

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ.: «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Listeria monocytogenes* ΚΑΙ
Escherichia coli O157:H7 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΒΟΛΒΩΝ ΤΟΥ
ΕΙΔΟΥΣ *Raphanus sativus* ΣΕ ΑΛΜΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΛΑΣΤΩΝ/ΦΥΛΛΩΝ (*Mentha
spicata*, *Thymus citriodorus*) ΚΑΙ ΒΟΛΒΩΝ (*Allium sativum*) ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 20°C

ΣΟΦΙΑ Κ. ΠΑΠΠΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ελευθέριος Δροσινός

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ.: «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Listeria monocytogenes* ΚΑΙ
Escherichia coli O157:H7 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΒΟΛΒΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ
Raphanus sativus ΣΕ ΑΛΜΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΛΑΣΤΩΝ/ΦΥΛΛΩΝ (*Mentha spicata*,
Thymus citriodorus) ΚΑΙ ΒΟΛΒΩΝ (*Allium sativum*) ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 20°C

ΣΟΦΙΑ Κ. ΠΑΠΠΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ελευθέριος Δροσινός

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Listeria monocytogenes* ΚΑΙ *Escherichia coli* O157:H7 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΒΟΛΒΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Raphanus sativus* ΣΕ ΑΛΜΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΛΑΣΤΩΝ/ΦΥΛΛΩΝ (*Mentha spicata*, *Thymus citriodorus*) ΚΑΙ ΒΟΛΒΩΝ (*Allium sativum*) ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ 20°C

Σοφία Κ. Παππά

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: Ε. Δροσινός, Καθηγητής

Α μέλος: Ε. Πανάγου, Επ. Καθηγητής

Β μέλος: Π. Σκανδάμης, Αν. Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση και ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πολύτιμη ήταν η βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και διευθυντή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Ελευθέριο Δροσινό για την στήριξη του καθ'όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας και το ειλικρινές ενδιαφέρον του για την πρόοδό μου.

Επίσης ευχαριστώ τον Ε.Πανάγου και τον Π.Σκανδάμη για την συμβολή τους στη συγγραφή της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Σ. Παραμυθιώτη και τη Μ. Παπαδέλλη οι οποίοι με καθοδηγούσαν σε όλα τα στάδια της εργασίας μου, τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας μου. Οι υποδείξεις τους με βοήθησαν να δώσω το καλύτερο αποτέλεσμα ενώ ήταν πάντα πρόθυμοι και διαθέσιμοι να να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου. Παράλληλα ο άμεσος χαρακτήρας τους δημιουργούσε ένα ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γ.Π.Α. καθώς μου παρείχαν σημαντικές συμβουλές.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον άντρα μου για τη διαρκή τους στήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
Οξυγαλακτική ζύμωση φρούτων και λαχανικών	8
Ιστορικά στοιχεία	9
Διαδικασία ζύμωσης	11
Ανησυχίες για την ασφάλεια των ζυμούμενων τροφίμων	14
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια στη ζύμωση φρούτων και λαχανικών	18
Αυθόρμητη ή ελεγχόμενη ζύμωση λαχανικών	19
Ζυμούμενα λαχανικά ανά τον κόσμο	21
Θρεπτική αξία ζυμούμενων τροφίμων	26
Παρουσία του <i>E. coli</i> στα φρούτα και τα λαχανικά	29
Επιδημικά επεισόδια οφειλόμενα στο παθογόνο <i>E. coli</i>	30
Επιδημικά επεισόδια οφειλόμενα στο παθογόνο <i>E. coli</i> O157:H7 στην Ασία	31
Παρουσία της <i>Listeria monocytogenes</i> σε φρούτα και λαχανικά	34
Επιδημικά επεισόδια λιστερίωσης σε φρούτα και λαχανικά	35
Επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης, Βοστώνη 1979	36
Επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης, Τέξας 2010	37
Φαινολικά συστατικά στα φρούτα και στα λαχανικά	38
ΣΚΟΠΟΣ	40
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	41
Ανανέωση καλλιεργειών	41
Περιγραφή του πειράματος	42
Δειγματοληψία	43
Μικροβιολογικές αναλύσεις	43
Έλεγχος πορείας αυθόρμητης ζύμωσης	46
Μέτρηση pH και οξύτητας	46
Ταυτοποίηση του <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
Μέτρηση φαινολικών	50
Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
Αποτελέσματα pH – ολική ογκομετρούμενη οξύτητα	52
Αποτελέσματα ολικών φαινολικών	55
Μικροβιολογικά αποτελέσματα	58
Αποτελέσματα ταυτοποίησης <i>Lactobacillus plantarum</i>	77
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	80

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87
-------------------	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ζύμωση φρούτων και λαχανικών είναι μια διαδικασία που ανέπτυξε ο άνθρωπος εδώ και χιλιάδες χρόνια στη προσπάθειά του να συντηρήσει τα εν λόγω ευπαθή τρόφιμα. Σήμερα, η παράδοση συνεχίζεται κυρίως όμως για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμούμενων τροφίμων. Ακόμη, η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών είναι ένα θέμα διαχρονικό που απασχολεί έντονα τους καταναλωτές και την επιστημονική κοινότητα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φυλλων/βλαστών αρωματικών φυτών (*Mentha spicata* και *Thymus citriodorus*) και βολβών *Allium sativum* στους 20°C. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των επεμβάσεων στην πορεία εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωση η ταχεία εξάλειψη της *L. monocytogenes* από το βάζο που περιείχε βολβούς σκόρδου και του *E. coli* O157:H7 από το δοχείο που περιείχε μέντα. Ταυτόχρονα, γινόταν καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας, οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών/μυκήτων, ψευδομονάδων, εντεροκόκκων, εντεροβακτηρίων, της τιμής του pH, της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας και των ολικών φαινολικών ουσιών. Η επικρατούσα μικροχλωρίδα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια με επικρατέστερο είδος το *Lactobacillus plantarum*. Δευτερεύουσα μικροβιακή ομάδα ήταν οι εντερόκοκκοι ενώ οι ψευδομονάδες και οι ζύμες/μύκητες έμειναν σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσής τους νωρίτερα από το μέσον της ζύμωσης. Τα δυο παθογόνα δεν ανιχνεύθηκαν στο τέλος της ζύμωσης. Η ποσότητα των φαινολικών αυξήθηκε έντονα τις πρώτες έξι ημέρες ενώ μετά σχεδόν σταθεροποιήθηκε εμφανίζοντας μια μικρή αύξηση.

Λέξεις κλειδιά: αυθόρμητη ζύμωση, *Raphanus sativus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, γαλακτικό οξύ.

ABSTRACT

In the past, fruit and vegetable fermentation process was developed giving the ability of food preservation. Nowadays, the tradition continues, due to the organoleptic characteristics of these products. Of course, the presence of microorganisms in food concerns both scientists and consumers strongly. In the present study, the survival of pathogens *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 was examined during the spontaneous fermentation of *Raphanus sativus* roots in the presence of leaves/stems of aromatics plants (*Mentha spicata* and *Thymus citriodorus*) and root of *Allium sativum* at 20°C. Results didn't show significant variation of the growth population of pathogens among attempts. Nevertheless, the rapid extinction of *L. monocytogenes* is remarkable in the pot containing root of *Allium sativum* and *E. coli* O157:H7. At the same time, the population of total viable count, lactic acid bacteria, yeast/molds, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. and Enterobacteriaceae was counted, as well as pH value, total titratable acidity and total phenolic substances. The dominant microbial population was lactic acid bacteria, in all experimental fermentations, and *Lactobacillus plantarum* was the dominant species. Secondary microbial population was *Enterococcus* spp. while *Pseudomonas* spp. and yeast/molds remained at non detectable levels at the early stages of the fermentation process. The amount of phenolic substances increased in the first six days and after that it remained almost stable with a slight increase.

Key words: spontaneous fermentation, *Raphanus sativus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, lactic acid.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οξυγαλακτική ζύμωση φρούτων και λαχανικών

Η οξυγαλακτική ζύμωση διεξάγεται εδώ και χιλιάδες χρόνια για τη δαιτήρηση των ευπαθών και πλεονασματικών τροφίμων όπως επίσης και για να βελτιώσει τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Μια μεγάλη κατηγορία φρούτων και λαχανικών συνηθίζονται να χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως υπόστρωμα για την οξυγαλακτική ζύμωση με αποτέλεσμα ένα πλούτο τελικών προϊόντων. Μερικά από αυτά είναι χαρακτηριστικά γεωγραφικών περιοχών.

Η κυριαρχία των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο αναπτυσσόμενο μικροπεριβάλλον είναι πρωταρχικής σημασίας για το επιθυμητό αποτέλεσμα της διαδικασίας. Η ταχεία πτώση του pH η οποία οφείλεται στη μεταβολική δραστηριότητα και στο γαλακτικό οξύ παρεμποδίζει την ανάπτυξη της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Το αλάτισμα είναι ένα στάδιο της διαδικασίας που βοηθά την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της εκκίνησης της ζύμωσης. Η κατάλληλη θερμοκρασία και η ποιότητα των πρώτων υλών παίζουν επίσης αποφασιστικό ρόλο. Στη περίπτωση που δεν επιτευχθεί γρήγορα η οξύνιση, εξαιτίας αποτυχημένου ελέγχου των προαναφερόμενων παραμέτρων, έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση της ανταγωνίστριας μικροχλωρίδας και κυρίως των *Enterobacteriaceae*, η ανάπτυξη των οποίων εκτιμάται σαν αλλοίωση.

Ένας άλλος τρόπος για τον αποτελεσματικό έλεγχο της διαδικασίας ζύμωσης είναι η ανάπτυξη εναρκτηρίων καλλιεργείων, οι οποίες αποτελούσαν το επίκεντρο εντατικών μελετών, λαμβάνοντας υπόψη, ιδιαιτέρως, προϊόντα με παγκόσμια εμπορική σημασία όπως οι ζυμούμενες ελιές, το αγγούρι και το ξυνολάχανο. Αρκετά στελέχη, που είναι ικανά να παράξουν βακτηριοσίνες, βελτιώνουν την ασφάλεια και τη θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος. Αυτά τα στελέχη έχουν εξετασθεί και καταγραφεί. Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη του μικροπεριβάλλοντος από κάποια άλλα αυθόρμητα ζυμούμενα φρούτα και λαχανικά βοηθά στην καλύτερη κατανόηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, γενικά, και συγκεκριμένων προϊόντων πιο ειδικά.

Στην επόμενη παράγραφο γίνεται αναφορά της ζύμωσης των

οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φρούτα και λαχανικά. Μία ιστορική αναφορά βασισμένη στην αρχαία ελληνική και ρωμαϊκή λογοτεχνία, που προσπαθεί να παρουσιάσει τις κύριες συνήθειες της παραγωγικής διαδικασίας, τις ανησυχίες για την ασφάλεια και τις θρεπτικές ιδιότητες (192).

Ιστορικά στοιχεία

Μία μεγάλη γκάμα φρούτων και λαχανικών καλλιεργήθηκαν και καταναλώθηκαν στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου την περίοδο της αρχαιότητας. Υπάρχουν άφθονες αναφορές σε αρχαία κείμενα όπως για παράδειγμα στην "Οδύσσεια" του Ομήρου, στο "Συμπόσιον" του Ξενοφώντα, στους "Δειπνοσοφισταί" του Αθηναίου και σε άλλα. Επιπρόσθετα, ορισμένοι τύποι ή ποικιλίες ήταν σε ιδιαίτερη εκτίμηση από το κοινό όπως τα σύκα Αττικής και Ρώμης, τα αμύγδαλα Νάξου, τα καρύδια από την Κάρυστο, τα ρόδια Βοιωτίας, τα αχλάδια Κέας και άλλα.

Η συντήρηση φρούτων και λαχανικών εξασκήθηκε κυρίως με το αλάτισμα, την αφυδάτωση και την οξύνιση. Το αλάτι εφαρμοζόταν όπως ήταν ή σε μορφή άλμης, η οποία αναφέρεται σε αρκετά αρχαία κείμενα. Η απλή άλμη εφαρμοζόταν για τη συντήρηση ψαριού, κρέατος, ελιών αλλά και για φύλλα και ρίζες ελαιοκράμβης (*Brassica napus* L.). Επιπλέον, πρόσθεταν ξύδι και άλλα υλικά όπως το σκόρδο, το θυμάρι και άλλα. Η αφυδάτωση ήταν μία πολύ κοινή μέθοδος η οποία εφαρμοζόταν κυρίως στη συντήρηση φρούτων όπως τα σύκα, τα σταφύλια, οι χουρμάδες και άλλα. Η ζύμωση χρησιμοποιούνταν συχνά για την παραγωγή μιας σειράς προϊόντων όπως ψωμί, κρασί, ξύδι, γαλακτοκομικά προϊόντα και μπύρα. Περισσότεροι από 50 τύποι ψωμιού έχουν καταγραφεί σε αρχαία κείμενα ανάλογα με τις πρώτες ύλες, την παραγωγική διαδικασία, το χρόνο και τον τύπο ζύμωσης. Όσο για το τελευταίο, ο Αθηναίος, στο έργο του "Δειπνοσοφισταί", αναφέρει τη ξινή γεύση ορισμένων ψωμιών κάτι το οποίο υποδηλώνει τη χρήση προζυμιού. Το κρασί φαίνεται να ήταν ένας γενικός όρος που αναφερόταν στην αλκοολική ζύμωση. Παρόλα αυτά, ο όρος χρησιμοποιούνταν ως έχει μόνο όταν τα σταφύλια αποτελούσαν υπόστρωμα της ζύμωσης. Η χρήση άλλων πρώτων υλών αναμεμιγμένων ή όχι με σταφύλια υποδεικνύεται με τη προσθήκη ενός επιθέτου στο γενικό όρο. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνταν μια ευρεία ποικιλία πρώτων υλών όπως *Cydonia oblonga* Mill.,

Malus sp., *Punica granatum* L., *Myrtus communis* L., *Pistacia lentiscus* L., *Phoenix dactylifera* L., *Ficus carica* L., *Laurus nobilis* L., *Pinus* sp., *Origanum dictamnus* L., *Thymus capitatus* L., *Satureja* sp., *Mentha pulegium* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Anethum graveolens* L., *Valeriana celtica* L., *Petroselinon hortense* Hoffm., *Daphne gnidium* L., *Daphne oleides* L., *Apium graveolens* L. δίνοντας ένα καταπληκτικό πλούτο τελικών προϊόντων. Υπάρχουν δυο ιδιαίτερα προϊόντα που αξίζει να αναφερθούν ξεχωριστά. Το ένα παράγεται από λωτό και το άλλο από χουρμά. Η περιοχή των λωτοφάγων αναφέρεται από τον Όμηρο στην “Οδύσσεια” και τοποθετείται στον κόλπο Γκαμπές στην Τυνησία. Ο λωτός ήταν ένα όνομα που χρησιμοποιούνταν για να περιγράψει μια πληθώρα φρούτων. Το φρούτο, όμως, που αναφέρεται από τον Όμηρο φαίνεται να είναι το *Ziziphus lotus* L.. Σύμφωνα με τον Ηρόδοτο και τον Πολύβιο τα φρούτα του λωτού χρησίμευαν για την παραγωγή κρασιού. Ωστόσο, λόγω του μικρού χρόνου ζωής των δέκα ημερών, παρήγαγαν μόνο μικρές ποσότητες κάθε φορά. Οι χουρμάδες χρησίμευαν για την παραγωγή κρασιού και μελιού από τον 5^ο αιώνα π.Χ., σύμφωνα με τον Ηρόδοτο και τον Ξενοφώντα. Η αρχαία Βαβυλωνία θεωρείτο κεντρικό σημείο παραγωγής και μέσω του εμπορίου τα προϊόντα έφτασαν στη λεκάνη της Μεσογείου. Βέβαια, λόγω των ελλειπών αναφορών σε αρχαία κείμενα, πιστεύεται ότι αυτά τα προϊόντα είτε ήταν άγνωστα είτε δεν έβρισκαν εκτίμηση από τον κόσμο. Παρομοίως, αρκετοί τύποι ξυδιού είναι καταγεγραμμένοι βάση της προέλευσής τους ή των πρώτων υλών. Η χρήση σιταριού και κριθαριού για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών ήταν γνωστή αλλά λιγότερο εκτιμώμενη από τους αρχαίους Έλληνες. Αντιθέτως, σύμφωνα με αναφορές του Αριστοτέλη, του Εκαταίου και του Πεδάνιου Διοσκουρίδη, η Αίγυπτος, η Βρετανία και η Ιβερία ήταν σημεία στα οποία κατανάλωναν ευρέως τέτοιου είδους προϊόντα. Επιπλέον, ο Πεδάνιος ο Διοσκουρίδης, στο έργο του “De Materia Medica”, αναφέρει ότι αυτά τα ποτά μπορεί να βλάψουν τα νεφρά και τον εγκέφαλο και ότι είναι διουρητικά και προκαλούν φούσκωμα. Αυτή είναι η πιο πιθανή αιτία για την περιορισμένη αποδοχή τους. Το κρασί ήταν περισσότερο αποδεκτό καθώς θεωρείτο πιο υγιεινό και χωρίς παρενέργειες.

Εξετάζοντας τη οξυγαλακτική ζύμωση, όπως αυτή γίνεται αντιληπτή σήμερα, φαίνεται να ήταν λιγότερο διαδεδομένη κυρίως λόγω της διαθεσιμότητας φρούτων και λαχανικών όλο το χρόνο, όπως αναφέρεται στα

κείμενα της Ομηρικής εποχής, αλλά και λόγω της προτίμησης της αφυδάτωσης και του καπνισμού για τη συντήρηση, όπως αυτό αναφέρεται από τον Αθηναίο στο έργο του “Δειπνοσοφισταί”. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για ένα προϊόν, η ύπαρξη του οποίου υποδηλώνει τη χρήση οξυγαλακτικής ζύμωσης. Το προϊόν αυτό ονομαζόταν “αβυρτάκη” και ο τόπος καταγωγής του ήταν η περιοχή των Μηδών, στο σημερινό βόρειο Ιράν, από όπου διαδόθηκε στη λεκάνη της Μεσογείου. Προέκυπτε από την ανάμειξη διαφόρων πρώτων υλών όπως κάρδαμο, σπόρους μουστάρδας, πράσο, σκόρδο, σταφίδες, ρόδι και φύλλα λαχανικών. Η ύπαρξη οξυγαλακτικής ζύμωσης συμπεραίνεται λόγω της πολύ έντονης και ξινής γεύσης που χαρακτήριζε το προϊόν. Αν και δεν αναφέρεται σε κάποιο αρχαίο κείμενο η προσθήκη ξυδιού, παρά μόνο σε μερικά μεταγενέστερα Ρωμαϊκά κείμενα, η παρουσία μιας ποικιλίας παρόμοιων προϊόντων είναι εμφανής όπως επίσης και η ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού που εκπαιδευόταν για το σκοπό αυτό. Τέτοιου είδους προϊόντα δεν μπορούσαν να χειριστούν απλοί μάγειρες. Έτσι, στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου ενώ ο ελληνικός και ο ρωμαϊκός πολιτισμός άνθιζαν μέχρι τον 1ο αιώνα μ.Χ. η ζύμωση ήταν μια κοινή διαδικασία που υιοθετήθηκε για την παραγωγή μιας ποικιλίας προϊόντων καθημερινής χρήσης. Η οξυγαλακτική ζύμωση εφαρμοζόταν επίσης και ήταν εξίσου αποδεκτή με την αλκοολική ζύμωση μέσα από μια ευρεία ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων και τύπων ψωμιού. Κρίνοντας από τις αναφορές, φαίνεται ότι τα φρούτα και τα λαχανικά χρησιμοποιούνταν σαν υπόστρωμα για τη οξυγαλακτική ζύμωση.

Διαδικασία ζύμωσης

Η παραγωγή ζυμούμενων φρούτων και λαχανικών, ουσιαστικά, περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια.

Συλλογή των πρώτων υλών: Εξαρτάται από το επιθυμητό τελικό προϊόν και τις σχετικές πρώτες ύλες που έχουν συλλεχθεί.

Αρχική επεξεργασία: Όλα τα ουσιαστικά βήματα, όπως πλύσιμο, πυρηνοληψία, κόψιμο, ξεφλούδισμα, μαγείρεμα ή άλλη επεξεργασία που γίνεται πριν τη ζύμωση. Για παράδειγμα γίνεται επεξεργασία των ελιών με σόδα με σκοπό να υδρολυθεί η ελευρωπαΐνη, ένα φαινολικό γλυκοσίδιο που είναι κύριος υπεύθυνος της πικρής γεύσης των ελιών, και να ελευθερωθεί ένα ποσοστό

υδατανθράκων που περιέχονται στον καρπό μέσα στο διάλυμα. Η επεξεργασία με τη σόδα ακολουθείται από πλύσιμο για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος και να επιτευχθεί το κατάλληλο τελικό pH. Στη περίπτωση ζύμωσης ξινολάχανου, ο τεμαχισμός του λάχανου αποτελεί την αρχική επεξεργασία.

Αλάτισμα: Το αλάτισμα είναι το επόμενο στάδιο της ζύμωσης και μπορεί να εφαρμοστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι το ξηρό αλάτισμα. Σε αυτή την περίπτωση το αλάτι εφαρμόζεται πάνω στις κομμένες πρώτες ύλες. Ο δεύτερος τρόπος είναι με τη χρήση άλμης. Η άλμη προκαλεί την οσμωτική εκχύλιση του νερού από τους φυτικούς ιστούς. Η ποσότητα του αλατιού που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή της άλμης εξαρτάται από τον τύπο των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται (συνήθως είναι το 2,5-5% του βάρους των λαχανικών). Μόλις τα λαχανικά βυθιστούν στην άλμη (συνήθως 5-20% NaCl) υδατάνθρακες και άλλα θρεπτικά στοιχεία εκχυλίζονται και έτσι σχηματίζεται το υπόστρωμα για την επερχόμενη ζύμωση. Ο τρίτος τρόπος είναι να μην αλατιστούν. Η συγκεκριμένη μέθοδος συνήθως εφαρμόζεται στα αμυλώδη φρούτα και λαχανικά στις περιοχές του Δυτικού Ειρηνικού, στην Αιθιοπία και στα Ιμαλία (1,2).

Ζύμωση: Με τη προϋπόθεση ότι έχει γίνει το κατάλληλο αλάτισμα, η θερμοκρασία είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας που καθορίζει το αποτέλεσμα της ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συμβαίνει μια σειρά από φυσικοχημικές αλλαγές, αναλόγως της δυναμικής του μικροβιακού πληθυσμού που θα συζητηθεί σε επόμενη παράγραφο.

Δεύτερη επεξεργασία: Ένα δεύτερο επίπεδο επεξεργασίας μπορεί να εμφανιστεί μετά τη ζύμωση. Για παράδειγμα μπορεί να γίνει αποξήρανση ή παστερίωση του παραγόμενου προϊόντος. Όταν το τελικό προϊόν είναι έτοιμο συσκευάζεται και καταναλώνεται είτε ως έχει είτε ύστερα από θερμική επεξεργασία (βράσιμο ή τηγάνισμα).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συμβαίνει μια σειρά από φυσικοχημικές αλλαγές ανάλογα με το ζυμούμενο προϊόν. Η γρήγορη οξίνιση και πτώση του pH είναι επιθυμητές σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με την επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι πρώτες ύλες με καλή μικροβιολογική ποιότητα, το κατάλληλο αλάτισμα και οι κατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες μπορούν να διασφαλίσουν την επαναληψιμότητα των ζυμώσεων ακόμη και αν

αυτές γίνονται αυθόρμητα. Όταν η οξίνιση δεν επιτευχθεί γρήγορα είναι δυνατόν να επικρατήσουν τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και ο πληθυσμός τους να φτάσει σε τέτοια επίπεδα που να εκτιμηθεί σαν αλλοίωση.

Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στη ζύμωση φρούτων και λαχανικών ποικίλουν σε επίπεδο είδους κάτι το οποίο δικαιολογείται από την ποικιλία των πρώτων υλών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, την αρχική τιμή του pH, όπως επίσης και το περιεχόμενο NaCl. Το *Ln. mesenteroides* συχνά απομονώνεται από τα αρχικά στάδια μιας αυθόρμητης ζύμωσης. Αυτός ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται από μικρή διάρκεια γενιάς, την ικανότητα αντοχής σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων NaCl, και ευαισθησία στις όξινες συνθήκες (3). Βέβαια, αυτό δε συμβαίνει κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης άγουρης ντομάτας, στην οποία η ζύμωση ξεκινά όταν η αρχική τιμή του pH βρεθεί μεταξύ 3.8-4.8 (4). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχουν πολλές πτυχές της φυσιολογίας των μικροοργανισμών που είναι ακόμη άγνωστες. Από την άλλη πλευρά, ο *Lb. plantarum* είναι ο περισσότερο σχετιζόμενος με τα τελευταία στάδια καθώς εμφανίζει αντοχή σε όξινο περιβάλλον και διακρίνεται από μεγάλη μεταβολική ικανότητα η οποία του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα (5). Η ικανότητά του να αντέχει στρεσογόνες συνθήκες μπορεί να δικαιολογήσει την ύπαρξη μερικών άλλων ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως το *Lb. sakei*, *Lb. brevis*, *Pd. pentosaceus* και το *Weissella spp.* το οποίο μπορεί να αντέξει όξινες συνθήκες. Το *Ln. gelidum* μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι 10°C, το *Ln. gasicomitatum* το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη αντοχή σε όξινο περιβάλλον σε σχέση με τα *Ln. mesenteroides* και *Ln. citreum*. Το *W. koreensis* που είναι ψυχρόφιλο μπορεί να αναπτυχθεί σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες (6,7,8). Κατά τη διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης λαχανικών υπάρχουν αναφορές για μια διαδοχή σε επίπεδο ειδών με την πιο χαρακτηριστική να εμφανίζεται στη ζύμωση λάχανου και κουνουπιδιού στην οποία αρχικά κυριαρχεί το *Ln. mesenteroides* και στη συνέχεια αντικαθίσταται από το *Lb. plantarum*. Επιπλέον, εμφανίζεται και μια άλλη διαδοχή σε επίπεδο υποείδους κατά την αυθόρμητη ζύμωση σπαραγγιών και πράσινης τομάτας (4,9). Αυτή η διαδοχή ήταν στοιχείο για όλα τα είδη που εμπλέκονται στη ζύμωση, προτείνοντας ότι οι διατροφικές αλληλεπιδράσεις που καθοδηγούν την αυθόρμητη ζύμωση είναι ακόμη πιο

περίπλοκες απ' ότι αναμενόταν.

Ανησυχίες για την ασφάλεια των ζυμούμενων τροφίμων

Γενικά οι τροφιμογενής ασθένειες είναι πιο πιθανόν να εμφανιστούν ύστερα από την κατανάλωση φρέσκων προϊόντων παρά από τη κατανάλωση των αντίστοιχων ζυμούμενων προϊόντων κυρίως εξαιτίας του ανταγωνισμού που δημιουργούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Πράγματι, τα επιδημικά επεισόδια γαστρεντερίτιδας που προκαλούνται από μικρόβια και ιούς επανειλημμένα έχει βρεθεί ότι προκαλούνται από τη κατανάλωση νωπών λαχανικών (10). Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση των δεδομένων από τις τροφιμογενής ασθένειες και από τους σχετιζόμενους θανάτους κατά τη διάρκεια των ετών 1998-2008, καθιστά τα φρέσκα προϊόντα υπεύθυνα για το 46% και το 23% αυτών αντίστοιχα (11). Τα λαχανικά συνήθως καταναλώνονται νωπά, όπως το λάχανο και το αγγούρι, με αποτέλεσμα να γίνονται πολύ συχνά το μέσο εκδήλωσης τροφιμογενών ασθενειών. Αντίθετα, στα ζυμούμενα, με αλάτι ή ξύδι φρούτα και λαχανικά υπάρχει μια πολύ μικρή συσχέτιση με τα *Cl. botulinum*, *L. monocytogenes* και τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* (12).

Πίνακας 1: Επιδημικά επεισόδια στις Η.Π.Α. που σχετίζονται με την κατανάλωση μαρουλιού και αγγουριού.

Έτος	Πολιτεία	Παράγοντας	Άρρωστοι /Νοσηλεύόμενοι/ Νεκροί
<i>Brassica oleracea var. capitata</i>			
1999	Νεμπράσκα	<i>E. coli</i> O157:H7	65/8/0
1999	Μινεσότα	Norovirus Genogroup I	25/0/0
2000	Κονέκτικατ	<i>C. jejuni</i>	13/1/0
2001	Μινεσότα	Norovirus Genogroup I	64/0/0
2009	Νέα Υόρκη	Norovirus	24/0/0
2010	Όρεγκον	Norovirus Genogroup II	23/0/0
2010	Ιλινόις	Norovirus Genogroup II	7/1/0
2011	Μέριλαντ	Norovirus Genogroup II	93/0/0
2011	Αλαμπάμα	Norovirus Genogroup I	21/2/0
2012	Μινεσότα	Norovirus	9/0/0

2013	N. Καλιφόρνια	Norovirus Genogroup I	8/0/0
2013	Αριζόνα	<i>E. coli</i> O157:H7	94/22/0
<i>Cucumis sativus</i>			
2011	Τζόρτζια	<i>S. Saintpaul</i>	14/2/0
2012	πολυπολιτειακό	<i>S. Javiana</i>	49/14/0
2013	Μίτσιγκαν	<i>S. enterica</i> I 4,[5],12:i:-	12/1/0
2013	πολυπολιτειακό	<i>S. Saintpaul</i>	84/17/0

Η αποτελεσματικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης τροφιμογενών παθογόνων σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης έχει μελετηθεί εκτενώς (13). Πέρα από την οξύτητα, η οποία έχει αναγνωριστεί ως πρωταρχικός παρεμποδιστικός παράγοντας, ο ανταγωνισμός για τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία, όπως επίσης και η παραγωγή μεταβολιτών όπως διοξείδιο του άνθρακα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, αιθανόλη, διακετύλιο ακόμη και οι βακτηριοσίνες μπορεί να συμβάλλουν στη καταστολή της ανάπτυξης παθογόνων του ανθρώπου. Από την άλλη, η μικροβιολογική ασφάλεια των ζυμούμενων φρούτων και λαχανικών δεν είναι δεδομένη εξαιτίας των παρακάτω παραγόντων.

Πρώτον, ένας παράγοντας είναι η επίδραση της μορφολογίας των φυτικών υλικών στην αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτικού υλικού και των μικροβίων. Η εκτεταμένη ποικιλομορφία της επιφάνειας των φυτών, η οποία επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία, το είδος, τη μορφολογία της επιφάνειας, τη σύσταση των ιστών και τη μεταβολική δραστηριότητα (14, 15, 16, 17,18, 19, 20, 21) έχει ως αποτέλεσμα μια αντίστοιχη ποικιλία μικροπεριβαλλόντων στα οποία τα παθογόνα βακτήρια μπορεί να αλληλεπιδράσουν με επιφυτικά βακτήρια, να προσαρμοστούν, ακόμη και να διεισδύσουν στο φυτικό ιστό (22, 23, 24, 25, 26,27).

Δεύτερον, η τάση των βακτηριακών κυττάρων να συναθροίζονται ανάμεσα στις αυλακώσεις των επιδερμικών φυτικών κυττάρων και να βρίσκουν καταφύγιο κάτω από την επιφάνεια των φυτικών υλικών κατά τη διάρκεια των προ και μετά συλλεκτικών χειρισμών (28, 29, 30).

Κατά συνέπεια, η μοίρα των τροφιμογενών παθογόνων κατά τη διάρκεια και μετά τη ζύμωση έχει αναθεωρηθεί. Οι Inatsu et al. (31) μελέτησαν την επιβίωση των *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *St. aureus* και *L. monocytogenes* σε

εμπορικό και εργαστηριακά προετοιμασμένο kimchi. Τα προϊόντα ενοφθαλμίστηκαν με πληθυσμό παθογόνων της τάξης των 5-6 log CFU/g και επώαστηκαν στους 10°C. Βρέθηκε ότι ο πληθυσμός του *E. coli* O157:H7 παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα και στα δυο προϊόντα. Σε υψηλά επίπεδα διατηρήθηκε και ο πληθυσμός του *S. Enteritidis* στα προϊόντα που είχαν παρασκευαστεί στο εργαστήριο. Ο πληθυσμός του *St. aureus* μειώθηκε κάτω από το όριο αρίθμησης μετά τις 12 μέρες επώασης. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* χρειάστηκε 16 και 20 μέρες για να κατέβει κάτω από το όριο αρίθμησης στα εμπορικά και εργαστηριακά παρασκευασμένα προϊόντα αντίστοιχα. Τέλος ο πληθυσμός του *S. Enteritidis* σταμάτησε να ανιχνεύεται μετά από 16 μέρες στα εμπορικώς παρασκευασμένα προϊόντα.

Άλλο ένα παράδειγμα μείωσης του πληθυσμού για το *E. coli* O157:H7 και τη *L. monocytogenes* κάτω του ορίου ανίχνευσης είναι κατά τη διάρκεια ζύμωσης *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο) (32). Στη μελέτη των Niksic et al. 2005 (32) αξιολογήθηκε το αποτέλεσμα της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (18 και 22°C) και της συγκέντρωσης του αλατιού (1.8, 2.25 και 3%) στην επιβίωση των προαναφερόμενων παθογόνων μικροοργανισμών. Όλα τα παθογόνα διατήρησαν τον πληθυσμό τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε άλμη, προς το τέλος, όμως, της διαδικασίας ο πληθυσμός τους μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Οι Kim et al. 2008 (33) μελέτησαν τη μοίρα των *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* και *St. aureus* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του kimchi κάτω από δυο επεξεργασίες: θερμική επεξεργασία (85°C για 15 min) και επεξεργασία εξουδετέρωσης (pH 7) στη μέρα 0 ή στη μέρα 3. Αν και η θερμική επεξεργασία τη μέρα 0 δεν είχε κάποια επίδραση στο πληθυσμό του *B. cereus*, σημειώθηκε μείωση στο πληθυσμό της *L. monocytogenes* και του *St. aureus*. Σημαντική και ολοκληρωτική αδρανοποίηση των *B. cereus* και *L. monocytogenes* αντίστοιχα, αλλά μόνο οριακή αδρανοποίηση για το *St. aureus* σημειώθηκε μετά από θερμική επεξεργασία τη μέρα 3. Η επεξεργασία εξουδετέρωσης τη μέρα 3 είχε σαν αποτέλεσμα την ολοκληρωτική αδρανοποίηση της *L. monocytogenes*, σημαντική μείωση του *B. cereus* και μόνο οριακή μείωση για τον πληθυσμό του *St. aureus*. Όλα αυτά τα αποτελέσματα σχετίζονται με την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και την επακόλουθη πτώση του pH.

Η ανάπτυξη του *E. coli* O157:H7 στη ζύμωση αγγουριού σε άλμη

αποκτήθηκε από εμπορικά εργοστάσια σε διαφορετικά στάδια της ζύμωσης αξιολογήθηκε από τους Breidt Jr και Caldwell 2011 (34). Σύμφωνα με τον Food and Drug Administration, ο απαιτούμενος χρόνος για να επιτευχθεί μείωση 5 log στο πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την τιμή του pH και τη συγκέντρωση NaCl στην άλμη. Ο *E. coli* O157:H7 δεν μπορεί να ανταγωνιστεί το *Lb. plantarum* και *Ln. mesenteroides* στους 30°C, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των κυττάρων του παθογόνου κάτω από το όριο ανίχνευσης μέσα σε 2-3 μέρες. Οι Cho et al. 2011 (35) μελέτησαν την επιβίωση των *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* κατά την ζύμωση kimchi παρασκευασμένου με *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο), βολβούς του είδους *Raphanus sativus* (ραπανάκι) και νωπό χοιρινό κρέας. Ο πληθυσμός των παθογόνων σταδιακά μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στους 4°C και δεν ανιχνεύονταν μετά από 14 και 15 μέρες μετά τη ζύμωση, για τον *E. coli* O157:H7 και τη *L. monocytogenes* αντίστοιχα.

Σε άλλο πείραμα, οι Paramithiotis et al. 2012 (36) αξιολόγησαν τη μοίρα των *L. monocytogenes* και *S. Typhimurium* κατά τη διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης κουνουπιδιού. Η μελέτη έδειξε ότι και τα δυο παθογόνα επιβιώνουν σε χαμηλά (2.0 log CFU/mL) και μεσαία (4.0 log CFU/mL) επίπεδα ενοφθαλμίσματος. Τα στελέχη της *L. monocytogenes* είναι περισσότερο ικανά να επιβιώσουν από τα στελέχη του *S. Typhimurium*, ενώ σε υψηλά επίπεδα ενοφθαλμίσματος (6.0 log CFU/mL) δεν καταγράφηκε σημαντική διαφορά. Η επιβίωση των *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* και *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των ζυμούμενων πράσινων επιτραπέζιων ελιών της ποικιλίας Χαλκιδική σε άλμη μελετήθηκε από τους Argyri et al. 2013 (37). Σε αυτή τη μελέτη, οι ελιές είχαν ζυμωθεί προηγουμένως είτε αυθόρμητα είτε με προσθήκη εναρκτήριων καλλιεργειών, ενοφθαλμίστηκαν με ένα μείγμα παθογόνων στους 7.0 log CFU/mL, συσκευάστηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και αποθηκεύτηκαν στους 20°C. Ο πληθυσμός των παθογόνων σταδιακά μειωνόταν και ήταν ανιχνεύσιμος μέχρι τη 19, 21 και 31 μέρα της αποθήκευσης για τους *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* και *St. aureus* αντίστοιχα. Οι Medina et al. 2013 (38) μελέτησαν την επιβίωση των *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* και *St. aureus* ενοφθαλμισμένων με 8.0 log CFU/mL σε βιομηχανικές επιτραπέζιες ελιές σε άλμη, κατά την αποθήκευση στους 4°C σε

αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Βρέθηκε ότι όλα τα παθογόνα εξαλείφθηκαν με ρυθμό που ήταν ανάλογος με τη περιεκτικότητα της άλμης σε φαινολικά στοιχεία, τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα η απουσία αλκαλικής επεξεργασίας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης σε αντιβακτηριδιακές ουσίες, που οδηγούν σε ένα χρόνο μείωσης κατά 5 log των παθογόνων μεταξύ 5-10 min, πέρα από τη θερμοκρασία δωματίου ή τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Αντίθετα η επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) έχει ως αποτέλεσμα στη μείωση της συγκέντρωσης αντιβακτηριδιακών ουσιών που οδηγεί σε αύξηση του χρόνου μείωσης 5 log. Για παράδειγμα ο χρόνος αυτός αυξήθηκε στις 2.8 μέρες για τη *L. monocytogenes*, στις 5.2 μέρες για το *E. coli*, στις 6.2 μέρες για το *St. aureus* και στις 6.7 για τη σαλμονέλα υπό αερόβια αποθήκευση σε θερμοκρασία ψύξης, φτάνοντας τις 17 μέρες για το *St. aureus* και τις 11 μέρες για το *E. coli* υπό αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία ψύξης.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια στη ζύμωση φρούτων και λαχανικών

Τα ζυμούμενα τρόφιμα είναι ευρέως γνωστά και η διαδικασία της ζύμωσης υιοθετήθηκε με σκοπό τη συντήρηση αλλοιώσιμων τροφίμων όπως είναι τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Για χρόνια το φάσμα των ζυμούμενων τροφίμων επηρεαζόταν από κοινωνικές και πολιτικές επιρροές, από διαφορετικές εθνικότητες, όπως επίσης και από τη διαθεσιμότητα των φυτικών πηγών η οποία εξαρτόνταν από τη γεωγραφική περιοχή (39). Συνήθη λαχανικά που υφίστανται τη διαδικασία της ζύμωσης είναι τα λάχανο, κουνουπίδι, μουστάρδα, ραπανάκι, καρότο, αγγούρι, φρέσκο κρεμμυδάκι, κολοκύθα, ντομάτα, σπανάκι, σπαράγγια, μαρούλι, το μπρόκολο, το τζίντζερ, βλαστός μπαμπού και αρκετοί χυμοί φρούτων και λαχανικών (40, 41).

Ζυμούμενα τρόφιμα και ποτά έχουν προκύψει διαμέσου του μεταβολισμού ζυμών και βακτηρίων, εκ των οποίων τα πιο αντιπροσωπευτικά είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ζυμώνουν τα χημικά συστατικά των πρώτων υλών, βελτιώνοντας έτσι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία του προϊόντος. Ταυτόχρονα αυξάνουν την

πεπτικότητα και τη βιοαποικοδόμηση των μη θρεπτικών παραγόντων και άλλων ανεπιθύμητων στοιχείων, προκαλώντας την απελευθέρωση αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών στοιχείων. Επιπλέον τα οξυγαλακτικά βακτήρια με προβιοτικές ιδιότητες μπορούν να προσδώσουν στο τελικό προϊόν λειτουργικές ιδιότητες (40, 42, 43). Το ενδιαφέρον για τα οξυγαλακτικά βακτήρια εξελίχθηκε μέσα στο χρόνο. Εκτός από την τεχνολογική πλευρά που σχετίζεται με το ρόλο των εναρκτήριων καλλιιεργειών, η προβιοτική δράση τους κερδίζει όλο και περισσότερο την προσοχή (44, 45). Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων, που εμφανίζονται στα ζυμούμενα τρόφιμα, έχει ερευνηθεί για τις προβιοτικές του ιδιότητες.

Αυθόρμητη ή ελεγχόμενη ζύμωση λαχανικών

Οι *Lactobacillus*, *Leuconostus*, *Weissella*, *Enterococcus* και *Pediococcus* είναι τα γένη που εμφανίζονται κυρίως στη ζύμωση των λαχανικών. Όταν επιτευχθούν οι ιδανικές συνθήκες αναεροβίωσης, θερμοκρασίας, ενεργότητας νερού και συγκέντρωσης αλατιού, τα επιφυτικά οξυγαλακτικά βακτήρια ξεκινούν την αυθόρμητη ζύμωση. Γενικά, αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή συμμετοχή ετεροζυμούμενων και ομοζυμούμενων ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων, εκτός από τη συνεισφορά ορισμένων ζυμών (40). Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης, σχεδόν όλοι οι υδατάνθρακες μετατρέπονται σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, μαννιτόλη και οξικό οξύ. Το αποτέλεσμα της σταδιακής πτώσης του pH απαγορεύει την ανάπτυξη των Gram αρνητικών βακτηρίων και εγκαθιστά τις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Σε αντίθεση με άλλα ζυμούμενα τρόφιμα, όπως τα αλκοολούχα ποτά (κρασί και μπύρα), τα προϊόντα αρτοποιίας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα για την παραγωγή των οποίων η χρήση των εναρκτήριων καλλιιεργειών είναι μια καλά εγκατεστημένη τεχνολογία, η ζύμωση των λαχανικών βασίζεται στους ενδογενείς μικροοργανισμούς. Αυτό συμβαίνει κυρίως, εξαιτίας μιας μεγάλης ποικιλότητας στη σύνθεση των συστατικών, στην απουσία διαθέσιμης τεχνολογίας να παρέχει μικροοργανισμούς για βιομηχανική εφαρμογή και στο ότι παραδοσιακά η παραγωγή γινόταν σε επίπεδο οικιακής χρήσης με αποτέλεσμα να μην απαιτείται εντατικοποίηση της διαδικασίας. Επιπλέον, είναι δύσκολη η αναπαραγωγή του μικροβιακού πληθυσμού της αυθόρμητης

ζύμωσης λόγω της δυναμικής που εμφανίζει η μικροβιακή κοινότητα.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές εργασίες έχουν ερευνήσει τη μικροβιακή σύνθεση της αυθόρμητης ζύμωσης λαχανικών με σκοπό να αυξήσουν τη γνώση γύρω από τη διαδικασία και να μπορέσουν να επιλέξουν εναρκτήριοις καλλιέργειες και να ελέγξουν τη ζύμωση του τροφίμου και την ποιότητα του τελικού προϊόντος(46). Έχει αναφερθεί ότι ορισμένα ζυμούμενα λαχανικά χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση ενός κυρίαρχου είδους ή γένους. Στη περίπτωση του *yacon* η ζύμωσή του σχετίζεται κυρίως με τη μεταβολική δραστηριότητα του *Leuconostoc* spp. (47). Αντίθετα, αλλαγές στη μικροχλωρίδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων αναφέρονται διαμέσου της αυθόρμητης ζύμωσης *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (κινέζικο λάχανο) (48). Παρομοίως η οικογένεια *Enterobacteriaceae* και μια ευρεία ποικιλία ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένης της *Weissella* spp. κυριαρχούν στη πρώτη φάση της ζύμωσης *Brassica oleracea* var. *botrytis* (κουνουπίδι) και μείγματος λαχανικών, ακολουθούμενη από μια δεύτερη φάση όπου εμφανίζονται τα *Ln. citreum* και *Lb. brevis*, και από μια τελική φάση που χαρακτηρίζεται για την επικράτηση των *Lb. brevis* και *Lb. plantarum* (49). Η αυθόρμητη ζύμωση του kimchi με μη καθαρές πρώτες ύλες οδηγεί στην ανάπτυξη αρκετών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχει σαν αποτέλεσμα την ποικιλία στη γεύση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων kimchi.

Αν και η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών αναμενόταν ότι θα έπαιζε βασικό ρόλο στη βιομηχανική παραγωγή και τυποποίηση των ζυμούμενων λαχανικών, θα πρέπει να μελετηθούν προσεκτικά και άλλοι παράγοντες για την επιτυχημένη εφαρμογή των εναρκτήριων καλλιεργειών συμπεριλαμβάνοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, την ασφάλεια και τα οφέλη στην υγεία και στη διάρκεια ζωής του προϊόντος (51). Γενικά, ο μικροβιακός πληθυσμός που επικρατεί μεταξύ των ενδογενών κοινοτήτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων εμφανίζεται να περιλαμβάνει καλής προέλευσης εναρκτήριοις καλλιέργειες για τη ζύμωση λαχανικών (52). Σήμερα, οι πράσινες επιτραπέζιες ελιές, το λάχανο τουρσί, οι πίκλες και το kimchi είναι ζυμούμενα λαχανικά που παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα στην οποία η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών έχει εδραιωθεί (53, 54). Ορισμένα από τα πιο σημαντικά ζυμούμενα λαχανικά παγκοσμίως με τη βοήθεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων παγκοσμίως

φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Τα κυρίαρχα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων παραδοσιακά ζυμούμενων τροφίμων.

Ζυμούμενο τρόφιμο	Ά ύλη	Κυρίαρχο LAB είδος	Χώρα
Fu-tsai και suan-tsai	Μουστάρδα	<i>Pd. pentosaceus</i> , <i>Tetragenococcus halophilus</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. Paramesenteroides</i>	Ταϊβάν
Ελιές	Ελιά	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i>	Μεσόγειος
Khalpi	Αγγούρι	<i>Ln. fallax</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Ιμαλία
Λάχανο	Λάχανο	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>	Ευρώπη, Η.Π.Α.
Mesu	Βλαστοί μπαμπού	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>	Ιμαλία
Sunki	Φύλλα και βλαστοί κόκκινων γογγυλιών	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Ec. faecalis</i> , <i>Pd. Pentosaceus</i>	Ιαπωνία

Ζυμούμενα λαχανικά ανά τον κόσμο

Οι ελιές, το λάχανο τουρσί, το αγγούρι πίκλες, το kimchi και μερικοί χυμοί λαχανικών είναι μεταξύ των πιο διαδεδομένων ζυμούμενων λαχανικών που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Ωστόσο υπάρχουν και άλλα ζυμούμενα λαχανικά που είναι λιγότερο γνωστά στις δυτικές χώρες αλλά πιο δημοφιλή στην Ασία και στη περιοχή της Αφρικής (55, 56, 57).

Οι επιτραπέζιες ελιές αποκτώνται από τον καρπό των ελαιοδένδρων κοινό των Μεσογειακών χωρών όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Τουρκία και το Μαρόκο με ποικιλία στην επεξεργασία τους που εξαρτάται από τη γεωγραφική

περιοχή. Οι μέθοδοι επεξεργασίας των ελιών είναι τρεις. i) Οι πράσινες Ισπανικές ελιές οι οποίες επεξεργάζονται με NaOH (υδροξείδιο του νατρίου) και ύστερα ζυμώνονται, ii) Οι Ελληνικές ελιές που είναι φυσικά μαύρες και ζυμώνονται χωρίς να προηγηθεί επεξεργασία με NaOH, iii) Οι ελιές Καλιφόρνιας οι οποίες (ώριμες μαύρες ή πράσινες) δεν ζυμώνονται αλλά επεξεργάζονται με υδροξείδιο του νατρίου και μπορεί να υπόκεινται σε αερισμό για να προωθηθεί η οξείδωση της χρωστικής και να μετατραπεί το πράσινο χρώμα σε μαύρο. Στις Ελληνικές και Ισπανικές ελιές η ζύμωση οδηγείται από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (58) ενώ το διάλυμα άλμης αυξάνει τη διάρκεια ζωής και βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (59). Η αναγκαιότητα της επεξεργασίας των ελιών ξεκινά εξαιτίας της παρουσίας μιας πολυφαινόλης που ονομάζεται ελευρωπαΐνη η οποία συμβάλλει στη πικρή γεύση του καρπού, καθιστώντας τα μη καταναλώσιμα (60). Η βακτηριακή μικροχλωρίδα αποτελεί ένα κρίσιμο στοιχείο για την επιτυχία της ζύμωσης και στη γεύση του τελικού προϊόντος των επιτραπέζιων ελιών (61), με τα *Lb. plantarum*, *Lb. casei* και *Lb. pentosus* να είναι τα κύρια οξυγαλακτικά βακτήρια της διαδικασίας (62). Η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών στη ζύμωση είναι μια πρακτική που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία παραγωγής επιτραπέζιων ελιών. Τα κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης καλλιέργειας αποτελεί η παραγωγή οξέων και η αντοχή στη θερμοκρασία και στο αλάτι (63). Οι εναρκτήριες καλλιέργειες μειώνουν το κίνδυνο της αλλοίωσης του προϊόντος και προκαλούν ταχεία μείωση του pH της άλμης. Επιπρόσθετα συμβάλλουν στη προβλεψιμότητα της διαδικασίας ζύμωσης και βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (53, 60).

Η *Capparis spinosa* (κάππαρη) είναι ένας άγριος θάμνος που αναπτύσσεται σε ημιάνυδρες περιοχές και συνήθως στις Μεσογειακές χώρες. Η παραγωγή της βασίζεται στα άγρια παρά στα καλλιεργημένα φυτά. Για το λόγο αυτό το κόστος παραγωγής είναι δαπανηρό, και συν τοις άλλοις εξαρτάται από την εποχή. Η ζύμωση της κάππαρης σε άλμη είναι μια αυθόρμητη διαδικασία των οξυγαλακτικών βακτηρίων (64). Τα *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Pd. pentosaceus* και *Pd. acidilactici* είναι αντιπροσωπευτικά οξυγαλακτικά βακτήρια με το *Lb. plantarum* να είναι το επικρατούν είδος (65, 66).

Το ζυμούμενο *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο τουρσί - sauerkaut)

έχει τις ρίζες του στη βόρεια Ευρώπη και το όνομά του προέρχεται από τη γερμανική λέξη *kraut*, ωστόσο φαίνεται να έχει εισαχθεί από την Κίνα. Πράγματι, η οξυγαλακτική ζύμωση των λαχανικών ήταν πολύ κοινή πρακτική των ασιατικών χωρών. Το ζυμούμενο *Brassica oleracea* var. *capitata* προέρχεται από στεγνό και αλατισμένο *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο) το οποίο είναι τεμαχισμένο σε λεπτές λωρίδες και ζυμώνεται από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (67). Η διαδικασία της ζύμωσης περιλαμβάνει μια ετεροζυμωτική φάση, στην οποία εμφανίζονται τα λιγότερο ανθεκτικά σε όξινο περιβάλλον οξυγαλακτικά βακτήρια, η οποία ακολουθείται από μια ομοζυμωτική φάση η οποία κυριαρχείται από οξυγαλακτικά βακτήρια με αντοχή σε όξινο περιβάλλον όπως τα *Ln. mesenteroides*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* και *Pd. pentosaceus*. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη είναι τα πιο άφθονα ζυμούμενα σάκχαρα που βρίσκονται στο *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο), ακολουθούμενα από τη σουκρόζη η οποία αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 0.2% (68). Κατά την προετοιμασία του λάχανου προστίθενται διάφορα μπαχαρικά. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτος και η υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης οδηγούν στην αύξηση της οξύτητας του προϊόντος (69). η προσθήκη αλατιού προωθεί την εκχύλιση των φυτικών υγρών τα οποία με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (60). Το αποτέλεσμα της παραγωγής γαλακτικού και οξικού οξέος είναι η πτώση του pH και η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα που αντικαθιστά το οξυγόνο, με οξύνιση και αναερόβιες συνθήκες αποτρέποντας την ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (67).

Το ζυμούμενο *Cucumis sativus* (αγγούρι τουρσί) φτιάχνεται από ολόκληρους καρπούς του είδους *Cucumis sativus* τα οποία ζυμώνονται και επεξεργάζονται με διάφορα μπαχαρικά και εμβάπτιση σε άλμη (5-8%), συχνά οξινοσμένο με οξικό οξύ στο pH 4.5 ή με την προσθήκη σορβικού καλίου για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη ή η αλλοίωση από μύκητες (70). Η ζύμωση, η οποία διαρκεί πάνω από τέσσερις εβδομάδες εξαρτάται από τη θερμοκρασία, η οποία επηρεάζει θετικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και σταθεροποιεί το τελικό προϊόν, από τη μείωση του pH και από τη συγκέντρωση των ζυμούμενων σακχάρων. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανάπτυξης αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Στην αρχή της ζύμωσης κυριαρχεί ένας αερόβιος μικροβιακός πληθυσμός με χαμηλό πληθυσμό οξυγαλακτικών

βακτηρίων τα οποία δρουν τελευταία στη διαδικασία (60). Το *Lb. plantarum* είναι κυρίαρχο είδος σε όλα τα στάδια της ζύμωσης και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα *Lb. pentosus* και *Leuconostoc* spp. έχουν απομονωθεί από τη ζύμωση ενώ το *Pediococcus* spp. εμφανίζεται στο τέλος της φάσης (71, 72). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίζουν προστατευτικό ρόλο έναντι των μη επιθυμητών μικροοργανισμών μέσω της απελευθέρωσης βακτηριοσινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων (40). Με σκοπό να σχεδιαστεί η παραγωγή και να προβλεφθεί η ποιότητα, προτιμάται η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών στη βιομηχανία ζυμωμένων *Cucumis sativus* σε σχέση με την αυθόρμητη ζύμωση η οποία εκτελείται από την αυτόχθονη βακτηριακή μικροχλωρίδα (73).

Κάποια άλλα ζυμούμενα λαχανικά όπως το kimchi, gundruk, sinki και khalpi, όπως αναφέρονται από τους Swain et al. 2014 (74) παράγονται και καταναλώνονται κυρίως στην Ανατολή.

Το kimchi είναι ένα παραδοσιακό, ζυμούμενο κορεατικό τρόφιμο που παράγεται από αλατισμένο *Brassica oleracea* var. *capitata* (λάχανο), *Raphanus sativus* (ραπανάκι) και *Cucumis sativus* (αγγούρι), με την προσθήκη μπαχαρικών και άλλων συστατικών(75). Το kimchi θεωρείται ένα πολύ υγιεινό φαγητό εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας που έχει σε θρεπτικά στοιχεία (βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) τα οποία παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (76).

Η ζύμωση του kimchi λαμβάνει χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες και διεξάγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που παράγουν οργανικά οξέα και άλλα συστατικά όπως το διοξείδιο του άνθρακα, η μαννιτόλη, αιθανόλη, βακτηριοσίνες και λιπαρά οξέα που βελτιώνουν τη σταθερότητα και τα υγιεινά οφέλη του προϊόντος. Γενικά στα πρώτα στάδια της ζύμωσης του kimchi ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι περίπου στους 4-5 log CFU/g. Αερόβιοι μικροοργανισμοί εμφανίζονται στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Έπειτα αναλαμβάνουν αναερόβια βακτήρια και τα *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. και *Weissella* spp.. Το *Ln. mesenteroides* φαίνεται να είναι το είδος που επικρατεί κατά τη φάση ωρίμασης σε χαμηλές θερμοκρασίες ενώ το *Lb. plantarum* επικρατεί στην τελική φάση της ζύμωσης. Το *Lb. plantarum* μαζί με το *Lb. sakei* προκαλούν υπερωρίμαση του kimchi με επακόλουθη μείωση της ποιότητας του προϊόντος. Αυτό μπορεί επίσης να συμβεί από ζύμες που εμφανίζονται κυρίως

στο τελικό στάδιο της ζύμωσης του kimchi. Για να αποφευχθεί η μείωση της ποιότητας του kimchi και να επεκταθεί η διάρκεια ζωής του χρησιμοποιούνται εναρκτήριες καλλιέργειες των οποίων τα κριτήρια επιλογής έχουν προαναφερθεί (77).

Το gundruk είναι ένα ζυμούμενο προϊόν των Ιμαλαίων φτιαγμένο από φρέσκα φύλλα φυτών *Brassica rapa*, υποείδος *campestris*, ποικιλία *cuneifolia* (rayo-sag), *Brassica juncea* (ινδική μουστάρδα), *Brassica oleracea* var *botrytis* (κουνουπίδι). Τα φύλλα μαραίνονται, θρυμματίζονται και συμπιέζονται ελαφρώς και στη συνέχεια ζυμώνονται αυθόρμητα για περίπου 10 μέρες. Στο τέλος το προϊόν αποξηραίνεται για τέσσερις μέρες και μπορεί να αποθηκευτεί για δυο χρόνια. Τα αυτόχθονα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν κυρίως *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. casei subsp. Pseudopplantarum* και *Pd. pentosaceus*, ενώ ορισμένες ζύμες παρουσιάζονται στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Επειδή η μη ελεγχόμενη ζύμωση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του προϊόντος έχει προταθεί η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών (60, 78).

Το sinki είναι ένα άλλο εθνικό, ζυμούμενο φαγητό των Ιμαλαίων που αποτελείται από βολβούς του είδους *Raphanus sativus* (ραπανάκια). Συνήθως προετοιμάζεται κατά τη διάρκεια του χειμώνα όταν ο καιρός είναι λιγότερο υγρός και υπάρχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα πρώτων υλών (79). Η ζύμωση του sinki είναι μια ενδιαφέρουσα και ιδιαίτερη επεξεργασία βολβών από βολβούς του είδους *Raphanus sativus* (ραπανάκια).. Η ζύμωση διαρκεί 30 μέρες μετά από τις οποίες το sinki κόβεται και αποξηραίνεται στον ήλιο. Για το λόγο αυτό μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου (74). Το αποξηραμένο sinki μπορεί να αποθηκευτεί για πάνω από δυο χρόνια σε αναερόβιες συνθήκες. Από το sinki έχουν απομονωθεί τα *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei* και *Ln. fallax* (60).

Το khalpi είναι ένα ακόμη παραδοσιακό, ζυμούμενο φαγητό των Ιμαλαίων. Μετά τη συγκομιδή των καρπών του είδους *Cucumis sativus* (αγγούρι) κόβονται και αποξηραίνονται στον ήλιο για μερικές μέρες. Μετά τοποθετούνται σε ένα δοχείο από μπαμπού ερμητικά κλειστό χρησιμοποιώντας αποξηραμένα φύλλα και αφήνονται να ζυμωθούν για πέντε μέρες. Στα πρώτα στάδια της ζύμωσης σχηματίζονται ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια όπως τα *Ln. fallax*, *Pd. pentosaceus*, *Lb. brevis*, ενώ το *Lb. plantarum* επικρατεί όταν η ζύμωση είναι παρατεταμένη (60).

Αρκετοί ζυμούμενοι χυμοί λαχανικών προκύπτουν είτε από αυθόρμητη ζύμωση είτε με τον ενοφθαλμισμό εναρκτήριων καλλιεργειών σε παστεριωμένους χυμούς. Συνήθως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η θερμοκρασία φτάνει τους 25°C, ωστόσο χαμηλότερες θερμοκρασίες έχουν θετικό αποτέλεσμα στην ποιότητα του ποτού. Μια ταχεία μείωση του pH ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης. Γενικά το τελικό pH είναι μεταξύ 3.8 και 4.5 (80).

Θρεπτική αξία ζυμούμενων τροφίμων

Τα πολλαπλά οφέλη της οξυγαλακτικής ζύμωσης στη θρεπτική αξία των φρούτων και των λαχανικών έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πιθανώς τροποποιούν το επίπεδο και τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων διαμέσου του μεταβολισμού τους, ή της αλληλεπίδρασης τους με τη μικροχλωρίδα του εντέρου ή ακόμη και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Το εδώδιμο μέρος των φυτών μπορεί να περιέχει μια σειρά από στοιχεία που μπορούν να επέμβουν στην αφομοίωση των θρεπτικών στοιχείων από τον άνθρωπο ή ακόμη να δημιουργήσουν ανεπιθύμητα φυσιολογικά αποτελέσματα. Σε ό,τι αφορά τα συστατικά που χαρακτηρίζονται για την αντιθρεπτική δραστηριότητά τους προκαλούν προβληματισμό, και μόνο οι λεκτίνες συναντώνται στα φρούτα και τα λαχανικά. Ωστόσο, μόνο ορισμένες λεκτίνες από τα όσπρια και τα δημητριακά έχουν βρεθεί να έχουν τοξικές συνέπειες στον άνθρωπο και στα ζώα ύστερα από κατανάλωση. Άλλες, όπως από τομάτες, φακές, μπιζέλια και αλλού, δεν είναι τοξικές (81). Επειδή οι λεκτίνες είναι θερμοευαίσθητα μόρια, απομακρύνονται εύκολα εαν μαγειρευτούν ή υποστούν επεξεργασία με ατμό κατά τη διάρκεια της παραγωγής πριν ή μετά τη ζύμωση.

Το φολικό παράγεται από διάφορα φυλλώδη λαχανικά, δημητριακά, όσπρια και ορισμένους μικροοργανισμούς. Είναι βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής, με τα λαχανικά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα να είναι οι κύριες πηγές του. Ήταν μοιραίο, λοιπόν να μελετηθεί και κατά τη διάρκεια της οξυγαλακτικής ζύμωσης των λαχανικών. Σε μία έρευνα χρησιμοποίησαν εναρκτήριες καλλιέργειες, που ήταν σχεδιασμένες για εμπορική χρήση και για τη ζύμωση του γάλακτος, για να ζυμώσουν παντζάρια, λευκό λάχανο και ένα μείγμα

άλλων λαχανικών (82). Παρατηρήθηκε ότι οι εναρκτήριες καλλιέργειες που αποτελούνταν από *Lb. plantarum*, *Lc. lactis/cremoris* και *Leuconostoc* spp. οδηγούσαν, σχεδόν, στο διπλασιασμό της συγκέντρωσης του φολικού και κυρίως ως 5-μέθυλο-τετραϋδροφολικό οξύ το οποίο είναι σε ατόφια και βιοδιαθέσιμη μορφή. Επιπλέον, το *Propionobacterium freudenreichii* αναφέρθηκε ότι παράγει βιταμίνη B12. Αυτή η μελέτη τονίζει ότι η παραγωγή του φολικού είναι στέλεχο – εξαρτώμενη, όπως ήδη έχει φανεί από μελέτες στη ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων και στο προζύμι (83, 84, 85).

Οι πρώτες ύλες μπορεί να περιέχουν και κάποια άλλα στοιχεία με πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως τα φλαβονοειδή και τα γλυκοσινολικά για τα οποία υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με την τύχη τους κατά τη διάρκεια της οξυγαλακτικής ζύμωσης. Τα πρώτα είναι παράγωγα φαινολών και είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτά. Μια ποικιλία βιοχημικών λειτουργιών είναι συνδεδεμένη με αυτές, συμπεριλαμβάνοντας δράσεις ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα, τον καρκίνο, φλεγμονές και αλλεργίες (86, 87, 88, 89). Τα γλυκοσυνολικά είναι ομάδες θειούχων δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών που βρίσκονται σε φυτά της τάξης των *Capparales*, η οποία περιλαμβάνει την οικογένεια *Brassicaceae*, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται ευρέως σαν πρώτη ύλη για ζύμωση λαχανικών. Το κύριο προϊόν υδρόλυσης, τα ισοθειοκυανικά, έχει βρεθεί ότι δρουν προστατευτικά έναντι του καρκίνου, ειδικά στο αίμα, στο κόλον και στους πνεύμονες (90, 91).

Η επιλογή καθαρών καλλιεργειών είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η σύγχρονη αντίληψη των ιδανικών εναρκτήριων καλλιεργειών απαιτεί ότι παρέχουν την κατάλληλη οξίνιση, αλλά βελτιώνουν τη θρεπτική αξία του προϊόντος. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων διεξάγεται και η παραγωγή γαλακτικού οξέως σαν μείγμα οπτικών ισομερών L-(+) και D+(-). Το τελευταίο δεν μπορεί να μεταβολίζεται από τους ανθρώπους και υπερβολική εισαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ αλκάεων και οξέων στο αίμα (92). Επομένως είναι επιθυμητή η παραγωγή μόνο του πρώτου ισομερούς.

Η ιδέα των προβιοτικών ήταν το επίκεντρο επίμονων μελετών τις τελευταίες δεκαετίες. Έχουν προταθεί μερικές από τις ιδιότητες των προβιοτικών οι οποίες περιλαμβάνουν την ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι πιθανών

παθογόνων μικροοργανισμών και ειδικά την εισβολή των Gram-αρνητικών παθογόνων. Επίσης, περιλαμβάνουν ιδιότητες που είναι ωφέλιμες στον ξενιστή όπως είναι η τροποποίηση της απόκρισης της άμυνας του οργανισμού, μείωση της υπερχολιστερολαιμίας, πρόληψη των εντερικών και ουρογεννητικών μολύνσεων, αντικαρκινική δραστηριότητα, όπως επίσης προστασία έναντι των ταξιδιωτών, της βρεφικής διάρροιας, της διάρροιας προκαλούμενης από τα αντιβιοτικά και τις αλλεργίες (93-101). Μια ευρεία ποικιλία φρούτων και λαχανικών εξετάστηκαν για την καταλληλότητά τους σαν φορείς προβιοτικών βακτηρίων (102-108). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί η προβιοτική ικανότητα πολλών απομονώσεων από τα ζυμούμενα προϊόντα. Ωστόσο μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει εκτιμήσει την πραγματική ικανότητα του πιθανού προβιοτικού σαν μια λειτουργική ή επιπρόσθετη καλλιέργεια.

Οι επιτραπέζιες ελιές έχουν αναγνωριστεί ως κατάλληλο μέσο μικροοργανισμών με προβιοτικές ιδιότητες. Οι Lavermicocca et al. 2005 (109) μελέτησαν την επιβίωση στελεχών των *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Bifidobacterium bifidum* και *Bf. longum* σε επιτραπέζιες ελιές σε θερμοκρασία δωματίου. Η υψηλότερη επιβίωση παρατηρήθηκε για το *Lb. paracasei* το οποίο χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για την επιτυχημένη επαλήθευση των ελιών σαν φορείς βακτηριακών κυττάρων στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό. Το αποτέλεσμα του ίδιου στελέχους ως εναρκτήρια καλλιέργεια μελετήθηκε από τους De Beli et al. 2010 (110). Δημιουργούν, επιτυχημένα, αποικίες στην επιφάνεια των ξεπικρισμένων πράσινων ελιών της ποικιλίας Bella di Cerignola και επικρατούν των ιθαγενών πληθυσμών οξυγαλακτικών βακτηρίων κάτω από διαφορετικές συνθήκες άλμης όπως επίσης και θερμοκρασίες ζύμωσης. Η χρήση των πολυλειτουργικών *Lb. pentosus* σαν εναρκτήριες καλλιέργειες επιτραπέζιων ελιών ισπανικού τύπου ζύμωσης της ποικιλίας Manzanilla μελετήθηκε από τους Rodrigue-Gomez et al. 2013 (111). Αν και, τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυριαρχούν στη ζύμωση τα στελέχη του *Lb. pentosus* ανακτήθηκαν στο τέλος της ζύμωσης και ο πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* ήταν κατεσταλμένος. Σε επίπεδο στελέχους εμφανίζεται ευρεία ποικιλότητα, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ενοφθαλμισμός με συγκεκριμένο στέλεχος δεν μπορεί να εγγυηθεί την επικράτησή του. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν διεξαχθεί και από τους Randazzo et al. 2014 (112). Στη τελευταία μελέτη, τα στελέχη H25 και GG του *Lb.*

rhamnosus χρησιμοποιήθηκαν ως εναρκτήριες καλλιέργειες για τη ζύμωση των Giarraffa και Grosso di Spagna σύμφωνα με την παραδοσιακή σικελική μέθοδο και αναδείχθηκε η δυνατότητά τους να επιβιώνουν. Οι Blana et al. 2014 (113) διερεύνησαν την υπόθεση προβιοτικών στελεχών των *Lb. pentosus* και *Lb. plantarum* σαν εναρκτήριες καλλιέργειες ζύμωσης ισπανικού τύπου της ποικιλίας Χαλκιδική σε θερμοκρασία δωματίου σε άλμη 8 και 10% w/v NaCl. Το *Lb. pentosus* B281 εμφάνισε υψηλότερη αποίκιση στο τέλος της ζύμωσης και στα δυο επίπεδα άλμης, ενώ το στέλεχος του *Lb. plantarum* απέτυχε να αποικήσει την επιφάνεια των ελιών σε επίπεδο συγκέντρωσης άλμης 10% NaCl. Επιπλέον, το στέλεχος του *Lb. pentosus* επικράτησε έναντι του στελέχους του *Lb. plantarum* όταν ενοφθαλμίστηκαν σε συγκαλλιέργεια. Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν όταν οι ελιές υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 80 °C για 10 min με σκοπό να μειωθεί η ενδογενής μικροχλωρίδα, και επομένως θα διευκολυνόταν η επικράτηση των ενοφθαλμισμένων καλλιεργειών (114). Ακόμη το στέλεχος *Lb. plantarum* ήταν ικανό να αποικήσει την επιφάνεια των ελιών στην άλμη με συγκέντρωση 10% NaCl.

Το αποτέλεσμα του αποχρωματισμού και της ζύμωσης από ένα πιθανό προβιοτικό στέλεχος του *Lb. paracasei*, στα επίπεδα γλυκοζινόλης στο *Brassica oleracea* var. capitata (λάχανο) κατά τη διάρκεια της ζύμωσής του εξετάστηκε από τους Sarvan et al. 2013 (115). Αναφέρθηκε ότι το 35% της αρχικής περιεχόμενης γλυκοζινόλης παρέμεινε μετά από 71 ώρες ζύμωσης, ενώ την ίδια στιγμή ο πληθυσμός του στελέχους του *Lb. paracasei* αριθμούνταν στα 8.26 ± 1.2 log CFU/g. Επομένως, οι συγγραφείς σωστά τόνισαν τη δυνατότητα να παράξουν ένα λειτουργικό προϊόν πέρα από τη κοινή ζύμωση για το λάχανο.

Παρουσία του *E. coli* στα φρούτα και τα λαχανικά

Ένα σημαντικό ποσοστό τροφιμογενών παθογόνων μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει σε φρέσκα φρούτα, λαχανικά και βότανα θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Τα φρέσκα προϊόντα καταναλώνονται είτε νωπά, χωρίς να υποβάλλονται σε κάποια διαδικασία, ή έχοντας υποστεί μια ήπια διαδικασία που προκαλεί μικροβιακή μείωση. Ως εκ τούτου, η φύση της κατανάλωσης φρέσκων προϊόντων, μαζί με το μη αποστειρωμένο περιβάλλον παραγωγής τους και η έλλειψη ελέγχου των συνθηκών παραγωγής στο χωράφι εξηγούν το λόγο

γιατί φρέσκα και ήπιας επεξεργασίας προϊόντα μπορούν εύκολα να μολυνθούν με παθογόνα (116).

Ο *E. coli* είναι ένας μικροοργανισμός που μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος για πάνω από 20 μήνες στις ρίζες και στα φύλλα των φυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον τα φύλλα με μεγάλα επίπεδα αζώτου ή κατεστραμμένα φύλλα και φρούτα ευνοούν την επιβίωση του μικροοργανισμού (117). Ο *E. coli* O157:H7, για παράδειγμα, επιβιώνει σε δείγματα εδάφους καλλιεργημένου με το είδος *Lactuca sativa* (μαρούλι) και *Petroselinum crispum* (μαϊντανός) για 154 με 217 μέρες (118). Ανιχνεύεται, επίσης, σε ρίζες και φύλλα *Lactuca sativa* (μαρούλι) και *Petroselinum crispum* (μαϊντανός) μετά από 77 και 177 μέρες αντίστοιχα και ύστερα από μίανση του εδάφους μέσω του συστήματος άρδευσης ή με τη χρήση κομπόστ (compost) (119). Έχει βρεθεί ότι επιβιώνει πάνω από 14 μέρες σε τεμαχισμένο *Lactuca sativa* (μαρούλι), *Daucus carota* (καρότο) και *Cucumis sativus* (αγγούρι) στους 5°C και πολλαπλασιάζεται στους 12-21°C (120). Επομένως κακές αγροτικές και βιομηχανικές πρακτικές στη καλλιέργεια, συγκομιδή, αποθήκευση, μεταφορά και προετοιμασία προϊόντος έχουν ως αποτέλεσμα μόλυνση και επιδημίες που σχετίζονται με τα φρέσκα προϊόντα (121).

Επιδημικά επεισόδια οφειλόμενα στο παθογόνο *E. coli*

Ο *E. coli* είναι ένα βακτήριο ευρέως διαδεδομένο στη γαστρεντερική οδό του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Είναι κυρίως προαιρετικά αναερόβιο στο έντερο και αποτελεί μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας στη φυσιολογία ενός υγιούς ξενιστή. Αν και τα περισσότερα στελέχη *E. coli* είναι μη παθογόνα μπορεί να προκαλέσουν λοίμωξη στους ξενιστές σε ανοσοκαταστολή, ενώ υπάρχουν μερικά παθογόνα στελέχη *E. coli* που μπορεί να προκαλέσουν γαστρεντερικές λοιμώξεις στην υγεία των ανθρώπων, ακόμη και θάνατο.

Τα στελέχη του *E. coli* που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τη Shiga – τοξίνη ονομάζονται “κολοβακτηρίδια που παράγουν Shiga – τοξίνη” (Shigatoxigenic/ STEC). Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται και οι όροι “κολοβακτηρίδια που παράγουν Vero – τοξίνη” (Verotoxigenic/ VTEC) ή “εντεροαιμορραγικά κολοβακτηρίδια” (Enterotoxigen/ ETEC).

Το εντεροαιμορραγικό *E. coli* O157:H7 θεωρείται ως ένα από τα πιο

σημαντικά τροφιογενή παθογόνα. Το 1982, ο συγκεκριμένος ορότυπος χαρακτηρίστηκε ως παθογόνο του ανθρώπου και αιτία τροφιογενών ασθενειών, έπειτα από την πρόκληση δυο επιδημικών κρουσμάτων αιμορραγικής κολίτιδας συνδεόμενες με κατανάλωση hamburger (128). Σήμερα, έχει αναγνωριστεί ως μια σημαντική αιτία για βακτηριακή διάρροια. Η ελάχιστη δόση για μόλυνση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα και η ασθένεια μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική διάρροια χωρίς αίμα, αιμορραγική κολίτιδα, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο και θάνατο (129, 130). Παρ' όλα αυτά, οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν από τη μόλυνση μέσα σε 10 μέρες (131). Από το 2008, ο *E. coli* 104:H4 αναφέρθηκε επίσης να προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις στην Ε.Ε.. Η πιο σοβαρή επιδημία που προκλήθηκε από αυτό τον ορότυπο εμφανίστηκε το 2011, και συνδέθηκε με την κατανάλωση σπόρων με φύτρο. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος ορότυπος αναφέρεται σπάνια παγκοσμίως.

Τα βακτήρια μπορεί να μεταδίδονται στον άνθρωπο κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου φαγητού ή νερού. Μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων που συνδέονται με επιδημίες προκαλούμενες από τον *E. coli* περιλαμβάνουν μισοψημένο κιμά, νωπό γάλα, τυρί, βοδινό και μολυσμένα νωπά λαχανικά, φυλλώδη λαχανικά και χυμούς (131). Τα βοοειδή εμφανίζονται να είναι το κύριο μέσο της μετάδοσης στον άνθρωπο της πλειονότητας των επιδημιών που συνδέονται με λοιμώξεις του *E. coli*. Παρ' όλα αυτά, τα φρέσκα προϊόντα μπορεί επίσης να μολυνθούν με *E. coli* μέσω του νερού άρδευσης, με μολυσμένους σπόρους, έντομα, παράσιτα, άγρια και οικόσιτα ζώα και την κοπριά. Ως εκ τούτου τα φρέσκα προϊόντα είναι μια αναδυόμενη πηγή μόλυνσης με *E. coli* προκαλώντας σοβαρές επιδημίες που συνδέονται με την κατανάλωση φύτρων, φρέσκων φρουτών και λαχανικών, νωπές σαλάτες και απαστερίωτοι χυμοί. Οι ασθένειες στον άνθρωπο που προκαλούνται από τον *E. coli* συνδέονται κυρίως με την κατανάλωση μολυσμένου νερού και φαγητού. Ωστόσο, η επαφή από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι ακόμη ένας σημαντικός τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού μέσω της οδού στόματος – κοπράνων και μεταξύ των στενών επαφών (οικογένεια, φίλοι, κέντρα φροντίδας παιδιών κλπ) (131).

Επιδημικά επεισόδια οφειλόμενα στο παθογόνο *E. coli* O157:H7

στην Ασία

Η μεγαλύτερη καταγεγραμμένη επιδημία παγκοσμίως εμφανίστηκε το 1996 στην Ιαπωνία όπου η κατανάλωση άσπρων βολβών του είδους *Raphanus sativus* ήταν επιδημιολογικά συνδεδεμένη με ένα επιδημικό επεισόδιο προκαλούμενο από τον *E. coli* O157:H7. Από το Μάιο μέχρι τον Αύγουστο του 1996, καταγράφηκαν σχεδόν 10.000 περιπτώσεις λοιμώξεων στην Ιαπωνία. Η επιδημία ξεκίνησε 13 Ιουλίου, 1996. Η λοίμωξη ήταν συνδεδεμένη με τουλάχιστον 14 διαφορετικές περιπτώσεις εκ των οποίων οι περισσότερες αφορούσαν παιδιά σχολικής ηλικίας. Περισσότερα από 6.000 παιδιά του δημοτικού σχολείου μολύνθηκαν σε μια μεγάλη επιδημία που εμφανίστηκε στην πόλη Sakai του νομού Osaka. Ταυτόχρονα με αυτά τα κρούσματα εμφανίστηκαν κρούσματα σε ένα εργοστάσιο στο Kyoto, σχεδόν 50 km από την πόλη Sakai την ίδια περίοδο.

Το επιδημικό επεισόδιο που εμφανίστηκε στην πόλη Sakai του Osaka προσέβαλλε 6.309 παιδιά σχολικής ηλικίας και 92 ενήλικες από το προσωπικό 62 δημόσιων δημοτικών σχολείων, καθώς επίσης και 160 ανθρώπους που ήταν κυρίως μέλη της οικογένειας των παιδιών που είχαν νοσήσει. Από την 26 Αυγούστου 1996, 565 άνθρωποι νοσηλεύτηκαν, 101 διαγνώστηκαν με ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο και δυο κορίτσια, 10 και 12 χρονών πέθαναν. Στα περισσότερα δείγματα ασθενών ανιχνεύθηκε ο *E. coli* O157:H7 (132).

Στις 17 Ιουλίου 1996, σημειώθηκε η εμφάνιση ενός επιδημικού επεισοδίου *E. coli* O157:H7 ακολουθώντας το αντίστοιχο στην πόλη Sakai. Ένας άντρας 24 χρονών, εργαζόμενος σε εργοστάσιο, εμφάνισε διάρροια και νοσηλεύθηκε σε τοπική κλινική. Μια μέρα αργότερα ένας δεύτερος εργαζόμενος νοσηλεύθηκε σε κλινική με διάρροια. Και οι δυο ασθενείς εμφάνισαν διάρροια με αίμα και ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο. Στις 21 Ιουλίου 1996, ένας τρίτος εργαζόμενος πέθανε από ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο σχετιζόμενο με εγκεφαλοπάθεια. Δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν και από τους τρεις εργαζομένους έδειξαν ότι ο *E. coli* O157:H7 ήταν ο υπεύθυνος παράγοντας για την ασθένειά τους.

Κατά τη διάρκεια των διαλειμμάτων οι εργαζόμενοι μπορούσαν να καταναλώσουν οποιοδήποτε γεύμα παρέχονταν στην καφετέρια του εργοστασίου που λειτουργούσε από μια εξωτερική εταιρεία. Οι τρεις ασθενείς είχαν καταναλώσει γεύμα από τη συγκεκριμένη καφετέρια. Τελικά, 74 στους 3.155 εργαζομένους του εργοστασίου αναφέρθηκαν με γαστρεντερικά

συμπτώματα τον Ιούλιο και η μόνη κοινή έκθεση σε τροφή ήταν η καφετέρια του εργοστασίου.

Γι αυτό το λόγο, διεξήχθη έρευνα με σκοπό να προσδιοριστεί η πηγή της μόλυνσης. Από όλους τους 25 χειριστές τροφίμων και τους άρρωστους εργαζομένους πάρθηκε συνέντευξη για τα γαστρικά συμπτώματα και παρέδιδαν δείγματα κοπράνων για βακτηριολογική εξέταση. Σαράντα δυο περιπτώσεις ελέγχθηκαν κλινικά και πέντε επιβεβαιώθηκαν μέσω τεχνικών καλλιιεργειών. Έξι εργαζόμενοι είχαν μόνο γαστρικούς πόνους, πυρετό ή εξάντληση, πέντε ασθενείς ανέπτυξαν διάρροια με αίμα και 21 διάρροια εκτός της περιόδου της επιδημίας. Σαράντα πέντε στους σαράντα επτά εργαζομένους που ανέφεραν γαστρεντερικά συμπτώματα είχαν φάει στην καφετέρια του εργοστασίου από τις 8 έως τις 14 Ιουλίου, 1996. Η ηλικία των προσβεβλημένων εργαζομένων κυμαινόταν 18-61 με ένα μέσο όρο στα 30 χρόνια και το 83% από αυτούς ήταν άντρες.

Οι εγκαταστάσεις της κουζίνας της καφετέριας εξετάστηκαν από το τοπικό κέντρο δημόσιας υγείας στις 18 Ιουλίου 1996. Μια γυναίκα που μεταχειριζονταν τα τρόφιμα εμφάνισε διάρροια στις 17 Ιουλίου αλλά ο *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε από δείγμα κοπράνων της ούτε και από τα δείγματα κοπράνων των υπόλοιπων χειριστών.

Έτσι στις 26 Αυγούστου 1996, αναφέρθηκε ένα σύνολο των 9.578 περιπτώσεων μόλυνσης από *E. coli* O157:H7 στην Ιαπωνία προκαλώντας το θάνατο 11 ανθρώπων. Οι έρευνες έδειξαν ότι η μόλυνση στο εργοστάσιο στο Kyoto και στην πόλη Sakai συνδέονταν με την κατανάλωση βολβών του είδους *Raphanus sativus*. Οι βολβο σερβιρίονταν στην καφετέρια η οποία τα προμηθευόταν από ένα μόνο διανομέα ο οποίος παραλάμβανε βολβούς του είδους *Raphanus sativus* από τέσσερις διαφορετικούς αγρότες. Ο ένας από τους αγρότες παρήχε το εν λόγω προϊόν και στο δημοτικό σχολείο που αναφέρθηκαν τα κρούσματα. Μάλιστα, βρέθηκε ότι οι βολβοί που σερβιρίστηκαν στην καφετέρια του εργοστασίου και στο δημοτικό σχολείο στάλθηκαν την ίδια μέρα (9 Ιουλίου 1996) από τον καλλιεργητή (133). Αν και ο *E. coli* O157:H7 δεν απομονώθηκε από *Raphanus sativus* στην καφετέρια του εργοστασίου και στο δημοτικό σχολείο, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτά ήταν το μέσο για την εμφάνιση της επιδημίας.

Παρουσία της *Listeria monocytogenes* σε φρούτα και λαχανικά

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε νωπά φρούτα και λαχανικά είναι ένα θέμα που έχει διεγείρει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριάντα ετών. Έχουν γίνει πολλές έρευνες σε πολλές χώρες για να προσδιοριστεί η παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά τα προϊόντα.

Η *Listeria monocytogenes* έχει κατηγορηθεί ως υπεύθυνος παράγοντας για επιδημίες τροφιμογενούς λιστερίωσης. Συγκεκριμένα τα αναφερόμενα κρούσματα λιστερίωσης στη Βόρεια Αμερική και Ευρώπη είναι συχνά αντίθετα με την Αφρική, την Ασία και τη Νότια Αμερική όπου οι περιπτώσεις αναφοράς λιστερίωσης είναι σπάνιες (134). Μια εμφανής αύξηση των περιπτώσεων λιστερίωσης έχει καταγραφεί τα τελευταία 20 χρόνια, παρά το γεγονός ότι υπάρχει επίγνωση της λιστερίωσης και υπάρχουν βελτιωμένες τεχνικές που αυξάνουν τη διάγνωση. Οι περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης φαίνεται να είναι σποραδικές. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ένα ποσοστό αυτών των περιπτώσεων να οφείλεται στην ίδια μη αναγνωρισμένη κοινή πηγή (135). Αν και η λιστερίωση είναι σπάνια, η ασθένεια είναι πολύ σοβαρή καθώς μεγάλο ποσοστό των ασθενών χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης ή καταλήγουν σε θάνατο. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) το 2009, καταγράφηκαν 1645 περιπτώσεις λιστερίωσης – οι περιπτώσεις αυξήθηκαν κατά 19.1% σε σύγκριση με το 2008 – με 270 θανάτους ανθρώπων. Το 2010 ο αριθμός των περιπτώσεων λιστερίωσης παρέμεινε σχεδόν στα ίδια επίπεδα - καταγράφηκαν 1601 περιπτώσεις. Το 2011, καταγράφηκαν 1470 περιπτώσεις με βαθμό θνησιμότητας 12.7% (136-138). Σύμφωνα με το Wesley 2009 (139) οι Ηνωμένες Πολιτείες μετρούν περίπου 2500 περιπτώσεις λιστερίωσης, 2289 περιπτώσεις νοσηλείας σε νοσοκομείο και 449 περιπτώσεις θανάτου κάθε χρόνο με το βαθμό θνησιμότητας να κυμαίνεται στο 28% - ο μεγαλύτερος μεταξύ όλων των τροφιμογενών παθογόνων.

Τα επιδημικά κρούσματα της σαλάτας από *Brassica oleracea* var. *capitata* το 1981 στον Καναδά, τα οποία οδήγησαν στην αναγνώριση της λιστερίωσης ως

τροφιμογενούς ασθένειας του ανθρώπου, παρακίνησαν μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα. Ύστερα από αυτό, έγιναν έρευνες με σκοπό να βρεθεί η πραγματική πηγή της *L. monocytogenes* όταν εμφανίζεται μια τροφιμογενής λιστερίωση, ειδικά όταν πρόκειται για ενδονοσοκομειακά κρούσματα. Παρά τις βελτιωμένες τεχνικές και την τεχνολογική ανάπτυξη, η έρευνα των ενδονοσοκομειακών κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών έχει πολλές δυσκολίες. Μία από τις πιο σημαντικές είναι ότι τα τρόφιμα που καταναλώνονται από ασθενείς σπανίως καταγράφονται στις ιατρικές αναφορές. Επιπλέον, δεν υπάρχει κάποιος οδηγός που να αφορά την κατανάλωση έτοιμων-φαγητών-προς-κατανάλωση από ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς στο νοσοκομείο. Οι Cokes et al. 2011 (140), διενήργησαν μια έρευνα σε νοσοκομεία της Ν. Υόρκης για να περιγράψουν την πολιτική τους σχετικά με τους οδηγούς διαχείρισης επικινδυνότητας τροφιμογενών ασθενειών. Σύμφωνα με την έρευνα, το 57% των νοσοκομείων δεν διατηρούν αρχείο με το φαγητό που καταναλώνουν οι ασθενείς. Σύμφωνα με τις αναφορές των νοσοκομείων οι έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες σερβίρονταν σε ποσοστό 94%, 89% και 73% σε εγκύους, σε άτομα που λάμβαναν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε χημειοθεραπεία αντίστοιχα. Τέλος η παραπάνω έρευνα επιβεβαίωσε ότι συνήθως οι ασθενείς δεν ακολουθούν δίαιτα η οποία περιορίζει τρόφιμα που σχετίζονται με τη λιστερίωση, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης κρουσμάτων.

Επιδημικά επεισόδια λιστερίωσης σε φρούτα και λαχανικά

Αν και η *L. monocytogenes* έχει περιγραφεί ως παθογόνο του ανθρώπου κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1920 (λανθασμένα θεωρούνταν αιτία της λοιμώδους μονοπυρύνωσης), τα πρώτα καταγεγραμμένα κρούσματα σχετιζόμενα με το μικροοργανισμό ήταν το 1979, ενώ το πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα που συνδέει περιπτώσεις λιστερίωσης με κατανάλωση τροφίμου ήταν το 1981 (Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας Καναδά). Ήδη από το 1967, οι Blenden και Szatalowicz αναφέρουν (141) 731 περιπτώσεις λιστερίωσης στον άνθρωπο οι οποίες είχαν καταγραφεί μεταξύ 1933-1966, υποστηρίζοντας ότι τα φυτικά προϊόντα όπως το μαρούλι ή άλλα φρέσκα λαχανικά μολυσμένα με *L. monocytogenes* μπορεί να είναι υπεύθυνα για κάποιες από αυτές τις

περιπτώσεις.

Η τροφιμογενής λιστερίωση του ανθρώπου έχει συνδεθεί κυρίως με την κατανάλωση κοτόπουλου, βοδινού και γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών που αναφέρουν τις περιπτώσεις του *L. monocytogenes* στα έτοιμα προς κατανάλωση φρούτα και λαχανικά έχει αυξηθεί δραματικά τη τελευταία δεκαετία. Ένας από τους πιο σημαντικούς λόγους είναι ότι οι εξελίξεις στις αγροτικές πρακτικές, διαδικασίες, διανομή και στο μαρκετινγκ οδήγησαν στη παγκοσμιοποίηση της παροχής τροφίμων με τα παθογόνα να διασπείρονται σε μια ευρεία γεωγραφική περιοχή εισάγοντας σημαντικούς κινδύνους. Επιπλέον χάρη στην αύξηση της δημοτικότητάς τους – λόγω της τάσης των καταναλωτών προς την υγιεινή διατροφή – τα φρέσκα φρούτα και τα λαχανικά έχουν γίνει σημαντικοί φορείς για τις τροφιμογενείς ασθένειες (142). Από την άλλη πλευρά, η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στην επιφάνεια του εδάφους, σε σάπια φυτικά υπολείμματα στο έδαφος, στα κόπρανα ζώων, σε ποτάμια και κανάλια, στα λιπάσματα, πάνω στα φυτά και στα ζώα και είναι γνωστό ότι μπορεί να επιβιώσει σε φυτικά υλικά για 10 – 12 χρόνια (143) και στο έδαφος για πάνω από 295 μέρες (144). Επομένως τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να μολυνθούν εύκολα με παθογόνα ενώ αναπτύσσονται στο χωράφι ή στα θερμοκήπια ή κατά τη διάρκεια της συγκομιδής ή τη διαδικασία των προσυλλεκτικών χειρισμών (145). Ο *L. monocytogenes* είναι επίσης γνωστό ότι αναπτύσσεται σε ποικιλία λαχανικών, σε θερμοκρασίες ψύξης (146-148). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού σε συνδυασμό με την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών των καταναλωτών και την παγκοσμιοποίηση στην παροχή των τροφίμων ερμηνεύουν την αύξηση της συχνότητας των επιδημιολογικών κρουσμάτων που σχετίζονται με φρέσκα φρούτα και λαχανικά.

Επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης, Βοστώνη 1979

Το 1986 οι Ho et al. ανέφεραν ένα κρούσμα μόλυνσης *L. monocytogenes* στο οποίο ενεπλάκησαν 23 ασθενείς από οκτώ διαφορετικά νοσοκομεία της Βοστόνης το 1979. Τελικά πέντε από τους ασθενείς κατέληξαν. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς προσβλήθηκαν από ενδονοσοκομειακή μόλυνση και είχαν συμπτώματα στη γαστρεντερική οδό που ξεκίνησαν την ίδια χρονική περίοδο καθώς και πυρετό. Οι ασθενείς κατανάλωναν συχνά τόνο, σαλάτα με κοτόπουλο

και τυρί. Ωστόσο, τα μόνα κοινά τρόφιμα που σερβίρονταν με αυτά τα φαγητά ήταν το σέλινο, η τομάτα και το μαρούλι. Το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν ότι η κατανάλωση των συγκεκριμένων λαχανικών πιθανότατα προκάλεσε το κρούσμα λιστερίωσης (149).

Επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης, Τέξας 2010

Το 2012 οι Gaul et al. (150) ερεύνησαν το κρούσμα λιστερίωσης που διήρκεσε επτά μήνες και ενεπλάκησαν πέντε νοσοκομεία στο Τέξας. Προσδιορίστηκαν δέκα ασθενείς με το σχετικό κρούσμα. Οι ηλικίες κυμαίνονταν από 56 έως 93 χρονών, με μέση ηλικία τα 80 έτη. Εννέα από τους ασθενείς ζούσαν στο κέντρο του Τέξας και ένας στο Νότιο Τέξας. Εννιά από αυτούς νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο για 5 έως 23 ημέρες, ενώ ένας επισκέφτηκε τρία νοσοκομεία κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης της λιστερίωσης. Σε διάστημα τριών μηνών από τη συλλογή των πρώτων δεδομένων πέντε ασθενείς πέθαναν, κάτι που υποδηλώνει την παρουσία της *L. monocytogenes*. Η λιστερίωση φαίνεται να συνέβαλε στο θάνατο των δυο από τους αποθανόντες ασθενείς. Για τους υπόλοιπους τρεις η λιστερίωση ταυτοποιήθηκε στο πιστοποιητικό θανάτου ως άμεση ή έμμεση αιτία. Ο τελευταίος ασθενής προσδιορίστηκε τον Αύγουστο του 2010.

Μελετήθηκαν οι ιατρικές αναφορές των ασθενών και οι ασθενείς πέρασαν από συνέντευξη. Οι ιατρικές αναφορές δεν αναγνώρισαν καμία κοινή φαρμακευτική αγωγή, διαδικασία ή άλλη πιθανή έκθεση. Σύμφωνα με τους ασθενείς οι ιατρικές αναφορές - από τις οποίες ήταν διαθέσιμο μόνο ένα στατικό σιτηρέσιο βασισμένο σε μία δίαιτα (π.χ. για διαβητικούς, νεφροπαθείς κλπ.) - οι ασθενείς δεν περιορίστηκαν στο να καταναλώσουν τρόφιμα κοινώς συνδεδεμένα με τη λιστερίωση. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το ιατρικό ιστορικό των ασθενών, όλοι τους είχαν επισκεφτεί ή είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μέσα στο νοσοκομείο τις τελευταίες 70 ημέρες (ο μέγιστος χρόνος επώασης) πριν τη συλλογή δειγμάτων λιστερίωσης. Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν στην υπόθεση ότι όλοι οι ασθενείς απέκτησαν τη λιστερίωση από ένα τρόφιμο που παρέχεται σε πολλά νοσοκομεία. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε όταν μια έρευνα προσδιόρισε ότι τα πέντε νοσοκομεία όπου εμφανίστηκαν τα κρούσματα με τους αντίστοιχους ασθενείς χρησιμοποιούσαν τον ίδιο διανομέα για την

πλειονότητα των τροφίμων (κρέας, πουλερικά, έτοιμα και κατεψυγμένα φαγητά). Στο τέλος, εννέα από τις περιπτώσεις των κρουσμάτων συνδέονταν με τις εγκαταστάσεις παραγωγικής διαδικασίας. Οι ασθενείς είτε ως επισκέπτες είτε ως ασθενείς στα νοσοκομεία αυτά κατανάλωσαν σέλινο από τις εγκαταστάσεις τους κατά τη διάρκεια του χρόνου επώασης της λιστερίωσης. Τελικά, η εταιρεία έκλεισε προσωρινά το Φεβρουάριο 2011, και καμία άλλη περίπτωση δεν ανιχνεύθηκε ξανά.

Φαινολικά συστατικά στα φρούτα και στα λαχανικά

Τα φαινολικά συστατικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από το μονοπάτι της φωσφωρικής πεντόζης, του σικιμάτο (shikimate) και του πολυφαινυλοπροπανοειδούς στα φυτά (170). Αυτά τα συστατικά, που αποτελούν μια από τις περισσότερο εμφανιζόμενες ομάδες φυτοχημικών, θεωρούνται μορφολογικά και φυσιολογικά πολύ σημαντικές στα φυτά. Επίσης, παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή, παρέχοντας προστασία έναντι παθογόνων και αρπακτικών (171), εκτός του ότι συμβάλλουν στο χρώμα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φρούτων και των λαχανικών (172).

Τα φαινολικά στοιχεία εκθέτουν μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιαλλεργικές, αντιαθηρογόνες, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (173-177).

Τα φαινολικά στοιχεία συνδέονται με οφέλη στην υγεία, καταναλώνοντας σημαντικές ποσότητες φρούτων και λαχανικών (178, 179). Τα οφέλη των φαινολικών στοιχείων συνδέονται με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (180). Τα φαινολικά στοιχεία θα μπορούσαν να είναι ο κύριος παράγοντας των αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων των τροφίμων (179), και θα μπορούσαν επομένως να είναι μια φυσική πηγή αντιοξειδωτικών.

Υπάρχει ευρεία ποικιλία ολικών περιεχόμενων φαινολικών μεταξύ των διαφόρων φρούτων και λαχανικών ή ακόμη και για τα ίδια φρούτα ή λαχανικά όπως αναφέρεται από διαφορετικούς συγγραφείς (188). Οι διαφορές αυτές προκύπτουν από την πολυπλοκότητα της ομάδας και των μεθόδων εκχύλισης και ανάλυσης (171, 181). Για παράδειγμα, τα φαινολικά στοιχεία που υπάρχουν στα

φρούτα υπάρχουν ταυτόχρονα σε δυο μορφές, ελεύθερα και συνδεδεμένα (κυρίως ως β-γλυκοσίδια), αλλά στην τελευταία μορφή εξαιρούνται από την ανάλυση και έτσι η ολική ποσότητα των φαινολικών συχνά υποτιμάται (182). Εκτός από τα φαινολικά που περιέχονται στα φυτά τα τρόφιμα εξαρτώνται από μια σειρά εσωτερικών (γένος, είδος, ποικιλία) και εξωτερικών (αγρονομικών, περιβαλλοντικών, αποθήκευσης, χειρισμών) παραγόντων (183, 184). Έρευνες έχουν δείξει ότι οργανικώς καλλιεργημένες φράουλες έχουν υψηλότερα ποσοστά φαινολικών στοιχείων απ' ό,τι εκείνα που καλλιεργούνται συμβατικά (185), ενώ σε άλλη έρευνα δεν μπορούσε να γίνει συσχέτιση (186). Η επεξεργασία και η αποθήκευση μπορεί να έχουν διαφορετικό αντίκτυπο σε διαφορετικά φαινολικά στοιχεία όπως φαίνεται στην επεξεργασία του βατόμουρου όπου η μυρικετίνη (myricetin) και η kaempferol ήταν πιο επιρρεπείς να χαθούν σε σχέση με τη κερκετίνη (quercetin) (187).

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες που αποδεικνύουν τη δράση των φαινολικών έναντι του *E. coli* και της *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τους Zaidi et al. 2015 τα φαινολικά στοιχεία που υπάρχουν στη μέντα (*Mentha piperita* και *Mentha spicata*) φαίνεται να έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι μιας σειράς βακτηρίων και μυκήτων. Ανάμεσα σε αυτά τα μικρόβια βρίσκεται και ο μικροοργανισμός *E. coli* (189). Ακόμη τα φαινολικά στοιχεία των φυτών του γένους *Thymus* παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *Listeria innocua* και άλλων μικροβίων (190). Οι Shakurfow et al 2015 απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση του κρεμμυδιού και του σκόρδου έναντι της *Listeria monocytogenes* (191).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 κατά την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* σε άλμη με αρχική συγκέντρωση NaCl 5% (3.2% μετά την εξισορρόπηση) παρουσία βλαστών/φύλλων (*Mentha spicata*, *Thymus citriodorus*) και βολβών (*Allium sativum*) αρωματικών φυτών σε θερμοκρασία 20°C. Για το σκοπό αυτό η ζύμωση των βολβών *Raphanus sativus* έγινε δυο φορές. Σε κάθε ζύμωση έγινε ενοφθαλμισμός των παθογόνων μικροοργανισμών με διαφορετικό ύψος ενοφθαλμίσματος. Στη συνέχεια καταγράφηκε η πορεία της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων μικροοργανισμών και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών/μυκήτων, εντεροβακτηρίων, εντερόκοκκων και ψευδομονάδων. Με τον τρόπο αυτό αποκτήθηκε στο τέλος μια πλήρη εικόνα της πορείας του μικροβιακού πληθυσμού της αυθόρμητης ζύμωσης. Επίσης καταγράφηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, δηλαδή το pH, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα και τα ολικά φαινολικά στοιχεία. Το pH και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα συνδέονται με την πορεία της ζύμωσης ενώ για τα ολικά φαινολικά έγινε μια προσπάθεια συσχέτισής τους με την εξέλιξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Στο τέλος έγινε ταυτοποίηση για την ύπαρξη του μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ανανέωση καλλιεργείων

Για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν απαραίτητη η ανανέωση των καλλιεργείων *Listeria monocytogenes* (LQC 15257) και *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 13127) από αποθηκευμένες καλλιέργειες. Τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα στους -20 °C σε Brain Heart Infusion broth (Biolife) που περιείχε 20% γλυκερόλη (Merck, Darmstadt, Germany). Ο σκοπός της διαδικασίας ήταν να ανακτήσουν τα κύτταρα των παθογόνων μικροοργανισμών τη ζωτικότητά τους και να καταστούν ικανά για ανάπτυξη. Το στέλεχος *Listeria monocytogenes* (LQC 15257) προέρχεται από τη συλλογή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γ.Π.Α.. Κατά την πρώτη ανανέωση, μεταφέρθηκαν 40-50μL εμβολίου σε πλαστικό δοχείο τύπου falcon που περιείχε 4-5 mL Brain Heart Infusion broth (B.H.I. broth) και επωάστηκαν για 24 h στους 37°C. Ο κάθε μικροοργανισμός μπήκε σε διαφορετικό δοχείο.

Μετά το πέρας των 24 h έγινε ο μακροσκοπικός έλεγχος καθαρότητας των καλλιεργείων. Σκοπός αυτού του βήματος ήταν να ελεγχθεί ότι οι καλλιέργειες περιέχουν μόνο τον επιθυμητό μικροοργανισμό. Έτσι, από τα δοχεία falcon της προηγούμενης μέρας και με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου έγινε μεταφορά των καλλιεργείων σε B.H.I. agar με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης. Επιπλέον, η *Listeria monocytogenes* μεταφέρθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό ονόματι PALCAM το οποίο είναι εκλεκτικό για το γένος *Listeria spp.* ενώ ο *Escherichia coli* O157:H7 μεταφέρθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό ονόματι Fluorocult το οποίο είναι εκλεκτικό για το συγκεκριμένο είδος. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 24 h. Την επόμενη μέρα ελέγχθηκε μακροσκοπικά η καθαρότητα των καλλιεργείων στο στερεοσκόπιο. Δηλαδή, ελέγχθηκε το εάν οι αποικίες που σχηματίστηκαν είχαν όλες την ίδια μορφολογία. Επίσης για τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν εξετάστηκε εάν οι σχηματιζόμενες αποικίες είχαν την αναμενόμενη μορφολογία σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα οι αποικίες της *Listeria monocytogenes* έπρεπε να είναι θαμπές με σκούρο γκρι χρώμα και να περιβάλλονται από μαύρη halo, ενώ οι αποικίες του *Escherichia coli* O157:H7 έπρεπε να είναι πράσινες στιλπνές και στρογγυλές. Στη

συνέχεια, με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου και από μεμονωμένες αποικίες μεταφέρθηκαν τα παθογόνα σε νέα δοχεία falcon με B.H.I. broth και επωάστηκαν για 24 h στους 37 °C. Μετά τις 24 h έγιναν διαδοχικές αραιώσεις για να ελεγχθεί η ποσότητα των κυττάρων που υπήρχαν στα δοχεία falcon. Μία μέρα πριν την έναρξη του πειράματος μεταφέρθηκαν 20 μL παθογόνου σε νέα δοχεία falcon με B.H.I. broth και επωάστηκαν στους 37°C για 24 h ώστε να ετοιμαστεί το ενοφθάλμισμα που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα.

Περιγραφή του πειράματος

Η μέθοδος της παρούσας μελέτης περιελάμβανε την αυθόρμητη ζύμωση βολβών *Raphanus sativus* σε άλμη, δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Σε κάθε ζύμωση υπήρχαν τέσσερα γυάλινα δοχεία ζύμωσης. Το κάθε δοχείο περιείχε 700 g βολβών του είδους *Raphanus sativus* τεμαχισμένα στο ήμισυ, 1300 mL άλμη 5%, 13 g αρωματικού παράγοντα, το ενοφθάλμισμα και ηλιέλαιο. Ο αρωματικός παράγοντας ήταν διαφορετικός για κάθε δοχείο και αποτελούνταν από βλαστούς, φύλλα ή βολβούς αρωματικών φυτών. Τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *Mentha spicata* (μέντα), το *Thymus citriodorus* (λεμονοθύμαρο) και το *Allium sativum* (σκόρδο), ενώ ένα δοχείο δεν είχε κανένα αρωματικό παράγοντα.

Το ενοφθάλμισμα αποτελείτο από 800 μL *E. coli* O157:H7 σε υγρό θρεπτικό μέσο (B.H.I. broth) και 800 μL *L. monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό μέσο (B.H.I. broth). Το ενοφθάλμισμα προήλθε από μια καλλιέργεια 16-18 h (overnight). Σε δοκιμή προηγούμενων ημερών για καλλιέργεια 16-18 h είχε υπολογιστεί ότι σε ένα mL καλλιέργειας υπήρχαν κύτταρα της τάξης του 10^9 . Επομένως θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος σε κύτταρα λιστέριας ήταν της τάξης του 10^9 . Παρομοίως με τη *L. monocytogenes*, το ενοφθάλμισμα του *E. coli* O157:H7 προέκυψε από μία καλλιέργεια 16-18 h αλλά ο αναμενόμενος αριθμός κυττάρων *E. coli* O157:H7 ανά mL καλλιέργειας ήταν της τάξης του 10^8 .

Η παρασκευή της άλμης έγινε με προσθήκη 65 g NaCl σε 1300 mL νερό βρύσης. Η προσθήκη του ηλιελαίου έγινε σε τέτοια ποσότητα ώστε οι βολβοί να είναι βυθισμένοι καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες.

Η δεύτερη ζύμωση ξεκίνησε δεκαπέντε μέρες μετά από την πρώτη. Όπως στην πρώτη ζύμωση έτσι και σε αυτή υπήρχαν τέσσερα γυάλινα δοχεία ζύμωσης που περιείχαν βολβούς του είδους *Raphanus sativus*, άλμη 5%, ενοφθάλμισμα, έναν αρωματικό παράγοντα και ηλιέλαιο. Οι αρωματικοί παράγοντες και η ποσότητά τους παρέμειναν ίδια. Επίσης παρέμεινε ίδια η συγκέντρωση της άλμης και η χρήση του ηλιελαίου. Η διαφορά ήταν η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος. Το ενοφθάλμισμα προήλθε από υγρή καλλιέργεια 16-18 h *Listeria monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 σε B.H.I. broth. Στη συνέχεια 100 μL από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε δυο δοκιμαστικούς σωλήνες (ένα για κάθε καλλιέργεια) που περιείχαν 9 mL Ringer με σκοπό να αραιωθούν κατά 100 φορές. Από το αραιωμένο ενοφθάλμισμα μεταφέρθηκαν 800 μL σε κάθε βάζο. Κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

Δειγματοληψία

Η πρώτη δειγματοληψία έγινε την ημέρα που άρχισε η ζύμωση (0 d) ώστε να υπάρχει μία αρχική εικόνα για το φορτίο του ενοφθαλμίσματος και για τη μικροβιολογική κατάσταση των βολβών του είδους *Raphanus sativus*. Κατά τη διαδικασία αυτή με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας μεταφέρονταν περίπου 8 mL σε αποστειρωμένο πλαστικό δοχείο των 10 mL για τις μικροβιολογικές αναλύσεις και άλλα 10 mL σε δεύτερο πλαστικό δοχείο των 10 mL για τη μέτρηση pH και οξύτητας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0, 1, 3, 6, 9, 13, 16, 20 και 27.

Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις περιελάμβαναν τον έλεγχο της πορείας ανάπτυξης/θανάτωσης συγκεκριμένων κατηγοριών μικροοργανισμών και του ενοφθαλμίσματος με τη κλασσική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου ενός προϊόντος αποτελεί η απαρίθμηση των αποικιών (colony count) που σχηματίζονται σε ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υλικό. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και σχηματίζει μια ορατή αποικία. Τα αποτελέσματα της εκτίμησης του μικροβιακού

πληθυσμού εκφράζονται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units- Cfu) ανά g ή mL δείγματος.

Αυτή η παραδοχή δεν είναι απόλυτα σωστή διότι τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και έτσι δεν αναπτύσσονται όλα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μερικά μικρόβια λόγω θρεπτικών ελλείψεων του υποστρώματος, δυσμενών συνθηκών επώασης ή αντιμικροβιακών ουσιών (είτε είναι παρούσες στο υπόστρωμα είτε παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς) δεν σχηματίζουν ορατές αποικίες. Επιπλέον μία αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μικροβιακό κύτταρο. Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων το δείγμα ομογενοποιείται όσο γίνεται καλύτερα για το διασκορπισμό των μικροβιακών κυττάρων. Έπειτα χρησιμοποιούνται διαφορετικά υποστρώματα και διαφορετικές συνθήκες επώασης, ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (αερόβια, μεσόφιλα, ψυχρότροφα, κλπ) του δείγματος.

Σε κάθε δειγματοληψία οι μικροοργανισμοί που εξετάζονταν ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα εντεροβακτήρια, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα, οι ψευδομονάδες, οι ζύμες και μύκητες, οι εντερόκοκκοι, η *L. monocytogenes* και ο *E. coli* O157:H7. Για την κάθε κατηγορία μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε επιλεκτικό υλικό που ευνοεί την ανάπτυξή του και κατατίθενται στον Πίνακα 3. Εξαίρεση αποτελεί το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την *Listeria monocytogenes*. Ονομάζεται PALCAM και είναι επιλεκτικό υλικό για το γένος *Listeria* όχι όμως για το είδος *Listeria monocytogenes*. Ανάλογα με τη μέρα δειγματοληψίας και τις προηγούμενες μετρήσεις γινόντουσαν οι κατάλληλες αραιώσεις με μεταφορά 1 mL από την προηγούμενη στην επόμενη αραιώση. Στη συνέχεια 100 μL μεταφέρονταν από την επιθυμητή αραιώση στο τρυβλίο με το θρεπτικό υπόστρωμα για επίστρωση. Για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, τα εντεροβακτήρια και τα οξυγαλακτικά βακτήρια ακολουθούνταν η μέθοδος της ενσωμάτωσης. Δηλαδή 1 mL από την επιθυμητή αραιώση εμβολιαζόταν σε άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη του θρεπτικού υλικού. Όλη η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και του εμβολιασμού των τρυβλίων γινόταν κοντά στο λύχνο Bunsen.

Πίνακας 3: Θρεπτικά υλικά και συνθήκες επώασης των υπό εξέταση μικροοργανισμών.

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό υλικό	Μέθοδος	Θερμ/σία επώασης	Χρόνος επώασης
Οξυγαλακτικά βακτήρια	M.R.S.	ενσωμάτωση	30	2 μέρες
Εντεροβακτήρια	V.R.B.G.	ενσωμάτωση	37	1 μέρα
Ολική μεσόφιλη χλωρίδα	P.C.A.	ενσωμάτωση	30	2 μέρες
Ψευδομονάδες	C.F.C.	επίστρωση	25	2 μέρες
Ζύμες-μύκητες	R.B.C.	επίστρωση	25	2-5 μέρες
Εντερόκοκκοι	K.A.A.	επίστρωση	37	2 μέρες
<i>L. monocytogenes</i>	PALCAM	επίστρωση	37	2 μέρες
<i>E. coli</i> O157:H7	Fluorocult	επίστρωση	37	2 μέρες

Ύστερα από τον ενοφθαλμισμό των τρυβλίων ακολουθούσε επώαση στις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και για ορισμένο χρονικό διάστημα σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας των θρεπτικών υποστρωμάτων.

Επειδή ο σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 μετά τις πρώτες μικροβιολογικές αναλύσεις που δεν ανιχνεύονταν η παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών γινόταν εμπλουτισμός ώστε να διαπιστωθεί η πλήρης απουσία των μικροβίων. Είναι γνωστό ότι όταν στις μικροβιολογικές αναλύσεις απουσιάζει από τα τρυβλία ο μικροοργανισμός που μελετάται σημαίνει ότι υπάρχουν λιγότερα από 10 κύτταρα στο ένα mL με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμα. Το μέσο εμπλουτισμού για την περίπτωση της *Listeria monocytogenes* ήταν αρχικά το Half Fraser (LabM, UK), στο οποίο προστέθηκε Ferric Ammonium Citrate Supplement (LabM, UK). Η επώαση έγινε στους 30 oC για 24 h. Στη συνέχεια 1 mL από το Half Fraser μεταφέρθηκε σε Full Fraser (LabM, UK) και επώαστηκε για 24 h στους 37 oC. Για τον έλεγχο της παρουσίας του μικροβίου έγινε επιφανειακή γραμμική επίστρωση (streaking) σε τρυβλία με PALCAM τα οποία επώαστηκαν για 48 h στους 37 oC. Για τον εμπλουτισμό του *E. coli* O157:H7 χρησιμοποιήθηκε ως μέσο το Modified TSB (Biolife, Italy) στο οποίο προστέθηκε το αντιβιοτικό Novobiocin. Η επώαση έγινε στους 41 oC για 18 h.

Στη συνέχεια ακολούθησε επιφανειακή γραμμική επίστρωση (steaking) σε τρυβλία με Fluorocult τα οποία επωάστηκαν για 48 h στους 37°C.

Έλεγχος πορείας αυθόρμητης ζύμωσης

Για τον έλεγχο της πορείας της αυθόρμητης ζύμωσης σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγμα για τον έλεγχο του pH και της οξύτητας. Επιπλέον στο τέλος της ζύμωσης έγινε μοριακή ταυτοποίηση σε αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων για την ύπαρξη του *Lactobacillus plantarum*, ο οποίος αποτελεί δείκτη επιτυχημένης ζύμωσης.

Μέτρηση pH και οξύτητας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν ξεχωριστό δείγμα για τη μέτρηση του pH και της οξύτητας της άλμης. Οι μετρήσεις αυτές γινόντουσαν με τη βοήθεια του ψηφιακού πεχαμέτρου WTW, pH 526 (Weilheim, Γερμανία).

Η αρχή της μεθόδου για τη μέτρηση pH αναφέρεται στο γεγονός ότι ορισμένα ηλεκτρόδια όταν βυθιστούν μέσα σε διάλυμα με H^+ εμφανίζουν ηλεκτρερρεγτική δύναμη (ΗΕΔ) με ορισμένη σταθερή τιμή, που εξαρτάται από την ενεργότητα των H^+ του διαλύματος. Τέτοιο ηλεκτρόδιο είναι και το ηλεκτρόδιο υάλου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη.

Αρχικά γινόταν μέτρηση του pH και στη συνέχεια το δείγμα μεταφερόταν σε πλαστικό δοχείο (ουροσυλλέκτη) για τη μέτρηση της οξύτητας. Κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (40, 49) τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι μικροοργανισμοί που αναμένεται να επικρατήσουν. Επειδή τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι η κατηγορία μικροοργανισμού που επικρατεί θεωρείται ότι και ανάμεσα στα διάφορα οξέα που παράγονται κατά την αυθόρμητη ζύμωση κυριαρχεί το γαλακτικό οξύ λόγω της δραστηριότητάς τους. Έτσι, ως οξύτητα της άλμης ορίστηκαν τα γραμμάρια γαλακτικού οξέος σε 100 γραμμάρια άλμης. Μετά τη μεταφορά του δείγματος στο δοχείο προστίθεντο απιονισμένο νερό ώστε το ηλεκτρόδιο να μπορεί να εμβαπτιστεί στο δείγμα. Στη συνέχεια προστίθεντο καυστικό νάτριο ($NaOH$) 0,1N μέχρι το pH του δείγματος να γίνει 8,5.

Ταυτοποίηση του *Lactobacillus plantarum*

Στο τέλος κάθε ζύμωσης από τα τρυβλία των μικροβιολογικών αναλύσεων που αναπτύχθηκαν αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονώθηκαν ορισμένες από αυτές με σκοπό να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη του *Lactobacillus plantarum* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Για το λόγο αυτό μεταφέρθηκαν αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων, από κάθε εφαρμογή (χωρίς αρωματικό παράγοντα, μέντα, λεμονοθύμαρο, σκόρδο), σε tubes με MRS broth. Σε κάθε tube μπήκε μία αποικία και η επώαση έγινε στους 30°C για 2 μέρες. Ταυτόχρονα σε MRS broth μπήκε καθαρή αποικία *Lactobacillus plantarum* για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας στην ταυτοποίηση.

Ο *Lactobacillus plantarum* που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο DSMZ 20174 από τη συλλογή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γ.Π.Α.. Ο μικροοργανισμός ήταν αποθηκευμένος στους -20 °C σε MRS broth (Biolife) και περιείχε 20% γλυκερόλη (Merck, Darmstadt, Germany). Επομένως, πριν τη χρήση έγινε ανανέωση της καλλιέργειας σε MRS broth (Biolife) και επώαση για 24 h στους 37 °C.

Μετά την επώαση των αποικιών ξεκίνησε η εξαγωγή του DNA ακολουθώντας την τροποποιημένη ενζυματική μέθοδο σύμφωνα με τους Ercolini et al. (2001) με τα εξής βήματα:

- Φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας στις 14000 rpm για 5 min στους 4°C
- Απόχυση του υπερκείμενου
- Επαναιώρηση και έκπλυση του ιζήματος (pellet) με προσθήκη 2-3 mL Ringer
- Σπάσιμο κυττάρων με χρήση υπερήχων για 2.5min, στα 50 W, 1:1
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min στους 4°C
- Επαναιώρηση ιζήματος σε 0.5 mL σε ρυθμιστικό διάλυμα
- Προσθήκη 50 µL 10% διαλύματος SDS
- Επώαση στους 65 °C για 30 min
- Προσθήκη 0.2 mL οξικού καλίου (5M) και ήπια ανάδευση
- Παραμονή στον πάγο για 30 min

- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min στους 4°C
- Το υπερκείμενο κατακρημνίζεται με 800 μL ισοπροπανόλη
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min στους 4°C
- Έκπλυση με 300 μL αιθανόλης 70% (δύο φορές)
- Στέγνωμα του pellet και επαναιώρηση σε 50 μL αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού.

Έπειτα τα δείγματα μπήκαν στο μηχάνημα ProFlex PCR System By life technologies applied biosystems για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Πίνακας 4: Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών για τη ταυτοποίηση του *L. plantarum*.

Περιοχή πολυμερισμού	Κατεύθυνση	Ζεύγη εκκινητών
Μεταξύ του 16S και 23S rDNA	F	GCTGGATCACCTCCTTTC
	R	ATGAGGTATTCAACTTATG

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την *in vitro* αντιγραφή του DNA με τη μέθοδο PCR είναι οι εκκινητές (primers), η DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης. Τους εκκινητές αποτελούν δύο μικρά μόρια ολιγονουκλετιδίων καθένα από τα οποία έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των 2 αντίπαράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη, γιατί το ένζυμο DNA πολυμεράση δεν είναι ικανό να συνθέσει εκ νέου καινούργια αλυσίδα DNA. Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA *in vivo* και *in vitro*. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική *Taq*- DNA πολυμεράση (*Taq* πολυμεράση), που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*). Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια

(dATP, dCTP, dGTP και dTTP) είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Προμηθεύουν τα μονονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των αφετηριών. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3-8,9 στους 20 °C), MgCl₂, KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Τα συστατικά αυτά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής.

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια: (α) Αποδιάταξη DNA, στην οποία η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιατάσσεται, (β) υβριδοποίηση των εκκινητών, που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο τους και (γ) επιμήκυνση της αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές. Στο τέλος του κάθε κύκλου (ο καθένας αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια), η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30–50 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Το πρόγραμμα των θερμικών κύκλων κατά την PCR φαίνεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή.

Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή			
Επαναλήψεις	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Αποτέλεσμα
-	94	5	Ενεργοποίηση της πολυμεράσης
	94	1	Αποδιάταξη του DNA
30	50	1	Υβριδισμός εκκινητών
	72	1,5	Επιμήκυνση αλυσίδας
-	72	5	

Τα θραύσματα του DNA διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1.5% gel

αγαρόζης σε 1.0x Tris acetate EDTA (TAE) στα 100 V για 1.5 h, οπτικοποιήθηκε με χρώση σε βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε με τη χρήση GelDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Μέτρηση φαινολικών

Για να μετρηθούν τα φαινολικά στοιχεία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του δείγματος από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Από κάθε βάζο λαμβάνονταν περίπου 1.5 mL δείγματος από την άλμη και ακολουθούσαν τα βήματα της μεθόδου:

- Φυγοκέντρηση 1.5 mL άλμης στις 12000 rpm για 10 min.
- Μεταφορά 50 μL από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθήκη 450 μL νερό, 2.5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ανάδευση στο (vortex).
- Επώαση στο σκοτάδι για 5 min.
- Προσθήκη 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 και ανάδευση στο (vortex).
- Επώαση στο σκοτάδι για 1.5 h με ταυτόχρονη ανάδευση στο vortex ανά μισή ώρα.
- Μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm.

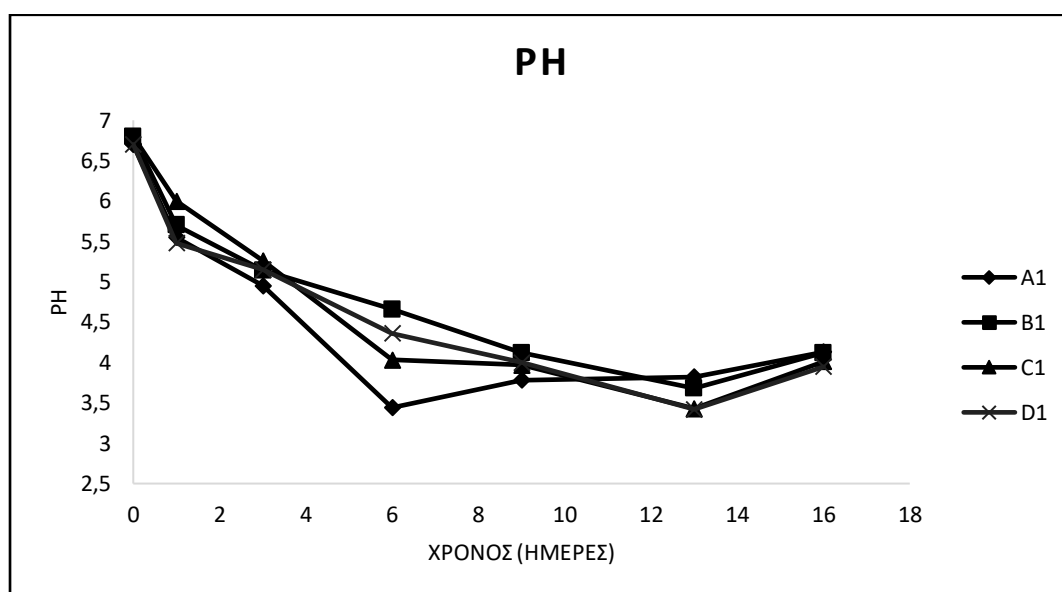
Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η επίδραση της παρουσίας των αρωματικών παραγόντων και των βολβών σκόρδου στην εξέλιξη των παθογόνων ενοφθαλμισμάτων και των δυο επιπέδων αλλά και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των εντεροβακτηρίων, των εντεροκόκκων, των ζυμών/μυκήτων, των ψευδομονάδων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων αξιολογήθηκε με τη βοήθεια της Ανάλυσης Διασποράς μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA).

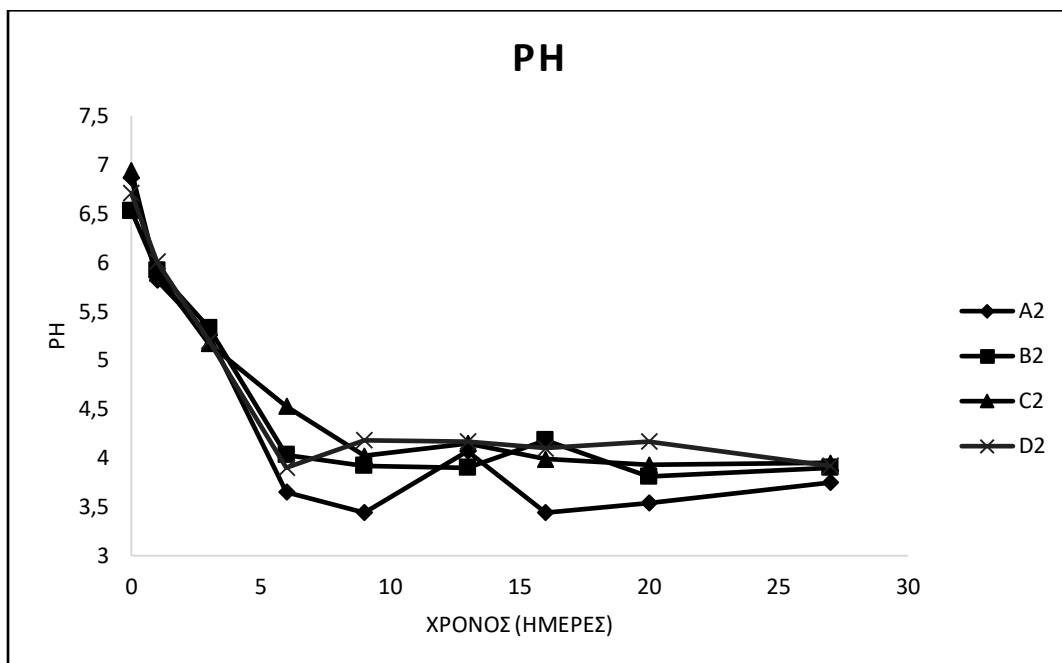
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτελέσματα pH – ολική ογκομετρούμενη οξύτητα

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης σχεδόν όλοι οι υδατάνθρακες μετατρέπονται σε οξέα (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ κλπ.) με αποτέλεσμα να μειώνεται η τιμή του pH και να δημιουργούνται δυσμενείς συνθήκες για την επιβίωση των gram αρνητικών βακτηρίων (192).

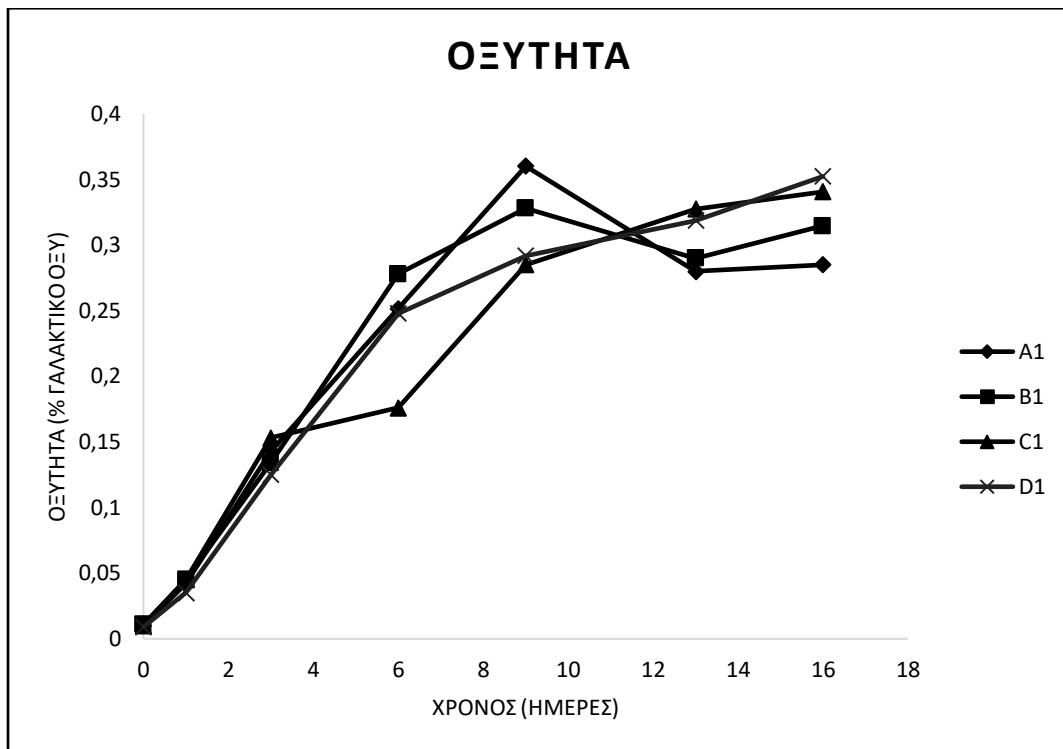


Διάγραμμα 1: Διάγραμμα μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1).

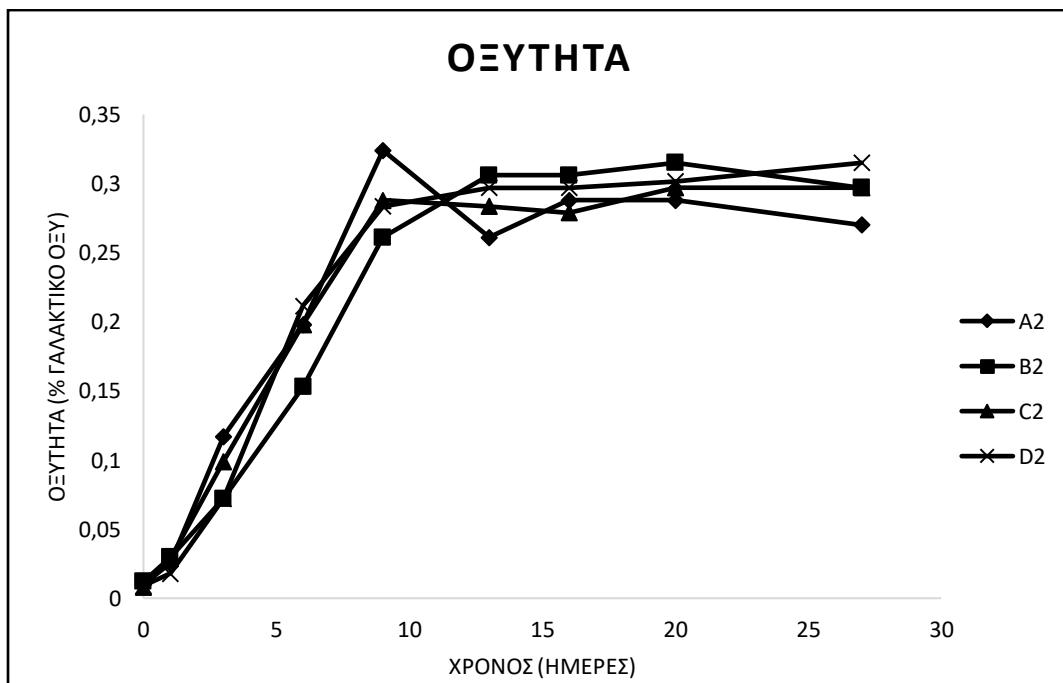


Διάγραμμα 2: Διάγραμμα μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της 2^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2).

Παρατηρώντας τα Διαγράμματα 1 και 2 της μεταβολής του pH κατά τη διάρκεια των δυο ζυμώσεων φαίνεται η αναμενόμενη μείωσή του. Μάλιστα, φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, στην αρχή της αυθόρμητης ζύμωσης το pH έχει τιμή 6.5 - 7 και την 6^η ημέρα η τιμή του pH είναι 3.5 - 5 όπου και σταθεροποιείται. Ταυτόχρονα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια τις 6 πρώτες μέρες των ζυμώσεων αυξάνουν τον πληθυσμό τους ο οποίος στη συνέχεια σταθεροποιείται. Η αναλογία αυτή είναι λογικό να υπάρχει καθώς η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι αυτή που προκαλεί τη μείωση του pH. Ακόμη, συγκρίνοντας το pH των διαφορετικών επεμβάσεων δεν βλέπουμε κάποια σημαντική διαφορά. Άρα, οι αρωματικοί παράγοντες πιθανόν δεν επηρέασαν την εξέλιξη του pH.



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της οξύτητας της άλμης κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1).

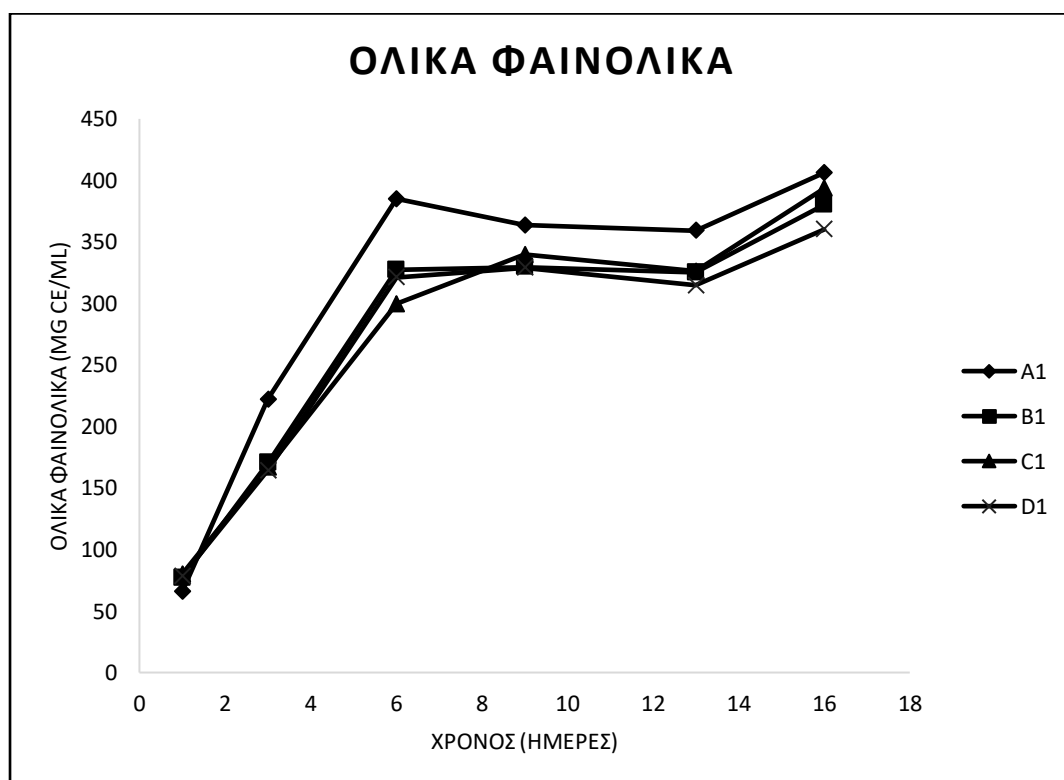


Διάγραμμα 4: Μεταβολή της οξύτητας της άλμης κατά τη διάρκεια της 2^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2).

Σε ό,τι αφορά την οξύτητα της άλμης βλέποντας τα Διαγράμματα 3 και 4 φαίνεται ότι αυξάνεται μέχρι την 9^η ημέρα (0.25-0.35%) και στη συνέχεια σταθεροποιείται. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα καθώς η παραγωγή οξέων συνδέεται με την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επομένως, όσο τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται παράγεται γαλακτικό οξύ και επομένως η οξύτητα αυξάνεται.

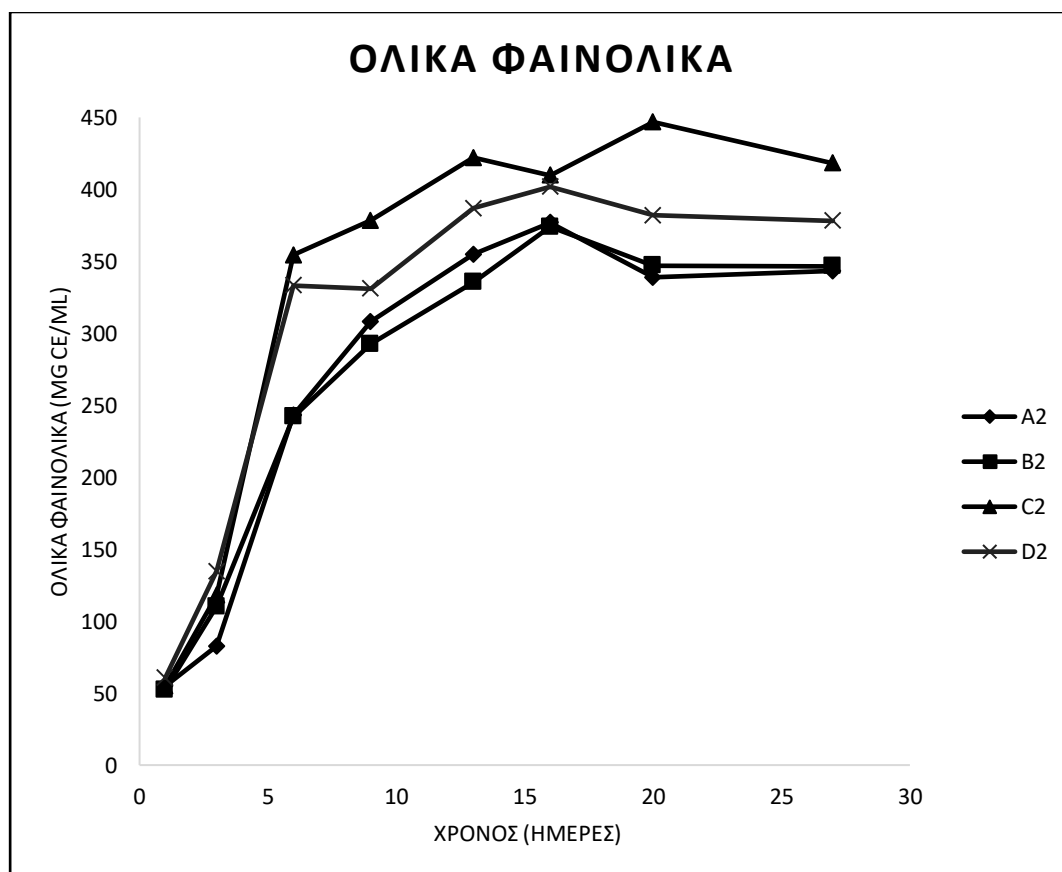
Μεταξύ των επεμβάσεων δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά, οπότε η εφαρμογή των αρωματικών παραγόντων μάλλον δεν επηρεάζει την οξύτητα. Επιπλέον, οι διαφορές αυτές δικαιολογούνται καθώς η ζύμωση έγινε αυθόρμητα.

Αποτελέσματα ολικών φαινολικών



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα μεταβολής των ολικών φαινολικών στην άλμη σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1).

Σε όλες τις περιπτώσεις, μέσα σε έξι ημέρες παρατηρείται μια εντυπωσιακή αύξηση των φαινολικών συστατικών, η οποία συνεχίζει μέχρι την 16^η ημέρα, με διαφορετικό ρυθμό. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο στην άλμη την 16^η ημέρα προσδιορίστηκε στις τιμές 406, 380, 393 και 360 $\mu\text{g CE} / \text{mL}$ άλμης για τις περιπτώσεις A1, B1, C1 και D1, αντίστοιχα (Πίνακας Ι, Παράρτημα).



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα μεταβολής των ολικών φαινολικών στην άλμη σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της 2^{ης} αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2).

Η εκχύλιση των φαινολικών είναι εντυπωσιακή στις πρώτες έξι ημέρες, ενώ σταδιακά η ποσότητά τους αυξάνεται μέχρι και την 16^η ημέρα, στις περιπτώσεις A2, B2 και D2, ενώ μέχρι και την 20^η ημέρα στην περίπτωση C2. Σύμφωνα με τον Πίνακα II του Παρατήματος τη μεγαλύτερη τιμή φαινολικών τη λαμβάνουμε για την περίπτωση A2 στα 377 $\mu\text{g CE} / \text{mL}$ άλμης (16^η), για την B2 στα 374 $\mu\text{g CE} / \text{mL}$ άλμης (16^η), για την C2 στα 447 $\mu\text{g CE} / \text{mL}$ άλμης (20^η) και για την D2 στα 402 $\mu\text{g CE} / \text{mL}$ άλμης (16^η). Την 27^η ημέρα παρατηρείται μείωση στο φαινολικό περιεχόμενο σ' όλες τις περιπτώσεις, σε σχέση πάντα με τη

μέγιστη τιμή φαινολικών που έχει προσδιοριστεί στη χρονική περίοδο που μελετήθηκε.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα και των δυο ζυμώσεων φαίνεται ότι κατά τη 2^η ζύμωση, με βάσει τα αποτελέσματα προσδιορισμού των ολικών φαινολικών στην άλμη, διακρίνεται η περίπτωση C2, ακολουθεί η περίπτωση D2, και τέλος η A1 με τη B1. Στη 1^η ζύμωση δε φαίνεται να διαφοροποιούνται ουσιαστικά οι τιμές των φαινολικών συστατικών στην άλμη, στις περιπτώσεις A1, B1 και C1, ενώ στην περίπτωση D1 προσδιορίστηκαν μικρότερες τιμές. Στις περιπτώσεις C1 και D1 υπάρχουν διαφορές στην ποσότητα των φαινολικών συστατικών που προσδιορίστηκαν μεταξύ των ζυμώσεων 1 και 2 και μάλιστα οι απόλυτες τιμές των φαινολικών είναι μικρότερες στην περίπτωση 1. Στην περίπτωση βέβαια C2 η εκχύλιση συνεχίζεται και μετά τη 16^η ημέρα στη 2^η ζύμωση, γι' αυτό και μετρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές, ενώ στην 1^η ζύμωση δε μετρήσαμε μετά τη 16^η ημέρα. Η μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών στην άλμη στην περίπτωση C2 μπορεί να αποδοθεί και στο φαινολικό περιεχόμενο του φυτικού υλικού.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες οι βολβοί από *Raphanus sativus* είναι πηγή διαφόρων πολυφαινολών και κυρίως φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών (206, 207). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι το εκχύλισμα από τις ρίζες του είδους *Raphanus sativus* στο νερό είναι πλούσιο σε κατεχίνες και σιναπικό οξύ (207) ενώ σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η άλμη από βολβούς του είδους *Raphanus sativus* είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα (όπως σιναπικό, σαλικιλικό, φερουλικό, κουμαρικό κ.α.) και σε φλαβονοειδή (όπως παράγωγα καμφερόλης και ανθοκυανίνες) (208). Επιπλέον, η μέντα και το λεμονοθύμαρο έχει αναφερθεί ότι αποτελούν και εκείνα πηγή φαινολικών στοιχείων (209) σε αντίθεση με το σκόρδο το οποίο είναι γνωστό περισσότερο για τις πτητικές όργανο θειικές ενώσεις παρά για τα φαινολικά (210).

Στη περίπτωση της 1^{ης} ζύμωσης οι διαφορές των φαινολικών μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων με τους αρωματικούς παράγοντες δεν είναι σημαντική. Στη περίπτωση της 2^{ης} ζύμωσης η διαφορά των τιμών των φαινολικών πιθανώς οφείλεται στο χρόνο διάρκειας της ζύμωσης (27 ημέρες).

Μικροβιολογικά αποτελέσματα

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο σύμφωνα με το πρόγραμμα δειγματοληψίας κάθε φορά που λαμβανόταν δείγμα γίνονταν κλασσικές μικροβιολογικές αναλύσεις για να ελεγχθεί η εξέλιξη των παθογόνων μικροοργανισμών και της αυτόχθονης μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια των δυο αυθόρμητων ζυμώσεων.

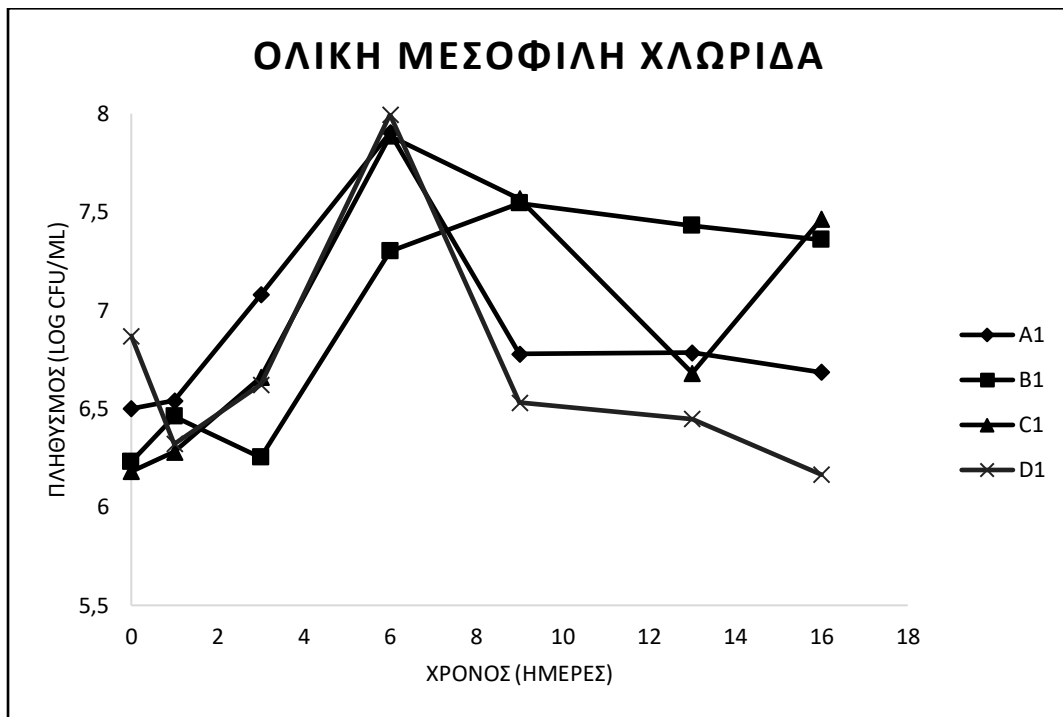


Εικόνα 2:Φωτογραφία των δοχείων της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (Α μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B), λεμονοθύμαρου (C) και βολβών σκόρδου (D).



Εικόνα 3:Φωτογραφία των δοχείων της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (Α μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (Β), λεμονοθύμαρου (C) και βολβών σκόρδου (D).

Σε κάθε ζύμωση (1^η και 2^η) υπήρχαν τέσσερα δοχεία ζύμωσης. Το ένα δεν είχε αρωματικό παράγοντα, μάρτυρας (Α), το επόμενο είχε βλαστούς και φύλλα *Mentha spicata* (Β), μέντα, άλλο ένα που περιείχε βλαστούς και φύλλα *Thymus citriodorus* (C),λεμονοθύμαρο, και ένα τελευταίο που περιείχε βολβούς *Allium sativum* (D), σκόρδο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων εξηγούνται παρακάτω.



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα μεταβολής του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

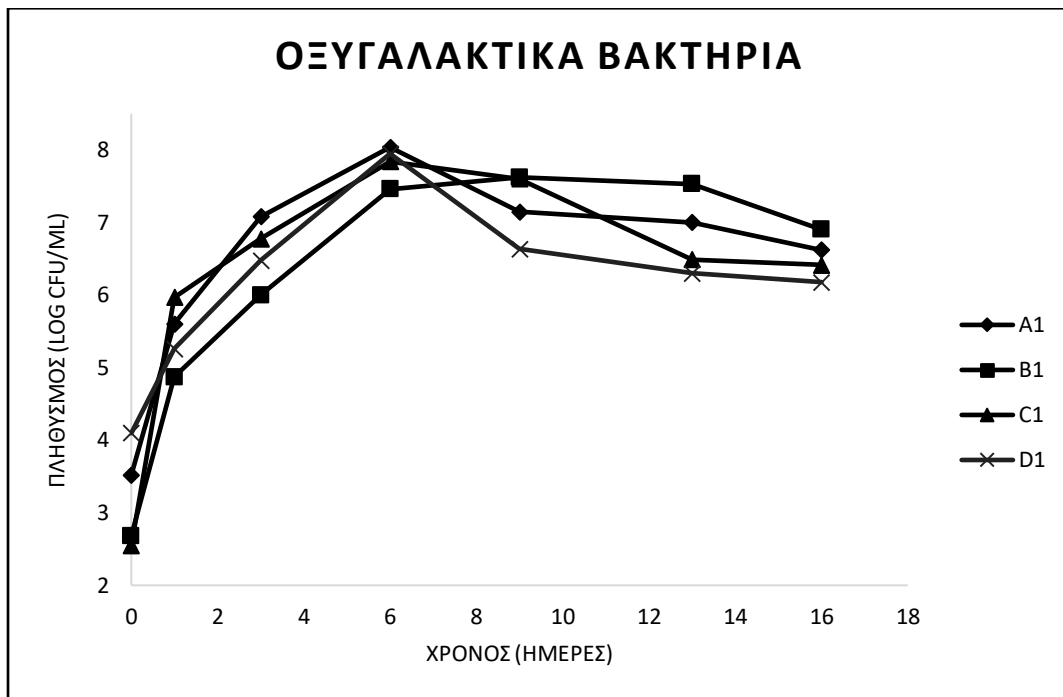


Διάγραμμα 8: Διάγραμμα μεταβολής του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

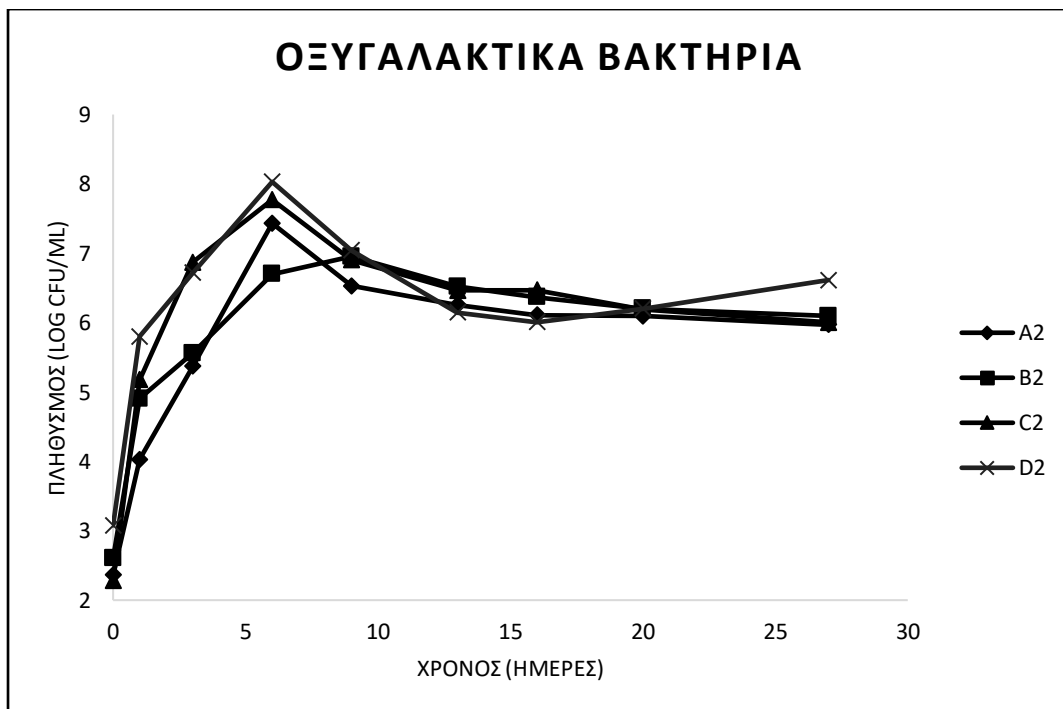
Όπως φαίνεται από τα Διαγράμματα 7 και 8 σε όλα τα δοχεία και των δυο ζυμώσεων ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) ακολουθεί μια ομοιόμορφη πορεία μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων και των διαφορετικών ζυμώσεων. Στην αρχή της ζύμωσης ο πληθυσμός κυμαίνεται στους 6-7 log CFU/mL έχοντας μια μικρή τάση αύξησης. Την 6^η ημέρα ο πληθυσμός παίρνει τη μέγιστη τιμή, δηλαδή τους 6.5-8 log CFU/mL και στη συνέχεια ακολουθεί έναν ελαφρώς πτωτικό ρυθμό για την πρώτη ζύμωση ενώ στη 2^η ζύμωση ο πληθυσμός επανέρχεται, σχεδόν, στα αρχικά επίπεδα.

Κοιτάζοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων από τον Πίνακα III του Παραρτήματος φαίνεται καθαρά η συμπεριφορά των μικροοργανισμών. Ο πληθυσμός Ο.Μ.Χ. της 1^{ης} ζύμωσης ξεκινά περίπου στους 6.5 log CFU/mL. Μέχρι και την 6^η ημέρα αυξάνεται αγγίζοντας τους 7.9 log CFU/mL ενώ στη συνέχεια ελαττώνεται. Για το μάρτυρα και την επέμβαση με το σκόρδο την τελευταία μέρα δειγματοληψίας ο πληθυσμός μειώνεται στους 6.7 log CFU/mL και στους 6.1 log CFU/mL αντίστοιχα. Η επέμβαση με το λεμονοθύμαρο μετά την 6^η ημέρα παρουσιάζει τη μικρότερη μείωση πληθυσμού σε σχέση με τις προηγούμενες δυο επεμβάσεις και ανάμεσα στη 13^η και 16^η ημέρα διαπιστώνεται αύξηση του πληθυσμού. Από την άλλη, ο πληθυσμός της επέμβασης με τη μέντα αυξάνει μέχρι και την 9^η ημέρα στους 7.50 log CFU/mL και ακολουθείται από μικρή βαθμιαία μείωση τις επόμενες δύο ημέρες 13 και 16 σε 7.43 και 7.36 log CFU/mL αντίστοιχα.

Στη διάρκεια της 2^{ης} ζύμωσης οι μικροοργανισμοί Ο.Μ.Χ. ακολουθούν παρόμοια πορεία με τη 1^η ζύμωση με μια μικρή διαφοροποίηση. Ο αρχικός πληθυσμός βρίσκεται σε μεγαλύτερα επίπεδα από τη 1^η ζύμωση, περίπου στους 6.80 log CFU/mL, και αυξάνεται μέχρι τη 3^η ημέρα όπου σε όλες τις επεμβάσεις παρουσιάζεται μείωση του πληθυσμού. Στη συνέχεια την 6^η ημέρα αυξάνεται και από την 9^η ημέρα και μετά μειώνεται. Σε αυτή τη ζύμωση εξαίρεση αποτελεί ο πληθυσμός της επέμβασης με σκόρδο ο οποίος από τη 13^η ημέρα και μετά παρουσιάζει μια μικρή αύξηση.



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα της εξέλιξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

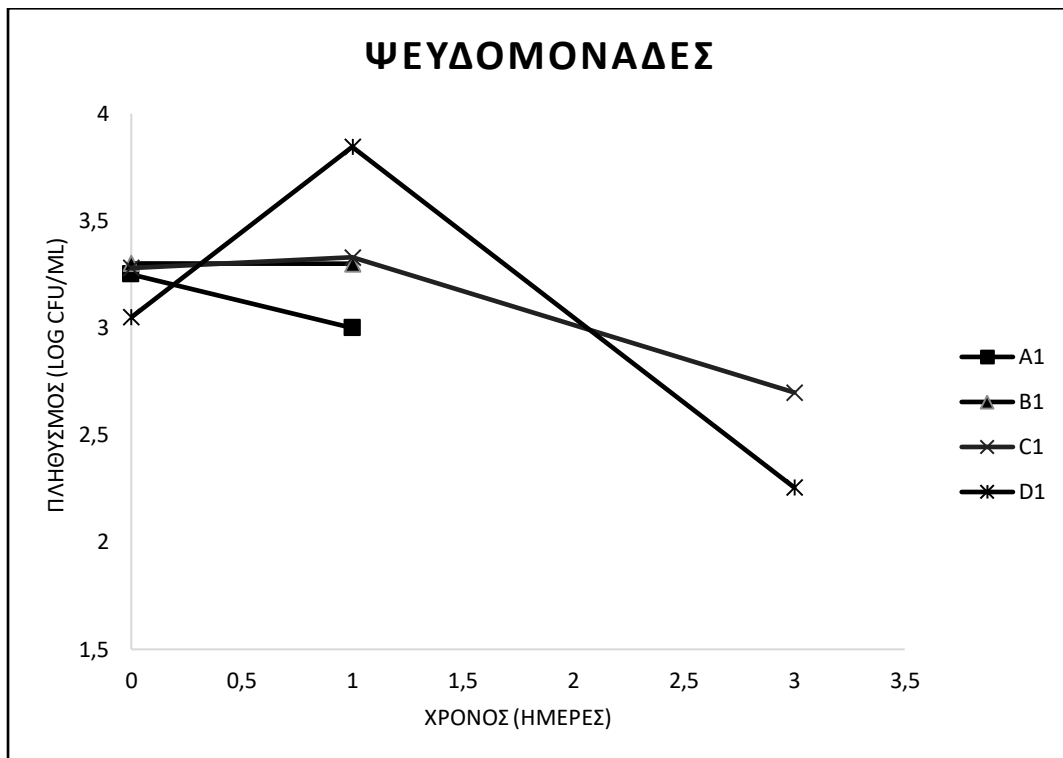


Διάγραμμα 10: Διάγραμμα της εξέλιξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

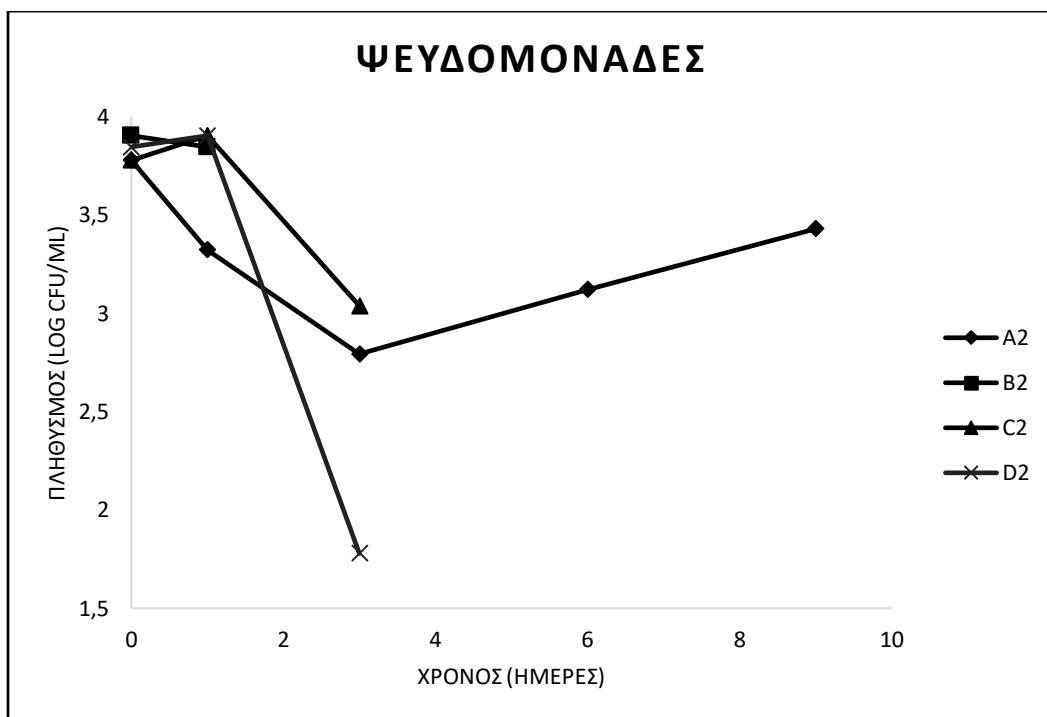
Στα Διαγράμματα 9 και 10 με την μεταβολή πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται για ακόμη μια φορά να υπάρχει ομοιομορφία μεταξύ των επεμβάσεων και των ζυμώσεων. Ο πληθυσμός τους αρχικά βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα της τάξης των 2-4 log CFU/mL και αυξάνουν μέχρι την 6^η ημέρα φτάνοντας τους 7-8 log CFU/mL. Στη συνέχεια μειώνεται κατά 1 log CFU/mL και διατηρείται σε αυτό το επίπεδο μέχρι το τέλος των ζυμώσεων.

Κατά τη 1^η ζύμωση, και σύμφωνα με τον Πίνακα IV του Παραρτήματος, ο αρχικός πληθυσμός είναι περίπου 3 log CFU/mL και αυξάνει μέχρι την 6^η ημέρα. Την 6^η ημέρα η τιμή έχει φτάσει τους 8.04 log CFU/mL για το μάρτυρα, 7.46 log CFU/mL για το δοχείο με μέντα, 7.84 log CFU/mL για το δοχείο με λεμονοθύμαρο και 7.95 log CFU/mL για το δοχείο με το σκόρδο. Από την 9^η ημέρα και μετά ο πληθυσμός για όλες τις επεμβάσεις, εκτός από την επέμβαση με τη μέντα, μειώνεται με μικρό ρυθμό μέχρι τη 16^η ημέρα. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων της επέμβασης με τη μέντα συνεχίζει να αυξάνει μέχρι την 9^η ημέρα και μετά και αυτός μειώνεται με μικρό ρυθμό. Έτσι στο τέλος ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων για το μάρτυρα είναι 6.62 log CFU/mL, την επέμβαση με μέντα 6.90 log CFU/mL, την επέμβαση με λεμονοθύμαρο 6.41 log CFU/mL και την επέμβαση με σκόρδο 6.18 log CFU/mL.

Στη 2^η ζύμωση τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν σχεδόν ίδια συμπεριφορά. Ο αρχικός πληθυσμός τους είναι σε χαμηλότερα επίπεδα γύρω τους 2.50 log CFU/mL αλλά όπως με πριν αυξάνει μέχρι την 6^η ημέρα για όλες τις επεμβάσεις εκτός από την επέμβαση με μέντα που συνεχίζει μέχρι την 9^η ημέρα. Στη συνέχεια σε όλες τις περιπτώσεις μειώνεται μέχρι την 27^η μέρα με μικρό ρυθμό και φτάνει τα 5.97 log CFU/mL για το μάρτυρα, 6.10 log CFU/mL για την επέμβαση με μέντα, 6.00 log CFU/mL για την επέμβαση με λεμονοθύμαρο και 6.61 log CFU/mL για την επέμβαση με σκόρδο. Επίσης στην επέμβαση του σκόρδου από την 20^η μέρα παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού.



Διάγραμμα 11: Απεικόνιση της εξέλιξης των *Pseudomonas spp.* της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.



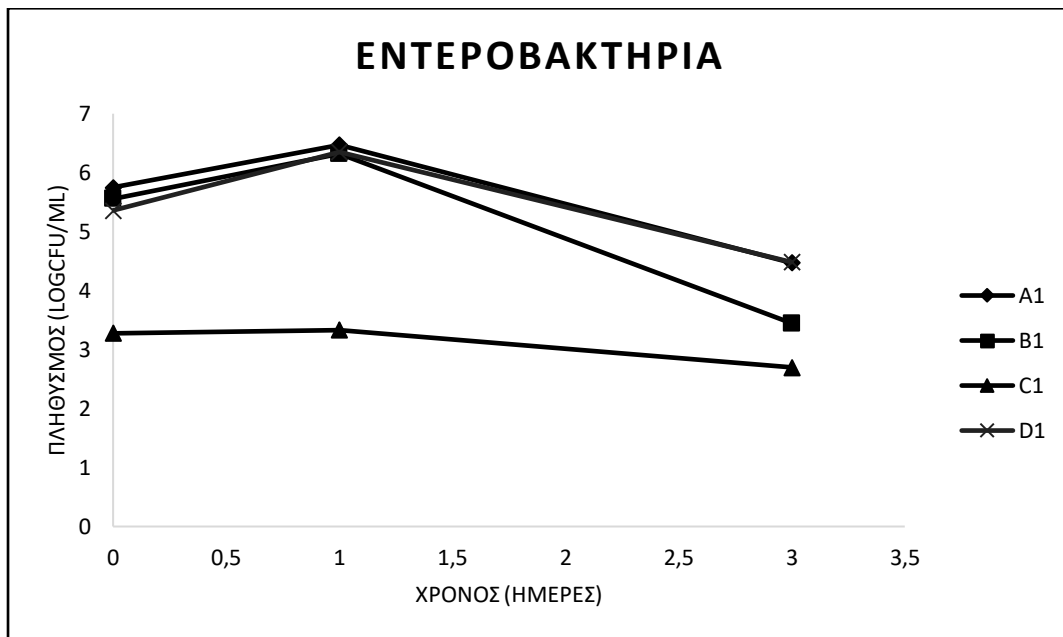
Διάγραμμα 12 : Απεικόνιση της εξέλιξης των *Pseudomonas spp.* της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε

συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

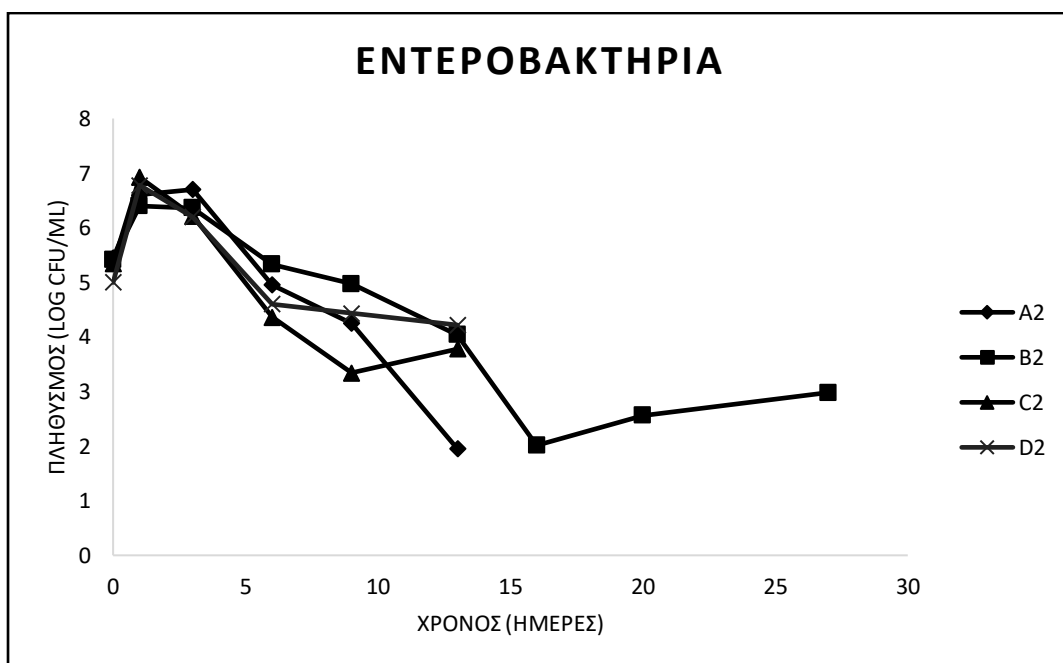
Στα παραπάνω Διαγράμματα 11 και 12 φαίνεται η εξέλιξη του πληθυσμού των ψευδομονάδων. Ο πληθυσμός τους αρχικά είναι 3-4 log CFU/mL και στη συνέχεια ελαττώνεται. Μάλιστα, αρκετά νωρίς την 3^η ημέρα ζύμωσης ο πληθυσμός τους κυμαίνεται σε μη μετρήσιμα από τη μέθοδο όρια για τις περισσότερες επεμβάσεις εκτός από την επέμβαση με το λεμονοθύμαρο και το σκόρδο της πρώτης ζύμωσης όπου οι ψευδομονάδες βρίσκονται κάτω από το όριο αρίθμησης την 6^η ημέρα και το μάρτυρα της 2^{ης} ζύμωσης που έχει αντίστοιχα αποτελέσματα την 9^η ημέρα.

Βλέποντας στο Παράρτημα τον Πίνακα V των αποτελεσμάτων των αναλύσεων φαίνεται ότι ο πληθυσμός *Pseudomonas spp.* αρχίζει με χαμηλά επίπεδα και γρήγορα μειώνεται κάτω από το όριο αρίθμησης. Στη 1^η ζύμωση τα επίπεδα του πληθυσμού είναι γύρω στο 3.20 log CFU/mL αρχικά και για το μάρτυρα και την επέμβαση με τη μέντα μειώνεται από την πρώτη κιόλας μέρα. Από την 3^η ημέρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης ο πληθυσμός είναι σε μη μετρήσιμα επίπεδα, από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Στις επεμβάσεις με λεμονοθύμαρο και σκόρδο διαπιστώνεται μια μικρή αύξηση τη 1^η ημέρα και μείωση τη 3^η ημέρα. Από την 6^η ημέρα και μετά ο πληθυσμός βρίσκεται σε μη μετρήσιμα επίπεδα.

Στη 2^η ζύμωση ο πληθυσμός των *Pseudomonas spp.* βρίσκεται στους 3.80 log CFU/mL περίπου και γρήγορα ελαττώνεται κάτω από το όριο αρίθμησης. Στις επεμβάσεις με λεμονοθύμαρο και σκόρδο διαπιστώνεται μικρή αύξηση τη 1^η ημέρα, μείωση τη 3^η ημέρα και ύστερα βρίσκεται κάτω από το όριο αρίθμησης της συγκεκριμένης μεθόδου. Στην επέμβαση με τη μέντα ο πληθυσμός μειώνεται από τη 1^η ημέρα και από τη 3^η βρίσκεται σε μη μετρήσιμα επίπεδα. Σε ό,τι αφορά το μάρτυρα φαίνεται ότι από μέρα σε μέρα παρουσιάζει αυξομειώσεις ενώ από τη 13^η ημέρα και μετά βρίσκεται κάτω από το όριο μέτρησης.



Διάγραμμα 53: Απεικόνιση της εξέλιξης των *Enterobacteriaceae* της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

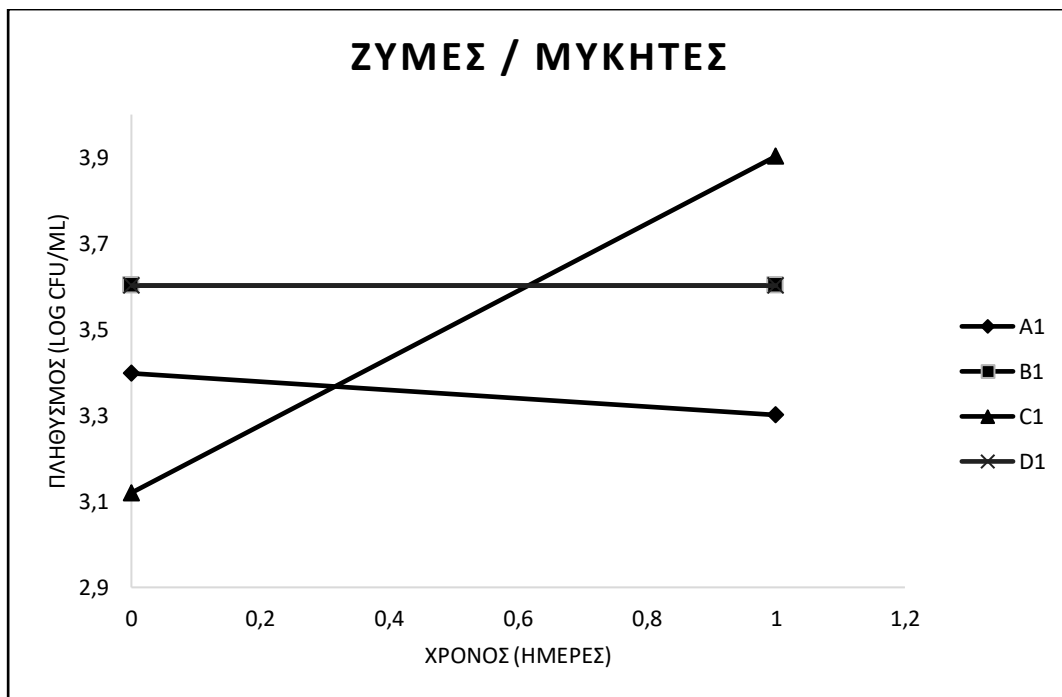


Διάγραμμα 14: Απεικόνιση της εξέλιξης των *Enterobacteriaceae* της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

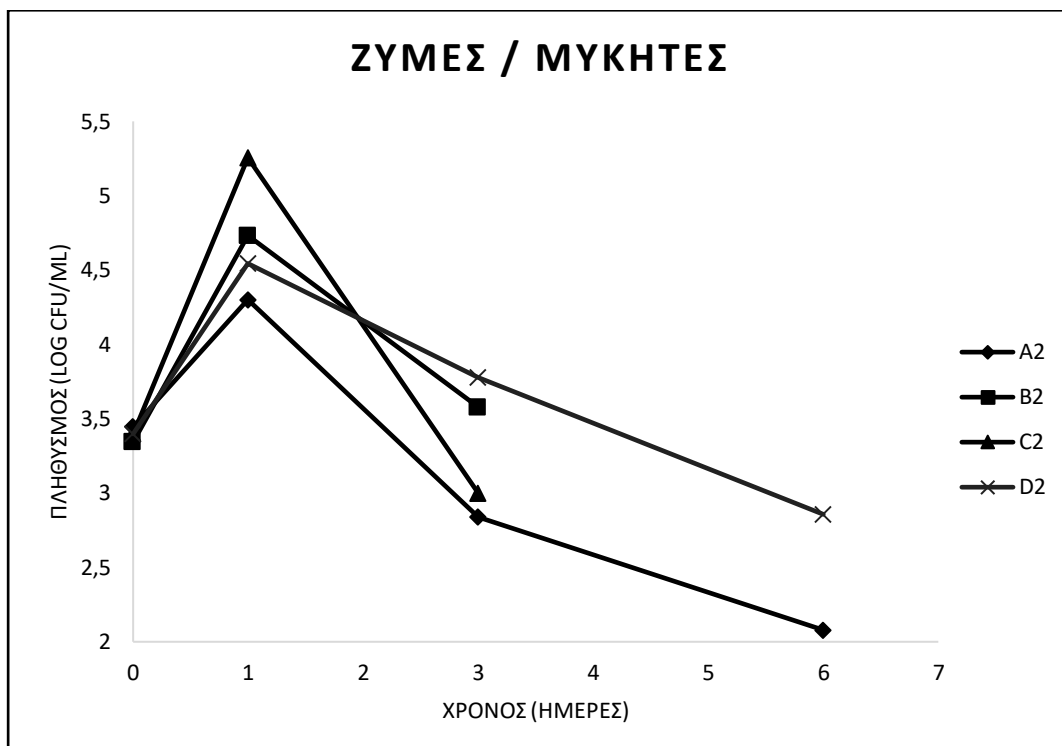
Σε ό,τι αφορά τον πληθυσμό της οικογένειας *Enterobacteriaceae* ενώ και στις δυο ζυμώσεις έχουν τον ίδιο αρχικό πληθυσμό (περίπου 5-6 log CFU/mL, Διαγράμματα 13 και 14) στη συνέχεια φαίνεται να υπάρχει μια διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα ο πληθυσμός *Enterobacteriaceae* της πρώτης ζύμωσης από την 1^η μέρα εμφανίζει μια απότομη πτωτική πορεία που μειώνει τον πληθυσμό 5 μέρες αργότερα κάτω από το όριο αρίθμησης, δηλαδή την 6^η ημέρα. Από την άλλη πλευρά, στη δεύτερη ζύμωση ο πληθυσμός φαίνεται να μειώνεται σταδιακά από τη 1^η ημέρα και χανεται από το όριο μέτρησης τη 13^η για τα δοχεία που είχαν το λεμονοθύμαρο και το σκόρδο και τη 16^η ημέρα για τα υπόλοιπα. Όπως έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενες μελέτες, η παρουσία μικροοργανισμών της οικογένειας αυτής συνυπάρχει με τα οξυγαλακτικά βακτήρια στην αρχή της ζύμωσης ενώ στην επόμενη φάση της ζύμωσης επικρατούν μόνο τα οξυγαλακτικά βακτήρια (49). Η παρουσία τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υποδηλώνει αλλοίωση του ζυμούμενου προϊόντος και αποτυχία γρήγορης οξίνισης (192). Πράγματι στη δεύτερη ζύμωση υπήρξε αλλοίωση του ζυμούμενου προϊόντος καθώς λόγο του ότι δεν είχε προστεθεί επαρκής ποσότητα λαδιού δεν διασφαλίστηκαν αναερόβιες συνθήκες. Έτσι οι βολβοί *Raphanous sativus* που βρίσκονταν σε επαφή με τον αέρα ανέπτυξαν μούχλα. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ξανά ότι όταν στις μικροβιολογικές αναλύσεις το αποτέλεσμα είναι 0 σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε μη μετρήσιμα, από τη μέθοδο, επίπεδα.

Εξετάζοντας πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα για τον πληθυσμό των *Enterobacteriaceae* φαίνεται ότι σε όλες τις επεμβάσεις των δυο ζυμώσεων οι πληθυσμοί ακολουθούν παρόμοια πορεία. Στη 1^η ζύμωση ο αρχικός πλυθησμός είναι στους 5.50 log CFU/mL περίπου (Πίνακας VI, Παράρτημα) και αυξάνεται μέχρι τη 1^η ημέρα. Από την 3^η ημέρα μειώνεται και από τη 13^η βρίσκεται κάτω από τα όρια αρίθμησης. Αξιοσημείωτη είναι η επαναληψιμότητα των μετρήσεων μεταξύ των επεμβάσεων. Στη 2^η ζύμωση ο αρχικός πληθυσμός βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα (5.30 log CFU/mL) αλλά η συμπεριφορά του είναι παρομοιάζει τον πλυθησμό της 1^{ης} ζύμωσης. Εκτός από το μάρτυρα, στις υπόλοιπες επεμβάσεις ο πληθυσμός αυξάνεται μέχρι τη 1^η ημέρα, μειώνεται από την ημέρα 3 μέχρι την ημέρα 13 και στη συνέχεια δεν μπορεί να μετρηθεί ξανά. Στο μάρτυρα ο πληθυσμός *Enterobacteriaceae* αυξάνεται μέχρι

την 3^η ημέρα, μειώνεται μέχρι την 9^η ημέρα και ύστερα βρίσκεται κάτω από το όριο αριθμησης.



Διάγραμμα 65: Απεικόνιση της πορείας του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.



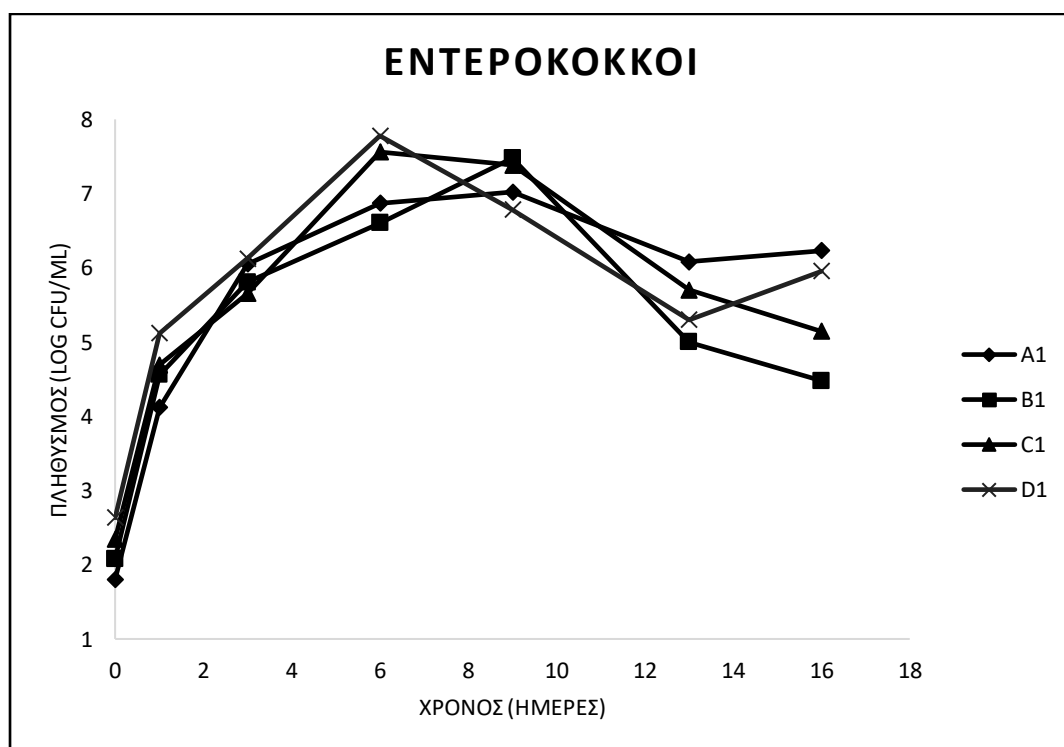
Διάγραμμα 16: Απεικόνιση της πορείας του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

Οι ζύμες και οι μύκητες έχουν και αυτοί παρόμοια εξέλιξη. Ο πληθυσμός τους αρχικά είναι στους 3-4 log CFU/mL, περίπου, και από την 1^η ημέρα της ζύμωσης αρχίζει η φθίνουσα πορεία τους μέχρι το σημείο κάτω από το όριο ανίχνευσης. Μάλιστα το σημείο αυτό εμφανίζεται αρκετά γρήγορα, την 3^η ημέρα, για τα δοχεία της πρώτης ζύμωσης και τα δοχεία με μέντα και λεμονοθύμαρο της δεύτερης ζύμωσης. Στα υπόλοιπα δοχεία της δεύτερης ζύμωσης το σημείο μηδενισμού των αποικιών έρχεται την 6 ημέρα για το δοχείο με το σκόρδο και την 9^η ημέρα για το δοχείο μάρτυρα. Επίσης, φαίνεται ότι στα δοχεία της δεύτερης ζύμωσης ο πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων την 1^η ημέρα έχει φτάσει σε μεγαλύτερα επίπεδα 1-2 log CFU/mL πιο πολύ. Η διαφορά αυτή λογικά οφείλεται στην αλλοίωση που υπήρξε στη δεύτερη ζύμωση.

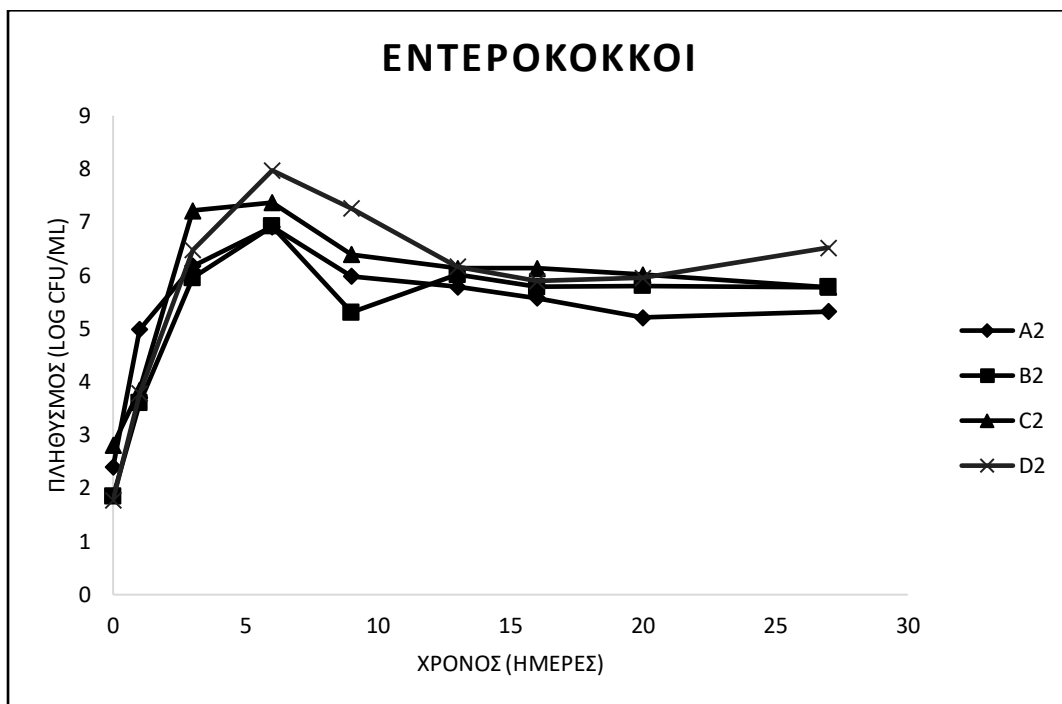
Ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων όπως φαίνεται στον Πίνακα VI του Παραρτήματος βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, δηλαδή 3.5 και 3.4 log CFU/mL για την 1^η και 2^η ζύμωση αντίστοιχα. Στη 1^η ζύμωση παρατηρείται μείωση του πληθυσμού στο μάρτυρα από τη 1^η ημέρα ενώ στις επεμβάσεις με μέντα και

σκόρδο παραμένει σταθερός και στην επέμβαση με λεμονοθύμαρο αυξάνεται. Την ημέρα 3 σε όλες τις επεμβάσεις και στο μάρτυρα διακρίνεται μείωση του πληθυσμού σε σχεδόν ίδια επίπεδα – 2.85 για το μάρτυρα, 3.02 log CFU/mL για την επέμβαση με μέντα, 3.07 log CFU/mL για την επέμβαση με λεμονοθύμαρο και 2.75 log CFU/mL για την επέμβαση με το σκόρδο. Από την 6^η ημέρα και έπειτα οι μικροοργανισμοί βρίσκονται κάτω του ορίου αρίθμησης.

Στη δεύτερη ζύμωση παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού μεταξύ των ημερών 0 και 1 και μείωση από τη μέρα 3. Επιπλέον ο πληθυσμός ζυμών/μυκήτων είναι κάτω από το όριο αρίθμησης από την ημέρα 6 για τις επεμβάσεις με μέντα και λεμονοθύμαρο και από την ημέρα 9 για το μάρτυρα και την επέμβαση με το σκόρδο.



Διάγραμμα 17: Απεικόνιση της εξέλιξης των *Enterococcus spp.* της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

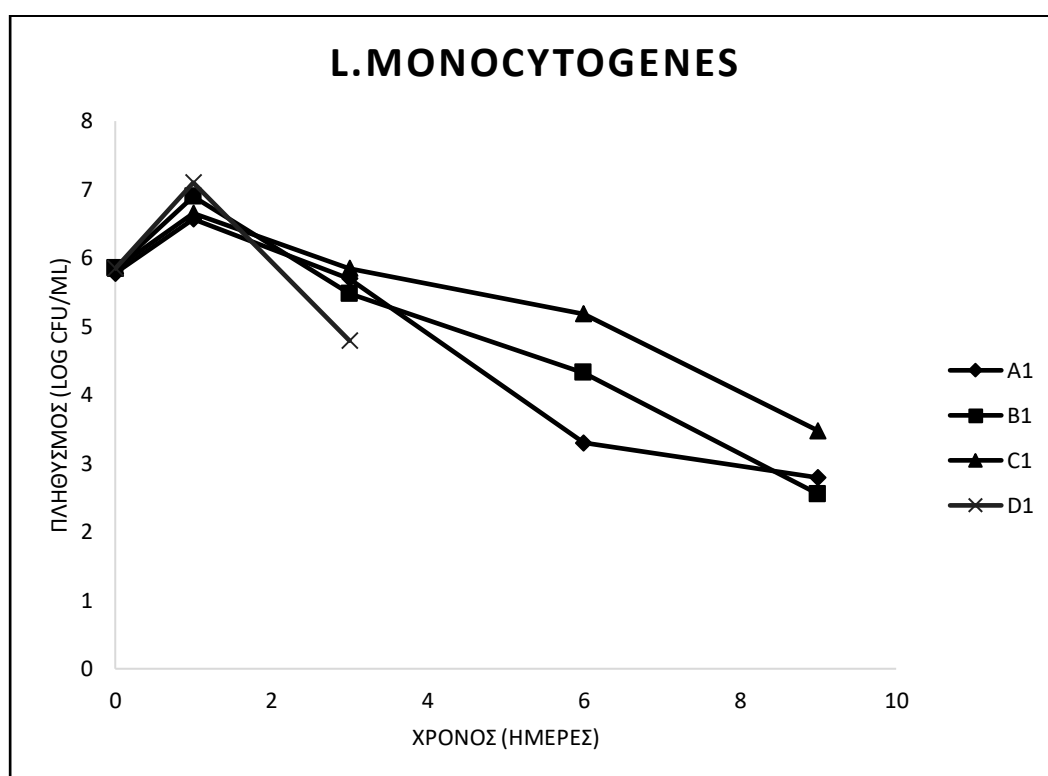


Διάγραμμα 18: Απεικόνιση της εξέλιξης των *Enterococcus spp.* της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

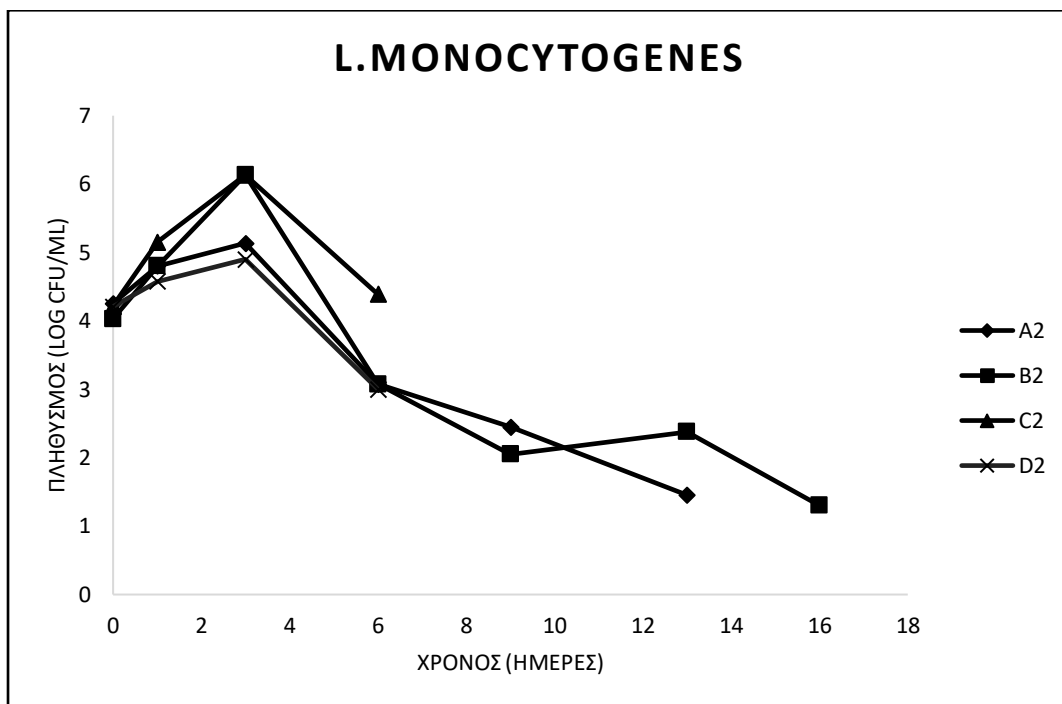
Παρατηρώντας τα Διαγράμματα 17 και 18 των *Enterococcus spp.* διαπιστώνεται συμφωνία στη μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών μεταξύ των διαφόρων παρεμβάσεων και ζυμώσεων. Ο πληθυσμός ξεκινά με σχεδόν 1.5-3 log CFU/mL και αυξάνει μέχρι την 6^η ημέρα φτάνοντας τους 6-8 log CFU/mL. Από την 6^η ημέρα και έπειτα φθίνει και σταθεροποιείται στους 4-6 log CFU/mL μέχρι το τέλος της ζύμωσης.

Όπως φάνηκε από τα Διαγράμματα 17 και 18 ο πληθυσμός των *Enterococcus spp.* υπάρχει καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης και αποτελεί δευτερεύουσα μικροβιακή χλωρίδα μετά τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Στη 1^η ζύμωση φαίνεται ότι ο αρχικός πληθυσμός είναι περίπου 2 log CFU/mL (Πίνακας VIII, Παράρτημα) και αυξάνει μέχρι την ημέρα 6 για τις επεμβάσεις με σκόρδο και λεμονοθύμαρο και μέχρι την ημέρα 9 για το μάρτυρα και την επέμβαση με μέντα. Στη συνέχεια ο πληθυσμός μειώνεται και στο τέλος της ζύμωσης βρίσκεται στους 6.23 log CFU/mL, 4.47 log CFU/mL, 5.15 log CFU/mL και 5.95 log CFU/mL για το μάρτυρα, την επέμβαση με μέντα, λεμονοθύμαρο και σκόρδο αντίστοιχα.

Στη 2^η ζύμωση ο πληθυσμός στην αρχή είναι περίπου 2 log CFU/mL αυξάνεται μέχρι την ημέρα 6 και στη συνέχεια μειώνεται. Ο μάρτυρας, το λεμονοθύμαρο και το σκόρδο παρουσιάζουν μείωση του πληθυσμού μέχρι την τελευταία μέρα της ζύμωσης και μάλιστα στο μάρτυρα βρίσκεται κάτω του ορίου αρίθμησης. Στην επέμβαση με μέντα ενώ μειώνεται από την 9^η ημέρα παρατηρούνται κάποιες αυξομειώσεις. Δηλαδή μεταξύ των ημερών 9 - 13 αυξάνεται, μεταξύ των ημερών 13 - 16 μειώνεται, μεταξύ των ημερών 16 - 20 αυξάνεται ξανά και στις μέρες 20 - 27 μειώνεται πάλι. Βέβαια οι αυξήσεις που γίνονται είναι μικρές και ο πληθυσμός δεν ξεπερνά σε καμία περίπτωση τη μέτρηση της ημέρας 6.



Διάγραμμα 19: Απεικόνιση της πορείας της *L. monocytogenes* της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.



Διάγραμμα 20: Απεικόνιση της πορείας της *L. monocytogenes* της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/θλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

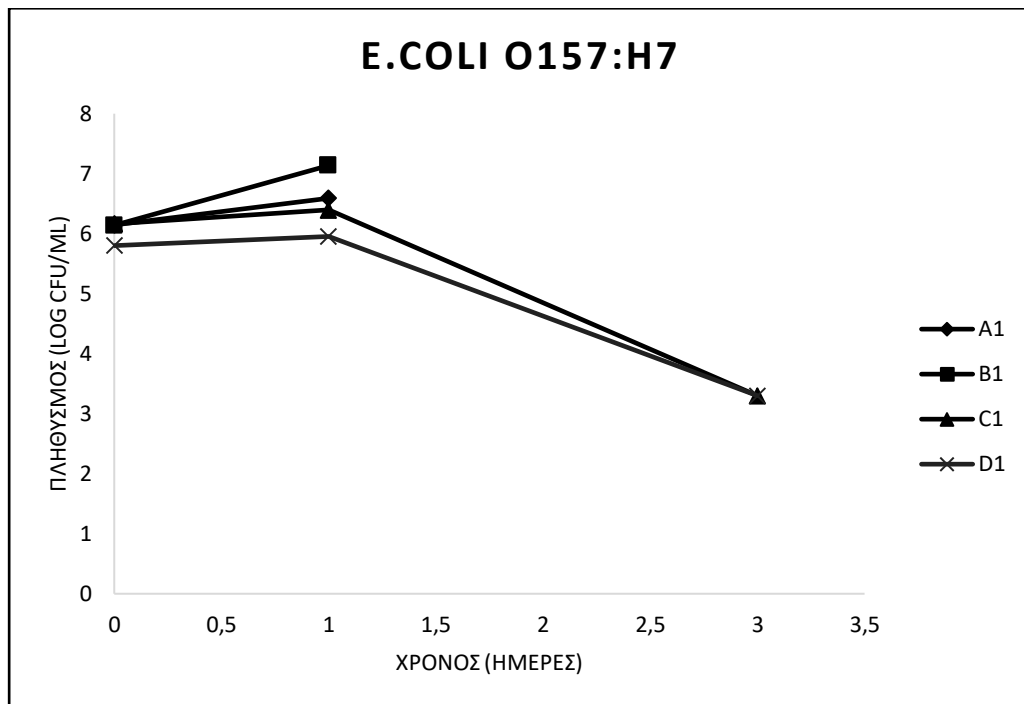
Κοιτώντας ενδελεχώς τα Διαγράμματα 19 και 20 της πορείας της *Listeria monocytogenes* διαπιστώνεται ότι παρά τη διαφορά των 2 log CFU/mL των ενοφθαλμισμάτων μεταξύ πρώτης και δεύτερης ζύμωσης η εξέλιξή της εμφανίζει παραπλήσια συμπεριφορά. Και στις δυο περιπτώσεις φθίνει μέχρι που διαπιστώνεται η πλήρης απουσία της. Η διαφορά που υπάρχει είναι ότι στη πρώτη ζύμωση ο μικροοργανισμός αρχίζει να ελαττώνεται από την 1^η ημέρα ενώ στη δεύτερη ζύμωση δύο μέρες αργότερα. Επιπλέον, στη πρώτη ζύμωση, ο μικροοργανισμός απουσιάζει εντελώς την 3^η ημέρα για το δοχείο με το σκόρδο και την 9^η ημέρα για τα υπόλοιπα δοχεία. Στη δεύτερη ζύμωση, ο μικροοργανισμός σβήνει τα ίχνη του από την 6^η ημέρα για το δοχείο με το λεμονοθύμαρο, την 9^η ημέρα για το δοχείο με το σκόρδο, τη 13^η ημέρα για το δοχείο μάρτυρα και τη 16^η ημέρα για το δοχείο με τη μέντα. Τα αποτελέσματα αυτά προκαλούν το ενδιαφέρον καθώς το ενοφθάλμισμα της πρώτης ζύμωσης ήταν 100 φορές πυκνότερο από εκείνο της δεύτερης.

Θα πρέπει, επίσης, να διευκρινιστεί ότι το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, PALCAM, είναι επιλεκτικό για το γένος *Listeria spp.* αλλά όχι για το είδος *L.*

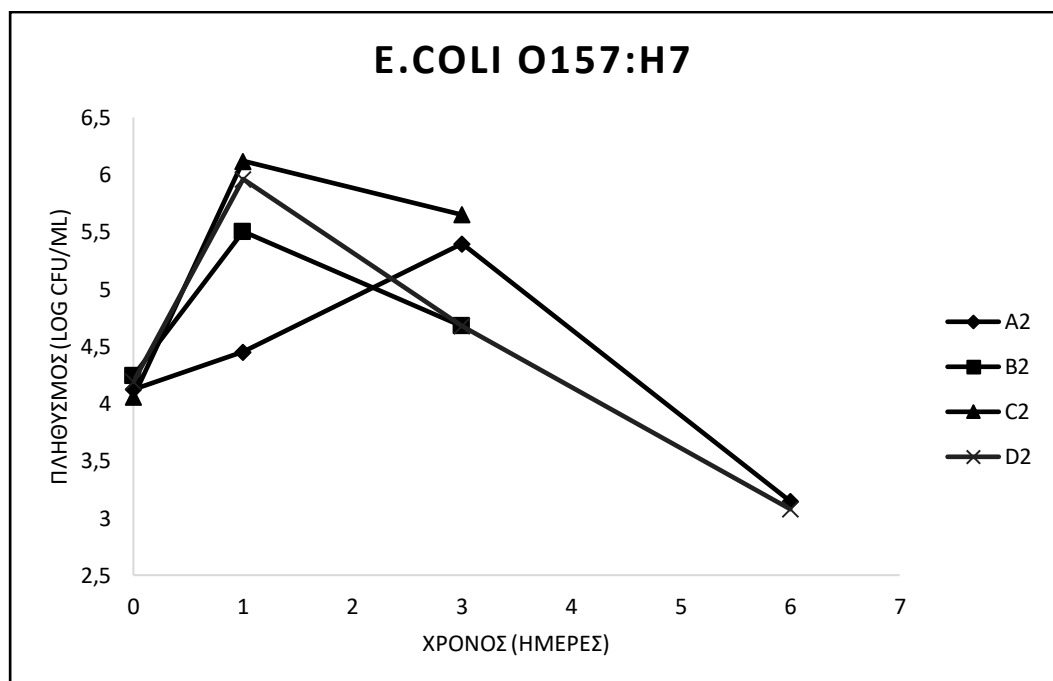
monocytogenes. Επειδή όμως στη δοκιμασία εμβολιάσαμε με γνωστή ποσότητα *L. monocytogenes* παραδεχτήκαμε ότι οι αποικίες *Listeria* που εμφανίζονταν στο υλικό PALCAM ήταν της *L. monocytogenes*.

Σε ό,τι αφορά τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* φαίνεται να μη μπορεί να ανταπεξέλθει των συνθηκών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και έτσι στο τέλος παρατηρείται πλήρης απουσία του μικροοργανισμού. Στη 1^η ζύμωση ο αρχικός πληθυσμός είναι περίπου στο 5.80 log CFU/mL. Παρουσιάζει αύξηση μεταξύ 0 και 1 ημέρας και στη συνέχεια μειώνεται. Η επέμβαση με το σκόρδο είναι η πρώτη επέμβαση στην οποία ο πληθυσμός βρίσκεται ακάτω από το όριο ανίχνευσης την 6^η ημέρα ενώ την 9^η διαπιστώνεται η απουσία του. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις και στο μάρτυρα, μέχρι την ημέρα 9 εμφανίζονται αποικίες στα τρυβλία και από την ημέρα 13 διαπιστώνεται η πλήρης απουσία του μικροβίου.

Στη 2^η ζύμωση ο πληθυσμός αρχικά είναι 4.20 log CFU/mL και αυξάνεται μέχρι την ημέρα 3. Έπειτα, ο πληθυσμός μειώνεται. Το σκόρδο και η επέμβαση με λεμονοθύμαρο είναι οι πρώτες επεμβάσεις όπου ο μικροοργανισμός βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης, 9^η ημέρα, αλλά διαπιστώνεται η παρουσία του στην άλμη. Ο μάρτυρας εμφανίζει αποικίες έως και την ημέρα 13 και η επέμβαση με τη μέντα έως και την ημέρα 16. Πλήρης απουσία του μικροβίου διαπιστώνεται ταυτόχρονα σε όλες τις επεμβάσεις την ημέρα 20.



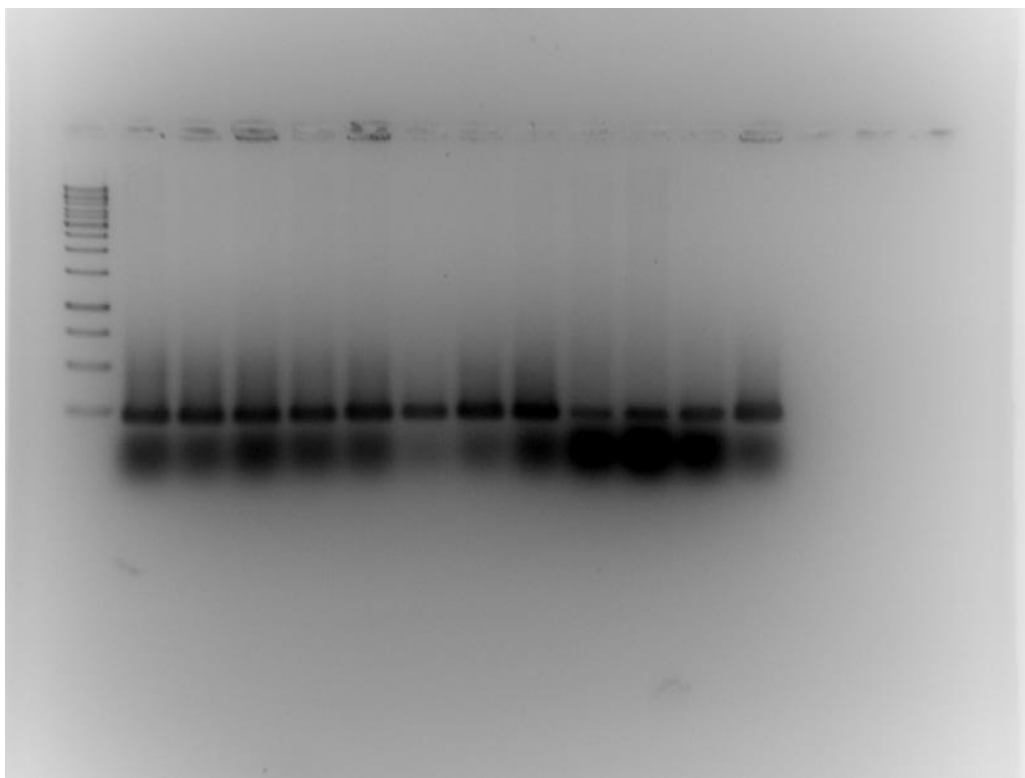
Διάγραμμα 21: Απεικόνιση του *E. coli* O157:H7 της 1^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.



Διάγραμμα 22: Απεικόνιση του πληθυσμού του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της εξέλιξης του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 από τα Διαγράμματα 21 και 22 φαίνεται ότι οι συνθήκες που δημιουργήθηκαν μέσα στην άλμη ήταν ικανές για να τον μειώσουν κάτω από το όριο ανίχνευσης γρήγορα. Συγκεκριμένα, στα δοχεία της πρώτης ζύμωσης με μέντα και του μάρτυρα ο πληθυσμός μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης την 1^η κιόλας μέρα. Στο αντίστοιχο δοχείο μάρτυρα και στο δοχείο με λεμονοθύμαρο της δεύτερης ζύμωσης απουσία του μικροοργανισμού από τα τρυβλία τύπου Πέτρι παρατηρήθηκε την 9^η ημέρα. Στα υπόλοιπα δοχεία της 1^{ης} και 2^{ης} ζύμωσης ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου την 3^η ημέρα.

Αποτελέσματα ταυτοποίησης *Lactobacillus plantarum*



Εικόνα 7:Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων PCR.

Μετά την εξαγωγή του DNA από τα δείγματα και την PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να διαπιστωθεί εάν πέτυχε η εξαγωγή του DNA και η PCR αλλά και να διαπιστωθεί ότι τα δείγματα είχαν το επιθυμητό DNA (219 bp). Όπως φαίνεται και στην παραπάνω φωτογραφία το δείγμα παραλήφθηκε επιτυχώς. Επιπλέον, το δείγμα σε σχέση με το δείκτη (ladder) φαίνεται ότι αποτελείται από τον αναμενόμενο αριθμό βάσεων και άρα προέρχεται από κύτταρα του μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διαδικασία ζύμωσης φρούτων και λαχανικών είναι μια πανάρχαια διαδικασία η οποία συνέβαλε με τον τρόπο της στη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων του ανθρώπου. Η διατήρηση των αλλοιώσιμων ή των πλεονασμάτων των τροφίμων για μεγάλο χρονικό διάστημα ήταν ένα πρόβλημα το οποίο ξεπεράστηκε με τη ζύμωση. Με τη διαδικασία της ζύμωσης η διατροφή του ανθρώπου πλούτισε τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Ποσοτικά καθώς δημιουργήθηκαν νέα προϊόντα και ποιοτικά επειδή η διαδικασία της ζύμωσης αυξάνει τη θρεπτική αξία του ζυμούμενου προϊόντος (83, 84, 85).

Σήμερα ύστερα από τόσα χρόνια και ύστερα από την τεχνολογική εξέλιξη τα ζυμούμενα προϊόντα είναι ακόμη επιθυμητά από το καταναλωτικό κοινό κυρίως όμως για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Η ασφάλεια των τροφίμων, βέβαια, συνεχίζει να προβληματίζει τους υπεύθυνους και προκαλεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Μάλιστα η *L. monocytogenes* και ο *E. coli* O157:H7 είναι δυο μικροοργανισμοί που μπορούν εύκολα να βρεθούν στο τραπέζι του καταναλωτή μέσω της τροφής και να δημιουργήσουν επιδημίες με μοιραίο αποτέλεσμα για ευαίσθητες κοινωνικές ομάδες.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 σε σχέση με την παρουσία αρωματικών παραγόντων και σκόρδου κατά τη διάρκεια ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativum*. Οι αρωματικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μέντα και το λεμονοθύμαρο. Η ζύμωση έλαβε χώρα στους 20°C, σε άλμη 5% NaCl και υπό αναερόβιες συνθήκες με την προσθήκη ηλιελαίου. Πραγματοποιήθηκαν δυο ζυμώσεις, η δεύτερη περιείχε ενοφθάλμισμα 100 φορές αραιότερο από την πρώτη. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και σύμφωνα με το πρόγραμμα δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές αναλύσεις για να ελεγχθεί η πορεία των παθογόνων μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα με τους παθογόνους μικροοργανισμούς ελέγχθηκε η πορεία της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των εντεροβακτηρίων, των εντεροκόκκων, των ψευδομονάδων και των ζυμών/μυκήτων. Ακόμη, σε κάθε

δειγματοληψία μετρούνταν το pH και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα της άλμης των δοχείων ζύμωσης. Στόχος των μετρήσεων αυτών ήταν ο έλεγχος της πορείας της ζύμωσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η παρουσία των αρωματικών παραγόντων και του σκόρδου, πιθανόν, δεν επηρεάζει την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus*. Εξαίρεση αποτελεί η μέντα έναντι του *E.coli* O157:H7 και το σκόρδο έναντι της *L.monocytogenes*.

Σε επόμενη έρευνα θα ήταν σκόπιμο να διερευνηθεί η σχέση της ποσότητας των αρωματικών παραγόντων με την επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών όπως επίσης και το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Ι: Μετρήσεις των φαινολικών κατά την της 1^η ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A1 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B1), λεμονοθύμαρου (C1) και βολβών σκόρδου (D1) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

Περίοδος Αποθήκευσης (Ημέρες)	A1	B1	C1	D1
1	65,67	76,78	80,11	78,31
3	222,06	170,39	166,5	164,28
6	384,83	327,06	299,56	321,22
9	363,72	329,56	339,56	329
13	359,28	325,11	326,22	314,56
16	406,22	380,11	393,44	360,11

Πίνακας ΙΙ: Μετρήσεις ολικών φαινολικών της 2^{ης} ζύμωσης βολβών του είδους *Raphanus sativus* (A2 μάρτυρας) σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση βολβών του είδους *Raphanus sativus* παρουσία φύλλων/βλαστών μέντας (B2), λεμονοθύμαρου (C2) και βολβών σκόρδου (D2) σε συνάρτηση με τις ημέρες ζύμωσης.

Περίοδος Αποθήκευσης (Ημέρες)	A2	B2	C2	D2
1	54,83	52,33	54,83	60,67
3	82,61	110,11	117,89	134,56
6	243,17	242,06	354,28	333,17
9	308,17	292,61	378,44	330,94
13	354,83	335,39	422,06	386,78
16	376,78	374	409,83	401,78
20	338,72	347,06	446,78	382,06
27	343,17	346,5	418,17	378,17

Πίνακας III: Αποτελέσματα Ο.Μ.Χ. των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	6,50	6,23	6,18	6,87
1	6,54	6,46	6,28	6,32
3	7,08	6,25	6,66	6,62
6	7,90	7,30	7,89	8,00
9	6,78	7,54	7,57	6,53
13	6,79	7,43	6,68	6,45
16	6,68	7,36	7,47	6,16

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	6,90	6,78	6,85	6,90
1	7,46	7,04	7,46	7,36
3	7,43	6,95	7,34	7,11
6	7,48	7,11	7,68	7,92
9	6,39	6,79	6,90	7,36
13	6,26	6,77	6,46	6,26
16	6,03	6,38	6,50	5,98
20	6,02	6,13	6,17	6,21
27	5,98	6,10	5,92	6,60

Πίνακας IV: Αποτελέσματα οξυγαλακτικών βακτηρίων των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

Οξυγαλακτικά βακτήρια (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	3,52	2,68	2,54	4,10
1	5,60	4,87	5,97	5,26
3	7,08	6,00	6,78	6,48
6	8,04	7,46	7,84	7,95
9	7,15	7,62	7,60	6,63
13	7,00	7,53	6,49	6,30
16	6,62	6,90	6,41	6,18

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	2,36	2,60	2,28	3,08
1	4,03	4,90	5,18	5,80
3	5,37	5,56	6,87	6,72
6	7,43	6,70	7,77	8,03
9	6,53	6,95	6,90	7,04
13	6,26	6,52	6,46	6,15
16	6,11	6,37	6,47	6,01
20	6,10	6,20	6,19	6,20
27	5,97	6,10	6,00	6,61

Πίνακας V: Αποτελέσματα *Pseudomonas spp.* των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

<i>Pseudomonas spp.</i> (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	3,25	3,30	3,28	3,05
1	3,00	3,30	3,33	3,85
3	<2	<2	2,70	2,26
6	<2	<2	<2	<2
9	<2	<2	<2	<2
13	<2	<2	<2	<2
16	<2	<2	<2	<2

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	3,78	3,90	3,78	3,85
1	3,32	3,85	3,90	3,90
3	2,79	<2	3,04	1,78
6	3,12	<2	<2	<2
9	3,43	<2	<2	<2
13	<2	<2	<2	<2
16	<2	<2	<2	<2
20	<2	<2	<2	<2
27	<2	<2	<2	<2

Πίνακας VI:Αποτελέσματα *Enterobacteriaceae* των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

Enterobacteriaceae (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	6,07	5,56	5,21	5,36
1	6,27	6,32	6,42	6,35
3	4,47	3,45	3,90	4,48
6	3,25	3,42	3,08	3,87
9	2,42	2,42	2,58	3,07
13	<1	<1	<1	<1
16	<1	<1	<1	<1

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	5,45	5,41	5,34	5,00
1	6,60	6,40	6,92	6,78
3	6,70	6,36	6,21	6,20
6	4,95	5,33	4,36	4,60
9	3,25	4,97	3,34	4,43
13	<1	2,01	3,78	4,22
16	<1	<1	<1	<1
20	<1	<1	<1	<1
27	<1	<1	<1	<1

Πίνακας VII:Αποτελέσματα ζυμών/μυκήτων των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

Ζύμες/μύκητες (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	3,40	3,60	3,12	3,60
1	3,30	3,60	3,90	3,60
3	2,85	3,02	3,07	2,75
6	<2	<2	<2	2,47
9	<2	<2	<2	<2
13	<2	<2	<2	<2
16	<2	<2	<2	<2

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	3,45	3,34	3,40	3,40
1	4,30	4,73	5,26	4,54
3	2,84	3,58	3,00	3,78
6	2,08	<2	<2	2,86
9	<2	<2	<2	<2
13	<2	<2	<2	<2
16	<2	<2	<2	<2
20	<2	<2	<2	<2
27	<2	<2	<2	<2

Πίνακας VIII:Αποτελέσματα *Enterococcus* spp. των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2).

<i>Enterococcus</i> spp. (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	1,80	2,08	2,34	2,63
1	4,12	4,56	4,69	5,12
3	6,05	5,81	5,65	6,12
6	6,87	6,60	7,56	7,78
9	7,02	7,48	7,38	6,79
13	6,08	5,00	5,70	5,30
16	6,23	4,48	5,15	5,95

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	2,40	1,85	2,81	1,78
1	4,99	3,60	3,85	3,78
3	6,18	5,95	7,21	6,48
6	6,91	6,92	7,37	7,97
9	5,98	5,30	6,39	7,26
13	5,78	6,01	6,13	6,16
16	5,58	5,78	6,13	5,90
20	5,20	5,80	6,01	5,95
27	<2	5,78	5,78	6,52

Πίνακας IX:Αποτελέσματα της *L. monocytogenes* των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2). pre=παρουσία, abs=απουσία μικροοργανισμού

<i>Listeria monocytogenes</i> (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	5,78	5,85	5,85	5,85
1	6,57	6,90	6,65	7,10
3	5,70	5,48	5,85	4,79
6	3,30	4,32	5,18	pre
9	2,79	2,55	3,48	abs
13	abs	abs	abs	abs
16	abs	abs	abs	

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	4,25	4,03	4,22	4,21
1	4,80	4,80	5,15	4,58
3	5,14	6,13	6,13	4,90
6	3,08	3,08	4,39	3,00
9	2,45	2,05	pre	pre
13	1,45	2,38	pre	pre
16	pre	1,30	pre	pre
20	abs	abs	abs	abs
27	abs	abs	abs	abs

Πίνακας Χ: Αποτελέσματα του *E.coli* O157:H7 των επεμβάσεων (μάρτυρας=A, μέντα=B, λεμονοθύμαρο=C, σκόρδο=D) των δυο ζυμώσεων (1, 2). pre=παρουσία, abs=απουσία μικροοργανισμού

<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (log CFU/ mL)				
Ημέρα	A1	B1	C1	D1
0	6,15	6,14	6,17	5,80
1	6,59	7,14	6,40	5,95
3	pre	pre	3,30	3,30
6	pre	pre	pre	pre
9	abs	abs	abs	abs
13	abs	abs	abs	abs
16	abs	abs	abs	abs

Ημέρα	A2	B2	C2	D2
0	4,12	4,24	4,06	4,19
1	4,45	5,50	6,12	5,96
3	5,40	4,68	5,65	4,68
6	3,15	pre	pre	3,08
9	pre	pre	pre	abs
13	pre	pre	abs	abs
16	abs	abs	abs	abs
20	abs	abs	abs	abs
27	abs	abs	abs	abs

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gashe, B.A. 1987. Kocho fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 473-477.
2. Tamang, J.P., B. Tamang, U. Schillinger, C.M.A.P. Franz, M. Gores and W.H. Holzapfel. 2005, Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology* 105:347-356.
3. Stamer, J.R., B.O. Stoyla and B.A. Dunckel. 1971. Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation. *Journal of Milk and Food Technology* 34: 521-525.
4. Paramithiotis S., K. Kouretas and E.H. Drosinos. 2014b. Effect of ripening stage on the development of the microbial community during spontaneous fermentation of green tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1600-1606.
5. Daeschel, M.A., R.E. Andersson and H.P. Fleming. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews* 46: 357-367.
6. Cho, J., D. Lee, C. Yang, J. Jeon, J. Kim and H. Han. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters* 257: 262-267.
7. Jung, J.Y., S.H. Lee, H.M. Jin, Y. Hahn, E.L. Madsen and C.O. Jeon, 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 163: 171-179.
8. Jeong, S.H., J.Y. Jung, S.H. Lee, H.M. Jin and C.O. Jeon. 2013a. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of dongchimi, traditional Korean watery kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 164: 46-53.
9. Paramithiotis, S., A.I. Doulgeraki, A. Karahasani and E.H. Drosinos. 2014a. Microbial population dynamics during spontaneous fermentation of

- Asparagus officinalis* L. young sprouts. European Food Research and Technology 239: 297-304.
10. Bassett, J. and P. McClure. 2008. A risk assessment approach for fresh fruits. *Journal of Applied Microbiology* 104: 925-943.
 11. Painter, J.A., R.M. Hoekstra, T. Ayers, R.V. Tauxe, C.R. Braden, F.J. Angulo and P.M. Griffin. 2013. Attribution of food-borne illnesses, hospitalizations and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases* 19: 407-415.
 12. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2013. Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal* 11(1):3025. p. 138, doi:10.2903/j.efsa.2013.3025. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
 13. Drosinos, E.H. and S. Paramithiotis. 2007. Research trends in lactic acid fermentation. Pp. 3992. In: M.V. Palino (Ed.). *Food Microbiology Research Trends*. Nova Science Publishers, NY, USA.
 14. Burnett, S.L., J. Chen and L.R. Beuchat. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4679-4687.
 15. Takeuchi, K. and J.F. Frank. 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum's size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *Journal of Food Protection* 63: 434-440.
 16. Takeuchi, K. and J.F. Frank. 2001. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. *Journal of Food Protection* 64: 147-151.
 17. Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44: 367-392.
 18. Klerks, M.M., E. Franz, M. van Gent-Pelzer, C. Zijlstra and A.H.C. van Bruggen. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars

- with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal* 1: 620-631.
19. Beuchat, L.R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4: 413-423.
 20. Mitra, R., E. Cuesta-Alonso, A. Wayadande, J. Talley, S. Gilliland and J. Fletcher. 2009. Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157: H7 in spinach. *Journal of Food Protection* 72:1521-1530.
 21. Raybaudi-Massilia, R.M., J. Mosqueda-Melgar, R. Soliva-Fortuny and O. Martin-Belloso. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8: 157-180.
 22. Brandl, M.T. and R.E. Mandrell. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3614-3621.
 23. Cooley, M.B., D. Chao and R.E. Mandrell. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection* 69:2329-2335.
 24. Critzer, F.J. and M.P. Doyle. 2010. Microbial ecology of food-borne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 125-130.
 25. Warriner, K. and A. Namvar. 2010. The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 131-136.
 26. Kroupitski, Y., D. Golberg, E. Belausov, R. Pinto, D. Swartzberg, D. Granot and S. Sela. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6076-6086.

27. Kroupitski, Y., R. Pinto, E. Belausov and S. Sela. 2011. Distribution of *Salmonella typhimurium* in romaine lettuce leaves. *Food Microbiology* 28: 990-997.
28. Seo, K.H. and J.F. Frank. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Food Protection* 62: 3-9.
29. Warriner, K., F. Ibrahim, M. Dickinson, C. Wright and W.M. Waites. 2003. Internalization of human pathogens within growing salad vegetables. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 20: 117-134.
30. Hadjok, C., G.S. Mittal and K. Warriner. 2008. Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1014-1024.
31. Inatsu, Y., M.L. Bari, S. Kawasaki and K. Isshiki. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in kimchi. *Journal of Food Protection* 67: 1497-1500.
32. Niksic, M., S.E. Niebuhr, J.S. Dickson, A.F. Mendonca, J.J. Koziczowski and J.L.E. Ellingson. 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during sauerkraut fermentation. *Journal of Food Protection* 68: 1367-1374.
33. Kim, Y.S., Z.B. Zheng and D.H. Shin. 2008. Growth inhibitory effects of kimchi (Korean traditional fermented vegetable product) against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 71: 325-332.
34. Breidt Jr, F. and J.M. Caldwell. 2011. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in cucumber fermentation brines. *Journal of Food Science* 76: M198-M203.
35. Cho, G.Y., M.H. Lee and C. Choi. 2011. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during kimchi fermentation supplemented with raw pork meat. *Food Control* 22: 1253-1260.

36. Paramithiotis, S., A.I. Doulgeraki, I. Tsilikidis, G.J.E. Nychas and E.H. Drosinos. 2012. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Control* 27: 178-183.
37. Argyri A.A., E. Lyra, E.Z. Panagou and C.C. Tassou. 2013. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* during storage of fermented green table olives in brine. *Food Microbiology* 36: 1-6.
38. Medina, E., M. Brenes, C. Romero, E. Ramirez and A. de Castro. 2013. Survival of food-borne pathogenic bacteria in table olive brines. *Food Control* 34: 719-724.
39. Tamang, J.P. and D. Samuel. 2010. Dietary Cultures and Antiquity of Fermented Foods and Beverages. Pp. 1-41. In: J.P. Tamang and K. Kailasapathy (Eds.). *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
40. Di Cagno, R., R. Coda, M. De Angelis and M. Gobbetti. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 33: 1-10.
41. Marsh, A.J., C. Hill, R.P. Ross and P.D. Cotter. 2014. Fermented beverages with healthpromoting potential: Past and future perspectives. *Trends In Food Science And Technology* 38:113-124.
42. Drosinos, E.H. and S. Paramithiotis. 2012. Nutritional attributes of lactic acid fermented fruits and vegetables. *Agro Food Industry Hi Tech* 23: 46-48.
43. Filannino, P., Y. Bai, R. Di Cagno, M. Gobbetti and M.G. Gänzle. 2015. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology* 46: 272-279.
44. Gupta, S. and N. Abu-Ghannam. 2012. Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 183-199.
45. Marsh, A.J., C. Hill, R.P. Ross and P.D. Cotter. 2014. Fermented beverages with healthpromoting potential: Past and future perspectives. *Trends In Food Science And Technology* 38:113-124.

46. Yang, H., H. Zou, C. Qu, L. Zhang, T. Liu, H. Wu and Y. Li. 2014. Dominant microorganisms during the spontaneous fermentation of suan cai, a Chinese fermented vegetable. *Food Science and Technology Research* 20: 915-926.
47. Reina, L.D., I.M. Pérez-Díaz, F. Breidt, M.A. Azcarate-Peril, E. Medina and N. Butz. 2015. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation at 20°C. *International Journal of Food Microbiology* 203: 35-40.
48. Xiong, T., Q. Guan, S. Song, M. Hao and M. Xie. 2012. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control* 26: 178-181.
49. Wouters, D., S. Grosu-Tudor, M. Zamfir and L. De Vuyst. 2013a. Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 749-760.
50. Jung, J.Y., S.H. Lee and C.O. Jeon. 2014. Kimchimicroflora: history, current status and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:2385-2393.
51. Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J.C. Frisvad, M.L. Gerds, W.P. Hammes, J. Harnett, G. Huys, S. Laulund, A. Ouwehand, I.B. Powell, J.B. Prajapati, Y. Seto, E. Ter Schure, A. Van Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgoda, S. Tuijtelaars and E.B. Hansen. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.
52. Wouters, D., S. Grosu-Tudor, M. Zamfir and L. De Vuyst. 2013b. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 3352-3361.
53. Hurtado, A., C. Reguant, A. Bordons and N. Rozès. 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology* 31: 1-8.
54. Lee, M., J. Jang, J. Lee, H. Park, H. Choi and T. Kim. 2015. Starter cultures for kimchi fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 559-568.

55. Demarigny, Y. 2012. Fermented food products made with vegetable materials from tropical and warm countries: Microbial and technological considerations. *International Journal of Food Science and Technology* 47: 2469-2476.
56. Satish, K.R., P. Kanmani, N. Yuvaraj, K.A. Paari, V. Pattukumar and V. Arul. 2013. Traditional Indian fermented foods: A rich source of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science and Nutrition* 64: 415-28.
57. Franz, C.M., M. Huch, J.M. Mathara, H. Abriouel, N. Benomar, G. Reid, A. Galvez and W.H. Holzapfel. 2014. African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 190: 84-96.
58. Hutkins, R.W. 2008. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
59. Brenes, M. 2004. Olive fermentation and processing: Scientific and technological challenges. *Journal of Food Science* 69: 33-34.
60. Tamang, J.P. and K. Kailasapathy. 2010. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
61. Sabatini, N., M.R. Mucciarella and V. Marsilio. 2008. Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. Moresca and Kalamata). *LWT-Food Science and Technology* 41: 2017-2022.
62. Ercolini, D., F. Villani, M. Aponte and G. Mauriello. 2006. Fluorescence in situ hybridization detection of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 112: 291-296.
63. Heperkan, D. 2013. Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology* 4: 143.
64. Pulido, R.P., N. Benomar, M.M. Cañamero, H. Abriouel and A. Gálvez. 2012. Fermentation of caper products. Pp. 201-208. In: Hui, Y.H. (Eds.). *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*, second ed. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
65. Hui, Y.H. and E.Ö. Evranuz. 2012. *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*. CRC Press. Boca Raton, London, New York.

66. Pulido, R.P., N.B. Omar, H. Abriouel, R.L. López, M.M. Cañamero and A. Gálvez. 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7872-7879.
67. Halász, A., A. Baráth and W.H. Holzapfel. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *European Food Research and Technology* 208: 434-438.
68. Plengvidhya, V., F. Breidt, H. Fleming. 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 93: 287-296.
69. Guizani, N. 2011. Vegetable Fermentation and Pickling. Pp. 351-367. In: N.K. Sinha, Y.H. Hui, E.O. Evranuz, M. Siddiq, J. Ahmed (Eds.). *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
70. Lahtinen, S., A.C. Ouwehand, S. Salminen and A. von Wright. 2011. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
71. Tamminen, M., T. Joutsjoki, M. Sjöblom, M. Joutsen, A. Palva, E. Ryhänen and V. Joutsjoki. 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR–ELISA. *Letters in Applied Microbiology* 39: 439-444.
72. Singh, A.K. and A. Ramesh. 2008. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR-based approach. *Food Microbiology* 25: 278-287.
73. Desai, P. and T. Sheth. 1997. Controlled fermentation of vegetables using mixed inoculum of lactic cultures. *Journal of Food Science and Technology* 34: 155-158.
74. Swain, M.R., M. Anandharaj, R.C. Ray and R. Praveen Rani. 2014. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International* 2014: 250-424.
75. Oum, Y.R. 2005. Authenticity and representation: cuisines and identities in Korean-American diaspora. *Postcolonial Studies* 8: 109-125.

76. Lee, H., H. Yoon, Y. Ji, H. Kim, H. Park, J. Lee, H. Shin and W. Holzapfel. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 145: 155-161.
77. Lee, M., J. Jang, J. Lee, H. Park, H. Choi and T. Kim. 2015. Starter cultures for kimchi fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 559-568.
78. Tamang, J.P., N. Tamang, S. Thapa, S. Dewan, B. Tamang, H. Yonzan, A.K. Rai, R. Chettri, J. Chakrabarty and N. Kharel. 2012. Microorganisms and nutritional value of ethnic fermented foods and alcoholic beverages of northeast India. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 11: 7-25.
79. Das, A. and S. Deka. 2012. Fermented foods and beverages of northeast India. *International Food Research Journal* 19: 377-392.
80. Lahtinen, S., A.C. Ouwehand, S. Salminen and A. von Wright. 2011. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
81. Radberg, K., M. Biernat, A. Linderöth, R. Zabielski, S.G. Pierzynowski and B.R. Westrom. 2001. Enteral exposure to crude red kidney bean lectin induces maturation of the gut in suckling pigs. *Journal of Animal Science* 79: 2669-2678.
82. Jägerstad, M., J. Jastrebova and U. Svensson. 2004. Folate in fermented vegetables—A pilot study. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37: 603-611.
83. Rao, D.R., A.V. Reddy, S.R. Pulusani and P.E. Cornwell. 1984. Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B by lactic acid cultures in skim milk. *Journal of Dairy Science* 67:1169-1174.
84. Lin, M.Y. and C.M. Young. 2000. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 10: 409-413.
85. Crittenden, R.G., N.R. Martinez and M.J. Playne. 2003. Synthesis and utilisation of folate by yogurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80:217-222.
86. Middleton, E., C. Kandaswami and T.C. Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.

87. Birt, D.F., S. Hendrich and W.Q. Wang. 2001. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 90: 157-177.
88. Yao, L.H., Y.M. Jiang, J. Shi, F.A. Tomas-Barberan, N. Datta, R. Singanusong and S.S. Chen. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59: 113-122.
89. Halliwell, B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research* 73: 341-347.
90. Mithen, R.F., M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot and I.T. Johnson. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 967-984.
91. Song, L. and P.J. Thornalley. 2007. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology* 45: 216-224.
92. Nout, M.J.R. and Y. Motarjemi. 1997. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: A joint FAO/WHO workshop. *Food Control* 8: 221-226.
93. Gilliland, S.E., C.R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 377-385.
94. Ushiyama, A., K. Tanaka, Y. Aiba, T. Shiba, A. Takagi, T. Mine and Y. Koga. 2003. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 18: 986-991.
95. Chen, C.C. and A. Walker. 2005. Probiotics and prebiotics: Role in clinical disease states. *Advances in Pediatrics* 52: 77-113
96. Commane, D., R. Hughes, C. Shortt and I. Rowland. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research* 591: 276-289.
97. Zarate, G. and M.E. Nader-Macias. 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology* 43: 174-180.

98. Koo, H.L. and H.L. DuPond. 2006. Current and future developments in travelers' diarrhea therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 4: 417-427.
99. Guandalini, S., L. Pensabene, M.A. Zikri, J.A. Dias, L.G. Casali, H. Hoekstra, S. Kolacek, K. Massar, D. Micetic-Turk, A. Papadopoulou, J.S. de Sousa, B. Sandhu, H. Szajewska and Z. Weizman. 2000. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 30: 54-60.
100. Kim, H.J., M. Camilleri, S. McKinzie, M.B. Lempke, D.D. Burton, G.M. Thomforde and A.R. Zinsmeister. 2003. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 17: 895-904.
101. Tricon, S., S. Willersw, H.A. Smitw, P.G. Burneyz, G. Devereux, A.J. Frew, S. Halkenz, A. Hostz, M. Nelsonk, S. Shaheenz, J.O. Warner and P.C. Calder. 2006. Nutrition and allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy Reviews* 6: 117-188.
102. Betoret, N., L. Puente, M.J. Díaz, M.J. Pagán, M.J. García, M.L. Gras, J. Martinez-Monzo and P. Fito. 2003. Development of probiotic enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering* 56: 273-277.
103. Yoon, K.Y., E.E. Woodams and Y.D. Hang. 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology* 42: 315-318.
104. Yoon, K.Y., E.E. Woodams and Y.D. Hang. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology* 97: 1427-1430.
105. Yoon, K.Y., E.E. Woodams and Y.D. Hang. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology* 38: 73-75.
106. Roessle, C., M.A.E. Auty, N. Brunton, R.T. Gormley and F. Butler. 2010. Evaluation of freshcut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 203-209.

107. Fonteles, T.V., M.G.M. Costa, A.L.T. Jesus and S. Rodrigues. 2011. Optimization of the fermentation of cataloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food and Bioprocess Technology* 5: 2819-2826.
108. Alegre, I., I. Viñas, J. Usall, M. Anguera and M. Abadias. 2011. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology* 28: 59-66.
109. Lavermicocca, P., F. Valerio, S.L. Lonigro, M. De Angelis, L. Morelli, M.L. Callegari, C.G. Rizzello and A. Visconti. 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4233-4240.
110. De Bellis, P., F. Valerio, A. Sisto, S.L. Lonigro and P. Lavermicocca. 2010. Probiotic table olives: Microbial populations adhering on the olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strains *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 in an industrial plant. *International Journal of Food Microbiology* 140: 6-13.
111. Rodríguez-Gómez, F., J. Bautista-Gallego, F.N. Arroyo-López, V. Romero-Gil, R. JiménezDíaz, A. Garrido-Fernández and P. Garcia-Garcia. 2013. Table olive fermentation with multifunctional *Lactobacillus pentosus* strains. *Food Control* 34: 96-105.
112. Randazzo C.L., A. Todaro, A. Pino, I. Pitino, O. Corona, A. Mazzaglia and C. Caggia. 2014. Giarrappa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: Effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. *Food Research International* 82: 1154-1164.
113. Blana, V.A., A. Grounta, C.C. Tassou, G.J. Nychas and E.Z. Panagou. 2014. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology* 38: 208-218.
114. Argyri, A.A., A.A. Nisiotou, A. Malouchos, E.Z. Panagou and C.C. Tassou. 2014. Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains

- from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat-shocked green olives. *International Journal of Food Microbiology* 171:68-76.
115. Sarvan, I., F. Valerio, S.L. Lonigro, S. de Candia, R. Verkerk, M. Dekker and P. Lavermicocca. 2013. Glucosinolate content of blanched cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) fermented by the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMG-P22043. *Food Research International* 54:706-710.
 116. Hadjilouka, A; Paramithiotis, S; Drosinos, EH. Prevalence of *Salmonella* spp. and occurrence of salmonellosis from ready to eat fresh fruits and vegetables. *Salmonella: prevalence, risk factors and treatment options*. Nova Publishers.2014, 79-110.
 117. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin 39.FAO Animal Production and Health Division. 2011. Available online:<http://www.fao.org/3/ai2530e/i2530e03.pdf>. Accessed:13 May 2015.
 118. Islam, M; Doyle, MP; Phatak, SC; Millner, P; Jiang, X. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J. Food Protect.*, 2004, 67, 1365–1370.
 119. Semenov, AV; van Overbeek, L; van Bruggen, AHC. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75, 3206–3215.
 120. Lin, CM; Fernando, SY; Wei, C. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. *Food Control*, 1996, 7 (3), 135-140.
 121. Tournas, VH. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards.*Crit. Rev. Microbiol.*, 2005, 31, 33-44; Available online: <http://dx.doi.org/10.1080/10408410590886024>.
 122. Khalil, RKS; Gomaa, MAE; Khalil; MIM.Detection of shiga-toxin producing *E. coli*(STEC) in leafy greens sold at local retail markets in Alexandria, Egypt. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, 197, 58–64.

123. Ozpinar, H; Turan, B; Tekiner, IH; Tezmen, G; Gokc, I; Akinede, O. Evaluation of pathogenic *Escherichia coli* occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013, 57, 362-367.
124. Abadias, M; Usall, J; Anguera M; Solsona, C; Viñas, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 123, 121–129.
125. Castro-Rosas, J; Cerna-Cortés, JF; Méndez-Reyes, E; Lopez-Hernandez, D; Gómez-Aldapa, CA; Estrada-Garcia, Teresa. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. Coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 156, 176–180.
126. World Health Organization (WHO).Feng, P; Weagant, SD; Grant, MA; Burkhardt, W. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriology Analytical Manual*. 2002. Chapter 4. Available online: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm064948.htm>. Accessed: 17 May 2015.
127. Centers of Disease Control and Prevention (CDC).*E. coli* (*Escherichia coli*) General Information.2014b. <http://www.cdc.gov/ecoli/general/> Page last updated: December 1, 2014.
128. Berry, D; Wells, E. *Escherichia coli* O157:H7: Recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Adv. Food Nutr., Res.* 2010, 60, 67-118.
129. Cohen, MB; Giannella, RA. Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Adv. Intern. Med.*, 1992, 37, 173–195.
130. Harris, LJ; Farber, JN; Beuchat, LR; Parish, ME, Suslow, TV; Garrett, EH; Busta, FF. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, g, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2003, vol 2 (Supplement), 78141.
131. World Health Organization (WHO).Enterohaemorrhagic*Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet NO 125. 2011a. Available

online:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>. Accessed: 14 May 2015.

132. World Health Organization (WHO). 1996 – Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Japan – Update. 1996. Available online: http://www.who.int/csr/don/1996_08_28/en/. Accessed: 12 May 2015.
133. Watanabe, Y; Ozasa, K; Jonathan, MH; Griffin, MP; Masuda, K; Imashuku, S; Sawada, T. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, 5(3), 424-428.
134. Low, JC; Donachie, W. Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.*, 1997, 153, 9-29.
135. Ciesielski, CA; Hightower, AW; Parsons, SK; Broome, CV. Listeriosis in the United States: 1980-1982. *Arch. Intern. Med.*, 1988, 148, 1416-1419.
136. EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011, 9, 2090.
137. EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, 10, 2597.
138. EFSA – European Food Safety Authority. *Listeria*. 2013. <http://www.efsa.europa.eu/topics/topic/listeria.htm> Last updated: 27 June 2013.
139. Wesley, I. Public health impact of food-borne illness: impetus for the international food safety effort. 2009. In N. Heredia, I. Wesley, & S. Garcia (Eds.), *Microbiologically safe foods* (pp. 3-13). United States of America: Wiley, A John Wiley, & Sons, Inc.
140. Cokes, C; France, AM; Reddy, V; Hanson, H; Lee, L; Kornstein, L; Stavinsky, F; Balter, S. Serving high-risk foods in a high-risk setting: survey of hospital food service practices after an outbreak of listeriosis in a hospital. *Infect. Cont. Hosp. Ep.*, 2011, 32, 380-386.
141. Blendon, DC; Szatalowicz, FT. Ecological aspects of listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1967, 151, 1761-1766.

142. Beuchat, LR. World Health Organisation (WHO), Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Geneva: World Health Organisation, 2002.
143. Beuchat, LR. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. Food control, 1996, 7, 223-228.
144. Welshimer, H.J. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriol., 1960, 80, 316-320.
145. Nguyen-the, C; Carlin, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1994, 34, 371-401.
146. Berrang, ME; Brackett, RE. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. J. Food Prot., 1989, 52, 702-705.
147. Brackett, RE. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. Postharvest Biol. Tec., 1999, 15, 305-331.
148. Beuchat, LR; Brackett, RE. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56, 1734-1742.
149. Ho, JL; Shands, KN; Friedland, G; Eckind, P; Fraser, DW. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Intern. Med., 1986, 146, 520-524.
150. Gaul, LK; Farag, NH; Shim, T; 3 Kingsley, MA; Silk, BJ; Trees, EH. Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery – Texas, 2010. Clin. Infect. Dis., 2012, 56, 20-26.
151. Sado, PN; Jinneman, KC; Husby, GJ; Sorg, SM; Omiecinski, CJ. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. J. Food Prot., 1998, 61, 1199-1202.
152. Francis, GA; Thomas, C; O’Beirne, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Int. J. Food Sci. Tech. 1999, 34, 1-22.
153. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Outbreaks associated with Fresh Produce: Incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. 2013. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091268.htm> Last updated:24/04/2013.

154. Abadias, M; Usall, J; Anguera, M; Solsona, C; Vinas I. Microbiological quality of fresh minimally-processed fruits and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 123, 121-129.
155. Lin, CM; Fernando, SY; Wei, CI. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E.coli* O157:H7 in vegetable salads. *Food control*, 1996, 7, 135-140.
156. Cordano, AM; Jacquet, C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarket in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 132, 176-179.
157. Kramarenko, T; Roasto, M; Meremae, K; Kuningas, M; Poltsama, P; Elias, T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 2013, 30, 24-29.
158. Gunasena, DK; Kodokara, CP; Ganepola, K; Widanaparthirana, S. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Sri Lanka. *J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka*, 1995, 23, 107-114.
159. Arumugaswamy, RK; Ali, GRR; Abdul-Hamid, SNB. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. *Int. J Food Microbiol.*, 1999, 23, 117-121.
160. Heisick, JE; Wagner, DE; Nierman, ML; Peeler, JT. *Listeria* spp. Found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 1925-1927.
161. Farber, JM; Sanders, GW; Johnston, MA. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.*, 1989, 52, 456-458.
162. Vahidy, R; Jahan, F; Nasim, R. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh fruits and vegetables. *Hortscience*, 1992, 27, 628.
163. Breer, C; Baumgatner, A. Occurrence and behavior of *Listeria monocytogenes* in salads, vegetables and fresh vegetables juices. *Arch Lebensmittelhyg.*, 1992, 43, 108-110.
164. Garcia-Gimeno, RM; Zurena-Cosano, G; Amaro-Lopez, M. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed salad vegetables in Spain. *J. Food Safety*, 1996, 16, 75-86.

165. Odumeru, JA; Mitchell, SJ; Alves, DM; Lynch, JA; Yee, AJ; Wang, SL; Stylianidis, S; Farber, JM. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health care food services. *J. Food Prot.*, 1997, 60, 954-960.
166. Harvey, J; Gilmour. A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. *Int. J. Food Microbiol.*, 1993, 19, 193-205.
167. Velani, S; Roberts, D. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. In pre packed mixed salads and individual salad ingredients. *PHLS Microbiology Digest*, 1991, 8, 21-22.
168. Beckers, HJ; In't Veld, PH; Soentoro, PSS; Delfgou-van Ash, EHM. The occurrence of *Listeria* in foods. 1989. In: *Foodborne Listeriosis. Proceeding of a Symposium on September 7, 1988, 83-97, Weisbaden, Hamburg, FRG.*
169. MacGowan, AP; Bowker, K; McLauchlin, J; Bennett, PM; Reeves, DS. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. In shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, 21, 325-334.
170. Randhir, R., Lin, Y.-T., & Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 295–307.
171. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
172. Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1410–1416.
173. Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505–4515.

174. Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinions in Lipidology*, 16, 77–84.
175. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
176. Samman, S., Lyons Wall, P. M., & Cook, N. C. (1998). Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In C. A. RiceEvans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease* (pp. 469–482). New York: Marcel Dekker.
177. Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., et al. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494–507.
178. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007–1011.
179. Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 985–1012.
180. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
181. Kalt, W., Ryan, D. A. J., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K., & Kloet, S. P. V. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4761–4767.
182. Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449–7454.

183. Toma's-Barbera'n, F., & Espi'n, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853–876.
184. Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., & Saija, A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4718–4723.
185. Asami, D. K., Hong, Y.-J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolics and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1237–1241.
186. Ha'kkinen, S. H., & To'rro'nen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33, 517–524.
187. Ha'kkinen, S. H., Ka'renlampi, S. O., Mykka'nen, H. M., & To'rro'nen, A. R. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2960–2965.
188. Nagendran Balasundram, Kalyana Sundram, Samir Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99 (2006) 191–203.
189. Zaidi, S. and Dahiya, P. In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *Int. Food R. J.* 22(6): 2440-2445 (2015).
190. E. VARGA, A. BARDOCZ, Á. BELÁK, A. MARÁZ, B. BOROS, A. FELINGER, A. BÖSZÖRMÉNYI, G. HORVÁTH., Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different thymus extracts. *FARMACIA*, 2015, Vol. 63, 3.

191. Shakurfow, F. A. A., Mahmoud, M. Buazzi and Gamal, M. A. B., Assessment of antimicrobial activity of onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on *Listeria monocytogenes*; in vitro study. *Lebda Medical Journal*, vol. 1, June 2015, p.1 -5.
192. Paramithiotis S., Papoutsis G., Drosinos E.H. 2017. Lactic acid fermentation of fruits and vegetables; an overview In: S. Paramithiotis (ed.). *Lactic acid fermentation of fruits and vegetables*, CRC Science, USA, pp. 1-18.
193. Fleming, H.P., K.H. Kyung and F. Breidt. 1995. Vegetable fermentations. pp. 629-662. In: G. Reed and T.W. Nagodawithana (Eds). *Biotechnology*, second completely revised edition, vol. 9. Enzymes, Biomass, Food and Feed. VCH, Weinheim, Germany.
194. Harris, L.J. 1998. The microbiology of vegetable fermentations. Pp. 45-72. In: B.J.B. Wood (Ed). *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
195. Barrangou, R., S.S. Yoon, F. Breidt Jr, H.P. Fleming and T.R. Klaenhammer. 2002. Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2877-2884.
196. Lee, J.S., G.Y. Heo, J.W. Lee, Y.J. Oh, J.A. Park, Y.H. Park, Y.R. Pyun and J.S. Ahn. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 102: 143-150.
197. Chang, H.W., K.H. Kim, Y.D. Nam, S.W. Roh, M.S. Kim, C.O. Jeon, H.M. Oh and J.W. Bae. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 126: 159-166.
198. Jeong, S.H., S.H. Lee, J.Y. Jung, E.J. Choi and C.O. Jeon. 2013b. Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of kimchi. *Journal of Food Science* 78:M763-M769.
199. Yeun, H., H.S. Yang, H.C. Chang and H.Y. Kim. 2013. Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different

- temperatures using a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 76-84.
200. Sesena, S. and M.Ll. Palop. 2007. An ecological study of lactic acid bacteria from Almagro eggplant fermentation brines. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1553-1561.
 201. Chen, Y.S., F. Yanagida and J.S. Hsu. 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology* 101: 125-130.
 202. Chao, S.H., R.J. Wu, K. Watanabe and Y.C. Tsai. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in suantsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 135: 203-210.
 203. Paramithiotis, S., O.L. Hondrodinou and E.H. Drosinos. 2010. Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Research International* 43:1098-1103.
 204. Maifreni, M., M. Marino and L. Conte. 2004. Lactic acid fermentation of Brassica rapa: Chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (brovada). *European Food Research and Technology* 218: 469-473.
 205. Nguyen, D.T.L., K. Van Hoorde, M. Cnockaert, E. De Brandt, M. Aerts, L. Thanh and P.Vandamme. 2013. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology* 163: 19-27.
 206. Goyeneche R, Roura S, Ponce A, Vega-Gálvez A, Quispe-Fuentes I, Uribe E, Di Scala K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods* 16, 256–264.
 207. Beevi S.S., Mangamoori L.N., Gowda B.B. (2012) Polyphenolics profile and antioxidant properties of *Raphanus sativus* L. *Natural Product Research*, 26(6), 557-563

208. Jing, P., Song, H., Shen, S-O, Zhao, S-J., Pang, J., Qian, B-J. (2014). Characterization of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Red Radish Brines during Lactic Acid Fermentation. *Molecules* 19, 9675-9688.
209. Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed* 6(9), 760–766.
210. Bozin, B., Mimica-Dukicb, N., Samojlik, I., Goran, A., Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry* 111, 925–929.
211. Cho G.Y., Lee M.H., Choi C. 2011. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during kimchi fermentation supplemented with raw pork meat. *Food Control* 22, 1253-1260.
212. Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N., Stratford, M., 2000. Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast* 16, 1173–1183.
213. Masana, M.O., Baranyi, J., 2000. Growth/no growth interface of *Brocothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. *Food Microbiology* 17, 485–493.
214. Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 104, 83–91.