε μύκητες που αναπτύσσονται στο εσωτερικό των τυριών (π.χ. Roquefort, Gorgonzola, Danablue, Stilton, Blue Wensleydale) (Κυριακόπουλος 1995, Ανυφαντάκης 2004).

1.3.1.1 Edam και Gouda

Τα edam και gouda είναι ΠΟΠ τυριά της Ολλανδίας. Ανήκουν στην κατηγορία των ημίσκληρων τυριών ωρίμανσης από αγελαδινό γάλα. Η μάζα των τυριών αυτών είναι συμπαγής, χρώματος υποκίτρινου, χαρακτηριστικής βουτυρώδους γεύσης και με λίγες αραιές μικρές τρύπες ανομοιόμορφα διαμοιρασμένες. Η υγρασία τους δεν υπερβαίνει το 45% και το λίπος επί ξηρού βάρους δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 40% για το edam και 46% για το gouda. Κατά την παρασκευή τους, πραγματοποιείται παστερίωση του γάλακτος (72–73^{o}C για 15 sec) και προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας συνδυασμού *Betacoccus cremoris, Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis* (σε αναλογία 2%) (15-20 λεπτά πριν την προσθήκη της πυτιάς). Επιπλέον, γίνεται προσθήκη υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (40%) και διάλυμα χρωστικής ουσίας αννάτου (φυτική χρωστική που υπάρχει κυρίως στα καρότα, στα πράσινα λαχανικά, στις ντομάτες και στα πορτοκάλια). Η πήξη του γάλακτος γίνεται με την προσθήκη σκόνης πυτιάς σε θερμοκρασία 31-32^{o}C. Στη συνέχεια γίνεται διαίρεση του τυροπήγματος, και όταν αποκτήσει την ενδεδειγμένη συνεκτικότητα, αναδεύεται, αφήνεται για ανάπαυση και αφαιρείται το τυρόγαλα. Κατά το επόμενο στάδιο της τυροκόμησης γίνεται θέρμανση του τυροπήγματος σε θερμοκρασία 38-39^{o}C, προστίθεται νερό (60-70^{o}C) και μαγειρικό αλάτι και αναδεύεται. Ακολουθεί προπίεση της τυρομάζας, διαίρεσής της σε μεγέθη ανάλογα των καλουπιών, πίεση των τυριών σε θαλάμους των 20^{o}C και αλάτισμά τους με εμβάπτιση σε άλμη. Τέλος, τα τυριά ωριμάζουν για 2 μήνες σε θαλάμους θερμοκρασίας 12-14^{o}C και σχετικής υγρασίας στο 85%. Με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης τα τυριά πλένονται ή ξύνονται και τους γίνεται παραφίνωση (Κυριακόπουλος 1995).

1.3.1.2 Χαλούμι

Ημίσκληρο τυρί, λευκού μέχρι λευκοκίτρινου χρώματος, χωρίς επιδερμίδα που παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα και σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα στην Κύπρο. Χαρακτηριστική ιδιορρυθμία του τρόπου παρασκευής του τυριού αυτού είναι ότι το τυρόπηγμα το οποίο λαμβάνεται, θερμαίνεται αμέσως μετά την πίεσή του σε τυρόγαλα θερμοκρασίας μεγαλύτερης των 85^{o}C. Λόγω του παραπάνω χειρισμού που δεν γίνεται σε κανένα άλλο τυρί προσδίδεται στο χαλούμι ιδιάζουσα υφή και γεύση. Κατά την παρασκευή του γίνεται θέρμανση του γάλακτος στους 34^{o}C και προσθήκη πυτιάς. Ακολουθεί διαίρεση του τυροπήγματος, ανάδευσή του και αναθέρμανσή του στους 40^{o}C. Στη συνέχεια, το τυρόπηγμα τοποθετείται σε καλούπια και πιέζεται. Παράλληλα με τη διαδικασία της πιέσεως της τυρομάζας, θερμαίνεται τυρόγαλα για την παρασκευή της αναρής (μυζήθρα) σε θερμοκρασία 80-82^{o}C. Εξάγεται η αναρή με διάτρητη κουτάλα και τοποθετείται σε τυρόπανα για να στραγγίσει. Μετά την εξαγωγή της αναρής, η πιεσμένη τυρόμαζα διαιρείται σε τεμάχια και τοποθετείται στο θερμό τυρόγαλα για να ψηθεί (στους 93-95^oC). Μετά από 30 λεπτά τα τεμάχια εξάγονται και τοποθετούνται σε τυροτράπεζα για να κρυώσουν. Τέλος, όταν η ψημένη τυρόμαζα αποκτήσει θερμοκρασία γύρω στους 30^oC, προστίθεται επιφανειακά 3% λεπτόκοκκο αλάτι που περιέχει τεμάχια φύλλων δυόσμου. Μετά το αλάτισμα στα τεμάχια του χαλουμιού προστίθεται άλμη και πάνε για διάθεση (Ανυφαντάκης 1993).

1.3.2 Μαλακά τυριά

1.3.2.1 Τυριά από γάλα

Μαλακά τυριά χαρακτηρίζονται τα τυριά, των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 58%, τα οποία είτε υφίστανται ωρίμανση (π.χ. Bel Paese, Brie, Camembert, Hand, Neufchatel), είτε όχι (π.χ. Pot, Bakers, Ricotta, Mysot, Primost) (Κυριακόπουλος 1995, Ανυφαντάκης 2004).

1.3.2.1.1 Mozzarella

Η mozzarella είναι ΠΟΠ τυρί της Ιταλίας. Τυρί που παλαιότερα παρασκευαζόταν στις Νότιες περιοχές της Ιταλίας, σχεδόν αποκλειστικά από γάλα βουβαλιού με υψηλή λιποπεριεκτικότητα. Παρόλα αυτά, σήμερα μεγάλες ποσότητες παράγονται και από αγελαδινό γάλα. Χαρακτηριστικό των τυριών είναι ότι η τυρόμαζα, από την οποία λαμβάνονται είναι λεία, ελαστική και ινώδη. Η mozzarella προσφέρεται στο εμπόριο σε σφαιρικό σχήμα, με υγρασία μεγαλύτερη του 52% και μικρότερη του 60%. Παστεριωμένο γάλα προσαρμοσμένης λιποπεριεκτικότητας στο 3%, μεταφέρεται σε τυρολέβητα θερμοκρασίας 32^oC, όπου δέχεται 0,05% από μείγμα καλλιέργειας *S. lactis* και *S. cremoris* και αμέσως μετά επαρκή ποσότητα πυτιάς για να επιφέρει την πήξη του σε 7-8 λεπτά περίπου. Μετά από 25-30 λεπτά περίπου το πήγμα διαιρείται, αφήνεται στο θερμό τυρόγαλα χωρίς αναθέρμανση για 15 λεπτά, απομακρύνεται το ελεύθερο τυρόγαλα και αφήνεται να στραγγίσει για 1 ώρα περίπου, κατά τη διάρκεια της οποίας με ήπιους χειρισμούς συγκεντρώνεται σε ένα μέρος ώστε τελικά να αποτελέσει συμπαγή μάζα. Ακολουθεί διαίρεση της τυρόμαζας σε τεμάχια και εμβάπτισή τους σε κρύο νερό. Μετά από 15 λεπτά απομακρύνεται το κρύο νερό, τα τεμάχια της τυρόμαζας τοποθετούνται σε τυρόπανα και μεταφέρονται σε κρύο δωμάτιο για να ολοκληρωθεί η στράγγιση (αφήνονται μέχρι το pH να φθάσει 5.2-5.4 ή μέχρι να διαπιστωθεί ότι η τυρόμαζα εκτείνεται-φιλάρει). Αφαιρούνται τα τυρόπανα και η όξινη τυρόμαζα διαιρείται σε λωρίδες και τοποθετείται σε ζεστό νερό. Στη συνέχεια αρχίζει η ανάμιξη και έκτασή της μέχρις ότου μετατραπεί σε λεία, λευκή, πλαστική μάζα, οπότε θερμή όπως είναι διαιρείται ώστε να ληφθούν τυριά επιθυμητού βάρους, τοποθετείται στα καλούπια και μεταφέρεται σε κρύο νερό για να αποκτήσει μεγαλύτερη συνεκτικότητα. Μετά την ψύξη και το ξέπλυμα με κρύο νερό, αφαιρούνται τα καλούπια και τοποθετούνται τα τυριά σε άλμη 23% για 2-12 ώρες, για να αποκτήσουν μεγαλύτερη συνεκτικότητα και περιεκτικότητα σε αλάτι περίπου 1%. Τέλος, τα τυριά στεγνώνουν και συσκευάζονται (Ανυφαντάκης 1993).

1.3.2.1.2 Camembert

Τυρί που παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1791 στο χωριό camembert της Νορμανδίας. Πλέον είναι ένα από τα ΠΟΠ τυριά της Γαλλίας. Ο μύκητας που κατ’ εξοχήν αναπτύσσεται και δίνει το χαρακτηριστικό άρωμα, γεύση και εμφάνιση στο τυρί αυτό είναι ο *Penicillium camemberti*. Οι κονιδιοφόροι του καλύπτουν την επιφάνεια των τυριών υπό μορφή πυκνού λευκού σώματος. Το camembert είναι μαλακό τυρί, το εσωτερικό του οποίου είναι κιτρινωπό κηρώδες ή κρεμώδες ή σχεδόν υγρό, ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσής του. Είναι έτοιμο για κατανάλωση όταν η επιφάνειά του είναι λευκή, το εσωτερικό του έχει αποκτήσει κιτρινωπό χρώμα και σε τομή δείχνει ένα ελάχιστο σκληρό πυρήνα στο κέντρο του. Πραγματοποιείται παστερίωση του γάλακτος και ψύξη του (στους 32-34^{o}C). Ακολουθεί προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας και αν χρειάζεται, αννάτο για χρώση των τυριών. Μετά από 1 ώρα προστίθεται ποσότητα πυτιάς επαρκής να επιφέρει την πήξη του γάλακτος σε 25 λεπτά. Το πήγμα υπό αυτές τις συνθήκες διαιρείται μετά από 70-75 λεπτά. Στη συνέχεια, το πήγμα τοποθετείται στα καλούπια σε χώρο θερμοκρασίας 22^{o}C. Την επόμενη μέρα αφαιρούνται τα τυριά από τα καλούπια και μεταφέρονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 18-20^{o}C, όπου αλατίζονται με λεπτόκοκκο αλάτι ή με εμβάπτιση σε άλμη. 1h μετά το αλάτισμα, ψεκάζονται και οι δύο πλευρές των τυριών με σπόρια μύκητα, τοποθετούνται σε μεταλλικά πλέγματα και μεταφέρονται σε θάλαμο με θερμοκρασία 11-14^oC και σχετική υγρασία 90%, για να ωριμάσουν. Εκεί παραμένουν για 10-12 ημέρες και στη συνέχεια συσκευάζονται (Ανυφαντάκης 1993).

1.3.2.1.3 Λευκό αγελαδινό τυρί με την εμπορική ονομασία «μαστέλο®»

Το τυρί μαστέλο® είναι ένα τυρί που φτιάχτηκε για πρώτη φορά το 1994. Μέχρι τότε κανείς και ποτέ δεν είχε χρησιμοποιήσει τη λέξη «μαστέλο» για να χαρακτηρίσει τα τυριά που φτιάχνονταν στη Χίο, είτε από τοπικούς κτηνοτρόφους είτε στα σπίτια αγροτικών οικογενειών του νησιού. Η λέξη μαστέλο, στην κυριολεξία σημαίνει τον ξύλινο κάδο που χρησιμοποιούσαν για τη συλλογή του γάλακτος και είναι ενετικής προέλευσης (mastelo). Το μαστέλο® είναι λευκό, μαλακό τυρί από αγελαδινό γάλα, με μαλακή υφή μάζας χωρίς επιδερμίδα, εύπεπτο και γευστικό. Γίνεται παστερίωση του γάλακτος τυροκόμησης, προστίθεται πυτιά και πήζει σε ανοξείδωτα καζάνια. Στη συνέχεια αναδεύεται, ψήνεται και μαζεύεται για να στραγγίσει. Αφού στεγνώσει σε δροσερό περιβάλλον, μπαίνει σε ελαφριά άλμη και τέλος συσκευάζεται σε κενό αέρος.

1.3.2.2 Τυριά από τυρόγαλα

Τυριά τυρογάλακτος χαρακτηρίζονται τα τυριά τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλο) και βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα) και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%.

1.3.2.2.1 Ανθότυρο

Ο ανθότυρος είναι τυρί που παρασκευάζεται σε ολόκληρο τον ελλαδικό χώρο από αιγοπρόβειο τυρόγαλο, με ή χωρίς προσθήκη αιγοπρόβειου γάλακτος ή αιγοπρόβειας κρέμας γάλακτος. Η υγρασία του φτάνει το 66.2 ± 4.5% και η λιποπεριεκτικότητα το 18.5 ± 4.8% Έχει συνεκτική τυρώδη πάστα κρεμώδους υφής. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη γάλακτος στο τυρόγαλα με ή και χωρίς κρέμα. Το γάλα αυτό λέγεται «πρόσγαλα» και προστίθεται στο τυρόγαλα σε θερμοκρασία περίπου 70^{o}C. Η ποσότητα του προσγάλακτος είναι συνήθως 10% του τυρογάλακτος μπορεί όμως να είναι λιγότερο αλλά να προστεθεί κρέμα μαζί με το πρόσγαλα. Στραγγίζει σε τσαντίλες και παίρνει ωοειδές, αλατίζεται επιφανειακά με χονδρόκοκκο αλάτι και αφήνεται να στεγνώσει. Μετά το καλούπιασμα και το στέγνωμα ο ανθότυρος εισάγεται στο ψυγείο και από την επόμενη μέρα μπορεί να διατεθεί στην κατανάλωση (Ζερφυρίδης 2001).

1.3.2.2.2 Μανούρι

Το μανούρι είναι ΠΟΠ τυρί, το οποίο από την κατηγορία των τυριών τυρογάλακτος είναι το πλέον εύγευστο. Είναι συνεκτικό και κρεμώδες λόγω του ότι περιέχει διπλάσιο πρόσγαλα και κρέμα και κατά συνέπεια περιέχει περισσότερο λίπος και λιγότερη υγρασία από τον ανθότυρο. Χρησιμοποιείται τυρόγαλα από κατσικίσιο γάλα ή με πρόσμιξη λίγο πρόβειου. Για την παραγωγή του τυρογάλακτος πήζεται πλήρες κατσικίσιο γάλα σε θερμοκρασία 32^{o}C. Όταν αρχίζει να σχηματίζεται το πήγμα κόβεται σε ψιλά κομμάτια με σύγχρονη ανάδευση ώστε το λίπος να μένει κατά μεγάλο μέρος στο τυρόγαλα. Το τυρόπηγμα αναθερμαίνεται μέχρι τους 50^{o}C και εξάγεται από το τυρόγαλα. Συνεχίζει η θέρμανση και ανάδευση, προστίθεται πρόσγαλα 5-10% ή/και κρέμα στους 70^{o}C με συνεχή θέρμανση και ανάδευση μέχρι να εμφανισθούν οι θρόμβοι της πρωτεΐνης στους 90 ^{o}C. Στο σημείο αυτό σταματά η ανάδευση ενώ διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία για περίπου 15 λεπτά για να γίνει το ψήσιμο. Ακολούθως, συλλέγεται, τοποθετείται σε ηθμούς από πανί ή μεταλλικά καλούπια. Τέλος, μετά από μια μέρα μπορεί να πουληθεί νωπό αλατισμένο ή μη, ή ξηραίνεται στον ίσκιο σε χαμηλή θερμοκρασία (Ζερφυρίδης 2001).

1.3.2.2.3 Ricotta

Η ricotta είναι ιταλικό τυρί τυρογάλακτος από πρόβειο (ή αγελαδινό, ή κατσικίσιο ή βουβαλίσιο) γάλα, που έχει απομείνει από την παραγωγή τυριού. Το τυρόγαλο ρίχνεται στον τυρολέβητα, προστίθεται η υπολογιζόμενη ποσότητα κρέμας γάλακτος και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία των 65^{o}C. Στη συνέχεια προστίθεται το γάλα και μικρή ποσότητα διαλύματος μαγειρικού αλατιού. Η οξίνιση του τελικού μίγματος γίνεται με προσθήκη κιτρικού οξέος. Στην αρχή παρατηρείται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που στη συνέχεια πήζουν σε μια μάζα η οποία ανεβαίνει στην επιφάνεια. Γίνεται συλλογή του δείγματος με διάτρητες κουτάλες και τοποθετείται σε διάτρητα ειδικά καλούπια ή σε τυρόπανα. Το πήγμα αφήνεται να στραγγίσει επί 12-24 ώρες σε δροσερούς θαλάμους και όταν το προϊόν έχει πλέον αποκτήσει την κανονική του υγρασία, αφαιρούνται τα καλούπια ή τα τυρόπανα και συσκευάζονται ανά τεμάχιο (Κυριακόπουλος 1995).

1.3.3 Τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή

Τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή και τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση που ορίζονται με βάση τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ως εξής:

“Τα φρέσκα (νωπά) τυριά που παρασκευάζονται με την επενέργεια οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηρίων σε παστεριωμένο γάλα ή παστεριωμένο γάλα και παστεριωμένη κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 75%”.

“Τα τυριά τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα) και βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (κοινώς αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα) [μερικά από αυτά μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξερά) και άλλα κατόπιν ωρίμανσης] και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%”.

1.3.3.1 Mascarpone

Φρέσκο τυρί της Βόρειας Ιταλίας, με μάζα λευκού έως λευκοκίτρινου χρώματος και αλοιφώδη υφή. Έχει λεπτή και ευχάριστη γεύση και καταναλώνεται αμέσως μετά την παρασκευή του ως υποκατάστατο του φρέσκου βουτύρου ή στη ζαχαροπλαστική. Παρασκευάζεται από φρέσκια αγελαδινή κρέμα γάλακτος, λιποπεριεκτικότητας 25-35%, που παστεριώνεται στους 90^{o}C. Όταν η θερμοκρασία της κρέμα φτάσει τους 90 ^{o}C προστίθεται κιτρικό οξύ (5%), υπό συνεχή ανάδευση, έως ότου η μάζα αποκτήσει ορισμένη πυκνότητα. Ακολουθεί, εξαγωγή του πήγματος και στράγγισή του για 24 ώρα σε θαλάμους θερμοκρασίας 5-10^{o}C. Μετά από 24 ώρες το τυρί είναι έτοιμο να συσκευαστεί σε πλαστικά κύπελλα για πώληση (Κυριακόπουλος 1995).

1.3.3.2 Cottage

Τυρί Cottage θεωρείται το χωρίς ωρίμανση αναθερμασμένο λευκό κοκκώδες τυρόπηγμα άπαχου αγελαδινού γάλακτος στο οποίο προστίθεται κορυφή και αλάτι. Γίνεται παστερίωση του γάλακτος και προστίθεται καλλιέργεια των *S. lactis* και *S. cremoris*, σε αναλογία 5%. Η πήξη του γάλακτος γίνεται σε θερμοκρασία 32^{o}C, με υγρή πυτιά, που προστίθεται συνήθως 30 λεπτά μετά την οξυγαλακτική καλλιέργεια. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διαίρεση του τυροπήγματος (5 ώρες μετά την προσθήκη της πυτιάς ή όταν το pH του είναι 4.6) και το πήγμα αφήνεται σε ακινησία για 15-30 λεπτά. Στη συνέχεια, αναδεύεται ήπια και αναθερμαίνεται μέχρι τους 50-52^{o}C. Μετά την αναθέρμανση απομακρύνεται μέρος του τυρογάλακτος και προστίθεται νερό για έκπλυση. Το ξεπλυμένο και ψυγμένο τυρόπηγμα στραγγίζεται, προστίθεται η κορυφή (ποσότητας ανάλογης με αυτή που επιθυμείται στο τελικό προϊόν) και το αλάτι (0,75-1% του τελικού προϊόντος) και το προϊόν συσκευάζεται (Ανυφαντάκης 1993).

1.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στο τυρί

Οι σημαντικότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί να συνδέονται με κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων στο τυρί είναι οι *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 και *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). Πρέπει να τονιστεί ότι γίνεται αναφορά κυρίως σε αυτούς καθώς η παρουσία τους στο νωπό γάλα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού είτε η επιμόλυνση του παστεριωμένου γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί για παστερίωση από αυτούς αποτελεί σημαντική απειλή για την Δημόσια Υγεία, λόγω του αυξημένου ποσοστού περιστατικών που έχουν καταγραφεί, καθώς και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων των λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτούς (Kousta et al. 2010).

<u>Listeria monocytogenes</u>**:** Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, είναι ο μικροοργανισμός ο οποίος προκαλεί λιστερίωση, μια σοβαρή λοιμώδη τροφιμογενή ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε σύγκριση με τις ασθένειες που προκαλούν τα άλλα τροφιμογενή βακτήρια (Donelly 2001). Η λιστερίωση επηρεάζει άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα όπως τις εγκύους, τα νεογνά, τους ανοσοκατεσταλμένους και τους υπερήλικες (Ανυφαντάκης 2004). Το επίπεδο της αρχικής επιμόλυνσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την πρόκληση της λοίμωξης από το παθογόνο (Ryser 1999). Σε σχεδόν τα μισά καταγεγραμμένα κρούσματα λιστερίωσης στην Ευρώπη έχουν εμπλακεί γαλακτοκομικά προϊόντα (Lundén et al. 2004). Κατά τη δεκαετία του 1980 – 1990 εκδηλώθηκαν τρεις μεγάλες εξάρσεις που συνδέονται με γαλακτοκομικά προϊόντα καταλήγοντας σε περισσότερους από 100 θανατηφόρα περιστατικά (Ανυφαντάκης 2004). Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH. Θανατώνεται με την παστερίωση του γάλακτος. Η συμπεριφορά του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά την ωρίμανση των τυριών εξαρτάται τόσο από τις συνθήκες ωρίμανσης και διατήρησής τους όσο και από τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Η ενεργότητα του νερού (a_w) καθώς και το pH είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξή του. Τυριά με υψηλή υγρασία και υψηλή τιμή pH, όπως είναι πολλά από τα μαλακά, είναι πιθανό να υποστηρίζουν ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Ανυφαντάκης 2004), γιατί δεν υφίστανται ωρίμανση και λόγω της θέρμανσης του τυρογάλακτος στερούνται φυσικής οξυγαλακτικής χλωρίδας και καλλιεργειών εκκινητών. Η ψύξη των τελικών προϊόντων δεν είναι εμπόδιο για τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου *L. monocytogenes* αφού πρόκειται για ψυχρότροφο μικροοργανισμό που επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (Φουκάκη 2011).

<u>Staphylococcus aureus</u>**:** Ακόμη ένας παθογόνος μικροοργανισμός που ενδιαφέρει την τυροκομία είναι ο *S. aureus*, εξαιτίας των εντεροτοξινών που παράγει, οι οποίες προκαλούν τροφικές τοξινώσεις στον άνθρωπο (Le Loir et al. 2003, Φουκάκη 2011). Η τοξίνωση προκαλείται από κατανάλωση τροφίμου, το οποίο φέρει κύτταρα του τοξινοπαραγωγού στελέχους, που έχουν παράξει εντεροτοξίνες (SEss) (Genigeorgis 1989, Rosec et al. 1997, Balaban and Rasooly 2000, Le Loir et al. 2003, Ανυφαντάκης 2004). Πηγή μόλυνσης του γάλακτος είναι ο μαστός των γαλακτοπαραγωγών ζώων, τον οποίο προσβάλλουν και προκαλούν κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα. Από το γάλα ο μικροοργανισμός περνά στα τυριά, σε περίπτωση που αυτό δεν παστεριώνεται, όπου κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστεί και να δημιουργήσει προβλήματα. Παρόλο που ο μικροοργανισμός *S. saureus* θανατώνεται με τη θέρμανση, δεν συμβαίνει το ίδιο και με τις τοξίνες του, οι οποίες είναι θερμοάντοχες (Ανυφαντάκης 2004, Φουκάκη 2011). Η εντεροτοξίνη Α του *S. aureus* ενοχοποιήθηκε για τροφοδηλητηριάσεις στη Μεγάλη Βρετανία το Δεκέμβριο του 1984 και τον Ιανουάριο 1985. Τέλος του 2009, έξι επιδημίες από σταφυλοκοκκικές τροφοδηλητηριάσεις αναφέρθηκαν στη Γαλλία, από μαλακό τυρί παρασκευασμένο από απαστερίωτο γάλα (Φουκάκη, 2011). Τα συμπτώματα εκδηλώνονται ταχύτατα και περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό και διάρροια (Jablonski and Bohach 1997). Ο μικροοργανισμός είναι τρίτος στην κατάταξη από υπεύθυνους παθογόνους για τροφιμογενείς λοιμώξεις παγκοσμίως (Normanno et al. 2005, Boerema et al. 2006).

***Salmonella* spp.:** Οι λοιμώξεις από *Salmonella* spp., παρότι έχουν συσχετιστεί περισσότερο με την κατανάλωση πουλερικών (Bryan and Doyle, 1995), έχουν επίσης συνδεθεί και με κρούσματα λοιμώξεων μετά από κατανάλωση διαφόρων τύπων τυριών. Συγκεκριμένα οι D' Aoust et al. (1985) και οι Ratman and March (1986), αναφέρουν κρούσμα σαλμονέλωσης προερχόμενο από τυρί Cheddar, στο οποίο είχαν αναπτυχθεί λιγότερα από 10 κύτταρα *Salmonella* spp.. Επιπλέον, οι Hedberg et al. (1992) αναφέρουν 164 κρούσματα σαλμονέλωσης που συνδέονταν με την κατανάλωση επιμολυσμένου τυριού Mozzarella (Πίνακας 1). Η μολυσματική δόση αυτών των περιστατικών βρέθηκε να είναι αρκετά χαμηλή (0.36-4.3 MPN/100 g), υποδεικνύοντας ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις ακόμη και αν βρίσκεται στο τυρί σε πληθυσμό κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στο Οντάριο του Καναδά, το Σεπτέμβριο του 1996, ταυτοποιήθηκαν 82 περιστατικά μόλυνσης από *Salmonella berta*, μετά από κατανάλωση μη παστεριωμένου μαλακού τυριού. Στην Πολιτεία της Ουάσινγκτον, μεταξύ 1 Ιανουαρίου και 5 Μαΐου 1997, αναφέρονται 54 περιστατικά νόσησης από *Salmonella typhimurium* DT104. Από έρευνα που ακολούθησε αποδείχτηκε ότι αίτιο της επιδημίας ήταν μεξικάνικο μαλακό τυρί που παρασκευαζόταν από μη παστεριωμένο γάλα σε τοπική φάρμα. Τέλος, στη Γαλλία, από 12 Μαΐου έως 8 Ιουλίου του 1997, ξέσπασε επιδημία από *Salmonella* Typhimurium. Επιβεβαιώθηκαν 113 περιστατικά και το αίτιο αποδείχθηκε ότι ήταν ένα είδος μαλακού τυριού που παρασκευαζόταν από μη παστεριωμένο γάλα (Φουκάκη, 2011). Τα τυπικά συμπτώματα της λοίμωξης είναι η ναυτία, ο πυρετός, η διάρροια, η σηψαιμία ή η αρθρίτιδα (D'Aoust et al. 2001).

***Escherichia coli* O157:H7:** Ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 είναι συνδεδεμένος περισσότερο με λοιμώξεις προερχόμενες από κατανάλωση νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος από ότι τυριού (Upton and Coia 1994) (Πίνακας 1). Ωστόσο υπάρχουν επιβεβαιωμένα κρούσματα λοιμώξεων από *E. coli* O157:H7 προερχόμενες από την κατανάλωση τυριού. Στον Καναδά, κρούσματα συνδέθηκαν, με κατανάλωση σκληρού τυριού από μη παστεριωμένο γάλα (Honish et al. 2005) (Πίνακας 1) και σε μια δεύτερη περίπτωση στη Γαλλία, από κατανάλωση μη παστεριωμένου κατσικίσιου τυριού (Espié et al. 2006) (Πίνακας 1). Η μολυσματική δόση του παθογόνου είναι 10-100 κύτταρα ή και ακόμη χαμηλότερη στις ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες (παιδιά, ηλικιωμένοι, βρέφη κ.ά.) (Armstrong et al. 1996). Η λοίμωξη από τον παθογόνο προκαλεί μη εντεροαιμοραγική διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και θάνατο (Meng et al. 2001). Με δεδομένο ότι ο μικροοργανισμός καταστρέφεται με την παστερίωση, είναι προφανές ότι σε περιπτώσεις που υπάρχει σε τυριά, αυτό οφείλεται σε επιμολύνσεις τους για τις οποίες συνήθως ενοχοποιείται το προσωπικό ή το μολυσμένο νερό. Η υγιεινή του προσωπικού έχει ιδιαίτερη σημασία, γι' αυτό και θα πρέπει να υποβάλλεται σε ειδική εκπαίδευση (Ανυφαντάκης 2004).

***Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP):** Η παρουσία του MAP στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχει, πρόσφατα, προκαλέσει ανησυχία, λόγω της πιθανής συσχέτισής του με την παθογένεια της νόσου του Crohn's (Hermon-Taylor et al. 2000, Chamberlin et al. 2001, Chacon et al. 2004).

Πίνακας 1: Κρούσματα λοιμώξεων από παθογόνους μικροοργανισμούς στο τυρί (Kousta et al. 2010).

Προϊόν	**Παθογόνος μικροοργανισμός**	**Κρούσματα (θάνατοι)**	**Έτος**	**Χώρα**
Τυρί από παστεριωμένο γάλα	*S. aureus*	16	1981	ΗΠΑ

Παραδοσιακό πρόβειο τυρί από νωπό γάλα	*S. aureus*	20	1983	Γαλλία
Τυρί από παστεριωμένο γάλα	*S. aureus*	2	1983	Αγγλία
Πρόβειο τυρί από νωπό γάλα	*S. aureus*	27	1984	Σκωτία
Μαλακό τυρί από νωπό γάλα	*S. aureus*	215	1985	Ελβετία
Τυρί Stilton από μη παστεριωμένο γάλα	*S. aureus*	155	1988	Αγγλία
Τυρί από άγνωστης προέλευσης γάλα	*S. aureus*	7	1994	Βραζιλία
Τυρί Mozzarella από παστεριωμένο γάλα	*Salmonella*	164	1989	ΗΠΑ
Κατσικίσιο τυρί από νωπό γάλα	*Salmonella*	277	1990	Γαλλία
Κατσικίσιο τυρί από νωπό γάλα	*Salmonella*	273 (1)	1993	Γαλλία
Μαλακό παραδοσιακό τυρί από μη παστεριωμένο γάλα	*Salmonella*	35	1994	Καναδάς
Τυρί Mont d’Or από νωπό γάλα	*Salmonella*	25 (5)	1995	Γαλλία
Τυρί Mont d’Or από νωπό γάλα	*Salmonella*	14 (1)	1996	Γαλλία
Τυρί Morbier από νωπό γάλα	*Salmonella*	113	1997	Γαλλία
Μαλακό τυρί Μεξικού	*Salmonella*	17	1997	ΗΠΑ

Φρέσκο τυρί από νωπό γάλα	*Salmonella*	215	2001	Γαλλία
Μαλακό τυρί	*Salmonella*	82	2006 - 2007	Ελβετία
Τυρί Brie και Camembert από παστεριωμένο γάλα	*E. coli*	170	1983	ΗΠΑ
Τυρί Brie από παστεριωμένο γάλα	*E. coli*	135	1983	Ολλανδία και Σουηδία
Φρέσκο παραδοσιακό τυρί από νωπό γάλα	*E. coli*	4 (1)	1992	Γαλλία
Παραδοσιακό τυρί από νωπό γάλα	*E. coli*	22	1994	Σκωτία
Φρέσκο παραδοσιακό τυρί από νωπό γάλα	*E. coli*	4	1994	Γαλλία
Τυρί Gouda μη παστεριωμένο	*E. coli* O157: H7	13	2002	Καναδάς
Φρέσκο μη παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα	*E. coli* O157: H7	3	2004	Γαλλία

1.5 *Listeria monocytogenes*

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει μέχρι σήμερα 9 αναγνωρισμένα είδη, από τα οποία μόνο το είδος *Listeria monocytogenes* είναι παθογόνο για τον άνθρωπο. Το 90% των στελεχών του που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο ανήκουν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος διαστάσεων 0.4-0.5 μm x 0.5-2.0 μm και απαντάται υπό μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή αλυσίδων μικρού μήκους. Πρόκειται για μη σπορογόνο βακτήριο, το οποίο παρουσιάζει ικανότητα κίνησης σε θερμοκρασία δωματίου (20-25^{o}C) λόγω των περίτριχων βλεφαρίδων που διαθέτει, ενώ στερείται κίνησης σε θερμοκρασίες άνω των 30 ^{o}C (Peel et al. 1988). Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο αυξάνεται καλύτερα υπό συγκέντρωση 5-10% διοξειδίου του άνθρακα (Μπαλατσούρας 2006, Lungu et al. 2009). Το κατώτερο και ανώτερο θερμοκρασιακό όριο αύξησής του είναι 1 – 2^{o}C και 45^{o}C αντίστοιχα (Junttila et al. 1988). Πρόκειται λοιπόν για έναν ψυχρότροφο μικροοργανισμό, η βέλτιστη αύξηση του οποίου παρατηρείται σε θερμοκρασία μεταξύ 35^{o}C και 37^{o}C. Η ικανότητα του βακτηρίου να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψυγείου (2 – 4^{o}C) καθιστά το τεχνολογικό εμπόδιο της ψύξης ανεπαρκές για τον πλήρη έλεγχο του παθογόνου στα τρόφιμα. Ωστόσο, η παρατηρούμενη μικροβιακή αύξηση στις θερμοκρασίες ψυγείου είναι σχετικά αργή, με τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού του βακτηρίου να έχει καταγραφεί περίπου στις 1 – 2 ημέρες κατά τη συντήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων σε θερμοκρασία 4^{o}C (Ryser 2007). Σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5^{o}C, η λανθάνουσα φάση (lag phase) κατά την αύξηση του μικροοργανισμού διαρκεί συνήθως από 1 έως και 33 ημέρες (Adams and Moss 2008). Ο μικροοργανισμός επιβιώνει σε θερμοκρασίες μικρότερες από τους 0^{o}C. Αύξηση του *L. monocytogenes* παρατηρείται σε ζωμούς με τιμές pH μεταξύ 4.4 και 9.4, με τη βέλτιστη αύξηση να λαμβάνει χώρα σε τιμή pH 7.0 (Parish and Higgins 1989, Harris 2002). Τιμές pH μικρότερες της τιμής 5.5 καταλήγουν σε σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (Adams & Moss, 2008). Επιπλέον, το *L. monocytogenes* είναι ένα από τα λίγα βακτηριακά τροφιμογενή παθογόνα που παρουσιάζουν ικανότητα αύξησης σε τιμές ενεργότητας νερού μικρότερες της τιμής 0.93 (Farber et al. 1992). Το βακτήριο είναι ανθεκτικό στην ξηρασία και στη μεγάλη συγκέντρωση αλάτων, καθώς είναι σε θέση να αυξάνεται σε 10% (w/v) χλωριούχο νάτριο ή 200 ppm νιτρώδους νατρίου και να επιβιώνει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των αλάτων αυτών (Shahamat et al. 1980). Εξάλλου, η επιβίωση του *L. monocytogenes* σε χαμηλή τιμή pH και υψηλή συγκέντρωση άλατος εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από τη θερμοκρασία (Cole et al. 1990).

1.6 Λιστερίωση

1.6.1 Επιδημιολογικά στοιχεία και κρούσματα λιστερίωσης

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* απαντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον, ευρισκόμενος στο έδαφος, στη βλάστηση, στα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, στα λύματα, στη λάσπη των βιολογικών καθαρισμών και στα κόπρανα ανθρώπου και ζώων (Schuchat et al. 1991, Allerberger 2007). Η επιβίωση του βακτηρίου στο έδαφος και στο νερό μπορεί να συμβεί για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του έτους, ενώ στα κόπρανα των ζώων μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από 2 χρόνια (Schlech et al. 1983, Schutchat et al. 1993). Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού στον άνθρωπο, εκτός από την άμεση μετάδοση από τα προσβεβλημένα ζώα, είναι τα μιασμένα τρόφιμα, όπου κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί τόσο παστεριωμένο όσο και το μη παστεριωμένο γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. μαλακά τυριά, παγωτό, βούτυρο), το κρέας και διάφορα κρεατοσκευάσματα (λουκάνικα, ζυμούμενα αλλαντικά, πατέ κ.α.), οι ωμές σαλάτες και τα λαχανικά (π.χ. μαρούλι, λάχανο, ραπανάκι), τα πουλερικά, τα ψάρια και τα οστρακοειδή (Farber and Peterkin 1991, Mossel et. al. 1995, Rocourt and Cossart 1997). Ο μικροοργανισμός δύναται μιάνει τα προαναφερθέντα τρόφιμα, από κακούς χειρισμούς κατά την παρασκευή και διανομή των τροφίμων με συνέπεια την εμφάνιση φαινομένων επιμόλυνσης (cross-contamination) των έτοιμων προς κατανάλωση (ready-to-eat) τελικών προϊόντων.

Τα αποτελέσματα δυο μελετών παρακολούθησης του *L. monocytogenes* που διεξάχθηκαν από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) των Η.Π.Α. κατά τα έτη 1980 – 1982 και 1986, κατέδειξαν ετήσια 7.4 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού, γεγονός που μεταφράστηκε σε περίπου 1850 κρούσματα και 425 θανάτους κατ' έτος από τη μόλυνση με το παθογόνο (Ciesielski et al. 1988, Gellin et al. 1991). Μέχρι το 1993, μετά την υιοθέτηση συστάσεων για ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης τροφιμογενούς λιστερίωσης (NACMCF, 1991) από τις αρμόδιες κρατικές υπηρεσίες των Η.Π.Α. (FDA, FSIS κ.α.) και την εναρμόνιση της βιομηχανίας τροφίμων στις απαιτήσεις της προκύπτουσας σχετικής νομοθεσίας, η ετήσια συχνότητα εμφάνισης της νόσου μειώθηκε στα 4.4 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού ή στα 1092 κρούσματα και 248 θανάτους περίπου κατ' έτος (Tappero et al. 1995).

Τη δεκαετία 1991 έως 2001, τα καταγεγραμμένα περιστατικά από επιδημίες λιστερίωσης στον Ευρωπαϊκό χώρο ήταν 2065, δηλαδή 188 το χρόνο. Ο αριθμός αυτός είναι μάλλον μικρότερος του πραγματικού, αφού πολλά από αυτά μπορεί να μην δηλώθηκαν στις υγειονομικές αρχές. Επίσης, σποραδικά κρούσματα της νόσου μπορεί να αποτελούν μέρος κάποιας επιδημίας που δεν αναγνωρίστηκε. Νεότερα δεδομένα ανεβάζουν το συνολικό αριθμό επιβεβαιωμένων περιστατικών στην Ευρωπαϊκή Ένωση στα 1381 για το 2008 (Φουκάκη, 2011). Στην Ε.Ε. η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης για το έτος 2010 ανερχόταν στα 3.5 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού (EFSA & ECDC, 2012). Στη χώρα μας οι τροφιμογενείς λοιμώξεις και δηλητηριάσεις κατά τα έτη 1993 – 1998, δείχνουν μόνο ένα κρούσμα ανθρώπινης λιστερίωσης το οποίο καταγράφηκε το 1998 (Tirado and Schmidt 2000), ενώ τα έτη 1999 και 2000 επιβεβαιώθηκαν επτά και έξι κρούσματα λιστερίωσης αντίστοιχα (Schmidt and Gervelmeyer 2003). Τα επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης στη χώρα μας κατά τα έτη 2004 – 2010 ήταν 3 (2004), 8 (2005), 7 (2006), 10 (2007), 1 (2008), 4 (2009) και 10 (2010) (EFSA & ECDC, 2010, 2011, 2012).

Φαίνεται ότι περίπου το 50% των κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ευρώπη, εξαιτίας τροφιμογενών λοιμώξεων, οφείλονται σε κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Ryser 1999, De Buyser et al. 2001) (Πίνακας 2). Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ανήκουν στις κατηγορίες τροφίμων που καταναλώνονται από πληθυσμιακές ομάδες όλων των ηλικιών, περιλαμβανομένων και αυτών που διαθέτουν υψηλό κίνδυνο να νοσήσουν αν καταναλώσουν τρόφιμα επιμολυσμένα με τον παθογόνο μικροοργανισμό (YOPIS) (Φουκάκη 2011).

<u>Πίνακας 2:</u> Κρούσματα λοιμώξεων από *L.monocytogenes* σε γάλα, τυρί ή άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (Seeliger 1961, Fleming et.al. 1985, Linnan et. al. 1988, Jensen et al. 1994, Büla et al. 1995, MacDonald et al. 2005, Gaulin et al. 2003, Bille et al. 2006, Swaminathan and Gerner-Smidt 2007, Fretz et al. 2010, Koch et al. 2010, Kousta et al. 2010, Ανδρίτσος 2012, FDA).

Προϊόν	**Κρούσματα (θάνατοι)**	**Έτος**	**Χώρα**
Νωπό γάλα	100	1949 - 1957	Γερμανία
Διάφορα γαλακτοκομικά	11 (5)	1981	Αγγλία
Παστεριωμένο γάλα	49 (14)	1983	ΗΠΑ
Μαλακό τυρί από μη παστεριωμένο γάλα, Vacherin Mont d' Or	122 (34)	1983 - 1987	Ελβετία
Μαλακό τυρί μεξικάνικου τύπου, από απαστερίωτο γάλα	142 (48)	1985	ΗΠΑ
Απαστερίωτο γάλα	28 (5)	1986	Αυστρία
Παγωτό και μαλακό τυρί Brie	36 (16)	1986 - 1987	ΗΠΑ
Βούτυρο	11	1987	ΗΠΑ
Camembert	2	1989	Λουξεμβούργο
Μπλε τυρί / Σκληρό τυρί	26 (7)	1989 - 1990	Δανία
Παστεριωμένο σοκολατούχο γάλα	48	1994	ΗΠΑ

Μαλακό τυρί	37 (11)	1995	Γαλλία
Μαλακό τυρί Pont l’ évêque	14	1997	Γαλλία
Βούτυρο	25 (6)	1998 - 1999	Φιλανδία
Μαλακό τυρί Μεξικού από νωπό γάλα	13 (5)	2000	ΗΠΑ
Τυρί μεξικάνικου τύπου (από απαστερίωτο γάλα)	12 (5)	2000 - 2001	ΗΠΑ
Μαλακό τυρί	33	2001	Σουηδία
Τυρί από νωπό γάλα	17	2002	Καναδά
Τυρί Μεξικού	12	2003	ΗΠΑ
Μαλακό τυρί	10 (3)	2005	Ελβετία
Τυρί που έχει πήξει με οργανικό οξύ, από παστεριωμένο γάλα	189	2006 - 2007	Γερμανία
Τυρί που έχει πήξει με οργανικό οξύ	34 (7)	2009	Αυστρία Γερμανία Τσεχία
Ημι-μαλακό τυρί με την ονομασία: Les Frères, Petit Frère, Petit Frère with Truffles	6 (1 θάνατος και 1 αποβολή εγκύου)	2013	ΗΠΑ

1.6.2 Παθογένεια του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Το παθογόνο *Listeria monocytogenes* είναι ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο. Οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι κυρίως ευθύνονται για την παθογένεια του μικροοργανισμού είναι η λιστεριολυσίνη Ο (listeriolysin O, LLO), η ειδική φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και η λεκιθινάση (Vazquez-Boland et al. 2001, Portnoy et al. 2002, Dussurget et al. 2004). Ο μικροοργανισμός εισάγεται στο υγιές κύτταρο μέσω του σχηματισμού φαγοσωμάτων (phagosomes). Όταν το φαγόσωμα εισαχθεί με φαγοκύτωση στο κύτταρο, με τη βοήθεια των ενζύμων που προαναφέρθηκαν, επέρχεται λύση της μεμβράνης του φαγοσώματος και το βακτήριο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και πολλαπλασιάζεται. Σημαντικό στοιχείο της παθογένειας του *L. monocytogenes* είναι η ικανότητά του να εισβάλλει σε γειτονικά κύτταρα. Για να το επιτύχει αυτό, το βακτήριο κινητοποιεί μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή, οι οποίοι μεταξύ αυτών περιλαμβάνουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, για τη δημιουργία βλεφαρίδας στον έναν από τους δύο πόλους του (Sanger et al. 1992, Southwick and Purich 1996). Η βλεφαρίδα αυτή εξυπηρετεί στην προώθηση του παθογόνου και στη μετατόπισή του δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Εξαιτίας της υφιστάμενης ώθησης από τον μικροοργανισμό, στο σημείο αυτό δημιουργείται μια προεκβολή της κυτταρικής μεμβράνης η οποία μπορεί να εισχωρήσει σε ένα γειτονικό κύτταρο. Ομοίως, όπως και στην περίπτωση του φαγοσώματος, ακολουθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης της προεκβολής που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα του νεοπροσβαλλόμενου κυττάρου.

Η ανθρώπινη μόλυνση από τον παθογόνο μικροοργανισμό συνηθέστερα προκύπτει μετά από κατανάλωση μιασμένου τρόφιμου. Αρχικά, ο παθογόνος *L. monocytogenes* επιβιώνει της γαστρικής διέλευσης από τον στόμαχο και αυξάνεται στο έντερο, ενώ στη συνέχεια κύτταρα του μικροοργανισμού διηθούν στον εντερικό βλεννογόνο, με τη βοήθεια της ενεργού ενδοκύττωσής τους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μολυσμένου οργανισμού (Cossart and Sansonetti 2004). Η αλκαλοποίηση του στομάχου από αντιόξινα, οι αναστολείς υδρογόνου, οι παρεμποδιστές λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων των επιθηλιακών κυττάρων ή ακόμη και οι χειρουργικές επεμβάσεις για θεραπεία του έλκους του στομάχου, είναι παράγοντες που μπορούν να προάγουν τη μόλυνση (Schlech et al. 1993). Το παθογόνο μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος προσβάλλοντας διάφορα όργανα (ήπαρ, σπλήνας, κ.ά.) και ιστούς γενικότερα, μεταξύ άλλων και το κεντρικό νευρικό σύστημα και τον πλακούντα των εγκύων γυναικών. Περαιτέρω διασπορά του μικροοργανισμού στον εγκέφαλο προκαλεί σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες επιφέρουν ακόμη και θάνατο.

1.6.3 Νοσολογία του ανθρώπου

Η τροφιμογενής λιστερίωση εμφανίζεται στον άνθρωπο υπό μορφή σποραδικών κρουσμάτων, εξάρσεων ή επιδημιών. Η περίοδος επώασης του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό, εξαρτάται από την ευπάθεια του προσβεβλημένου ατόμου και τον λαμβανόμενο πληθυσμό του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* μέσω του τροφίμου. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η περίοδος επώασης της λιστερίωσης να ποικίλλει σημαντικά, ενώ έχουν καταγραφεί περίοδοι από 24 ώρες έως και 91 ημέρες με τη μέση περίοδο επώασης να διαρκεί 31 ημέρες (Harris 2002, Ooi and Lorber 2005, Lorber 2007).

Τα συμπτώματα της λιστερίωσης μπορεί να είναι ήπια, όμοια με εκείνα μιας τοπικής λοίμωξης του δέρματος ή γρίπης. Εντούτοις, συνήθως η λιστερίωση παρουσιάζεται ως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με μικροβιαιμία (Wing and Gregory 2002, Allerberger 2007). Γενικά, τα συμπτώματα από προσβολή από *Listeria* spp. συνίσταται στην εμφάνιση μηνιγγίτιδων και διαταραχών του ΚΝΣ. Το τυπικότερο σύμπτωμα είναι η πολυμορφοπύρηνη λευκοκυττάρωση (polymorphonuclear leukokytosis) και αργότερα η μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση. Σε μέσης ηλικίας άτομα η λιστερίωση εκδηλώνεται σε ποσοστό 55% ως μηνιγγίτιδα, 25% ως βακτηριαιμία και 7% ως βακτηριαιμία και 7% ως άτυπες νοσηρές καταστάσεις, ενώ η θνητότητα της νόσου είναι μεγάλη και κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα (20-30%) (Mead et al. 1999). Το παθογόνο αίτιο μεταφερόμενο διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να προσβάλλει πληθώρα οργάνων, όπως οι μήνιγγες, το ήπαρ, ο σπλήνας, ο θυροειδής αδένας κ.ά. με συνέπεια την εμφάνιση φλεγμονών και νεκρωτικών τόπων. Στις ομάδες ειδικού κινδύνου στη νόσο, όπως τα νεογνά, οι έγκυοι, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι, το ποσοστό θνητότητας μπορεί να ξεπεράσει το 30% (Guerro et al. 2004, Allerberger 2007).

1.7 Πηγές μόλυνσης τυροκομικών προϊόντων

Η μικροβιακή επιμόλυνση των τυροκομικών προϊόντων μπορεί να προέρχεται από πολλές πηγές. Κατά την παραγωγή των τυροκομικών προϊόντων πηγές επιμόλυνσης δύναται να είναι η εναρκτήρια καλλιέργεια, η άλμη και τα υλικά συσκευασίας, τα τυρόπανα και τα μαχαίρια κοπής, ο χώρος ωρίμανσης ή/και ο αέρας του δωματίου παραγωγής (Temelli et al. 2006). Το δάπεδο, οι αποχετεύσεις, το στάσιμο νερό και πολλά είδη εξοπλισμού όπως τα ψυγεία αποθήκευσης και οι καταψύκτες έχουν, επίσης, αποδειχθεί ως πηγή επιμόλυνσης τυριών από παστεριωμένο γάλα με *Listeria monocytogenes* (Brito et al. 2008, Barancelli et al. 2014, Dalmasso and Jordan 2014). Ωστόσο, οι δύο κύριες πηγές μόλυνσης των τυριών με παθογόνα βακτήρια είναι το νωπό γάλα και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας του. Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει, σε φάρμες, τροφιμογενή παθογόνα στις δεξαμενές και τα σιλό συλλογής του νωπού γάλακτος, με αποτέλεσμα, να θεωρείται μια πιθανή πηγή επιμόλυνσης του τυριού (Donaghy et al. 2004, André et al. 2008). Το επιμολυσμένο γάλα μπορεί να είναι είτε μαστιτικό γάλα (Bourry and Poutrel 1996), είτε γάλα που έχει έρθει σε επαφή με κόπρανα ζώων (Van Kessel et al. 2004).

Η επιμόλυνση των τυριών από τροφιμογενή παθογόνα που επιβιώνουν εκτός του τροφίμου σε αβιοτικές επιφάνειες, όπως είναι ο εργοστασιακός εξοπλισμός και οι χώροι αποθήκευσης είναι καλά τεκμηριωμένη (Greenwood et al. 1991). Οι Pritchard, Flanders and Donelly (1995) εξέτασαν την παρουσία του *L. monocytogenes* στον εξοπλισμό έναντι του περιβάλλοντος, σε 21 εργοστάσια γαλακτοκομικών προϊόντων. Όσο αφορά τον εργοστασιακό εξοπλισμό, 6 από τα 21 δείγματα βρέθηκαν θετικά στον παθογόνο, ενώ όσο αφορά το περιβάλλον, βρέθηκαν θετικά, τα 19 από τα 21. Οι Kibuki et al. (2004), σε περίοδο 6 μηνών, ανέλυσαν 246 δείγματα και ανίχνευσαν *L. monocytogenes*, σε αποχετεύσεις και δάπεδα, 3 εργοστασίων επεξεργασίας φρέσκου τυριού. Οι Cox et al. (1989) βρήκαν 2.9% *L. monocytogenes* στον εξοπλισμό εργοστασίου επεξεργασίας τυριού, ενώ οι Kells and Gilmour (2004) ανίχνευσαν επιμόλυνση στον εξοπλισμό συσκευασίας σε 2 εργοστάσια. Οι Charlton et al. (1990) βρήκαν επιμολυσμένα δείγματα πάγκων εργασίας, παλετών και κιβωτίων μεταφοράς. Οι Barnier et al. (1988) ανίχνευσαν *L. monocytogenes* σε εξοπλισμό επεξεργασίας μαλακών τυριών. Η παρουσία του *L.*

monocytogenes ενισχύεται και από το γεγονός ότι έχει τη δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, ειδικά όταν προστατεύεται από στερεά υπολείμματα γάλακτος. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να εξαπλωθεί στο περιβάλλον επεξεργασίας και τέλος στο τελικό προϊόν μέσα από το σύστημα εξαερισμού, κατά το πλύσιμο των χώρων παραγωγής, μέσα από σωλήνες που στάζουν ή μέσω του προσωπικού του εργοστασίου (Reij and Den Aantrekker 2004, Kells and Gilmour 2004).

1.8 Νομοθεσία

Σύμφωνα με τα νέα κριτήρια ασφάλειας του Κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005 απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25 g τροφίμου σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Σε ΕΚΤ ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*, διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25 g τροφίμου πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε, ενώ για προϊόντα που διατίθενται στην αγορά οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 100 CFU/g κατά τη διάρκεια ζωής τους (n=5, c=0). Τέλος, σε ΕΚΤ μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* και διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 100 CFU/g (n=5, c=0) κατά τη διάρκεια ζωής τους.

Ως ΕΚΤ που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* θεωρούνται τα προϊόντα με pH ≤ 4.4 ή a_w ≤ 0.92, τα προϊόντα με pH ≤ 5.0 και a_w ≤ 0.94 και τα προϊόντα με διάρκεια ζωής μικρότερη από πέντε ημέρες. Στον ίδιο Κανονισμό διευκρινίζεται ότι και άλλα ΕΚΤ (που δεν πληρούν τα παραπάνω φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή χρόνο ζωής) μπορούν επίσης να ανήκουν σ’ αυτήν την κατηγορία, εφόσον αποδεικνύεται με επιστημονικές μελέτες. Συγκεκριμένα, οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων οφείλουν να αποδεικνύουν εάν τα ΕΚΤ που παράγουν πληρούν την παραπάνω προϋπόθεση.

Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η πλειονότητα των τυριών που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των τροφίμων που θεωρούνται ως μη ικανά να υποστηρίξουν ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* με κριτήριο τις τιμές pH ή a_w ή το συνδυασμό αυτών ή το χρόνο ζωής τους που υπερβαίνει τις πέντε ημέρες. Κατά συνέπεια, ως απόρροια της υποχρεωτικής εφαρμογής του ΕΚ 2073/2005 στα προϊόντα γάλακτος, υπάρχει ανάγκη διεξαγωγής ειδικής έρευνας με σκοπό να εκτιμηθεί αν και κατά πόσο ο παθογόνος *L. monocytogenes* στο έτοιμο τυρί ή κατά τη διάρκεια της παραγωγής, μπορεί να αναπτυχθεί και τελικά να επιβιώσει πάνω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 100 CFU/g, ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες συντήρησης του τυριού.

Η διεξαγωγή πειραμάτων πρόκλησης (challenge tests) αποτελεί έναν από τους τρόπους με τους οποίους παρέχονται πειραματικά δεδομένα αναφορικά με τη συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε ΕΚΤ. Εναλλακτικά, η χρήση μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* συναρτήσει φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του τροφίμου (pH, a_w, συγκέντρωση συντηρητικών, κ.α.) και της θερμοκρασίας συντήρησης, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Ωστόσο καμία από τις δύο προσεγγίσεις δεν είναι καθολικά επαρκής, δεν μπορεί να οδηγήσει δηλαδή σε απολύτως ασφαλή συμπεράσματα για όλες τις κατηγορίες των ΕΚΤ. Αυτό γιατί η διεξαγωγή πειραμάτων πρόκλησης σε μια παρτίδα ΕΚΤ και τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από τα πειράματα αυτά, ενδεχομένως να μην ισχύουν για όλες τις παρτίδες του ιδίου τροφίμου λόγω μικρής, ωστόσο σημαντικής διαφοράς σε φυσικοχημικές παραμέτρους (π.χ. στο pH) του τροφίμου από παρτίδα σε παρτίδα. Επίσης, με κάποιες εξαιρέσεις τα τελευταία χρόνια, τα περισσότερα διαθέσιμα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* έχουν κατασκευαστεί στηριζόμενα σε πειραματικά δεδομένα που έχουν ληφθεί σε μικροβιολογικά υποστρώματα και όχι σε πραγματικά τρόφιμα. Τέτοιου είδους μοντέλα, τείνουν συνήθως να υπερεκτιμούν τη δυνατότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα δεδομένου ότι δε λαμβάνουν υπόψη παραμέτρους, όπως η ενδογενής μικροβιακή χλωρίδα του τροφίμου ή η επίδραση φυσικών αντιμικροβιακών συστατικών των τροφίμων. Οι μη σταθερές ή μη αναμενόμενες θερμοκρασίες συντήρησης κατά τη μεταφορά και συντήρηση των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων σε επίπεδο λιανικής, αλλά και σε οικιακό επίπεδο δυσχεραίνουν περαιτέρω την ικανότητα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων. Εξάλλου, για όλους τους λόγους που προαναφέρθηκαν, η συμμόρφωση των ΕΚΤ με τα κριτήρια του Κανονισμού 2073 δεν μπορεί στην πράξη να αποτελεί διακριτή μεταβλητή. Θα ήταν ενδεχομένως προτιμότερο οι νομοθετικές απαιτήσεις για τα ΕΚΤ να αφορούσαν ποσοστό (βαθμό) συμμόρφωσης και όχι απλά συμμόρφωση ή μη των τροφίμων με τα κριτήρια του Κανονισμού (EFSA Journal 2013;11(6):3241).

1.9 Απόκριση του *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα περισσότερα περιστατικά λιστερίωσης οφείλονται στην κατανάλωση ΕΚΤ, όπως το βούτυρο, το γάλα, το τυρί, τα αλλαντικά, κ.ά. (CDC 1999, 2002, 2008, 2011, Maijala et al. 2001, Olsen et al. 2005, Fretz et al. 2012). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (δομή και σύσταση) του τροφίμου μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* και την μετέπειτα επιβίωσή του κατά την εισαγωγή του στον γαστρεντερικό σωλήνα (Wonderling and Bayles 2004, Stopforth et al. 2005, Barmpalia-Davis et al. 2009). Η γενική αρχή της προσαρμογής σε μια καταπόνηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο όταν ένα βακτήριο εκτεθεί σε ενός είδους υποθανάτια καταπόνηση δύναται να αποκτήσει ανθεκτικότητα έναντι εντονότερης καταπόνησης ίδιας φύσεως (Hill et al. 2002). Η προσαρμοστική απόκριση, ως αποτέλεσμα της σύντομης έκθεσης σε ήπιες όξινες συνθήκες, ενεργοποιεί μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας έναντι όξινης καταπόνησης, με αποτέλεσμα αλλαγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η επαγωγή οξεοανθεκτικότητας θεωρείται πολύ σημαντική για την επιβίωση του *L. monocytogenes* σε όξινα τρόφιμα (Gahan et al. 1996, Hill et al. 2002) αλλά και κατά τη μετέπειτα διέλευση του παθογόνου από τον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα ή κατά τη «φάση» των μακροφάγων (Gahan et al. 1996). Η οξεοανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που εξηγούν την παρουσία του στα τρόφιμα χαμηλού pH, όπως είναι το τυρί. Η κατηγορία αυτών των τροφίμων έχει συνήθως pH 5.0-5.5, εύρος τιμής που μπορεί να επάγει ανθεκτικότητα σε ένα μετέπειτα χαμηλότερο pH (Faleiro et al. 2003). Η ικανότητα προσαρμοστικότητας του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες είναι μεγάλης σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις τροφίμων μπορεί να αυξήσει την ικανότητα επιβίωσης του βακτηρίου (Cataldo et al. 2007, Stopforth et al. 2007, Ryan et al. 2008).

Επιπλέον, η έκθεση σε παράγοντες ήπιας καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένου αυτών που αποτελούν μέσα συντήρησης των τροφίμων όπως η θέρμανση, η προσθήκη άλατος κ.ά., μπορεί να επάγουν ανθεκτικότητα έναντι των ίδιων ή/και διαφορετικών ειδών καταπονήσεων (Casey and Gordon 2002, Ryan et al. 2008). Πειράματα έχουν δείξει μια ποικιλομορφία στην απόκριση ενός βακτηρίου έναντι καταπονήσεων, όπως για παράδειγμα επαγωγή της οξεοανθεκτικότητας μπορεί να οδηγήσει και σε ανοχή έναντι θερμοκρασιακού στρες, ενώ αντίθετα θερμική καταπόνηση δεν οδηγεί σε επαγωγή οξεοανθεκτικότητας (Hill et al. 2002). Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν δείξει ότι η προσαρμογή σε ήπιες όξινες συνθήκες προσδίδει ανθεκτικότητα στην θέρμανση, στην παρουσία άλατος και αιθανόλης (Ryan et al. 2008), στις βακτηριοσίνες (ένα φαινόμενο που πιθανόν να συνδέεται με την σύνθεση λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης) (Bonnet and Montville 2005, Ryan et al. 2008), στα χολικά άλατα (Begley et al. 2002, Ryan et al. 2008) και σε συνθήκες χαμηλού pH (Ferreira et al. 2003).

Το χαμηλό pH των γαστρικών εκκρίσεων θεωρείται η “πρώτη γραμμή” άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού ενάντια στα τροφιμογενή παθογόνα. Η επιβίωση στον γαστρεντερικό σωλήνα συνδέεται αρχικά με την αντίσταση των παθογόνων στο χαμηλό pH του στομάχου (1.0 με 2.0) (Skandamis et al. 2012). Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόστασή του (pH) με αποτέλεσμα την προσαρμογή και την επιβίωσή του σε όξινο περιβάλλον. Η προσαρμοστικότητα και η αντίστοιχη επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων βασίζεται στην ικανότητα του μικροοργανισμού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ήπιου στρες να παράγει τις αντίστοιχες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας καθιστώντας τον ανθεκτικό σε μετέπειτα ακραία καταπόνηση (Kroll and Patchett 1992, O’Driscoll et al. 1997). Με την πτώση του pH ενεργοποιείται η παραγωγή αιμολυσίνης, προκειμένου να διαφύγει από το μακροφάγο φαγόσωμα. Τέλος, διαθέτει και άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι όξινης καταπόνησης όπως είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, η απαμινάση της αργινίνης και το σύστημα της F_0F_1 ATPασης (Melo et al. 2015). Εξαιτίας, της ανθεκτικότητας που παρουσιάζει το *L. monocytogenes* στο χαμηλό pH, γίνονται μελέτες για τη συμπεριφορά του παθογόνου, σε έκθεσή του σε συνθετικό γαστρικό υγρό, κατά τη διαδικασία της πέψης (Roering et al. 1999, Wonderling and Bayles 2004, Gahan and Hill 2005, Stopforth et al. 2005, Garner et al. 2006, Peterson et al. 2007, Formato et al. 2007, Barmpalia et al. 2008, Samara and Koutsoumanis 2009, Koseki et al. 2010, Ramalheira et al., 2010 Jiang et al. 2010 Dikici and Calicioglou 2013). Σε κάποιες από τις προαναφερθείσες μελέτες η έκθεση του παθογόνου σε συνθετικό γαστρικό υγρό έγινε για διαφορετικά τρόφιμα όπως λουκάνικα Φρανκφούρτης (Wonderling and Bayles 2004, Stopforth et al. 2005), αλλαντικά γαλοπούλας (Peterson et al. 2007), μαρούλι (Samara and Koutsoumanis 2009), αλλαντικά Bologna (Formato et al. 2007) και σε μια μόνο εργασία χρησιμοποιήθηκε τυρί (Dikici and Calicioglou 2013).

1.10 Υπόθεση της παρούσας μελέτης

Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση του αριθμού των τροφιμογενών νοσημάτων. Ειδικότερα, ποσοστό 10-15% του πληθυσμού των ανεπτυγμένων χωρών αντιμετωπίζει τουλάχιστον μια φορά το χρόνο κάποια διαταραχή στην υγεία του που αποδίδεται σε κατανάλωση τροφίμου μη ικανοποιητικής μικροβιολογικής ασφάλειας (Käferstein 2003). Το κόστος των συνεπειών των τροφιμογενών ασθενειών είναι σημαντικό και αφορά τόσο τον άνθρωπο σε ατομικό επίπεδο όσο και την κοινωνία γενικότερα (ιατρικές δαπάνες, απώλεια παραγωγικότητας, θάνατοι κ.ά.), αλλά και τη βιομηχανία τροφίμων (ανακλήσεις προϊόντων, επιπλέον εργαστηριακοί έλεγχοι, απώλεια της αγοράς, νομικές δαπάνες για διοικητικές κυρώσεις-πρόστιμα, αμοιβές δικηγόρων, αποζημιώσεις καταναλωτών κ.ά.) (Buzby and Roberts 2009). Μολονότι η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης είναι σχετικά μικρή, δεδομένου της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και του ποσοστού θνησιμότητάς της υπάρχει ανάγκη μελέτης του παθογόνου παράγοντα *Listeria monocytogenes* για την αποτροπή ή τον περιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης της προκύπτουσας ασθένειας στον άνθρωπο.

Το τυρί ανήκει στα ΕΚΤ, το οποίο καταναλώνεται είτε φρέσκο, είτε αφού έχει υποστεί ωρίμανση, συντηρείται στο ψυγείο ενώ δεν απαιτεί κάποια προηγούμενη θερμική επεξεργασία. Ως προϊόν παρασκευάζεται από μεγάλες βιομηχανίες έως μικρά παραδοσιακά τυροκομία, γεγονός που οδηγεί σε μεγάλη παραλλακτικότητα της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ) μεταξύ και ίδιων ειδών τυριών, που παρασκευάζονται από διαφορετικά τυροκομεία, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Διαφορές στην ΟΜΧ έχουν παρατηρηθεί επίσης και μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του ίδιου τυροκομείου. Επιπλέον, τα διαφορετικά είδη τυριών, λόγω των διαφορετικών συστατικών, αλλά και του διαφορετικού τρόπου παρασκευής και κατά περίπτωση ωρίμανσής τους, έχουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH, a_w κ.ά.) και διαφορετικά επίπεδα ΟΜΧ, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά του *L. monocytogenes* στο τρόφιμο κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής του, καθώς επίσης και την ανθεκτικότητα του στο χαμηλό pH του στομάχου κατά την κατανάλωση του από τον άνθρωπο.

Συμπερασματικά, θα πρέπει να μελετηθεί ο τρόπος συμπεριφοράς του παθογόνου στο μικροπεριβάλλον του τυριού, καθώς και τα χαρακτηριστικά της τεχνολογίας παραγωγής του που βοηθούν το εν λόγω παθογόνο βακτήριο να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε αυτό, καθώς και να επιβιώσει των διάφορων καταπονήσεων (π.χ. χαμηλό pH) που συναντά έως ότου φθάσει στο εντερικό επιθήλιο του ανθρώπου. Όλα τα παραπάνω, θα συμβάλουν στην κατανόηση της συμπεριφορά του παθογόνου *L. monocytogenes* στο τυρί και να ληφθούν πιο αποτελεσματικά μέτρα για την προστασία της υγείας του καταναλωτή.

2 Στόχοι της παρούσας μελέτης

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

Α) Η σύγκριση έντεκα τυριών (ημίσκληρα, μαλακά και τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή) ως προς τη δυνατότητα να υποστηρίξουν ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*, αγορασμένα κοντά στην ημερομηνία παραγωγής τους για εξασφάλιση χαμηλού αρχικού πληθυσμού ενδογενούς μικροχλωρίδας.

Β) Η αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* (αγοράζοντας παρτίδες σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής) σε διάφορα τυριά.

Γ) Η εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης, με έκθεση διαφορετικών κατηγοριών τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό, στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου *L. monocytogenes*.

3 Υλικά και μέθοδοι

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

3.1.1 Σύγκριση τυριών ως προς τη δυνατότητα να υποστηρίξουν ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*

<u>Σχήμα 1:</u> Πειραματικός σχεδιασμός σύγκρισης τυριών ως προς τη δυνατότητα να υποστηρίξουν ανάπτυξη του *L. monocytogenes.*

Αγορά, 2 ανεξάρτητων παρτίδων, έντεκα ημίσκληρων (edam, gouda και χαλούμι), μαλακών (mozzarella, camembert, ricotta, μαστέλο®, ανθότυρο και μανούρι) και τυριών χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή (mascarpone και cottage), κοντά στην ημερομηνία παραγωγής, για επίτευξη χαμηλού αρχικού επιπέδου ενδογενούς μικροχλωρίδας (ΟΜΧ).

↓

Εμβολιασμός

L. monocytogenes (4b και 1/2a)

2.0 log CFU/cm^2 (ημίσκληρα και μαλακά τυριά)

2.0 log CFU/ g (ricotta και αλοιφώδη τυριά)

↓

Συσκευασία και συντήρηση

Υπό κενό (ημίσκληρα και μαλακά)

ή

Υπό αερόβιες συνθήκες (ricotta και αλοιφώδη τυριά)

σύμφωνα με την εμπορική τους συσκευασία

Συντήρηση στους 7^{o}C

3.1.2 Αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*

<u>Σχήμα 2:</u> Πειραματικός σχεδιασμός αξιολόγησης της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας των τυριών στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes.*

Αγορά, 3 έως 5 ανεξάρτητων παρτίδων, χαλουμιού, mozzarella, camembert και , ricotta, μαστέλο®, ανθότυρο και μανούρι) και αλοιφώδη (mascarpone σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής των προϊόντων για επίτευξη διαφορετικών επιπέδων αρχικού πληθυσμού ενδογενούς

↓

<u>Εμβολιασμός</u>

L. monocytogenes (4b και 1/2a)

2.0 log CFU/cm^2 (ημίσκληρα και μαλακά)

2.0 log CFU/ g (ricotta και αλοιφώδη τυριά)

↓

<u>Συσκευασία και συντήρηση</u>

Υπό κενό (ημίσκληρα και μαλακά)

ή

Υπό αερόβιες συνθήκες (ricotta και αλοιφώδη τυριά)

σύμφωνα με την εμπορική τους συσκευασία

<u>Συντήρηση στους 7^oC</u>

3.1.3 Εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης στη μείωση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes,* με έκθεση τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό

<u>Σχήμα 3:</u> Πειραματικός σχεδιασμός εκτίμησης της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης στη μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes*, με έκθεση τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό

<u>Ημίσκληρα τυριά:</u> gouda (επιβίωση) και χαλούμι (ανάπτυξη)

<u>Μαλακά τυριά:</u> μαστέλο® (επιβίωση) και camembert (ανάπτυξη)

<u>Αλοιφώδη τυριά:</u> cottage (επιβίωση) και mascarpone (ανάπτυξη)

↓

<u>Έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό στην αρχή, τη μέση και το τέλος της συντήρησης</u>

pH 1.50 (HCl) στους 37 ^{o}C για 5, 10, 15, 20, 40 και 60 λεπτά

↓

9 δείγματα ανά δειγματοληψία

3 δείγματα

καταμέτρηση του *L. monocytogenes* με τη μέθοδο thin layer agar (Kang and Fung, 1999)

3 δείγματα

εμπλουτισμός για ανίχνευση του *L. monocytogenes*

1. 25mL ομογενοποιημένου δείγματος σε Half Fraser

(30^{o}C, 24 ώρες)

2. 100μl σε Full Fraser

(37^{o}C, 48 ώρες)

3. Streaking σε ALOA

(37^{o}C, 48 ώρες)

3 δείγματα

μέτρηση pH

3.2 Προετοιμασία εμβολίου

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, δυο από τα οποία ανήκαν στον ορότυπο 4b και δυο ανήκαν στον ορότυπο 1/2a, τα οποία προήλθαν από τη συλλογή που διατηρεί το Εργαστήριο Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη διατηρούνταν χωριστά, σε τρυβλία μη επιλεκτικού υποστρώματος TSAYE (Trypton Soy Agar με 6% Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK), τα οποία ανανεώνονταν κάθε μήνα. Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου μια αποικία από κάθε στέλεχος μεταφερόταν ξεχωριστά σε 10 mL υγρού μη επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος Tryptic Soy Broth με την προσθήκη 6% Yeast Extract (TSBYE, LAB M, Lancashire, UK) και επωάζονταν στους 30^{o}C για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών, ποσότητα 100 μl από κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε τέσσερις καινούργιους σωλήνες TSBYE και επωάζονταν εκ νέου σε θερμοκρασία 30^{o}C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ο καθαρισμός του εμβολίου, για εμβολιασμό των τυριών. Για τον καθαρισμό του εμβολίου το περιεχόμενο κάθε σωλήνα φυγοκεντρούνταν (Megafuge 1.0 R,Heraeus Instruments) στις 3600 στροφές/min για 10 min στους 4 ^{o}C. Το υπερκείμενο κάθε σωλήνα απορριπτόταν και ακολουθούσε επαναιώριση σε 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (Ringer solution tablets, LAB M, Lancashire, UK). Ακολουθούσαν άλλες δυο φυγοκεντρήσεις και μετά την τελευταία επαναιώρηση, τα τέσσερα στελέχη αναμιγνύονταν σε ίσες ποσότητες.

3.3 Προετοιμασία δειγμάτων τυριών και εμβολιασμός

Εμπορικές συσκευασίες, δυο ανεξάρτητων παρτίδων, έντεκα διαφορετικών ειδών τυριών από τις κατηγορίες των ημίσκληρων (edam, gouda και χαλούμι), μαλακών (mozzarella, camembert, ricotta, μαστέλο®, ανθότυρο και μανούρι) και τυριών χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή (mascarpone και cottage), προμηθεύτηκαν από τοπικές υπεραγορές, κοντά στην ημερομηνία παρασκευής τους. Επιπλέον, αγοράστηκαν τρεις έως πέντε ανεξάρτητες παρτίδες χαλουμιού, mozzarella, camembert και mascarpone σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής των προϊόντων για επίτευξη διαφορετικών επιπέδων αρχικού πληθυσμού ενδογενούς μικροχλωρίδας (ΟΜΧ). Τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, όπως αυτά αναγράφονται στην εμπορική τους συσκευασία (Πίνακας 3).

<u>Πίνακας 3:</u> Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών της παρούσας μελέτης, όπως αναγράφονται στην εμπορική τους συσκευασία

ΤΥΡΙΑ						
Είδος	**Ονομασία**	**Ελάχιστη λιπ/τητα επί ξηρού**	**Λιπ/τητα ως έχει**	**Μέγιστη υγρασία**	**NaCl (%)**	**Χαρακτηριστικά**
Ημίσκληρα τυριά	Edam	48%	28%	45%	2	Τυριά που ωριμάζουν με βακτήρια σε όλη τους τη μάζα
	Gouda	40%	25%	46 %	2	
	Χαλούμι	43%	25%	46%	3	Τυρί άλμης που δεν ωριμάζει
Μαλακά τυριά	Ανθότυρο	33%	10%	70%	1	Τυριά τυρογάλακτος που δεν ωριμάζουν
	Μανούρι	70%	47 %	60%	0.4	
	Μαστέλο®	46%	29%	54%	2	Λευκό αγελαδινό τυρί που δεν ωριμάζει
	Mozzarella	44%	18%	59%	0.2	Φρέσκο τυρί από γάλα τύπου pasta filata, που δεν ωριμάζει
	Camembert	50%	23%	50%	2	Τυρί που ωριμάζει με μύκητες επιφανειακά
	Ricotta	40%	12%	72%	0.1	Φρέσκο τυρί με αλοιφώδη υφή που δεν ωριμάζει

Τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή	Cottage	21%	4%	81%	1	Αναθερμασμένο λευκό κοκκώδες τυρόπηγμα που δεν ωριμάζει
	Mascarpone	84%	42%	-	0.1	Φρέσκο τυρί με αλοιφώδη υφή που δεν ωριμάζει

Τα τυριά edam και gouda αγοράστηκαν σε φέτες. Κατά τον εμβολιασμό, οι φέτες κόπηκαν σε ισομεγέθη κομμάτια (5 x 5 cm), υπό ασηπτικές συνθήκες. Όσον αφορά τα τυριά mozzarella, camembert, χαλούμι, ανθότυρο, μανούρι και μαστέλο®, αγοράστηκαν σε ολόκληρες συσκευασίες την ημέρα του εμβολιασμού και η κοπή τους σε φέτες, έγινε στο εργαστήριο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Με το άνοιγμα της συσκευασίας, τα τυριά τοποθετήθηκαν σε επιφάνεια κοπής και αφού κόπηκαν, σε φέτες ίδιων διαστάσεων [mozzarella (6 x 4 cm), camembert (6 x 2 cm), χαλούμι (6 x 4 cm), ανθότυρο (6 x 4 cm), μανούρι (3 x 5 cm), μαστέλο® (3 x 5 cm)], εμβολιάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, το τυρί ricotta και τα τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή, cottage και mascarpone, αγοράστηκαν και αυτά σε ολόκληρες συσκευασίες την ημέρα του εμβολιασμού και από κάθε τυρί ζυγίστηκαν 15 (cottage και mascarpone) με 20g (ricotta) σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες. Μετά από κατάλληλο αριθμό δεκαδικών αραιώσεων στο αρχικό εμβόλιο (10^9 CFU/mL), μεταφέρθηκε τέτοια ποσότητα εμβολίου σε καθεμία φέτα τυριού, ώστε ο τελικός αριθμός κυττάρων εμβολίου ήταν τα 10^2 CFU/cm^2 ή CFU/g. Στα τυριά που κόπηκαν σε φέτες, ακολούθησε εξάπλωση του εμβολίου σε όλη την επιφάνεια της φέτας (τεχνική spread) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο θερμοκρασίας 4^oC για 15 min προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση του εμβολίου. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και στις δύο πλευρές των φετών του τυριού. Τα τυριά edam και gouda συσκευάστηκαν ανά τρείς φέτες, ενώ τα τυριά mozzarella, camembert, χαλούμι, ανθότυρο, μανούρι και μαστέλο ανά μια φέτα, σε πλαστικές σακούλες υπό κενό. Όσον αφορά τα τυριά ricotta, cottage και mascarpone συσκευάστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες. Όλα τα τυριά συντηρήθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 7^oC (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) υψηλής ακρίβειας (0.5 ^oC). Η θερμοκρασία αυτή επιλέχθηκε με στόχο την προσομοίωση των απωλειών ψύξης κατά τη μεταφορά των προϊόντων στα σημεία πώλησης, καθώς και των απωλειών ψύξης των εμπορικών και οικιακών ψυγείων.

3.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Κατά τις δειγματοληψίες, 2 τεμάχια τυριών που εμβολιάστηκαν επιφανειακά (edam, gouda, mozzarella, camembert, χαλούμι, ανθότυρο, μανούρι, μαστέλο®), μεταφέρονταν σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher με φίλτρο και αραιώνονταν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer σε αναλογία 1:3 (1 μέρος τρόφιμο και 2 μέρη Ringer). Ακολουθούσε ομογενοποίηση του περιεχομένου της σακούλας σε συσκευή Stomacher (Interscience, France) για 1 λεπτό. Στην συνέχεια ακολουθούσαν δεκαδικές αραιώσεις του περιεχομένου της σακούλας, το οποίο είτε ενσωματωνόταν (1 mL) (pour technique) είτε επιστρωνόταν επιφανειακά (100 μL) (spread technique), σε επιλεκτικά ή μη υποστρώματα. Η καταμέτρηση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πραγματοποιούνταν σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα ALOA (CHROMOGENIC LISTERIA AGAR BASE – Oxoid), με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης και μετά από επώαση των τρυβλίων σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 2 ημέρες. Οι αποικίες του *L. monocytogenes* που καταμετρούνταν εμφανίζονταν γαλαζοπράσινες με χαρακτηριστική άλο. Η καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ) πραγματοποιούνταν σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSAYE (Trypton Soy Agar with Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK), με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 3 ημέρες και καταμετρούνταν όλες οι αποικίες οι οποίες έβγαιναν στο τρυβλίο. Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καταμετρούνταν με επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar (LAB M, Lancashire, UK) με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 4 ημέρες και καταμετρούνταν οι φακοειδείς υποκίτρινες αποικίες που έβγαιναν στο τρυβλίο. Οι ζύμες και μύκητες καταμετρούνταν με επιλεκτικό υπόστρωμα RBC (Rose Bengal Chroramphenicol Agar, LAB M, Lancashire, UK) με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 25°C για 5 ημέρες και καταμετρούνταν όλες οι αποικίες οι οποίες έβγαιναν στο τρυβλίο. Τέλος τα εντεροβακτήρια καταμετρούνταν με επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα VRBG Agar (Violet Red Bile Glucose Agar, LAB M, Lancashire, UK) με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 24 ώρες και καταμετρούνταν οι μωβ φωσφορίζουσες αποικίες που έβγαιναν στο τρυβλίο. Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH των δειγμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν μέτρηση της ενεργότητας νερού (a_w) στην αρχή, τη μέση και το τέλος της συντήρησης των τυριών.

3.5 Εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης στη μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes*

Για την εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* επιλέχθηκαν δυο τυριά ανά κατηγορία τυριών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ένα τυρί που υποστήριξε επιβίωση και ένα που υποστήριξε ανάπτυξη του παθογόνου. Για τα τυριά που υποστήριξαν ανάπτυξή του, η έκθεσή τους στο συνθετικό γαστρικό υγρό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν σημεία, όπου τα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονταν στην φάση προσαρμογής, στην εκθετική και στην στατική φάση. Από την άλλη, για τα τυριά που υποστήριξαν επιβίωση του *L. monocytogenes* η έκθεσή τους στο συνθετικό γαστρικό υγρό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον χρόνο ζωής του προϊόντος (αρχή μέση και τέλος του χρόνου ζωής), δηλαδή σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης της ΟΜΧ.

3.5.1 Παρασκευή γαστρικού υγρού

Το συνθετικό γαστρικό υγρό αποτελούνταν από 0.4 g/l glucose, 3.0 g/l yeast extract, 1.0 g/l Bacto peptone, 4.0 g/l porcine mucin, 0.5 g/l cysteine, 0.08 g/l NaCl, 0.4 g/l $NaHCO_3$, 0.04 g/l K_2HPO_4, 0.04 g/l KH_2PO_4, 0.008 g/l $CaCL_2$-$2H_2O$, 0.008 g/l $MgSO_4$-$7H_2O$, 1.0 g/l xylan, 3.0 g/l soluble starch, 2.0 g/l pectin και 1 ml/l διαλύματος tween 80. Το συνθετικό γαστρικό υγρό αποστειρώνονταν και στη συνέχεια προσθέτονταν 3.0g/l pepsin from porcine stomach mucosa και γινόταν ρύθμιση του pH σε pH 1.50 με πρότυπο διάλυμα HCl 10N υπό ανάδευση (Ioanna M. Barmpalia-Davis et al. 2009).

3.5.2 Έκθεση των τυριών στο συνθετικό γαστρικό υγρό

Στις δειγματοληψίες, στις οποίες γινόταν έκθεση των εμβολιασμένων τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό, το γαστρικό υγρό βρισκόταν σε σταθερή θερμοκρασία 37^{o}C, μέσα σε υδατόλουτρο καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Σε κάθε μια από τις ημέρες δειγματοληψίας, παρασκευάζονταν 9 δείγματα τυριού με τοποθέτηση κομματιού τυριού σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher με φίλτρο και προσθήκη γαστρικού υγρού σε αναλογία 1:10. Ακολουθούσε ομογενοποίηση του περιεχομένου κάθε σακούλας σε συσκευή Stomacher (Interscience, France) για 1 λεπτό και οι σακούλες τοποθετούνταν ξανά πίσω στο υδατόλουτρο. Κάθε 5, 10, 15, 20, 40 και 60 λεπτά σε 3 από τα 9 δείγματα, 25 ml ομογενοποιημένου τροφίμου εμπλουτίζονταν σε 225 ml Half Fraser Broth, σε 3 από τα 9 δείγματα γινόταν μέτρηση της μεταβολής του pH του γαστρικού υγρού με ηλεκτρονικό pHμετρο (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland) και τέλος από τα 3 τελευταία δείγματα πραγματοποιούνταν καταμέτρηση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε τρυβλία με μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE (Trypton Soy Agar with Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK), τα οποία τοποθετούνταν σε κλίβανο 37°C για 2 ώρες και στην συνέχεια στρώνονταν σε αυτά δεύτερη στρώση, των 8 ml, επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος ALOA (CHROMOGENIC LISTERIA AGAR BASE, Oxoid) με τη μέθοδο thin layer agar. Αυτό γινόταν για καλύτερη ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων (Kang and Fung 1999). Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 2 ημέρες και οι αποικίες του παθογόνου που καταμετρούνταν εμφανίζονταν γαλαζοπράσινες με χαρακτηριστική άλο. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν καταμέτρηση της σε μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE (Trypton Soy Agar with Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK). Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 3 ημέρες και καταμετρούνταν όλες οι αποικίες οι οποίες έβγαιναν στο τρυβλίο.

3.6 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA – Principal Components Analysis)

Η ανάλυση PCA είναι μια στατιστική διαδικασία που έχει ως στόχο τον εντοπισμό συσχετίσεων μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών και πειραματικών παρατηρήσεων που βαθμολογούνται ως προς τις εν λόγω μεταβλητές.. Η ανάλυση είναι μη κατευθυνόμενη (unsupervised) καθώς δεν υποδεικνύεται στον αλγόριθμο η ύπαρξη η μή συσχέτισης μεταξύ μεταβλητών, αλλά απεναντίας αναζητείται η εύρεση των όποιων συσχετίσεων. Η ανάλυση στηρίζεται στην περιγραφή της διασποράς των τιμών συγκεκριμένων μεταβλητών (communalities) από μη συσχετισμένες μεταβλητές που τις ονομάζει κύριες συνιστώσες (principal components). Οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται σε μία τέτοια ανάλυση είναι οι εξής:

1. Μία συνιστώσα χαρακτηρίζεται ως κυρίαρχη όταν έχει egien value ≥ 1
2. Όλες οι συνιστώσες πρέπει να εξηγούν τουλάχιστον το 60% της διασποράς των μεταβλητών που συμμετέχουν στην ανάλυση.
3. Η διασπορά κάθε συμμετέχουσας στην ανάλυση μεταβλητή πρέπει να εξηγείται τουλάχιστον κατά 50% από μία συνιστώσα.
4. Καμία μεταβλητή δεν πρέπει να εξηγείται κατά ποσοστό >40% από περισσότερες των μία συνιστωσών.

Ο αριθμός των κύριων συνιστωσών είναι μικρότερος ή το πολύ ίσος με τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών. Κατά τον μετασχηματισμό η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) εμφανίζει την μέγιστη διακύμανση (δηλαδή αντιστοιχεί στη μέγιστη ποικιλία δεδομένων) και η κάθε επόμενη εμφανίζει συνεχώς χαμηλότερη διακύμανση και ταυτόχρονα να μην εμφανίζει συσχέτιση με τις προηγούμενές της. Στην παρούσα μελέτη, στην PCA ανάλυση ως μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν η μεταβολή του pH, οριζόμενη ως η διαφορά μεταξύ της τιμής pH μετά από έκθεση διάρκειας 60 λεπτών του δείγματος σε συνθετικό γαστρικό υγρό, με την τιμή pH του δείγματος αμέσως μετά την έκθεση του σε γαστρικό υγρό, η διάρκεια συντήρησης των τυριών, η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μετά από έκθεση σε γαστρικό υγρό του δείγματος τυριού για 60 λεπτά και το ποσοστό θετικών κατόπιν εμπλουτισμού (ομογενοποιημένων σε γαστρικό υγρό) δειγμάτων μετά από παραμονή σε γαστρικό υγρό για 60 λεπτά. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν όλα τα τυριά που συμμετείχαν στις δοκιμές έκθεσης σε γαστρικό υγρό. Η ανάλυση κυρίαρχων συνιστωσών έγινε με το πακέτο XLSTAT 2013, σε περιβάλλον XL. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πληρούσαν τις ανωτέρω προϋποθέσεις, όπως παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

4 Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1 Επιβίωση/ανάπτυξη *Listeria monocytogenes* σε διαφορετικές κατηγορίες τυριών

Το αντικείμενο του πρώτου στόχου στην παρούσα μελέτη ήταν η σύγκριση έντεκα ειδών τυριών, που επιλέχθηκαν από 3 κατηγορίες (ημίσκληρα, μαλακά και φρέσκα) ως προς την δυνατότητά τους να υποστηρίξουν επιβίωση ή ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* κατά τη συντήρησή τους στους 7^{o}C. Όλα τα τυριά προμηθεύτηκαν κοντά στην ημερομηνία παραγωγής τους για εξασφάλιση χαμηλού αρχικού πληθυσμού ενδογενούς μικροχλωρίδας. Η επιλογή της θερμοκρασίας έγινε με στόχο την προσομοίωση των απωλειών ψύξης κατά τη μεταφορά των προϊόντων στα σημεία πώλησης, καθώς και των απωλειών ψύξης των εμπορικών και ακολούθως οικιακών ψυγείων.

4.1.1 Ημίσκληρα τυριά

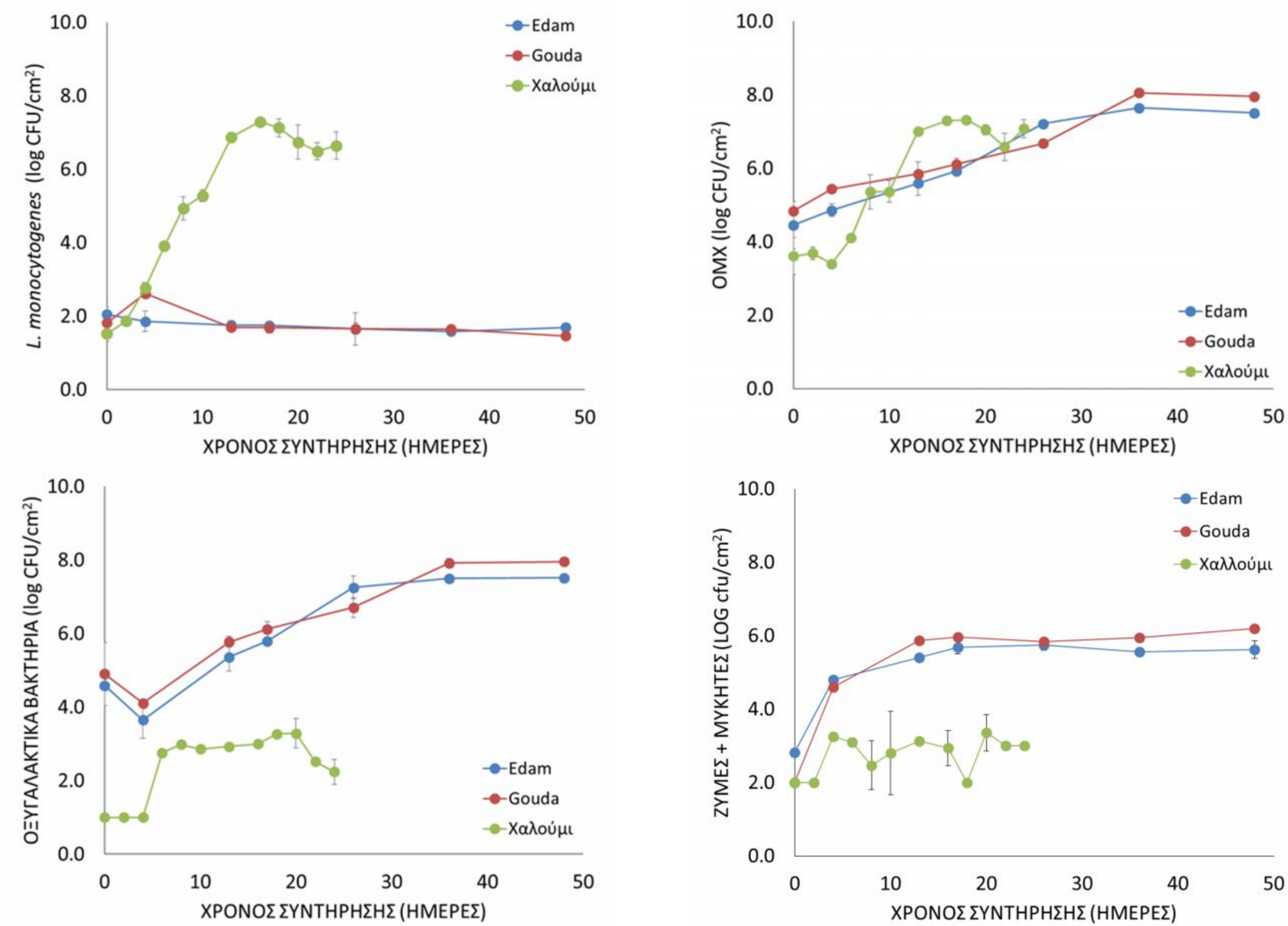
Από την κατηγορία των ημίσκληρων τυριών επιλέχθηκαν τα τυριά edam, gouda και χαλούμι. Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα τυριά edam και gouda φαίνεται να υποστηρίζουν επιβίωση του *L. monocytogenes*, μιας και ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός ($p \leq 0.05$) στα επίπεδα του αρχικού εμβολίου (100 CFU/cm^2), καθ΄ όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, στα τυριά edam και gouda τα επίπεδα του πληθυσμού του παθογόνου που εμβολιάστηκε ήταν στα 1.8 ± 0.0 log CFU/cm^2 και 2.0 ± 0.2 log CFU/cm^2, αντίστοιχα και μέχρι το τέλος της συντήρησης παρέμειναν στο ίδιο επίπεδο (1.5 ± 0.1 log CFU/cm^2 και 1.7 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα). Αντίθετα με τα προαναφερθέντα τυριά, το τυρί χαλούμι υποστήριξε την ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε από τις πρώτες μέρες συντήρησης του τυριού έως και την 16^{η} μέρα συντήρησης, φτάνοντας τα 7.3 ± 0.0 log CFU/cm^2. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που εξετάζουν τη συμπεριφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* κατά τη διαδικασία της παρασκευής και ωρίμανσής ημίσκληρων τυριών (Luukkonen et al. 2005, Schvartzman et al. 2011, Wemmenhove et al. 2013, Dalmasso and Jordan 2014, Wemmenhove et al. 2014,) με μία μόνο από αυτές να εξετάζει τη συμπεριφορά του παθογόνου και στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Chatelard-Chauvin et al. 2015). Στην εν λόγω μελέτη, οι Chatelard-Chauvin et al. (2015), εμβολίασαν με *Listeria monocytogenes* (6 CFU/mL), κατά την Παρασκευή τους τυριά τύπου cantal, τα οποία συντήρησαν στους 6 ^{o}C σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες (τυλιγμένα σε ζελατίνη, υπό κενό και τυλιγμένα σε χαρτί), μετά από ωρίμανση έως και 6 μηνών. Και στα τρία είδη συσκευασίας ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επιπλέον, οι Shrestha et al. (2011) παρακολούθησαν την επιβίωση του *L. monocytogenes* (10^{3}-10^{4} κύτταρα/g) σε τυριά cheddar χαμηλής αλατότητας (0.7% w/w) σε σύγκριση με τυριά cheddar κανονικής αλατότητας (1.8% w/w) σε δυο επίπεδα pH (5.2 και 5.7), τα οποία συντηρήθηκαν στους 4, 10 και 21^{o}C μετά από 10 εβδομάδες περίοδο ωρίμανσης. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μέχρι το τέλος της συντήρησης, συμπεραίνοντας ότι τα τυριά cheddar με χαμηλή αλατότητα είναι εξίσου ασφαλή με τα τυριά cheddar κανονικής αλατότητας, ανεξάρτητα από το επίπεδο του pH. Επιπλέον τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης έδειξαν ότι η ενεργότητα νερού και το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τη δράση της εναρκτήριας καλλιέργειας είναι τα ισχυρότερα εμπόδια για την ανάπτυξη του παθογόνου στα τυριά cheddar. Επίσης, οι Valero et al. (2014) εξέτασαν την επιβίωση του *L. monocytogenes* (αρχικός πληθυσμός 10^{4} CFU/g) σε τυρί από νωπό κατσικίσιο γάλα υπό κενό κατά την συντήρηση στους 4, 12 και 22 ^{o}C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μείωση και τελικά η θανάτωση του παθογόνου πιθανόν οφείλεται στη μείωση της υγρασίας και την αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, εύρημα που συμφωνεί και με τους Sip et al. (2012).

Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται, επίσης, η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Στα τυριά edam και gouda, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεκινάει την 0η ημέρα από αρκετά υψηλά επίπεδα 4.6 ± 0.2 και 4.9 ± 0.9 log CFU/cm^{2}, αντίστοιχα, και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης έως και την 48^{η} ημέρα, φτάνοντας πληθυσμούς 7.5 ± 0.1 και 8.0 ± 0.1 log CFU/cm^{2}, αντίστοιχα. Όσον αφορά στο χαλούμι, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεκινάει από αρκετά χαμηλά επίπεδα (1.0 ± 0.0 log CFU/cm^{2}) και φτάνει σε πληθυσμούς 2.2 ± 0.3 log CFU/cm^{2} στο τέλος της συντήρησης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων εδώ και πολλούς αιώνες. Εκτός από τη συμβολή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων αυτών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ασκούν και ισχυρή ανταγωνιστική δράση έναντι πολλών μικροοργανισμών που επιμολύνουν τα τρόφιμα. Η ανταγωνιστική δράση γίνεται με την παραγωγή οργανικών οξέων, υπεροξειδίου του υδρογόνου, διακετυλίου, ανασταλτικών ενζύμων και βακτηριοσινών και μη πρωτεϊνικών θερμοάντοχων μορίων και μπορεί να συνδέονται με την αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου (Bleicher et al. 2010, Callon et al. 2011). Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, το γαλακτικό οξύ που παράγεται μειώνει το pH. Παράλληλα με την πτώση του pH, αυξάνεται η αδιάστατη μορφή του γαλακτικού οξέος προκαλώντας αναστολή στην ανάπτυξη οποιουδήποτε παθογόνου (Le Marc et al. 2009). Στα τυριά ωρίμανσης ο συνδυασμός των ανταγωνιστικών σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της εναρκτήριας καλλιέργειας και του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, η χαμηλή ενεργότητα νερού και το χαμηλό pH αποτελούν εμπόδια που δυσχεραίνουν την ανάπτυξη του παθογόνου (Morgan et al. 2001).

Ο πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων στα τυριά edam και gouda ήταν 2.8 ± 0.0 και 2.0 ± 1.4 log CFU/cm^2, αντίστοιχα, αυξάνεται στα 5.6 ± 0.2 και 6.2 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα, στην μέση της συντήρησής τους και διατηρείται σταθερός μέχρι το τέλος. Αυτό οφείλεται και στο χαμηλότερο pH τους (5.50 ± 0.01 έως 5.60 ± 0.00 και 5.50 ± 0.01 έως 5.50 ± 0.02, αντίστοιχα), το οποίο δημιουργεί ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη μυκήτων. Στο χαλούμι ωστόσο, αν και ξεκινά από χαμηλότερα επίπεδα (2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2), παρουσιάζοντας αρκετά μεγάλες διακυμάνσεις, δεν ξεπερνά τους 3.4 ± 0.0 log CFU/cm^2 σε όλη την διάρκεια συντήρησης και δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού (Γράφημα 1).

Η καμπύλη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) (Γράφημα 1), των τυριών edam και gouda ταυτίζεται, με την καμπύλη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συμπεραίνοντας ότι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός σε αυτά τα προϊόντα είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Αντίθετα, η καμπύλη της ΟΜΧ του χαλουμιού (Γράφημα 1β), όπως φαίνεται, είναι πανομοιότυπη με αυτή του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, αποδεικνύοντας ότι η επικρατούσα χλωρίδα στο χαλούμι είναι αυτή του παθογόνου μικροοργανισμού. Το έλλειμα που υπάρχει στην αρχή της συντήρησης μεταξύ της ΟΜΧ και του πληθυσμού του παθογόνου ή κάποιου άλλου από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, οφείλεται στη ύπαρξη ψευδομονάδων στο τυρί, των οποίων έγινε ταυτοποίηση, αλλά όχι καταμέτρηση. Η επικράτησή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά edam και gouda ήταν αναμενόμενη, εφόσον η προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας αποτελεί μέρος της τεχνολογίας παρασκευής τους και αναγράφεται στην συσκευασία τους. Συγκεκριμένα, η οξυγαλακτική καλλιέργεια προστίθενται μετά την παστερίωση του γάλακτος μαζί με την πυτιά, καθώς συμβάλουν στην πήξη και ακόμη περισσότερο στην μετέπειτα ωρίμανση τους, δεδομένου ότι αποτελούν τυριά ωρίμανσης. Η προσθήκη τους, δικαιολογεί τα υψηλά τους επίπεδα από την αρχή της συντήρησης των προϊόντων και το πιο χαμηλό τους pH (5.50 ± 0.01 έως 5.60 ± 0.00 και 5.50 ± 0.01 έως 5.50 ± 0.02, αντίστοιχα), οδηγώντας στην επιβίωση, αλλά παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria. monocytogenes*. Αντίθετα, το χαλούμι, παρόλο που ανήκει και αυτό με την σειρά του στην κατηγορία των ημίσκληρων τυριών, δεν παράγεται από παστεριωμένο γάλα και δεν ωριμάζει, άρα δεν γίνεται και προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας. Το χαλούμι έχει υψηλότερο pH (6.60 ± 0.03 έως 6.52 ± 0.0) συγκριτικά με τα τυριά edam και gouda (5.50 ± 0.01 έως 5.60 ± 0.00 και 5.50 ± 0.01 έως 5.50 ± 0.02, αντίστοιχα), αλλά δεν διαφέρουν ιδιαίτερα ως προς την ενεργότητα νερού τους (Πίνακας 4)

Πολλές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει μικροβιακές κοινότητες με αντι-λιστεριακή δράση στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό διάφορων τυριών (Bleicher et al. 2010, Imran et al. 2010, Retureau et al. 2010, Roth et al. 2010). Όλες οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν πως κανένα στέλεχος από το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας μόνο του δεν εκδηλώνει κάποια αντιμικροβιακή δράση έναντι στον παθογόνο *L. monocytogenes*, αντίθετα η αντιμικροβιακή δράση κάθε κοινότητας είναι αποτέλεσμα συνέργειας μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες όσον αφορά το είδος των μικροοργανισμών, την σύσταση και τον βαθμό βιοποικιλότητας και δομής είναι ικανές να εμποδίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Συγκεκριμένα, οι Maoz et al. (2003) περιέγραψαν μια μικροβιακή κοινότητα που υπήρχε σε τυρί, γνωστό ως red-smear cheese, της οποίας η αντιμικροβιακή δράση έναντι στον παθογόνο οφειλόταν στα θετικά κατά gram μη οξυγαλακτικά βακτήρια που βρίσκονταν στο τυρί, όπως τα Corynebacterium, Brevibacterium κ.α., ενώ οι Bleicher et al. (2010) και οι Roth et al. (2010, 2011) ανακάλυψαν την συμβολή οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως Vagococcus, Facklamia, Alkalibacterium, Marinilactibacillus κ.ά. στην αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου στην επιφάνεια του ίδιου τυριού. Ακόμη οι Imran et al. (2010) και Callon et al. (2011) έδειξαν ότι η προσθήκη και άλλων ειδών βακτηρίων ή η αφαίρεση ενός μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την αντιμικροβιακή δράση της μικροβιακής κοινότητας έναντι του παθογόνου *L. monocytogenes*. Παρόλα αυτά παραμένουν άγνωστες οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών μια μικροβιακής κοινότητας στο τυρί και του *L. monocytogenes*, που οδηγούν στην αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου. Όλα τα τυριά ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ’ όλη την διάρκεια της συντήρησης.



Γράφημα 1: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L.monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών – μυκήτων, σε ημίσκληρα τυριά κατά τη συντήρησή τους υπό κενό στους 7^{o}C.

4.1.2 Μαλακά τυριά

Στο Γράφημα 2 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα μαλακά τυριά της παρούσας μελέτης χωρίζονται σε δυο ομάδες, σε αυτά που υποστηρίζουν την επιβίωση του παθογόνου (ανθότυρο, μανούρι και μαστέλο®) και σε αυτά που υποστηρίζουν την ανάπτυξή του (mozzarella, camembert και ricotta). Ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα όπως 1.7 ± 0.2 έως 1.6 ± 0,2 log CFU/cm^2, 1.7 ± 0.1 έως 1.4 ± 0,2 log CFU/cm^2 και 1.3 ± 0.0 έως 1.6 ± 0,2 log CFU/cm^2 στα τυριά ανθότυρο, μανούρι και μαστέλο®, αντίστοιχα, καθ΄ όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 7°C. Αντίθετα με τα προαναφερθέντα τυριά, τα τυριά mozzarella, camembert και ricotta υποστήριξαν ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. monocytogenes.* Πιο συγκεκριμένα, στο τυρί mozzarella ο πληθυσμός του παθογόνου από τους 1.7 ± 0.2 log CFU/cm^2 (0η ημέρα) έφτασε την $26^η$ ημέρα συντήρησης τους 6.6 ± 0.2 log CFU/cm^2, στο τυρί camembert από τους 1.6 ± 0.0 log CFU/cm^2 (0η ημέρα) έφτασε την $26^η$ ημέρα συντήρησης τους 7.1 ± 0.2 log CFU/cm^2 και τέλος, στο τυρί ricotta από τους 1.6 ± 0.2 log CFU/cm^2 (0η ημέρα) έφτασε την $17^η$ ημέρα συντήρησης τους 7.7 ± 0.2 log CFU/cm^2. Οι Tsiotsias et al. (2002) στη μελέτη τους έθεσαν ως στόχο να καθορίσουν τη σκοπιμότητα της γ-ακτινοβολίας (3 εντάσεις ακτινοβολίας, 0.5, 2 και 4 kGy) για τον έλεγχο του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που εμβολιάστηκε (10^5 – 10^6 CFU/g) σε τυρί ανθότυρο και η παρακολούθηση του πληθυσμού του, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε δύο θερμοκρασίες (4 και 10 ^oC). Σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, οι Tsiotsias et al. (2002) παρατήρησαν ανάπτυξη του παθογόνου και στις 2 θερμοκρασίες συντήρησης, αποτέλεσμα που συμφωνεί και με τη μελέτη του Papageorgiou et al. (1996).

Στο Γράφημα 2 παρουσιάζεται η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7^{o}C. Στο τυρί μανούρι, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεκινάει τη 0η ημέρα από πολύ υψηλά επίπεδα (6.5 ± 0.0 log CFU/cm^2) ο οποίος έφτασε στο τέλος του χρόνου συντήρησης τους 7.8 ± 0.5 log CFU/cm^2. Το τυρί ανθότυρο ξεκίνησε από τους 4.3 ± 0.1 log CFU/cm^2 και έφτασε σε πληθυσμό τους 6.9 ± 0.1 log CFU/cm^2 και σχεδόν την ίδια πορεία είχε και το τυρί mozzarella (3.9 ± 0.4 log CFU/cm^2 έως 7.3 ± 0.2 log CFU/cm^2). Ακολούθησε το τυρί μαστέλο® με τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων να ξεκινάει από τους 3.3 ± 0.1 log CFU/cm^2 και να φτάνει στο τέλος του χρόνου συντήρησης τους 6.8 ± 0.2 log CFU/cm^2. Τέλος, τα τυριά camembert και ricotta είχαν τον χαμηλότερο αρχικό πληθυσμό (2.2 ± 0.2 log CFU/cm^2 και 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα) και τις μικρότερες ή καθόλου αυξήσεις μέχρι το τέλος του χρόνου συντήρησης (3.7 ± 0.0 log CFU/cm^2 και 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2). Τα τυριά ανθότυρο και μανούρι είναι τυριά τυρογάλακτος, τα οποία δεν ωριμάζουν και δεν προστίθεται σε αυτά οξυγαλακτική καλλιέργεια, παρόλα αυτά ανέπτυξαν υψηλούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών, οι οποίοι κυριάρχησαν στο τέλος δημιουργώντας εμπόδιο στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes.* Οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών πιθανόν να προήλθαν από επιμόλυνση των τυριών κατά τη διαδικασία της παραγωγής τους με αποτέλεσμα την μετέπειτα κυριαρχία τους. Η επιμόλυνση μπορεί να οφείλεται στο ότι η ίδια γραμμή παραγωγής μπορεί να χρησιμοποιείται και για τυριά των οποίων η τεχνολογία παρασκευής τους υποστηρίζει την προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 2 ο αυξημένος πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα τυριά ανθότυρο και μανούρι σε συνδυασμό με τις τιμές του pH, (6.72 ± 0.01 έως 4,84 ± 0.00 και 5.71 ± 0.07 έως 5,11 ± 0.33, αντίστοιχα) κατά τη διάρκεια της συντήρησης, των συγκεκριμένων τυριών ήταν ικανός να εμποδίσει την ανάπτυξη του παθογόνου, αλλά επέτρεψε την επιβίωσή του. Πιο συγκεκριμένα, το ανθότυρο ξεκίνησε από υψηλό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων (4.3 ± 0.1 log CFU/cm^2 έως 6.9 ± 0.1 log CFU/cm^2), η δράση του οποίου είχε ως αποτέλεσμα την πτώση του pH (6.72 ± 0.01 έως 4.84 ± 0.00), συνδυασμός που όπως φαίνεται έδρασε ανασταλτικά στην αύξηση του παθογόνου. Παρομοίως, το τυρί μανούρι ξεκίνησε με τον πιο υψηλό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων (6.5 ± 0.0 log CFU/cm^2) και κατ' επέκταση με τη χαμηλότερη τιμή pH (5.71 ± 0.07) τιμή η οποία μειώθηκε κι' άλλο (5.11 ± 0.33) κατά τη διάρκεια της συντήρησης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού.

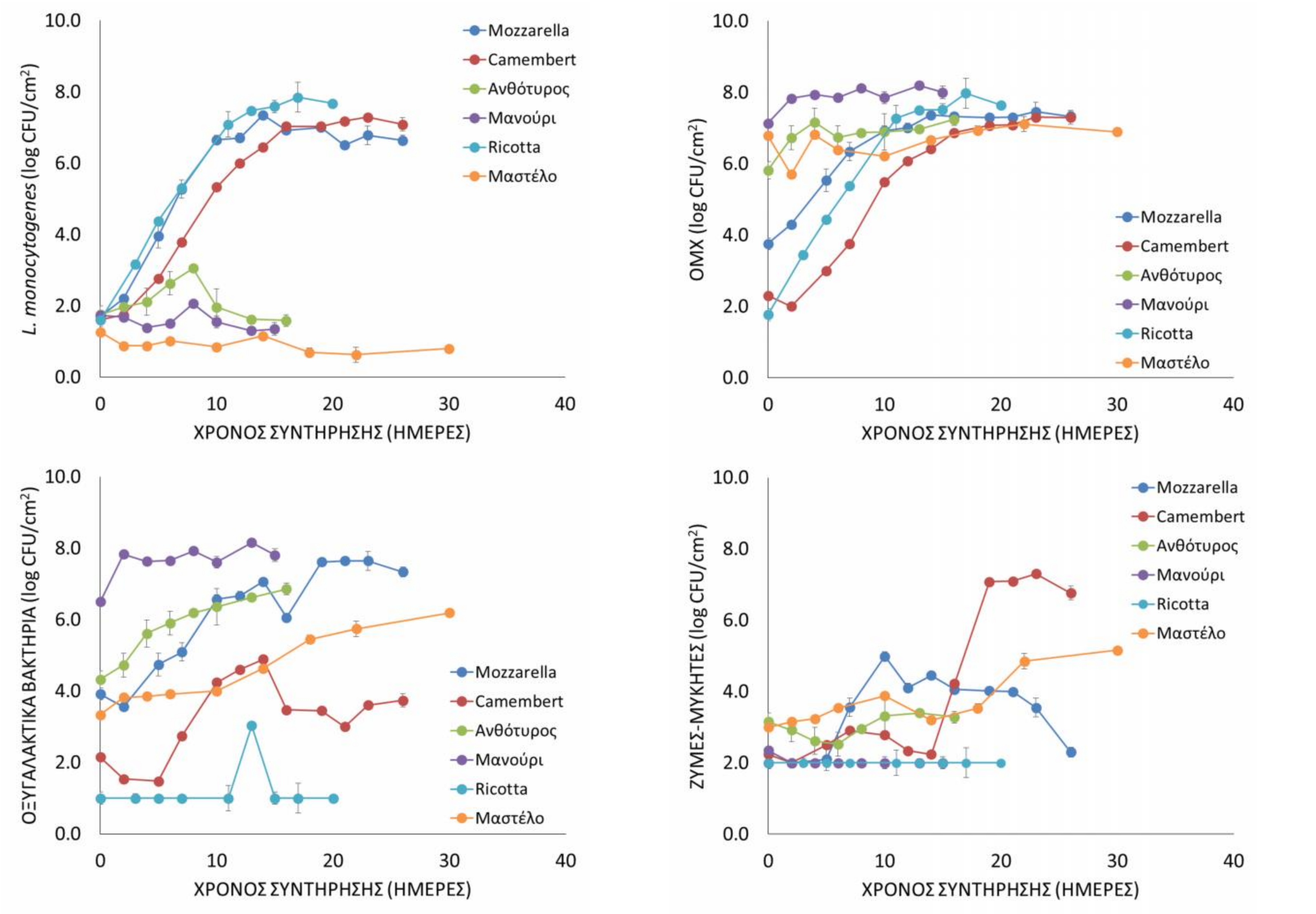
Το Γράφημα 2 για τις ζύμες και μύκητες δείχνει ότι τα τυριά ανθότυρο, μανούρι και ricotta διατήρησαν σταθερό τον πληθυσμό τους στους 3.2 ± 0.2 log CFU/cm^2 έως 3,3 ± 0.2 log CFU/cm^2, 2.3 ± 0.5 log log CFU/cm^2 έως 2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2 και 2.0 ± 0.0 log cfu/cm^2 έως 2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα, καθ΄ όλη τη διάρκεια συντήρησής του. Ωστόσο, στο τυρί mozzarella ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ξεκίνησε από τους 2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, έως τη 10η ημέρα συντήρησης αυξήθηκε στους 5.0 ± 0.0 log CFU/cm^2 και στη συνέχεια άρχισε να μειώνεται απότομα μέχρι και το τέλος της συντήρησης φτάνοντας στους 2.3 ± 0.4 log CFU/cm^2. Τέλος, στα τυριά camembert και μαστέλο® ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ξεκίνησε από τους 2.2 ± 0.3 log CFU/cm^2 και 3.0 ± 0.0 log CFU/cm^2 και έφτασε τους 6.8 ± 0.0 log CFU/cm^2 και 4.3 ± 0.5 log CFU/cm^2, αντίστοιχα, πληθυσμό τον οποίο διατήρησαν μέχρι και το τέλος της συντήρησής τους. Για το τυρί camembert, η αύξηση αυτή είναι αναμενόμενη δεδομένου ότι είναι ένα τυρί το οποίο ωριμάζει με ανάπτυξη επιφανειακών μυκήτων.

Οι καμπύλες της ΟΜΧ Γράφημα 2, δείχνουν ότι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στα τυριά mozzarella και μανούρι είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθώς οι καμπύλες ανάπτυξης της ΟΜΧ ταυτίζονται με αυτές των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Από την άλλη, στα τυριά camembert και ricotta φαίνεται να κυριαρχεί ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, καθώς οι καμπύλες ανάπτυξης της ΟΜΧ ταυτίζονται με αυτές του παθογόνου βακτηρίου. Στο τυρί ανθότυρο το έλλειμα που υπάρχει στην αρχή της συντήρησης μεταξύ της ΟΜΧ και του πληθυσμού του παθογόνου ή κάποιου άλλου από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, οφείλεται στη ύπαρξη ψευδομονάδων στο τυρί, των οποίων έγινε ταυτοποίηση, αλλά όχι καταμέτρηση. Στο τυρί μαστέλο η επικρατούσα μικροχλωρίδα είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος δεν είναι ούτε τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ούτε οι ζύμες και οι μύκητες, ούτε τα εντεροβακτήρια, που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο ο πληθυσμός αυτού του μικροοργανισμού είναι αρκετά υψηλός ώστε να αναστείλει την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Το μαστέλο® είναι λευκό μαλακό τυρί που φτιάχνεται από αγελαδινό γάλα. Το γάλα παστεριώνεται, δεν γίνεται προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας και αλατίζεται σε ελαφριά άλμη. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* στο συγκεκριμένο τυρί καταφέρνει να επιβιώσει, αλλά όχι να αναπτυχθεί, λόγω του υψηλού πληθυσμού της ενδογενούς μικροχλωρίδας του τυριού (6.8 ± 0.4 log cfu/g) από την αρχή της συντήρησης. Επιπλέον, είναι το μαλακό τυρί με τη χαμηλότερη ενεργότητα νερού (0.952 ± 0.000 έως 0.949 ± 0.002) (Πίνακας 4).

Όλα τα τυριά ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης.

Η επιμόλυνση μετά την παρασκευή και ωρίμανση και η ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* στα μαλακά τυριά που συντηρούνται υπό ψύξη, αποτελεί ανησυχία για τη δημόσια υγεία και έχει μελετηθεί αρκετά (Morgan et al. 2001, Samelis et al. 2003, Uhlich et al. 2006, Bernini et al. 2013, Tiwari et al. 2014). Το mozzarella είναι μαλακό τυρί που παράγεται από παστεριωμένο γάλα, δεν ωριμάζει, προστίθεται σε αυτό οξυγαλακτική καλλιέργεια και χαρακτηρίζεται ως φρέσκο. Στην παρούσα μελέτη παρατηρείται ότι παρόλη την αυξημένη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ο πληθυσμός του παθογόνου φτάνει τους 6.6 ± 0.1 log CFU/cm^2). Αυτό μπορεί να οφείλεται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, όπως είναι η ενεργότητα νερού (0.994 ± 0.003 έως 0.987 ± 0.009) και το pH (6.23 ± 0.01 έως 6.14 ± 0.00), τα οποία την καθιστούν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου. Για αυτό τον λόγο πολλά από τα κρούσματα λιστερίωσης που έχουν καταγραφεί οφείλονται στο συγκεκριμένο τύπο τυριού (Ιταλία 1981, ΗΠΑ 1981, ΗΠΑ 1989), ο οποίος έχει μελετηθεί σε έρευνες που έχουν αξιολογήσει τη συμπεριφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε αυτό κατά τη διάρκεια της παρασκευής του (Buazzi et al. 1992, Villani et al. 1996), καθώς και κατά τη διάρκεια της συντήρησής του (Stecchini et al. 1995). Το ricotta αποτελεί ένα τυρί που δεν ωριμάζει και παράγεται από παστεριωμένο γάλα. Δεδομένου ότι είναι φρέσκο τυρί δεν αναμένεται να έχει υψηλό αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων. Στο συγκεκριμένο προϊόν ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* αυξήθηκε και διατήρησε υψηλούς πληθυσμούς, γεγονός που οφείλεται στην υψηλή ενεργότητα νερού και το υψηλό pH των τυριών αυτής της τεχνολογίας, καθώς και στην έλλειψη ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας, συνδυασμός που δημιούργησε ένα φιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης των Spanu et al. (2012), όπου εμβολίασαν τυρί ricotta με μείγμα τριών στελεχών του *L. monocytogenes*. Το επίπεδο του εμβολίου ήταν στους 10^2 CFU/g και τα τυριά συντηρήθηκαν στους 4 ± 2^{o}C. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του τυριού και μετρήσεις pH και ενεργότητας νερού. Και σε αυτή τη μελέτη (Spanu et al. 2012) το τυρί ricotta υποστήριξε την ανάπτυξη του παθογόνου, παρόλο που το pH (5.88 ± 0.18) και η ενεργότητα νερού (0.940 ± 0.010) ήταν χαμηλότερα από το pH (6.64 ± 0.02 έως 6.59

± 0.33) και την ενεργότητα νερού (0.988 ± 0.001 έως 0.990 ± 0.002) της παρούσας εργασίας. Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η έλλειψη κάποιας ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας καθιστά το τυρί ricotta ικανή να υποστηρίξει ανάπτυξη του παθογόνου. Τέλος, το τυρί camembert, παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού και την μικρότερη αύξηση οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ταυτόχρονα παρουσίασε και την μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων (Γραφημα 2δ). Το τυρί camembert, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω αποτελεί ένα μαλακό τυρί που ωριμάζει με επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων. Επομένως, είναι λογική η μεγάλη αύξηση του πληθυσμού αυτών και η μικρή αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επιπλέον, το τυρί camembert έχει εξίσου αναφερθεί σε πολλά κρούσματα λιστερίωσης (ΗΠΑ 1983, Λουξεμβούργο 1989) και έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών ερευνών που μελετούν την συμπεριφορά του παθογόνου σε αυτό κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσής του (Linton et al. 2008, Liu and Puri, 2008). Πρέπει να αναφερθεί ότι η υψηλή ενεργότητα νερού, το υψηλό pH του και η χαμηλή αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου σε αυτό.

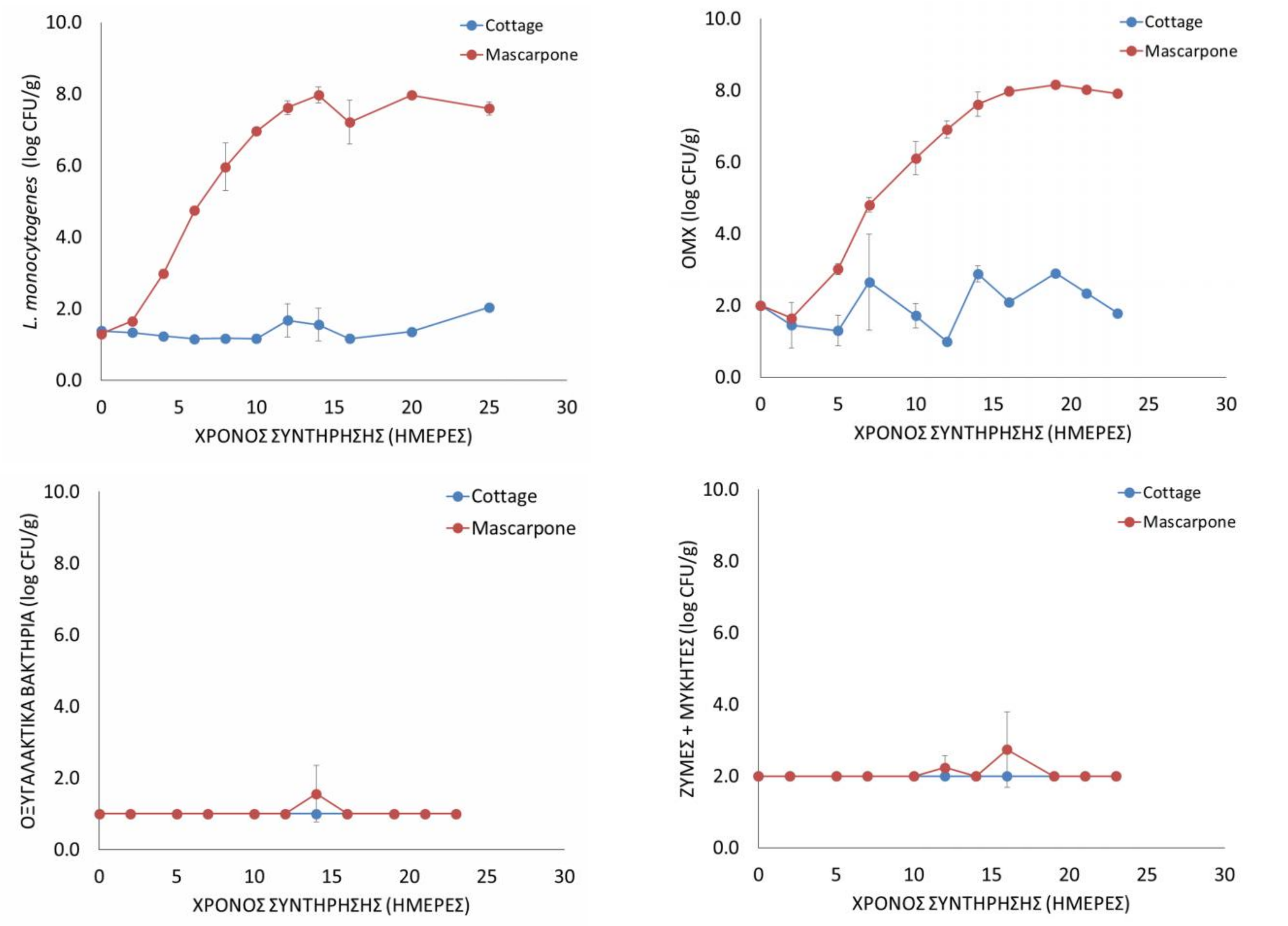


Γράφημα 2: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών – μυκήτων, σε μαλακά τυριά κατά τη συντήρησή τους υπό κενό ή υπό αερόβιες συνθήκες στους 7^oC.

4.1.3 Τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή

Από την κατηγορία των τυριών χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή επιλέχθηκαν τα τυριά cottage και mascarpone. Στο Γράφημα 3 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το τυρί cottage ανήκει στα τυριά που υποστήριξανν επιβίωση του *L. monocytogenes*, μιας και ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός ($p \leq 0.05$) στα επίπεδα του αρχικού εμβολίου (100 CFU/g), καθ΄ όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, στο τυρί cottage το επίπεδο του πληθυσμού του παθογόνου που εμβολιάστηκε ήταν στους 1.4 ± 0.1 log CFU/g και μέχρι το τέλος της συντήρησης παρέμειναν στο ίδιο επίπεδο (2.0 ± 0.0 log CFU/g). Αντίθετα, το τυρί mascarpone υποστήριξε την ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. monocytogenes.* Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε από τις πρώτες μέρες συντήρησης του τυριού έως και την 16^{η} μέρα συντήρησης, φτάνοντας την 25^{η} ημέρα συντήρησης τους 7.6 ± 0.2 log CFU/g. Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Γράφημα 3) σε κανένα από τα δύο τυριά ο πληθυσμός δεν αναπτύχθηκε πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1.0 ± 0.0 log CFU/g) καθ’ όλη τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος στους 7°C. Παρομοίως, ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων και των δυο τυριών δεν ανέβηκε πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (2.0 ± 0.0 log CFU/g) (Γράφημα 3). Όλα τα τυριά ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ’ όλη την διάρκεια της συντήρησης.

Στο Γράφημα 3 παρουσιάζεται, επίσης, η μεταβολή της ΟΜΧ συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι στο τυρί mascarpone κυριάρχησε ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, καθώς η καμπύλη ανάπτυξης της ΟΜΧ ταυτίζεται με αυτή του παθογόνου βακτηρίου. Όσον αφορά το τυρί cottage ο πληθυσμός της ΟΜΧ φαίνεται να είναι λίγο υψηλότερος (2.0 ± 0.0 log CFU/g έως 1.8 ± 1.1 log CFU/g) από αυτόν του παθογόνου (1.4 ± 0.1 log CFU/g έως 2.0 ± 0.0 log CFU/g), αλλά σταθερός καθ’ όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Η καμπύλη της ΟΜΧ για το τυρί cottage μπορεί να περιλαμβάνει και έναν μικρό πληθυσμό ενδογενούς χλωρίδας του τυριού. Και τα δυο τυριά δεν παρουσιάζουν κάποια ενδογενή μικροχλωρίδα η οποία θα μπορούσε να δράσει ανταγωνιστικά ως προς την ανάπτυξη του παθογόνου. Επιπλέον, η ενεργότητα νερού τους είναι παρόμοια (Πίνακας 4). Συμπερασματικά, η διαφοροποίησή τους ως προς την ικανότητά τους να υποστηρίξουν ή όχι ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού φαίνεται να οφείλεται στη διαφορετική τιμή pH που έχουν τα δυο τυριά, με το τυρί cottage (5.03 ± 0.00 έως 5.00 ± 0.01) να έχει σαφώς μικρότερη τιμή pH από το τυρί mascarpone (6.45 ± 0.17 έως 6.50 ± 0.04). Οι McAuliff et al. (1999) σε μελέτη τους παρατήρησαν επιβίωση του *Listeria monocytogenes* κατά τη συντήρηση τυριού cottage στους 4, 18 και 30^oC, στο οποίο δεν είχε προστεθεί εναρκτήρια καλλιέργεια με αντιμικροβιακή δράση, εύρημα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Αντίθετα, οι Chen and Hotchkiss (1993) και οι Østergaard et al. (2014) σε μελέτες τους θέλησαν να αναστείλουν την παρατηρούμενη ανάπτυξη του παθογόνου σε τυρί cottage, είτε με προσθήκη $CO_{2,}$ συγκέντρωσης 35% v/v, στην συσκευασία του προϊόντος (συντήρηση στους 4, 7 και 14^oC), είτε με χρήση του πληθυσμού και του είδους της εναρκτήριας καλλιέργειας κατά τη συντήρηση του προϊόντος στους 5, 10 και 15^oC. Τέλος, οι Panagou (2008) και Mataragas et al. (2008) εμβολίασαν με *L. monocytogenes* αλοιφώδες τυρί κατίκι, το οποίο στη συνέχεια συντήρησαν στους 5, 10, 15 και 20 ^oC και παρακολούθησαν την θανάτωση του παθογόνου, λόγω του χαμηλού pH σε συνδυασμό με τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων της εναρκτήριας καλλιέργειας.



Γράφημα 3: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών – μυκήτων, σε τυριά με αλοιφώδη υφή κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους $7^{o}C$.

Πίνακας 4: Μεταβολή της a_w (αρχή, μέση και τέλος της συντήρησης) διαφορετικού τύπου τυριών (ημίσκληρων, μαλακών και τυριών χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή) κατά την συντήρησή τους στους 7°C

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΥΡΙΟΥ	ΕΙΔΟΣ ΤΥΡΙΟΥ	ΑΡΧΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	ΜΕΣΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	ΤΕΛΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ
ΗΜΙΣΚΛΗΡΑ	edam	0.942 ± 0.001	0.952 ± 0.0013	0.953 ± 0.001
	gouda	0.967 ± 0.004	0.967 ± 0.001	0.947 ± 0.006
	χαλούμι	0.965 ± 0.004	0.963 ± 0.001	0.955 ± 0.001
ΜΑΛΑΚΑ	mozzarella	0.994 ± 0.003	0.985 ± 0.002	0.987 ± 0.009
	camembert	0.973 ± 0.003	0.969 ± 0.002	0.969 ± 0.003
	ανθότυρο	0.991 ± 0.001	0.985 ± 0.001	0.988 ± 0.002
	μανούρι	0.990 ± 0.000	0.990 ± 0.000	0.990 ± 0.000
	ricotta	0.988 ±0.001	0.984 ± 0.000	0.990± 0.002
	μαστέλο®	0.952 ± 0.000	0.951 ± 0.001	0.949 ± 0.002
ΤΥΡΙΑ ΧΩΡΙΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΜΕ ΑΛΟΙΦΩΔΗ ΥΦΗ	cottage	0.994 ± 0.001	0.985 ± 0.000	0.983 ± 0.001
	mascarpone	0.993 ± 0.003	0.989 ± 0.004	0.971 ± 0.006

4.2 Επίδραση της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*

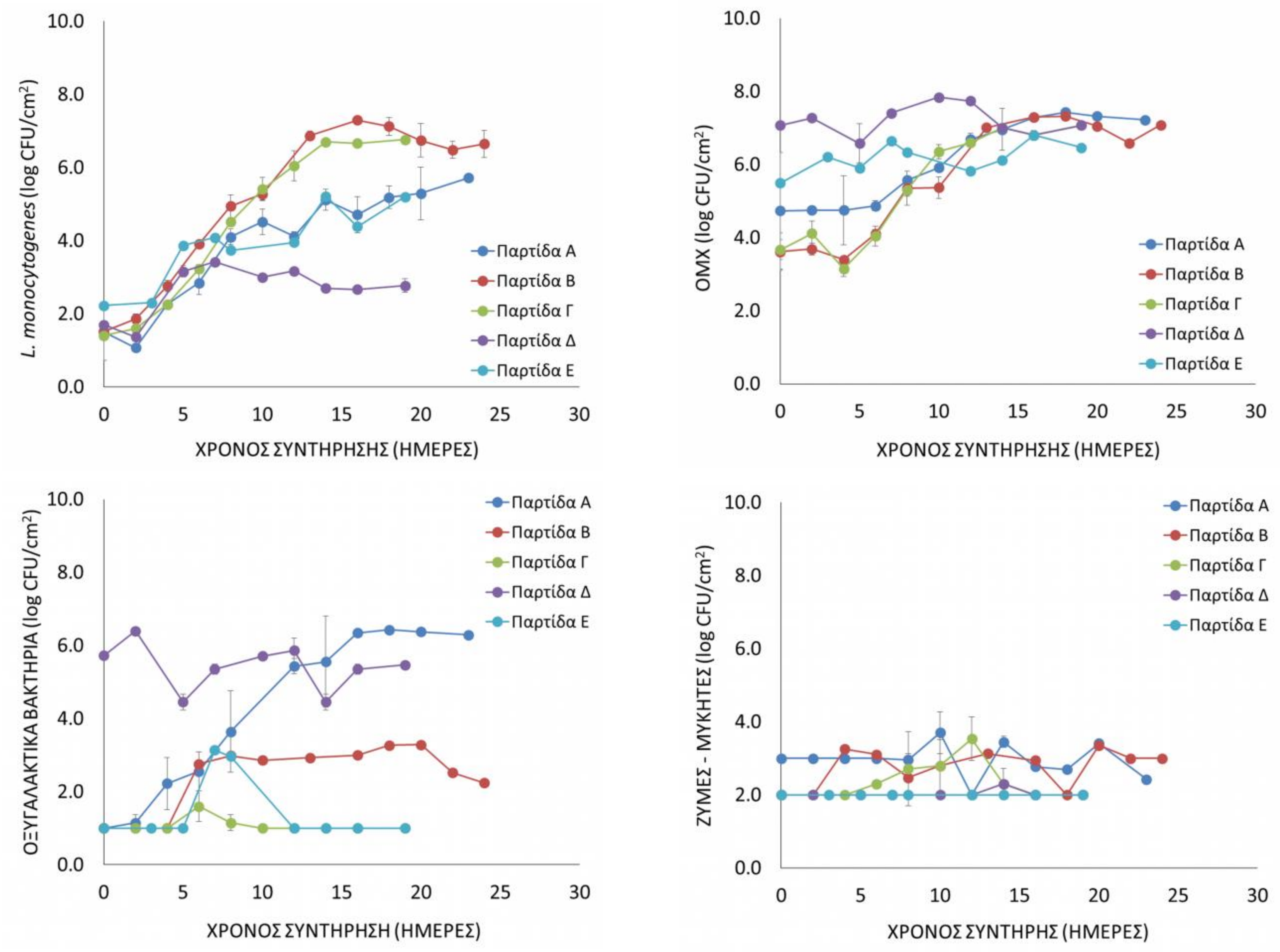
Τα τυριά χαλούμι, mozzarella, camembert και mascarpone επιλέχθηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*. Η αγορά των τυριών πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία του χρόνου ζωής τους (κοντά στην ημερομηνία παραγωγής και κοντά στην ημερομηνία λήξης), με σκοπό να μελετηθούν διαφορετικές παρτίδες και κατά συνέπεια διαφορετικά επίπεδα ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ).

4.2.1 Ημίκληρα τυριά

4.2.1.1 Χαλούμι

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* στο τυρί χαλούμι, αγοράστηκαν πέντε παρτίδες, από τις οποίες κάποιες διέφεραν ως προς την ημερομηνία παραγωγής και κάποιες είχαν κοινή ημερομηνία παραγωγής, αλλά αγοράστηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία του χρόνου συντήρησης του προϊόντος.

Στο Γράφημα 4, φαίνεται ότι όσο υψηλότερος είναι ο αρχικός πληθυσμός της ΟΜΧ, τόσο μικρότερο είναι το δυναμικό αύξησης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση του τυριού χαλούμι στους 7°C. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, οι τέσσερις από τις πέντε παρτίδες του χαλουμιού ξεκίνησαν από διαφορετικά επίπεδα ΟΜΧ, γεγονός που φαίνεται να επηρέασε την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Πιο συγκεκριμένα, οι παρτίδες Β και Γ ήταν αυτές που είχαν τη 0η ημέρα συντήρησης την χαμηλότερη ΟΜΧ (3.6 ± 0.5 log CFU/cm^2 και 3.7 ± 0.3 log CFU/cm^2, αντίστοιχα) με αποτέλεσμα να είναι και αυτές που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του παθογόνου (τελικοί πληθυσμοί: 6.6 ± 0.4 log CFU/cm^2 και 6.8 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα) (Γράφημα 4). Επιπλέον, και στις δυο παραπάνω παρτίδες οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών και μυκήτων παρουσίασαν πολύ μικρή (παρτίδα Β) ή καθόλου αύξηση (παρτίδα Γ), γεγονός που συνέβαλλε ώστε στην αύξηση του παθογόνου λόγω της περιορισμένης ανταγωνιστικότητας. Οι παρτίδες Α και Ε τη 0η μέρα συντήρησης είχαν επίπεδο αρχικού πληθυσμού ΟΜΧ 4.7 ± 1.6 log CFU/cm^2 και 5.5 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα. Στις συγκεκριμένες παρτίδες (Α και Ε) ο παθογόνος παρουσίασε παρόμοιες καμπύλες αύξησης, φτάνοντας την τελική ημέρα συντήρησης σε πληθυσμούς των 5.7 ± 1.6 log CFU/cm^2 και 5.5 ± 0.0 log CFU/cm^2, αντίστοιχα.



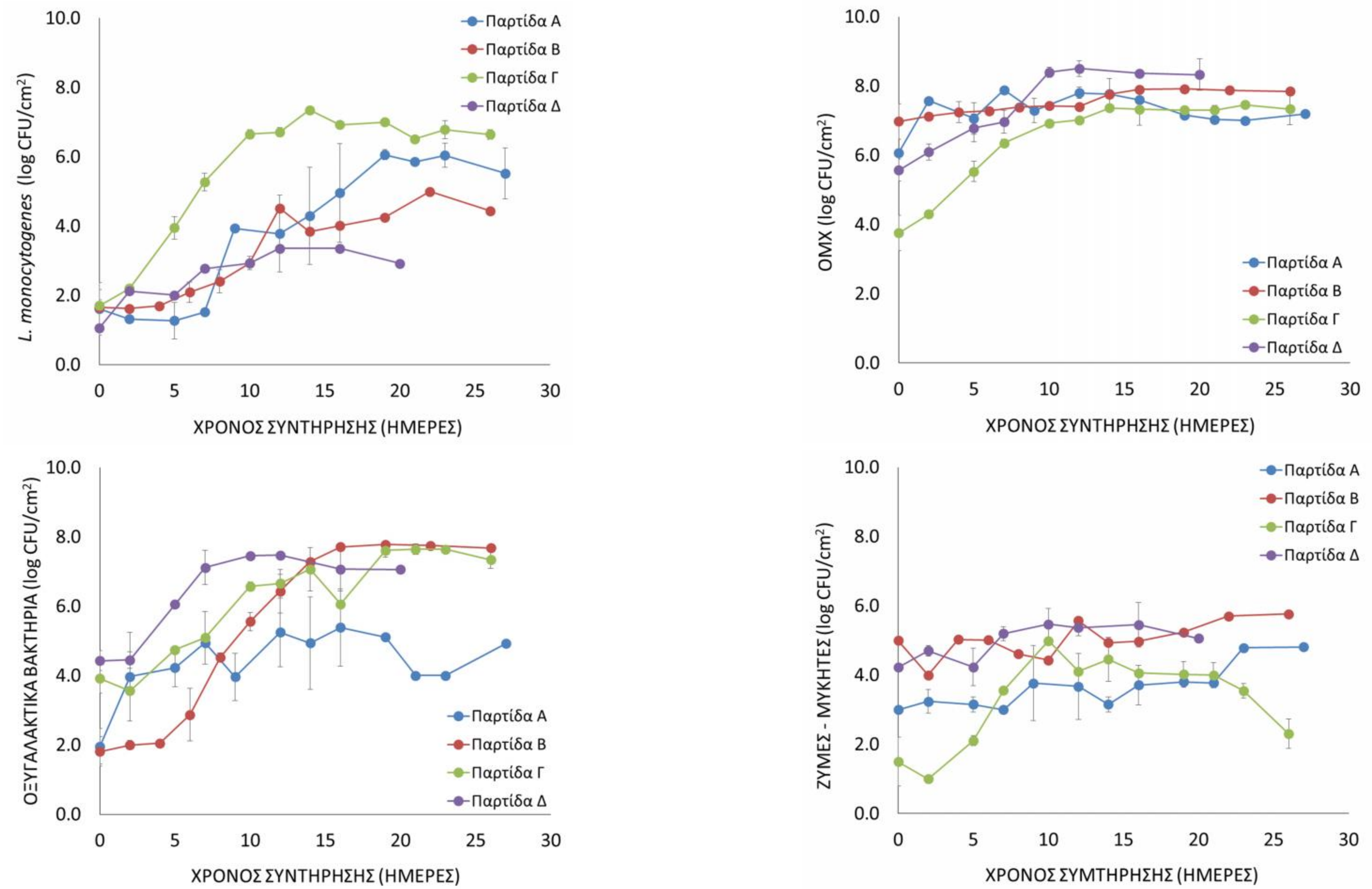
<u>**Γράφημα 4:**</u> Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών – μυκήτων, σε πέντε διαφορετικές παρτίδες τυριού χαλούμι, κατά τη συντήρησή τους υπό κενό στους 7^{o}C.

Ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων βρισκόταν στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (100 CFU/cm^2) και για τις δύο παρτίδες. Αντίθετα ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παρτίδα Α αυξήθηκε συναρτήσει του χρόνου φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης τους 6.9 ± 0.3 log CFU/cm^2, ενώ ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων της παρτίδας Ε παρέμεινε στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2). Συμπερασματικά, αρχικά οι παρτίδες Α και Ε, παρουσίασαν χαμηλότερη ανάπτυξη του πληθυσμού του παθογόνου από τις παρτίδες Β και Γ, λόγω του ότι είχαν πιο υψηλό επίπεδο πληθυσμού ΟΜΧ την 0η ημέρα συντήρησης. Δευτερευόντως, οι παρτίδες Α και Ε παρουσίασαν παρόμοια εικόνα ανάπτυξης του παθογόνου ανεξαρτήτως της διαφορετικής εικόνα του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών έπαιξε ρόλο στην ανάπτυξη του παθογόνου. Τέλος, η παρτίδα Δ τη 0η μέρα συντήρησης διέθετε τον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό ΟΜΧ (7.1 ± 1.6 log CFU/cm^2), ο οποίος παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο καθ’ όλη τη διάρκεια της συντήρησης (7.1 ± 0.0 log CFU/cm^2), γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την χαμηλότερη ανάπτυξη του παθογόνου (1.7 ± 0.1 log CFU/cm^2 έως 2.8 ± 0.2 log CFU/cm^2), σε σχέση με τις υπόλοιπες παρτίδες. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να έχει υψηλό επίπεδο πληθυσμού από την αρχή, τον οποίο διατηρεί μέχρι και το τέλος της συντήρησης (5.7 ± 0.0 log CFU/cm^2 έως 5.5 ± 0.2 log CFU/cm^2), ενώ ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων παρέμεινε στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (100 CFU/cm^2). Το έλλειμα που υπάρχει στην αρχή της συντήρησης μεταξύ της ΟΜΧ και του παθογόνου ή κάποιου άλλου από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, οφείλεται στη ύπαρξη ψευδομονάδων στο τυρί, των οποίων έγινε ταυτοποίηση, αλλά όχι καταμέτρηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνολογία παρασκευής του τυριού χαλούμι δεν υποστηρίζει προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται μάλλον σε επιμόλυνση κατά την παραγωγή και συσκευασία του προϊόντος στο χώρο του εργοστασίου. Όλες οι παρτίδες ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ’ όλη την διάρκεια της συντήρησης.

4.2.2 Μαλακά τυριά

4.2.2.1 Mozzarella

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* στο τυρί mozzarella, αγοράστηκαν τέσσερις παρτίδες, από τις οποίες κάποιες διέφεραν ως προς την ημερομηνία παραγωγής και κάποιες είχαν κοινή ημερομηνία παραγωγής, αλλά αγοράστηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία του χρόνου συντήρησης του προϊόντος. Στο Γράφημα 5, φαίνεται ότι το άθροισμα των πληθυσμών των επιμέρους μικροοργανισμών της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας, επηρεάζει το επίπεδο ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο τυρί mozzarella κατά την συντήρησή του στους 7°C. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, οι τέσσερις παρτίδες του τυριού mozzarella ξεκίνησαν από διαφορετικά επίπεδα ΟΜΧ, γεγονός που φαίνεται να επηρέασε την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Πιο συγκεκριμένα, η παρτίδα Γ ήταν αυτή που τη 0η ημέρα συντήρησης είχε την μικρότερη ΟΜΧ (3.8 ± 0.5 log CFU/cm^2) με αποτέλεσμα να είναι και αυτή που παρουσίασε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του παθογόνου (6.6 ± 0.1 log CFU/cm^2). Στη συγκεκριμένη παρτίδα ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεκινά και αυτός από πληθυσμό 3.9 ± 0.4 log CFU/cm^2, ο οποίος φτάνει και διατηρείται μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 7.3 ± 0.1 log CFU/cm^2 Επιπλέον, ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων παρουσιάζει αρχικά μια αύξηση, μέχρι το τέλος του χρόνου συντήρησης πέφτει στους 2.3 ± 0.4 log CFU/cm^2. Η παρτίδα Δ, τη 0η μέρα συντήρησης είχε αρχικό πληθυσμό ΟΜΧ στους 5.6 ± 0.3 log CFU/cm^2 και αρχικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων στους 4.4 ± 0.3 log CFU/cm^2, οι οποίοι αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επιπλέον, ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ξεκίνησε από τα 4.2 ± 0.1 ± 0.3 log CFU/cm^2 και αυξήθηκε 1.0 ± 0.3 log CFU/cm^2 κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η παραπάνω εικόνα της αρχική ενδογενούς μικροχλωρίδας της παρτίδας Δ είχε ως αποτέλεσμα ο παθογόνος μικροοργανισμός να έχει τη μικρότερη ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η παρτίδα Α, τη 0η μέρα συντήρησης είχε παρόμοιο αρχικό πληθυσμό ΟΜΧ (6.1 ± 0.0 log CFU/cm^2) με την πατρίδα Δ, με τους αρχικούς πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηριών (2.0 ± 0.5 log CFU/cm^2) και των ζυμών και μυκήτων (3.0 ± 0.5 log CFU/cm^2) να είναι πιο χαμηλοί, γεγονός που επέτρεψε στον παθογόνο να αναπτυχθεί περισσότερο απ' ότι στην προηγούμενη παρτίδα που περιεγράφηκε.



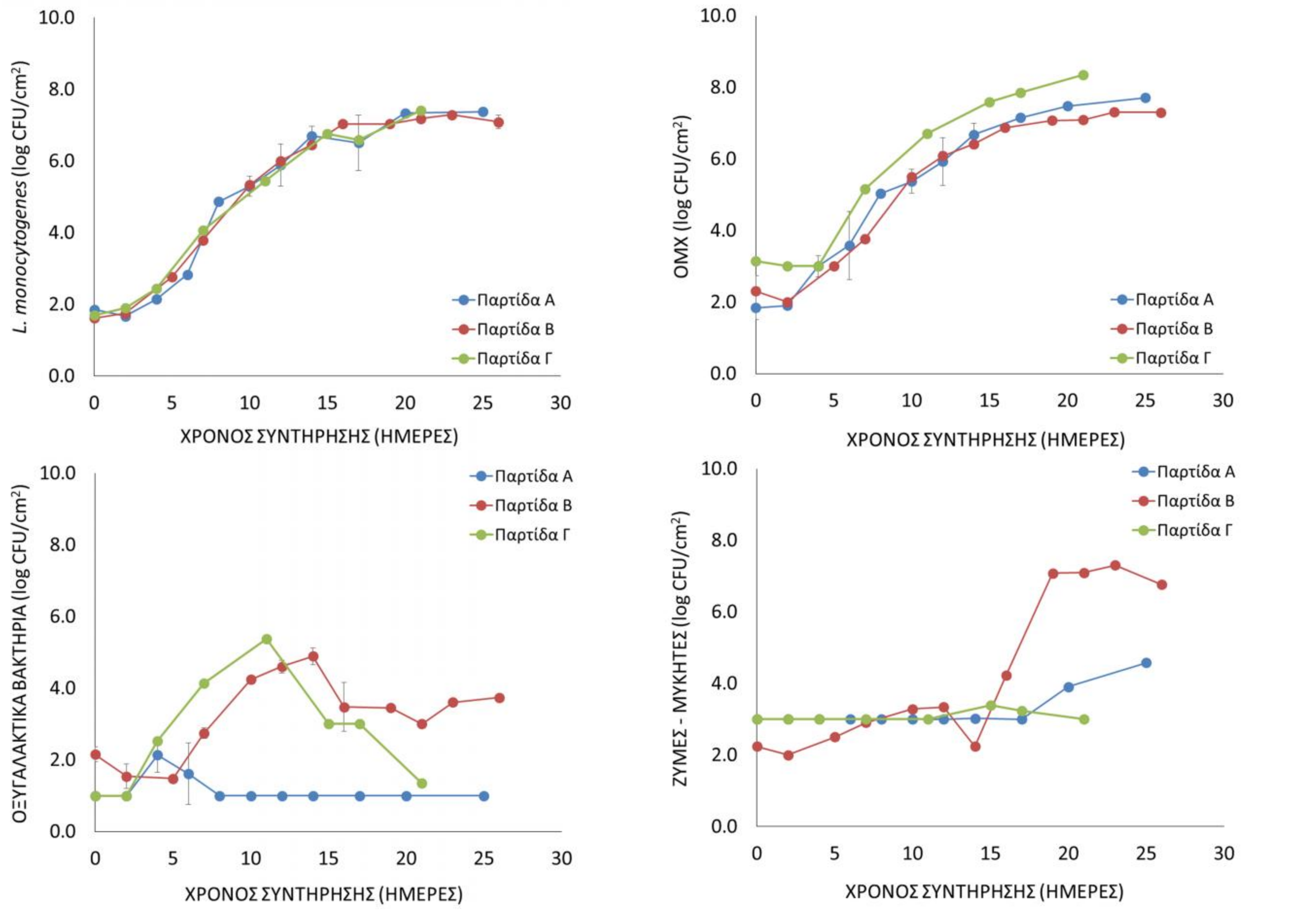
Γράφημα 5: Γραφική απεικόνηση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών και μυκήτων, σε τέσσερις διαφορετικές παρτίδες τυριού mozzarella κατά τη συντήρησή τους υπό κενό στους 7°C.

Τέλος, η παρτίδα Β ήταν αυτή με τον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό ΟΜΧ (7.0 ± 0.3 log CFU/cm^2) και τον υψηλότερο αρχικό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων (5.0 ± 0.3 log CFU/cm^2), η οποία λόγω του χαμηλότερου αρχικού πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηριών (1,8 ± 0.5 log CFU/cm^2), οδήγησε σε μία μέτρια (μεταξύ των παρτίδων) ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού. Το έλλειμα που υπάρχει στην αρχικά μεταξύ της ΟΜΧ και του πλυθησμού των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, οφείλεται στη ύπαρξη ψευδομονάδων στο τυρί, των οποίων έγινε ταυτοποίηση. Όλες οι παρτίδες ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης.

4.2.2.2 Camembert

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* στο camembert, αγοράστηκαν τρεις παρτίδες, από τις οποίες κάποιες διέφεραν ως προς την ημερομηνία παραγωγής και κάποιες είχαν κοινή ημερομηνία παραγωγής, αλλά αγοράστηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία του χρόνου συντήρησης του προϊόντος.

Η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού και στις τρεις παρτίδες του τυριού camembert είναι πανομοιότυπη, ανεξαρτήτως την διαφορετική ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών και μυκήτων, κατά τη συντήρησή του στους 7°C. Από το Γράφημα 6 και τα διαγράμματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Α: 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Β: 2.2 ± 0.2 log CFU/cm^2, Γ: 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2) και των ζυμών και μυκήτων (Α: 3.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Β: 1.2 ± 0.3 log CFU/cm^2, Γ: 3.0 ± 0.0 log CFU/cm^2), λαμβάνοντας υπόψιν και την καμπύλη της ΟΜΧ, φαίνεται ότι το τυρί camembert έχει χαμηλή αρχική ενδογενή μικροχλωρίδα χλωρίδα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα ο παθογόνος να αναπτύσσεται και να γίνεται η κυρίαρχη μικροχλωρίδα του τυριού και για τις τρεις παρτίδες (πανομοιότυπες καμπύλες της ΟΜΧ με αυτές του *L. monocytogenes*). Όλες οι παρτίδες ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης.



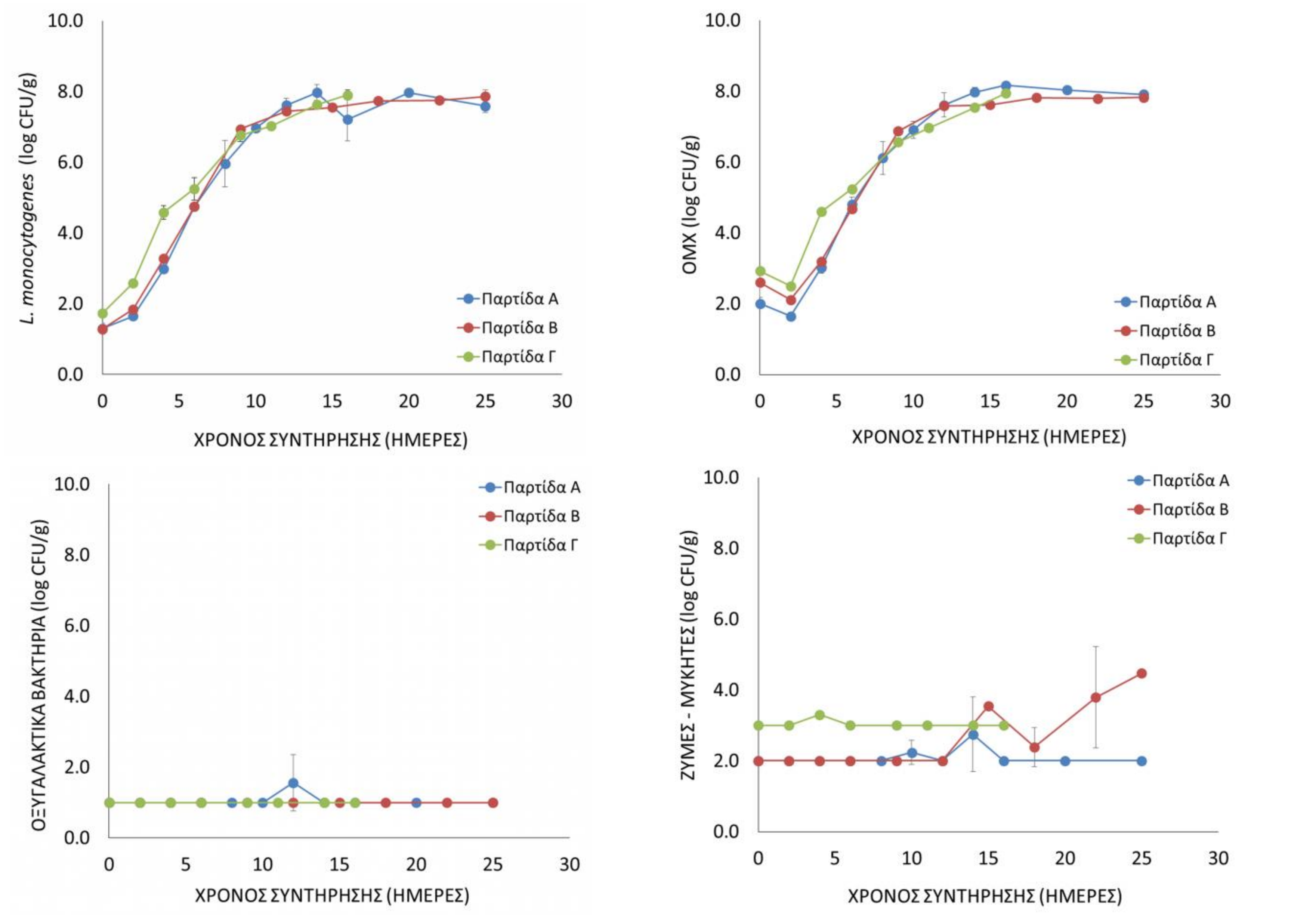
Γράφημα 6: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών και μυκήτων, σε τρεις διαφορετικές παρτίδες τυριού camembert κατά τη συντήρησή τους υπό κενό στους 7°C.

4.2.3 Τυριά χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή

4.2.3.1 Mascarpone

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* στο mascarpone, αγοράστηκαν τρεις παρτίδες, από τις οποίες κάποιες διέφεραν ως προς την ημερομηνία παραγωγής και κάποιες είχαν κοινή ημερομηνία παραγωγής, αλλά αγοράστηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία του χρόνου συντήρησης του προϊόντος.

Η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και στις τρεις παρτίδες του τυριού mascarpone είναι πανομοιότυπη, λόγω του πολύ χαμηλού αρχικού πληθυσμού της ενδογενούς μικροχλωρίδας του. Από το Γράφημα 7 και τα διαγράμματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Α: 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Β: 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Γ: 1.0 ± 0.0 log CFU/cm^2) και των ζυμών και μυκήτων (Α: 2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Β: 2.0 ± 0.0 log CFU/cm^2, Γ: 3.0 ± 0.0 log CFU/cm^2), λαμβάνοντας υπόψιν και την καμπύλη της ΟΜΧ, φαίνεται ότι το τυρί mascarpone έχει χαμηλή αρχική ενδογενή μικροχλωρίδα χλωρίδα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα ο παθογόνος να αναπτύσσεται και να γίνεται η κυρίαρχη μικροχλωρίδα του τυριού και για τις τρεις παρτίδες (πανομοιότυπες καμπύλες της ΟΜΧ με αυτές του *L. monocytogenes*. Όλες οι παρτίδες ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία εντεροβακτηρίων την μηδενική ημέρα αλλά και για πιθανό δυναμικό αύξησης κατά την διάρκεια της συντήρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 CFU/cm^2) καθ’ όλη την διάρκεια της συντήρησης.



<u>Γράφημα 7:</u> Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών – μυκήτων σε δυο διαφορετικές παρτίδες τυριού mascarpone, κατά τη συντήρησή τους, υπό αερόβιες συνθήκες στους 7^{o}C.

4.3 Έκθεση διαφορετικών κατηγοριών τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό

Η πρώτη άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού έναντι στους παθογόνους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν το εντερικό επιθήλιο είναι το χαμηλό pH των γαστρικών εκκρίσεων. Ανάλογα με την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει κάθε παθογόνος μικροοργανισμός στο χαμηλό pH του στομάχου ορίζεται και η προσλαμβανόμενη, μέσω του στόματος, μολυσματική του δόση (Peterson et al., 1989; Waterman and Small, 1998). Αν ένας παθογόνος μικροοργανισμός, όπως ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* καταφέρει να επιζήσει στο εξαιρετικά όξινο και θανατηφόρο περιβάλλον του στομάχου, τότε αυξάνεται η πιθανότητα τόσο να αποικίσει στο έντερο όσο και να εκδηλώσει την παθογόνο δράση του και να προκαλέσει λοίμωξη. Σημαντικό είναι ωστόσο να αναφερθεί πως το pH του στομάχου διαμορφώνεται και ανάλογα με την τροφή που έχει καταναλωθεί πριν την κατανάλωση του επιμολυσμένου τροφίμου. Κάτω από συνθήκες νηστείας, το pH του γαστρικού υγρού ενός υγιή ενήλικα είναι γύρω στο 2.00. Η πέψη ωστόσο ενός γεύματος δυτικής διατροφής αυξάνει το pH περίπου στο 6. Η μείωση της οξύτητας του γαστρικού υγρού έχει συνδεθεί με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών και με μείωση της μολυσματικής τους δόσης (Waterman and Small, 1998).

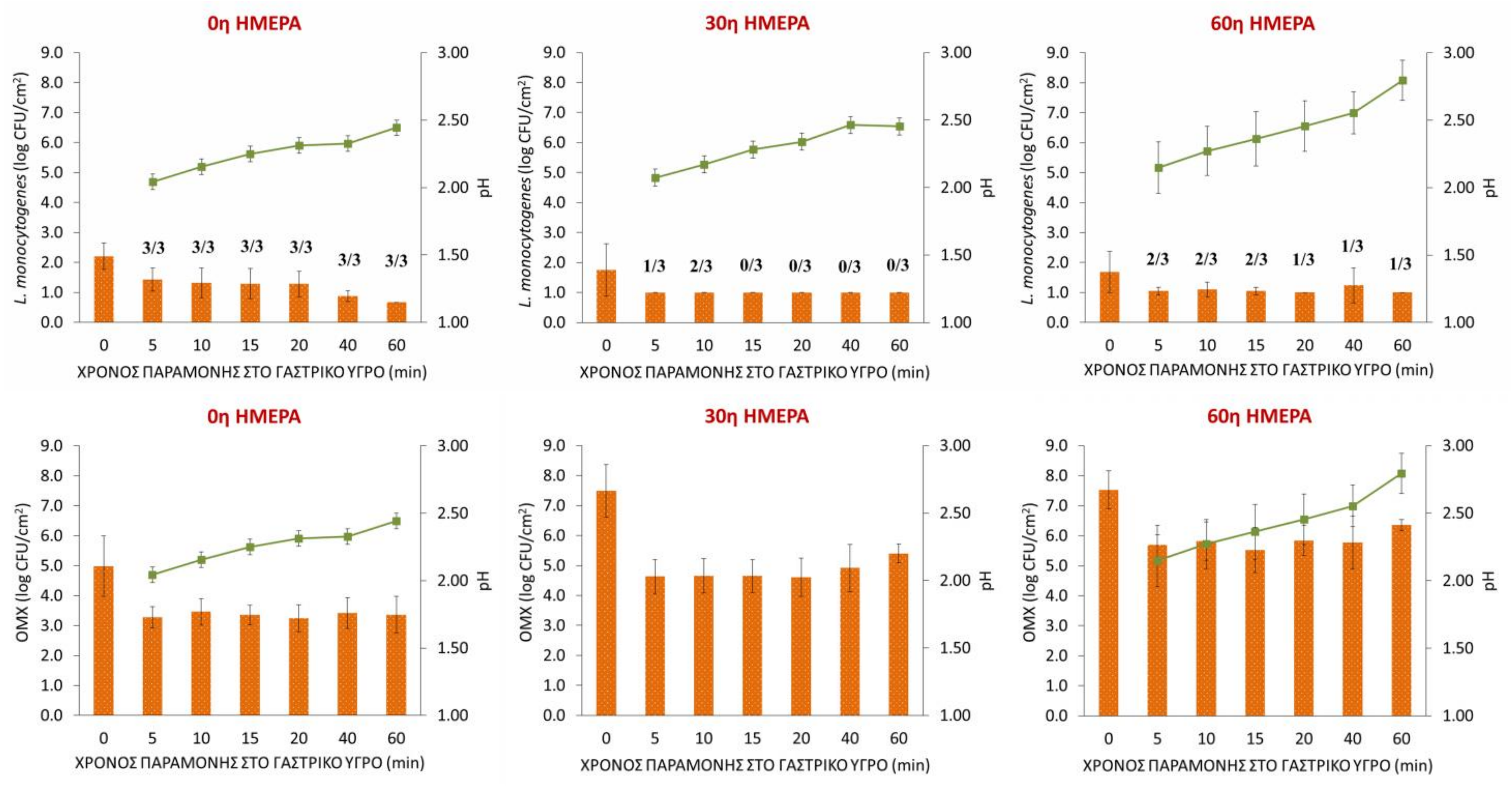
Για την εκτίμηση της επίδρασης της διάρκειας συντήρησης στη μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* έγινε έκθεση των τυριών σε συνθετικό γαστρικό υγρό. Επιλέχθηκαν 2 τυριά με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων στόχων της μελέτης, ένα που υποστήριξε επιβίωση και ένα που υποστήριξε ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού για κάθε κατηγορία τυριού (ημίσκληρα, μαλακά και τυρια χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή). Από την κατηγορία των ημίσκληρων τυριών επιλέχθηκαν τα gouda (επιβίωση) και χαλούμι (ανάπτυξη), από την κατηγορία των μαλακών επιλέχθηκαν τα μαστέλο (επιβίωση) και camembert (ανάπτυξη) και τέλος από την κατηγορία των τυριών αλοιφώδους υφής επιλέχθηκαν τα cottage (επιβίωση) και mascarpone (ανάπτυξη). Η έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό για τα τυριά που υποστηρίζουν επιβίωση του παθογόνου έγινε με βάση την καμπύλη της ΟΜΧ, στην αρχή, τη μέση και το τέλος του χρόνου ζωής του προϊόντος. Αντίθετα, για τα τυριά που υποστηρίζουν ανάπτυξη του παθογόνου, η έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό έγινε με βάση την καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού. Τη 0η μέρα όπου τα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονταν στην φάση προσαρμογής, στη μέση του χρόνου συντήρησης, όπου τα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονταν στην εκθετική φάση και στο τέλος του χρόνου συντήρησης όπου τα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονταν στην στατική φάση.

4.3.1 Ημίσκληρα τυριά

4.3.1.1 Gouda (υποστηρίζει επιβίωση παθογόνου)

Από το Γράφημα 8, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την 0^{η} ημέρα συντήρησής στο τυρί gouda, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 2.2 ± 0.4 log CFU/cm^2, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 40 min. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου στα 60 min της έκθεσης και στα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), όπου εκεί ο αρχικός πληθυσμός είναι υψηλότερος (5.0 ± 1.0 log CFU/cm^2), καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (3.4 ± 0.2 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ’ όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 8, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 0^{η} ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών χρόνου έκθεσης (pH 2.04) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.44). Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την 0^{η} ημέρα συντήρησης, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH κατά τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και το τέλος της έκθεσης (60 λεπτά).

Κατά την 30^{η} ημέρα συντήρησης του τυριού gouda, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 8, υπάρχει διαφορετική συμπεριφορά του παθογόνου. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 1.7 ± 0.9 log CFU/cm^2 την 0^{η} στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, δεν καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μετά από τα 5 λεπτά και μέχρι το τέλος της έκθεσής του (60 λεπτά). Επιπλέον,



<u>Γράφημα 8:</u> Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού gouda σε γαστρικό υγρό τη $0^{η}$, $30^{η}$ και $60^{η}$ ημέρα συντήρησής του υπό κενό στους 7^{o}C (1 log CFU/cm^{2} το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

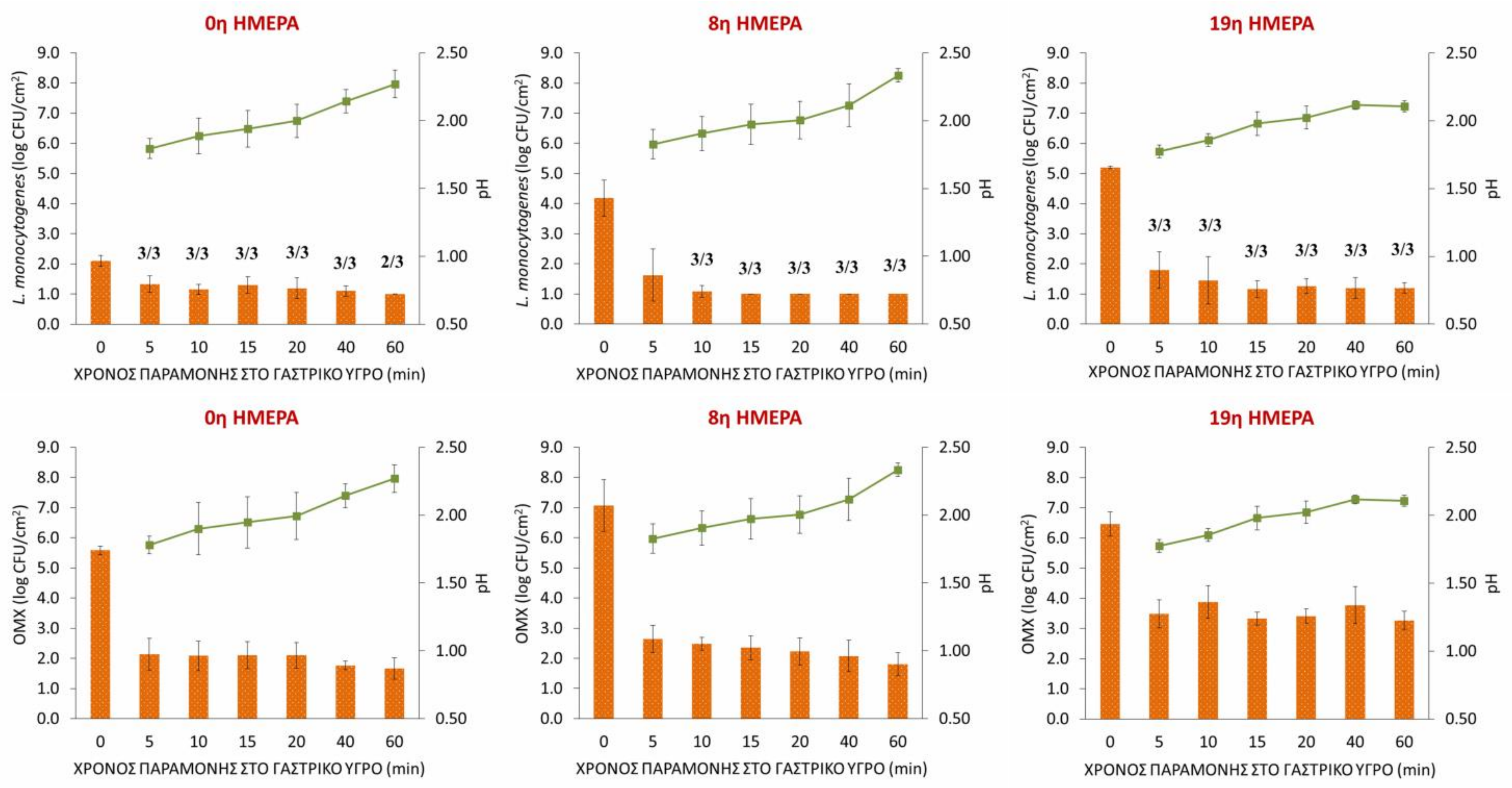
με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι και τα 10 λεπτά της έκθεσης, σε 2 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^η$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (7.5 ± 0.9 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (4.8 ± 0.6 log CFU/cm^2), καθ’ όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 8, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $30^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 2.07) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.45). Στο συγκεκριμένο τυρί ο παθογόνος μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώσει, αλλά όχι να αναπτυχθεί, λόγω των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να βρίσκεται συνεχώς σε ανταγωνισμό με την κυρίαρχη μικροχλωρίδα, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο σε ένα δεύτερο stress, όπως είναι το χαμηλό pH του γαστρικού υγρού.

Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού gouda ($58^η$ ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 8, υπάρχει ελαφρώς παρόμοια συμπεριφορά του παθογόνου με αυτή της 0ης ημέρας. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 1.7 ± 0.7 log CFU/cm^2 την $0^η$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 40 λεπτά. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου στα 60 λεπτά της έκθεσης, σε 1 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^η$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (7.5 ± 0.6 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (5.8 ± 0.6 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ’ όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 8, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $60^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 2.15) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.80). Η λίγο πιο αυξημένη επιβίωση που παρουσιάζει το παθογόνο την $60^η$ ημέρα σε σχέση με την $30^η$ κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο γαστρικό υγρό, μπορεί να οφείλεται είτε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ενάντια στις καταπονήσεις (ανταγωνισμός με την ενδογενή μικροχλωρίδα), είτε στην προσαρμογή στο όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής), λόγω του παρατεταμένου χρόνου συντήρησης, γεγονός που μπορεί να τον προστατεύσει σε μετέπειτα στρεσογόνες καταστάσεις (χαμηλό pH στομάχου).

4.3.1.2 Χαλούμι (υποστηρίζει ανάπτυξη παθογόνου)

Από το Γράφημα 9, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την $0^η$ ημέρα συντήρησής του τυριού χαλούμι, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού και συσκευασίας του, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 2.1 ± 0.2 log CFU/cm^2, κατάφερε να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι και τα 40 λεπτά μετά την έκθεσή του στο γαστρικό υγρό. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου στα 60 λεπτά της έκθεσης, σε 2 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), ο αρχικός πληθυσμός είναι υψηλότερος (5.6 ± 0.1 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (2.0 ± 0,3 log CFU/cm^2), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ’ όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 9, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $0^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.80) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.27). Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την $0^η$ ημέρα συντήρησής, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH κατά τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και το τέλος της έκθεσης (60 λεπτά).

Κατά την $8^η$ ημέρα συντήρησης του τυριού χαλούμι, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 9, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας υψηλότερο αρχικό πληθυσμό την $0^η$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό (4.2 ± 0.6 log CFU/cm^2), από τη 0η μέρα συντήρησης, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 10 λεπτά. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό που γίνεται κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι και το τέλος της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά), σε 2 από τα 3



Γράφημα 9: Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού χαλούμι σε γαστρικό υγρό τη $0^{η}$, $8^{η}$ και $19^{η}$ ημέρα συντήρησής του υπό κενό στους $7^{o}C$ (1 log CFU/cm^2 το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^{η}$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (7.1 ± 0.9 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (2.3 ± 0.5 log CFU/cm^2), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 9, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $8^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.83) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.12). Την $8^{η}$ ημέρα συντήρησης μπορεί ο παθογόνος μικροοργανισμός να βρίσκεται στην αυξητική του φάση αλλά φαίνεται ότι η παραμονή του στο υποθανάτιο pH του τυριού προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής) με αποτέλεσμα την ανίχνευσή του έως και το τέλος της έκθεσης στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά).

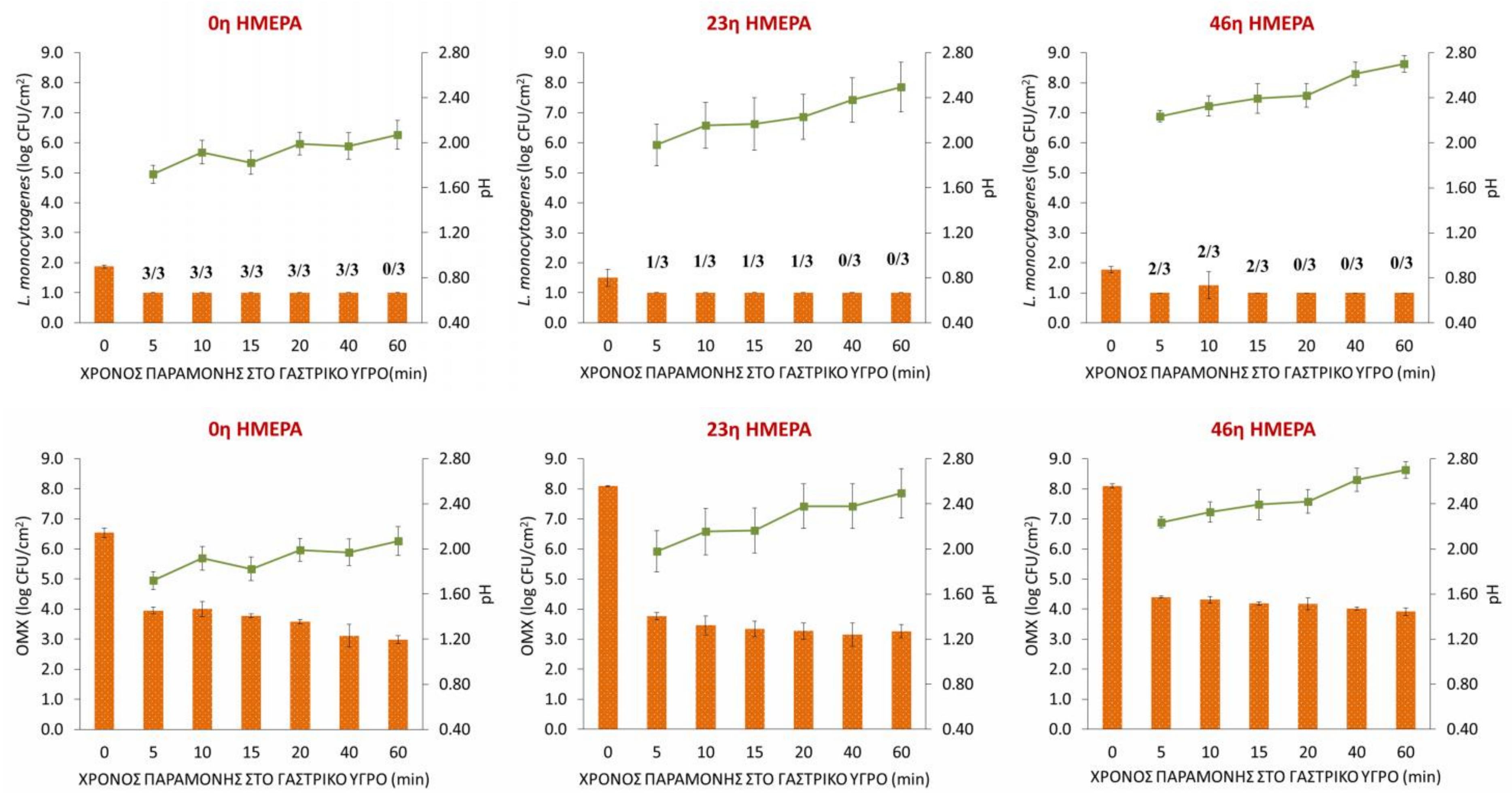
Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού ($19^{η}$ ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 9, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 5.2 ± 0.0 log CFU/cm^2 την $0^{η}$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς, πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, μέχρι και το τέλος της έκθεσης των δειγμάτων στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά). Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^{η}$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (6.5 ± 0.4 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (3.5 ± 0.4 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 9, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $19^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.77) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.11). Τη $19^{η}$ ημέρα συντήρησης του τυριού ο παθογόνος βρίσκεται ήδη στην στατική φάση του αυξητικού του κύκλου με τον πληθυσμό του να βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο (5.2 ± 0.0 log CFU/cm^2). Όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Driscoll et al. 1996, Stopforth et al. 2005) όταν ο πληθυσμός του παθογόνου βρίσκεται στην στατική του φάση, λόγω ανάπτυξης μεγάλου πληθυσμού και ανταγωνισμού μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων για κατανάλωση "τροφής", ο μικροοργανισμός εκφράζει γονίδια που τον καθιστούν πιο ανθεκτικό στις καταπονήσεις και τον προστατεύουν από στρεσογόνες καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα δαπανά όλη του την ενέργεια για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών με στόχο μόνο την επιβίωσή του. Επιπλέον, η παρατεταμένη συντήρηση/παραμονή στο υποθανάτιο pH του τυριού φαίνεται να προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής). Συμπερασματικά, οι παραπάνω ισχυρισμοί δικαιολογούν την ανίχνευση του παθογόνου έως και το τέλος της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά).

4.3.2 Μαλακά τυριά

4.3.2.1 Μαστέλο® (υποστηρίζει επιβίωση παθογόνου)

Από το Γράφημα 10, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την $0^η$ ημέρα συντήρησής του τυριού μαστέλο®, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού και συσκευασίας του, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1.9 ± 0.4 log CFU/cm^2, δεν κατάφερε να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι και το τέλος της έκθεσής του σε συνθετικό γαστρικό υγρό (60 λεπτά). Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και τα 40 λεπτά της έκθεσης και στα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), όπου εκεί ο αρχικός πληθυσμός είναι υψηλότερος (6.5 ± 0.2 log CFU/cm^2), καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (3.6 ± 0.5 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ’ όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 10, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $0^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.72) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.07). Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την $0^η$ ημέρα συντήρησής, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH κατά τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και τα 40 λεπτά.

Κατά την $23^η$ ημέρα συντήρησης του τυριού μαστέλο®, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 10, υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά του παθογόνου με εκείνη της



<u>Γράφημα 10:</u> Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού μαστέλο® σε γαστρικό υγρό τη $0^{η}$, $23^{η}$ και $46^{η}$ ημέρα συντήρησής του, υπό κενό, στους 7^{o}C (1 log CFU/cm^2 το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

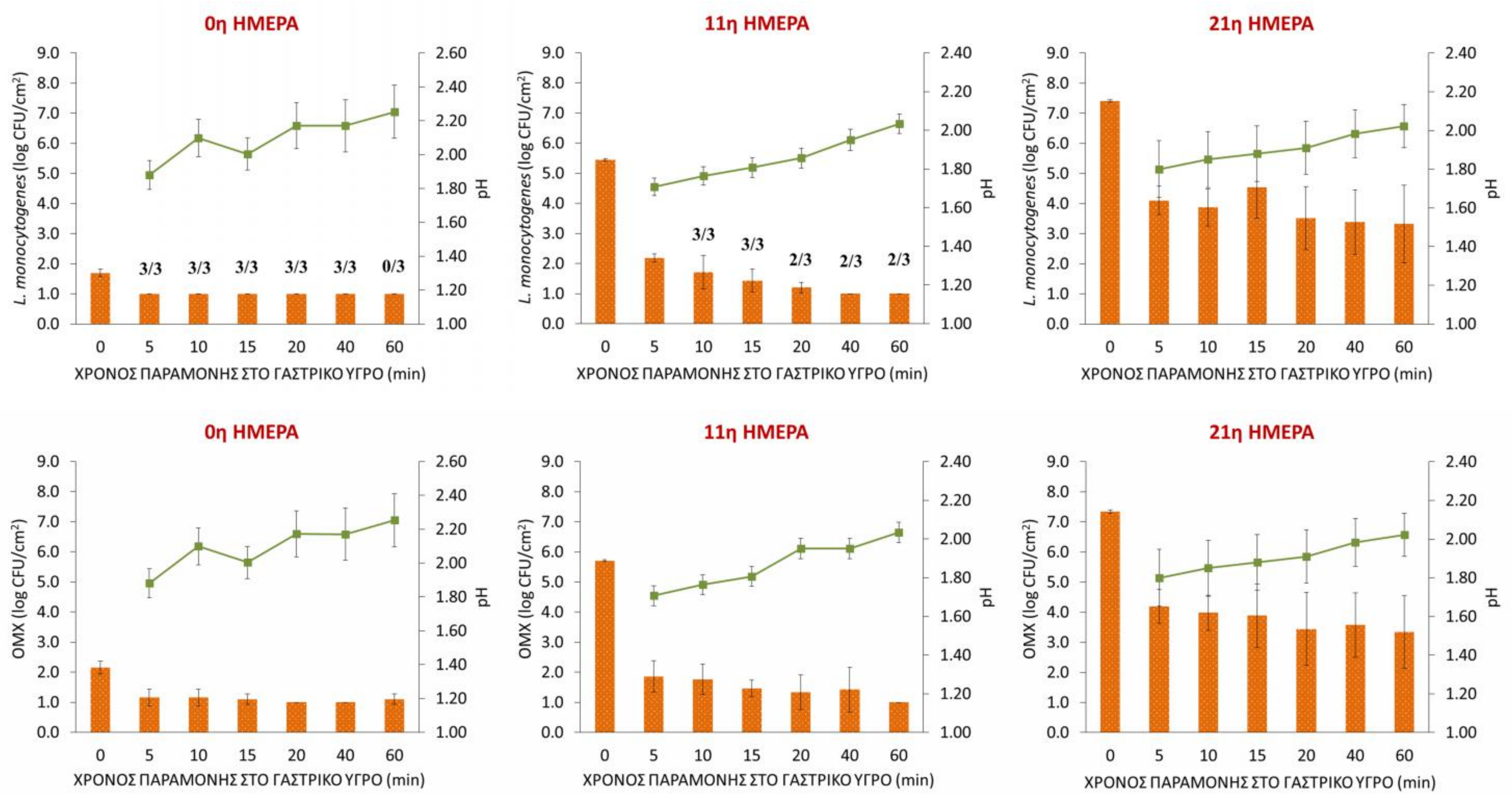
$0^{ης}$ ημέρας. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 1.5 ± 0.3 log CFU/cm^2 την $0^η$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, δεν καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μετά από τα 5 λεπτά μέχρι το τέλος, της έκθεσής του (60 λεπτά). Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό που γίνεται κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι και τα 20 λεπτά της έκθεσης, σε 1 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^η$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (8.1 ± 0.0 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (3.4 ± 0.4 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 10, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $23^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ της των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.98) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.50). Στο συγκεκριμένο τυρί ο παθογόνος μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώσει, αλλά όχι να αναπτυχθεί, λόγω της ανταγωνιστική μικροχλωρίδας του τυριού. Βρίσκεται συνεχώς σε ανταγωνισμό, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο σε ένα δεύτερο stress, όπως είναι το χαμηλό pH του γαστρικού υγρού και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανιχνεύεται έως τα 20 λεπτά ($23^η$ ημέρα συντήρησης) σε αντίθεση με τη $0^η$ ημέρα συντήρησης (ανίχνευση έως τα 40 λεπτά).

Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού ($46^η$ ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 10, υπάρχει ελαφρώς παρόμοια συμπεριφορά του παθογόνου με αυτή της των προηγούμενων σημείων έκθεσης σε γαστρικό υγρό. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 1.8 ± 0.1 log CFU/cm^2 την $0^η$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, δεν καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 60 λεπτά, με μόνη εξαίρεση τα 10 λεπτά όπου έχουμε καταμέτρηση πληθυσμού λίγο πάνω από το όριο ανίχνευσης. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και τα 15 λεπτά της έκθεσης σε 2 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^η$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι υψηλότερος (8.1 ± 0.1 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (4.2 ± 0.3 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 10, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 60^η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 2.24) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.70). Ο υψηλός πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας του μαστέλο, συνεχίζει να δημιουργεί στρεσογόνο περιβάλλον για τον παθογόνο, ο οποίος κατά τη διάρκεια της συντήρησης γίνεται όλο και πιο ευαίσθητος στην όξινη καταπόνηση (ανίχνευσή του έως τα 15 λεπτά έκθεσης).

4.3.2.2 Camembert (υποστηρίζει ανάπτυξη παθογόνου)

Από το Γράφημα 11, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την 0^η ημέρα συντήρησής του τυριού camembert, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού και συσκευασίας του, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1.7 ± 0.1 log CFU/cm^2, δεν κατάφερε να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου από τα 5 πρώτα λεπτά της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό. Αντίθετα, με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιήθηκε κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και τα 40 λεπτά της έκθεσης, σε 3 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), ο αρχικός πληθυσμός είναι περίπου στα ίδια επίπεδα με τον παθογόνο (2.2 ± 0.2 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (1.2 ± 0.3 log CFUcfu/cm^2 έως 1.1 ± 0.1 log CFUcfu/cm^2), καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 11 φαίνεται, επίσης, η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 0^η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.88) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.25). Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την 0^η ημέρα συντήρησής, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH κατά τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και τα πρώτα 40 λεπτά της έκθεσής του.

Κατά την 11^η ημέρα συντήρησης του camembert, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 11, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*,



<u>Γράφημα 11:</u> Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού camembert σε γαστρικό υγρό τη $0^{η}$, $11^{η}$ και $21^{η}$ ημέρα συντήρησής του, υπό κενό, στους $7^{o}C$ (1 log CFU/cm^2 το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

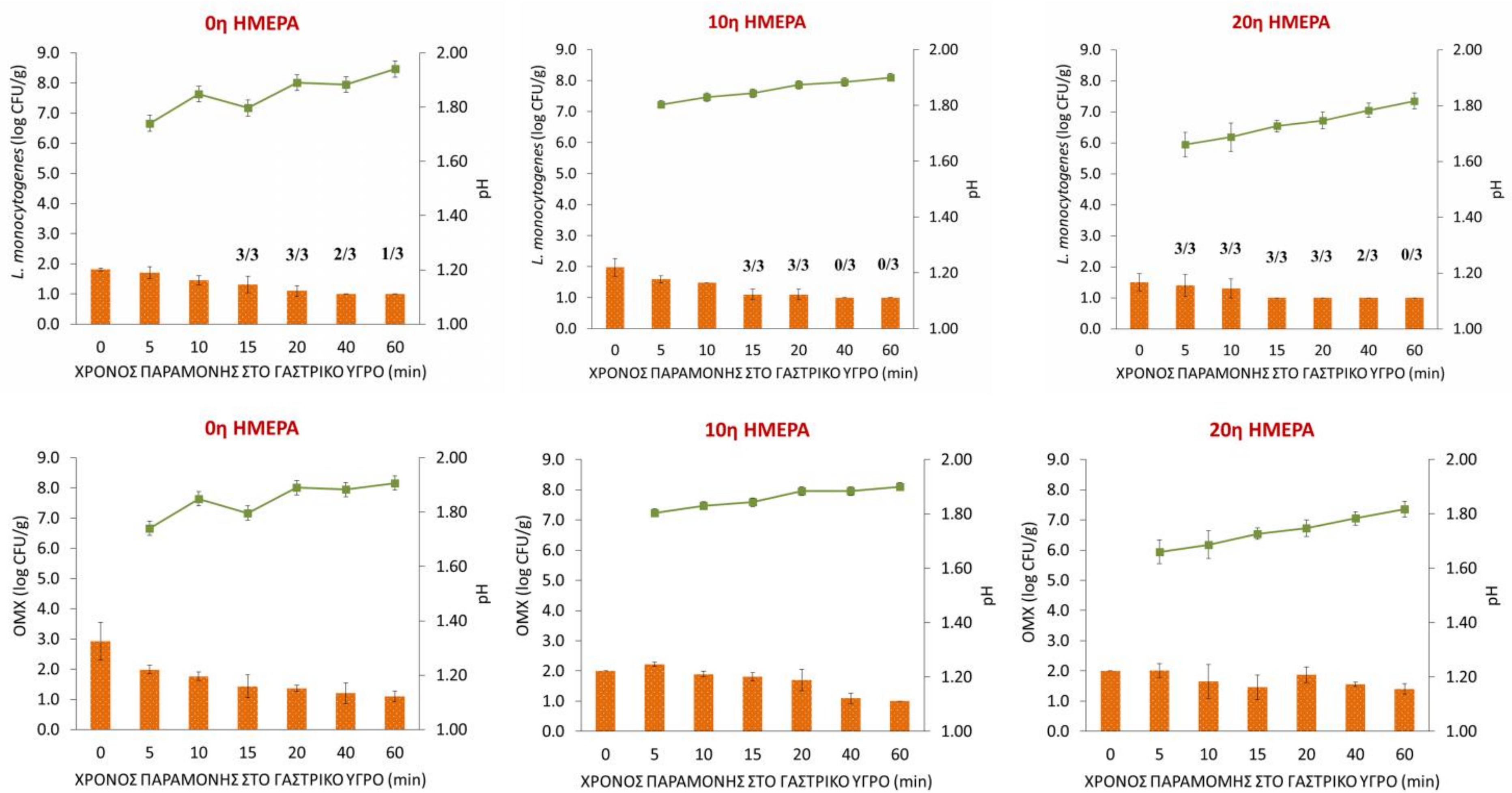
έχοντας υψηλότερο αρχικό πληθυσμό την 0η στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό (5.4 ± 0.0 log CFU/cm^2), από τη 0η μέρα συντήρησης, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 20 λεπτά έκθεσης. Επιπλέον, με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιείται κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι και το τέλος της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά), σε 2 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη 0η στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι περίπου στα ίδια επίπεδα με τον παθογόνο (5.7 ± 0.0 log cfu/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (1.5 ± 0.5 log cfu/cm^2), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης έως και τα 40 πρώτα λεπτά της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 11, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 11η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.80) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.03). Την 11η μέρα συντήρησης ο παθογόνος μικροοργανισμός βρίσκεται στην αυξητική του φάση και δαπανά την περισσότερη ενέργεια για την ανάπτυξη του, μη αναπτύσσοντας μηχανισμούς επιβίωσης. Παρόλα αυτά, η παραμονή του στο υποθανάτιο pH του τυριού φαίνεται να προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής) με αποτέλεσμα την ανίχνευσή του έως και το τέλος της έκθεσης στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά).

Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού (21η ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 11, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 7.4 ± 0.0 log CFU/cm^2 την 0η στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου έως και το τέλος της έκθεσης των δειγμάτων στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά) (3.3 ± 1.3 log CFU/cm^2). Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη 0η στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι παρόμοιος με αυτόν του παθογόνου (7.3 ± 0.1 log CFU/cm^2) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (3.7 ± 0.5 log CFU/cm^2), αλλά πολύ πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 11, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 21η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.80) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 2.02). Τη 21η ημέρα συντήρησης του τυριού ο παθογόνος βρίσκεται ήδη στην στατική φάση του αυξητικού του κύκλου, με τον πληθυσμό του να βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο (7.3 ± 0.0 log CFU/cm^2). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Παράγραφος 4.3.1.2) όταν ο πληθυσμός του παθογόνου βρίσκεται στην στατική του φάση εκφράζει γονίδια που τον καθιστούν πιο ανθεκτικό στις καταπονήσεις και τον προστατεύουν από στρεσογόνες καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, δαπανά όλη του την ενέργεια για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών με στόχο μόνο την επιβίωσή του. Επιπλέον, η παρατεταμένη συντήρηση/παραμονή στο υποθανάτιο pH του τυριού φαίνεται να προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής). Συμπερασματικά, οι παραπάνω ισχυρισμοί δικαιολογούν την καταμέτρηση του παθογόνου έως και το τέλος της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά).

4.3.3 Τυριά χωρίς ωρίμανση, με αλοιφώδη υφή

4.3.3.1 Cottage (υποστηρίζει επιβίωση παθογόνου)

Από το Γράφημα 12, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την 0^η ημέρα συντήρησής του τυριού cottage, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού και συσκευασίας του, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1.8 ± 0.0 log CFU/g, κατάφερε να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι και τα 20 λεπτά μετά την έκθεσή του στο γαστρικό υγρό. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και τα 60 λεπτά της έκθεσης, σε 1 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), όπου εκεί ο αρχικός πληθυσμός είναι λίγο υψηλότερος (2.9 ± 0.6 log CFU/g), καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό που μειώνεται συναρτήσει του χρόνου έκθεσης, πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό, φτάνοντας στο τέλος τα 1.1 ± 0.2 log CFU/g (60 λεπτά). Στο Γράφημα 12, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 0^η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.74) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 1.97). Συγκεκριμένα, μεταβολή παρατηρείται από πρώτα 5 λεπτά της έκθεσης, με το pH να μην



Γράφημα 12: Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού cottage σε γαστρικό υγρό τη 0η, 10η και 20η ημέρα συντήρησής του, υπό κενό, στους 7°C (1 log CFU/g το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

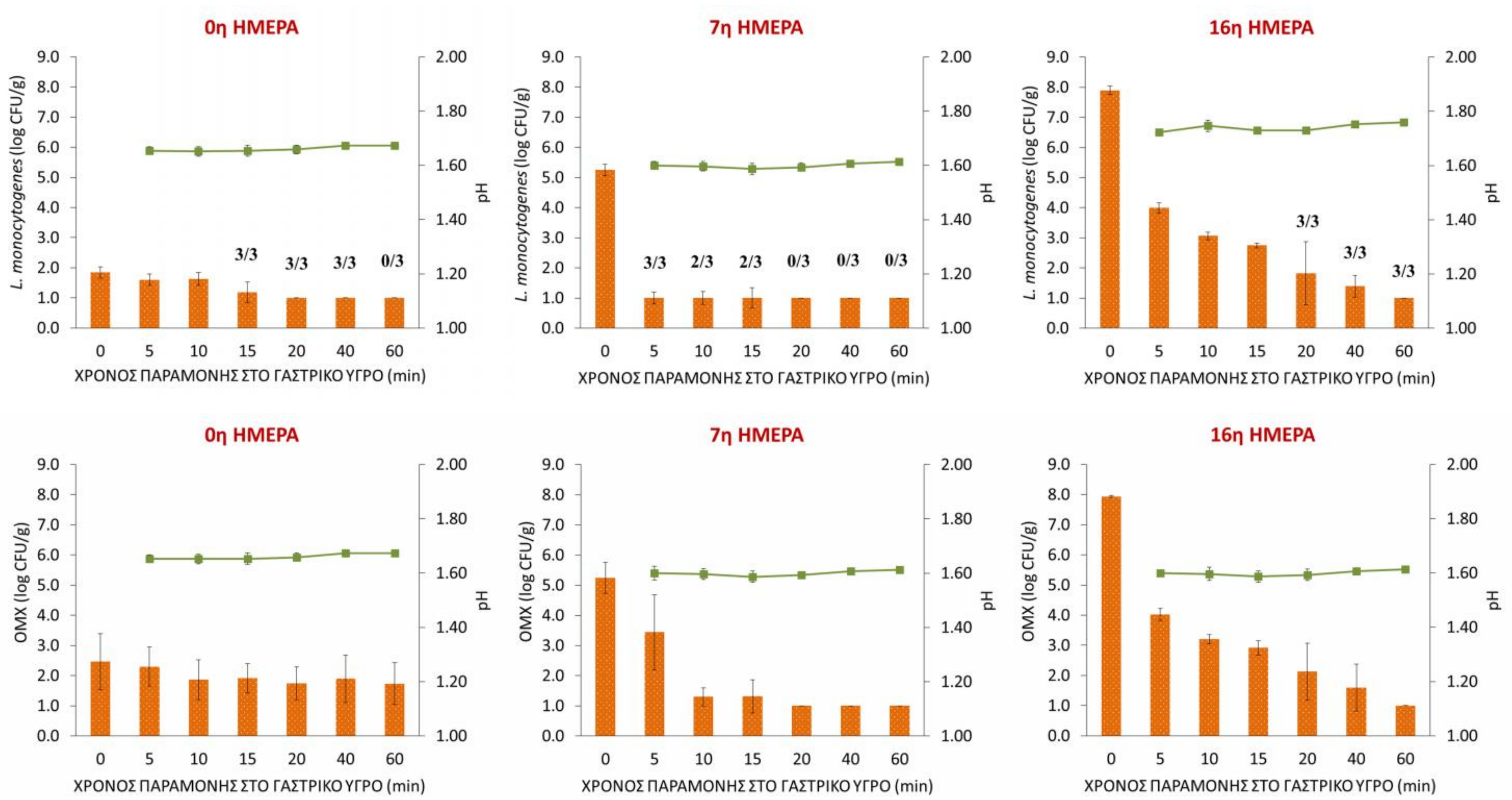
διαφοροποιείται ιδιαίτερα και να διατηρεί σχετικά χαμηλές τιμές. Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την 0η ημέρα συντήρησής, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH κατά τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και το τέλος της έκθεσης (60 λεπτά).

Κατά την 10η ημέρα συντήρησης του τυριού cottage, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 12, υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά του παθογόνου με εκείνη της 0ης ημέρας. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 2.0 ± 0.3 log CFU/g την 0η στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 20 λεπτά. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι και τα 20 λεπτά της έκθεσης, σε 3 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη 0η στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι σχετικά χαμηλός (2.0 ± 0.0 log CFU/g) και μειώνεται μετά την έκθεση του τυριού στο γαστρικό υγρό έως ότου μετά τα 40 λεπτά πέφτει κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Στο Γράφημα 12, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 10η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.80) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 1.90). Συγκεκριμένα, μεταβολή παρατηρείται από πρώτα 5 λεπτά της έκθεσης, με το pH να μην διαφοροποιείται ιδιαίτερα και να διατηρεί σχετικά χαμηλές τιμές. Στο συγκεκριμένο τυρί ο παθογόνος μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώσει, αλλά όχι να αναπτυχθεί, λόγω του χαμηλού του pH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να βρίσκεται συνεχώς σε μια στρεσογόνο κατάσταση, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο σε ένα δεύτερο stress, όπως είναι το χαμηλό pH του γαστρικού υγρού.

Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού (20η ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 12, υπάρχει ελαφρώς παρόμοια συμπεριφορά του παθογόνου με αυτή των προηγούμενων σημείων έκθεσης σε γαστρικό υγρό. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 1.5 ± 0.3 log CFU/g την 0η στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μέχρι τα 10 λεπτά έκθεσης. Επιπλέον, με τον πραγματοποιούμενο εμπλουτισμό κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και τα 40 λεπτά της έκθεσης, σε 2 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^{η}$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι ελαφρώς υψηλότερος (2.0 ± 0.0 log CFU/g) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό ελάχιστα μειωμένο (1.7 ± 0.3 log CFU/g), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 12, φαίνεται η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $20^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.66) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 1.82). Στο τυρί cottage ο παθογόνος μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώσει, αλλά όχι να αναπτυχθεί, λόγω του χαμηλού του pH. Η λίγο πιο αυξημένη επιβίωση που παρουσιάζει το παθογόνο την $20^{η}$ ημέρα σε σχέση με την $10^{η}$ κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο γαστρικό υγρό, μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ενάντια στην όξινη καταπόνηση, λόγω του παρατεταμένου χρόνου συντήρησης, γεγονός που μπορεί να τον κάνει λίγο πιο ανθεκτικό σε μια επόμενη στρεσογόνο κατάσταση (χαμηλό pH στομάχου) (απόκριση όξινης αντοχής).

4.3.3.2 Mascarpone (υποστηρίζει ανάπτυξη παθογόνου)

Από το Γράφημα 13, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* την $0^{η}$ ημέρα συντήρησής του τυριού mascarpone, δηλαδή την ημέρα εμβολιασμού και συσκευασίας του, έχοντας αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1.8 ± 0.2 log CFU/g, κατάφερε να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης έως και τα 15 πρώτα λεπτά της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό. Αντίθετα, με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιήθηκε κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου από τα 20 έως και τα 40 λεπτά της έκθεσης, σε 3 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), ο αρχικός πληθυσμός είναι ελαφρώς υψηλότερος από τον πληθυσμό του παθογόνου (2.5 ± 0.9 log CFU/g) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό ελαφρά μειωμένο (1.9 ± 0.4 log cfu/g), πάνω από το όριο ανίχνευσης καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης



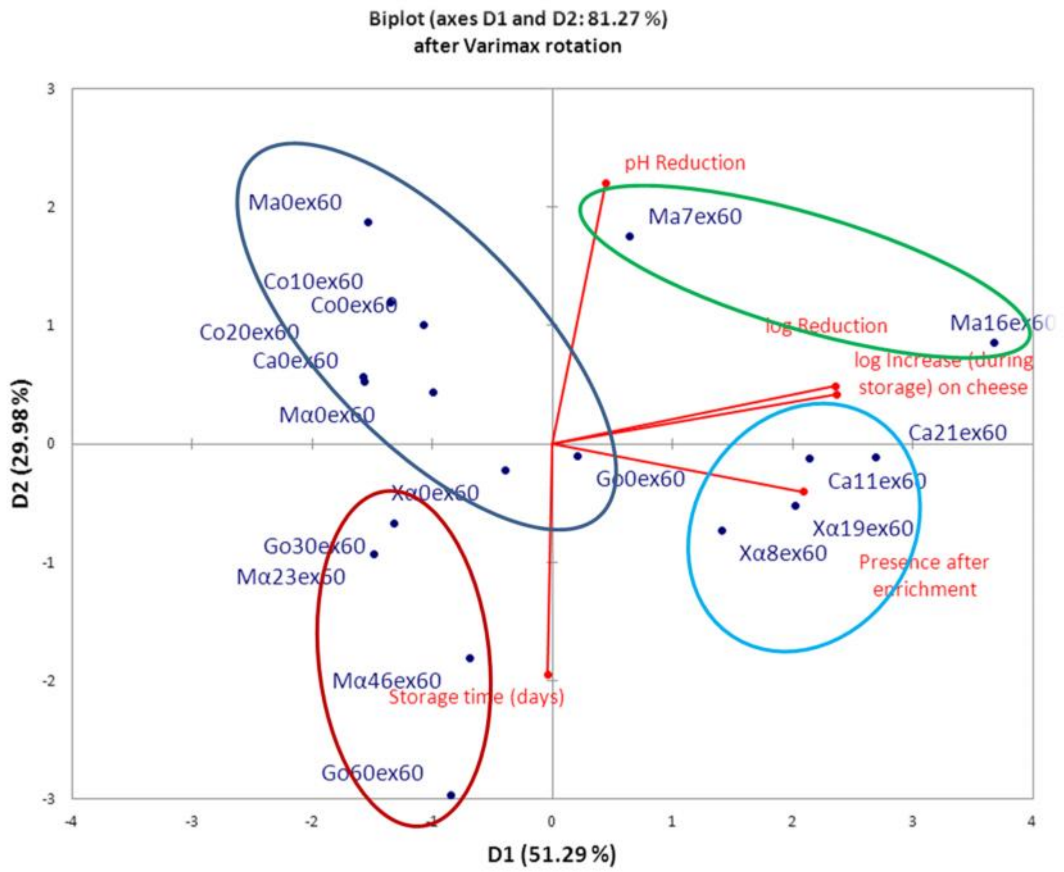
<u>Γράφημα 13:</u> Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης του *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, μετά από έκθεση επιμολυσμένου τυριού mascarpone σε γαστρικό υγρό τη $0^{η}$, $7^{η}$ και $16^{η}$ ημέρα συντήρησής του, υπό κενό, στους $7^{o}C$ (1 log CFU/g το όριο ανίχνευσης της μεθόδου).

του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 13 φαίνεται, επίσης, η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 0η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.65) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 1.67). Συγκεκριμένα, η μεταβολή του pH που παρατηρείται από τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσης είναι πολύ μικρή και δεν διαφοροποιείται έως και το τέλος της έκθεσης. Παρόλο, που ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση προσαρμογής στο προϊόν την 0η ημέρα συντήρησής, πράγμα που τον καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH του γαστρικού υγρού δεν είναι ικανό να τον θανατώσει, αφού γίνεται ανίχνευσή του έως και τα πρώτα 40 λεπτά της έκθεσής του.

Κατά την 7η ημέρα συντήρησης του τυριού mascarpone, όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 13, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας υψηλότερο αρχικό πληθυσμό την 0η στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό (5.3 ± 0.3 log CFU/g), από τη 0η μέρα συντήρησης, δεν καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου από τα πρώτα 5 λεπτά έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Αντίθετα, με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιείται κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου, μέχρι τα 15 λεπτά, σε 2 από τα 3 δείγματα που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη 0η στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι στα ίδια επίπεδα με τον παθογόνο (5.2 ± 0.5 log CFU/g) και καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (1.3 ± 0.6 log CFU/g), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης έως και τα 15 λεπτά της έκθεσης του τυριού στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 13 φαίνεται, επίσης, η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη 0η ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.60) και των 60 min μετά την έκθεση (pH 1.61). Συγκεκριμένα, η μεταβολή του pH που παρατηρείται από τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσης είναι πολύ μικρή και δεν διαφοροποιείται έως και το τέλος της έκθεσης. Την 7η μέρα συντήρησης ο παθογόνος μικροοργανισμός βρίσκεται στην αυξητική του φάση και δαπανά την περισσότερη ενέργεια για την ανάπτυξη του, μη αναπτύσσοντας μηχανισμούς επιβίωσης. Παρόλα αυτά, η παραμονή του στο υποθανάτιο pH του τυριού φαίνεται να προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής) με αποτέλεσμα την ανίχνευσή του έως και τα 15 πρώτα λεπτά της έκθεσης στο γαστρικό υγρό.

Φτάνοντας στο τέλος της συντήρησης του τυριού ($16^η$ ημέρα), όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 13, φαίνεται πως ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχοντας αρχικό πληθυσμό 7.9 ± 0.1 log CFU/g την $0^η$ στιγμή έκθεσης στο γαστρικό υγρό, καταφέρνει να επιβιώσει και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου έως και τα 40 λεπτά της έκθεσης των δειγμάτων στο γαστρικό υγρό. Επιπλέον, με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιείται κατά την δειγματοληψία, υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου μέχρι και το τέλος της έκθεσης (60 λεπτά), σε 3 από τα 3 δείγματα τυριού που αναλύθηκαν. Όσον αφορά τη συνολική ενδογενή μικροχλωρίδα του τυριού (ΟΜΧ), τη $0^η$ στιγμή έκθεσης ο πληθυσμός είναι ίδιος με αυτόν του παθογόνου (7.9 ± 0.0 log CFU/g) και παρουσιάζει και την ίδια εικόνα κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Αρχικά, καταφέρνει να επιβιώσει σε πληθυσμό μειωμένο (1.6 ± 0.8 log CFU/g), αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου έως τα 40 λεπτά της έκθεσης στο γαστρικό υγρό. Στο Γράφημα 13 φαίνεται, επίσης, η μεταβολή του pH του γαστρικού υγρού τη $0^η$ ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών έκθεσης (pH 1.72) και των 60 λεπτών μετά την έκθεση (pH 1.76). Συγκεκριμένα, η μεταβολή του pH που παρατηρείται από τα πρώτα 5 λεπτά της έκθεσης είναι πολύ μικρή και δεν διαφοροποιείται έως και το τέλος της έκθεσης. Τη $16^η$ ημέρα συντήρησης του τυριού ο παθογόνος βρίσκεται ήδη στην στατική φάση του αυξητικού του κύκλου, με τον πληθυσμό του να βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο (7.9 ± 0.1 log CFU/g). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Παράγραφος 4.3.1.2) όταν ο πληθυσμός του παθογόνου βρίσκεται στην στατική του φάση εκφράζει γονίδια που τον καθιστούν πιο ανθεκτικό στις καταπονήσεις και τον προστατεύουν από στρεσογόνες καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, δαπανά όλη του την ενέργεια για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών με στόχο μόνο την επιβίωσή του. Επιπλέον, η παρατεταμένη συντήρηση/παραμονή στο υποθανάτιο pH του τυριού φαίνεται να προκάλεσε την προσαρμογή του σε όξινο περιβάλλον (απόκριση όξινης αντοχής). Συμπερασματικά, οι παραπάνω ισχυρισμοί δικαιολογούν την καταμέτρηση του παθογόνου έως και τα 40 λεπτά, αλλά και την ανίχνευσή του έως το τέλος της έκθεσής του στο γαστρικό υγρό (60 λεπτά).

Στο Γράφημα 14, παρουσιάζεται μια PCA ανάλυση στην οποία ομαδοποιούνται τα σημεία έκθεσης των διαφορετικών τυριών με βάση τις διαφορές τους ως προς τις τέσσερις μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν από το πρόγραμμα ανάλυσης. Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η μεταβολή του pH (η διαφορά μεταξύ της τιμής pH μετά από έκθεση διάρκειας 60 λεπτών του δείγματος σε συνθετικό γαστρικό υγρό, με την τιμή pH του δείγματος αμέσως μετά την έκθεση του σε γαστρικό υγρό), η διάρκεια συντήρησης των τυριών, η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μετά από έκθεση σε γαστρικό υγρό του δείγματος τυριού για 60 λεπτά και το ποσοστό θετικών στον εμπλουτισμό (ομογενοποιημένων σε γαστρικό υγρό) δειγμάτων μετά από την έκθεση



Γράφημα 14: PCA biplot στο οποίο ομαδοποιούνται, τα τυριά τα οποία εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό, με βάση τη διαφορά τους ως προς τις μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν

σε γαστρικό υγρό για 60 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, το Γράφημα 14 χωρίζεται σε τέσσερα τεταρτημόρια, τα οποία συγκρίνονται μεταξύ τους ως προς τις διαφορετικές μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν. Τα δύο πάνω τεταρτημόρια περιλαμβάνουν τα σημεία έκθεσης των τυριών που προκάλεσαν χαμηλή μεταβολή του pH του συνθετικού γαστρικού υγρού, ενώ τα δυο κάτω τεταρτημόρια περιλαμβάνουν τα σημεία έκθεσης των τυριών που προκάλεσαν μεγάλη μεταβολή του pH του συνθετικού γαστρικού υγρού. Επιπλέον, τα δυο αριστερά τεταρτημόρια περιλαμβάνουν τα σημεία έκθεσης των τυριών όπου η αύξηση του παθογόνου κατά τη συντήρηση, η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μετά από έκθεση σε γαστρικό υγρό του δείγματος, για 60 λεπτά και το ποσοστό θετικών στον εμπλουτισμό (ομογενοποιημένων σε γαστρικό υγρό) δειγμάτων μετά από την έκθεση σε γαστρικό υγρό, για 60 λεπτά, ήταν χαμηλά, σε αντίθεση με τα δυο δεξιά τεταρτημόρια όπου οι αντίστοιχες μεταβλητές ήταν υψηλές. Οι ομάδες, σημείων έκθεσης των διαφορετικών τυριών, που δημιουργούνται κατά την PCA ανάλυση είναι τέσσερις. Η πρώτη ομάδα (Γράφημα 14 – μπλε κύκλος) περιλαμβάνει όλες τις $0^{ες}$ ημέρες έκθεσης, όλων των τυριών, καθώς επίσης και τη $10^{η}$ και $20^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού cottage. Όλα τα παραπάνω σημεία, παρουσίασαν χαμηλές τιμές όλων των μεταβλητών που μελετήθηκαν. Η δεύτερη ομάδα που σχηματίζεται (Γράφημα 14 – κόκκινος κύκλος), περιλαμβάνει την $23^{η}$ και $46^{η}$ ημέρα του μαστέλο® και την $30^{η}$ και $60^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού gouda. Τα παραπάνω σημεία παρουσίασαν υψηλή μεταβολή του pH του συνθετικού γαστρικού υγρού, ενώ παρουσίασαν χαμηλές τιμές των υπόλοιπων εξεταζόμενων μεταβλητών. Η τρίτη ομάδα που σχηματίζεται (Γράφημα 14 – πράσινος κύκλος) περιλαμβάνει την $7^{η}$ και $16^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού mascarpone, σημεία που παρουσίασαν χαμηλή μεταβολή του pH του συνθετικού γαστρικού υγρού, ενώ παρουσίασαν υψηλές τιμές των υπόλοιπων εξεταζόμενων μεταβλητών. Τέλος, η τέταρτη ομάδα που σχηματίζεται (Γράφημα 14 – γαλάζιος κύκλος) περιλαμβάνει την $11^{η}$ και $21^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού camembert και την $8^{η}$ και $19^{η}$ ημέρα έκθεσης του τυριού χαλούμι, σημεία που παρουσίασαν υψηλή τιμές όλων των μεταβλητών που μελετήθηκαν.

Ανακεφαλαιώνοντας, στα τυριά που υποστήριξαν επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (gouda, μαστέλο®, cottage) φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα του παθογόνου, στο χαμηλό pH του γαστρικού υγρού, αυξάνει όσο προχωράει η συντήρηση. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των τυριών (π.χ. pH) ή η ανταγωνιστική ενδογενής μικροχλωρίδα (π.χ. οξυγαλακτικά βακτήρια) φαίνεται ότι "αναγκάζουν" τον παθογόνο να αναπτύξει απόκριση όξινης αντοχής (ATR) και να γίνεται πιο ανθεκτικός στην όξινη καταπόνηση με αποτέλεσμα να επιβιώνει στο εξαιρετικά όξινο περιβάλλον του στομάχου. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα ανθεκτικά αυτά κύτταρα να περάσουν στο εντερικό επιθήλιο και να εκφράσουν παθογόνο δράση. Παρόμοια, στα τυριά που υποστήριξαν ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (χαλούμι, camembert, mascarpone) φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα του παθογόνου, στο χαμηλό pH του γαστρικού υγρού, αυξάνει όσο προχωράει η συντήρηση. Αυτό συμβαίνει γιατί προς το τέλος της συντήρησης ο παθογόνος έχει φτάσει στη στατική του φάση και δαπανά όλη του την ενέργεια για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών με στόχο μόνο την επιβίωσή του. Τελικά, αν κάποιος καταναλωτής αγοράσει ή/και καταναλώσει κάποιο επιμολυσμένο με *L. monocytogenes* τυρί, κοντά στην ημερομηνία λήξης υπάρχει πιθανότητα ανθεκτικά κύτταρα του παθογόνου να περάσουν στο εντερικό επιθήλιο και να εκφράσουν παθογόνο δράση. Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται στα τυριά που υποστηρίζουν ανάπτυξη, λόγω και του μεγαλύτερου πληθυσμού του παθογόνου προς το τέλος της συντήρησης.

Τέλος, ανάμεσα σε όλα τα παραπάνω, πρέπει να ληφθεί υπόψη πως κάθε τροφή παραμένει περισσότερη ή λιγότερη ώρα στο στομάχι ανάλογα με την ποσότητα και το είδος του γεύματος. Οι Zhu et al. το 2006 σε μελέτη τους αναφέρουν ότι σε χρονικό διάστημα 80 λεπτών το 60% του περιεχομένου του στομάχου έχει προχωρήσει, μεταφέροντας τους μικροοργανισμούς στο αλκαλικό περιβάλλον του δωδεκαδάκτυλου. Επομένως, δεν είναι γνωστό το ακριβές χρονικό διάστημα παραμονής του επιμολυσμένου τρόφιμου στο στομάχι, ώστε να είναι βέβαιη η θανάτωση των κυττάρων του παθογόνου που στην μελέτη μας στα 60 λεπτά έχουν επιβιώσει.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σε εξαιρετικά όξινα περιβάλλοντα, όπως το περιβάλλον του στομάχου του ανθρώπινου οργανισμού και να επιβιώνουν, όταν έχει προηγηθεί προσαρμογή τους σε περιβάλλοντα όξινα μεν, αλλά λιγότερο εχθρικά. Η ικανότητα αυτή ονομάζεται απόκριση όξινης αντοχής (Acid Tolerance Response, ATR) (Foster and Hall 1990). Οι Waterman and Small (1998) έδειξαν ότι το pH του μικροπεριβάλλοντος του τροφίμου, στο οποίο αναπτύσσονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως και ο παθογόνος *Listeria monocytogenes* επηρεάζει την επιβίωσή τους στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού. Για παράδειγμα στελέχη Salmonella ενοφθαλμισμένα σε μοσχαρίσιο κιμά pH 2.61 δεν επιβίωναν στο γαστρικό υγρό του στομάχου, ενώ τα ίδια στελέχη εμβολιασμένα σε βρασμένο ασπράδι αυγού, μια τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και χαμηλή σε λίπος, επιβίωναν. Επιπλέον, αναφέρουν πως ενδέχεται ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης στα τρόφιμα με υψηλό ποσοστό λίπους, καθώς κατορθώνει να διαφύγει από το όξινο στρες του στομάχου, αφού παγιδεύεται μέσα στις υδροφοβικές ομάδες των λιπιδίων του τροφίμου που τον προστατεύουν. Σύμφωνα με τους ίδιους, το ίδιο ισχύει και για τα τρόφιμα με υψηλό ποσοστό σε πρωτεΐνη.

Οι Stopforth et al. (2005) μελέτησαν την ανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* μετά από έκθεση σε τεχνητά παρασκευασμένο γαστρικό υγρό pH 1.0 για 0, 20, 40, 60 λεπτά, εμβόλιο του οποίου είχε ενοφθαλμιστεί σε λουκάνικα Φρανκφούρτης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός θανατώθηκε αμέσως όταν εκτέθηκε στο γαστρικό υγρό μετά από 10 ημέρες συντήρησης στους 10°C. Ωστόσο, όταν εκτέθηκε μεταξύ 20 και 40 ημερών συντήρησης στην ίδια θερμοκρασία, παρατηρήθηκε επιβίωση. Όσο μεγαλύτερη ήταν η αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου στο τρόφιμο τόσο μεγαλύτερη ήταν και η επιβίωση του μετά την έκθεση στο γαστρικό υγρό. Πιθανώς αρχικά ο μικροοργανισμός βρισκόταν στην εκθετική φάση του αυξητικού του κύκλου, κατά την οποία είναι πιο ευαίσθητος στο όξινο περιβάλλον, δεδομένου ότι δαπανά την περισσότερη του ενέργεια για την ανάπτυξή και τον πολλαπλασιασμό του. Στην συνέχεια, μεταξύ 20 και 40 ημερών συντήρησης του τροφίμου, ο μικροοργανισμός έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα πληθυσμού και έχει μπει στην στατική φάση του αυξητικού του κύκλου. Σε αυτήν την φάση αναπτύσσει μηχανισμούς που θα του εξασφαλίσουν την επιβίωσή του, μιας και το περιβάλλον έχει γίνει ήδη δυσμενές για εκείνον. Οι μηχανισμοί αυτοί τον προστατεύουν και από άλλες καταπονήσεις, όπως είναι η όξινη καταπόνηση του γαστρικού υγρού του στομάχου.

Από την άλλη, οι Barmpalia et al (2009) αναφέρουν πως ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* εμφάνισε μεγαλύτερη επιβίωση στο γαστρικό υγρό όταν είχε εμβολιαστεί σε λουκάνικα Φρανκφούρτης χαμηλών λιπαρών, επειδή κατά την συντήρησή τους μεταξύ 39 και 55 ημερών είχαν φθάσει σε χαμηλότερο pH (5.24) από ότι τα λουκάνικα υψηλών λιπαρών (pH 5.32) και ο πληθυσμός εμφάνισε απόκριση όξινης αντοχής. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και ο Davis et al. (1996), σύμφωνα με τον οποίο αν ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* εκτεθεί σε τιμές pH μεταξύ 4.8 - 5.2 κατά την συντήρησή του, εκδηλώνει την καλύτερη απόκριση όξινης αντοχής (ATR).

Τέλος, οι Dakici και Calicioglu (2013) μελέτησαν την επιβίωση του *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης ενός παραδοσιακού τούρκικου τυριού. Έγινε εμβολιασμός του γάλακτος τυροκόμησης με μείγμα 5 στελεχών του παθογόνου (7.0 log CFU/ml) και στη συνέχεια παρασκευάσθηκαν τυριά τα οποία αφέθηκαν να ωριμάσουν στους 6^{o}C για 90 ημέρες. Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις στα τυριά καθώς και έκθεσή τους σε συνθετικό γαστρικό υγρό (pH 1.5 έως 2.5) την $1^{η}$ και $2^{η}$ ημέρα κατά την Παρασκευή τους και τη $0^{η}$, $15^{η}$, $30^{η}$, $45^{η}$ και $60^{η}$ ημέρα ωρίμανσης. Ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (4.1 log CFU/g). Στην έκθεση σε γαστρικό υγρό που έγινε στα διάφορα σημεία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παρουσιάστηκε επιβίωση κυττάρων του παθογόνου μέχρι και τα 90 λεπτά της έκθεσης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η παρόλη τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο τυρί κατά την ωρίμανση, η παραμονή στο υποθανάτιο περιβάλλον του τυριού ενεργοποίησε απόκριση σε όξινη αντοχή επιτρέποντας στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* την επιβίωση έως και τα 90 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό.

5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη παρατηρείται ότι το κάθε τυρί είναι διαφορετικό και πρέπει να αντιμετωπίζεται διαφορετικά. Η κατηγορία στην οποία ανήκει κάθε τυρί (ημίσκληρο, μαλακό, τυρί χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή) δεν θα πρέπει να συνδέεται με το επίπεδο της ασφάλειάς του (π.χ. ότι τα ημίσκληρα τυριά είναι πιο ασφαλή από τα μαλακά). Επιπλέον, η τήρηση καλής βιομηχανικής πρακτικής, είναι αναγκαία, ώστε να επιτυγχάνεται η παραγωγή όσο το δυνατόν πιο σταθερών, ως προς το επίπεδο της ενδογενούς μικροχλωρίδας, προϊόντων, μεταξύ των παρτίδων. Καθώς και να αποφεύγεται η επιμόλυνση με οξυγαλακτικά βακτήρια από τις εναρκτήριες καλλιέργειες σε τυριά που η τεχνολογία τους δεν τα περιλαμβάνει. Τέλος, αξιολογόντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA, φαίνεται υπάρχουν τυριά στα οποία δεν αναπτύσεται ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, παρόλα αυτά μπορεί η κατανάλωσή τους να εμπεριέχει κάποια επικινδυνότητα. Καθώς επίσης, υπάρχουν τυριά που υποστηρίζουν ανάπτυξη του παθογόνου, τα οποία φαίνεται να είναι λιγότερο επικίνδυνα από άλλα τυριά που υποστηρίζουν ανάπτυξη.

6 Βιβλιογραφία

Adams M. R. & Moss M. O., 2008. Food microbiology (3rd edn.). Cambridge: RSC Publishing.

Allerberger F., 2007. Listeria, In S. Simjee (Ed.), Foodborne diseases (pp. 27 – 39). Totowa, NJ: Humana Press Inc.

Andre Maria Claudia D. P. B., Campos Maria Raquel Hidalgo, Borges Liana Jayme, Kipnis Andre, Pimenta Fabiana Cristina, Serafini Bisol Alvaro, 2008. Comparison of Staphylococcus aureus isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gelelectrophoresis following SmaI digestion. Food Control, Volume 19, p. 200–207.

Andri, M. C. D. P. B., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., & Serafini, A. I. B., 2008. Comparison of Staphylococcus aureus isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsedfield gel electrophoresis following SmaI digestion. Food Control, 19, 200–207.

Armstrong, G. L., Hollingsworth, J., & Morris, J. G. Jr., 1996. Emerging foodborne pathogens: Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiologic Reviews, 18, 29–51.

Asperger, H., 1994. Staphylococcus aureus. In The significance of pathogenic microorganisms in raw milk (pp. 24–42). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Balaban, N., & Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology, 61, 1–10.

Barancelli, G. V., Camargo, T. M., Gagliardi, N. G., Porto, E., Souza, R. A., Campioni, F., 2014. Pulsed-Field gel electrophoresis characterization of

Listeria monocytogenes isolates from cheese manufacturing plants in Sao Paulo, Brazil. ~ International Journal of Food Microbiology, 171, 21-29.

Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., & Sofos, J.N. 2008. Differences in survival among thirteen Listeria monocytogenes strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. Applied and Environmental Microbiology, 74, 5563–5567.

Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., & Sofos, J.N. 2009. Effect of fat content on survival of Listeria monocytogenes during simulated digestion of inoculated beef frankfurters stored at 7 °C. Food Microbiology, 26, 483–490.

Barnier, E., Vincent, J. P., & Catteau, M. 1988. Listeria et environnement industriel. Sciences Alimentaires, 8, 239–242.

Begley M, Gahan CG, Hill C, 2002. Bile stress response in Listeria monocytogenes LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. Appl. Environ. Microbiol. , 68:6005-6012.

Bernini C., Andruniów T., Olivucci M., Pogni R., Basosi R., Sinicropi A., J., 2013. Am. 760 Chem. Soc. 135 2013; 4822–4833.

Bleicher, A., Obermajer, T., Matijasic, B.B., Scherer, S., Neuhaus, K., 2010. High biodiversity and potent anti-listerial action of complex red smear cheese microbial ripening consortia. Ann. Microbiol. 60, 531–539.

Boerema, J. A., Clemens, R., & Brightwell, G., 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus. International Journal of Food Microbiology, 107, 192–201.

Bonnet, M., & Montville, T. J., 2005. Acid-tolerant Listeria monocytogenes persist in a model food system fermented with nisinproducing bacteria. Letters in Applied Microbiology, 40, 237–242.

Brito, J.R.F., Santos, E.M.P., Arcuri, E.F., Lange, C.C., Brito, M A.V.P., Souza, G.N. et al., 2008. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of Listeria monocytogenes isolates. Applied and Environmental Microbiology, 74, 4954–4961.

Bryan, F. L., & Doyle, M. P., 1995. Health risks and consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in raw poultry. Journal of Food Protection, 58, 326–344.

Buazzi, M., Johnson, M., Marth, E., 1992. Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture of Mozzarella cheese J. Food Prot. 55, 80–83.

Bucholz U. & Mascola L., 2001. Transmission, pathogenesis and epidemiology of Listeria monocytogenes. Infectious Diseases in Clinical Practice, 10, 34 – 41.

Büla, C. J., Bille, J., & Glauser, M. P., 1995. An epidemic of foodborne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. Clinical Infectious Diseases, 20, 66–72.

Bourry, A., & B. Poutrel, 1996. Bovine mastitis caused by Listeria monocytogenes: kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. J. Dairy Sci. 79: 2189–2195.

Buzby J.C. & Roberts T., 2009. The economics of enteric infections: Human foodborne disease costs. Gastroenterology, 136, 1851-1862.

Callon Cécile, Retureau Emilie, Didienne Robert, Montel Marie-Christine, 2011. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative Listeria growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. International Journal of Food Microbiology, Volume 174, p. 98-109.

Casey, P. G., and Condon, S., 2002. Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on Escherichia coli O157:H45. Int. J. Food Microbiol. 76, 199–206.

Cataldo, G., Conte, M. P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M. G., Superti, F., and Longhi, C., 2007. Acid adaptation and survival of Listeria monocytogenes in Italian-style soft cheeses. J. Appl. Microbiol. 103, 185–193.

Chacon, O., Bermudez, L. E., & Barletta, R. G., 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and Mycobacterium paratuberculosis. Annual Review Microbiology, 58, 329–363.

Chamberlin, W., Graham, D. Y., Hulten, K., El-Zimaity, H. M. T., Schwartz, M. R., Naser, S., et al., 2001. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 15, 337–346.

Charlton, B. R., Kinde, H., & Jensen, L. H., 1990. Environmental survey for Listeria species in California milk processing plants. Journal of Food Protection, 53, 198–201.

Chatelard-Chauvin C., Pelissier F., Hulin S, Montel M.C., 2015. Behaviour of Listeria monocytogenes in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. Food Control, Volume 54, August 2015, Pages 53–6.

Chen. J.H.. Hotchkiss. J.H., 1993. Growth of Listeria monocytoigenes and Clostridium sporogenes in cottage cheese in modified atmosphere packaging. J. Dairy Sci. 76, 972-977.

Ciesielski C.A., Hightower A.W., Parsons S.K. and Broome C.V., 1988. Listeriosis in the United States: 1980-1982. Archives of Internal Medicine, 148, 1416-1419.

Cole M.B., Jones M.V. and Holyoak C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of Listeria monocytogenes. Journal of Applied Bacteriology, 69, 63 – 72.

Cossart P. and Sansonetti P.J., 2004. Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. Science, 304, 242 – 248.

Cox, L. J., Kleiss, J., Cordier, J. L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., et al., 1989. Listeria spp. In food processing, non food and domestic environments. Food Microbiology, 6, 49–61.

Dalmasso, M., & Jordan, K. 2014. Absence of growth of Listeria monocytogenes in naturally contaminated Cheddar cheese. J. Dairy Research, 81, 46-53.

D'Aoust, J. Y., 1985. Infective dose of Salmonella typhimurium in Cheddar cheese. American Journal of Epidemiology, 122, 717–720.

D'Aoust, J. Y., Warburton, D. W., & Sewell, A. M., 1985. Salmonella typhimurium phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. Journal of Food Protection, 48, 1062–1066.

D'Aoust, J. Y., Maurer, J., & Bailey, J. S., 2001. Salmonella species. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers (2nd ed, pp. 141–178). Washington, DC, USA: ASM Press.

Davis M.J., Coote P.J., & O'Byrne C.P., 1996. Acid tolerance in Listeria monocytogenes: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. Microbiology, 142, 2975–2982.

Dikici a., Calicioglu M., 2013. Survival of Listeria monocytogenesduring Production and Ripening of Traditional Turkish Savak Tulum Cheese and in Synthetic Gastric Fluid. Journal of Food Protection. Number 10, October 2013, pp. 1666-1816, pp. 1801-1805(5).

Donaghy J.A., Linton M., Patterson M.F., Rowe MT., 2004. Effect of high pressure and pasteurisation on Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in milk. Lett Appl Microbiol 45: 154–159

Donnelly, C. W., 2001. Listeria monocytogenes: A continuing challenge. Nutrition Reviews, 59, 183–194.

Dussurget O., Pizzaro-Cerda J. and Cossart P., 2004. Molecular determinants of Listeria monocytogenes virulence. Annual Review of Microbiology, 58, 587 – 610.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., et al., 2006. Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiology and Infection, 134, 143–146.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control., 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA J. 10(3):2597. [442pp.]

Faleiro M. L., Andrew P. W., and Power D., 2003. Stress response of Listeria monocytogenes isolated from cheese and other foods. Int. J. Food Microbiol. 84, 207–216.

Farber J.M. and Peterkin P.I., 1991. Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen. Microbiological Reviews, Volume 55, p. 476-511.

FDA, Food Code, 2009: Chapter 1 - Purpose & Definitions.

Ferreira A., Sue D., O'Byrne C.P., Boor K.J., 2003. Role of Listeria monocytogenes sigmaB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response.Appl.Environ. Microbiol. 69 (5), 2692–2698.

Formato, G., Geornaras, I., Barmpalia, I. M., Skandamis, P. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., et al., 2007. Effect of acid adaptation on growth during storage at 10 °C and resistance to simulated gastric fluid of Listeria monocytogenes inoculated onto bologna formulated with or without antimicrobials. Journal of Food Protection, 70, 65−69.

Foster J. W. and Hall H. K., 1990. Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium, Journal of Bacteriology, p. 771-778.

Fox P.F., Law J., Mc Sweeney P.L.H. & Wallace J., 1999: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, Chapter 10: Biochemistry of cheese ripening (Aspen Publication).

Fretz, R., Pichler, J., Sagel, U., Much, P., Ruppitsch, W., Pietzka, A.T., Stoger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Appl, G., Werber, D., Stark, K., Prager, R., Flieger, A., Karpiskova, R., Pfaff, G., Allerberger, F., 2010. Multinational listeriosis outbreak due to quargel, a sour milk curd cheese, caused by two different L. monocytogenes serotype 1/2a strains, 2009-2010. Eurosurveillance 15, 2-3.

FSIS (Food Safety Inspection Service): Ready to Eat and Shelf Stable Products Process Familiarization, 2014.

Gahan C. G., O'Driscoll B., and Hill C., 2005. Acid adaptation of Listeria monocytogenes can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3128–3132.

Gellin B.G., Broome C.V., Bibb W.F., Weaver R.E., Gaventa S. and Mascola L., 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States, 1986. American Journal of Epidemiology, 133, 392-401.

Genigeorgis, C. A., 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. International Journal of Food Microbiology, 9, 327–360.

Greenwood, M. H., Roberts, D., & Burden, P. 1991. The occurrence of Listeria species in milk and dairy products: A national survey in England and Wales. International Journal of Food Microbiology, 12, 197–206.

Guerro M.L.F., Rivas P., Ràbago R., Núnez A., deGórgolas M. and Martinelli J., 2004. Prosthetic valve endocarditis due to L. monocytogenes. Report of two cases and reviews. International Journal of Infectious Diseases, 8, 97 – 102.

Harris L.J., 2002. Listeria monocytogenes, In D.O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), Foodborne diseases (2nd edn. pp. 137 – 150). San Diego, CA: Academic Press.

Hedberg, C. W., Korlath, J. A., D'Aoust, J. Y., White, K. E., Schell, W. L., Miller, M. R., et al., 1992. A multistate outbreak of Salmonella javiana and Salmonella oranienburg infections due to consumption of contaminated cheese. Journal of the American Medical Association, 268, 3203–3207.

Hermon-Taylor, J., Bull, T. J., Sheridan, J. M., Cheng, J., Stellakis, M. L., & Sumar, N., 2000. Causation of Crohn's disease by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Canadian Journal of Gastroenterology, 14, 521–539.

Ho J. L., Shands K.N., Friedland G., Eckind P. and Fraser D.W., 1986. An outbreak of type 4b Listeria monocytogenes infection involving patients from eight Boston hospitals. Archives Of Internal Medicine, 146, 520 – 524.

Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska-Grochowska, K., Trottier, L., et al., 2005. An outbreak of E. coli O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. Canadian Journal of Public Health, 96, 182–184.

Husu, J. R., Seppδnen, J. T., Sivelδ, S. K., & Rauramaa, A. L., 1990. Contamination of raw milk by Listeria monocytogenes on dairy farms. Journal of Veterinary Medicine, 37, 268–275.

Imran, M., Desmasures, N., Vernoux, J.P., 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. Food Microbiol. 27, 1095-1103.

Jablonski, L. M., & Bohach, G., 1997. Staphylococcus aureus. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers (2nd ed, pp. 353–357). Washington, DC, USA: ASM Press.

Jensen A., Frederiksen, W. & Gerner-Smidt P., 1994. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989–1990. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 26, 171–178.

Jiang L., Olesen I., Andersen T., Fang W., & Jespersen L., 2010. Survival of Listeria monocytogenes in simulated gastrointestinal system and t *ranscriptional profiling of stress-and adhesion-related genes. Foodborne Pathogens and Disease, 7, 267–274.*

Junttila J.R., Niemelä S.I. and Hirn J., 1988. Minimum growth temperatures of Listeria monocytogenes and non-haemolytic Listeria. Journal of Applied Bacteriology, 65, 321 – 327.

Kabuki, D. Y., Kuaye, A. Y., Wiedmann, M., & Boor, K. J., 2004. Molecular subtyping and tracking of Listeria monocytogenes in latin-style fresh cheese processing plants. Journal of Dairy Science, 87, 2803–2812.

Kaferstein F., 2003. Foodborne disease in developing countries: Aetiology, epidemiology and strategies for prevention. Int J Environ Res 2003:13(Suppl 1):S161-8

Kang D.H., Fung, D.Y.C., 1999. Thin agar layer method for recovery of heat-injured Listeria monocytogenes. J. Food Protect. 62, 1346–1349.

Kells, J., & Gilmour, A., 2004. Incidence of Listeria monocytogenes in two milk processing environments, and assessment of Listeria monocytogenes blood agar for isolation. International Journal of Food Microbiology, 91, 167–174.

Kousta Maria, Mataragas Marios, Skandamis Panagiotis, Drosinos Eleftherios H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control, Volume 21, p. 805–815.

Kroll R. G. and Patchett R. A., 1992. Induced acid tolerance in Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiology 14, p. 224-227.

Le Loir Y., Baron F., & Gautier M., 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2, 7–28.

Le Marc, Y., Valík, L., Medved'ová, A., 2009. Modelling the effect of the starter culture on the growth of Staphylococcus aureus in milk. Int. J. Food Microbiol. 129, 306-311.

Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., et al., 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. The New England Journal of Medicine, 319, 823–828.

Lorber B., 1997. Listeriosis. Clinical Infectious Diseases, 24, 1 – 11.

Lorber B., 2007. Listeriosis. In H. Goldfine & H. Shen (Eds.). Listeria monocytogenes: Pathogenesis and host response (pp. 13 – 31). New York, NY: Springer.

Lunden J., Tolvanen R. and Korkeala H., 2004. Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. J. Dairy Sci., Volume 87, E6–E11.

Lungu B., Rickie S. C. & Johnson M. C., 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of Listeria monocyotgenes under low oxygen or anaerobic conditions: a review, Anaerobe, 15, 7 – 17.

Maijala R., Lyytika¨inen O., Auti, T., Aalto T., Haavisto, L. Honkanen-Buzalski T., 2001. Exposure of Listeria monocytogenes within an epidemic caused by butter in Finland. Int. J. Food Microbiol. 70, 97 – 109.

Maoz A., Mayr R., and Scherer S., 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Appl. Environ. Microbiol. 69:4012–4018.

Mataragas, M., Skandamis, P. N., and Drosinos, E. H., 2008. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. Int. J. Food Microbiol. 126, 1–12

McLauchlin, J., Greenwood, M. H., & Pini, P. N., 1990. The occurrence of Listeria monocytogenes in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. International Journal of Food Microbiology, 10, 255–262.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. and Tauxe R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 607 – 625.

Melo J., Andrew P.W. , Faleiro M.L., 2015. Listeria monocytogenes in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. Food Research International 67 (2015), 75–90.

Meng, J., Doyle, M. P., Zhao, T., & Zhao, S., 2001. Enterohemorrhagic Escherichia coli. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers (pp. 193–213). Washington, DC, USA: ASM Press.

Morgan F., Bonnin V., Mallereau M.-P., Perrin G., 2001. Survival of Listeria monocytogenes during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. International Journal of Food Microbiology, Volume 64, p. 217–221.

Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk C.B. and Baird R.M., 1995. Essentials of the microbiology of foods: A textbook for advanced studies. Chichesetr, England: John Wiley& Sons.

NACMCF, 1991. 'Listeria monocytogenes. Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods'. In ternational Journal of Food Microbiology, 14, 186-246.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., et al., 2005. Coagulase-positive staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 98, 73–79.

O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance in Listeria monocytogenes: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1693–1698.

Olsen, S.J., Patrick, M., Hunter, S.B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W.R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F., LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., *Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., Mead, P., 2005. Multistate outbreak of Listeria monocytogenes infection linked to delicatessen turkey meat. Clin. Infect Dis. 40, 962–967*

Ooi S.T. and Lorber B., 2005. Gastroenteritis due to Listeria monocytogenes. Clinical Infectious Diseases, 40, 1327 – 1332.

Panagou E., 2008. A Radial Basis Function Neural Network Approach to Determine the Survival of Listeria monocytogenes in Katiki, a Traditional Greek Soft Cheese. Journal of Food Protection, Vol. 71, No. 4, 2008, Pages 750–759

Papageorgiou N., Athanassov Y., Armand M., Bonhote P., Pettersson H., Azam A. and M. Grätzel, 1996. The Performance and Stability of Ambient Temperature Molten Salts for Solar Cell ApplicationsJ. Electrochem. Soc. 1996 143(10): 3099-3108;

Parish M.E. and Higgins D.P., 1989. Survival of Listeria monocytogenes in low pH model broth systems. Journal of Food Protection, 52, 144 – 147.

Peel M., Donachie W. & Shaw A., 1988. Temperature – dependent expression of f lagella of Listeria monocytogenes studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting, Journal of General Microbiology, 143, 2171 – 2178.

Peterson Walter L., Mackowiak Philip A., Barnett Cora C., Marling-Cason Margaret and Haley Marcia L., 1989. The Human Gastric Bactericidal Barrier: Mechanisms of Action, Relative Antibacterial Activity, and Dietary Influences. The Journal of Infectious Diseases, *Vol. 159, No. 5, p. 979-983.*

Portnoy D.A., Auerbach V. and Glomski I.J., 2002. The cell biology of Listeria monocytogenes infection: The intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. Journal of Cell Biology, 158, 409 – 414.

Pritchard, T. G., Flanders, K. J., & Donnelly, C. W., 1995. Comparison of the incidence of Listeria on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. International Journal of Food Microbiology, 26, 375–384.

Ramalheira R., Almeida M., Azeredo J., Brandão T.R.S., Almeida G., Silva J., Teixeira P., 2010. Survival of clinical and food isolates of Listeria monocytogenes through simulated gastrointestinal tract conditions. Food borne Pathogens and Disease 7, 121-128.

Ratnam, S., & March, S. B., 1986. Laboratory studies on Salmonella-contaminated cheese involved in a major outbreak of gastroenterititis. Journal of Applied Bacteriology, 61, 51–56.

Reij, M. W., & Den Aantrekker, E. D., 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. International Journal of Food Microbiology, 91, 1–11.

Retureau, E., Callon, C., Didienne, R., Montel, M.-C., 2010. Is microbial diversity an asset for inhibiting Listeria monocytogenes in raw milk cheeses? Dairy Sci. Technol. 90, 375–398.

Rocourt J. and Cossart P., 1997. Listeria monocytogenes. In M.P. Doyle, L.R. Buechat and T.J. Montville (Eds.), Food microbiology – fundamentals and frontiers (pp. 337-3357). Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press.

Roering J.J., Kirchner J.W., Dietrich W.E., 1999. Evidence for nonlinear, di¡usive sediment transport on hillslopes and implications for landscape morphology, Water Resour. Res. 35(1999); 853-870.

Rosec, J. P., Guiraud, J. P., Dalet, C., & Richard, N., 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. International Journal of Food Microbiology,35,213-221.

Roth E., Schwenninger S.M., Hasler M., Eugster-Meier E., Lacroix C., 2010. Population dynamics of two antilisterial cheese surface consortia revealed by *temporal temperature gradient gel electrophoresis. BMC Microbiol. 10, 74–87.*

Ryan S., Hill C., & Gahan C. G. M., 2008. Acid Stress Responses in Listeria monocytogenes. Advances in Applied Microbiology (Vol. 65, pp. 67–91).

Ryser, E. T., 1999. Foodborne listeriosis. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), Listeria, listeriosis and food safety (pp. 299–358). New York, USA: Marcel Dekker.

Ryser E.T., 2007. Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in unfermented dairy products. In E.T. Ryser and E.H. Marth (Eds.). Listeria, listeriosis and food safety (3rd edn. pp., 357 – 403). Boca Raton, FL: CRC Press.

Samara A., Koutsoumanis K.P., 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of Listeria monocytogenes during storage at 5 and 20 degrees C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. International Journal of Food Microbiology 129, 1–7.

Sanger J.M., Sanger J.W. and Southwick F.S., 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of Listeria monocytogenes. Infection and Immunity, 60, 3609 – 3619.

Schlech W.F. III, Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.H., Nicholls E.S. and Broome C.V., 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. New England Journal of Medicine, 308, 203-206.

Schlech W.F. III, Chase D.P. and Badley A., 1993. A model of food-borne Listeria monocytogenes infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: Development and effect of gastric acidity on infective dose. International Journal of Food Microbiology, 18, 15 – 24.

Schvartzman M.S., Maffree A., Tenenhaus-Aziza F., Sanna M., Jordan K., 2011. Modeling the fate of Listeria monocytogenes during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. Int. J. Food Microbiol. 145 (Suppl. 1), S31-S38.

Schuchat A., Swaminathan B. and Broome C.V., 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clinical Microbiological Reviews, 4, 169-183.

Schutchat A., Deaver K., Hayes P.S., Graves L., Mascola L. and Wenger J.D., 1993. Gastrointestinal carriage of Listeria monocytogenes in household contacts of patients with listeriosis. Journal of Infectious Diseases, 167, 1261-1262.

Shahamat M., Seaman A. and Woodbine M., 1980. Survival of Listeria monocytogenes in high salt concentrations. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt., Orig. A, 246, 506 – 510.

Shrestha S., J. A. Grieder D. J. McMahon and B. A. Nummer., 2011. Survival of Listeria monocytogenes introduced as a postaging contaminant during storage of low-salt Cheddar cheese at 4, 10, and 21°C. J. Dairy Sci. 94:4329–4335.

Sip, A., Więckowicz, M., Olejnik-Schmidt, A., Grajek, W., 2012. Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. Food Control 26, 117–124.

Spanu, C., Scarano, C., Spanu, V., Penna, C., Virdis, S., De Santis, E.P.L., 2012. Listeria monocytogenes growth potential in Ricotta salata cheese. Int. Dairy J. 24, 120–122.

Skandamis P.N., Gounadaki A.S., Geornaras I., & Sofos J.N., 2012. Adaptative acid tolerance response of Listeria mnocytogenes strains under planktonic and immobilized growth conditions. International Journal of Food Microbiology, 159, 160–166.

Southwick F.S. and Purich D.L., 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. New England Journal of Medicine, 334, 770 – 776.

Spurlock, A. T., & Zottola, E. A., 1991. The survival of Listeria monocytogenes in aerosols. Journal of Food Protection, 54, 910–912.

Stopfort, J.D., Yoon Y., Barmpalia I.M., Samelis J., Skandamis P.N., & Sofos J.N., (2005). Reduction of Listeria monocytogene populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. International Journal of Food Microbiology, 99, 309–319.

Stopforth J. D., Skandamis P. N., Geornaras I., and Sofos J. N., 2007. Acid tolerance of acid- adapted and nonacid-adapted Escherichia coli O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. Food Microbiol. 24, 530–538.

SymphonylIRI, 2010 (www.selfservice.gr/default.asp?pid=9&1a=1&Cid=20&arid=3637).

Temelli S., Anar S., Sen C., & Akyuva P., 2006. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. Food Control, 17, 856–861.

Tiwari U., Walsh D., Rivas L., Jordan K., Duffy G., 2014. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of Listeria monocytogenes in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. Food Control, Volume 42, p. 248-256.

Tondo E. C., Guimaraes MC. M., Henriques J. AP., Ayub M. AZ., 2000. Assessing and analyzing contamination of a dairy products processing plant by Staphylococcus aureus using antibiotic resistance and PFGE. Canadian Journal of Microbiology, Volume 46, p. 1108-1114.

Upton Pauline and Coia John E., 1994. Outbreak of Escherichia coli 0157 infection associated with pasteurised milk supply. The Lancet, Volume 344, p.1015.

Valero, A., Hernandez, M., De Cesare, A., Manfreda, G., González-García, P., & Rodríguez-Lázaro, D., 2014. Survival kinetics of Listeria monocytogenes on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures. International Journal of Food Microbiology, 184, 39-44.

Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Gorski, L., McCluskey, B. J., & Perdue, M. L., 2004. Prevalence of Salmonellae, Listeria monocytogenes, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. Journal of Dairy Science, 87, 2822–2830.

Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J. and Kreft J., 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews, 14, 584 – 640.

Waterman Scott R. and Small P. L. C., 1998. Acid-Sensitive Enteric Pathogens Are Protected from Killing under Extremely Acidic Conditions of pH 2.5 when They Are Inoculated onto Certain Solid Food Sources. Appl. Environ. Microbiol., Volume 64, p. 3882.

Wemmenhove E., Stampelou I., van Hooijdonk A.C.M., Zwieterin, M.H., & Wells-Bennik M.H., 2013. Fate of Listeria monocytogenes in Gouda microcheese: No growth, and substantial inactivation after extended ripening times. International Dairy Journal, 32, 192–198.

Wemmenhove E., Beumer R.R., van Hooijdonk A.C.M., Zwietering M.H., Wells-Bennik M.H.J., 2014. The fate of Listeria monocytogenes in brine and on Gouda cheese following artificial contamination during brining. International Dairy Journal, Volume 39, Issue 2, Pages 253–258.

Wing E.J. and Gregory S.H., 2002. Listeria monocytogenes: Clinical and experimental update. Journal of Infectious Diseases, 185, S18 – S24.

Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J., & Bayles, D.O., 2004. The htrA (degP) gene of Listeria monocytogenes 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. Applied and Environmental Microbiology, 70, 1935–1943.

Zhu H., Hart C. A., Sales D. and Roberts N. B., 2006. Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on Escherichia coli and Helicobacter pylori. Journal of Medical Microbiology, Volume 55, p. 1265–1270.

Ανδίτσος Νικόλαος Δ., 2012. Βιοποικιλότητα και ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του Listeria monocytogenes σε νωπό κρέας και προϊόντα του.

Ανυφαντάκης Εμμανουήλ Μιχ., (1993), Τυροκομία, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

Ανυφαντάκης Εμμανουήλ Μιχ., (2004), Τυροκομία: Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

Κυριακόπουλος Παναγιώτης Ι., (1995), Η τυροκομία στην πράξη: Εφαρμοσμένη τεχνολογία τυριών, κρέμας, βουτύρου παραδοσιακή και σύγχρονη, Εκδοτική Τρίαινα, Αθήνα.

Μπαλατσούρας Γ., 2006. Μικροβιολογία τροφίμων (2η έκδοση). Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Φουκάκη Ευαγγελία, 2011. Μικροβιολογική Ασφάλεια τυριών τυρογάλακτος στην Κρήτη.

http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm