



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ
ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

*Επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στη μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά και στην επιβίωσή του μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού συστήματος.*

Μεταπτυχιακή διατριβή

Μαρία Κ. Γεωργούλια

Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών (Π.Μ.Σ.)

“ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ”

Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Σκανδάμης

Αθήνα, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών (Π.Μ.Σ.)

**“ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ”**

Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων

Μεταπτυχιακή διατριβή

Μαρία Κ. Γεωργούλια

*Επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στη μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά και στην επιβίωσή του μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού συστήματος.*

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

Αθήνα, 2017

Μεταπτυχιακή διατριβή

*Επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στη μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά και στην επιβίωσή του μετά από έκθεση σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρικού συστήματος.*

Μαρία Κ. Γεωργούλια

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής

Εξεταστική επιτροπή : Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής

Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής

Τσακαλίδου Ευθυμία, Καθηγήτρια

Περίληψη

Η συνύπαρξη διαφορετικών στελεχών του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στο ίδιο τρόφιμο είναι πιθανό να επηρεάσει την ικανότητα ανάπτυξής τους και κατ' επέκταση τα τελικά επίπεδα πληθυσμού, τη στιγμή της κατανάλωσης και την ανθεκτικότητά τους κατά την διάρκεια της πέψης. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την επίδραση της συγκαλλιέργειας στην ανάπτυξη προσαρμοσμένων σε τυρί και μη προσαρμοσμένων στελεχών *L. monocytogenes* σε Ricotta και Camembert και στην μείωσή τους μετά την έκθεσή τους σε συνθετικό γαστρικό υγρό.

Η ανάπτυξη 4 προσαρμοσμένων σε τυρί και μη προσαρμοσμένων στελεχών *L. monocytogenes* προσδιορίστηκε σε μονές και μικτές καλλιέργειες των δυο στελεχών (1:1 αναλογία στελεχών). Ricotta και Camembert (10g) εμβολιάστηκαν με 2.5-3 log CFU/g από τις καλλιέργειες. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν ήταν ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά για την επίτευξη επιλεκτικής καταμέτρησης σε υπόστρωμα Tryptic Soy Agar + αντιβιοτικό. Η προσαρμογή των στελεχών έγινε σε ζωμό τυριού (1:1 τυρί:Maximum Recovery Diluent) για 48h στους 7°C, πριν τον εμβολιασμό των τυριών. Η προσαρμογή στο τυρί έγινε με στόχο την καλύτερη αξιολόγηση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων, περιορίζοντας την πιθανή επιρροή του μικροπεριβάλλοντος του τυριού. Τα τυριά μετά τον εμβολιασμό συντηρήθηκαν στους 7°C, υπό αερόβιες συνθήκες. Έπειτα ακολούθησε έκθεση 3 συνδυασμών στελεχών (2 σε Ricotta και 1 σε Camembert) σε συνθετικό γαστρικό υγρό (pH 2) για 120 λεπτά. Η καταμέτρηση έγινε σε υπόστρωμα Tryptic Soy Agar + αντιβιοτικό, και επιπλέον πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός και καταμέτρηση του pH καθόλη τη διάρκεια της έκθεσης.

Η ανάπτυξη των στελεχών τους *L. monocytogenes* και των συγκαλλιιεργειών στις οποίες έγινε προσαρμογή σε τυρί καθώς και σε αυτές που δεν έγινε, ήταν παρόμοια ($p \geq 0.05$), τόσο στη Ricotta όσο και στο Camembert, με εξαίρεση τον συνδυασμό C5 – ScottA, στο τυρί Ricotta, που η προσαρμογή εξάλειψε τον ανταγωνισμό των στελεχών. Στα προσαρμοσμένα στο τυρί στελέχη, οι μονοκαλλιέργειες όσο και οι συγκαλλιέργειες παρουσίασαν συντομότερη φάση προσαρμογής, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στελέχη στα οποία δεν έγινε προσαρμογή. Συγκεκριμένα, το προσαρμοσμένο στο τυρί C5 παρουσίασε αύξηση 1.5 log CFU/g or cm^2 τη 2^η μέρα συντήρησης. Το ίδιο στέλεχος στο οποίο δεν έγινε προσαρμογή, μπήκε στην εκθετική φάση την 4^η μέρα. Σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη ορισμένων στελεχών σε συγκαλλιέργεια σε σχέση με

την αντίστοιχη μονοκαλλιέργειά τους. Το προσαρμοσμένο σε τυρί και μη προσαρμοσμένο στέλεχος 6179 στην μονοκαλλιέργεια έφτασε τα 7.2 log CFU/g, ενώ στη συγκαλλιέργεια έφτασε τα 5.6 log CFU/g, υποδηλώνοντας αναστολή ανάπτυξης, όταν ο ανταγωνιστής του έφτασε το μέγιστο επίπεδο ανάπτυξης (7.9 log CFU/g). Κατά την έκθεση εμβολιασμένων τυριών Ricotta με τους συνδυασμούς ScottA – PL25 και C5 – ScottA, το στέλεχος ScottA, παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα ανεξαρτήτως παρουσίας ανταγωνισμού, καθώς στον 1^ο συνδυασμο δεν υπήρχε ενώ στον 2^ο υπήρχε. Το Camembert, αποτέλεσε μη ευνοϊκό υπόστρωμα για τους συνδυασμούς στελεχών που καλλιεργήθηκαν σε αυτό, όσον αφορά την οξεοανθεκτικότητά τους. Τέλος, η διάρκεια της συντήρησης παίζει ρόλο στην οξεοανθεκτικότητα των στελεχών καθώς, τα στελέχη που ήταν στη στατική φάση κατάφεραν να επιβιώσουν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς συγκριτικά με εκείνα που ήταν στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους.

Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν πώς το τυρί ως υπόστρωμα καθορίζει την έκβαση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων και την κυριαρχία ορισμένων στελεχών *L. monocytogenes* στα τρόφιμα αλλά και την ανθεκτικότητά τους σε όξινη καταπόνηση, όπως αυτή του χαμηλού pH του στομάχου.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωπονικές Επιστήμες, Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: *L. monocytogenes*, διαστελεχιακές αλληλεπιδράσεις, μαλακά τυριά, συνθετικό γαστρικό υγρό

The role of inter-strain interactions on the growth of *L. monocytogenes* strains in soft cheeses and its survival after exposure to synthetic gastric fluid.

Abstract

The coexistence of different *L. monocytogenes* strains in the same food sample might influence their growth capacity and thus, the final levels at the time of consumption and their resistance during digestion.

The aim of this study was to investigate the inter-strain interactions on the growth of matrix-adapted and non-adapted *L. monocytogenes* on Ricotta and Camembert cheeses and their reduction after exposure to synthetic gastric fluid.

Ricotta (10g) and Camembert (6x2 cm² pieces) cheeses were inoculated at approximately 2.5 log CFU/g or cm² with four matrix-adapted and non-adapted *L. monocytogenes* strains (serotypes 1/2a, 1/2b, 4b), in single and two-strain cultures (1:1 strain ratio). Strains were selected as resistant to different antibiotics for their selective enumeration on Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract and antibiotic. Adaptation of cells was performed in cheese broth (1:1 cheese in Maximum Recovery Diluent) for 48h at 7°C, before inoculation of cheeses. Adaptation aimed to evaluate exclusively the inter-strain interactions, eliminating the potential impact of cheese microenvironment on strain-to-strain interactions. Cheeses were stored aerobically at 7°C. Then 3 combinations of strains (2 in Ricotta and 1 in Camembert) were exposed to synthetic gastric fluid (pH 2) for 120 minutes. Their selective enumeration performed on a Tryptic Soy Agar + antibiotic substrate. Also, enrichment and pH-measures were made throughout the exposure.

Adaptation of *L. monocytogenes* strains on Ricotta and Camembert resulted in similar ($p \geq 0.05$) growth responses, with the exception of combination C5 - ScottA, in Ricotta cheese, where the adaptation eliminated the competition. Both single and co-culture adapted strains, had shorter lag phase than the non-adapted ones. Particularly, adapted strain C5 showed growth of 1.5 log CFU/g or cm² on the 2nd day of storage, compared to the non-adapted, which entered the exponential phase on day 4. Differences ($p < 0.05$) in growth kinetics of some strains were observed when grown singly compared to the same strain in co-culture. Adapted and non-adapted singly cultured strain 6179 increased to 7.2 log CFU/g, whereas in co-culture remained at 5.6

log CFU/g, suggesting growth inhibition ($p < 0.05$), when its competitor reached the maximum growth (7.9 log CFU/g). In the exposure of Ricotta inoculated with the ScottA - PL25 and C5 - ScottA combinations, the ScottA strain showed increased resistance irrespective of the presence of competition, since the first combination did not show competition while in the second there was. Camembert was an unfavorable substrate for the combinations of strains grown in it, in terms of their resistability. Finally, the duration of maintenance plays an important role in the resistances of the strains, as the cells in stationary phase managed to survive in larger populations compared to those in the exponential phase.

The results reveal how cheese matrix determines the outcome of inter-strain interactions and therefore could assist in explaining the dominance and acid resistance of certain strains in foods of safety concern for *L. monocytogenes*.

Scientific Disciplines: Agricultural Sciences, Food Microbiology

Key words: *L. monocytogenes*, inter-strain interactions, soft cheeses, synthetic gastric fluid.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον 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 τις πολύτιμες συμβουλές του και τη βοήθειά όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Έφη Τσακαλίδου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, για τις συμβουλές και διορθώσεις τους κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών κ. Μαρία Γκερέκου, για την πολύτιμη βοήθειά της, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και των εργαστηριακών αναλύσεων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την υπομονή, την κατανόηση και την στήριξη που μου έδειξαν, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	6
1 Εισαγωγή.....	11
1.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	11
1.1.1 Ιστορική αναδρομή	11
1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	11
1.1.3 Επιδημιολογία και λοιμοξιογόνος δράση του μικροοργανισμού	14
1.1.4 Κρούσματα λιστερίωσης.....	17
1.2 Τυριά	21
1.2.1 Ιστορική αναδρομή του τυριού	21
1.2.2 Τα τυριά ως έτοιμο προς κατανάλωση (ready to eat) τρόφιμο	21
1.2.3 Παρασκευή τυριών – τυροκόμηση	25
1.2.4 Κατηγορίες τυριών.....	27
1.2.5 Ricotta	28
1.2.6 Camembert.....	28
1.2.7 Πηγές μόλυνσης και παθογόνοι μικροοργανισμοί των τυριών	30
1.3 Διαστελεχιακές αλληλεπιδράσεις του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	34
1.4 Απόκριση του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	40
1.5 Ευρωπαϊκή νομοθεσία	43
1.6 Υπόθεση και σκοπός της εργασίας	45
2 Υλικά και μέθοδοι.....	46
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	46
2.1.1 Μελέτη της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε μαλακά τυριά.....	46
2.1.2 Εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> , σε μαλακά τυριά, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό.....	47
2.2 Προετοιμασία εμβολίου.....	48
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων τυριών και εμβολιασμός.....	49
2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις	51
2.5 Εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> , με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό	53

2.5.1 Παρασκευή γαστρικού υγρού	53
2.5.2 Έκθεση των τυριών στο συνθετικό γαστρικό υγρό	54
2.6 Μοντέλο Baranyi και Roberts.....	55
2.7 Μοντέλο Jameson effect	55
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	56
3 Αποτελέσματα - Συζήτηση	57
3.1 Επίδραση του διαστελεχιακού ανταγωνισμού στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε μαλακά τυριά	57
3.1.1 Μονοκαλλιέργειες στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	57
3.1.2 Συγκαλλιέργειες στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	60
3. 1. 3 Εκτίμηση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σύμφωνα με το φαινόμενο Jameson.....	77
3.2 Επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> , σε μαλακά τυριά, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό	79
4 Συμπεράσματα	92
Βιβλιογραφία	93

1 Εισαγωγή

1.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, είναι πλέον, ένας από τους πιο γνωστούς και μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις. Ωστόσο η πρώτη φορά που περιγράφηκε ως, *Bacterium monocytogenes*, ήταν το 1924 από τον E.G.D Murray, ο οποίος κατέγραψε τον θάνατο κουνελιών από το συγκεκριμένο βακτήριο (Murray et al., 1926) παρόλο που ήδη από το 1891 είχαν καταγραφεί λοιμώξεις που μετέπειτα, αποδόθηκαν στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (Gray and Killinger, 1966). Αργότερα, ακολούθησε η πρώτη απομόνωσή του από τον Gill το 1929 (Gill, 1937) και το 1940, καθιερώθηκε το γένος ως *Listeria* από τον Harvey Pirie (Harvey P.J.H., 1940), καθώς το όνομα *Listerella*, προς τιμήν του λόρδου Lister που προηγήθηκε, απορρίφθηκε εξαιτίας της ύπαρξης μυκήτων (*Mycetozoa*) που ονομάζονταν έτσι ήδη. Κατά τη δεκαετία του 1980 καταγράφηκε πληθώρα κρουσμάτων λιστερίωσης παγκοσμίως, γεγονός που οδήγησε στην εκτενέστερη μελέτη αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού, ο οποίος αποτελεί πλέον έναν από τους βιολογικούς κινδύνους που απειλούν την ασφάλεια των τροφίμων.

1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει 17 είδη: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, και *L. welshimeri*. (Collins et al., 1991, Weller et al., 2015). Για τον άνθρωπο το μόνο είδος που είναι παθογόνο είναι ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* (Farber J. M. and Peterkin P. I., 1991), ο οποίος περιλαμβάνει 13 οροτύπους (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7), εκ των οποίων τρεις είναι αυτοί που συνδέονται με λοιμώξεις στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, οι ορότυποι αυτοί είναι: 1/2a, 1/2b, και 4b, με τον 4b να εμφανίζεται ως υπεύθυνος για το 33% των λοιμώξεων σε Ευρώπη και Αμερική (Seeliger and Höhne, 1979). Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, ως ένα τυπικό, θετικό κατά Gram, βακτήριο,

έχει κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από 35% πεπτιδογλυκάνη η οποία συνδέεται με τείχοϊκά οξέα, τα οποία συντίθενται από γλυκερόλη, ριβιτόλη, ουδέτερα σάκχαρα, N-ακετυλάμινο-σάκχαρα και φωσφορικά άλατα. Στο συγκεκριμένο βακτήριο εντοπίζονται δύο τύποι τείχοϊκών οξέων. Στον πρώτο τύπο, τα κατάλοιπα ριβιτόλης συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των ανθράκων 1-5, και κάποιες φορές βρίσκονται υποκατεστημένα με N-ακετυλογλυκοζαμίνη στον άνθρακα 2. Αυτός ο τύπος εντοπίζεται στους ορότυπους 1/2a, b, και c, 3a, b, και c, και 7. Στον δεύτερο τύπο, που εντοπίζεται στους ορότυπους 4a, b, και d, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη ενσωματώνεται μέσα στην αλυσίδα (Fiedler, 1988).

Το είδος *Listeria monocytogenes*, του οποίου η ταξινόμηση παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1, είναι ένας θετικός κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιος, μη σποριογόνος μικροοργανισμός με μορφή ραβδόμορφου βακίλου και ενίοτε με απεικόνιση αλυσίδων στο μικροσκόπιο, διαστάσεων 0,4-0,5 μm x 0,5-2 μm (Lovett, 1989). Έχει την ικανότητα να κινείται με τη χρήση μαστιγίων και πιο συγκεκριμένα στους 20-25 °C εμφανίζει τη μέγιστη κινητικότητα, ενώ στους 37°C την χάνει. Δίνει θετικά αποτελέσματα στην αντίδραση καταλάσης και αρνητικά στην αντίδραση οξειδάσης. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός και είναι ικανός να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες 1 - 45°C (Junttila et al., 1988), ωστόσο η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 30-37 °C. Η ανθεκτικότητά του, τόσο σε χαμηλές (Walker and Stringer, 1987, Jaana et al., 1988) όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες (Ikonomou and Todoron, 1964 Sörqvist, 1994,) έχει μελετηθεί ευρέως. Οι Walker et al., το 1990 παρατήρησαν πως η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ήταν οι -0,1 έως -0,4°C ενώ η φάση προσαρμογής του διήρκησε από 1 έως 34 ημέρες ανάλογα με την θερμοκρασία στην οποία έγινε η επώαση. Σε θερμοκρασίες μικρότερες των δύο προηγούμενων παρατηρείται επιβίωση του μικροοργανισμού.

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* θεωρείται ανθεκτικός μικροοργανισμός (hardy microorganism) χάρη στην ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, pH και ενεργότητας νερού (a_w). Μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος pH (4,5-7) ενώ παράλληλα παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH (Parish and Higgins, 1989) και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, επιβιώνοντας σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου έως και 18% w/v, γεγονός που εξαρτάται ταυτόχρονα και από την θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται ο μικροοργανισμός (Cole

et al, 1990). Η ανθεκτικότητα αυτή οδήγησε στη δημιουργία μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν την σωρευτική επίδραση όλων αυτών των περιβαλλοντικών παραγόντων στην επιβίωση και την ανάπτυξη αυτού του μικροοργανισμού (Buchanan and Phillips 1990). Σε περιπτώσεις όμως, όπως αυτή που μελέτησαν οι Duffy et al. (1994), διαπιστώθηκε πως ο συνδυασμός πολλών, παρεμποδιστικών για την ανάπτυξη εμποδίων μπορεί να επιβραδύνει την ανάπτυξη, αυτού του ανθεκτικού μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, σε pH 5.9 και a_w 0,960 αυξήθηκε η φάση προσαρμογής και μειώθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στους 5°C. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε μελέτη που έγινε βρέθηκε πως το κατώτατο όριο για την ανάπτυξη αυτού του μικροοργανισμού είναι 0,920 όταν χρησιμοποιείται χλωριούχο νάτριο (Nolan et al., 1992). Η βέλτιστη τιμή ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* έχει προσδιοριστεί να είναι μεταξύ 0,98 και 0,99 (Tienungoon et al., 2000). Επιβίωση, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί σε σαλάμι με ενεργότητα νερού 0.79-0.86, συντηρούμενο στους 4°C (Johnson et al., 1988). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που θα αναλυθεί σε παρακάτω κεφάλαιο εκτενώς, είναι η αυξημένη ανθεκτικότητα σε συνθήκες όξινης καταπόνησης όταν προηγουμένως έχει εκτεθεί σε υποθανάτιες τιμές pH. (Davis et al., 1990).

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Βασίλειο	Eubacteria
Φύλο	Firmicutes
Κλάση	Bacilli
Τάξη	Bacillales
Οικογένεια	Listeriaceae
Γένος	Listeria
Είδος	<i>Listeria monocytogenes</i>

1.1.3 Επιδημιολογία και λοιμοξιογόνος δράση του μικροοργανισμού

Η λοίμωξη που προκαλεί ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* ονομάζεται λιστερίωση, η διάγνωση της οποίας γίνεται με καλλιέργεια δείγματος αίματος ή εγκεφαλονωτιαίου μυελού. Το 99% των περιστατικών λιστερίωσης σχετίζονται με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με υψηλό πληθυσμό του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού, για αυτό και πρόκειται για τροφιμογενή λοίμωξη (Farber et al., 1991). Η μολυσματική δόση για τον άνθρωπο δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια και σχετίζεται κυρίως με την κατάσταση της υγείας του. Στις ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες, δηλαδή παιδιά, ηλικιωμένους, εγκύους, και ανοσοκατεσταλμένους (YOPIs), που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο στις τροφιμογενείς λοιμώξεις, η λιστερίωση εξελίσσεται στη σοβαρότερη μορφή της (invasive disease) με αρχικό χρόνο εμφάνισης μία έως τρεις εβδομάδες και ποσοστό 20-30% θνησιμότητα (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007, Ramaswamy et al., 2007) ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις υγείων ανθρώπων εξελίσσεται ως γαστρεντερίτιδα ή γρίπη (febrile gastroenteritis, non-invasive disease) με αρχικό χρόνο εμφάνισης μεγαλύτερο των δώδεκα ωρών και συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια και εμετούς (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Τα συμπτώματα που εμφανίζονται στην περίπτωση της invasive disease περιλαμβάνουν αρχικά την πολυμορφοπύρηνη λευκοκυττάρωση και αργότερα την μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση. Γενικότερα, ο χρόνος επώασης του μικροοργανισμού ποικίλει και εξαρτάται από τον πληθυσμό που θα καταναλώσει ο άνθρωπος αλλά και την ευαισθησία του οργανισμού του (Lorber, 2007).

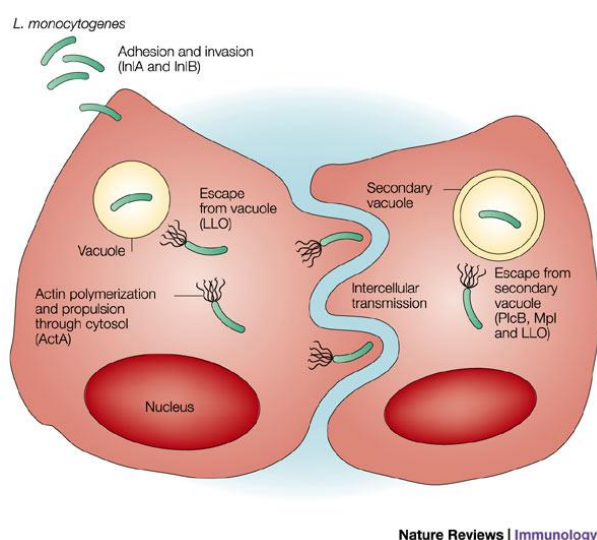
Όπως προαναφέρθηκε, ο άνθρωπος μπορεί να προσβληθεί από τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* με την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου. Αν ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός καταφέρει να ξεπεράσει το εμπόδιο του χαμηλού pH στο στομάχι του ανθρώπου τότε, περνάει στο έντερο, από όπου μέσω των μεσεντέριων λεμφαδένων μπορεί να φτάσει στον σπλήνα και το ήπαρ (Lecuit, 2007). Το ήπαρ αποτελεί σημαντικό σταθμό του ανοσοποιητικού συστήματος όσον αφορά αυτό το βακτήριο. Τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα προκαλούν υπεραιμική αντίδραση στον οργανισμό του ξενιστή ενεργοποιώντας τα ουδετερόφιλα που καταστρέφουν τόσο τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα όσο τα κύτταρα του παθογόνου βακτηρίου. Ωστόσο αν ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* καταφέρει να διαφύγει του ήπατος,

μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, μέσω του αίματος είναι δυνατόν να φτάσει στον εγκέφαλο όπου μπορεί να προκαλέσει νόσους όπως εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα και νόσους του ΚΝΣ ή στον πλακούντα, εάν πρόκειται για έγκυες γυναίκες και να προκαλέσει λοίμωξη του εμβρύου ή ακόμα και αποβολή του (Gray and Killinger, 1966).

Ο μηχανισμός της λοιμοξιογόνου δράσης του βακτηρίου περιλαμβάνει μια σειρά σταδίων αλλά και πολλούς παράγοντες που μπορούν να την επηρεάσουν (Σχήμ 1.1). Αρχικά, το βακτήριο διεισδύει στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, μέσω της απορρόφησής του εντός μιας κύστης, του φαγοσώματος, με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης κατά την οποία δημιουργείται ένα κενοτόπιο, από την σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων με το παθογόνο βακτήριο. Η διαδικασία της εισόδου εντός του ξενιστή πραγματοποιείται με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει την πρόσδεση των ιντερναλινών (InlA/InlB) στην πρωτεΐνη καδερίνη που αποτελεί τον υποδοχέα που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (Bonazzi et al., 2009). Μελέτες δείχνουν πως στελέχη στα οποία απενεργοποιήθηκε το γονίδιο *inlAB*, από το οποίο κωδικοποιούνται οι InlA και InlB, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα διείσδυσης στα κύτταρα των ξενιστών. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια, ένας παράγοντας λοιμοξιογόνου δράσης που συμμετέχει στην είσοδο του παθογόνου μικροοργανισμού εντός των επιθηλιακών κυττάρων, είναι οι πρωτεΐνες p60 (Bubert et al., 1992). Όταν το βακτήριο εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή, μπορεί να εξέλθει του κενοτοπίου και να απελευθερωθεί στο κυτταρόσπασμα του κυττάρου του ξενιστή με τη βοήθεια των ενζύμων λιστεριολυσίνη O (LLO), φωσφολιπάση A (*plcA*) και φωσφολιπάση B (*plcB*) (Schmid et al., 2005, Scuchat et al., 1991). Οι φωσφολιπάσες είναι ικανές να διασπών τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του κενοτοπίου, συμβάλλοντας έτσι στην ρήξη της. Αξίζει να αναφερθεί πως έχει παρατηρηθεί συνεργιστική δράση μεταξύ της LLO και της *plcB*. Η δράση της LLO έγκειται στη δημιουργία πόρων στη μεμβράνη του φαγοσώματος από τους οποίους διαφεύγουν τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού. Όταν το pH του κενοτοπίου είναι όξινο (4.9–6.7), η LLO παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα (Beauregard et al., 1997). Η ρήξη της διπλής λιπώδους φαγοσωμικής μεμβράνης εξασφαλίζει την επιβίωση του βακτηρίου, προλαμβάνοντας την ωρίμαση του φαγοσώματος στο φαγολυσοσωμικό στάδιο. Το ποσοστό των κυττάρων που καταφέρνουν να επιβιώσουν όταν απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή ανέρχεται στο 10%, ενώ 90% αυτών των κυττάρων

τελικά καταστρέφονται με διάφορους μηχανισμούς. Όταν πλέον ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχει απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να πολλαπλασιαστεί αλλά και να περάσει από κύτταρο σε κύτταρο. Η πρωτεΐνη ActA συμμετέχει στο μηχανισμό πολυμερισμού της ακτίνης (Southwick and Purich, 1996) του κυττάρου ξενιστή, κατά τον οποίο δίνεται ώθηση στο βακτηριακό κύτταρο ώστε να κινηθεί μέσα στο κύτταρο-ξενιστή ή ακόμα και από κύτταρο σε κύτταρο με τη δημιουργία προεξοχής στην κυτταρική μεμβράνη που μπορεί να εισχωρήσει στο γειτονικό κύτταρο του ξενιστή και να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμά του όπως και στην περίπτωση του φαγοσώματος (Robbins et al., 1999).

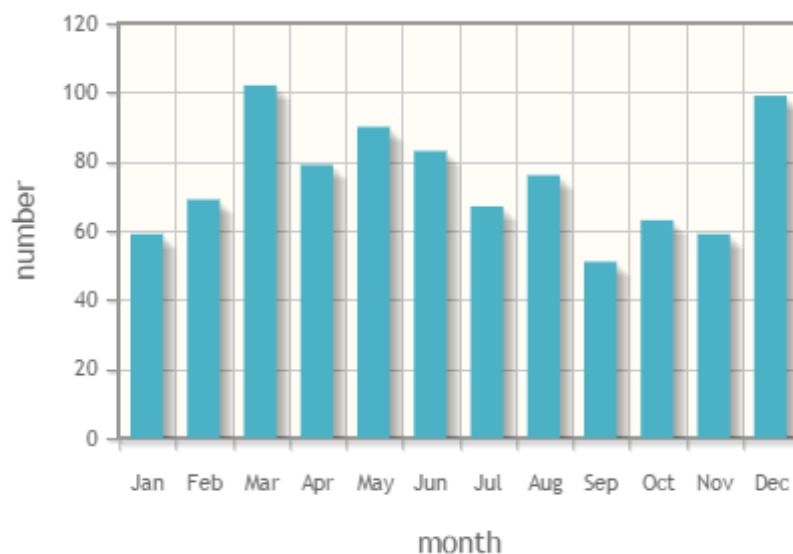
Ένας από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη λοιμοξιογόνο δράση του μικροοργανισμού είναι η θερμοκρασία. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια, ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε θερμοκρασία 4°C, παρουσίασε αυξημένη λοιμοξιογόνο δράση γεγονός που σχετίζεται άμεσα με τα τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη (Czurzynski et al., 1989). Ακόμη, ο σίδηρος που υπάρχει στο μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξή του. Η μειωμένη συγκέντρωση του σιδήρου αυξάνει την σύνθεση της αιμολυσίνης LLO και κατά συνέπεια την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. (Tanycz and Ziegler, 1988).



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* εντός του ξενιστή (Pamer, 2004).

1.1.4 Κρούσματα λιστερίωσης

Στις περιπτώσεις που η λιστερίωση εξελίσσεται με την επιδρομική μορφή της (invasive disease) μπορεί να προκαλέσει ακόμα και θάνατο σε ποσοστό 20-30%, για αυτό και θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς κινδύνους για την δημόσια υγεία. Σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control and Prevention), η λιστερίωση είναι η τρίτη αιτία θανάτου από τροφιμογενή λοίμωξη με 260 θανάτους το χρόνο. Σχεδόν κάθε ασθενής που προσβάλλεται από τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* νοσηλεύεται στο νοσοκομείο, ενώ 25% των περιπτώσεων που έγκυες προσβάλλονται από το βακτήριο καταλήγουν σε αποβολή του εμβρύου ή σε θάνατο του νεογέννητου. Στις Ηνωμένες πολιτείες, σύμφωνα με τον ετήσιο απολογισμό, καταγράφηκαν 0,24 περιπτώσεις ανά πληθυσμό 100.000 ενώ παράλληλα αν και τα καταγεγραμμένα κρούσματα ετησίως ανέρχονται στα 800, υπολογίζονται τα διπλάσια σε αριθμό καθώς είναι πολλές οι περιπτώσεις στις οποίες δεν γίνεται διάγνωση ή αναφορά της νόσου. Σύμφωνα με το CDC το 2015 (Σχήμα 1.2), στην Αμερική καταγράφηκαν 897 κρούσματα και 14 θάνατοι. Σύμφωνα με το CDC, στην Αμερική, 2 άντρες νόσησαν από λιστερίωση το 2014, μετά από κατανάλωση φρέσκου απαστεριώτου σοκολατούχου γάλακτος, καθώς επίσης, το 2010 και το 2014, μετά από κατανάλωση μαλακών τυριών επιμολυσμένων με τον συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό, νοσηλεύτηκαν 30 και 5 άτομα, αντίστοιχα (CDC, 2014).

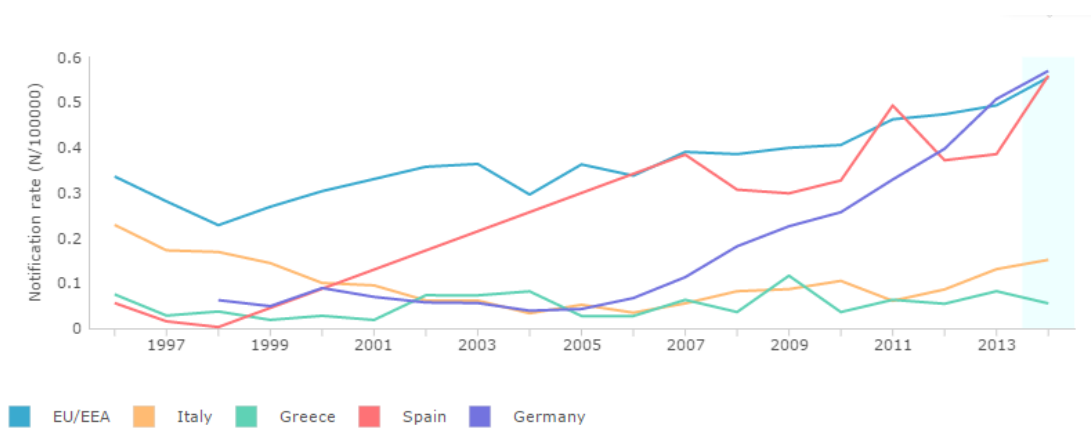


Σχήμα 1.2: Αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης ανά μήνα (CDC, 2015).

Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.3) τα κρούσματα που καταγράφηκαν στην Ευρώπη παρουσίασαν αύξηση από το 1997 ως το 2013

(European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). Παρόμοια αύξηση παρατήρησε και η ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων EFSA, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία που έχει συλλέξει, από το 2008 έως το 2015. Το 2015 καταγράφηκαν 2.206 περιστατικά λιστερίωσης στην Ευρώπη σύμφωνα με την EFSA, αριθμός που αντιστοιχεί σε 0,46 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμό. Από αυτά τα περιστατικά τα 270 οδήγησαν σε θάνατο, και αποτέλεσαν το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων εξαιτίας λιστερίωσης από το 2008. Ωστόσο τα περισσότερα κρούσματα αφορούσαν σε ηλικιωμένα άτομα άνω των 64 ετών (EFSA, 2015). Τα κρούσματα λιστερίωσης που έχουν καταγραφεί για τη χώρα μας ήταν 3 το 2004, 8 το 2005, 7 το 2006, 10 το 2007, 1 το 2008, 4 το 2009 και 10 το 2010 (EFSA and CDC, 2010, 2011, 2012).

Οι λόγοι για τους οποίους τα κρούσματα λιστερίωσης αυξήθηκαν με την πάροδο του χρόνου δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, οι Cairns και Payne προτείνουν πως είναι συνέπεια της αλλαγής της πολιτικής των κυβερνήσεων απέναντι στη βιομηχανία τροφίμων και την παρασκευή, προετοιμασία και διανομή των τροφίμων (Cairns and Payne 2009), ενώ ο Goulet υποθέτει πως σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι συστάσεις για την μείωση του αλατιού που έγιναν το 2002, με αποτέλεσμα την μείωση του αλατιού στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, που έχει ως συνέπεια την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης λιστερίωσης, στην περίπτωση που το τρόφιμο έχει μολυνθεί από τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* και καταναλώνεται από άτομο που ανήκει σε ευαίσθητη πληθυσμιακή ομάδα (Goulet et al., 2008).



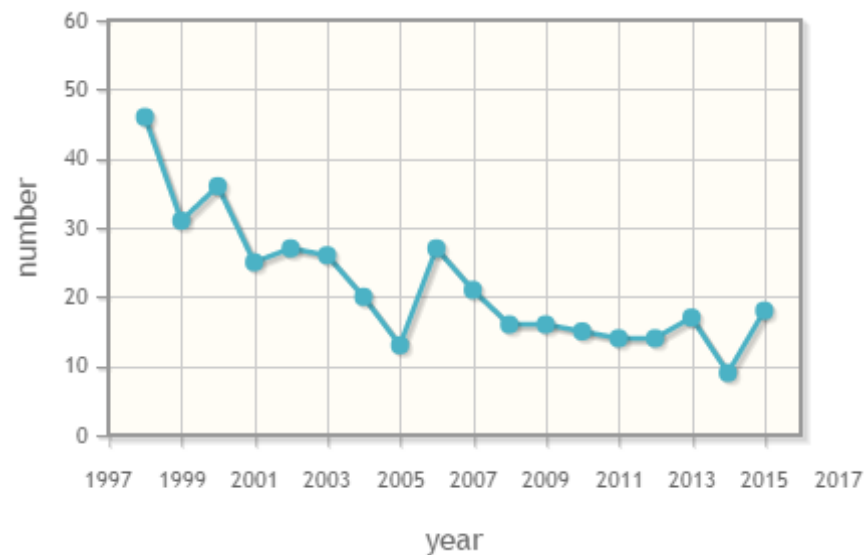
Σχήμα 1.3: Κρούσματα λιστερίωσης σε 4 ευρωπαϊκές χώρες 1997-2013 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2014).

Όπως προαναφέρθηκε οι ορότυποι που σχετίζονται με τη λοίμωξη στον άνθρωπο είναι οι 1/2a, 1/2b και 4b. Στην Ευρώπη τα κρούσματα λιστερίωσης αποδίδονται στον ορότυπο 4b, ενώ στην Αμερική ισοκατανέμονται και στους τρεις οροτύπους (Gellin et al., 1991).

Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και μπορεί να εντοπιστεί σε πολλά ενδιαίτηματα όπως χώμα, νερό, φυτά, περιττώματα ζώων και τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα τελευταία αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα που σχετίζεται με τη μετάδοση του παθογόνου *L. monocytogenes* στους ανθρώπους, που μπορεί να οδηγήσει σε σποραδικές περιπτώσεις ή μαζικά κρούσματα λιστερίωσης. Τα τρόφιμα που συνδέονται με περιπτώσεις λιστερίωσης, ωμά αλλά και επεξεργασμένα, είναι πολλά και περιλαμβάνουν γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, τυριά, λαχανικά, κρέας και προϊόντα κρέατος, θαλασσινά και ψάρια (Gandhi and Chikindas, 2007). Ο άνθρωπος μπορεί να προσβληθεί είτε καταναλώνοντας κάποιο μολυσμένο τρόφιμο είτε ερχόμενος σε άμεση επαφή με κάποιο ζώο που νοσεί.

Οι διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια, που τείνουν προς τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη, για λόγους ευκολίας, επηρέασαν σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη των κρουσμάτων λιστερίωσης (Gandhi and Chikindas, 2007). Πολλά από τα τρόφιμα που έχουν συνδεθεί με κρούσματα λιστερίωσης είναι έτοιμα προς κατανάλωση. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την EFSA, το 2007 βρέθηκε *L. monocytogenes* στο 1,8% των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος, στο 1% των μαλακών και ημίσκληρων τυριών που παρασκευάστηκαν από χαμηλής θερμικής επεξεργασίας ή νωπό γάλα και στο 18,3% των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων ψαριού, που ελέγχθηκαν (EFSA, 2007). Ένας από τους λόγους που αυξήθηκαν τα κρούσματα λιστερίωσης στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, είναι η τάση που παρατηρείται στην αύξηση του χρόνου ζωής αυτών των προϊόντων. Το παθογόνο βακτήριο έχει δυνητικά περισσότερο χρόνο για αναπτυχθεί αν οι συνθήκες του το επιτρέψουν. Και επιπλέον, το τρόφιμο, δεν θα υποστεί κάποια περαιτέρω επεξεργασία πριν την κατανάλωσή του, γεγονός που επιβαρύνει την ασφάλειά του (Allerberger and Wagner, 2010).

Γαλακτοκομικά προϊόντα επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* εμπλέκονται στα μισά περίπου περιστατικά λιστερίωσης στην Ευρώπη (Lundén et al.,2004). Από το 1998 έως το 2015 το CDC κατέγραψε 391 κρούσματα λιστερίωσης που προκλήθηκαν από την κατανάλωση μολυσμένου τυριού, 19 από τα οποία κατέληξαν σε θάνατο (Σχήμα 1.4). Κάποια από τα περιστατικά που αξίζει να αναφερθούν είναι τα 33 κρούσματα που καταγράφηκαν στην Σουηδία το 2001 και τα 12 στην Ελβετία το 2005, εκ των οποίων 3 κατέληξαν σε θάνατο, από μαλακά τυριά. Επιπλέον, το 1989 στο Λουξεμβούργο καταγράφηκαν 2 κρούσματα από κατανάλωση τυριού Camembert και το μεγαλύτερο καταγεγραμμένο περιστατικό έλαβε χώρα το 2006-2007 στη Γερμανία με 189 καταγεγραμμένα κρούσματα, στα οποία προκλήθηκε λοίμωξη μετά από κατανάλωση τυριού από παστεριωμένο γάλα που έπηξε με οργανικό οξύ, (Kousta et al., 2010).



Σχήμα 1.4: Αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης που προκλήθηκαν από κατανάλωση τυριού ανά έτος (CDC, 2015).

1.2 Τυριά

1.2.1 Ιστορική αναδρομή του τυριού

Το τυρί ή τυρός στην Αρχαία διάλεκτο, μπορεί να προέρχεται από το ρήμα *τορέω*, που σημαίνει διατρυπώ και επομένως μπορεί να αναφέρεται στις οπές του προϊόντος. Ίσως όμως και να προέρχεται από το ρήμα *τορεύω*, που σημαίνει καλουπώνω επειδή μερικά τυριά απαιτούν καλούπια.

Η ιστορία του τυριού αρχίζει το 8.000 π.Χ. όταν στα οροπέδια του Ιράν, για πρώτη φορά πάνω στον πλανήτη εξημερώθηκαν τα πρώτα μηρυκαστικά, η κατσικά και η προβατίνα. Ο Αριστοτέλης και ο Διοσκουρίδης, έδωσαν τις πρώτες συνταγές για την παραγωγή τυριού. Σε τραγωδίες και κωμωδίες έχουμε μέχρι και συνταγή παρασκευής τυριού με χρήση γάλακτος συκιάς ως πυτιά. Οι Ρωμαίοι υπήρξαν σπουδαίοι τυροκόμοι και φίλοι του τυριού. Κατά την διάρκεια της Βυζαντινής αυτοκρατορίας στον ελληνικό χώρο η τυροκομία ήταν πολύ εκτεταμένη. Μαρτυρίες μιλούν για το βλάχικο τυρί και τις μυζήθρες, από όπου πήρε το όνομά του και ο Μυζηθράς-Μιστράς. Κατά την διάρκεια της Τουρκοκρατίας στα βουνά της ηπειρωτικής Ελλάδας και των νησιών, η παραγωγή συνεχίστηκε. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, το νεοσύστατο ελληνικό κράτος με τους υπουργούς του και ιδιαίτερα τον Εμμανουήλ Μπενάκη, έγινε κατανοητή η οικονομική σημασία της κτηνοτροφίας για αυτό και ανατέθηκε στον τυροκόμο Ραϋμόνδο Δημητριάδη να εκπαιδεύσει τους νέους τυροκόμους της χώρας. Στην εξέλιξη της χώρας οργανώθηκε η Γεωπονική Σχολή όπου εκατοντάδες νέοι γεωπόνοι έμαθαν την τέχνη. Αργότερα συγκροτήθηκε η Εθνική Επιτροπή Γάλακτος, η οποία προωθεί με κάθε τρόπο τα συμφέροντα των τυροκόμων.

1.2.2 Τα τυριά ως έτοιμο προς κατανάλωση (ready to eat) τρόφιμο

Σύμφωνα με το Άρθρο 2 του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005, για τα μικροβιολογικά κριτήρια των τροφίμων, ως έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (EKT, Ready To Eat) ορίζονται τα τρόφιμα 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 παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ σύμφωνα με το FDA (Food and Drug Administration) τα ΕΚΤ δύναται να καταναλωθούν χωρίς να είναι απαραίτητη οποιαδήποτε επιπλέον προετοιμασία τους, για να θεωρηθούν ασφαλή προς κατανάλωση. Ωστόσο, επιτρέπεται να δεχτούν επιπλέον επεξεργασία με στόχο την οργανοληπτική τους βελτιστοποίηση. Στα ΕΚΤ ανήκουν τα νωπά προϊόντα ζωικής προέλευσης, τα οποία είναι μαγειρεμένα σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα νωπά φρούτα και λαχανικά αλλά και 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, καρκεύματα, 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) και τέλος τα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας, που βρίσκονται σε ερμητικά κλειστές συσκευασίες (FDA, 2009).

Ένα από τα είδη των ΕΚΤ είναι τα τυριά. Αρχικά, ο Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1973) όρισε ως τυρί, 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. Αργότερα, το 2011, ο ορισμός επαναδιατυπώθηκε ως εξής:

«Τυρί είναι το μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό προϊόν ωρίμασης 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 :

(α) την πήξη, μερική ή ολική, πρωτεΐνης γάλακτος, αποβουτυρωμένου γάλακτος, μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος, κρέμας, κρέμας ορού γάλακτος ή βουτύρου 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

(β) 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)».

Ένας ακόμα ορισμός έχει διατυπωθεί στον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, το 2003: Τυριά από γάλα με ωρίμαση είναι τα προϊόντα ωρίμασης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένα από τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν με την επενέργεια πυτιάς, ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα, σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγμα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα).

Οι διατροφικές συνήθειες των λαών ανά τον κόσμο καθορίζονται από πολλούς παράγοντες. Η γεωγραφική θέση, η ιστορική εξέλιξη και ένα σύνολο κοινωνικοοικονομικών παραγόντων αποτελούν το συνονθύλευμα που διαμορφώνει αυτές τις συνήθειες. Ο σύγχρονος ρυθμός ζωής, του οποίου η ταχύτητα συνεχώς αυξάνεται, δεν επιτρέπει στους ανθρώπους να διαθέσουν τον απαιτούμενο χρόνο στην παρασκευή των γευμάτων τους. Κατά συνέπεια, έχει αυξηθεί η κατανάλωση των ΕΚΤ, αφού δεν χρειάζονται κάποια περαιτέρω διαδικασία για να καταναλωθούν. Ακόμη, διαφορές στις διατροφικές συνήθειες παρατηρούνται όχι μόνο όσον αφορά τον χρόνο που διαθέτουν οι άνθρωποι στην παρασκευή των γευμάτων τους αλλά και στις ίδιες τους τις διατροφικές επιλογές. Το 2003 πραγματοποιήθηκε μία μελέτη με στόχο να εκτιμηθούν οι διαφορές στην κατανάλωση τυριού και γάλακτος στις διάφορες κοινωνικοοικονομικές ομάδες της Ευρώπης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι οι υψηλότερες κοινωνικοοικονομικά ομάδες καταναλώνουν μεγαλύτερη ποσότητα τυριού (Sanchez-Villegas, 2003). Για το 2015 οι τρεις χώρες με την μεγαλύτερη κατανάλωση τυριού ετησίως ήταν η Δανία, η Φιλανδία και η Γαλλία ενώ την μικρότερη κατανάλωση παρουσίασε η Ισπανία, δεδομένα που απεικονίζονται στον πίνακα 1.2. Ωστόσο στον παρακάτω πίνακα δεν φαίνεται η κατανάλωση της Ελλάδας, η οποία για το 2013 ήταν η χώρα με την μεγαλύτερη κατά κεφαλήν κατανάλωση τυριού (31 Kg) πανευρωπαϊκά.

Πίνακας 1.2: Ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση τυριού σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (International Dairy Federation and Statistics Canada,2016).

	2010	2011	2012	2013	2014	2015
European Union (28)	17.2	17.3	17.3	17.9	18.1	18.3
Austria	18.2	20	20.3	19.9	20.9	21.5
Belgium	16	15.3	15.3	15	15.1	14.9
Bulgaria	15.9	16.4	15.8	15.6
Croatia	8.7	7.7	9.6	10.2	11.2	12.3
Cyprus	21.6	18.1	18.1	25.5	19.2	24.2
Czech Republic	16.5	16.2	16.6	16.2	16.6	16.6
Denmark	19.4	20.2	24.5	26.2
Estonia	19.6	20.8	21	21.3	21.5	16.3
Finland	21.4	22.5	23.7	24.7	25.6	26.7
France	26.6	26.2	26.1	26.2	26.7	26.8
Germany	23.5	24.2	24.2	23.7	24.1	24.6
Hungary	11.5	11	11.5	11	11.6	12.9
Ireland	7.3	6.9	10.7	10.8	11.2	13.8
Italy	21.1	22.3	21.4	22.3	22.1	21.5
Latvia	14.4	14.3	16	18.1	17.6	20.3
Lithuania	13.9	16.1	17.5	20.1	18.6	18.3
Luxembourg	26.4	24.2	24.4	25.6	25.6	22.8
Netherlands	19.5	18.5	21.3	20.1	18.2	18.2
Poland	11.3	11.4	15.6	15.6	15.4	16.1
Slovakia	10	10.3	10.1	11.4	11.5	12.2
Spain	9.5	9.5	9.3	9.5	9.5	8.9
Sweden	18.9	19	19.7	19.7	20.6	20.7
United Kingdom	11.3	11	11.4	11.4	11.6	12.1

1.2.3 Παρασκευή τυριών – τυροκόμηση

Η παρασκευή των περισσότερων τυριών ξεκινάει με την ενζυμική πήξη του γάλακτος, το οποίο έχει παστεριωθεί και ψυχθεί στους 32-34°C, που πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, την ενζυμική και την μη ενζυμική. Κατά την ενζυμική φάση πραγματοποιείται υδρόλυση της σταθεροποιητικής κ-καζεΐνης στον πεπτιδικό δεσμό Phe105-Met106 από το πρωτεολυτικό ένζυμο χυμοσίνη, που είναι το κύριο πρωτεολυτικό ένζυμο της πυτιάς και ονομάζεται και πηκτικό ένζυμο του γάλακτος. Από την υδρόλυση αυτή παραλαμβάνεται παρακαζεΐνη, που περιλαμβάνει το N τελικό άκρο της καζεΐνης και είναι αδιάλυτη. Με τον όρο πυτιά, εννοούμε το εκχύλισμα του 4^{ου} στομαχιού των νεαρών μη απογαλακτισμένων μοσχαριών, αρνιών ή κατσικιών, το οποίο περιέχει 80% χυμοσίνη και 20% πεψίνη. Η πυτιά χρησιμοποιείται ευρέως κατά την τυροκόμηση αν και πλέον υπάρχουν και άλλα ένζυμα πήξης αλλά και μέθοδοι για την τυροκόμηση. Η δεύτερη φάση της τυροκόμησης, η μη ενζυμική, περιλαμβάνει την συσσωμάτωση των αποσταθεροποιημένων καζεϊνικών μικκυλίων παρουσία ιόντων ασβεστίου σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 20°C. Πιο συγκεκριμένα, η χυμοσίνη έρχεται σε επαφή με την εξωτερική στρώση κ-καζεΐνης των μικκυλίων του γάλακτος, τα οποία αποσταθεροποιούνται καθώς απομακρύνεται το μακροπεπίδιο, που είναι το διαλυτό τμήμα της κ-καζεΐνης. Τέλος, λαμβάνει χώρα η κροκκίδωση των αποσταθεροποιημένων μικκυλίων μέσω των ιόντων ασβεστίου. Συνεπώς, δημιουργείται ένα τρισδιάστατο καζεϊνικό πλέγμα, το τυρόπηγμα, που συνδέεται διαμέσου γεφυρών ασβεστίου και μέσα στο οποίο περικλείονται τα λιποσφαίρια και μέρος του ορού γάλακτος. Το πήγμα αυτό, που παρουσιάζει μεγάλη ικανότητα συναίρεσης, δηλαδή μπορεί να αποβάλει ορό και να συρρικνώνεται, αποκτώντας μεγάλη ελαστικότητα χωρίς να θρυμματίζεται, ονομάζεται και πήγμα φωσφοροπαρακαζεϊνικού ασβεστίου. Επιπλέον, θα μπορούσε κανείς να πει πως, η παραγωγή του τυροπήγατος είναι μια διεργασία συμπύκνωσης κατά την οποία το λίπος του γάλακτος και η καζεΐνη συμπυκνώνονται 10 φορές περίπου, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού, η λακτόζη και τα διαλυτά άλατα απομακρύνονται με το τυρόγαλα. Συνεπώς, το τυρί έχει αυξημένη περιεκτικότητα σε καζεΐνη και λίπος.

Το δεύτερο βήμα της παραγωγικής διαδικασίας της τυροκόμησης είναι η διαίρεση του τυροπήγατος και η αναθέρμανσή του, για τα ημίσκληρα τυριά στους

33-35°C ενώ για τα σκληρά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 38°C, με σκοπό την αφαίρεση τυρογάλακτος. Έτσι γίνεται η απομάκρυνση του ορού από το πήγμα σε ποσοστό 10-20% του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε. Ακολουθεί το αλάτισμα μέχρι το προϊόν να έχει 1-4% τελική περιεκτικότητα σε αλάτι. Το αλάτισμα πραγματοποιείται είτε με την τοποθέτηση αλατιού στην επιφάνεια του τυριού (ξηρή αλάτιση) είτε με την εμβάπτιση του τυριού σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (υγρή αλάτιση). Σκοπός της αλάτισης είναι η βελτίωση της γεύσης και της υφής αλλά και η επιμήκυνση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Η παραγωγική διαδικασία ολοκληρώνεται με την σχηματοδότηση του τυροπήγματος σε καλούπια υπό πίεση και την ωρίμαση κατά την οποία διαμορφώνεται η γεύση και το άρωμα του τυριού εξαιτίας βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα.

Σε κάποιες κατηγορίες τυριών χρησιμοποιούνται καλλιέργειες εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) ή ακόμα και άλλα είδη μικροοργανισμών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πέρα από τη μείωση του pH επιτυγχάνουν και την υδρόλυση του λίπους κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Η οξυγαλακτική καλλιέργεια προστίθεται σε αναλογία 1%. Άλλες καλλιέργειες πέραν των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δευτερεύουσες, είναι αυτές των μυκήτων, π.χ. *Penicillium*, που προσδίδουν μικκυλιακές υφές στην επιφάνεια και το εσωτερικό των τυριών. Παράδειγμα είναι τα τυριά Roquefort, Brie και Camembert. Τέλος, οι χαρακτηριστικές οπές που διαθέτουν τυριά όπως το Emmental, προέρχονται από προπιονικές καλλιέργειες (π.χ. *Propionibacterium shermanii*), οι οποίες ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ προς προπιονικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο ευθύνεται για τις οπές.

Πολύ σημαντική λεπτομέρεια είναι η θερμοκρασία του γάλακτος. Σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 52°C, η πυτιά αδρανοποιείται ενώ σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 41°C ή μεταξύ 10-20°C, η πήξη καθυστερεί. Τέλος, σε θερμοκρασία μικρότερη των 10°C δεν πραγματοποιείται καθόλου πήξη. Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την πήξη του γάλακτος είναι το pH, όπου σε χαμηλό pH η πήξη επιταχύνεται ενώ σε pH μεγαλύτερο του 7 δεν πραγματοποιείται πήξη. Τελευταίος και εξίσου σημαντικός παράγοντας της πήξης είναι τα ιόντα ασβεστίου, που όπως προαναφέρθηκε συμμετέχουν στην δεύτερη φάση της πήξης. Συχνά γίνεται προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου σε αναλογία 10-20g σε 100L γάλακτος, διότι κατά την παστερίωση του γάλακτος, που χρησιμοποιείται για την θανάτωση των παθογόνων

μικροοργανισμών, το διαλυτό ασβέστιο του γάλακτος μειώνεται με αποτέλεσμα να καθυστερεί η πήξη. Με την προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου αυξάνεται η συγκέντρωση αυτών των ιόντων αλλά επιτυγχάνεται και η ταυτόχρονη μείωση του pH. (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009).

1.2.4 Κατηγορίες τυριών

Από τους παραπάνω ορισμούς, μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα τυριά διακρίνονται σε ώριμα και φρέσκα. Τα ώριμα τυριά ή τυριά ωρίμασης, είναι εκείνα που δεν προορίζονται για κατανάλωση αμέσως μετά την παρασκευή τους, σε αντίθεση με τα φρέσκα τυριά που μπορούν να καταναλωθούν αμέσως μόλις τελειώσει επεξεργασία τους (Fox et al., 2000). Η ωρίμαση πραγματοποιείται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Πρέπει να παρέλθει ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος θα τροποποιηθούν χάρη στην πραγματοποίηση μιας σειράς βιοχημικών αντιδράσεων. Στις βασικές αλλαγές που πραγματοποιούνται περιλαμβάνεται ο μεταβολισμός της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ, η υδρόλυση των πρωτεϊνών (πρωτεόλυση) και η υδρόλυση του λίπους (λιπόλυση). Τα προϊόντα αυτών των μεταβολών είναι αυτά που δίνουν τη βασική γεύση στα τυριά, ωστόσο η περαιτέρω μετατροπή αυτών των προϊόντων σε πηκτικά συστατικά κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, είναι αυτή που χαρίζει τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε κάθε τυρί ωρίμασης (Κουτίνας και Κανελλάκη, 2006).

Πέραν όμως αυτής της κατηγοριοποίησης, υπάρχουν πολλές ακόμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τα τυριά. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους σε αγελαδινά, πρόβεια, κατσικίσια, με βάση την πρώτη ύλη σε τυριά από γάλα, από τυρόγαλα, ανακατεργασμένα τυριά, με βάση το ποσοστό υγρασίας σε σκληρά και μαλακά, με βάση τη λιποπεριεκτικότητα για παράδειγμα σε άπαχα και με βάση την τεχνολογία παρασκευής τους, για παράδειγμα σε τυριά που ωριμάζουν παρουσία μυκήτων όπως το Roquefort (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009).

1.2.5 Ricotta

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμαση, είναι τα τυριά, τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση του τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα), βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξερά) και άλλα κατόπιν ωρίμασης και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%. Η Ricotta ανήκει στα τυριά από τυρόγαλα που πήζουν με τη χρήση οξέος σε συνδυασμό με θέρμανση (acid heat coagulated cheeses) και όχι πυτιάς και είναι παραδοσιακό φρέσκο ιταλικό τυρί. Διαθέτει μαλακή κρεμώδη υφή, λευκό χρώμα, γλυκιά και ελαφριά γεύση με επίγευση ξηρών καρπών και καραμέλας (Guinee et al., 1999). Κατά την παρασκευή αυτών των τυριών αξιοποιείται το τυρόγαλα, που είναι υποπροϊόν της τυροκόμησης. Τα χαρακτηριστικά που πληροί αυτή η κατηγορία τυριών είναι 60-70% υγρασία και 50-70% λίπος επί της ξηρής ουσίας.

Για την παρασκευή του τυριού Ricotta τυρόγαλο φιλτράρεται για την απομάκρυνση τεμαχίων τυροπήγματος και ελέγχεται η οξύτητά του ώστε να είναι $pH > 6$. Έπειτα προστίθεται κρέμα γάλακτος και γίνεται θέρμανση με παροχή ατμού μέχρι τους $65^{\circ}C$, όπου και προστίθεται γάλα και αλάτι. Ακολουθεί η οξίνιση του μίγματος με κιτρικό ή γαλακτικό οξύ έως ότου το pH να είναι 5,9-5,4 και σε πέντε λεπτά αρχίζει η πήξη. Αρχικά, σχηματίζεται αφρός στην επιφάνεια εξαιτίας των πρώτων πρωτεϊνών που κατακρημνίζονται, ο οποίος αφαιρείται. Όταν πλέον όλο το μίγμα έχει πήξει και έχει έρθει στην επιφάνεια διακόπτεται η θέρμανση και αρχίζει η συλλογή του τυριού και τοποθετείται σε ειδικά καλούπια. Εκεί παραμένει για 24 ώρες σε δροσερούς θαλάμους μέχρι να στραγγίσει και έπειτα συσκευάζεται (Κυριακόπουλος, 1995).

1.2.6 Camembert

Το Camembert είναι ένα τυρί που παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1791 από τη Marie Harel στο χωριό Camembert της Νορμανδίας. Πρόκειται για μαλακό τυρί. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως τα μαλακά τυριά έχουν 55-80% υγρασία, η πήξη του γάλακτος γίνεται με λίγη ως καθόλου πυτιά, παρουσιάζουν

περιορισμένη πρωτεόλυση ή λιπόλυση, η διαίρεση του τυροπήγματος είναι ατελής ή παραλείπεται εντελώς, και τέλος αναπτύσσουν υψηλή οξύτητα.

Το πιο βασικό χαρακτηριστικό αυτού του τυριού είναι η ωρίμασή του με την προσθήκη καλλιέργειας *Penicillium camemberti* στην επιφάνειά του, που προσδίδει άρωμα, γεύση και την χαρακτηριστική λευκή επικάλυψη εξαιτίας των κονιδιοφόρων του συγκεκριμένου μύκητα. Αν και ο *Penicillium camemberti* είναι ο μύκητας που χρησιμοποιείται παραδοσιακά, σήμερα κατά τη βιομηχανική παρασκευή του Camembert χρησιμοποιείται ο *Penicillium candidum*, ο οποίος δίνει πιο λευκό χρώμα στην επιφάνεια των τυριών. Μερικές από τις ενώσεις που συμμετέχουν στη χαρακτηριστική γεύση του Camembert, είναι η αμμωνία, το N-ισοβουτυλακεταμίδιο, το ισοβαλεριανικό, ισοβουτυρικό, υδροξυβενζοϊκό και το υδροξυφαινυλακετικό οξύ, που σχηματίζονται ως μεταβολικά προϊόντα των βιοχημικών διεργασιών που συμβαίνουν (Fox et al., 2000).

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό είναι η προχωρημένη πρωτεόλυση, στην οποία οφείλεται η μαλακή έως κρεμώδης υφή αυτού του τυριού, ανάλογα με τη διάρκεια ωρίμασής του. Το Camembert έχει πάντα συγκεκριμένο μέγεθος, σχετικά μικρής διαμέτρου διότι αν ήταν μεγαλύτερα θα ωρίμαζαν γρήγορα εξωτερικά και αργά μέσα. Η μέση σύσταση του Camembert είναι 52% υγρασία, 24-28% λίπος, 17-21% πρωτεΐνη και 2,6% αλάτι. Οι ζύμες και οι μύκητες της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας, μεταβολίζουν τη λακτόζη προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό, οδηγώντας σε μια σημαντική αύξηση του pH του τυριού και κυρίως της επιφάνειάς του. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα πρωτεόλυση στην επιφάνεια και παραγωγή αμμωνίας από την απαμίνωση των εναπομενοντών αμινοξέων, γεγονός που συμμετέχει στην αύξηση του pH (Fox et al., 2000).

Η τυροκόμηση αυτού του τυριού ξεκινάει με παστεριωμένο αγελαδινό γάλα λιποπεριεκτικότητας 3,5% το οποίο παστεριώνεται και εν συνεχεία ψύχεται στους 32-34°C. Ακολουθεί η προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας σε αναλογία 1,5-2,5% σπόρια μικκυλίου, που θα εξασφαλίσει την μείωση του pH και την μετέπειτα στράγγιση του τυριού, ενώ παραλείπεται το χλωριούχο νάτριο. Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται καροτενοειδή και αννάτο για την χρώση του. Όταν παρέλθει μία ώρα προστίθεται ποσότητα πυτιάς που οδηγεί στην πήξη του τυροπήγματος σε 25 λεπτά. Μετά από 70 λεπτά το πήγμα διαιρείται και μεταφέρεται

αφού παραμείνει διαιρεμένο για 15 λεπτά, σε καλούπια. Έτσι στραγγίζει από το τυρόγαλα μέχρι να παραμείνει το μισό του αρχικού βάρους του. Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται αναστροφή των καλουπιών που επαναλαμβάνεται 3-4 φορές. Μετά την στράγγιση ακολουθεί η αλάτιση είτε με λεπτόκοκκο αλάτι είτε με άλμη. Τέλος, τα τυριά ψεκάζονται επιφανειακά με σπόρια του μύκητα *Penicillium camemberti* και τοποθετούνται σε θάλαμο θερμοκρασίας 11-14°C και σχετικής υγρασίας μεγαλύτερης του 90% για να ωριμάσουν 10-12 ημέρες (σύντομης ωρίμασης) (Ανυφαντάκης, 1993). Εκτός όμως από τον επιφανειακό εμβολιασμό τα τελευταία χρόνια, σε βιομηχανικό επίπεδο, ο *Penicillium camemberti*, δύναται να προστεθεί στο γάλα μαζί με την εναρκτήρια καλλιέργεια οξυγαλακτικών και επειδή ο μύκητας αυτός είναι υποχρεωτικά αερόβιος αναπτύσσεται μόνο στην επιφάνεια του τυριού (Fox et al., 2000). Τέλος, εναλλακτικές συνθήκες ωρίμασης, συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης ενζύμων που επιταχύνουν και ενισχύουν την ωρίμαση του Camembert, επιτρέπονται εφόσον δίνουν το ίδιο οργανοληπτικό αποτέλεσμα με τις κλασικές μεθόδους ωρίμασης (Codex Alimentarius, 2011).

1.2.7 Πηγές μόλυνσης και παθογόνοι μικροοργανισμοί των τυριών

Οι πηγές μόλυνσης των γαλακτοκομικών προϊόντων, και των τυριών ειδικότερα, με παθογόνους μικροοργανισμούς είναι πολλές. Ωστόσο οι πιο σημαντικές είναι το νωπό γάλα που χρησιμοποιείται κατά την τυροκόμηση και οι χώροι των βιομηχανιών που παράγουν τυριά. Για να μολυνθούν τα τυριά είναι πολύ πιθανόν να έχουν λάβει χώρα κακοί χειρισμοί κατά την παραγωγή και τη διανομή τους, με αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη επιμόλυνσή τους (cross contamination). Η μετακίνηση των τυριών κατά μήκος της παραγωγικής αλυσίδας του τροφίμου (supply chain) και ο αυξημένος αριθμός χειρισμών που αυτή η μετακίνηση συνεπάγεται, για παράδειγμα η κοπή του τυριού αρχικά σε κομμάτια και έπειτα σε φέτες και η μεταφορά του σε δοχεία ή χαρτί, αυξάνει όχι μόνο τον κίνδυνο για cross contamination αλλά και τη δυσκολία της ιχνηλασιμότητας του προϊόντος, με αποτέλεσμα αυτή η επιμόλυνση να εξαπλωθεί γεωγραφικά με την παράλληλη μετακίνηση του επιμολυσμένου προϊόντος (Sauders and D'Amico, 2016). Κατά τη διαδικασία της τυροκόμησης οι εναρκτήριες καλλιέργειες, η άλμη, τα δάπεδα, τα υλικά συσκευασίας, τα καλούπια, τα μαχαίρια κοπής και ο αέρας στους χώρους

αποθήκευσης-ψύξης και επεξεργασίας είναι μερικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν επιμόλυνση των τυριών (Temeli et al., 2006, Brito et al., 2008). Ακόμα και ο άνθρωπος μπορεί να προκαλέσει τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τους Andre et al. (2008), το ακατέργαστο γάλα αποτελεί την νούμερο ένα πηγή μόλυνσης των τυριών. Τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί ανιχνεύθηκαν στο γάλα από τα σιλό και τις δεξαμενές που αυτό συλλέγεται.

Οι πέντε κύριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται σε κρούσματα με σοβαρά συμπτώματα, που συνδέονται με επιμολυσμένα τυριά είναι οι μικροοργανισμοί *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 *Salmonella* spp., και *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *Escherichia coli* O157:H7 εντοπίζονται κυρίως στα κόπρανα των ζώων (Van Kessel et al., 2004).

Οι εγκαταστάσεις των τυροκομικών επιχειρήσεων βρίσκονται συχνά μολυσμένες με *L. monocytogenes*. Οι Cox et al. (1989) βρήκαν πως 2.9% των δειγμάτων από τον εξοπλισμό εργοστασίου επεξεργασίας τυριού βρέθηκε θετικό στην παρουσία *L. monocytogenes*, ενώ οι Kells and Gilmour (2004) ανίχνευσαν επιμόλυνση στον εξοπλισμό συσκευασίας σε 2 εργοστάσια. Σε μελέτη που έγινε, το 5,1% των δειγμάτων που λήφθηκαν από τον εξοπλισμό και το 14,7% των περιβαλλοντικών δειγμάτων αυτών των επιχειρήσεων, βρέθηκαν επιμολυσμένα (Pritchard et al., 1995). Οι Ryser και Marth επιβεβαίωσαν πειραματικά την ικανότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* να πολλαπλασιάζεται στο τελικό στάδιο της ωρίμασης του τυριού Camembert (1987) ενώ οι Rosenow και Marth παρατήρησαν επιβίωσή του έπειτα από 18 ημέρες ωρίμασης (1987). Επιπλέον πέραν των επιμολυσμένων τυριών που βρέθηκαν σε σχετικές βιομηχανίες, έχουν απομονωθεί δείγματα επιμολυσμένα με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* και στους τόπους εμπορίας τους. Το 2012, 6 άτομα κατανάλωσαν σαλάτα με βάση τη Ricotta, από την οποία μολύνθηκαν με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (Heiman et al., 2016, Acciari et al., 2016). Ο τύπος του τυριού και η τεχνολογία με την οποία έχει παρασκευαστεί, όπως αν έχει γίνει η παστερίωση του γάλακτος, είναι παράγοντες που συμβάλλουν στην επιβίωση ή την ανάπτυξη του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού. Φαίνεται πως τα μαλακά τυριά υπερισχύουν σε σχέση με τα σκληρά γιατί δεν υφίστανται ωρίμαση και συνήθως στερούνται της παρουσίας οξυγαλακτικών βακτηρίων ή εναρκτήριων καλλιιεργειών. (Ανυφαντάκης 2004,

Filiou et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα τυριά με υψηλές τιμές pH και λευκή «μούχλα», όπως το Camembert, δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου (WHO, 1988). Αντίστοιχα και για την Ricotta, η οποία έχει υψηλή τιμή pH και υγρασίας, μπορεί εύκολα να προσβληθεί από το βακτήριο αυτό (Fox et al., 2000). Η ικανότητα του βακτηρίου να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψυγείου (2–4°C) καθιστά το τεχνολογικό εμπόδιο της ψύξης ανεπαρκές για τον πλήρη έλεγχο του παθογόνου στα ready to eat τρόφιμα, όπως είναι τα τυριά (Rogga et al., 2005). Στην περίπτωση των μαλακών τυριών φαίνεται πως έχει καταφέρει να επιβιώσει για έναν χρόνο στους 4°C (Griffiths, 1989). Η παρουσία του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ενισχύεται και από το γεγονός ότι έχει τη δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, γεγονός που οδηγεί στην εξάπλωσή του στο περιβάλλον επεξεργασίας και κατ' επέκταση στο τελικό προϊόν (Kells and Gilmour, 2004).

Στις βιομηχανίες τυροκόμησης, οι κακοί χειρισμοί, που αποκλίνουν από τους κανόνες υγιεινής, όπως τα μολυσμένα χέρια των εργατών, που οδηγούν σε διασταυρούμενη επιμόλυνση, είναι πολλές φορές υπεύθυνοι για την επιμόλυνση των τελικών προϊόντων με *Staphylococcus aureus* (Poutrel et al., 2015). Σε μελέτη που έγινε, τα αποτελέσματα έδειξαν πως το 35,2% των χειριστών που εργάζονταν σε βιομηχανία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων ήταν ασυμπτωματικοί φορείς *S. aureus* και το 90,4% του νωπού γάλακτος ήταν μολυσμένο ενώ δεν απομονώθηκε από τον εξοπλισμό ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός (Tondo et al., 2000). Ο *S. aureus* είναι ο μικροοργανισμός που προκαλεί συχνότερα μαστίτιδα στις αγελάδες (Nickerson, 2002) σε σχέση με τα άλλα τέσσερα παθογόνα βακτήρια που προαναφέρθηκαν. Η μεταφορά του βακτηρίου από ζώο σε ζώο γίνεται από τις αρμεκτικές μηχανές και τις εγκαταστάσεις που αυτές βρίσκονται. Ο μικροοργανισμός *S. aureus* που βρίσκεται στις δεξαμενές προέρχεται κυρίως από μολυσμένο γάλα που είτε λαμβάνεται από μολυσμένα ζώα που πάσχουν από σταφυλοκοκκική μαστίτιδα είτε έχει έρθει σε επαφή με κόπρανα και λιγότερα συχνά που έχει επιμολυνθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Callon et al., 2008). Σε μελέτη για την οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα τυριά από τυροκομικές μονάδες της Πολωνίας, που παρασκευάστηκαν με νωπό γάλα, βρέθηκε πως το 50% των δειγμάτων ήταν επιμολυσμένα με *S. aureus* (Rola et al., 2016). Ο μικροοργανισμός *S. aureus* παράγει εντεροτοξίνες (SEss), οι οποίες προκαλούν τροφικές τοξινώσεις στον άνθρωπο (Ανυφαντάκης 2004). Η εντεροτοξίνη A του παθογόνου *S. aureus* συνδέθηκε με

τροφοδηλητηριάσεις στη Μεγάλη Βρετανία το Δεκέμβριο του 1984 και τον Ιανουάριο 1985. Το 1977 στον Καναδά οι εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενός παραδοσιακού σουηδικού τυριού, προκάλεσαν τροφιμογενή λοίμωξη, καθώς είχαν επιμολυνθεί με *S. aureus* (Zottola and Smith, 1999).

Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* spp. είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον και αποτελούν υψηλού κινδύνου παράγοντα επιμόλυνσης για τα τυριά. Μεταξύ 1982 και 1984, 2700 άνθρωποι νόσησαν από κατανάλωση επιμολυσμένου, με τον συγκεκριμένο παθογόνο, τυριού Cheddar. Κατά το έτος 1989, στην Αμερική νόσησαν 1500 άτομα ύστερα από κατανάλωση επιμολυσμένου τυριού Mozzarella από τα είδη *S. oranienburg* και *S. javiana* (Zottola and Smith, 1999).

Ο μικροοργανισμός *Mycobacterium paratuberculosis* μεταδίδεται στα βοοειδή μέσω του μολυσμένου γάλακτος ή των μολυσμένων θηλών όταν θηλάζουν αλλά και από το νερό και τις επιφάνειες στις οποίες μπορεί να υπάρχει αυτό ο βακτήριο. Οι Ikonomopoulos et al. (2005), σε μελέτη για την οποία χρησιμοποίησαν τυριά από καταστήματα στην Ελλάδα και την Τσεχία, βρήκαν πως το 31.7% και το 3.6%, ήταν θετικά ως προς το MAP με τη χρήση PCR και κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων αντίστοιχα. Επιπλέον 10 στα 12 τυριά Cheddar που τυροκομήθηκαν και εμβολιάστηκαν με MAP, βρέθηκαν μολυσμένα, ακόμα και μετά από 27 εβδομάδες σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Donaghy et al. (2004).

1.3 Διαστελεχιακές αλληλεπιδράσεις του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα πολύπλοκο μέσο-δίκτυο, στο οποίο συνυπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί. Το μικροπεριβάλλον αυτό περιέχει χημικές ουσίες που λειτουργούν ως σήματα επικοινωνίας μεταξύ των μικροοργανισμών (quorum sensing) (Miller and Bassler, 2001, Shank and Kotler, 2009), θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη ή την επιβίωση τους και μία πληθώρα μικροοργανισμών των οποίων η δραστηριότητα περιλαμβάνει πολλές διαδικασίες. Οι διαδικασίες αυτές καθορίζονται και καθορίζουν τις βιοχημικές μεταβολές των τροφίμων και συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών. Οι τελευταίες είναι αυτές που προδιαγράφουν την πορεία των μικροοργανισμών μέσα στο δίκτυο του τροφίμου και περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία (Haruta et al., 2009). Από την μία, σχηματίζουν βιοϋμένια για να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν σε δύσκολες συνθήκες (Elias and Banin, 2012) και από την άλλη, μπορούν να λειτουργήσουν ανταγωνιστικά διεκδικώντας τα θρεπτικά συστατικά που θα εξασφαλίσουν την επιβίωση και την ανάπτυξή τους στο περιβάλλον που βρίσκονται (Rendueles and Ghigo, 2012). Συνεπώς οι αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών είναι αυτές που θα επηρεάσουν τη συμπεριφορά τους και τελικά την ασφάλεια του τροφίμου.

Οι παραπάνω πληροφορίες ισχύουν για όλους τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται την εκάστοτε στιγμή σε ένα τρόφιμο. Οι μικροοργανισμοί που συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον/τρόφιμο, μάχονται για την εξασφάλιση των θρεπτικών συστατικών που θα τους δώσουν το «διαβατήριο» της επιβίωσης ή/και ανάπτυξης. Έτσι και για τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, η συμπεριφορά του καθορίζεται τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου όσο και από τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους μικροοργανισμούς που μπορεί να υπάρχουν ταυτόχρονα με αυτόν στο τρόφιμο. Και οι δύο αυτοί παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται εξίσου υπόψη στις διαδικασίες που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο να περιγράψουν την αναστολή αυτού του παθογόνου βακτηρίου, που αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων, με τη χρήση άλλων ανταγωνιστικών βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) χρησιμοποιούνται ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες καθώς καταφέρνουν να

αναστείλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Οι Callon et al. (2011), σε μελέτη που έκαναν σε νωπό τυρί, έδειξαν πως τα LAB, λειτούργησαν ανταγωνιστικά και ανέστειλαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, και μάλιστα στην περίπτωση που αυτά συνδυάστηκαν με Gram θετικά βακτήρια, θετικά στην αντίδραση της καταλάσης, Gram αρνητικά βακτήρια και ζύμες έδωσαν ακόμα μεγαλύτερη αναστολή. Ο *Lactococcus lactis*, ανέστειλε αποτελεσματικά την ανάπτυξη και τον σχηματισμό βιοϋμενίου του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, σε εκχύλισμα ζωμού λαχανικών και σε επιφάνεια από ανοξείδωτο ατσάλι (Breidt and Fleming, 1998, Garcia-Almendarez et al., 2008). Πέραν του ότι ο πληθυσμός καθ' αυτός των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να αποτελέσει ένα ανταγωνιστικό παράγοντα στην επιβίωση ή/και ανάπτυξη του παθογόνου, επιπλέον είναι γνωστό ότι παράγουν μεταβολικά προϊόντα, τις βακτηριοσύνες, ικανά να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αυτού του παθογόνου (Coelho et al., 2014). Η αναστολή βασίζεται στη συσσώρευση αυτών των μεταβολικών προϊόντων στο περιβάλλον του μικροοργανισμού δυσχεραίνοντας ή ακόμα και απαγορεύοντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός *Lactobacillus plantarum* χρησιμοποιήθηκε σε εμβολιασμένο με τον παθογόνο *L. monocytogenes*, αποστειρωμένο UHT (Ultra High Temperature) γάλα, περιορίζοντας κατά 4-5 log την ανάπτυξη του παθογόνου, μέσω της παραγωγής βακτηριοσυνών και της πτώσης του pH (Aguilar et al., 2011). Ο μικροοργανισμός *Lactococcus lactis* που χρησιμοποιήθηκε κατά την παραγωγή τυριού παράγαγε την βακτηριοσύνη πεδιοσύνη που ανέστειλε την ανάπτυξη του παθογόνου *L. monocytogenes* (Rodriguez et al., 2005). Πέραν των βακτηριοσυνών, τέτοια μεταβολικά προϊόντα μπορεί να είναι οργανικά οξέα που προκαλούν την μείωση του pH, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και κάποια ανασταλτικά ένζυμα (Goerges et al., 2006). Άλλος μικροοργανισμός που έχει ανταγωνιστική δράση απέναντι στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, είναι ο *Escherichia coli*. Σε μελέτες που έγιναν σε υγρό θρεπτικό μέσο, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ανταγωνίστηκε τον παθογόνο *L. monocytogenes* για θρεπτικά συστατικά με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξής του (Mellefont et al., 2008, Buchanan and Bagi, 1999). Ωστόσο υπάρχει και η περίπτωση της απευθείας επαφής με ανταγωνιστικά βακτήρια. Μια τέτοια περίπτωση περιέγραψαν οι Huang et al. (2016), όπου η αναστολή του παθογόνου *L. monocytogenes*, ήταν αποτέλεσμα της απευθείας επαφής του με κύτταρα του μικροοργανισμού *Enterococcus faecium*. Εκτός της ανασταλτικής δράσης που μπορεί να έχει η παρουσία κάποιων μικροοργανισμών έναντι του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, υπάρχει η

πιθανότητα να προκαλεί και συνεργιστική δράση ενισχύοντας την ανάπτυξή του. Πολλές είναι οι περιπτώσεις που ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* σχηματίζει μικτά βιοϋμένια με άλλα βακτήρια και έτσι καταφέρνει να προστατευτεί από απολυμαντικά. Οι Berner et al., παρατήρησαν πως οι μικροοργανισμοί *Flavobacterium spp.* έδρασαν συνεργιστικά απέναντι στον παθογόνο *L. monocytogenes*, και ενίσχυσαν τον σχηματισμό βιοϋμενίων αλλά και την ανθεκτικότητα του τελευταίου έναντι της ωσμωτικής καταπόνησης που προκαλείται από χλωριούχο νατρίο, που αποτελεί εμπόδιο που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων (Berner et al., 2001, Giaouris et al., 2013).

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των διαφορετικών βακτηρίων, υπάρχουν και αυτές που διαδραματίζονται μεταξύ των διαφορετικών ειδών του ίδιου βακτηρίου. Πιο συγκεκριμένα, ο ανταγωνισμός του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από τον μικροοργανισμό *L. innocua*, μειώνει την ανάπτυξη του πρώτου και την ικανότητα ανίχνευσής του κατά τον εμπλουτισμό (Gnanou Besse et al., 2005) αλλά και μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ενός είδους. Συχνά η επιμόλυνση των τροφίμων οφείλεται σε διαφορετικά στελέχη, γεγονός που επιβεβαιώνεται από καταγεγραμμένα κρούσματα λιστερίωσης που συσχετίστηκαν με παραπάνω τους ενός στελέχη του παθογόνου *L. monocytogenes*. Τέτοια περιστατικά είναι η μαζική λιστερίωση από γαλακτοκομικά προϊόντα της επιχείρησης Blue Bell Creameries το 2015 στην Αμερική και το 2008 στον Καναδά, η λιστερίωση που συνδέθηκε με έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος, τα οποία βρέθηκαν μολυσμένα με δύο διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (CDC, 2015, Gilmour et al., 2010). Αυτά τα στελέχη επιμόλυναν τα τρόφιμα ταυτόχρονα με αποτέλεσμα οι καταναλωτές να εκτίθενται σε παραπάνω από ένα στελέχη (Zilelidou et al., 2016, a). Η παρουσία πολλών στελεχών στο τρόφιμο, δημιουργεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών των στελεχών στο τρόφιμο, ενδεχομένως πυροδοτούν διαφορετικές συμπεριφορές σε σχέση με την παρουσία μόνο ενός στελέχους, γεγονός που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων. Για παράδειγμα, σε πρόσφατη μελέτη των Zilelidou et al., αποδείχθηκε ότι ο διαστελεχιακός ανταγωνισμός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μέγεθος του πληθυσμού του παθογόνου που θα διεισδύσει τελικά στα επιθηλιακά κύτταρα (Caco-2) και πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη που ήταν ισχυροί ανταγωνιστές, και επικράτησαν σε

μεγαλύτερους πληθυσμούς τελικά παρουσίασαν και μεγαλύτερη λοιμοξιογόνο δράση (2015).

Είναι γνωστό πως πολλά στελέχη του παθογόνου *L. monocytogenes*, παράγουν ουσίες παρόμοιες με τις βακτηριοσίνες, τις μονοσίνες. Οι μονοσίνες είναι ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που φέρουν ουρά που μοιάζει με αυτή των φάγων και εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση έναντι άλλων στελεχών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (Zink et al., 1994, Zink et al., 1995). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Gnanou Besse et al., παρατηρήθηκαν ανταγωνιστικές διαστελεχιακές αλληλεπιδράσεις του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που περιλάμβαναν τον σχηματισμό τέτοιων ουσιών (2016). Επιπλέον, ο μηχανισμός Quorum Sensing, Agr, φαίνεται πως δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαστελεχιακό ανταγωνισμό (Vivant et al., 2014, Shojima and Nakayama, 2014). Ένα ακόμα σύστημα που περιγράφει την αλληλεπίδραση των στελεχών είναι το σύστημα αναστολής της ανάπτυξης που εξαρτάται από την διακυτταρική επαφή (Cell contact dependent growth inhibition system (CDI)). Η επαφή των κυττάρων είναι θεμελιώδους σημασίας για την αναστολή της ανάπτυξης (Zilelidou et al., 2015). Τέλος, θεμελιώδης παράγοντας για τις αλληλεπιδράσεις των στελεχών είναι η σύνθεση και η δομή του μέσου. Στη μελέτη της ομάδας Zilelidou et al., που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του διαστελεχιακού ανταγωνισμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα ανάπτυξης ένα μη επιλεκτικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (TSB-YE) και εμπορική συσκευασία ζαμπόν σε φέτες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε σημαντική επίπτωση της συγκαλλιέργειας δύο στελεχών στον ρυθμό ανάπτυξή τους, με το φαινόμενο να μεγεθύνεται στο υγρό θρεπτικό μέσο σε σχέση με τις φέτες ζαμπόν, καθώς αυτό πέρα από το ότι έχει πλεόνασμα θρεπτικών συστατικών, δεν περιέχει κανέναν ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη (2016, b).

Όπως προαναφέρθηκε, οι συνθήκες που μπορούν να οδηγήσουν τους μικροοργανισμούς σε αλληλεπίδραση είναι πολλές. Η συγκέντρωση αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οι βακτηριοσίνες, τα οργανικά οξέα και γενικότερα διάφορα μεταβολικά προϊόντα μικροοργανισμών δύνανται να αποτελέσουν ανασταλτικούς παράγοντες στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως ο *L. monocytogenes* (Goerges et al., 2006). Αυτός ο τύπος αλληλεπίδρασης είναι έμμεσος και έγκειται στη μεταβολή του περιβάλλοντος του εκάστοτε παθογόνου μικροοργανισμού γεγονός που

μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξή του. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει και άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών, που περιλαμβάνει την απευθείας επαφή τους, όπως στη μελέτη των Saraoui et al όπου, ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, παρουσίασε αναστολή της ανάπτυξής του εξαιτίας της επαφής του με τον μικροοργανισμό *Lactococcus piscium*, σε εργαστηριακό υπόστρωμα που προσομοίαζε τη σύσταση γαρίδας (Saraoui et al., 2016). Τέλος, ένας ακόμη παράγοντας που οδηγεί σε αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον, που είναι και ο πιο συχνά αναφερόμενος σε μελέτες, είναι η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών. Τα τελευταία και η πρόσβαση των μικροοργανισμών σε αυτά, αποτελεί κινητήριο δύναμη που καθορίζει τις σχέσεις που δημιουργούνται μεταξύ των μικροοργανισμών.

Το 1962 ο Jameson, παρατήρησε πως ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* σταμάτησε να αναπτύσσεται όταν ο μικροοργανισμός *Salmonella* που βρισκόταν στο ίδιο περιβάλλον έφτασε την στατική φάση (Jameson, 1962). Έκτοτε, οι Ross et al., πρότειναν, προς τιμήν του Jameson, το φαινόμενο κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί μιας κοινότητας μάχονται χωρίς συγκεκριμένο τρόπο για τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντός τους (non-specific competition for nutrients), να ονομαστεί Jameson effect (2000). Οι Mellefont et al., συνόψισαν την έννοια αυτού του φαινομένου στην φράση: «το Jameson effect είναι η μάχη που διαδραματίζεται μεταξύ των ειδών για να χρησιμοποιήσουν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά ώστε να μεγιστοποιήσουν την ανάπτυξη και τον πληθυσμό τους, η οποία τελειώνει μόλις εξαντληθούν τα διαθέσιμα αποθέματα, με αποτέλεσμα να σταματήσει και η ανάπτυξη αυτών των ειδών (2008). Τα αποθέματα αυτά όμως, θα εξαντληθούν πρώτα από τα κυρίαρχα είδη (strong), δηλαδή τα είδη που θα φτάσουν πρώτα στην στατική φάση, δηλαδή στον μέγιστο πληθυσμό, αναγκάζοντας τα ασθενέστερα είδη (weak) να μπου από εκείνη τη στιγμή σε στατική φάση, νωρίτερα δηλαδή από ότι θα έμπαιναν αν αναπτύσσονταν σε περιβάλλον που δεν υπήρχαν άλλοι μικροοργανισμοί. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το ποιο είδος θα φτάσει πρώτο την στατική φάση είναι πολυπαραγοντικό, με σημαντικό ρόλο να διαδραματίζει ο αρχικός πληθυσμός και οι συνθήκες της ανάπτυξης. Αυτό επιβεβαιώνεται από την μελέτη των Mellefont et al. κατά την οποία ήλεγξαν τους αρχικούς πληθυσμούς των δύο ανταγωνιζόμενων μικροοργανισμών που χρησιμοποίησαν, *L. monocytogenes* και *Lactobacillus plantarum*, και τον ρυθμό ανάπτυξής τους με αποτέλεσμα όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έφτανε πρώτος την στατική φάση, ανέστειλε την

ανάπτυξη του *L. plantarum* και αντίστροφα όταν ο παθογόνος *L. plantarum* έφτανε πρώτος την στατική φάση, ανέστειλε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (2008). Το Jameson effect παρατηρείται συχνά σε τρόφιμα που η κυρίαρχη μικροχλωρίδα αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία έχουν πλεονέκτημα στο ρυθμό ανάπτυξης (Irlinger & Mounier, 2009). Πολλές μελέτες χρησιμοποιούν αυτό το φαινόμενο ως μορφή ανταγωνισμού, για παράδειγμα κατά την αναστολή του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, από τα βιοϋμένια που σχημάτισε η ενδογενής μικροχλωρίδα ξύλινων ραφιών που χρησιμοποιούνται για την ωρίμανση τυριών και πιο συγκεκριμένα η ανάπτυξη του παθογόνου *L. monocytogenes* σταμάτησε όταν η επικρατούσα μικροχλωρίδα εισήλθε στην στατική φάση (Guillier et al., 2008).

Όλες οι προσεγγίσεις μοντελοποίησης αυτού του φαινομένου επιτυγχάνονται μέσω της τροποποίησης των πρωτογενών μοντέλων ανάπτυξης. Στο σύστημα εξισώσεων για τα δύο είδη που συνυπάρχουν σε ένα κοινό περιβάλλον, συμπεριλαμβάνεται ένας παράγοντας επιβράδυνσης που προκαλεί κάθε μικροοργανισμός στην ανάπτυξη του άλλου. Σαφώς, αυτή η αρχή δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις κατηγορίες αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών και αφορά κυρίως καθαρές καλλιέργειες (Cornu et al., 2011). Οι Giménez and Dalgaard πρότειναν ένα μοντέλο για την αλληλεπίδραση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, το οποίο ανταποκρίνεται στο φαινόμενο Jameson και προβλέπει την παύση της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού όταν ο άλλος φτάσει στην μέγιστη ανάπτυξή του (2004). Το μοντέλο αυτό περιγράφεται από το παρακάτω σύστημα εξισώσεων:

$$\left\{ \begin{array}{l} t < t_{lag-S}, \quad \frac{dS/dt}{S_t} = 0 \\ t \geq t_{lag-S}, \quad \frac{dS/dt}{S_t} = \mu_{max}^S \times \left(1 - \frac{S_t}{S_{max}}\right) \times \left(1 - \frac{NB_t}{NB_{max}}\right) \\ t < t_{lag-NB}, \quad \frac{dNB/dt}{NB} = 0 \\ t \geq t_{lag-NB}, \quad \frac{dNB/dt}{NB} = \mu_{max}^{NB} \times \left(1 - \frac{NB_t}{NB_{max}}\right) \times \left(1 - \frac{S_t}{S_{max}}\right) \end{array} \right. \quad (1)$$

όπου t_{lag-S} και t_{lag-NB} είναι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, S και NB είναι οι πληθυσμοί σε CFU g⁻¹, S_{max} και NB_{max} είναι οι μέγιστοι πληθυσμοί σε CFU g⁻¹

και τέλος μ_{\max}^S και μ_{\max}^{NB} είναι οι μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης σε h^{-1} για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Salmonella* και την ενδογενή μικροχλωρίδα αντίστοιχα (Møller et al., 2013).

1.4 Απόκριση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Οι συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* και ειδικότερα τα όρια αυτών των συνθηκών δεν καθορίζονται μόνο από τις τιμές pH, ενεργότητας ύδατος (a_w) και θερμοκρασίας αλλά και από την προηγούμενη έκθεση του μικροοργανισμού σε παράγοντες καταπόνησης (Ryan et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της ζωής τους οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με πληθώρα καταπονήσεων τόσο στο περιβάλλον όσο και στα τρόφιμα και τις συνθήκες επεξεργασίας τους και η ανάγκη τους για επιβίωση πολλές φορές τους οδηγεί στην ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής (adaptation) (Begley et al., 2002).. Η έκθεση του μικροοργανισμού σε υποθανατίες συνθήκες καταπόνησης, (sublethal stress conditions) επάγει ανθεκτικότητα σε μετέπειτα ισχυρότερη καταπόνηση, γεγονός που οδηγεί στην αυξημένη ικανότητα επιβίωσης του μικροοργανισμού. Η κατάσταση αυτή σχετίζεται άμεσα με την ασφάλεια των τροφίμων (Cataldo et al., 2007) και ενδέχεται να προκαλέσει και διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross resistance) (Begley et al., 2002). Παραδείγματα διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι, η έκθεση σε ήπιες όξινες συνθήκες που επάγει ανθεκτικότητα στην θέρμανση, την παρουσία άλατος ή αιθανόλης και τις βακτηριοσίνες (Bonnet and Montville 2005, Ryan et al. 2008). Πολλοί παράγοντες καταπόνησης, που χρησιμοποιούνται ως μέσα συντήρησης, η θερμική επεξεργασία, το αλάτι και η οξίνιση δύναται να επάγουν προστασία έναντι άλλων συνθηκών καταπόνησης που υπό διαφορετικές συνθήκες θα ήταν θανατηφόρες για τους μικροοργανισμούς (Casey et al., 2002). Αυτό ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένη ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο εμπόδιο του χαμηλού pH του στομάχου, και στο εμπόδιο της αυξημένης συγκέντρωσης λιπαρών οξέων στο έντερο (Sleator et al., 2009). Η λοιμοξιογόνος δράση του μικροοργανισμού καθορίζεται από τη φυσιολογία του, όπως αυτή έχει διαμορφωθεί από τις διάφορες συνθήκες στις οποίες έχει εκτεθεί προηγουμένως, και την απόκρισή του σε αυτές.

Μία από τις κατηγορίες της επαγόμενης ανθεκτικότητας είναι η ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response, ATR). Πιο συγκεκριμένα, αν αρχικά ο μικροοργανισμός βρεθεί σε ήπιες όξινες συνθήκες, σε ήπια θέρμανση, σε μικρή συγκέντρωση άλατος ή και σε συνδυασμό αυτών των ήπιων καταπονήσεων, μπορεί να αναπτύξει ανθεκτικότητα σε μετέπειτα εντονότερη όξινη καταπόνηση (Ferreira et al., 2003, Skandamis et al., 2008). Η οξεοανθεκτικότητα μπορεί να προσδώσει αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης, διείσδυσης αλλά και επιβίωσης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα επιθηλιακά κύτταρα (Conte et al., 2000, Werbrouck et al., 2009). Επιπλέον, σε μοριακό επίπεδο έχει βρεθεί πως η παραμονή του *L. monocytogenes* σε ήπιες συνθήκες όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *prfA*, που σχετίζεται με τη λοιμοξιογόνο δράση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Makariti et al., 2015).

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* όχι μόνο καταφέρνει να επιβιώσει σε πολλές περιπτώσεις από τις συνθήκες όξινης καταπόνησης, αλλά απαιτεί πτώση του pH ώστε να ενεργοποιηθεί η αιμολυσίνη που θα τον απελευθερώσει από το φαγόσωμα, όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.1.3. Για να καταφέρει ο μικροοργανισμός να ανταπεξέλθει στην καταπόνηση από όξινες συνθήκες, ενεργοποιεί την έκφραση των πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid shock proteins ASPs), οι οποίες συμβάλλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων του και είναι αποτέλεσμα της τροποποιημένης έκφρασης των γονιδίων που λαμβάνουν χώρα υπό καθεστώς καταπόνησης (Davis et al., 1996). Επιπλέον, για να εξασφαλίσει την επιβίωσή του σε συνθήκες χαμηλού pH, χρησιμοποιεί μια σειρά μηχανισμών προσαρμογής που περιλαμβάνουν το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD) και το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase system, ADI). Κατά τη λειτουργία του συστήματος GAD, ένα εξωκυτταρικό μόριο γλουταμινικού οξέος μεταφέρεται εντός του κυττάρου του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, όπου αποκαρβοξυλιώνεται σχηματίζοντας Υ-αμινοβουτυρικό οξύ, χρησιμοποιώντας ένα ενδοκυτταρικό πρωτόνιο, που λόγω του χαμηλού pH είναι σε περίσσεια. Το Υ-αμινοβουτυρικό οξύ μεταφέρεται εκτός του κυττάρου με την ταυτόχρονη είσοδο ενός ακόμη μορίου γλουταμινικού οξέος. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να επέλθει ομοιόσταση του μικροοργανισμού (Gandhi and Chikindas, 2007). Στο σύστημα απαμινάσης της αργινίνης, η αργινίνη μεταφέρεται εντός του κυττάρου με ανταλλαγή ενός μορίου

ορνιθίνης. Ενδοκυτταρικά ένζυμα καταβολίζουν την αργινίνη σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Η αμμωνία μετατρέπεται σε κατιόν αμμωνίου με την πρόσληψη ενός ενδοκυτταρικού πρωτονίου, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση του ενδοκυτταρικού pH (Ryan et al., 2009).

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.3, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, αποτελούν έναν από τους παράγοντες που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις των παθογόνων μικροοργανισμών και κατά επέκταση την ανάπτυξή τους αλλά και την επιβίωσή τους στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου (Storfort et al., 2005). Αυτός ο παράγοντας έχει ακόμα μεγαλύτερη σημασία στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, όπως το τυρί, τα οποία δεν υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία πριν την κατανάλωσή τους. Σε μελέτη που έγινε, το τυρί Camembert, υποστηρίζει ανάπτυξη του παθογόνου *L. monocytogenes*, γεγονός που αποδίδεται στις υψηλές αρχικές τιμές pH (Karpetanakou et al., 2017). Το εκάστοτε τρόφιμο που αποτελεί το μέσο επιβίωσης ή/και ανάπτυξης αλλά και αλληλεπίδρασης κάθε μικροοργανισμού, μπορεί να συγκεντρώνει ένα σύνολο εμποδίων. Το χαμηλό pH, η παρουσία οργανικών οξέων και άλλων χημικών ενώσεων, το αλάτι, η παρουσία σακχάρων και το κατά πόσο είναι διαθέσιμα τα θρεπτικά συστατικά είναι τέτοιοι παράγοντες. Συνεπώς, η έκθεση ενός παθογόνου βακτηρίου σε αυτές τις μορφές ήπιας καταπόνησης πριν την κατανάλωσή του, μπορεί να επάγει μετέπειτα ανθεκτικότητα του σε ισχυρότερη καταπόνηση. Οι Colas-Meda et al. (2017), μελέτησαν την επίδραση της έκθεσης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, στο όξινο pH φρούτων, στην μετέπειτα επιβίωσή του στο γαστρεντερικό σύστημα. Παρατήρησαν πως η έκθεση σε pH 5-6, όπως αυτό που κυμαίνονται τα φρούτα, αύξησε την οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού αυτού, συμπέρασμα που συμφωνεί με αυτό των Koutsoumanis & Sofos (2004) και των Samara & Koutsoumanis (2009). Επιπλέον, το όξινο μέσο των φρούτων βοήθησε τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* να ξεπεράσει την πολύ χαμηλή θερμοκρασία των 1 και 5°C (Colas-Meda et al., 2017). Σύμφωνα με τους Gahan et al. (2005), η προσαρμογή του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε επιβίωσή του σε τρόφιμα, όπως το τυρί Cottage, το γιαούρτι και το πλήρες τυρί Cheddar, που έχουν pH 5-6 και η προσαρμογή αυτή στις ήπια όξινες συνθήκες των τυριών, ενδέχεται να επάγει ανθεκτικότητα σε ακόμα χαμηλότερο pH, όπως αυτό του γαστρεντερικού συστήματος (Faleiro et al., 2003). Οι Cataldo et al. (2007), συμπέραναν πως η προσαρμογή του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και σε χαμηλές τιμές pH, που επικρατούσαν στα μαλακά τυριά

που μελέτησαν, προκάλεσαν αυξημένη διείσδυση του παθογόνου βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή. Τέλος, οι Dikici και Calicioglu (2013), παρατήρησαν πως παρόλο που η ωρίμαση του τυριού Savak tulum, μείωσε κατά 4.1 log CFU/g τον παθογόνο *L. monocytogenes*, η έκθεσή του στις ήπιες συνθήκες καταπόνησης του περιβάλλοντος του τροφίμου, πιθανώς οδήγησε σε ATR η οποία προσέδωσε ανθεκτικότητα στο χαμηλό pH του συνθετικού γαστρικού υγρού για 90 λεπτά.

1.5 Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Δεδομένης της καταγραφής των κρουσμάτων λιστερίωσης, που δείχνει πως τα περισσότερα κρούσματα σχετίζονται με μολυσματική δόση μεγαλύτερη των 100 CFU/g, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα (Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005). Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (ΕΚΤ), όσον αφορά τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, διαφοροποιούνται ανάλογα με την δυνατότητά τους να υποστηρίξουν ή όχι την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Ως ΕΚΤ που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* θεωρούνται τα προϊόντα με $pH \leq 4.4$ ή $a_w \leq 0.92$, τα προϊόντα με $pH \leq 5.0$ και $a_w \leq 0.94$ και τα προϊόντα με διάρκεια ζωής μικρότερη από πέντε ημέρες. Ωστόσο, και άλλα ΕΚΤ που δεν πληρούν τα παραπάνω φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή χρόνο ζωής, ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία, εφόσον αποδεικνύεται με επιστημονικές μελέτες, από την επιχείρηση τροφίμων που τα παράγει.

Στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (εκτός εκείνων που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς) οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 100 CFU/g κατά τη διάρκεια ζωής τους. Στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, (εκτός εκείνων που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς), ισχύουν τα ακόλουθα:

- (i) τα επίπεδα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* θα πρέπει να είναι <100 CFU/g καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος και,

- (ii) απουσία στα 25g του προϊόντος πριν το τρόφιμο απομακρυνθεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, ο οποίος το έχει παράγει (CAC, 2007).

Τέλος, στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25g τροφίμου.

Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων, πρέπει να μπορούν να αποδείξουν στις αρμόδιες αρχές σε ποια κατηγορία τροφίμων, ως προς την συμπεριφορά του παθογόνου *L. monocytogenes*, ανήκουν τα τρόφιμα που διακινούν, καθώς και ποια όρια έχουν ορίσει για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό καθ' όλη την διάρκεια ζωής του προϊόντος τους. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί μέρος της εκτίμησης της διάρκειας ζωής ενός τροφίμου έτοιμου για κατανάλωση (Self life studies). Άλλη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την συλλογή πληροφοριών είναι τα μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που εξαρτώνται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τις συνθήκες αποθήκευσης του τροφίμου σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι, τα μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* συνήθως δεν λαμβάνουν υπόψη παράγοντες όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς εντός του τροφίμου, την ικανότητα προσαρμογής του κάθε μικροοργανισμού σε προηγούμενα περιβάλλοντα έκθεσης και πως αυτό επηρεάζει την ανθεκτικότητά του και τέλος τις μεταβαλλόμενες συνθήκες αποθήκευσής του.

Τα τυριά, σύμφωνα με όλες τις παραπάνω πληροφορίες δεν θεωρούνται απευθείας ΕΚΤ, καθώς το φυσικοχημικό προφίλ τους, όσον αφορά το pH και την a_w , αλλά και ο χρόνος ζωής τους διαφοροποιούνται από αυτά που ορίζει ο Κανονισμός για τα ΕΚΤ. Για το λόγο αυτό, 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 τα ανώτατα επιτρεπτά όρια, καθώς ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τη βιομηχανία τροφίμων, αφού έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες pH και a_w (Cataldo et al., 2007).

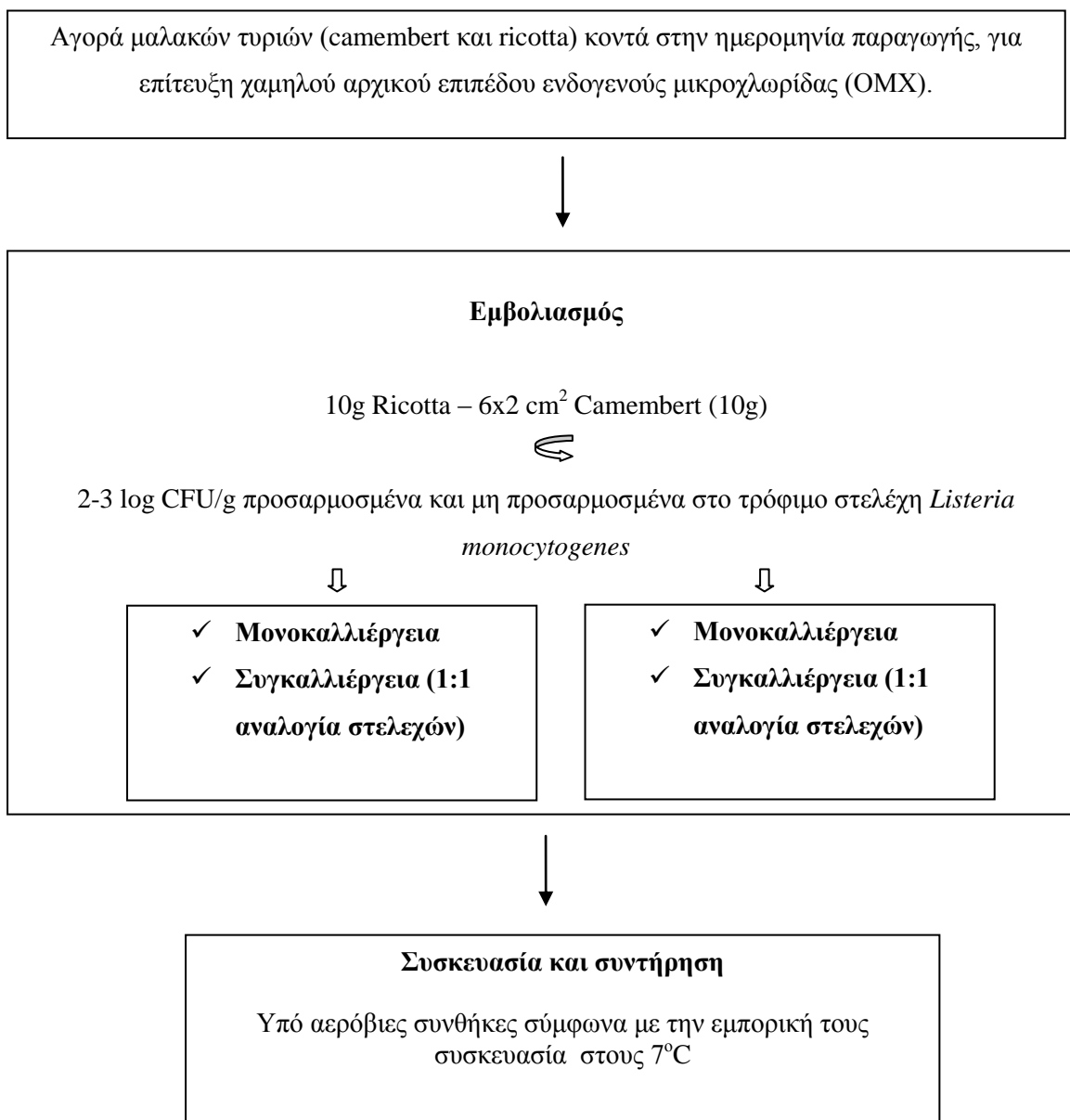
1.6 Υπόθεση και σκοπός της εργασίας

Παρότι ο παθογόνος *Listeria monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός που έχει μελετηθεί ευρέως και έχουν γίνει σημαντικά βήματα ως προς την κατανόηση της συμπεριφοράς του (McLauchlin et al., 2004), συνεχίζει να αποτελεί ένα σημαντικό κίνδυνο της ασφάλειας των ΕΚΤ. Ο μεγάλος αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης που έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση τυροκομικών προϊόντων σε συνδυασμό με την ικανότητα προσαρμογής που παρουσιάζει ο παθογόνος έναντι δυσμενών συνθηκών καθιστούν αναγκαία την έρευνα των παραγόντων που δύνανται να επηρεάσουν τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία του. Τόσο το πολύπλοκο μικροπεριβάλλον του τροφίμου όσο και η αλληλεπίδραση των διαφορετικών στελεχών του παθογόνου που δύνανται να επιμολύνουν ένα τυροκομικό προϊόν σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας του, μπορεί να επηρεάσει αφενός την ανάπτυξη του κάθε στελέχους με διαφορετικό τρόπο και αφετέρου την ανθεκτικότητά τους στο χαμηλό pH του στομάχου κατά τη διάρκεια της πέψης. Σε προηγούμενη μελέτη, των Zilelidou et al. (2015), αποδείχθηκε πως στελέχη με μεγαλύτερη ικανότητα να ανταγωνιστούν και να επικρατήσουν κατά την ανάπτυξη βρέθηκαν πιο ικανά και ανταγωνιστικά στο να διεισδύσουν στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη θα ερευνηθεί η επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων, κατά τη συγκαλλιέργεια διαφορετικών στελεχών, στην ανάπτυξη του παθογόνου *L. monocytogenes* σε δύο μαλακά τυριά που υποστηρίζουν αύξηση, Ricotta και Camembert (Karpetanakou et al., 2017). Επιπλέον θα αξιολογηθεί η επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων, κατά τη συγκαλλιέργεια διαφορετικών στελεχών του παθογόνου, στην ενδεχόμενη επαγωγή της ανθεκτικότητάς του έναντι στο χαμηλό pH του στομάχου κατά τη διαδικασία της πέψης. Η παρούσα μελέτη με την ολιστική της προσέγγιση και με γνώμονα πως η γνώση για τον διαστελεχιακό ανταγωνισμό του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου είναι περιορισμένη και δεν έχει ακόμα μελετηθεί επαρκώς, θα συμβάλει στην ανάλυση επικινδυνότητας (risk assessment) ως επιστημονική διαδικασία με τη συγκέντρωση στοιχείων που σχετίζονται με το δυναμικό προσαρμογής και εγκατάστασης του παθογόνου *L. monocytogenes* στο τυρί, παροχετεύοντας έτσι στην βιομηχανία τροφίμων δεδομένα που αφορούν στη λήψη αποτελεσματικών μέτρων προστασίας για τη βελτίωση των συστημάτων ασφαλείας.

2 Υλικά και μέθοδοι

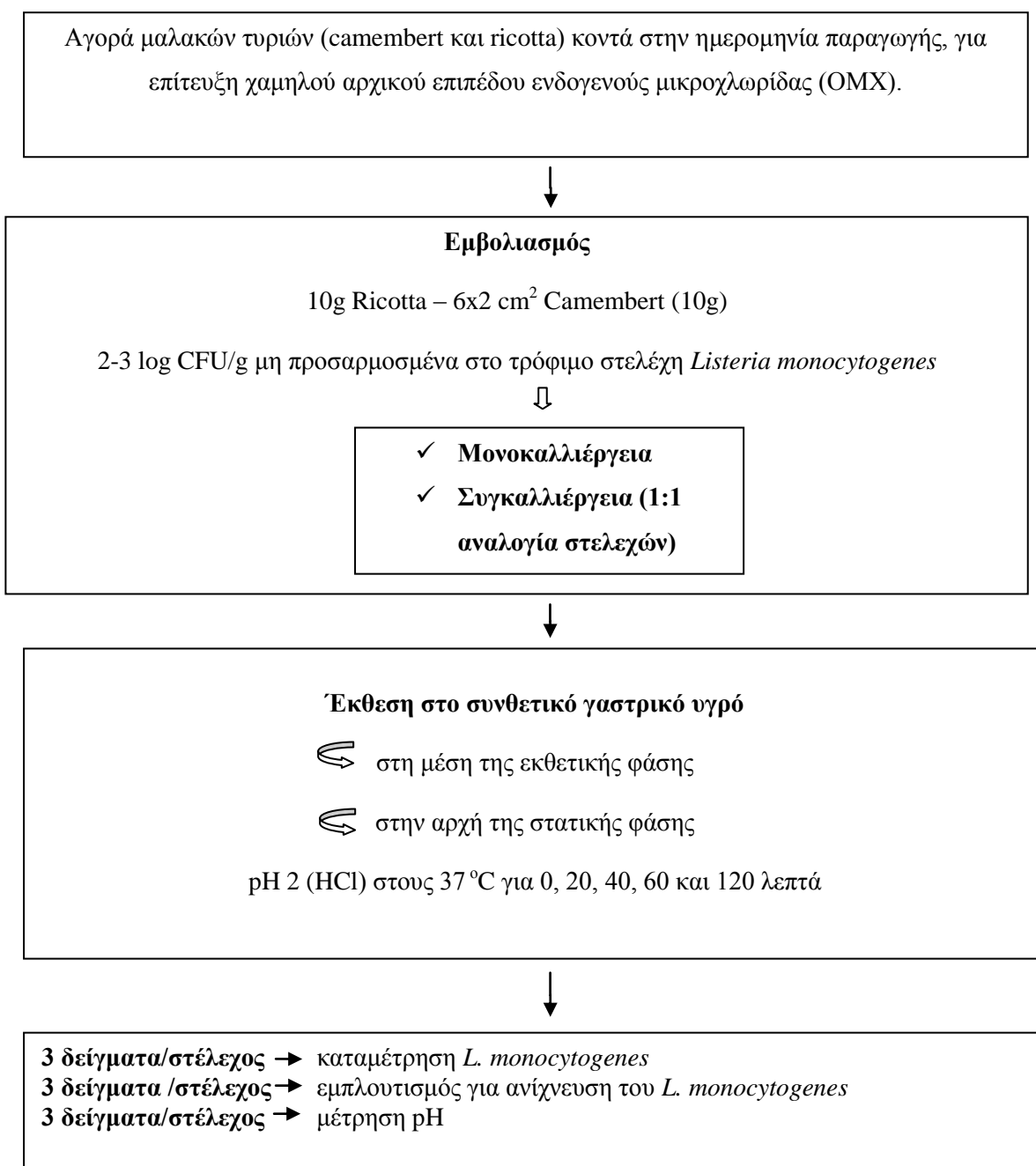
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

2.1.1 Μελέτη της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά



Σχήμα 2.1: Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια της συντήρησης διαφορετικών μαλακών τυριών.

2.1.2 Εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, σε μαλακά τυριά, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό



Σχήμα 2.2: Πειραματικός σχεδιασμός της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, σε διαφορετικά μαλακά τυριά, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό.

2.2 Προετοιμασία εμβολίου

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, δυο από τα οποία ανήκαν στον ορότυπο 4b ένα στον ορότυπο 1/2a και ένα στον ορότυπο 1/2b, απομονωμένα από μονάδες με γαλακτοκομικά προϊόντα, ζωικής προέλευσης και από ασθενείς, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα. Τα στελέχη αυτά έγιναν ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά για την επίτευξη επιλεκτικής καταμέτρησης και προήλθαν από τη συλλογή που διατηρεί το Εργαστήριο Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη διατηρούνταν χωριστά, στους -80°C σε TSB (Tryptic Soy Broth, LABM) με 0.6% Yeast Extract (LABM) (TSBYE) και 20% γλυκερόλη. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, τα στελέχη διατηρούνταν σε τρυβλία TSAYE με ριφαμπικίνη (50μg/ml) (AppliChem) ή στρεπτομυκίνη (1000μg/ml) (Streptomycin Sulfate Biochemica, AppliChem) (Trypton Soy Agar με 6% Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK), τα οποία ανανεώνονταν κάθε μήνα. Όσον αφορά στις ανανεώσεις των μικροοργανισμών, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου μια αποικία από κάθε στέλεχος μεταφερόταν ξεχωριστά σε 10 mL υγρού μη επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος TSBYE και 50 μl ριφαμπικίνη ή 100 μl στρεπτομυκίνη και επωάζονταν στους 30°C για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών, ποσότητα 100 μl από κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε δύο καινούργιους σωλήνες TSBYE με ριφαμπικίνη ή στρεπτομυκίνη και επωάζονταν εκ νέου σε θερμοκρασία 30°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°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. Κατά την τελευταία επαναιώριση, ο ένας σωλήνας από κάθε στέλεχος πληρωνόταν με 10ml διαλύματος Ringer ενώ ο άλλος με 10ml ζωμού τυριού, στην περίπτωση των προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τυριού στελεχών, (1:1, τυρί : MRD, Maximum Recovery Diluent LAB M, Lancashire, UK) και τοποθετούνταν για συντήρηση στους 7°C για 48 ώρες.

Πίνακας 2.1: Στελέχη *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Στέλεχος	Ορότυπος	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό	Πηγή
C5	<i>L. monocytogenes</i> ορότυπος 4b	Στρεπτομυκίνη	Περιβάλλον τυροκομείου
6179	<i>L. monocytogenes</i> ορότυπος 1/2a	Ριφαμπικίνη	Τυρί
ScottA	<i>L. monocytogenes</i> ορότυπος 4b	Ριφαμπικίνη	Ασθενής
ScottA	<i>L. monocytogenes</i> ορότυπος 4b	Στρεπτομυκίνη	Ασθενής
PL_25	<i>L. monocytogenes</i> ορότυπος 1/2b	Ριφαμπικίνη	Ζωικής προέλευσης

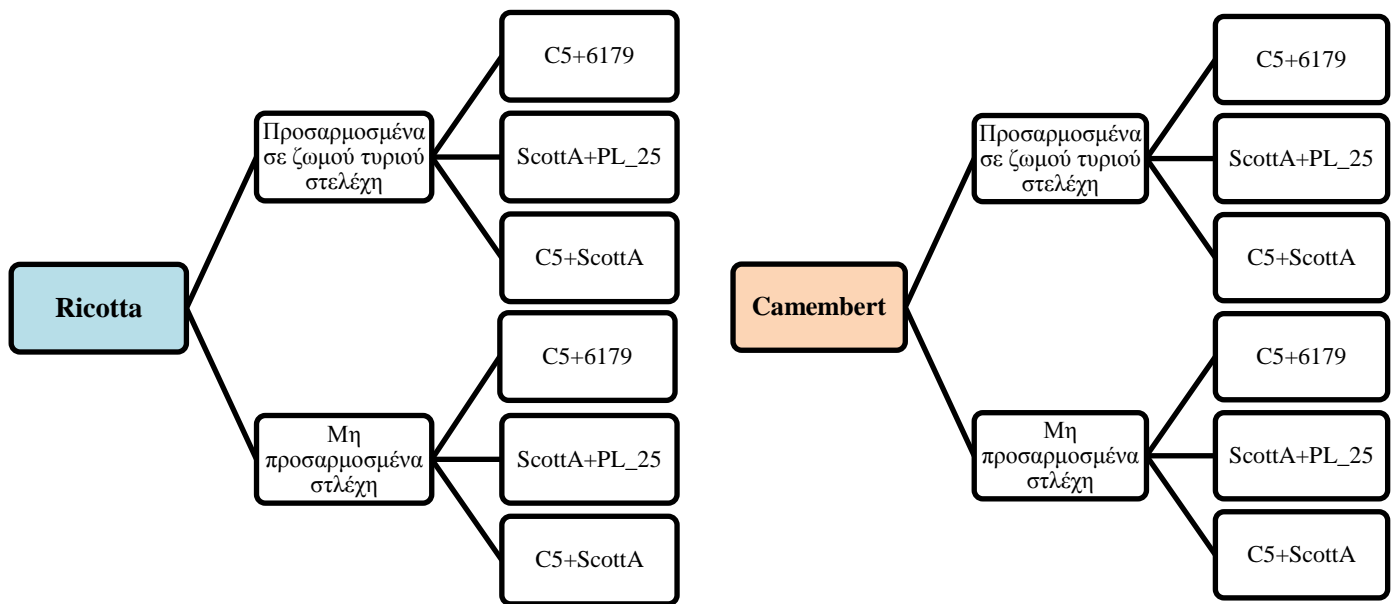
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων τυριών και εμβολιασμός

Εμπορικές συσκευασίες, δυο ανεξάρτητων παρτίδων, μαλακών τυριών Camembert και Ricotta, προμηθεύτηκαν από τοπικά supermarkets, κοντά στην ημερομηνία παραγωγής τους, ώστε ακόμα και στην περίπτωση που τα τυριά είχαν αρχική ενδογενή μικροχλωρίδα (OMX), αυτή να ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, όπως αυτά αναγράφονται στην εμπορική τους συσκευασία.

Πίνακας 2.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών της παρούσας μελέτης, όπως αναγράφονται στην εμπορική τους συσκευασία.

Ονομασία τυριού	Ελάχιστη λιπ/τητα επί ξηρού	Λιπ/τητα ως έχει	Μέγιστη υγρασία	NaCl (%)
Camembert	50%	25%	50%	2
Ricotta	44%	12%	80%	0.3

Δύο ημέρες πριν τον εμβολιασμό κάθε είδους και παρτίδας τυριών, ελεγχόταν η αρχική ενδογενής μικροχλωρίδα (OMX). Στην περίπτωση που ήταν χαμηλή ακολουθούσε εμβολιασμός των τυριών. Όσον αφορά το τυρί Camembert, αγοράστηκε ολόκληρη συσκευασία και η κοπή του σε φέτες, έγινε στο εργαστήριο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Με το άνοιγμα της συσκευασίας, το τυρί τοποθετήθηκε σε επιφάνεια κοπής και κόπηκε σε φέτες $6 \times 2 \text{ cm}^2$ (10g). Το τυρί Ricotta αγοράστηκε σε ολόκληρη συσκευασία και ζυγίστηκαν 10g σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες. Και τα δύο είδη τυριού εμβολιάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, τόσο με τις μονοκαλλιέργειες των προσαρμοσμένων και των μη προσαρμοσμένων στελεχών στο περιβάλλον του τροφίμου όσο και με τις συγκαλλιέργειες αυτών, οι συνδυασμοί των οποίων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.2). Μετά από κατάλληλο αριθμό δεκαδικών αραιώσεων στο αρχικό εμβόλιο (10^9 CFU/mL), μεταφέρθηκε σε τέτοια ποσότητα εμβολίου στην επιφάνεια κάθε τυριού, ώστε ο τελικός αριθμός κυττάρων εμβολίου ήταν τα 10^2 - 10^3 CFU/g. Στο τυρί Camembert, ακολούθησε εξάπλωση του εμβολίου σε όλη την επιφάνεια της φέτας και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο θερμοκρασίας 4°C για 15 min προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση του εμβολίου. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και στις δύο πλευρές των φετών του τυριού. Το τυρί Camembert συσκευάστηκε σε πλαστικές σακούλες. Και τα δύο είδη τυριού συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε θάλαμο θερμοκρασίας 7°C (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) υψηλής ακρίβειας (0.5°C). Η θερμοκρασία αυτή επιλέχτηκε καθώς αν και είναι εκτός των συστάσεων του προϊόντος, είναι πολύ πιθανό να επιτευχθεί στα οικιακά ψυγεία αλλά και κατά τη μεταφορά του προϊόντος στην αγορά, όπου υπάρχουν απώλειες.



Σχήμα 2.3: Συνδυασμοί στελεχών του παθογόνου *L. monocytogenes* που συγκαλλιεργήθηκαν σε τυριά Camembert και Ricotta στην παρούσα μελέτη.

2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να περιγραφεί η καμπύλη ανάπτυξης των στελεχών που βρίσκονταν σε μονοκαλλιέργεια αλλά και αυτών που βρίσκονταν σε συγκαλλιέργεια με άλλα στελέχη. Κατά τις δειγματοληψίες, 2 τεμάχια τυριών Camembert, μεταφέρονταν σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher με φίλτρο και αραιώνονταν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer σε αναλογία 1:5 (1 μέρος τρόφιμο και 4 μέρη Ringer). Ακολουθούσε ομογενοποίηση του περιεχομένου της σακούλας σε συσκευή Stomacher (Interscience, France) για 1 λεπτό. Ίδια αναλογία αραιώσης γινόταν και σε 2 ουροσυλλέκτες με Ricotta, σε κάθε δειγματοληψία. Στην συνέχεια ακολουθούσαν δεκαδικές αραιώσεις του περιεχομένου της σακούλας ή του ουροσυλλέκτη, το οποίο είτε ενσωματωνόταν (1 mL) είτε επιστρωνόταν επιφανειακά (100 μL), σε επιλεκτικά ή μη υποστρώματα. Η καταμέτρηση των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πραγματοποιούνταν σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE με ριφαμικίνη (50μg/ml) (AppliChem) ή στρεπτομυκίνη (1000μg/ml), με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων, και για τα δύο είδη τυριού, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 2 ημέρες και οι αποικίες του παθογόνου

που καταμετρούνταν εμφανίζονταν υπόλευκες. Η καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης γλωρίδας (OMX) πραγματοποιούνταν σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSAYE (Trypton Soy Agar με 6% Yeast Extract, LAB M, Lancashire, UK), με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 2 ημέρες και καταμετρούνταν όλες οι αποικίες οι οποίες έβγαιναν στο τρυβλίο. Στις περιπτώσεις που υπήρχε, για την παρακολούθηση και ταυτοποίηση της ενδογενούς μικρογλωρίδας των τυριών, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους, γινόταν καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar (LAB M, Lancashire, UK) με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 2 ημέρες και καταμετρούνταν οι φακοειδείς υποκίτρινες αποικίες που έβγαιναν στο τρυβλίο. Οι ζύμες και μύκητες καταμετρούνταν με επιλεκτικό υπόστρωμα YEDCA (Yeast Dextrose Chloraphenicol Agar, LAB M, Lancashire, UK) με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 25°C για 4 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.

2.5 Εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό

Για την εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό επιλέχθηκαν οι εξής συνδυασμοί, μη προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τυριού, στελεχών: ScottA-PL_25 και C5-ScottA. Η έκθεση των τυριών στο συνθετικό γαστρικό υγρό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν σημεία, όπου τα κύτταρα του παθογόνου βρίσκονταν στη μέση της εκθετικής φάσης και στην αρχή της στατικής φάσης.

2.5.1 Παρασκευή γαστρικού υγρού

Το συνθετικό γαστρικό υγρό αποτελούνταν από 0.4 g/l glucose, 3 g/l yeast extract, 1 g/l Bacto peptone, 4 g/l porcine mucin, 0.5 g/l cysteine, 0.08 g/l NaCl, 0.4 g/l NaHCO₃, 0.04 g/l K₂HPO₄, 0.04 g/l KH₂PO₄, 0.008 g/l CaCl₂-2H₂O, 0.008 g/l MgSO₄-7H₂O, 1 g/l xylan, 3 g/l soluble starch, 2 g/l pectin και 1 ml/l διαλύματος tween 80. Το συνθετικό γαστρικό υγρό αποστειρώνονταν και στη συνέχεια προσθέτονταν 3 g/l pepsin from porcine stomach mucosa και γινόταν ρύθμιση του pH σε pH 2 με πρότυπο διάλυμα HCl 10N υπό ανάδευση (Barmpalia-Davis et al. 2009).

2.5.2 Έκθεση των τυριών στο συνθετικό γαστρικό υγρό

Στις ημέρες συντήρησης των τυριών Ricotta και Camembert που αντιστοιχούσαν στη μέση της εκθετικής φάσης και στην αρχή της στατικής φάσης, σύμφωνα με τις καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών, γινόταν έκθεση των δύο αυτών ειδών τυριών, σε συνθετικό γαστρικό υγρό, το οποίο βρισκόταν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, μέσα σε υδατόλουτρο καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Σε κάθε μια από τις ημέρες δειγματοληψίας, τα δείγματα εμβολιασμένου τυριού, για τη μονοκαλλιέργεια κάθε στελέχους ανά συνδυασμό που επιλέχτηκε, και τα δείγματα εμβολιασμένου τυριού για την συγκαλλιέργεια των στελεχών εκτίθονταν στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Αρχικά, τα κομμάτια τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher με φίλτρο και προστιθόταν γαστρικό 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, έτσι ώστε η θερμοκρασία τους να διατηρηθεί σταθερή στους 37 °C . Κάθε 0, 20, 40, 60 και 120 λεπτά από 3 δείγματα, 25 ml ομογενοποιημένου τροφίμου εμπλουτίζονταν σε 225 ml Half Fraser Broth (LAB M, Lancashire, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο ISO, από 3 δείγματα γινόταν μέτρηση της μεταβολής του pH του γαστρικού υγρού με ηλεκτρονικό pHμετρο (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland) και τέλος από 3 δείγματα πραγματοποιούνταν καταμέτρηση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε τρυβλία με επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE με ριφαμικίνη (50μg/ml) ή στρεπτομυκίνη (1000μg/ml), με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων, και για τα δύο είδη τυριού, σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 2 ημέρες και οι αποικίες του παθογόνου που καταμετρούνταν εμφανίζονταν υπόλευκες. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν καταμέτρηση της OMX 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 2 ημέρες και καταμετρούνταν όλες οι αποικίες οι οποίες έβγαιναν στο τρυβλίο.

2.6 Μοντέλο Baranyi και Roberts

Για να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι των καμπυλών ανάπτυξης των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που εμβολιάστηκαν στα τυριά Ricotta και Camembert, χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση. Το μοντέλο αυτό είναι μηχανιστικό, σύμφωνα με το οποίο η φάση προσαρμογής του κυττάρου οφείλεται στην αναγκαιότητα σύνθεσης μιας ουσίας $q(t)$ η οποία είναι κρίσιμη για την αύξησή του. Από τη στιγμή που τα κύτταρα θα προσαρμοστούν στο καινούργιο περιβάλλον αυξάνονται εκθετικά μέχρι να περιοριστεί η αύξησή τους λόγω περιορισμού π.χ. των θρεπτικών στοιχείων ή συγκέντρωση τοξικών προϊόντων μεταβολισμού.

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{q(t)}{1+q(t)} \right) \cdot \left(1 - \left(\frac{N(t)}{N_{\max}} \right)^m \right) \cdot N(t)$$

Επιπλέον, υπολογίστηκε το έργο προσαρμογής (h_0), που είναι το έργο που θα πρέπει να καταβληθεί από το κύτταρο για να βγει από τη φάση προσαρμογής. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του h_0 τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (Baranyi & Roberts, 1995).

2.7 Μοντέλο Jameson effect

Για να γίνει μια πρώτη εκτίμηση του είδους των αλληλεπιδράσεων των στελεχών που συγκαλλιεργήθηκαν στα τυριά Ricotta και Camembert, επιλέχτηκε το φαινόμενο Jameson. Σύμφωνα με την θεωρία του φαινομένου Jameson, έγινε τροποποίηση του συστήματος εξισώσεων 1 (Παράγραφος 1.3), του μοντέλου του φαινομένου Jameson, των Møller et al. (2013):

$$\left\{ \begin{array}{l} t < t_{\text{lag-L1}}, \quad (dL1/dt) / L1_t = 0 \\ t \geq t_{\text{lag-L1}}, \quad (dL1/dt) / L1_t = \mu^{L1} \max \times (1 - L1_t / L1_{\max}) \times (1 - L2_t / L2_{\max}) \\ t < t_{\text{lag-L2}}, \quad (dL2/dt) / L2_t = 0 \\ t \geq t_{\text{lag-L2}}, \quad (dL2/dt) / L2_t = \mu^{L2} \max \times (1 - L2_t / L2_{\max}) \times (1 - L1_t / L1_{\max}) \end{array} \right. \quad (2)$$

όπου $t_{\text{lag-L1}}$ και $t_{\text{lag-L2}}$ είναι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, $L1$ και $L2$ είναι οι πληθυσμοί σε CFU g⁻¹, $L1_{\text{max}}$ και $L2_{\text{max}}$ είναι οι μέγιστοι πληθυσμοί σε CFU g⁻¹ και τέλος μ_{max}^{L1} και μ_{max}^{L2} είναι οι μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης σε h⁻¹ για τα στελέχη 1 και 2 του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, αντίστοιχα που συγκαλλιεργούνται.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγώνου του σφάλματος (Root Mean Square Error: RMSE), ο δείκτης με τον οποίο αξιολογείται κατά πόσο οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές επικυρώνουν τα πειραματικά δεδομένα.

2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Microsoft Excel® 2007 και *STATGRAPHICS® Centurion XVI* (StatPoint Technologies, Inc., USA). Οι στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη των διαφορετικών στελεχών στις μονοκαλλιεργείες σε σύγκριση με την ανάπτυξη των ίδιων στελεχών στη συγκαλλιέργεια προέκυψαν μετά από την πραγματοποίηση two-sample comparison με επίπεδο σημαντικότητας 95%.

3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

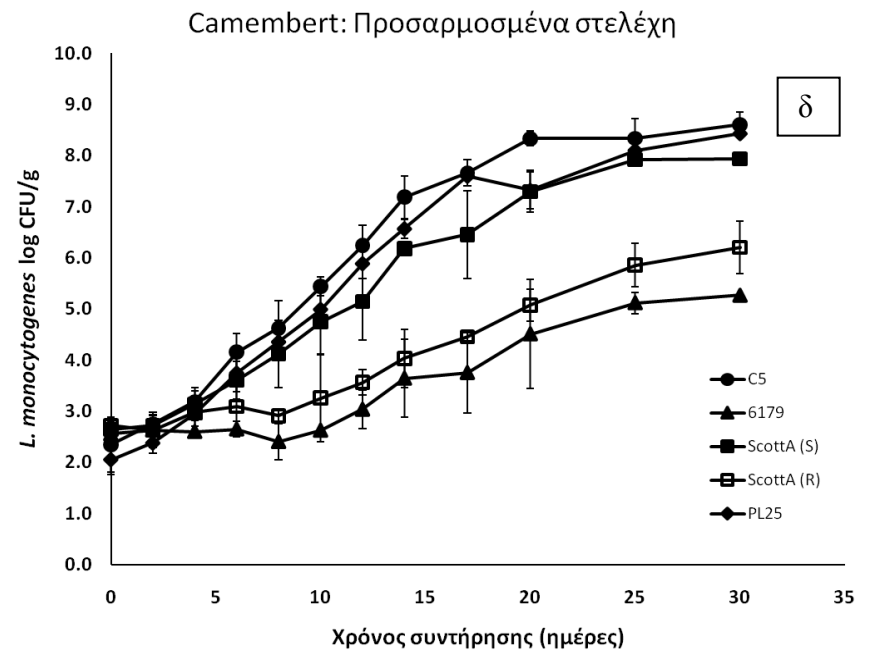
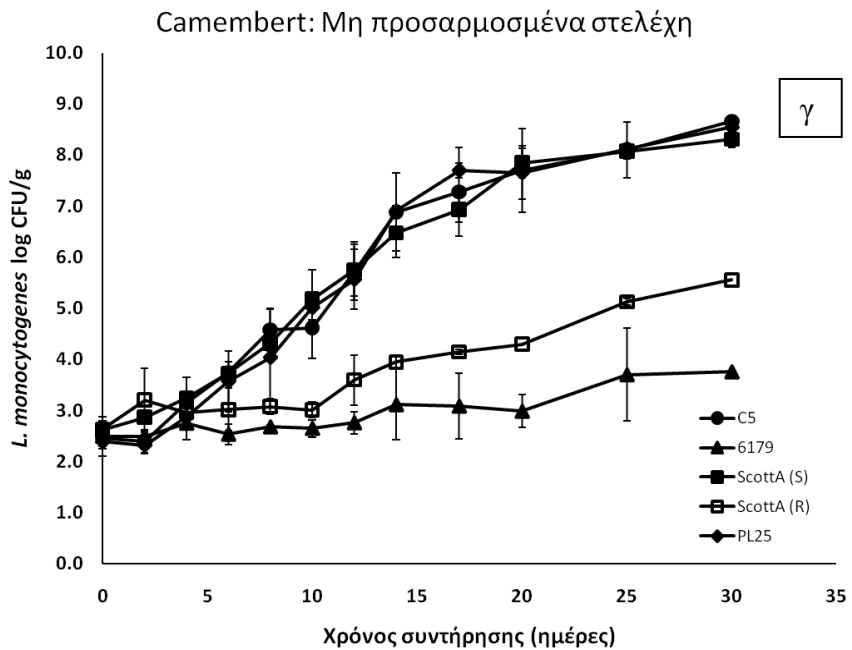
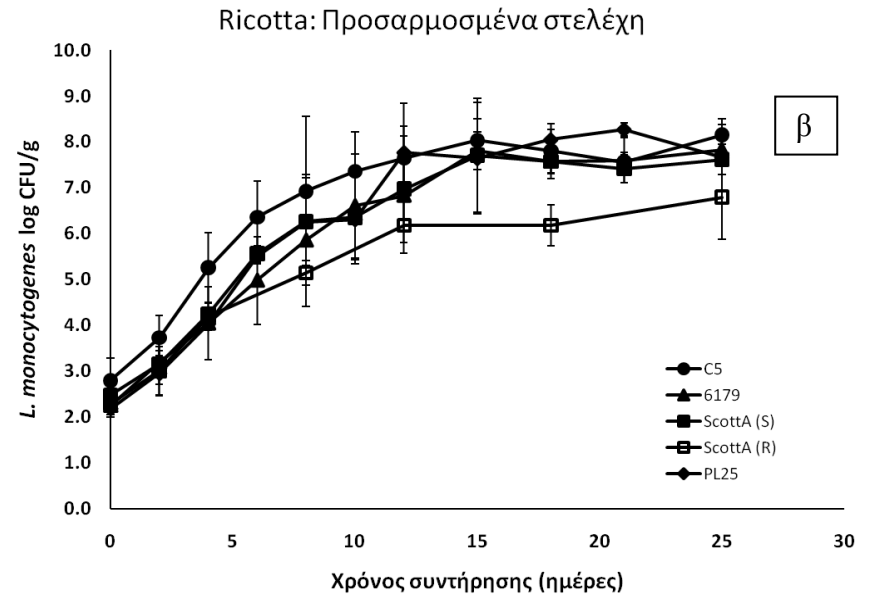
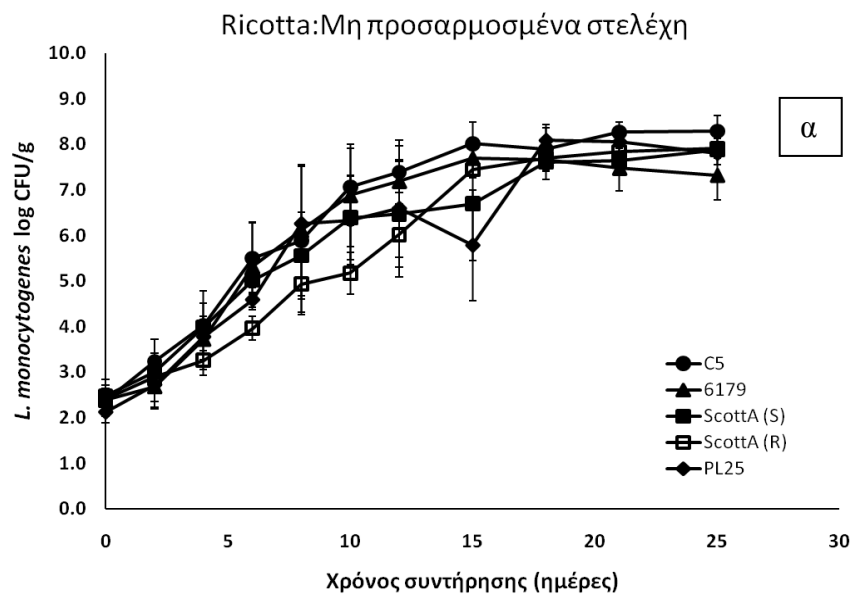
3.1 Επίδραση του διαστελεχιακού ανταγωνισμού στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά

Στόχος του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ανάπτυξης διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, όταν βρίσκονται σε μονοκαλλιέργεια σε σύγκριση με την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους σε συγκαλλιέργεια με άλλα στελέχη, στα οποία έχει γίνει πριν τον εμβολιασμό, προσαρμογή στο περιβάλλον του τυριού ή όχι, σε δύο είδη μαλακών τυριών, Ricotta και Camembert, που επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητας τους να υποστηρίζουν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Karpetanakou et al., 2017) κατά τη συντήρησή τους στους 7°C. Η προσαρμογή των στελεχών στο περιβάλλον του τυριού, έγινε με σκοπό την αξιολόγηση του παράγοντα της καταπόνησης που ενδέχεται να υποστούν τα στελέχη όταν βρεθούν απευθείας στο τρόφιμο, ώστε να εκτιμηθεί μόνο η επίδραση του διαστελεχιακού ανταγωνισμού. Τα τυριά προμηθεύθηκαν κοντά στην ημερομηνία παραγωγής τους για εξασφάλιση χαμηλού αρχικού πληθυσμού ενδογενούς μικροχλωρίδας, στην περίπτωση που αυτή υπήρχε. Η θερμοκρασία των 7°C επιλέχθηκε καθώς αν και είναι εκτός των συστάσεων του προϊόντος, είναι πολύ πιθανό να επιτευχθεί στα οικιακά ψυγεία αλλά και κατά τη μεταφορά του προϊόντος στα εμπορικά σημεία διάθεσης, όπου οι χώροι αποθήκευσης μπορεί να έχουν θερμοκρασιακές απώλειες.

3.1.1 Μονοκαλλιέργειες στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Για να γίνει εκτίμηση της επίδρασης που έχει η συγκαλλιέργεια δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, ήταν απαραίτητη η μελέτη της ανάπτυξης κάθε στελέχους ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό, έγινε εμβολιασμός των τυριών Ricotta και Camembert με κάθε ένα από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στους συνδυασμούς, ως μονοκαλλιέργειες. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη στα οποία δεν είχε προηγηθεί προσαρμογή τους στο περιβάλλον του τυριού και στελέχη στα

οποία είχε γίνει προηγούμενη προσαρμογή στο περιβάλλον του τυριού (Παράγραφος 2.2). Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού κάθε στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C. Πιο συγκεκριμένα στο Γράφημα 1α και 1β, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στελεχών στο τυρί Ricotta, ενώ στο Γράφημα 1γ και 1δ παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες για το τυρί Camembert. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Γράφημα 1α και 1β, οι μονοκαλλιέργειες τόσο των μη προσαρμοσμένων όσο και των προσαρμοσμένων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο τυρί Ricotta αναπτύχθηκαν παρόμοια. Όσον αφορά στις μονοκαλλιέργειες των στελεχών στο τυρί Camembert, τα στελέχη C5, ScottA(S) και PL25, παρουσιάζουν παρόμοια ανάπτυξη αλλά το στέλεχος ScottA(R) αναπτύχθηκε σε χαμηλότερο πληθυσμό. Επιπλέον το στέλεχος 6179, στην περίπτωση των μη προσαρμοσμένων στελεχών παρουσίασε επιβίωση και στην περίπτωση των προσαρμοσμένων στελεχών αναπτύχθηκε σε χαμηλότερο πληθυσμό από τα υπόλοιπα. Συνοψίζοντας, τα στελέχη C5, PL25 και ScottA(S) παρουσίασαν παρόμοια ανάπτυξη, περίπου 8 με 8,5 log CFU/g και στα δύο τυριά με ή χωρίς προηγούμενη προσαρμογή στο περιβάλλον του τυριού, με μόνη διαφορά τον πιο ταχύ ρυθμό ανάπτυξης στο τυρί Ricotta, σε κάποιες περιπτώσεις, όπως φαίνεται από τις κινητικές παραμέτρους που προκύπτουν από το μοντέλο Baranyi (Πίνακας 3.1). Το στέλεχος 6179, αναπτύχθηκε παρόμοια με και χωρίς προσαρμογή στο τυρί Ricotta ($7,5 \pm 0$ log CFU/g), ενώ στο τυρί Camembert όταν δεν είχε προηγηθεί προσαρμογή δεν παρουσίασε ανάπτυξη (ο πληθυσμός παρέμεινε στους $3 \log \pm 0$ CFU/g) και όταν είχε προσαρμοστεί στο περιβάλλον του τυριού παρουσίασε μια μικρή ανάπτυξη ($5 \log \pm 0$ CFU/g). Τέλος, το στέλεχος ScottA(R) είχε μικρότερη ανάπτυξη στο τυρί Camembert ($5,5-6 \log$ CFU/g) σε σχέση με το τυρί Ricotta, όπου ο πληθυσμός έφτασε τους $7-8 \pm 0,2 \log$ CFU/g.



Γράφημα 1: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.

Πίνακας 3.1: Κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των προσαρμοσμένων και μη προσαρμοσμένων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που εμβολιάστηκαν σε τυρί Ricotta και Camembert, που προκύπτουν από το μοντέλο Baranyi.

Τυρί	Στέλεχος	rate	lag	y0	yEnd	h0	se(fit)	R^2_stat
Ricotta	Μη προσαρμοσμένο							
	C5	0.533	1.062	2.216	8.328	0.566	0.200	0.993
	6179	0.665	1.672	2.293	7.517	1.111	0.178	0.992
	ScottA(S)	0.554	1.278	2.518	7.586	0.708	0.114	0.997
	ScottA(R)	0.352	1.329	2.422	7.926	0.468	0.218	0.989
	PL25	0.446	1.485	1.995	8.052	0.662	0.200	0.993
	Προσαρμοσμένο							
	C5	1.504	0.910	2.791	8.050	1.368	0.116	0.996
	6179	0.449		2.267	7.719	0	0.113	0.997
	ScottA(S)	0.543	0.673	2.473	7.576	0.366	0.148	0.995
	ScottA(R)	0.416		2.308	6.240	0	0.215	0.983
PL25	0.538		2.044	7.994	0	0.230	0.990	
Camembert	Μη προσαρμοσμένο							
	C5	0.663	3.119	2.532	9.407	2.068	0.134	0.997
	6179	0.117	11.893	2.556	5.263	1.386	0.213	0.930
	ScottA(S)	0.327	2.912	2.783	8.348	0.951	0.117	0.997
	ScottA(R)	0.151	7.572	2.793		1.144	0.184	0.977
	PL25	0.437	4.107	2.360	8.332	1.796	0.230	0.990
	Προσαρμοσμένο							
	C5	0.356	1.285	2.365	8.443	0.457	0.199	0.993
	6179	0.188	10.613	2.611	5.161	1.998	0.061	0.997
	ScottA(S)	0.267	2.426	2.662	7.997	0.648	0.066	0.999
	ScottA(R)	0.192	8.118	2.790	6.232	1.555	0.110	0.992
PL25	0.381	1.966	2.045	8.281	0.749	0.110	0.998	

3.1.2 Συγκαλλιέργειες στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Παράλληλα, για να γίνει εκτίμηση της επίδρασης που μπορεί να έχει η συγκαλλιέργεια δύο στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, εμβολιάστηκαν τα τυριά Ricotta και Camembert με διαφορετικούς συνδυασμούς στελεχών αυτού του παθογόνου μικροοργανισμού, που είχαν προσαρμοστεί ή που δεν είχαν προσαρμοστεί στο περιβάλλον του τροφίμου (ScottA(S) – PL25, C5 – ScottA(R) και C5 – 6179) (Σχήμα 2.3).

Στα γραφήματα 2α και 2β, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στο τρόφιμο στελεχών ScottA(S) και PL25, του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C στο τυρί Ricotta. Αντίστοιχα, στα γραφήματα 2γ και 2δ παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών των ίδιων στελεχών στο τυρί Camembert. Παρατηρώντας τα γραφήματα 2α και 2β, που αφορούν το τυρί Ricotta, υπάρχει ελάχιστη διαφορά στην ανάπτυξη του μη προσαρμοσμένου και του προσαρμοσμένου στο τρόφιμο στελέχους ScottA(S) όταν αυτό καλλιεργείται μόνο του στο τυρί Ricotta σε σχέση με όταν συγκαλλιεργείται με το στέλεχος PL25. Πιο συγκεκριμένα, το μη προσαρμοσμένο στέλεχος ScottA(S) στη μονοκαλλιέργειά του στο τυρί Ricotta φτάνει τους $7,9 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$ ενώ όταν συγκαλλιεργείται με το στέλεχος PL25 ο τελικός πληθυσμός του δείχνει να έχει τάση για μείωση κατά έναν λογάριθμο, που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$). Αντίστοιχα, και στην περίπτωση των προσαρμοσμένων στο τυρί Ricotta στελεχών, στην συγκαλλιέργεια ο πληθυσμός του στελέχους ScottA(S) είναι μικρότερος κατά περίπου ένα λογάριθμο ($p > 0.05$). Αυτή η παρατήρηση ωστόσο δεν ισχύει και για το στέλεχος PL25 όταν εμβολιάζεται στο τυρί Ricotta, είτε όταν έχει προσαρμοστεί προηγουμένως είτε όχι, καθώς οι πληθυσμοί φαίνεται να παραμένουν περίπου αμετάβλητοι ($7,8 \log \text{CFU/g}$ και $7,9 \log \text{CFU/g}$ στη μονοκαλλιέργεια και τη συγκαλλιέργεια αντίστοιχα).

Στο τυρί Camembert, (Γραφήματα 2γ και 2δ) δεν παρατηρείται καμία διαφορά στην καμπύλη ανάπτυξης του μη προσαρμοσμένου στο τρόφιμο στελέχους ScottA(S) όταν αυτό καλλιεργείται μόνο του σε σχέση με την συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος PL25. Στην πρώτη περίπτωση ο πληθυσμός φτάνει τους $8,3 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$ και στη δεύτερη, $8,2 \pm 0,1 \log \text{CFU/g}$. Αντίστοιχα και το μη προσαρμοσμένο στέλεχος PL25, φαίνεται να μην επηρεάζεται από την συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος ScottA(S), καθώς παρουσιάζει παρόμοια καμπύλη ανάπτυξης, με τελικό πληθυσμό στη μονοκαλλιέργεια τους $8,5 \log \text{CFU/g}$ και στην συγκαλλιέργεια τους $8,3 \log \text{CFU/g}$. Αυτή η εικόνα επαναλαμβάνεται και για τα στελέχη που έχουν προσαρμοστεί προηγουμένως στο περιβάλλον του τυριού Camembert. Πιο συγκεκριμένα, το προσαρμοσμένο στο τρόφιμο στέλεχος ScottA(S) όταν καλλιεργείται μόνο του φτάνει τους $7,9 \log \text{CFU/g}$ ενώ όταν συγκαλλιεργείται με το προσαρμοσμένο στέλεχος PL25 τους $8,3 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$ ($p > 0.05$) και το

προσαρμοσμένο στέλεχος PL25, φτάνει τους 8,4 log CFU/g και 8,1 log CFU/g αντίστοιχα.

Στα τυριά Camembert και Ricotta, για το συνδυασμό ScottA(S) –PL25, φαίνεται να κυριαρχούν τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, καθώς οι καμπύλες ανάπτυξης της OMX ταυτίζονται με αυτές του εκάστοτε στελέχους του παθογόνου βακτηρίου, που εμβολιάστηκε σε κάθε τυρί (Γράφημα 5).

Στα γραφήματα 3α και 3β, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στο τρόφιμο στελεχών C5 και ScottA(R), του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησής τους στους 7 °C στο τυρί Ricotta. Αντίστοιχα, στα γραφήματα 3γ και 3δ παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών των ίδιων στελεχών στο τυρί Camembert. Όσον αφορά το τυρί Ricotta, σε αντίθεση με το τυρί Camembert, η συγκαλλιέργεια του στελέχους C5 με το στέλεχος ScottA(R), φαίνεται να επηρέασε την ανάπτυξη του τελευταίου κυρίως στην περίπτωση που τα στελέχη δεν είχαν προσαρμοστεί προηγουμένως στο περιβάλλον του τροφίμου. Επιβεβαιώνοντας την παραπάνω πρόταση, ο τελικός πληθυσμός του μη προσαρμοσμένου στελέχους στο τρόφιμο ScottA(R), όταν καλλιεργήθηκε μόνος του ήταν $7,9 \pm 0,2$ log CFU/g ενώ στην συγκαλλιέργειά του με το μη προσαρμοσμένο στέλεχος C5 κατάφερε να αναπτυχθεί μόλις μέχρι τους 4,8 log CFU/g. Επιπλέον, η παρουσία του δεύτερου στελέχους είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής του στελέχους ScottA(R). Και στην περίπτωση των προσαρμοσμένων στελεχών, το ScottA(R), παρουσίασε μειωμένη ανάπτυξη κατά $0,8 \pm 0,5$ log CFU/g όταν συγκαλλιεργήθηκε με το προσαρμοσμένο στέλεχος C5, η οποία ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Αντίθετα, το στέλεχος C5, δεν παρουσίασε διαφορά στην ανάπτυξή του όταν συγκαλλιεργήθηκε με το στέλεχος ScottA(R), όπου και στις δύο περιπτώσεις έφτασε περίπου τους $8 \pm 0,2$ log CFU/g. Στα Γραφήματα 3γ και 3δ, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, δεν παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 και ScottA(R), όταν αυτά καλλιεργούνται μόνα τους ή συγκαλλιεργούνται στο τυρί Camembert. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των μη προσαρμοσμένων στελεχών, το στέλεχος C5, έφτασε και στην μονοκαλλιέργεια και στην συγκαλλιέργεια τους 8,7 log CFU/g και όταν υπέστη προσαρμογή στο

περιβάλλον του τροφίμου τους $8,6 \pm 0,3 \log \text{CFU/g}$ στη μονοκαλλιέργεια και τους $8,5 \log \text{CFU/g}$ στην συγκαλλιέργεια. Αντίστοιχα, το στέλεχος ScottA(R), έφτασε σε χαμηλότερους τελικούς πληθυσμούς σε σχέση με το στέλεχος C5, οι οποίοι ωστόσο δεν επηρεάστηκαν από την συγκαλλιέργεια με το τελευταίο στέλεχος, με μέσο όρο τους $6,3 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$ στις μονοκαλλιέργειες και τους $5,9 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$ στις συγκαλλιέργειες.

Στο τυρί Ricotta, η OMX φαίνεται να ταυτίζεται με τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Στο Γράφημα 6β η OMX του τυριού που εμβολιάστηκε με το στέλεχος ScottA(R), παρουσιάζει χαμηλότερο πληθυσμό σε σχέση με τα τυριά που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργεια του στελέχους C5. Στο τυρί Camembert, η OMX (Γράφημα 6γ, 6δ) του τυριού που έχει εμβολιαστεί με τη συγκαλλιέργεια των δύο στελεχών ακολουθεί την καμπύλη της OMX του τυριού που έχει εμβολιαστεί με το στέλεχος C5, το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ανάπτυξη της τάξης των $2 \log \text{CFU/g}$, σε σχέση με το τυρί που είναι εμβολιασμένο με το στέλεχος ScottA(R), και αποτελεί το στέλεχος που επικράτησε στην αλληλεπίδραση.

Τέλος, στα γραφήματα 4α και 4β, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στο τρόφιμο στελεχών C5 και 6179, του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7°C στο τυρί Ricotta. Το στέλεχος C5, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος 6179. Και στην περίπτωση που τα στελέχη έχουν προσαρμοστεί προηγουμένως στο τυρί αλλά και στην περίπτωση που δεν έχει προηγηθεί προσαρμογή τους, το στέλεχος C5 φτάνει περίπου τον τελικό πληθυσμό των $8,0 \pm 0,3 \log \text{CFU/g}$. Αντίθετα, στο τυρί Ricotta, το στέλεχος 6179, παρουσιάζει μεγάλη διαφορά στην ανάπτυξη όταν συγκαλλιεργείται με το στέλεχος C5 ($p > 0.05$), καθώς ο ρυθμός ανάπτυξής του μειώνεται σημαντικά από την παρουσία του δεύτερου στελέχους. Στη μονοκαλλιέργειά του φτάνει τους $7,5 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$, ενώ στη συγκαλλιέργεια τους $4,8 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$, κατά μέσο όρο, και στην περίπτωση προσαρμογής και στην περίπτωση μη προσαρμογής των στελεχών στο τρόφιμο. Αντίστοιχα, στα γραφήματα 4γ και 4δ παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών των ίδιων στελεχών στο τυρί Camembert. Όπως και στον συνδυασμό C5 - ScottA(R), έτσι και στον συνδυασμό C5 - 6179, δεν παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη των δύο στελεχών που συγκαλλιεργούνται. Στο τυρί Camembert, οι μονοκαλλιέργειες των δύο αυτών στελεχών που είτε έχουν

προσαρμοστεί προηγουμένως στο περιβάλλον του τυριού, είτε δεν έχουν προσαρμοστεί, δεν φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα από τις αντίστοιχες συγκαλλιέργειες με το άλλο στέλεχος. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος C5 όταν δεν έχει προηγηθεί προσαρμογή του στο περιβάλλον του τυριού, και στην μονοκαλλιέργεια και στην συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος 6179, φτάνει σε τελικό πληθυσμό $8,7 \log \text{CFU/g}$, ενώ όταν έχει προηγηθεί προσαρμογή, φτάνει κατά μέσο όρο τους $8,5 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$. Το στέλεχος 6179, που παρουσιάζει μικρότερο δυναμικό ανάπτυξης, σε όλες τις περιπτώσεις φτάνει κατά μέσο όρο τους $4,5 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$, είτε βρίσκεται σε μονοκαλλιέργεια είτε σε συγκαλλιέργεια, με ή χωρίς προσαρμογή στο περιβάλλον του τροφίμου.

Στο τυρί Ricotta (Γραφήματα 7α και 7β), η OMX φαίνεται να ταυτίζεται με τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Στο τυρί Camembert, η OMX (Γραφήματα 7γ και 7δ) του τυριού που έχει εμβολιαστεί με τη συγκαλλιέργεια των δύο στελεχών ταυτίζεται με την καμπύλη της OMX του τυριού που έχει εμβολιαστεί με το στέλεχος C5, που είναι και το στέλεχος που επικράτησε σε αυτό τον συνδυασμό.

Σε όλες τις παρτίδες και τις περιπτώσεις συνδυασμών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, και στα δύο τυριά, Ricotta και Camembert, σύμφωνα με το γράφημα 8, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών-μυκήτων και των εντεροβακτηρίων, που παρακολουθούνταν σε τακτικά σημεία κατά τη διάρκεια της συντήρησης των τυριών, φαίνεται να παρέμειναν σταθεροί.

Στα Γραφήματα 9α – 9στ, παρουσιάζεται η μεταβολή του pH των εμβολιασμένων τυριών Ricotta (Γραφήματα 9α – 9γ) και Camembert (Γραφήματα 9δ – 9στ). Για τα τυριά Ricotta, οι τιμές pH στην αρχή της συντήρησης στους 7°C , ήταν $6,6 \pm 0,2$ και στο τέλος $6,3 \pm 0,2$, ενώ για τα τυριά Camembert, στην αρχή της συντήρησης το pH κυμάνθηκε σε τιμές $6 \pm 0,1$ και στο τέλος $5,9 \pm 0,2$. Συνεπώς, και στα δύο τυριά παρατηρείται μικρή πτώση του pH, που μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή οργανικών οξέων που συντίθενται ως μεταβολικά παραπροϊόντα της μικροχλωρίδας του τροφίμου. Επιπλέον, στον Πίνακα 3.2, παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών ενεργότητας νερού των τυριών Ricotta και Camembert. Όπως είναι αναμενόμενο, το τυρί Camembert έχει χαμηλότερες τιμές (0,97) σε σχέση με το τυρί

Ricotta (0,98). Στο τελευταίο παρατηρείται και μια μικρή αύξηση με την πάροδο της διάρκειας συντήρησης (0,99)

Η διαφορά στο δυναμικό της ανάπτυξης και της ανθεκτικότητας σε διάφορα είδη καταπόνησης έχει μελετηθεί και από άλλους ερευνητές. Το μη προσαρμοσμένο στο περιβάλλον του τροφίμου στέλεχος ScottA(R), που εμβολιάστηκε στο τυρί Ricotta και συντηρήθηκε στους 7°C, παρουσίασε την πιο αργή ανάπτυξη, συμπέρασμα που συμφωνεί με αυτό των Lianou et al. και των Barbosa et al. Οι τελευταίοι βρήκαν πως το συγκεκριμένο στέλεχος είχε την πιο μεγάλη διάρκεια φάσης προσαρμογής, σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 4°C (Lianou et al., 2006, Barbosa et al., 1994).

Αν και στις μονοκαλλιέργειες των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν στον εμβολιασμό του τυριού Ricotta, όπως άλλωστε παρατήρησαν και οι Zilelidou et al., σε tryptic soy broth (2015) φαίνεται πως οι καμπύλες ανάπτυξης είναι παρόμοιες, στις καμπύλες των συγκαλλιεργείων παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις διαστελεχιακής αλληλεπίδρασης. Οι ερευνητές Gorski et al., παρατήρησαν ότι η ανάκτηση των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, κατά τον εμπλουτισμό τους, δεν εξαρτάται μόνο από το δυναμικό ανάπτυξης του κάθε στελέχους αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις που διαμορφώνονται μεταξύ τους (2006).

Ο μόνος συνδυασμός, στο τυρί Ricotta, στον οποίο δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή, σε καμία συνθήκη υποστρώματος ή προσαρμογής του στελέχους σε αυτό, ήταν ο συνδυασμός ScottA(S) - PL25. Το στέλεχος PL25 φάνηκε να μην επηρεάζεται από την συγκαλλιέργεια του με το στέλεχος ScottA(S), συμπέρασμα που συμφωνεί με αυτό των Zilelidou et al., στην μελέτη των οποίων το συγκεκριμένο στέλεχος όταν συγκαλλιεργήθηκε με το στέλεχος ScottA ή C5 δεν παρουσίασε κάποια σημαντική διαφορά στην ανάπτυξή του (2016, b). Στον συνδυασμό των μη προσαρμοσμένων στελεχών C5 – ScottA(R), το στέλεχος C5, παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το στέλεχος ScottA(R). Παρόμοια, στο συνδυασμό των προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 – 6179, το στέλεχος C5, παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το στέλεχος 6179. Και στις δύο περιπτώσεις το στέλεχος C5, είναι αυτό που αναγκάζει τα άλλα δύο να εισέλθουν στην στατική φάση γρηγορότερα, κατά τη 12^η

ημέρα συντήρησης των τυριών Ricotta που ήταν εμβολιασμένα με τους συνδυασμούς στελεχών C5 – 6179 και C5 – ScottA(R) από όταν εισήλθαν στις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειές τους, δηλαδή κατά την 15^η ημέρα συντήρησης. Αυτή η παρατήρηση, συμφωνεί με το συμπέρασμα των Buchanan και Bagi, που υποστηρίζουν πως τα στελέχη που αναπτύσσονται πιο γρήγορα είναι και εκείνα που θα επικρατήσουν στην συγκαλλιέργεια με άλλο στέλεχος (1999). Αυτή η συμπεριφορά του στελέχους C5, παρατηρείται και στο πείραμα των Zilelidou et al., όπου το συγκεκριμένο στέλεχος ανάγκασε τα υπόλοιπα που συγκαλλιεργήθηκαν μαζί του να φτάσουν σε χαμηλότερους πληθυσμούς συγκριτικά με τις μονοκαλλιέργειές τους (2016, b). Οι Zilelidou et al., παρατήρησαν πως τα στελέχη C5 και PL25, ήταν ισχυροί ανταγωνιστές στις περιπτώσεις που συγκαλλιεργήθηκαν με άλλα στελέχη σε tryptic soy broth, καθώς η ανάπτυξή τους δεν επηρεάστηκε σε καμία περίπτωση (2015). Στην παρούσα μελέτη, τα στελέχη C5 και PL25, σε όλες τις περιπτώσεις, δεν φάνηκε να επηρεάζονται όσον αφορά την ανάπτυξή τους από την συγκαλλιέργειά τους με κάποιο άλλο στέλεχος

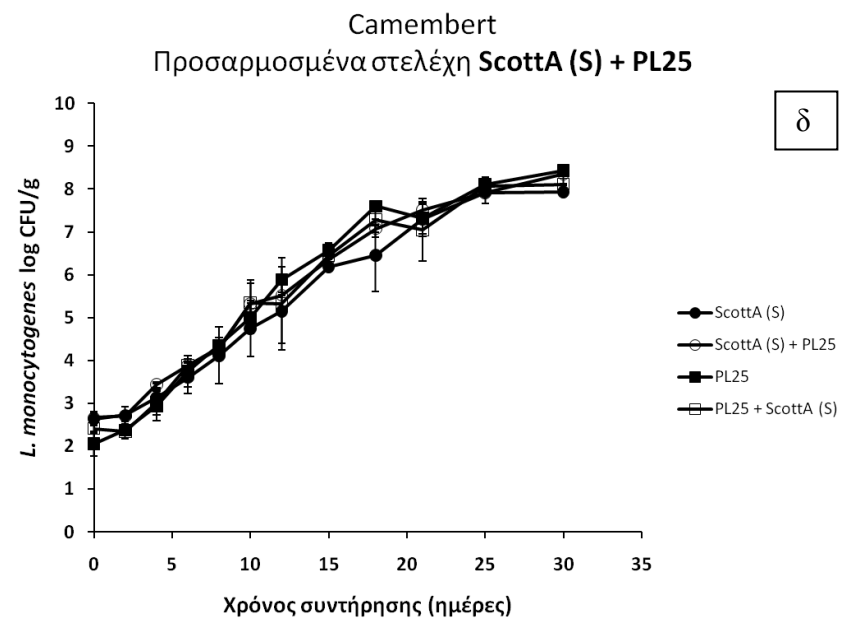
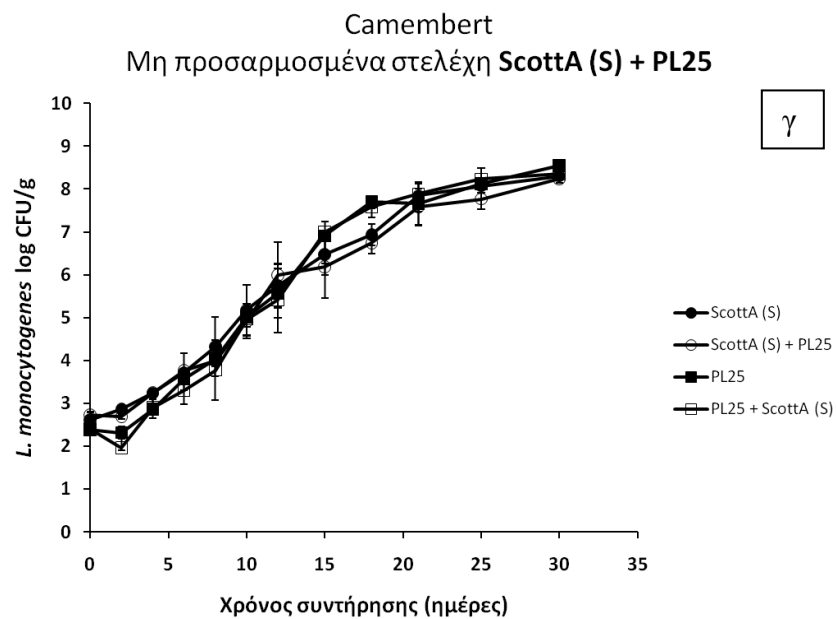
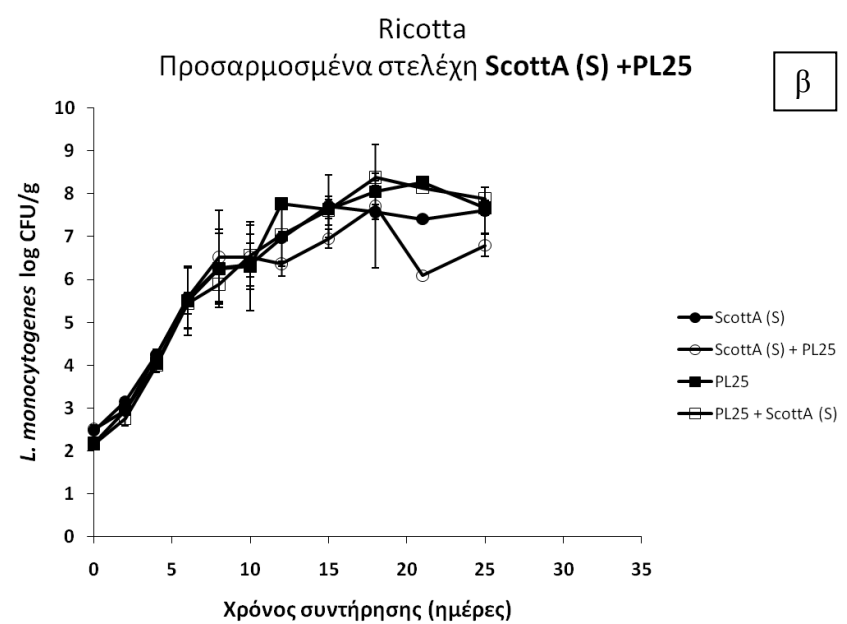
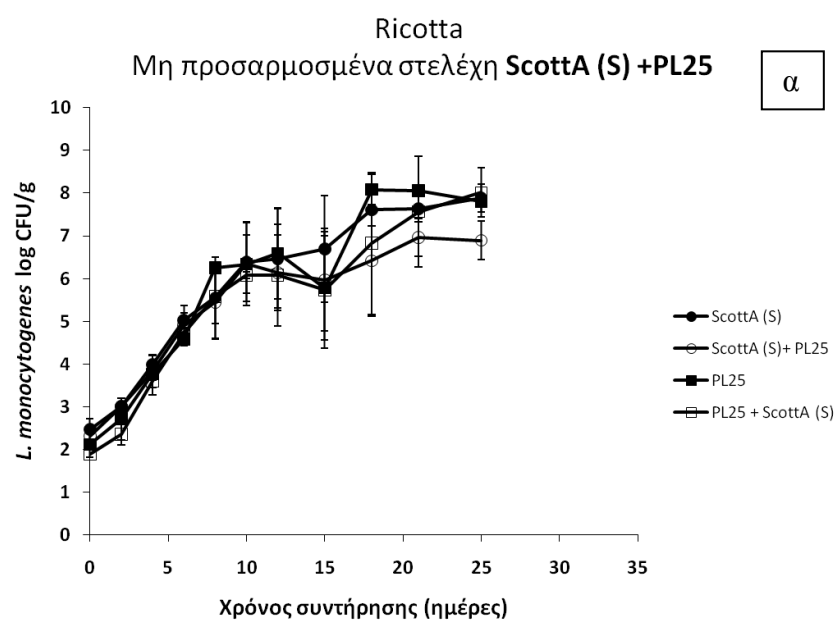
Στην περίπτωση του τυριού Ricotta, που καλλιεργήθηκε με τον συνδυασμό των προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 – ScottA(R), δεν παρατηρείται επίδραση της συγκαλλιέργειας στην ανάπτυξη των στελεχών, σε αντίθεση με την συγκαλλιέργεια των ίδιων στελεχών στο τυρί Ricotta, που δεν είχαν προσαρμοστεί στο περιβάλλον του τροφίμου, των οποίων η ανάπτυξη επηρεάστηκε. Πιθανώς σημαντικό ρόλο έπαιξε η προσαρμογή των στελεχών στο τρόφιμο, που κατάφερε να εξαλείψει την καταπόνηση που προσδίδει το τρόφιμο στα στελέχη, επιτρέποντάς τους έτσι να φτάσουν στον πληθυσμό που θα έφταναν και στην περίπτωση που θα καλλιεργούνταν μόνα τους. Παραλληλισμός αυτής της παρατήρησης, θα μπορούσε να γίνει και με την παρατήρηση των Zilelidou et al., όπου διαπιστώθηκε πως η συγκαλλιέργεια των στελεχών δεν επηρέασε την ανάπτυξή τους στο TSAYE, σε αντίθεση με τις φέτες ζαμπόν που φάνηκε να υπάρχει ανταγωνισμός. Αυτό αποδόθηκε στην πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά, που στην περίπτωση του TSAYE, είναι απεριόριστη, ενώ στην περίπτωση του ζαμπόν όχι. Άλλωστε είναι γνωστό πως η διαθεσιμότητα στα θρεπτικά συστατικά είναι κύριος παράγοντας για τις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών (Conforth & Foster, 2013). Επιπλέον, η προσαρμογή των στελεχών στο περιβάλλον του τροφίμου, έχει συνέπειες στην κινητική της ανάπτυξης αυτών των στελεχών. Το στέλεχος C5, όταν προσαρμόζεται στο περιβάλλον του τυριού Ricotta εμφανίζει πολύ μικρότερη διάρκεια φάσης

προσαρμογής (αύξηση 1.5 log CFU/g από τη 2^η μέρα συντήρησης), σε σχέση με όταν εμβολιάζεται στο τυρί χωρίς να έχει προηγουμένως προσαρμοστεί σε αυτό (είσοδος στην εκθετική φάση την 4^η μέρα). Ωστόσο, στον συνδυασμό C5-6179, επίδραση της συγκαλλιέργειας, παρατηρείται και στα προσαρμοσμένα και στα μη προσαρμοσμένα στο περιβάλλον του τροφίμου, στελέχη. Δηλαδή, σε αυτή την περίπτωση η προσαρμογή δεν ήταν αρκετή ώστε η ανάπτυξη του στελέχους 6179, να μην επηρεαστεί από την συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος C5.

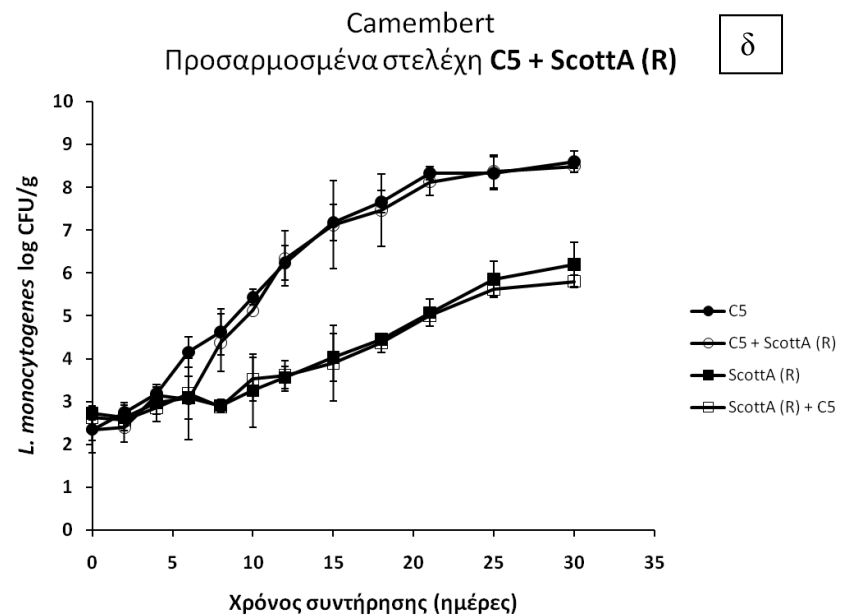
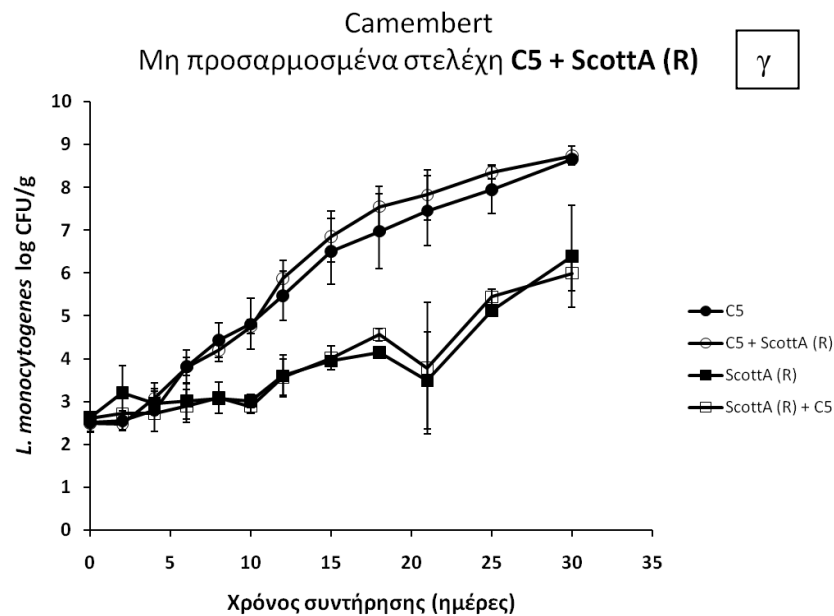
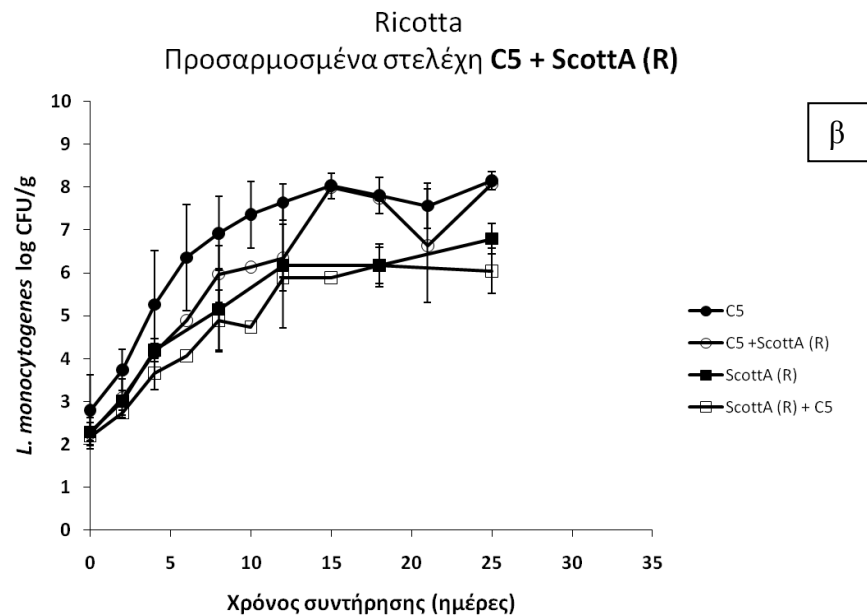
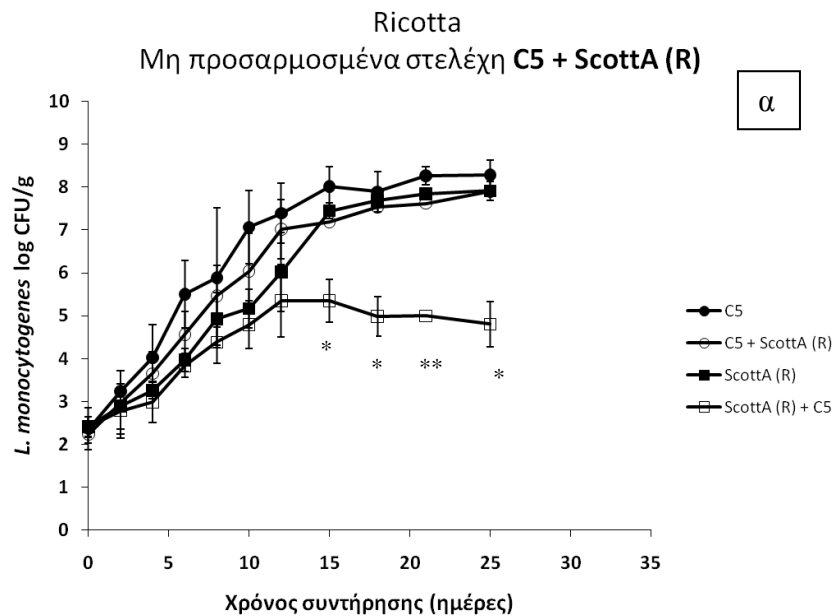
Ένα σημείο που αξίζει να αναφερθεί είναι πως παρατηρώντας τα αποτελέσματα των μονοκαλλιιεργειών των στελεχών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι εμφανής η επίδραση του διαφορετικού υποστρώματος στην ανάπτυξη κάθε στελέχους. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στο στέλεχος 6179 και ScottA, σύμφωνα με το γράφημα 1, φαίνεται να περιορίζονται πολύ όταν αυτά καλλιεργούνται στο τυρί Camembert σε σχέση με το τυρί Ricotta. Παρόμοια παρατήρηση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, έκαναν και οι Zilelidou et al., όπου παρόλο που τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, όταν καλλιεργήθηκαν στο εργαστηριακό υπόστρωμα tryptic soy agar, παρουσίασαν ίδια ανάπτυξη μόνα τους ή σε συγκαλλιέργεια, σε σύνθηκες πραγματικού τροφίμου (φέτες ζαμπόν) παρουσίασαν διαφορές στην ανάπτυξη (2016, b). Ακόμη, οι Gnanou Besse et al., παρατήρησαν πως όταν έγινε προσθήκη άγαρ σε υγρό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα, η ανάπτυξη των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, περιορίστηκε εξαιτίας της «μάχης» για πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά (2010). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (χαμηλότερο pH και a_w , σε σχέση με το τυρί Ricotta) αλλά πιθανώς και η δομή του τυριού Camembert φαίνεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη αυτών των στελεχών.

Πίνακας 3.2: Μεταβολή της ενεργότητας νερού (αρχή, μέση και τέλος της συντήρησης) των τυριών Camembert και Ricotta, ανά συνδυασμό στελεχών και παρτίδα τυριών, κατά την συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.

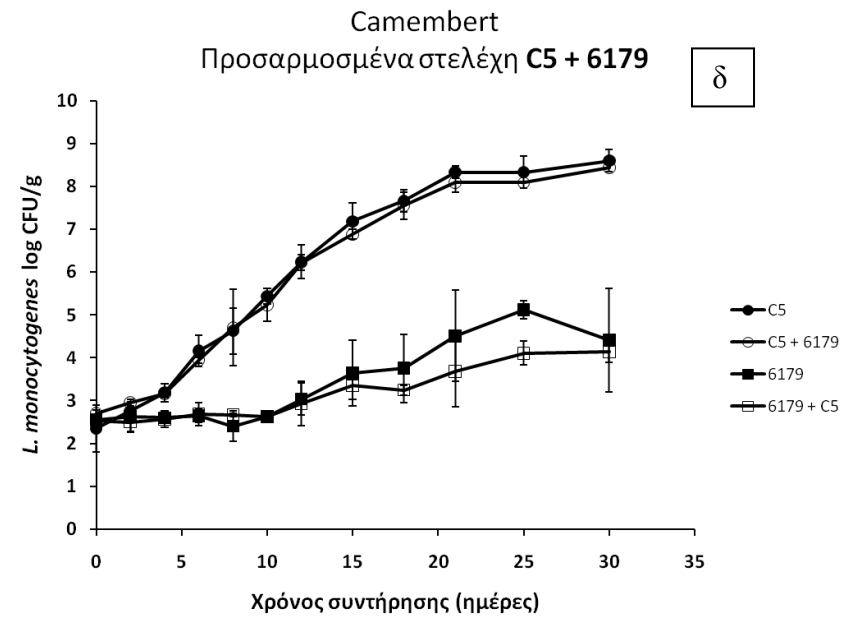
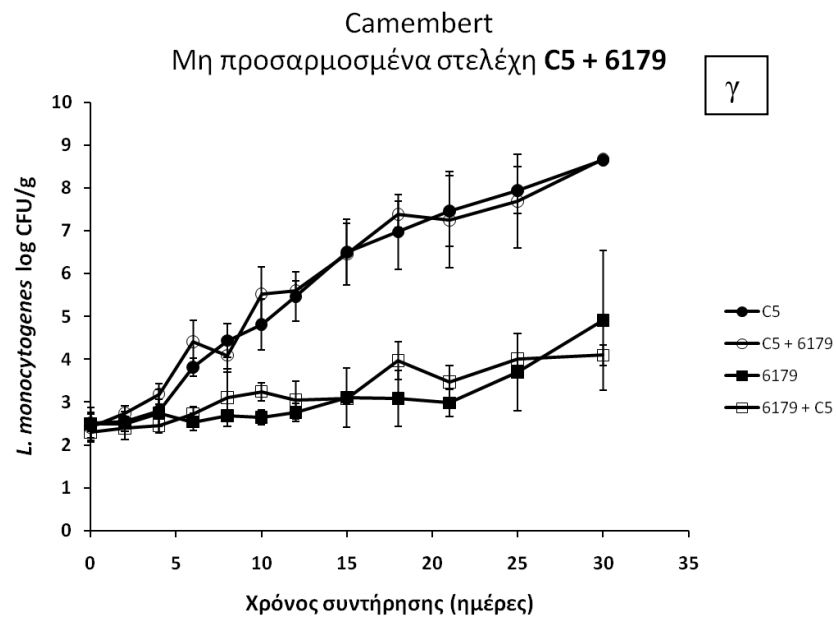
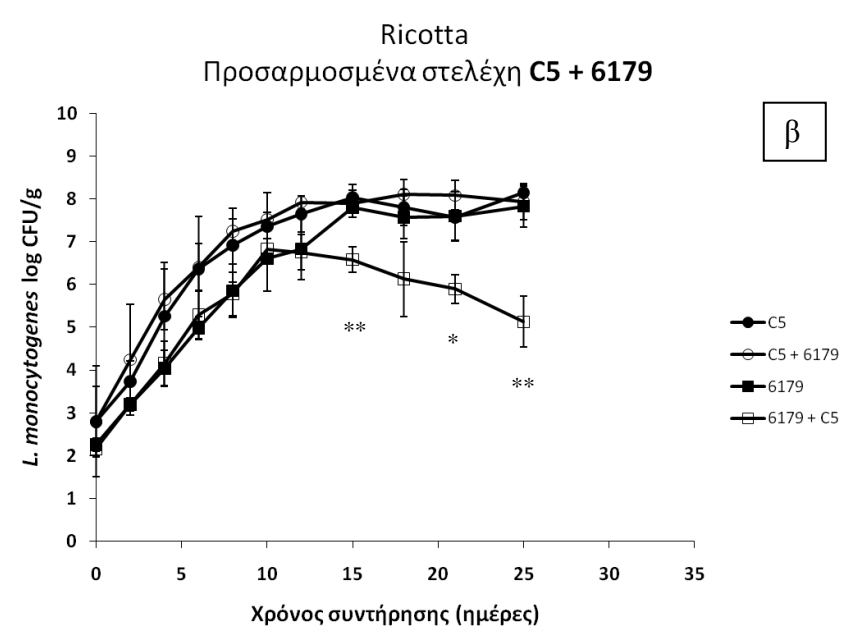
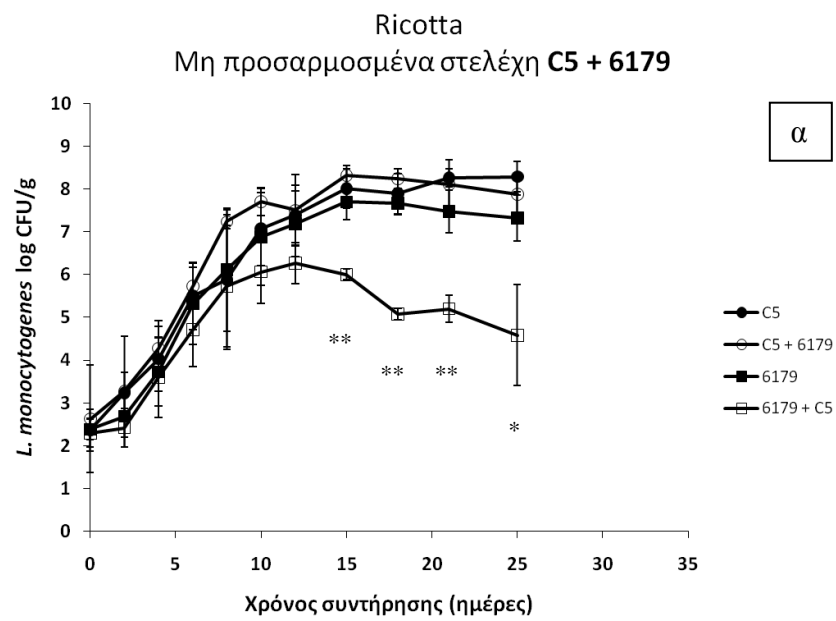
Είδος τυριού	Συνδυασμός στελεχών	Παρτίδα τυριών	Αρχή συντήρησης	Μέση συντήρησης	Τέλος συντήρησης
Camembert	ScottA(S) – PL25	1	0.976	0.977	0.976
		2	0.960	0.979	0.977
	C5 – ScottA(R)	1	0.976	0.979	0.970
		2	0.974	0.975	0.970
	C5 - 6179	1	0.975	0.978	0.978
		2	0.968	0.987	0.980
Ricotta	ScottA(S) – PL25	1	0.986	0.984	0.997
		2	0.981	0.980	0.988
	C5 – ScottA(R)	1	0.984	0.988	0.982
		2	0.987	0.981	0.980
	C5 - 6179	1	0.991	0.981	0.981
		2	0.982	0.995	0.985



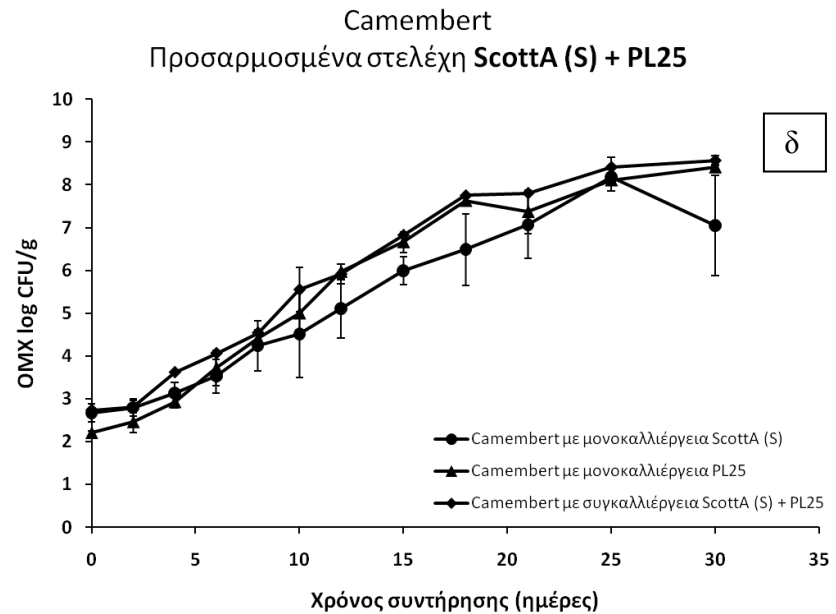
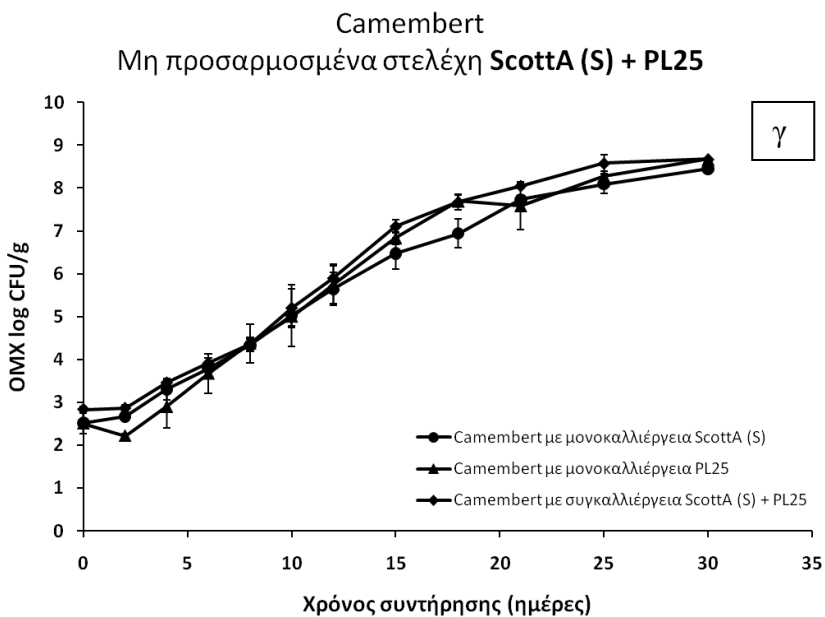
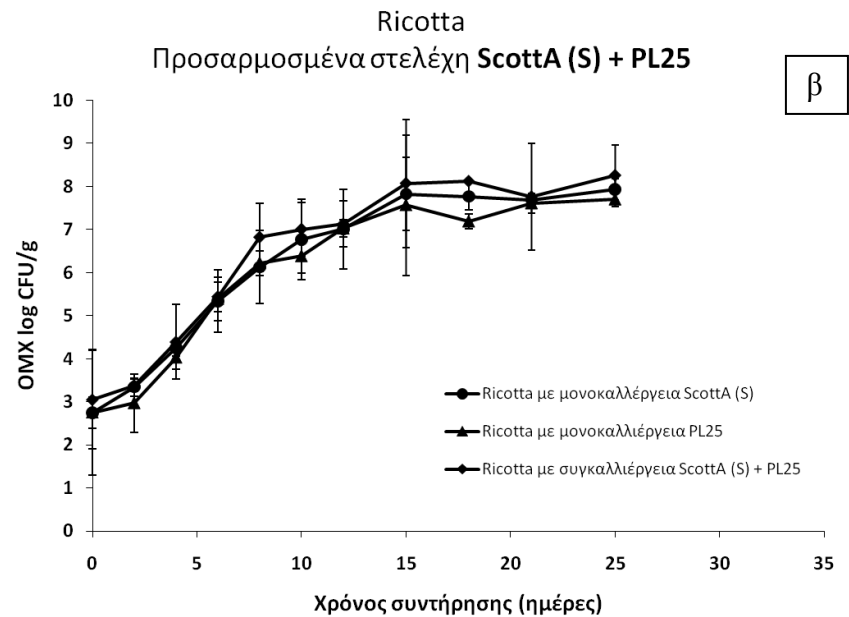
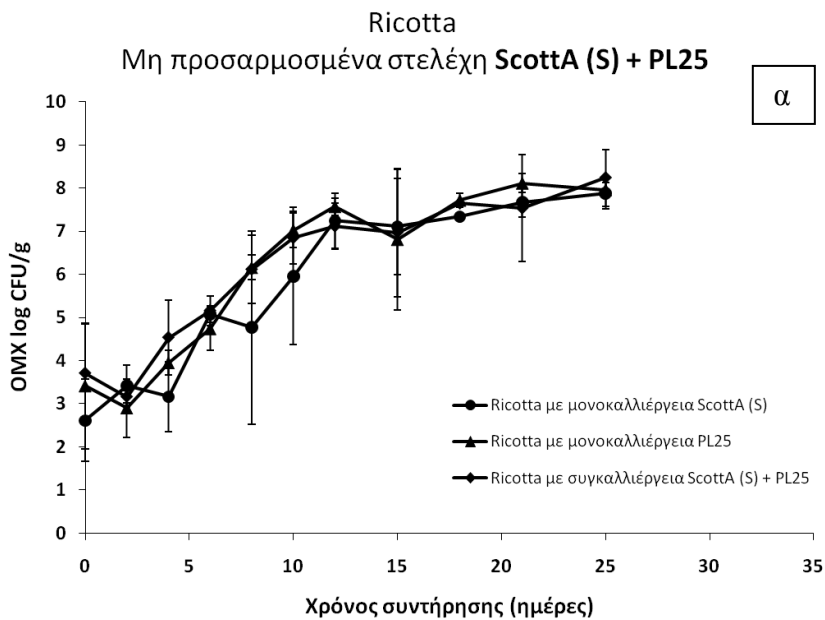
Γράφημα 2: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στελεχών στο τρόφιμο, ScottA(S) και PL25 του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



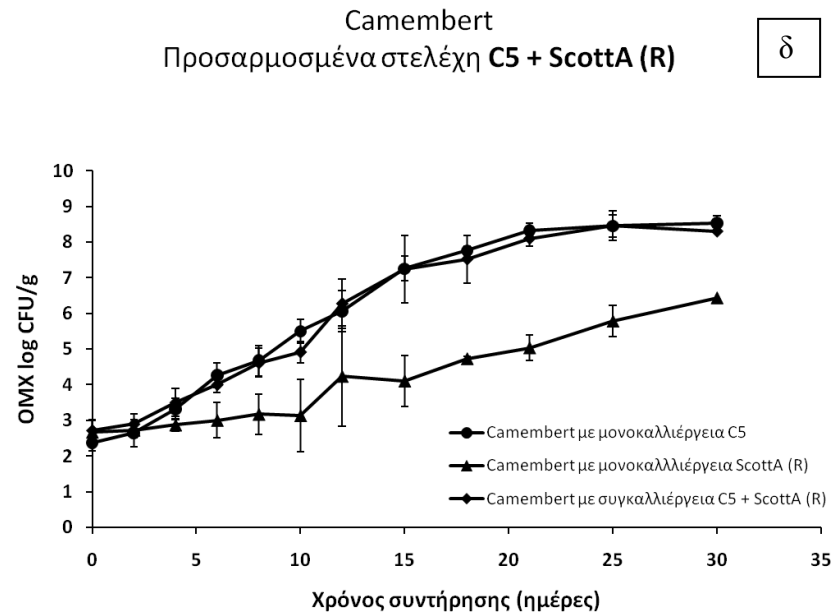
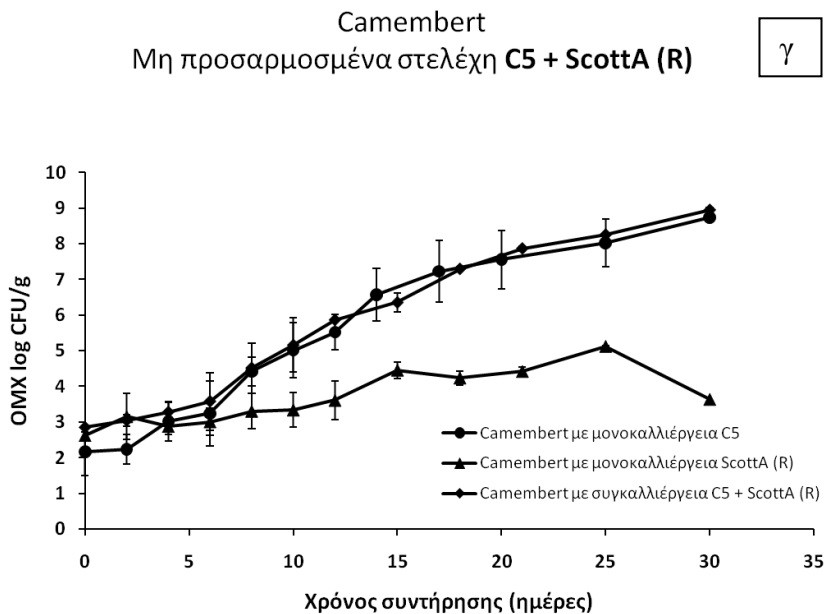
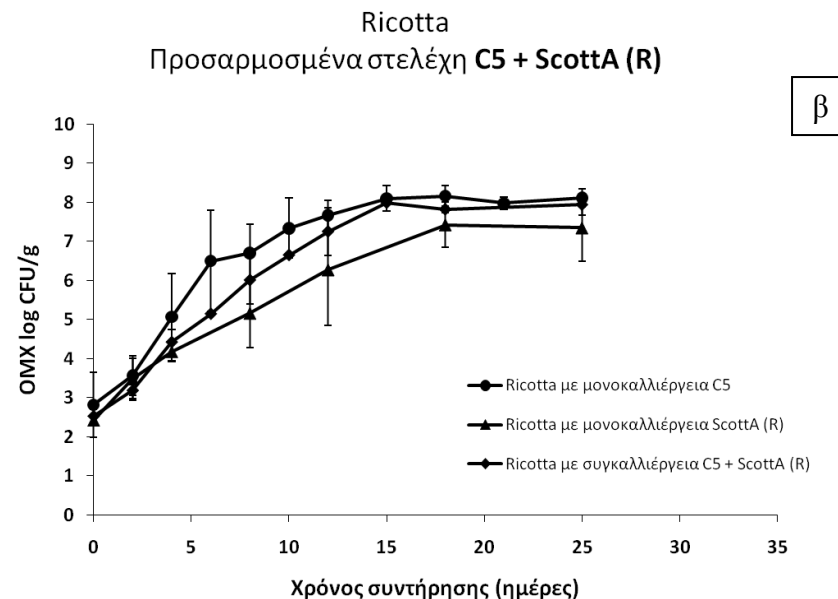
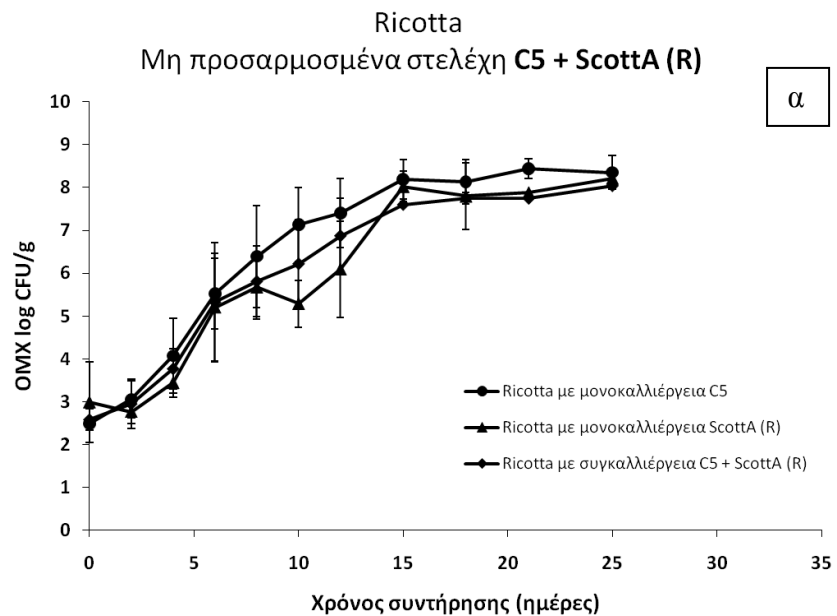
Γράφημα 3: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στελεχών C5 και ScottA(R) του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C(οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ συγκαλλιεργειών και των αντίστοιχων μονοκαλλιεργειών (p<0,05: *, p<0,01: **).



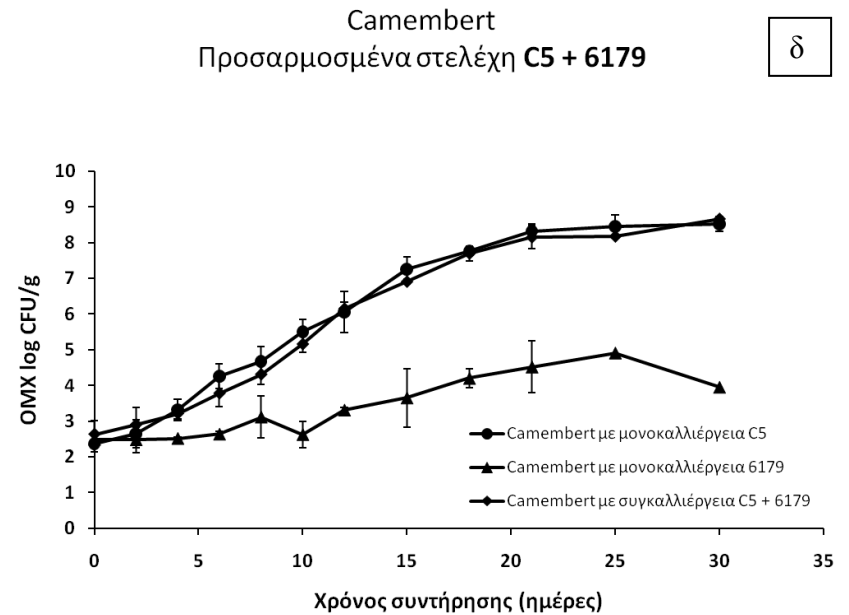
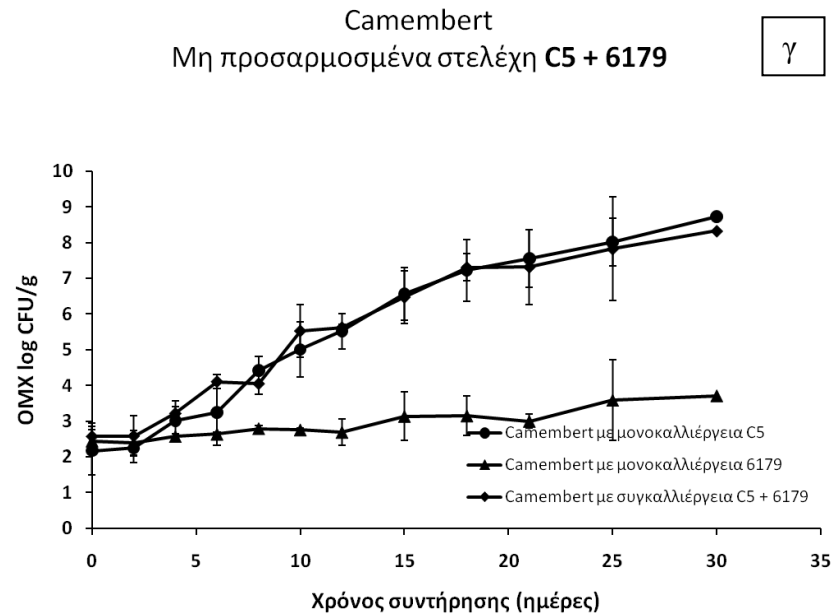
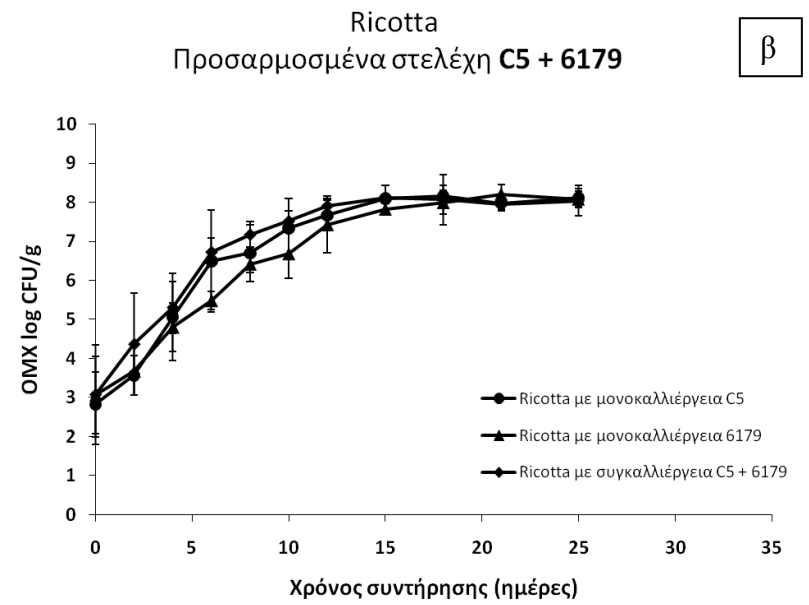
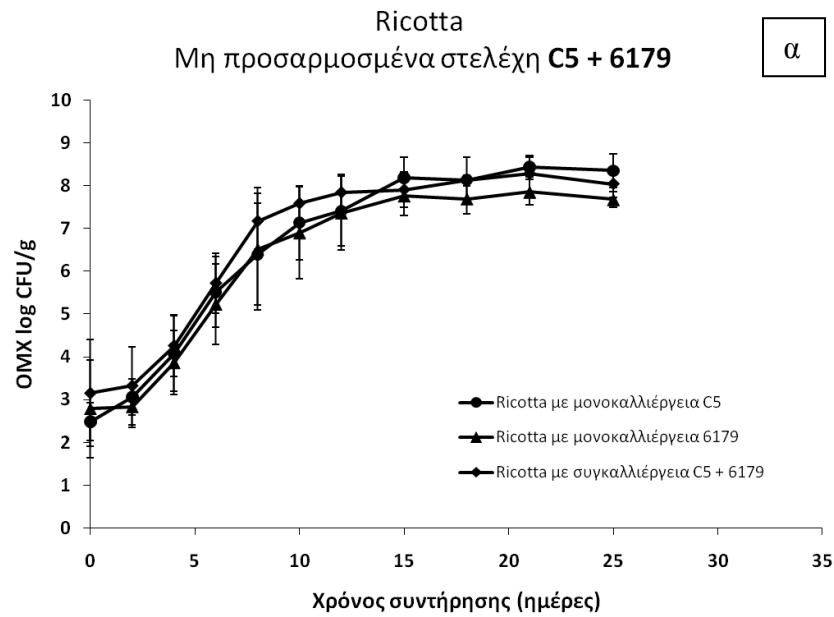
Γράφημα 4: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στελεχών C5 και 6179 του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C (οι αστερισκοί υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ συγκαλλιεργειών και των αντίστοιχων μονοκαλλιεργειών (p<0,05: *, p<0,01: **).



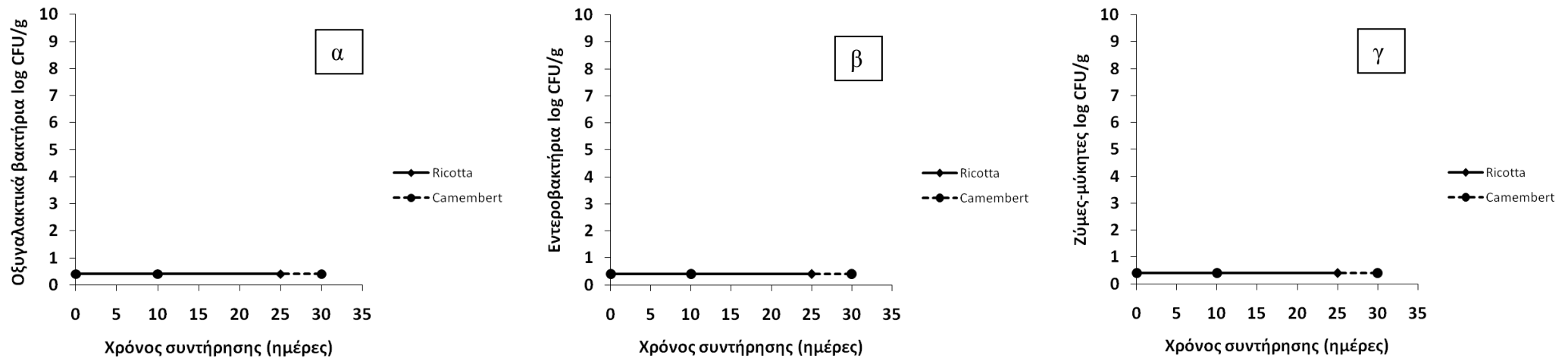
Γράφημα 5: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης της OMX στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες μη προσαρμοσμένων και προσαρμοσμένων στελεχών ScottA(S) και PL25 του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



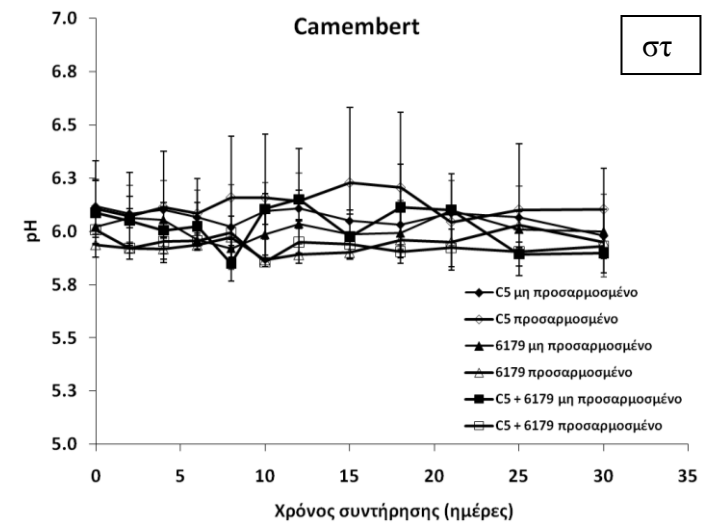
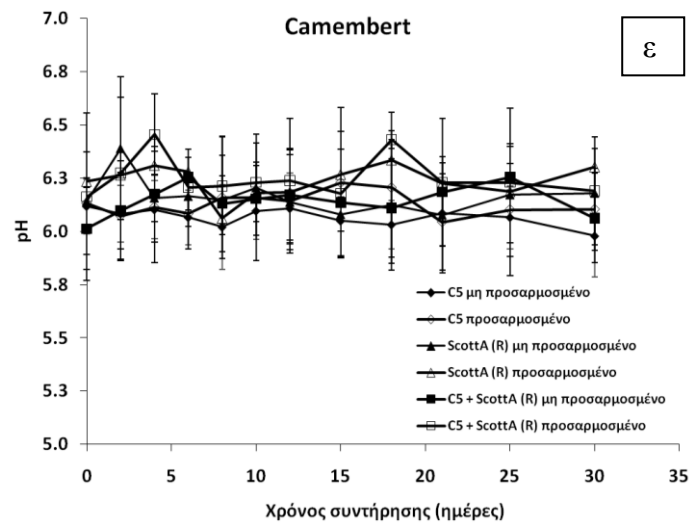
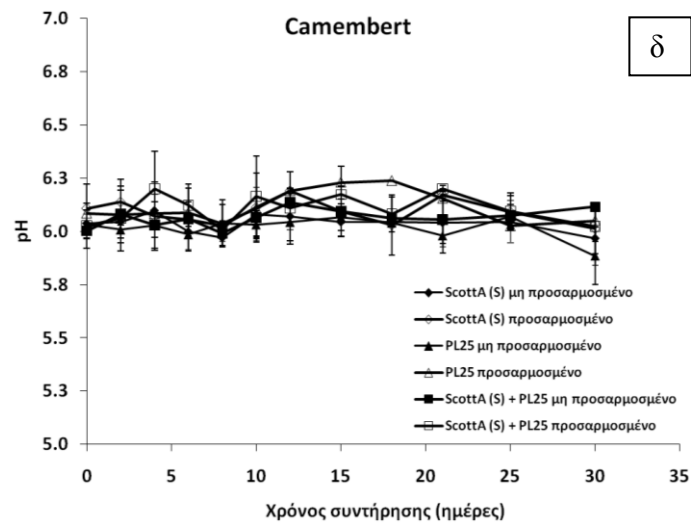
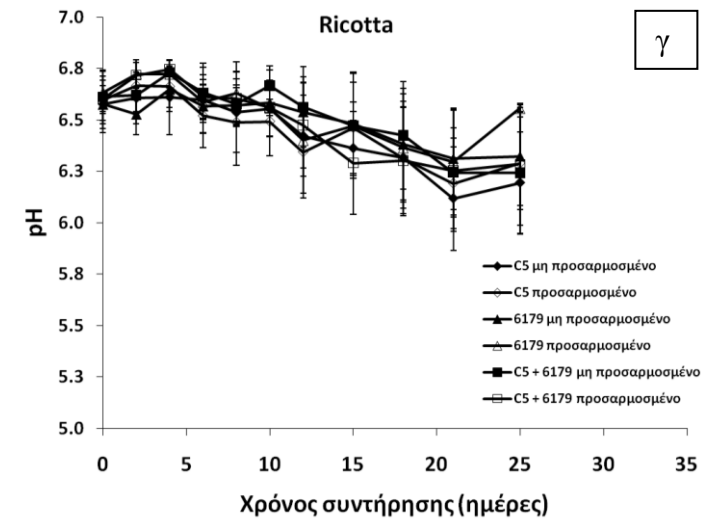
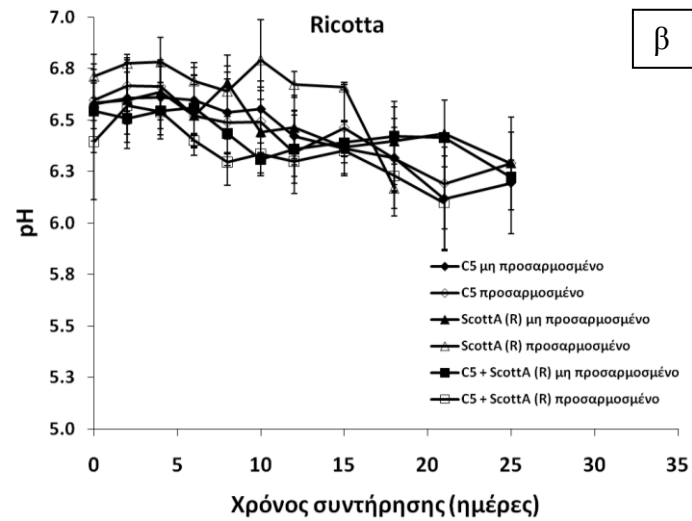
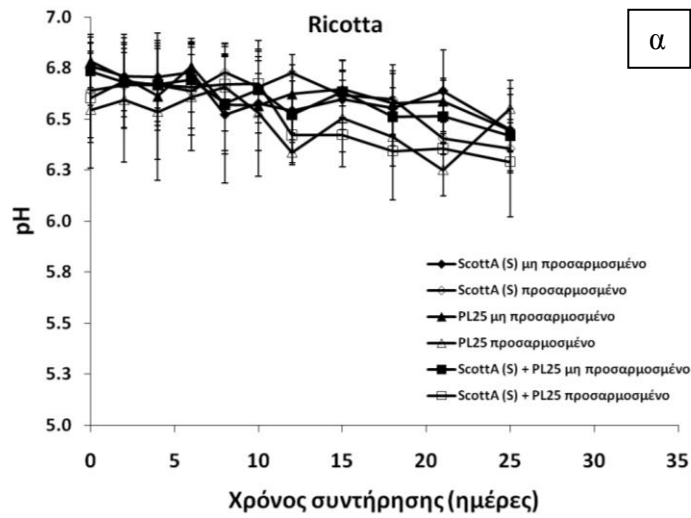
Γράφημα 6: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης της OMX στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες μη προσαρμοσμένων και προσαρμοσμένων στελεχών C5 και ScottA(R) του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



Γράφημα 7: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης της OMX στα τυριά Ricotta (α, β) και Camembert (γ, δ), που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες μη προσαρμοσμένων και προσαρμοσμένων στελεχών C5 και 6179 του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



Γράφημα 8: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (α), των εντεροβακτηρίων (β) και των ζυμών – μυκήτων (γ), στα τυριά Ricotta και Camembert κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



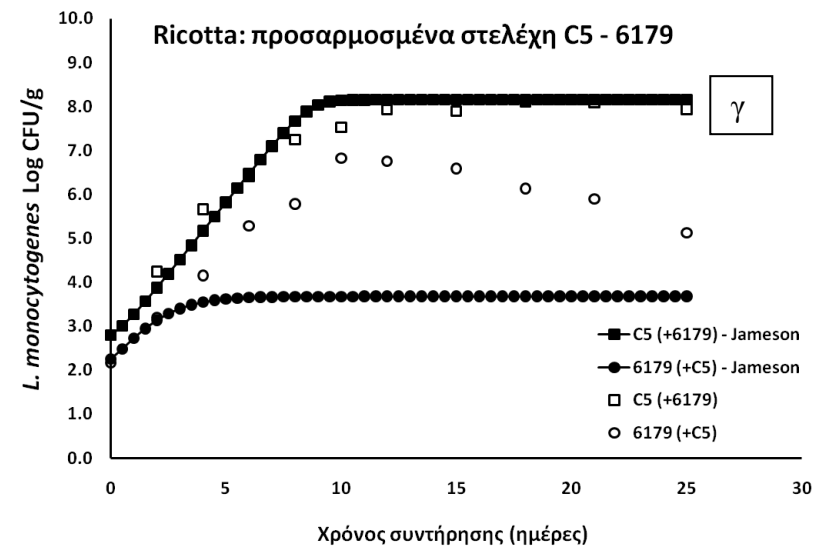
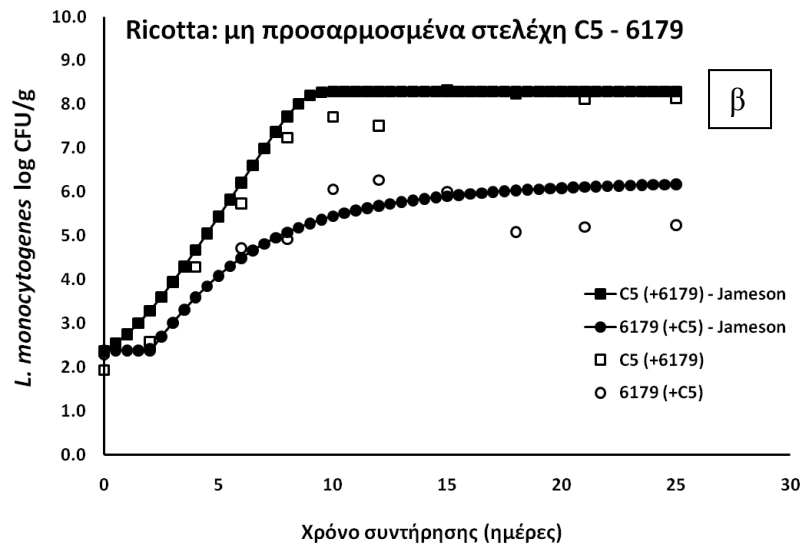
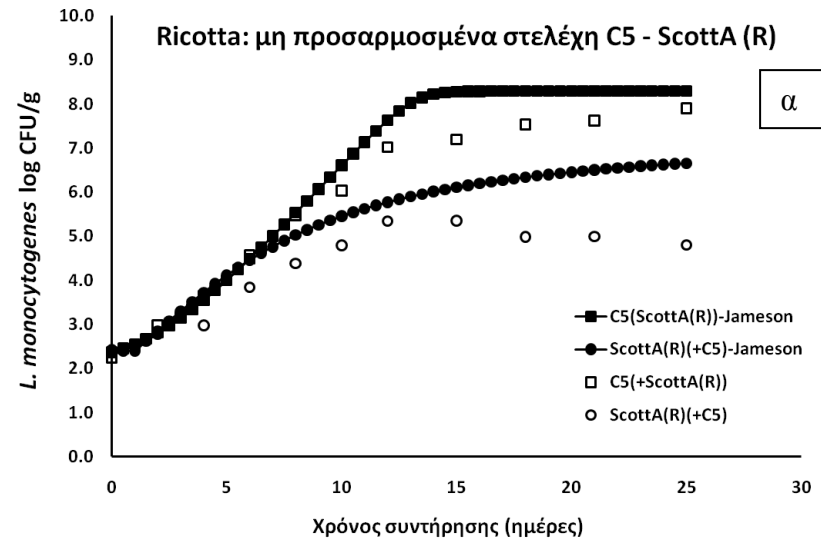
Γράφημα 9: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του pH των εμβολιασμένων τυριών Ricotta (α, β, γ) και Camembert (δ, ε, στ), με τα προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα στο τρώσιμο στελέχη, κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.

3. 1. 3 Εκτίμηση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σύμφωνα με το φαινόμενο Jameson

Στους συνδυασμούς στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που συγκαλλιεργήθηκαν και το ένα στέλεχος επηρέασε την ανάπτυξη του άλλου, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 2 (Παράγραφος 2.7), ώστε να γίνει εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων των στελεχών σύμφωνα με το φαινόμενο Jameson. Από την χρήση του μοντέλου προέκυψαν τα Γραφήματα 10α-10γ, που παρατίθενται παρακάτω.

Στο Γράφημα 10α, απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης της συγκαλλιέργειας των μη προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 – ScottA(R), στο τυρί Ricotta, που προκύπτει από το μοντέλο του φαινομένου Jameson. Η καμπύλη αυτή φαίνεται να μην συμπίπτει επαρκώς με τα πειραματικά δεδομένα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την σχετικά μεγάλη τιμή RMSE, που στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 0,917. Στο Γράφημα 10β, απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης της συγκαλλιέργειας των μη προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 – 6179, στο τυρί Ricotta, που προκύπτει από το μοντέλο του φαινομένου Jameson. Σε αντίθεση με την παραπάνω περίπτωση, η καμπύλη αυτή φαίνεται να αντιπροσωπεύει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μικρότερη τιμή RMSE, που στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 0,342. Τέλος, στο Γράφημα 10γ, απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης της συγκαλλιέργειας των προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών C5 – 6179 στο τυρί Ricotta, που προκύπτει από το μοντέλο του φαινομένου Jameson. Όπως και στην πρώτη περίπτωση, η καμπύλη αυτή φαίνεται να μην συμπίπτει με τα πειραματικά δεδομένα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μεγαλύτερη τιμή RMSE, που στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 4,396.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας των μη προσαρμοσμένων στελεχών C5 – 6179, στο τυρί Ricotta, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των στελεχών φαίνεται να εξηγούνται από το φαινόμενο Jameson, σύμφωνα με το οποίο τα στελέχη ανταγωνίζονται για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά με μη συγκεκριμένο τρόπο. Αντίθετα, στις άλλες δύο περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν, η αλληλεπίδραση που φαίνεται να υπάρχει δεν μπορεί να αποδοθεί ολοκληρωτικά στο φαινόμενο Jameson, και είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει για άλλους λόγους, όπως η επαφή των κυττάρων.



Γράφημα 10: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης των μη προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τροφίμου στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, C5 – ScottA(R) (α), C5 -6179 (β) και των προσαρμοσμένων στελεχών C5 -6179 (γ), που συγκαλλιεργήθηκαν στο τυρί Ricotta, και συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C, όπως προκύπτουν από το μοντέλο του φαινομένου Jameson. Οι κουκίδες, απεικονίζουν τα πειραματικά δεδομένα.

3.2 Επίδραση των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη διάρκεια συντήρησης, στη μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, σε μαλακά τυριά, με έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό

Η ικανότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, να επιβιώνει ή και να αναπτύσσεται, στο περιβάλλον των τυριών, σε μερικά από τα οποία οι τιμές του pH είναι πολύ κοντά στις υποθανάτιες συνθήκες καταπόνησης των βακτηρίων, μπορεί να οδηγήσει σε προσαρμογή του σε μετέπειτα πιο ισχυρές συνθήκες καταπόνησης, όπως είναι το χαμηλό pH του στομάχου. Το τελευταίο αποτελεί την πρώτη άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού έναντι στους παθογόνους μικροοργανισμούς που δύνανται να προσβάλλουν το εντερικό επιθήλιο. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, ο στόχος του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων, έπειτα από έκθεση των μαλακών τυριών Ricotta και Camembert, που εμβολιάστηκαν με συνδυασμούς στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, σε συνθετικό γαστρικό υγρό, κατά τη διάρκεια της συντήρησης αυτών των τυριών. Όπως προαναφέρθηκε, επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί, ScottA-PL25 και C5-ScottA, μη προσαρμοσμένων στο περιβάλλον του τυριού. Με τον πρώτο συνδυασμό, στον οποίο δεν παρατηρήθηκε η συγκαλλιέργεια των στελεχών να επιδρά στην ανάπτυξή τους, εμβολιάστηκαν και τα δύο είδη τυριών, Camembert και Ricotta ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση του υποστρώματος ενώ με τον δεύτερο μόνο το τυρί Ricotta. Όσον αφορά το τυρί Ricotta, οι συνδυασμοί αυτοί επιλέχθηκαν ώστε να γίνει εκτίμηση της μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας δύο στελεχών, τόσο όταν το ένα δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του άλλου (ScottA-PL25) όσο και όταν η ύπαρξη του ενός επηρεάζει την ανάπτυξη του άλλου (C5-ScottA).

Τυριά Ricotta, εμβολιάστηκαν με τα στελέχη ScottA και PL25, αλλά και με την συγκαλλιέργεια αυτών. Κατά την ημέρα της συντήρησης που αυτά τα στελέχη έφτασαν στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ($4,5-5 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$), τα εμβολιασμένα τυριά εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό, του οποίου το pH είχε ρυθμιστεί στο 2. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 11α, και τα δύο στελέχη, όταν

καλλιεργούνται μόνο τους στο τυρί Ricotta, καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Αξίζει να σημειωθεί πως, ο πληθυσμός του στελέχους PL25 θανατώνεται πιο γρήγορα από τον αντίστοιχο του στελέχους ScottA, στις μονοκαλλιέργειες αυτών των στελεχών, αφού ήδη από τα πρώτα 20 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό υπάρχει μείωση 3,5 log CFU/g για το στέλεχος PL25 και 2,5 log CFU/g για το στέλεχος ScottA. Συνεπώς, η μονοκαλλιέργεια του στελέχους ScottA φαίνεται να είναι πιο ανθεκτική σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια του στελέχους PL25. Όσον αφορά την συγκαλλιέργεια αυτών των στελεχών στο τυρί Ricotta, κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, το στέλεχος ScottA καταφέρει να επιβιώσει μέχρι τα 60 λεπτά έκθεσης και να καταμετράται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου, ενώ έπειτα με τον εμπλουτισμό που πραγματοποιείται κατά την δειγματοληψία, έως τα 120 λεπτά υπάρχει ανίχνευση, αλλά όχι καταμέτρηση, του παθογόνου. Το στέλεχος PL25, καταφέρει να επιβιώσει μόνο μέχρι τα πρώτα 20 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό και να καταμετράται σε πληθυσμούς μεγαλύτερους του ορίου καταμέτρησης της μεθόδου. Έπειτα από τα 20 λεπτά, το στέλεχος αυτό ανιχνεύεται μέσω εμπλουτισμού, μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης, αλλά δεν καταμετράται. Παρατηρώντας το Γράφημα 11α, το στέλεχος PL25, όταν συγκαλλιεργείται με το στέλεχος ScottA, φαίνεται να επηρεάζεται όσον αφορά τη μείωση του πληθυσμού του, καθώς από τα 20 λεπτά έκθεσης φαίνεται να βρίσκεται σε πληθυσμούς μικρότερους του ορίου καταμέτρησης της μεθόδου και να ανιχνεύεται μέσω εμπλουτισμού. Το στέλεχος ScottA, μέχρι τα 60 πρώτα λεπτά της έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό καταφέρει να επιβιώνει σε πληθυσμούς μεγαλύτερους από όταν καλλιεργείται μόνο. Επί παραδείγματι, στα 40 λεπτά έκθεσης ο πληθυσμός της μονοκαλλιέργειας ScottA είναι $1,8 \pm 0,1$ log CFU/g, ενώ για το ίδιο στέλεχος όταν συγκαλλιεργείται με το PL25, ο πληθυσμός είναι $2,5 \pm 0,4$ log CFU/g. Συνεπώς, κατά την συγκαλλιέργεια αυτών των δύο στελεχών το στέλεχος ScottA φαίνεται να είναι πιο οξεοανθεκτικό ενώ το PL25 πιο ευαίσθητο. Στο Γράφημα 11α, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιέργειες ScottA (2,75-2,8) και PL25 (2,67-2,7), αλλά και την συγκαλλιέργειά τους (2,69-2,77). Την ημέρα συντήρησης που επιλέχτηκε να γίνει η έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό, ο παθογόνος μικροοργανισμός βρίσκεται στη μέση της εκθετικής φάσης

ανάπτυξης και δαπανά την περισσότερη ενέργεια για την ανάπτυξη του, μη αναπτύσσοντας μηχανισμούς επιβίωσης.

Στο Γράφημα 11β, απεικονίζονται οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιιεργειών και της συγκαλλιιεργείας των στελεχών ScottA και PL25, με τα οποία εμβολιάστηκαν τυριά Ricotta, τα οποία εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην αρχή της στατικής φάσης της ανάπτυξής τους ($6,0 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$). Και τα δύο στελέχη, όταν καλλιιεργούνται μόνα τους στο τυρί Ricotta, καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Και σε αυτή την περίπτωση η μονοκαλλιιεργεία του στελέχους PL25, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη από αυτή του στελέχους ScottA, καθώς οι τελικοί πληθυσμοί στα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό είναι $2,2 \pm 0,8 \log \text{CFU/g}$ και $4,6 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$, αντίστοιχα. Καταμέτρηση πληθυσμών πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου παρατηρείται και για την συγκαλλιιεργεία των στελεχών μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Επιπλέον, η παρουσία του δεύτερου στελέχους στην συγκαλλιιεργεία, κατά τη διάρκεια συντήρησης των ScottA και PL25, μπορεί να συμβάλει στην μεγαλύτερη και γρηγορότερη μείωση του πληθυσμού των δύο στελεχών, αφού ο τελικός πληθυσμός των συγκαλλιιεργειών είναι κατά $1,2 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$ μικρότερος από τον τελικό πληθυσμό των μονοκαλλιιεργειών. Στο Γράφημα 11β, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό την ημέρα έκθεσης του τυριού, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιιεργείες ScottA (2,72-2,86) και PL25 (2,73-2,89), αλλά και την συγκαλλιιεργεία τους (2,75-2,89). Την ημέρα συντήρησης του τυριού, που γίνεται η έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό, ο παθογόνος βρίσκεται ήδη στην στατική φάση ανάπτυξής του, με τον πληθυσμό του να βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο. Τότε εκφράζει γονίδια που τον καθιστούν πιο ανθεκτικό στις καταπονήσεις και τον προστατεύουν από στρεσογόνες καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, δαπανά μεγάλο μέρος της ενέργειάς της 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 (120 λεπτά).

Στο Γράφημα 12α, παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιιεργειών αλλά και της συγκαλλιιεργειας των στελεχών C5 και ScottA του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που εμβολιάστηκαν σε τυριά Ricotta, κατά τη μέση της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους, με αρχικό πληθυσμό 5,5-6 log CFU/g. Και τα δύο στελέχη, όταν καλλιιεργούνται μόνα τους στο τυρί Ricotta, καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Και σε αυτή την περίπτωση η μονοκαλλιιεργεια του στελέχους C5, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη από αυτή του στελέχους ScottA, καθώς οι τελικοί πληθυσμοί στα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό είναι $0.2 \pm 0,8$ log CFU/g και $2,6 \pm 0,7$ log CFU/g, αντίστοιχα. Καταμέτρηση πληθυσμών πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου παρατηρείται και για την συγκαλλιιεργεια των στελεχών μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Το στέλεχος ScottA καταφέρνει να επιβιώσει σε μεγαλύτερο πληθυσμό ($2,6 \pm 0,8$ log CFU/g) όταν καλλιιεργείται μόνο του σε σχέση με την συγκαλλιιεργειά του με το στέλεχος C5 (1.1 ± 0.5 log CFU/g). Συνεπώς, κατά την συγκαλλιιεργεια αυτών των στελεχών, το στέλεχος ScottA γίνεται πιο ευαίσθητο. Στο Γράφημα 12α, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιιεργειες C5 (2,74-2,81), ScottA (2,7-2,91) αλλά και την συγκαλλιιεργειά τους (2,75-2,81).

Στο Γράφημα 12β, απεικονίζονται οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιιεργειών και της συγκαλλιιεργειας των στελεχών C5 και ScottA, με τα οποία εμβολιάστηκαν τυριά Ricotta, τα οποία εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην αρχή της στατικής φάσης της ανάπτυξής τους ($7,7 \pm 0,4$ log CFU/g για τις μονοκαλλιιεργειες). Και τα δύο στελέχη, όταν καλλιιεργούνται μόνα τους στο τυρί Ricotta, καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πολύ πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Επιπλέον, οι καμπύλες επιβίωσης αυτών των δύο στελεχών φαίνεται να συμπίπτουν, συνεπώς κανένα στέλεχος δεν είναι περισσότερο ευαίσθητο σε σχέση με το άλλο. Όσον αφορά την συγκαλλιιεργεια των στελεχών C5 και ScottA, και τα δύο στελέχη καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε

πληθυσμούς πολύ πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Το στέλεχος ScottA φαίνεται να ξεκινάει από χαμηλότερο πληθυσμό στην συγκαλλιέργεια του με το στέλεχος C5, σε σχέση με το τελευταίο, καθώς όπως φάνηκε και από το πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης η ανάπτυξη του επηρεάζεται από την παρουσία του στελέχους C5. Παρόλα αυτά, καταφέρνει να επιβιώσει στον ίδιο τελικό πληθυσμό με το στέλεχος C5 ($4,5 \pm 0,2 \log \text{CFU/g}$). Το στέλεχος C5 φαίνεται να μην επηρεάζεται από την παρουσία του ScottA, καθώς η καμπύλη της μονοκαλλιέργειάς του σε σχέση με την αντίστοιχη της συγκαλλιέργειάς του με το στέλεχος ScottA, ταυτίζονται. Στο Γράφημα 12β, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιέργειες C5 (2,66-2,79), ScottA (2,69-2,85) αλλά και την συγκαλλιέργειά τους (2,75-2,91).

Τέλος, στο Γράφημα 13α, απεικονίζονται οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιέργειών και της συγκαλλιέργειας των στελεχών ScottA και PL25, με τα οποία εμβολιάστηκαν τυριά Camembert, τα οποία εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην αρχή της εκθετικής φάσης της ανάπτυξής τους ($6 \pm 0,5 \log \text{CFU/g}$). Και τα δύο στελέχη, όταν καλλιεργούνται μόνα τους στο τυρί Ricotta, καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πολύ πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Το στέλεχος PL25, συγκριτικά με το στέλεχος ScottA, όταν και τα δύο βρίσκονται σε μονοκαλλιέργεια καταφέρνει να επιβιώσει σε ελάχιστα χαμηλότερο πληθυσμό ($1,4 \pm 0,9 \log \text{CFU/g}$). Καταμέτρηση πληθυσμών πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου παρατηρείται και για την συγκαλλιέργεια των στελεχών μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Επιπλέον, η παρουσία του δεύτερου στελέχους στην συγκαλλιέργεια των ScottA και PL25, φαίνεται να μην επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό και για τα δύο στελέχη. Στο Γράφημα 13α, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιέργειες ScottA (2,77-3,27), PL25 (2,68-3,25), αλλά και την συγκαλλιέργειά τους (2,63-3,22).

Στο Γράφημα 13β, απεικονίζονται οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιιεργειών και της συγκαλλιιεργείας των στελεχών ScottA και PL25, με τα οποία εμβολιάστηκαν τυριά Camembert, τα οποία εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην αρχή της στατικής φάσης της ανάπτυξής τους ($8 \pm 0,2 \log \text{ CFU/g}$). Οι καμπύλες επιβίωσης των μονοκαλλιιεργειών αυτών των δύο στελεχών φαίνεται να συμπίπτουν, συνεπώς κανένα στέλεχος δεν είναι περισσότερο ευαίσθητο σε σχέση με το άλλο. Όσον αφορά την συγκαλλιιεργεία των στελεχών ScottA και PL25, και τα δύο στελέχη καταφέρνουν να επιβιώσουν και να καταμετρούνται σε πληθυσμούς πολύ πάνω από το όριο καταμέτρησης της μεθόδου μέχρι και τα 120 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Και στα δύο στελέχη φαίνεται η αντοχή στο χαμηλό pH να μην επηρεάζεται από την παρουσία του άλλου στελέχους, κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Στο Γράφημα 13β, φαίνεται η μεταβολή του pH του ομογενοποιημένου τυριού στο συνθετικό γαστρικό υγρό, μεταξύ των 5 λεπτών και των 120 λεπτών μετά την έκθεση για τις μονοκαλλιιεργείες ScottA (2,58-3,14), PL25 (2,46-3,05), αλλά και την συγκαλλιιεργεία τους (2,46-3,05).

Στα Γραφήματα 11γ-δ, 12γ-δ, 13γ-δ, φαίνεται πως η συνολική ενδογενής μικροχλωρίδα του τυριού (OMX), στην περίπτωση των τυριών που εμβολιάστηκαν με μονοκαλλιιεργείες, ακολουθεί την καμπύλη του αντίστοιχου στελέχους του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και στην περίπτωση των τυριών που εμβολιάστηκαν με συγκαλλιιεργείες, ακολουθεί την καμπύλη του κυρίαρχου στελέχους.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνεται η αυξημένη ανθεκτικότητα των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, όσο αυξάνεται η διάρκεια της συντήρησης. Μεταξύ των ίδιων συνδυασμών στελεχών όταν τα στελέχη έχουν μπει στην στατική φάση, καταφέρνουν να επιβιώσουν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς, μετά την έκθεσή τους στο συνθετικό γαστρικό υγρό, σε σχέση με όταν εκτίθενται κατά τη μέση της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους. Στη στατική φάση, ο παθογόνος δαπανά όλη του την ενέργεια για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών με στόχο μόνο την επιβίωσή του. Επιπλέον, με την πάροδο της διάρκειας συντήρησης, οι πληθυσμοί των στελεχών του παθογόνου αυξάνονται,

γεγονός που συνδέεται με την αυξημένη αντοχή στην όξινη καταπόνηση που υφίστανται κατά την έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Stopforth et al., οι οποίοι εμβολίασαν λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, και τα εξέθεσαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό όταν τα κύτταρα είχαν φτάσει την εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Τότε παρατήρησαν πως τα κύτταρα αυτής της φάσης δεν κατάφεραν να επιβιώσουν στο χαμηλό pH του γαστρικού υγρού. Αντίθετα, όταν τα ίδια λουκάνικα εκτέθηκαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό, μετά από ένα μήνα συντήρησης, παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα, γεγονός που αποδόθηκε αφενός στον αυξημένο πληθυσμό και αφετέρου στην στατική φάση ανάπτυξης, στην οποία είχαν φτάσει τα κύτταρα αυτού του παθογόνου (2005). Οι Samelis et al., με τη μελέτη τους έδειξαν πως παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως *L. monocytogenes*, που βρίσκονται σε τρόφιμα που περιέχουν οξέα ή υδατάνθρακες που μπορούν να καταναλωθούν από βακτήρια που τελικά θα παράξουν οξέα ως παραπροϊόντα, με αποτέλεσμα να μειωθεί το pH στο τρόφιμο, είναι πιθανόν, στην στατική φάση ανάπτυξης, να εκφράσουν γονίδια που συνδέονται με την απόκριση σε όξινες συνθήκες (2003). Κατ' αυτό τον τρόπο ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, γίνεται πιο ανθεκτικός σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH, όπως αυτό του συνθετικού γαστρικού υγρού. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως τυριά που είναι επιμολυσμένα με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, και βρίσκονται κοντά στην ημερομηνία λήξης τους, μπορεί να είναι πιο επικίνδυνα για τους καταναλωτές, καθώς τα κύτταρα αυτού του παθογόνου ενδέχεται να είναι πιο ανθεκτικά στο χαμηλό pH του στομάχου.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο συνδυασμός των στελεχών ScottA και PL25, χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό και των δύο ειδών τυριών της παρούσας μελέτης, ώστε να γίνει αξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στην ανθεκτικότητα των κυττάρων που εκτίθενται στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Στην περίπτωση αυτών των στελεχών όταν βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους και εκτέθηκαν στο συνθετικό γαστρικό υγρό, παρατηρήθηκε πως στο τυρί Ricotta, υπήρχε αυξημένη ευαισθησία καθώς τα στελέχη δεν κατάφεραν να επιβιώσουν σε πληθυσμούς μεγαλύτερους του ορίου καταμέτρησης της μεθόδου, από τα 20 λεπτά έκθεσης για το στέλεχος PL25 και από τα 60 λεπτά έκθεσης για το στέλεχος ScottA

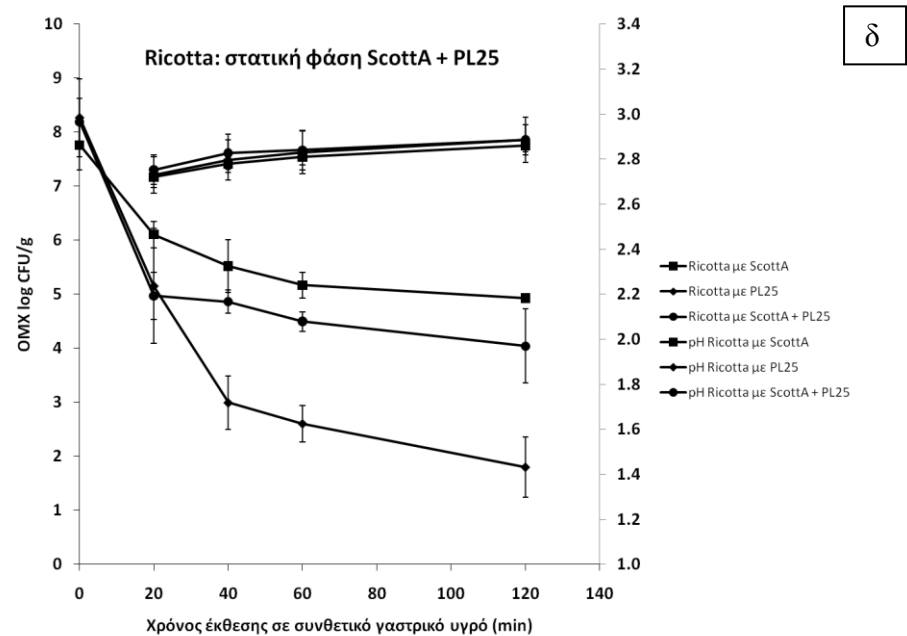
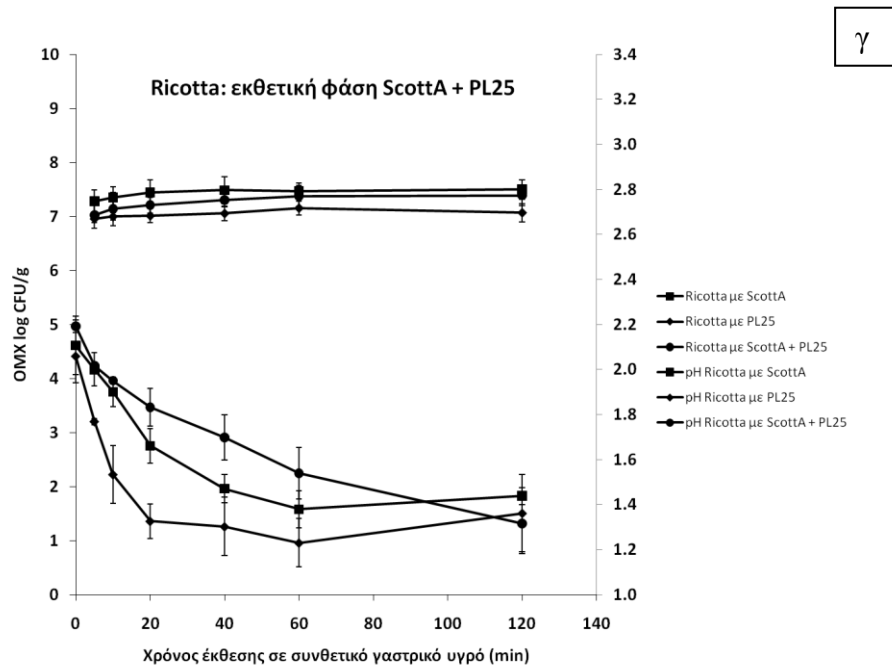
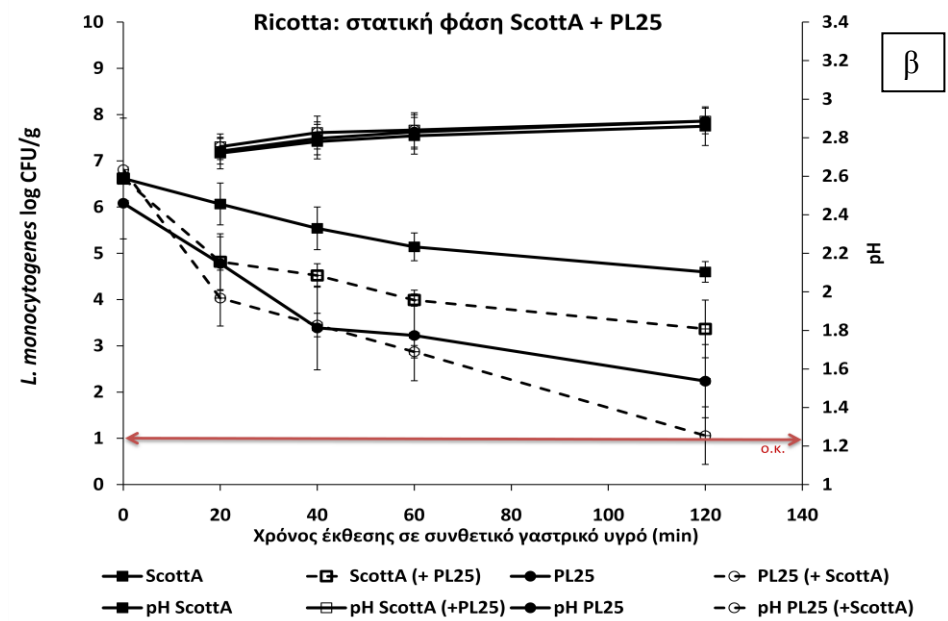
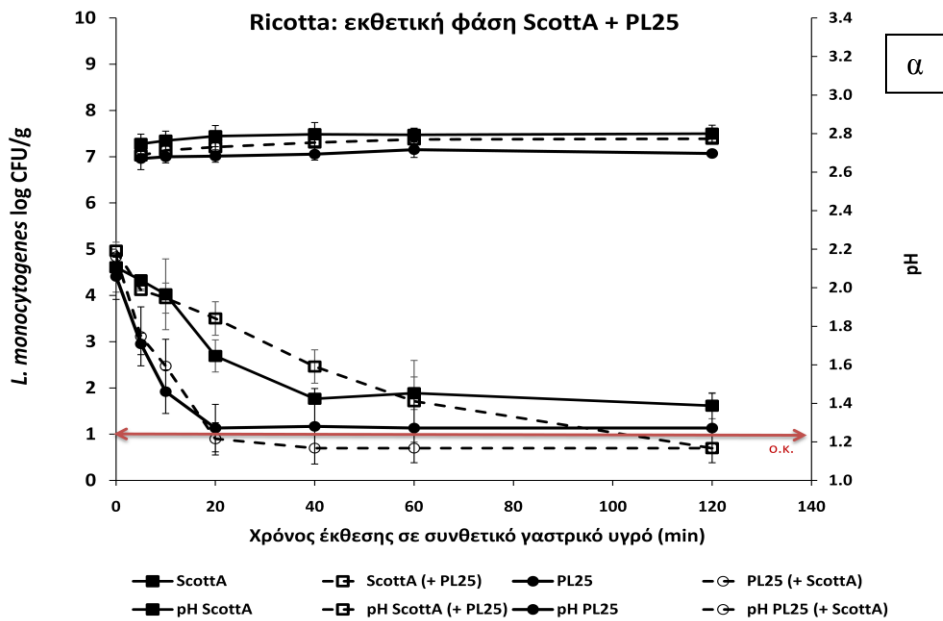
ενώ αντίθετα στο τυρί Camembert, τα στελέχη επιβίωσαν μέχρι το τέλος της έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό (120 λεπτά) σε πληθυσμούς μεγαλύτερους του ορίου καταμέτρησης. Από την άλλη πλευρά όμως, στο τυρί Camembert, παρατηρείται ταχεία πτώση του πληθυσμού από τα 10 πρώτα λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό, σε αντίθεση με το τυρί Ricotta, που η πτώση του πληθυσμού είναι πιο αργή, με αποτέλεσμα την σταθερή επιβίωση του πληθυσμού μέχρι το τέλος της έκθεσης (120 λεπτά). Το τυρί Camembert, συγκριτικά με το τυρί Ricotta, έχει μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα και μικρότερη ενεργότητα ύδατος, σύμφωνα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών τυριών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Οι Barmpalia et al., που πραγματοποίησαν πείραμα με εμβολιασμένα με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης με χαμηλά και υψηλά επίπεδα λίπους και παρατήρησαν πως τα λουκάνικα που είχαν μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα ενίσχυσαν την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού κατά την έκθεσή του στο συνθετικό γαστρικό υγρό, καθώς το λίπος προστατεύει τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού που παγιδεύονται μέσα στις υδροφοβικές ομάδες των λιπιδίων έναντι της αυξημένης οξύτητας του γαστρικού υγρού (2009). Στην παρούσα μελέτη το τυρί Camembert, ως υπόστρωμα φάνηκε να μην ευνοεί την επιβίωση των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που καλλιεργήθηκαν σε αυτό. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στον επιφανειακό εμβολιασμό των τυριών, που δεν επιτρέπει στα στελέχη να αναμιχθούν με την λιπαρή μάζα του τυριού.

Γενικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, ακόμα και όταν βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους, που είναι πιο ευαίσθητα σε καταπονήσεις ή ακόμα και όταν το pH ανέβηκε κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό, παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα και στις περισσότερες περιπτώσεις καταμετρούνταν σε πληθυσμούς μεγαλύτερους του ορίου καταμέτρησης της μεθόδου. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρατεταμένη παρουσία των κυττάρων στο περιβάλλον του τυριού, που έχει pH πολύ κοντά στις υποθανάτιες συνθήκες καταπόνησης. Το περιβάλλον αυτό ενδέχεται να ενεργοποίησε μηχανισμούς απόκρισης σε όξινες συνθήκες που ακολούθως έκαναν τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στην μετέπειτα καταπόνηση της ακραίας τιμής pH του συνθετικού γαστρικού υγρού (Karpetanakou et al., 2017). Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με αυτά των Dikici

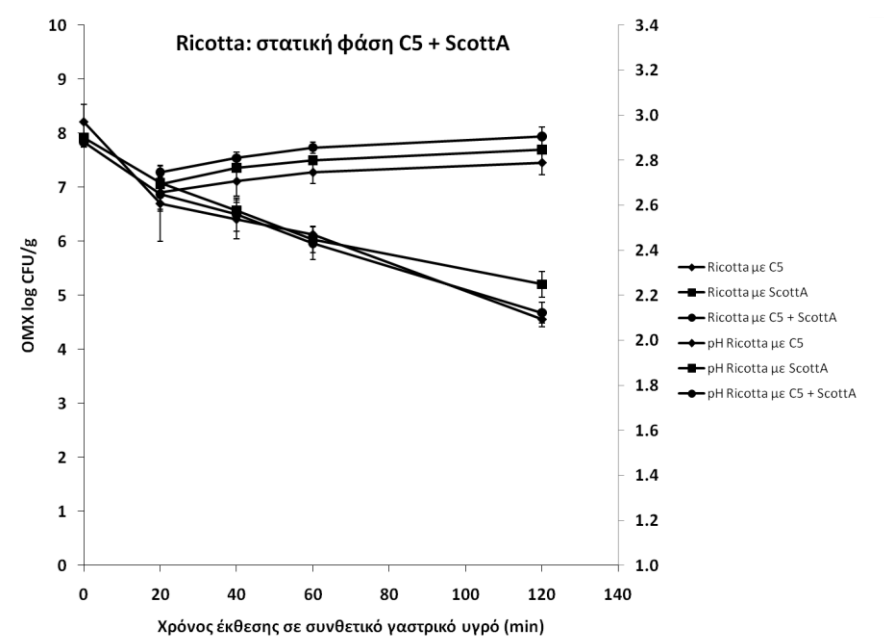
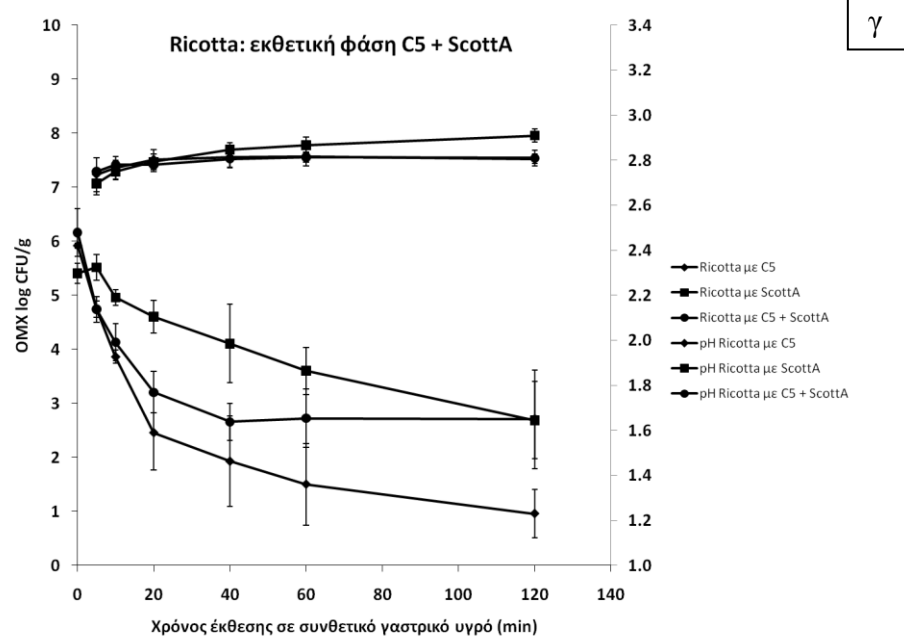
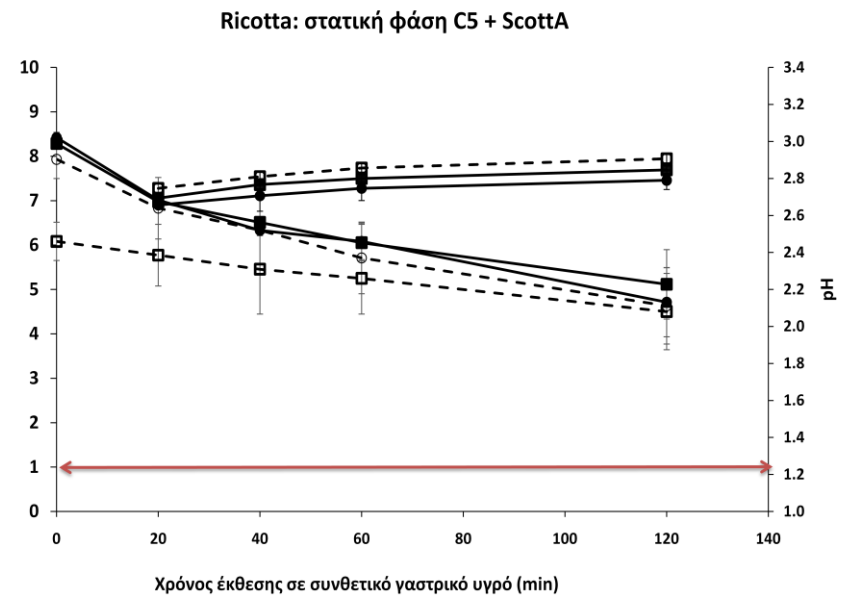
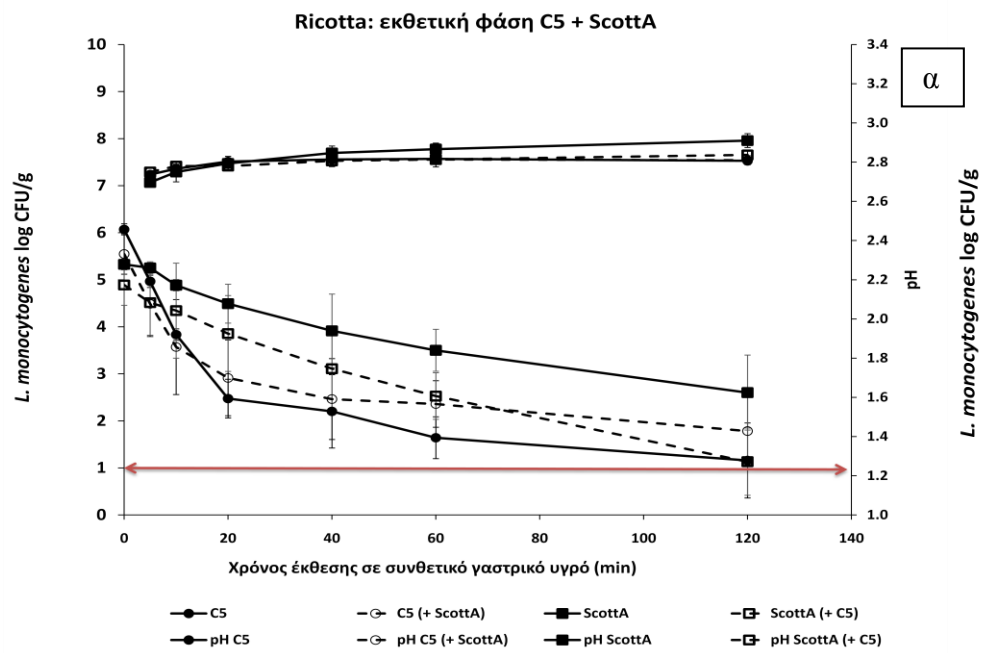
και Calicioglu που μελέτησαν την επιβίωση του *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης ενός παραδοσιακού τούρκικου τυριού. Οι τελευταίοι παρατήρησαν πως παρά τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο τυρί κατά την ωρίμανση, η παραμονή στο υποθανάτιο περιβάλλον του τυριού ενεργοποίησε απόκριση σε όξινη αντοχή επιτρέποντας στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* την επιβίωση έως και τα 90 λεπτά έκθεσης στο συνθετικό γαστρικό υγρό (2013). Επιπλέον, οι Formato et al., παρατήρησαν πως κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που είχαν παραμείνει για περισσότερο χρονικό διάστημα σε αλλαντικά bologna, και είχαν εκτεθεί για μεγαλύτερο χρόνο σε χαμηλότερο pH, παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα κατά την έκθεση τους σε συνθετικό γαστρικό υγρό (2007).

Το στέλεχος ScottA στη συγκαλλιέργειά του με τα στελέχη C5 και PL25, παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα κατά την έκθεση στο χαμηλό pH του συνθετικού γαστρικού υγρού. Στην ίδια παρατήρηση κατέληξαν και οι Zilelidou et al., που πραγματοποίησαν μελέτη κατά την οποία συγκαλλιέργησαν στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, σε TSBYE, στους 10°C, και έπειτα τα εξέθεσαν σε συνθετικό γαστρικό υγρό pH 2. Ο χαμηλότερος πληθυσμός του στελέχους ScottA, στην στατική φάση, σε σχέση με το στέλεχος C5, δεν οδήγησε σε γρηγορότερη θανάτωσή του κατά την έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το συμπέρασμα άλλων μελετών κατά το οποίο όσο χαμηλότερος είναι ο πληθυσμός που εκτίθεται στο συνθετικό γαστρικό υγρό, τόσο πιο ευαίσθητος είναι (Barmpalia et al., 2008, Zilelidou et al., 2016a). Παράδειγμα αποτελεί η συγκαλλιέργεια των στελεχών C5 – 6179, κατά την οποία το στέλεχος 6179, επειδή βρισκόταν σε χαμηλότερο πληθυσμό από ότι το στέλεχος C5, παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία στην έκθεσή του στο συνθετικό γαστρικό υγρό (Zilelidou et al., 2016a). Συμπερασματικά, παρόλο που το στέλεχος ScottA, το οποίο όπως παρατηρήθηκε στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, ήταν «αδύναμος ανταγωνιστής» όταν συγκαλλιεργούνταν με το στέλεχος C5, και μάλιστα επηρεαζόταν από την παρουσία του τελευταίου στελέχους, αποδείχτηκε «ισχυρός επιζών» μετά την έκθεση στο συνθετικό γαστρικό υγρό, γεγονός που υποδεικνύει πως ένα στέλεχος το οποίο ενδέχεται να μην αναπτυχθεί τόσο στο τρόφιμο που έχει επιμολύνει, λόγω ανταγωνισμού με πιο ισχυρά στελέχη δεν σημαίνει πως δεν είναι

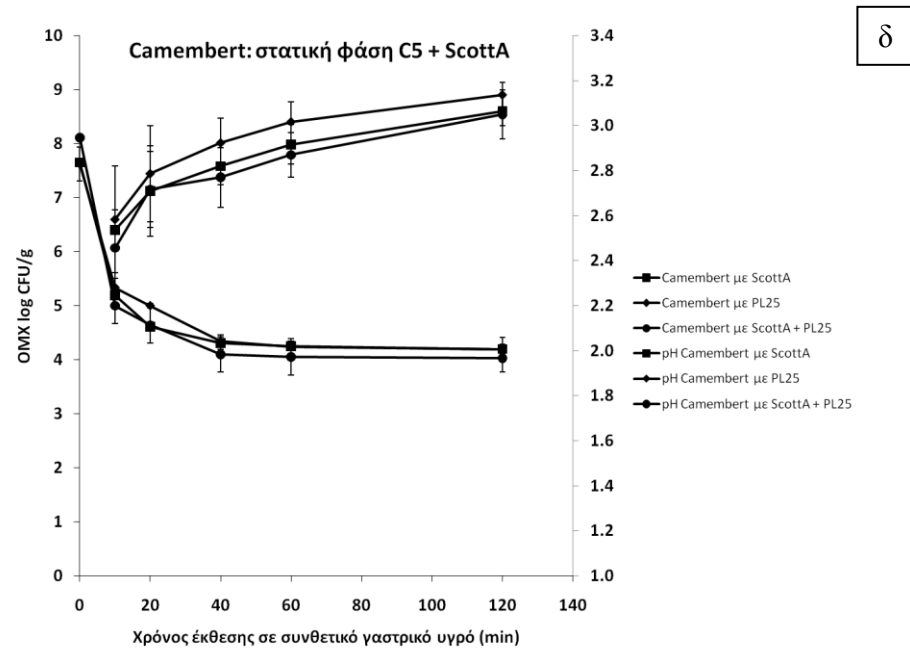
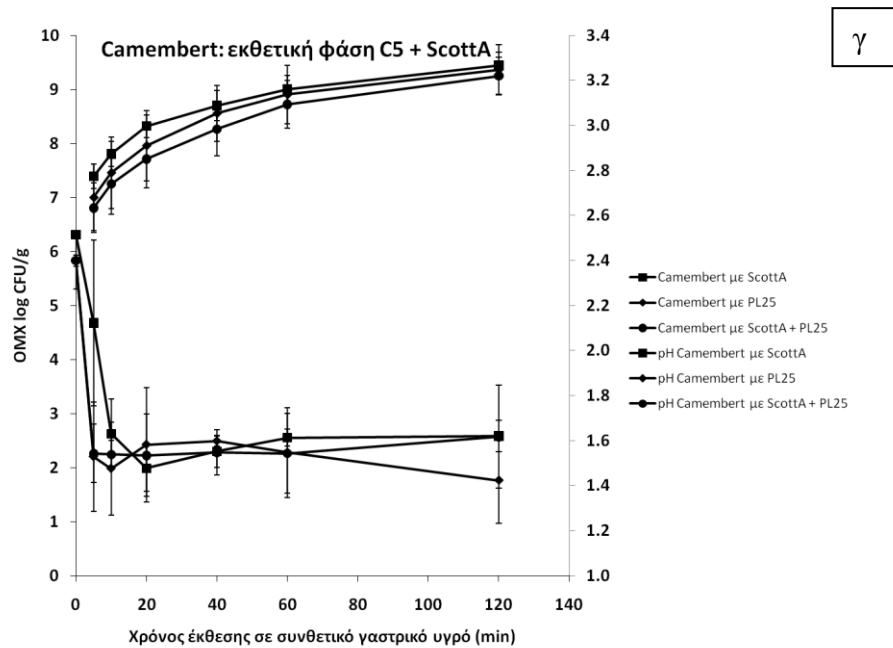
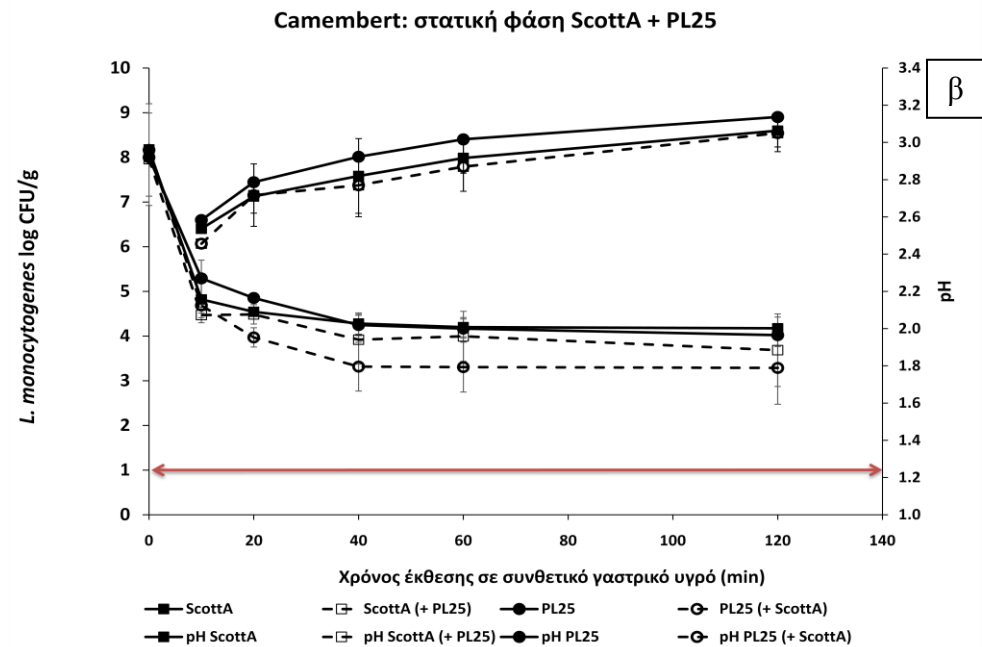
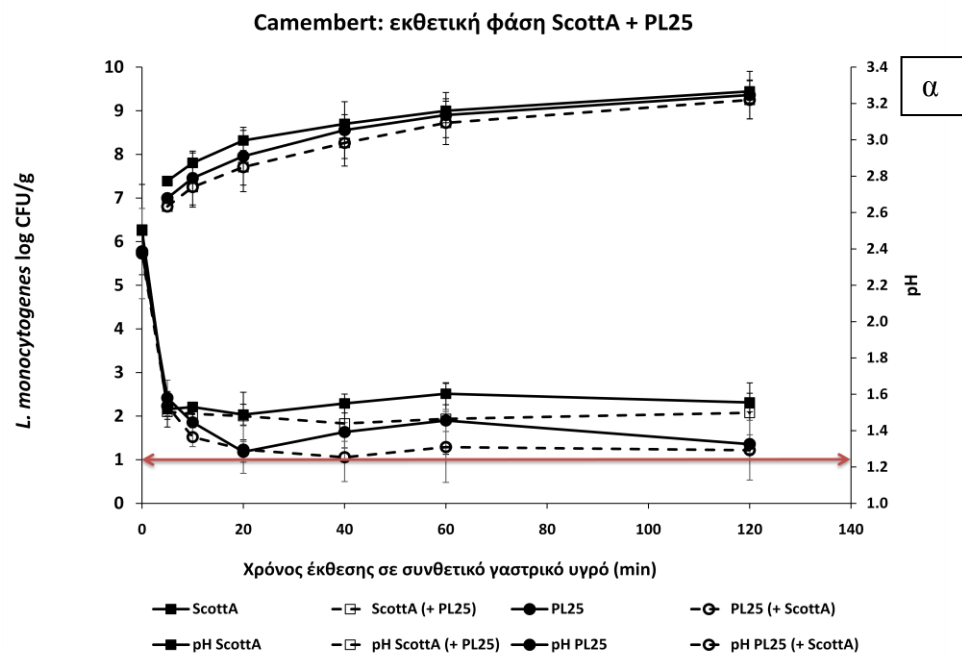
ικανό να καταφέρει να περάσει το εμπόδιο του χαμηλού pH του στομάχου, του ατόμου που θα το καταναλώσει και τελικά να φτάσει στο λεπτό έντερο.



Γράφημα 11: Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών στελεχών ScottA και PL25 του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (α, β) και της OMX (γ, δ), μετά από έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην εκθετική και την στατική φάση ανάπτυξης, εμβολιασμένων τυριών Ricotta που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



Γράφημα 12: Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών στελεχών C5 και ScottA του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (α, β) και της OMX (γ, δ), μετά από έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην εκθετική και την στατική φάση ανάπτυξης, εμβολιασμένων τυριών Ricotta που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.



Γράφημα 13: Γραφική απεικόνιση της επιβίωσης των μονοκαλλιεργειών και των συγκαλλιεργειών στελεχών ScottA και PL25 του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (α, β) και της OMX (γ, δ), μετά από έκθεση σε συνθετικό γαστρικό υγρό στην εκθετική και την στατική φάση ανάπτυξης, εμβολιασμένων τυριών Camembert που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 7°C.

4 Συμπεράσματα

Η επιμόλυνση ενός τροφίμου με περισσότερα από ένα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, μπορεί να περιπλέξει την έρευνα και να γίνει λάθος εκτίμηση στην σχέση στέλεχος – επικινδυνότητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται τόσο στην ετερογένεια των στελεχών όσο και στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Οι τελευταίες εξαρτώνται από τα στελέχη και τον συνδυασμό τους, με αποτέλεσμα κάποια από τα πολλά στελέχη που επιμολύνουν ταυτόχρονα τα τρόφιμα να αναπτύσσονται λιγότερο. Αυτό όμως δεν σημαίνει πως είναι και λιγότερο επικίνδυνα, καθώς ενδέχεται να είναι ανθεκτικά στο χαμηλό pH του στομάχου του ανθρώπου. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες για την επικινδυνότητα είναι η διάρκεια συντήρησης, καθώς στελέχη που έχουν προχωρήσει στην στατική φάση ανάπτυξής τους, είναι πιο ανθεκτικά στην καταπόνηση του χαμηλού pH. Ακόμη, το είδος του τροφίμου, και πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη φάνηκε να παίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα των στελεχών. Καθώς αποτελεί το περιβάλλον του παθογόνου μικροοργανισμού, που μπορεί να ενισχύσει ή να μειώσει την ανθεκτικότητά του. Συνεπώς, τα συμπεράσματα εξαρτώνται από τον συνδυασμό των στελεχών και το υπόστρωμα, που επηρεάζει τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων, την κυριαρχία ορισμένων στελεχών στα τρόφιμα και την ανθεκτικότητά τους στο χαμηλό pH του στομάχου.

Βιβλιογραφία

- Acciari V. A., Iannetti L., Gattuso A., Sonnessa M., Scavia G., Montagna C., Addante N., Torresi M., Zocchi L., Scattolini S., Centorame P., Marfoggia C., Prencipe V. A., Gianfranceschi M. V. (2016). Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. *Epidemiol Infect.* 144, 13: 2719-27.
- Aguilar C., Vanegas C., Klotz B. (2011). Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Research.* 78: 136–143.
- Allerberger F., Wagner M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection.* 16, 1: 16–23.
- Andre 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.
- Baranyi J., Roberts T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology.* 26, 199-218.
- Barbosa W. B., Cabedo L., Wederquist H. J., Sofos J. N., Schmidt G. R. (1994). Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. *J. Food Prot.* 57:765–769, 775.
- Barmpalia-Davis I.M., Geornaras I., Kendall P.A., Sofos J.N. (2008). Survival of *Listeria monocytogenes* in a simulated dynamic gastrointestinal model during storage of inoculated bologna and salami slices in vacuum packages. *J Food Prot* 71:2014–2023.

- 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.
- Beauregard K. E., Lee K. D., Collier R. J., Swanson J. A. (1997). pH-dependent Perforation of Macrophage Phagosomes by Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press . 186, 7:1159–1163.
- Begley M., Gahan C. G., 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.
- Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1,4.
- 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.
- Breidt F., Fleming H.P. (1998). Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3159–3165.
- Bremer P. J., Monk I., Osborne C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J. Food Prot.* 64: 1369–1376.
- Brito J. R. F., Santos E. M. P., Arcuri E. F., Lange C. C., Brito M. A. V. P., Souza G. N., Cerqueira M. M., Beltran J. M., Call J. E., Liu Y., Porto-Fett A. C., Luchansky J. B. (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.

- Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Köhler S. (1992). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J Bacteriol.* 174, 24: 8166–8171.
- Buchanan R. L., Bagi L. K. (1999). Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 16: 523–529.
- Buchanan, R. L., and J. G. Phillips. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53:370-376.
- CAC, (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC-GL 61, 1–28.
- Cairns B.J., Payne R. J. H. (2009). Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. *Emerg Infect Dis*, 15 : 465–468.
- Callon C., Gilbert F. B., De Cremoux R., Montel M. C. (2008). Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control.* 19, 2: 143–150.
- Callon C., Saubusse M., Didienné R., Buchin S., Montel M. C. (2011). Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *Int J Food Microbiol.* 145, 2-3: 379-89.
- Casey P. G., Condon S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *Int J Food Microbiol.* 76, 3: 199-206.

- Cataldo G., Conte M. P., Chiarini F., Seganti L., Ammendolia M. G., Superti F., Longhi C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *J Appl Microbiol.* 103,1:185-93.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2015. Multistate outbreak of Listeriosis linked to Blue Bell creameries products (final update).
URL <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/>
- Czuprynski C. J., Brown J. F., Roll J. T.. (1989). Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *Microb. Pathog.* 7:213-223.
- Coelho M.C., Silva C.C.G , Ribeiro S.C., Dapkevicius M.L.N.E., Rosa H.J.D . (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 191: 53–59.
- Cole M.B., Jones M.V., Holyoa 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.
- Codex Alimentarius. (2011). Milk and milk products. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO). Rome. 166-170.
- Colas-Meda P., Abadias M., Oliveira M. , Usall J. ,Vinas I. (2017) Influence of fruit matrix and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* in a gastrointestinal simulation. *Food Control.* 73: 1045-1052.
- Collins M. D., Wallbanks S., Lane D. J., Shah J., Nietupskin R., Smida J., Dorsch M., Stackebrandt E. (1991). Phylogenetic Analysis of the Genus *Listeria* Based on Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 41, 2: 240–246.
- Cornforth D.M., Foster K.R. (2013). Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 285–293.

- Conte M. P. , Petrone G., Di Biase A. M., Ammendolia M. G., Superti F., Seganti L. (2000). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells. *Microb Pathog.* 29, 3: 137-44.
- Cornu M., Billoir E., Bergis H., Beaufort A., Zuliani V. (2011). Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol.* 28, 4: 639-47.
- 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.
- Davis MJ, Coote PJ, O'Byrne CP (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology.* 142:2975-82.
- Dikici A., Calicioglu M. (2013). Survival of *Listeria monocytogenes* during Production and Ripening of Traditional Turkish Savak Tulum Cheese and in Synthetic Gastric Fluid. *Journal of Food Protection.* 76, 10: 1801-1805.
- Donaghy J. A., Totton N. L., Rowe M. T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 70, 8: 4899–4905.
- Duffy L.L., Vanderlinde P.B., Grau F.H (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, a_w , nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology.* 23, 3–4: 377-390.
- Elias S., Banin E., 2012. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 990–1004.

Espié E., Vaillant V., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Martin-Schaller R., De Val, 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.

Farber J. M., Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological reviews*. 55, 3: 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* sigma(B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl Environ Microbiol*. 69, 5: 2692-8.

Fiedler F. (1988). Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection*. 16, 2:S92-S97.

Filioussis G., Johansson A., Frey J., & Perreten V. (2008). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control*. 20, 314–317.

Formato G., Geornaras I., Barmpalia I. M., Skandamis P. N., Belk K. E., Scanga J. A., Kendall P. A., Smith G. C., SOFOS J. N. (2007). International Association for Food Protection Effect of Acid Adaptation on Growth during Storage at 10C and Resistance to Simulated Gastric Fluid of *Listeria monocytogenes* Inoculated onto Bologna Formulated with or without Antimicrobials. *Journal of Food Protection*. 70, 1: 65–69.

Fox P., Guinee T., Cogan T., McSweeney P. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers. Gaithersburg. p. 363, 384-385.

- 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.
- Gandhi C. G., Chikindas M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology.* 113, 1: 1-15.
- García-Almendárez B. E., Cann I. K. O., Martin S. E., Guerrero-Legarreta I., Regalado C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19: 670–680.
- Gellin B. G., Broome C. V., Bibb W. F., Weaver R. E., Gaventa S., Mascola L., and the Listeriosis Study Group. (1991). The epidemiology of listerioses in the United States-1986. *Am. J. Epidemiol.* 133:392-401.
- Giaouris E., Chorianopoulos N., Doulgeraki A., Nychas G.-J. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One.* 8: e77276.
- Gill D. A. (1937). Ovine bacterial encephalitis (Circling Disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Australian Vet. J.* 13:46-56.
- Gilmour M. W., Graham M., Van Domselaar G., Tyler S., Kent H., Trout-Yakel K. M., Larios O., Allen V., Lee B., Nadon C. (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics.* 11: 120.
- Giménez B., Dalgaard P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology.* 96: 96-109.

- Gnanou Besse N., Audinet N., K rouanton A., Colin P., Kalmokoff M. (2005). Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. *Int J Food Microbiol.* 104: 123–134.
- Gnanou Besse, N., Barre L., Buhariwalla C., Vignaud M.L., Khamissi E., Decourseulles E., Nirsimloo M., Chelly M., Kalmokoff M. (2010). The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 345–351.
- Gnanou Besse N., Favret S., Desreumaux J., Decourseulles Brasseur E., Kalmokoff M. (2016). Evaluation of reduction of Fraser incubation by 24h in the EN ISO 11290-1 standard on detection and diversity of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 224: 16–21.
- Goerges S., Aigner U., Silakowski B., Scherer S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 313–318.
- Gorski L., Flaherty D., Mandrell R.E. (2006). Competitive fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. Food and Drug Administration enrichment protocol. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 776–783.
- Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., De Valk H. (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis*, 14: 734–740.
- Gray M. L. and Killinger A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev.* 30 (2): 309–382.
- Griffiths M.W. (1989). *Listeria monocytogenes*: Its Importance in the Dairy Industry. *J. Sci. Food Agric.* 47: 133- 138.

Guillier L., Stahl V., Hezard B., Notz E., Briandet R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *Int J Food Microbiol.* 128:51-57.

Guinee T. P., Pudja P. D., Farkye N.Y. (1999). Cheese: chemistry, physics and microbiology, fresh acid-curd cheese varieties. Aspen Publications. Ireland. 363-412.

Haruta S., Kato S., Yamamoto K., Igarashi Y. (2009). Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environ. Microbiol.* 11: 2963–2969.

Harvey P.J.H. (1940). *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. *Nature.* 145 (3668): 264.

Heiman K. E., Garalde V. B., Gronostaj M., Jackson K. A., Beam S., Joseph L., Saupe A., Ricotta E., Waechter H., Wellman A., Adams-Cameron M., Ray G., Fields A., Chen Y., Datta A., Burall L., Sabol A., Kucerova Z., Trees E., Metz M., Leblanc P., Lance S., Griffin P. M., Tauxe R. V., Silk B. J. (2016). Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. *Epidemiol Infect.* 144, 13: 2698-708.

Huang Y., Ye K., Yu K., Wang K., Zhou G. (2016). The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 67: 18–24.

Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W. Y., Roubal P. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology.* 71, 8934–8936.

Ikonomou, L., and D. Todorov. (1964). Studies of the viability of *Listeria monocytogenes* in ewe's milk and dairy products. *Vet. Med.* 1,7:23-29.

- Irlinger F., Mounier J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 2: 142-148.
- Jaana R. Junttila, S.I. Niemelä, J. Hirn, (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of applied microbiology*. 65, 4: 321–327.
- Jameson, J. (1962). A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J. Hyg.* 60, 193–207.
- Johnson J. L., Doyle M. P., Cassens R. G. Schoeni J. L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2497-501.
- 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.
- Kapetanakou A. E., Gkerekou M. A., Vitzilaiou E. S., Skandamis P. N. (2017). Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion.
- 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 M., Mataragas M., Skandamis P., Drosinos E. H.. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. 21: 805–815.
- Koutsoumanis K. P., Sofos, J. N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria*

monocytogenes, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 4: 321-326.

Lianou A., Stopforth J.D., Yoon Y., Wiedmann M., Sofos J.N. (2006). Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *J. Food Prot.* 69: 2640–2647.

Lecuit M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection* 9, 1216-1225.

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

Lovett J., (1989). Foodborne bacterial pathogens: *Listeria monocytogenes*. M.P. Doyle (Ed.), Marcel Dekker, Inc, New York. 290–291.

Lundén J., Tolvanen R., & Korkeala H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 86: 6–11.

Makariti I. P., Printezi A., Kapetanakou A. E., Zeaki N., Skandamis P. N. (2015). Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiol.* 45(Pt B): 231-44.

McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. 92: 15– 33.

Mellefont L. A., McMeekin T. A., Ross T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 157–68.

- Miller M. B., Bassler B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55:165-99.
- Møller C.O.A., Ilg Y., Aabo S., Christensen B.B., Dalgaard P., Hansen T.B. (2013). Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella spp.* in fresh pork – A predictive microbiology approach. *National Food Microbiology.* 34: 284-295.
- Murray E.G.D., Webb R.E., Swann M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407–439.
- Nickerson S. C. (2002). Contagious pathogens. *Encyclopedia of dairy sciences.* UK: Academic Press. London. 1723–1728.
- Nolan D.A., Chamblin D.C., Troller J.A., (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology.* 16, 4: 323-335.
- Pamer E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology.* 4: 812-823.
- Parish, M. E., and D. P. Higgins. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Prot.* 52:144-147.
- Poutrel B., Vialard J., Groud K., Grain F., Soury-Lavergne F., Bastien J., Lambert V., Guidarini C. (2015). Sources of Contamination of Bovine Milk and Raw Milk Cheese by *Staphylococcus aureus* Using Variable Number of Tandem Repeat Analysis *Bernard Veterinar Sci Technol*, 6, 5.
- 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 Microbiolog.* 26, 375–384.

- Ramaswamy V., Cresence V.M., Rejitha J.S., Lekshmi M.U., Dharsana K.S., Prasad S.P., Vijila H.M. (2007). *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40, 1: 4–13.
- Rendueles O., Ghigo, J.M. 2012. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 972–989.
- Robbins J.R., Barth A.I., Marquis H., de Hostos E.L., Nelson W.J., Theriot J.A., (1999). *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell. *J. Cell. Biol.* 146, 6: 1333–50.
- Rodríguez E., Calzada J., Arqués J. L., Rodríguez J. M., Nuñez M., Medina M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15: 51–57.
- Rogga K. J., Samelis J., Kakouri A., Katsiari M. C., Savvaidis I. N., & Kontominas M. G. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4 and 12 °C. *International Dairy Journal.* 15, 59–67.
- Rola J. G., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Osek J. (2016). Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. *Toxins (Basel).* 8, 3: 62.
- Rosenow E. M., Marth E. H. (1987). *Listeria*, listeriosis and dairy foods: a review. *Cult Dairy Prod .J* 22: 13-17.
- Ross T., Dalgaard P., Tienungoon S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.

- Ryan S., Begley M., Gahan C. G., Hill C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol.* 11, 2: 432-45.
- Ryan S., Hill C., Gahan C. G. (2008). Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv Appl Microbiol.* ;65:67-91.
- Ryser E. T., & Marth E. H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection.* 50, 372–378.
- 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 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology.* 129, 1: 1-7.
- Samelis J., Ikeda J.S., Sofos N. (2003). Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of applied microbiology.* 95, 3: 563–575.
- Sanchez-Villegas A., Martínez J. A., Prättälä R., Toledo E., Roos G., Martínez-González M. A. (2003). A systematic review of socioeconomic differences in food habits in Europe: consumption of cheese and milk. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57: 917–929.
- Saraoui, T., Fall, P.A., Leroi, F., Antignac, J.-P., Chéreau, S., Pilet, M.F. (2016). Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium*. *Food Microbiol.* 53, 70–78.
- Sauders B. D., D’Amico D. J. (2016). *Listeria monocytogenes* cross contamination of cheese: risk throughout the food supply chain. *Epidemiol. Infect.* 144: 2693–2697.

- Schmid M. W., Ng E. Y. W., Lampidis R., Emmerth M., Walcher M., Kreft J., Goebel W., et al. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*. 28, 1: 1–18.
- Scuchat A., Swaminathan B., Broome C. V. (1991). Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical microbiology reviews*. 4,2:169-183.
- Seeliger H.P.R., Höhne K. (1979). Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. *Methods in Microbiology*. 13: 31–49.
- Shank E. A. , Kolter R. (2009). New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*. 12, 2: 205-214.
- Shojima A., Nakayama J. (2014). Quorum sensing in gram-positive bacteria: assay protocols for staphylococcal agr and enterococcal fsr systems. *Methods Mol Biol*. 1147:33-41.
- Skandamis P. N., Yoon Y., Stopforth J. D., Kendall P. A., Sofos J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol*. 2: 294-303.
- Sleator R. D., Watson D., Hill C., Gahan C. G. M. (2009). The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology*. 155: 2463–2475.
- Sörqvist S. (1994). Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*. 76, 4: 383–388.
- Southwick F.S. and Purich D.L., 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, 334, 770 – 776.
- 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.

Swaminathan B, and P. Gerner-Smidt. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microb. Infect.* 9:1236-1243.

Tanycz, I., Ziegler H. K.. (1988). Listeriolysin: characterization and regulation. Abstr. 72nd Annu. Gen. Meet. Fed. Am.Soc. Exp. Biol. FASEB J. 2:S3434.

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

Tienungoon, S., Ratkowski, D., McMeekin, T., Ross, T., (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4979 – 4987.

Tondo E. C., Guimarães M. C., Henriques J. A., Ayub M. A. (2000). Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol.* 46, 12: 1108-14.

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.

Vivant, A.-L., Garmyn, D., Gal, L., Piveteau, P., 2014. The Agr communication system provides a benefit to the populations of *Listeria monocytogenes* in soil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 160.

Walker S.J., Archer P., Banks J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. 68, 2: 157–162

- Walker S.J. & Stringer M.F. (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. Campden Food Preservation Research Association, Technical Memorandum, No. 462.
- Weller D., Andrus A., Wiedmann M., C. den Bakker H. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65: 286-292.
- Werbrouck H., Vermeulen A., Van Coillie E., Messens W., Herman L., Devlieghere F., Uyttendaele M. (2009). Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int J Food Microbiol.* 134, 1-2: 140-6.
- World Health Organization Working Group (1988). Foodborne listeriosis. *Bulletin WHO.* 66, 421–428.
- Zilelidou E., Karmiri C.V., Zoumpopoulou G., Mavrogonatou E., Kletsas D., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Drosinos E., Skandamis P. (2016, a). *Listeria monocytogenes* strains which are underrepresented during selective 2 enrichment with the ISO method might dominate during passage through 3 simulated gastric fluid and in vitro infection of Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Zilelidou E.A., Rychli K., Manthou E., Ciolacu L., Wagner M., Skandamis P. N. (2015). Highly Invasive *Listeria monocytogenes* Strains Have Growth and Invasion Advantages in Strain Competition. *PLoS One.* 10: e0141617.
- Zilelidou E., Manthou E., Skandamis P. (2016, b) Growth differences and competition between *Listeria monocytogenes* strains determine their predominance on ham slices and lead to bias during selective enrichment with the ISO protocol. *International Journal of Food Microbiology.* 235: 60-70.

- Zink R., Loessner M. J., Glas I., Scherer S. (1994). Supplementary *Listeria*-typing with defective *Listeria* phage particles (monocins). *Letters in Applied Microbiology*. 19: 99-101.
- Zink R., Loessner M. J., Scherer S. (1995). Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/lysozyme gene. *Microbiology*. 141: 2577-2584.
- Zottola E., Smith B. L. (1999). *Cheese: chemistry, physics and microbiology: Growth and survival of undesirable bacteria in cheese*. Aspen publications. Ireland. 47-492.
- Ανυφαντάκης Ε. (1993). *Τυροκομία*. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς. σ. 183-189.
- Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009) *Γαλακτοκομία*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα. σ. 245-255.
- Κουτίνης Α., Κανελλάκη Μ. (2006). *Χημεία και τεχνολογία τροφίμων*. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα. σ. 360-368.
- Κυριακόπουλος Π. (1995). *Η τυροκομία στην πράξη*. Εκδόσεις Τρίαινα, Αθήνα. σ. 219-221.

