ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΔΠΜΣ Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) *«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»*

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

«Μελέτη της επίδρασης της Νισίνης, στο χρόνο ζωής επιδόρπιου γαλακτοκομικού προϊόντος»

Πέτρος-Βασίλειος Δ. Μπαντούνας

Γεωπόνος

Επιβλέπων Καθ: Ακτύπης Αναστάσιος

Αθήνα 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

«Μελέτη της επίδρασης της Νισίνης, στο χρόνο ζωής επιδόρπιου γαλακτοκομικού προϊόντος»

«Study of the effect of Nisin on the shelf life of a dairy product»

Πέτρος-Βασίλειος Δ. Μπαντούνας

Γεωπόνος

Επιβλέπων Καθ: Ακτύπης Αναστάσιος

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής

Ακτύπης Α., (Επιβλέπων) Λέκτορας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου , ΓΠΑ

Τσακαλίδου Ε., (Μέλος) Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου , ΓΠΑ

Τσιπλάκου Ε., (Μέλος) Επικ. Καθηγήτρια του Τμήμα Επιστ. Ζωϊκ. Παραγωγής& Υδ/ργειών , ΓΠΑ

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής είναι η μελέτης της επίδρασης της Νισίνης στο χρόνο ζωής ενός γαλακτοκομικού προϊόντος και συγκεκριμένα του επιδορπίου «Κρέμα βανίλιας». Πραγματοποιήθηκε παρασκευή Κρέμας βανίλιας σε βιομηχανικό επίπεδο από νωπό πλήρες αγελαδινό γάλα με προσθήκη νισίνης σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ 1333/2008) χωρίς την χρήση βακτηριοκαθαριστή.

Το προϊόν αυτό, συσκευάστηκε και συντηρήθηκε στους 7°C και μελετήθηκε διαχρονικά η εξέλιξη διαφόρων αλλοιογόνων μικροβιακών ομάδων και κυρίως σπορογόνων βακίλλων και κλωστριδίων. Ο έλεγχος διενεργούταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, δηλαδή κάθε 7 ημέρες από την ημέρα παρασκευής του έως και τον διπλάσιο χρόνο από την λήξη του προϊόντος που έχει καθορίσει η βιομηχανία. Παράλληλα, εξετάστηκε η βιοδραστικότητα της νισίνης με την μέθοδο Well Diffusion Assay (WDA) και εκτιμήθηκαν τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της κρέμας βανίλιας.

Στόχος είναι η επιμήκυνση της ζωής του συγκεκριμένου γαλακτοκομικού προϊόντος και η ασφάλεια των καταναλωτών. Επιπλέον, επιχειρείται να δοθεί διέξοδος σε μικρές Γαλακτοκομικές επιχειρήσεις που λόγω του μεγάλου ανταγωνισμού πρέπει να μειώσουν τις δαπάνες τους παράγοντας προϊόντα που θα έχουν μεγάλο χρόνο ζωής με τρόπους που να μην είναι οικονομικά ασύμφορη και χωρίς την χρήση δαπανηρού εξοπλισμού. Με αυτόν τον τρόπο θα εξάγουν τα προϊόντα τους στο εξωτερικό χωρίς να διακυβεύεται η ασφάλεια των καταναλωτών.

Λέξεις κλειδιά: κρέμα βανίλια, νισίνη

Abstract

The subject of this diploma thesis is the study of the effect of Nisin on the life of a dairy product, namely the dessert "Vanilla cream". An industrial vanilla cream was made from fresh cow's milk with added nisin according to European Union Regulation (EU 1333/2008) without the use of a bacterial cleaner.

This product was packaged and preserved at 7°C and the evolution of various pathogenic microbial groups and mainly *sporogenic bacilli* and *clostridiums* was studied over time. The inspection was carried out at regular intervals, every 7 days from the day of manufacture up to twice the end of the product determined by the industry. At the same time, the bioavailability of nisin was examined by the Well Diffusion Assay (WDA) method and the physicochemical and organoleptic characteristics of the vanilla cream.

The aim is to extend the lifetime of the dairy product concerned and consumer safety. In addition, attempts are made to give way to small dairy businesses which, due to their high competition, have to reduce their costs by producing products that have a long life in ways that are not economically unprofitable and without the use of expensive equipment. In this way they will export their products abroad without jeopardizing consumer safety.

Keywords: vanilla cream, nisin

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού Προγράμματος ΔΠΜΣ Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»

Πριν από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που συνεργάστηκα μαζί τους, με βοήθησαν και διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας κ. Ακτύπη Αναστάσιο για την πολύτιμη καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, ιδίως την κα. Ευγενία Μανωλοπούλου και την κα. Κάτια Γεωργαλά, για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια της ακαδημαϊκής μου φοίτησης.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη **3**

Abstract **4**

Θεωρητικό μέρος **10-48**

1 Ιστορία της πουτίγκας **10-11**

2 Κλάδος των Γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα **11**

3 Επιδόρπια Γάλακτος **12-14**

3.1 Ρυζόγαλο 12

3.2 Επιδόρπια 12

3.3 Κρέμα 13

3.3.1 Επιδόρπια με βάση την κρέμα 13-14

4 Μικροβιολογία στις κρέμες και στο γάλα παρασκευής τους **14-22**

4.1 Τύποι μικροοργανισμών νωπού γάλακτος **14-18**

4.1.1 Θερμοδυναμική μικροχλωρίδα 14-15

4.1.2 Ψυχρότροφη μικροχλωρίδα 16-17

4.1.3 Κολοβακτηρίδια 17-18

4.2 Τύποι μικροοργανισμών στην κρέμας **18-21**

4.2.1 Μικροβιολογία επιδορπίων 18-19

4.2.2 Αναερόβια σπόρια 19

4.2.3 Αερόβια σπόρια 19-20

4.2.4 Ψευδομονάδα 20

4.2.5 Ζύμες 21

5. Ποιότητα κρέμας **21-23**

5.1 Διατήρηση της ποιότητας ή της διάρκειας ζωής 21

5.2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην κακή ποιότητα της κρέμας 22

5.3 Ποιότητα ακατέργαστου γάλακτος 22-23

6. Συντήρηση **23-24**

6.1 Συντήρηση κρέμας 23

6.2 Θερμοκρασία συντήρησης 23-24

7. Έλεγχος υγιεινής στην επεξεργασία κρέμας **24-25**

8. Μικροοργανισμοί που προκαλούν ελαττώματα στην κρέμα **25**

9. Αλλοιώσεις της κρέμας **25-26**

10. Πικρή γεύση στην κρέμα 27
11. Παραγωγική διαδικασία 28-29
11.1 Βιομηχανική παραγωγή επιδορπίου «κρέμας» 28-29
12 Κρίσιμα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας 29-32
12.1 Διαδικασία υψηλής παστερίωσης (UHT) στην κρέμα 29-30
12.2 Hot filling 30-31
12.3 Συσκευασία Κρέμας 31-32
13 Έλεγχος κρέμας 32
13.1 Μακροσκοπικός Ποιοτικός έλεγχος κρέμας 32
13.2 Εργαστηριακός χημικός έλεγχος κρέμας 32
13.3 Μικροβιολογικός έλεγχος κρέμας 32
14. Νομοθεσία 33-36
14.1 Εισαγωγή 33
14.2 Συσκευασία…….. 33-34
14.3 Πρόσθετα 34-35
14.4 Επιτρεπόμενα όρια μικροοργανισμών στα διαφορά είδη κρέμας 35-36
14.5 Επιτρεπόμενα όρια μικροοργανισμών σε νωπό αγελαδινό γάλα 36
15. Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες 36-46
15.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια 36-41
15.2 Βακτηριοσίνες 41-43
15.2.1 Νισίνη 43-46
Σκοπός και αντικείμενο πτυχιακής 46-47
Πειραματικό μέρος 47-95
16 Υλικά και Μέθοδοι 47-95
16.1 Παραγωγή Βιομηχανικής Κρέμας βανίλιας 47
16.2 Μέθοδος ανίχνευσης της βιοδραστικότητας 48-51
16.2.1 Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (Well Diffusion Assay, WDA) ..... .48
16.2.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς συγκεντρώσεων Νισίνης48-49
16.2.3 Επιλογή ευαίσθητων μικροοργανισμών ‘Δεικτών’ για την WDA..... 49

16.2.3.1 Υποστρώματα για την WDA 49-51

16.3 Πρωτόκολλο εκχύλισης της νισίνης από κρέμα..... 51

16.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις κρέμας και γάλακτος παρασκευής ... 51-60

16.4.1 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης 51-60

16.4.1.1 Μέθοδος δειγματοληψίας..... 51-52

16.4.1.2 Μέθοδος Αρίθμησης ΟΜΧ 52-55

16.4.1.3 Μέθοδος Αρίθμησης κολοβακτηριδίων 55-56

16.4.1.4 Μέθοδος Αρίθμησης ψυχρότροφων..... 56

16.4.1.5 Μέθοδος Αρίθμησης αναερόβιων σπόρων αερόβιων σπόρων βακίλλων μεσόφιλων-θερμόφιλων 56-57

16.4.1.6 Μέθοδος Αρίθμησης αναερόβιων σπόρων κλωστριδίων μεσόφιλων-θερμόφιλων 57-58

16.4.1.7 Μέθοδος Αρίθμησης Ζυμών-Μυκήτων 58-59

16.4.1.8 Μέθοδος αρίθμησης αποικιών 59-60

16.4.2 Υποστρώματα μικροβιολογικών αναλύσεων 60-63

16.5 Μέθοδοι Χημικών αναλύσεων κρέμας 63-70

16.5.1 Προσδιορισμός Ξηράς ουσίας/Υγρασίας..... 63-64

16.5.1.1 Υλικά..... 63

16.5.1.2 Μέθοδος προσδιορισμού Ξηράς ουσίας/Υγρασίας..... 63-64

16.5.2 Προσδιορισμός Λίπους..... 64-65

16.5.2.1 Υλικά..... 64

16.5.2.2 Αντιδραστήρια..... 64

16.5.2.3 Μέθοδος Gerber-Van Gulik 64-65

16.5.3 Προσδιορισμός ολικού αζώτου/πρωτεΐνης..... 65-68

16.5.3.1 Αντιδραστήρια..... 65-66

16.5.3.2 Μέθοδος Kjeldalh..... 66-68

16.5.4 Ηλεκτρομετρικός προσδιορισμός του pH 69

16.5.5 Μέθοδος οργανοληπτικής αξιολόγησης της κρέμας 69-70

17 Αποτελέσματα και συζήτηση 70-94

17.1 Αποτελέσματα βιοδραστικότητας της νισίνης..... 70-74

17.1.1 Επιλογή κατάλληλων στελεχών ώστε να προσδιοριστεί η βιοενεργότητα της Νισίνης σε IU με stock νισίνης 70-73

17.1.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας της Νισίνης στην Κρέμα κατά την συντήρησή της στους 7 ºC 73-74

17.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων..... 74-87

17.2.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων στο γάλα 74-75

17.2.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων στην κρέμας 75-87

17.2.2.1 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (ΟΜΧ)..... 75-77

17.2.2.2 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Κολοβακτηριδίων(coliforms)77-78

17.2.2.3 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Ψυχρότροφων..... 78-79

17.2.2.4 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Σπορογόνων Βακίλλων 80-83

17.2.2.5 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Σπορογόνων Κλωστριδίων.. 83-86

17.2.2.6 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Ζυμών- Μυκήτων..... 86-87

17.3 Αποτελέσματα φυσικοχημικών αναλύσεων 87-90

17.3.1 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης του pH 87-89

17.3.2 Αποτελέσματα λιποπεριεκτικότητας, ολικού αζώτου/πρωτεΐνης, ξηράς ουσίας και υγρασίας κρέμας νισίνης 90

17.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών..... 90-94

17.4.1 Διαχρονική σύγκριση αποτελεσμάτων οργανοληπτικού ελέγχου 90-94

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... 94-96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... 97

Βιβλιογραφία 98-106

Ξένη βιβλιογραφία..... 98-105

Ελληνική βιβλιογραφία..... 105-106

Θεωρητικό μέρος

1. Ιστορία της πουτίγκας

Η ιστορία της πουτίγκας είναι ένα πολύπλοκο και ταυτόχρονα ενδιαφέρον θέμα διότι με το όνομα αυτό ονομάστηκαν πολλά διαφορετικά είδη τροφίμων ανά τους αιώνες. Υπάρχουν δύο θεωρίες για την προέλευση της πουτίγκας. Η μία υποστηρίζει ότι προέρχεται από το γαλλικό *boudin,* ενώ η άλλη από το λατινικό *botellus*, που σημαίνει "μικρό λουκάνικο". Τη σήμερον ημέρα, με τον όρο πουτίγκα αναφερόμαστε κυρίως σε επιδόρπια, σε αντίθεση με τα πρότερα χρόνια, που παρέπεμπε αποκλειστικά στα αλμυρά πιάτα. Κυρίως, όμως, σε εκείνα που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας μια διαδικασία παρόμοια με λουκάνικα, όπου κρέατα και άλλα συστατικά είναι εγκιβωτισμένα σε μια κυρίως υγρή μορφή και βράζονται ή τοποθετούνται στον ατμό. Η Μαύρη πουτίγκα του Yorkshire και Haggis επιβιώνουν αυτής της παράδοσης (John F. Mariani, 1999).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε ορισμένες περιοχές του Καναδά χαρακτηρίζεται ως ένα επιδόρπιο που έχει βάση το γάλα, υποδηλώνοντας χαρακτηριστικά παρόμοια με κρέμες που έχουν βάση το αυγό και με στιγμιαίες κρέμες ή με μους, συχνά εμπορικά τοποθετημένες, χρησιμοποιώντας άμυλο καλαμποκιού, ζελατίνη ή παρόμοιο παράγοντα κολλαγόνου. Η ιστορία της κρέμας είναι εξίσου αρχαία και παρόλο που αυτό το φαγητό ακολούθησε ένα ξεχωριστό μονοπάτι, κατάφερε να συγκλίνει με την πουτίγκα της Αμερική του 19ου αιώνα.

Οι ιστορικοί τροφίμων συμφωνούν, σε γενικές γραμμές, ότι οι πρώτες πουτίγκες που παρήχθησαν στην Βρετανία τον 17^{ο} αιώνα ήταν είτε αλμυρές (με βάση το κρέας) είτε γλυκές (αλεύρι, ξηροί καρποί και ζάχαρη) και ήταν βρασμένες σε ειδικές σακούλες για πουτίγκα. Από τον δεύτερο μισό του 18ου αιώνα, οι παραδοσιακές αγγλικές πουτίγκες δεν περιείχαν πλέον κρέας. Τον 19^{ο} αιώνα ήταν ακόμα βρασμένες, αλλά το τελικό προϊόν ήταν περισσότερο σαν κέικ. Στην Αγγλία κατά την διάρκεια των Χριστουγέννων οι πουτίγκες εξακολουθούν να σερβίρονται κατά παράδοση (Olver, Lynne, 2000).

Αναφέρθηκε προηγουμένως, ότι οι δρόμοι της πουτίγκας συγκλίνουν με της κρέμας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην Γαλλική κουζίνα η κρέμα δεν έχει κανένα κοινό με την κρέμα της Αγγλικής κουζίνας. Είναι ένας λεπτός τύπος κρέμας Anglaise, σε αντίθεση με το Creme patissiere που είναι το ισοδύναμο της κρέμας ζαχαροπλαστικής. Επιπλέον, οι τάσεις της αγγλικής εποχής υποδηλώνουν ένα λιγότερο πλούσιο είδος από ότι το γαλλικό μείγμα. Το Creme patissiere αποτελείται από κρόκους αυγών, γάλα, ζάχαρη και λίγο αλεύρι, με βανίλια ή

με κάποια άλλη γεύση. Είναι η ελαφριά εκδοχή που χρησιμοποιείται στα γεμίσματα Eclair και Saint Honore που επίσης περιέχει χτυπημένα ασπράδια αυγών (Oxford Companion to Food, Alan Davidson).

Η πουτίγκα μπορεί, επίσης, να αναφέρεται και σαν πουτίγκα ρυζιού. Είναι ένα αρχαίο πιάτο που απολάμβαναν πολλοί πολιτισμοί και κουζίνες. Αυτό το τρόφιμο έχει τις ρίζες του από την μέση Ανατολή και έχει συνδεθεί με την καλή διατροφή και την εύκολη πέψη. Σε όλη την ιστορία, η πουτίγκα ρυζιού συνιστάται για τους νέους, τους ηλικιωμένους και τους ανθρώπους όλων των ηλικιών με παθήσεις του στομάχου. Τον 19^{ο} αιώνα, μάλιστα, η Αμερική συνταγογραφούσε πουτίγκες με αραβόσιτο και ταπιόκα για τον ίδιο λόγο.

Η νέα τάση την σήμερον ημέρα, είναι να φτιάχνονται οι πουτίγκες με άμυλο από Ταπιόκα (Tapioca, πορτογαλική προφορά: tapiˈɔkɐ) ως πυκνωτικός παράγοντας (Alan Davidson, 1999) και το πιο βασικό είναι ότι επιτρέπεται η χρήση της νισίνης βάση της ευρωπαϊκής αρχής για την ασφάλεια των καταναλωτών.

2. Κλάδος των Γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα

Ο κλάδος των γαλακτοκομικών προϊόντων βρίσκεται σε κυρίαρχη θέση στον ευρύτερο κλάδο των τροφίμων, όπου δραστηριοποιούνται μερικές από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες ειδών διατροφής της χώρας. Οι συγκεκριμένες βιομηχανίες δαπανούν μεγάλο όγκο κεφαλαίων για βελτίωση τόσο του εξοπλισμού τους όσο και των επενδυτικών σχεδίων τους. Από την άλλη πλευρά, στον εξεταζόμενο αυτό κλάδο δραστηριοποιείται σημαντικός αριθμός νεοσύστατων παραγωγικών επιχειρήσεων, οι περισσότερες των οποίων είναι μικρού μεγέθους με χαμηλή παραγωγική δυναμική. Οι μεγάλες βιομηχανίες κατέχουν υπερσύγχρονο μηχανολογικό εξοπλισμό, οργανωμένο δίκτυο διανομής και προσφέρουν στην αγορά ποικιλία προϊόντων. Αντίθετα, οι μικρές παραγωγικές μονάδες εξαιτίας της έλλειψης κεφαλαίου αλλά και γενικότερων δυσχερειών που αντιμετωπίζουν, λειτουργούν σε περιορισμένη κλίμακα και καλύπτουν κυρίως την γεωγραφική περιοχή στην οποία δραστηριοποιούνται προσφέροντας παραδοσιακά προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας. Ο κλάδος συμπληρώνεται από έναν αξιόλογο αριθμό εταιριών, οι οποίες πραγματοποιούν εισαγωγές γαλακτοκομικών προϊόντων και εντάσσονται στον ευρύτερο κλάδο των ειδών διατροφής. Βασικό σημείο αναφοράς του κλάδου είναι το γεγονός ότι το σύνολο της εγχώριας πρωτογενούς παραγωγής αγελαδινού γάλακτος καθορίζεται από το καθεστώς των ποσοστώσεων.

3. Επιδόρπια γάλακτος

3.1 Ρυζόγαλο

Στα επιδόρπια με βάση το γάλα εντάσσεται και το ρυζόγαλο, το οποίο παρήχθη παραδοσιακά στην Ελλάδα ως σπιτικό προϊόν, αλλά σήμερα εμπορεύεται σε αυξανόμενο βαθμό. Αποτελεί γαλακτοκομικό προϊόν που παρασκευάζεται από νωπό, παστεριωμένο, μη πλήρες γάλα, ρύζι και ζάχαρη με λίπος γάλακτος 3% τουλάχιστον. Κατά την παρασκευή του, επιτρέπεται η προσθήκη μικρής ποσότητας αμυλούχων ουσιών, κρόκου αυγού και σκόνη κανέλας επιφανειακά. Επιπροσθέτως, επιτρέπεται η προσθήκη καφέ, χυμού φρούτων, κομματιών φρούτων, κ.λ.π., με μόνη προϋπόθεση ότι στη συσκευασία θα πρέπει να αναγράφεται η φράση ρυζόγαλο και το είδος της προσθήκης. Τέλος, απαγορεύεται ρητά η προσθήκη νερού με οποιονδήποτε τρόπο και η χρησιμοποίηση υλών με σκοπό τον χρωματισμό του προϊόντος, με εξαίρεση τον κρόκο αυγού (Άρθρο 80 του κώδικα τροφίμων και ποτών (ΚΤΠ).

3.2 Επιδόρπια

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.) ως επιδόρπιο ορίζεται "το έτοιμο προϊόν που προορίζεται για κατανάλωση και παρασκευάζεται από μια ή περισσότερες κατηγορίες γάλακτος που προβλέπονται από το άρθρο 80 του Κ.Τ.Π (2003), προϊόντα γάλακτος ή και συστατικά γάλακτος (πρωτεΐνη γάλακτος, λακτόζη) ή και μαγιά γιαουρτιού". Και στις δύο περιπτώσεις τα παραπάνω προϊόντα γάλακτος ή το γάλα πρέπει να είναι σε αναλογία 75% τουλάχιστον κατά βάρος του τελικού προϊόντος, αναγόμενο σε νωπό γάλα, σακχαρούχες γλυκαντικές ύλες (σακχαρόζη ή άλλο σάκχαρο), φυσικές αρωματικές ουσίες, χυμούς φρούτων, κακάο σκόνη (λιποπεριεκτικότητας 10% τουλάχιστον σε βούτυρο κακάο), σοκολάτα ή εκχύλισμα καφέ με ή χωρίς καφεΐνη και άλλες φυσικές ουσίες που δίνουν γεύση και άρωμα. Επιπλέον, στα παραπάνω προϊόντα επιτρέπεται η προσθήκη τεχνικών αρωματικών και χρωστικών υλών, σταθεροποιητών (κερραγενάνη, αραβικό κόμμι, εδώδιμη ζελατίνη κ.α.), πυκνωτικών και πηκτικών υλών, εφόσον αυτές επιτρέπονται από τον Codex Alimentarius (Μάντης, 2000).

3.3 Κρέμα

Κρέμα ορίζεται η πάστα αμύλου με βάση την πρωτεΐνη γάλακτος που έχει ημιστερεά υφή. Είναι ένα εναιώρημα παραμορφωμένων σωματιδίων, τα οποία είναι διάσπαρτα σε ένα μέσο που περιέχει πρωτεΐνη γάλακτος ως παράγοντα πηκτωματοποίησης. Θεωρείται επιδόρπιο το όποιο προτιμάται σε μεγάλο βαθμό από το καταναλωτικό κοινό λόγω της εμφάνισης, της γεύση και της υφής (Shruti Puri, Bhavnita Dhillon, Sidhant Banura., 2015). Για τους παρασκευαστές αποτελεί πρόκληση το να αυξάνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος όλο και περισσότερο εξαιτίας του γεγονότος ότι η ψύξη είναι η μόνη άμυνα που διαθέτει ενάντια στους μικροοργανισμούς που το αλλοιώνουν. Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών, η κρέμα παρασκευάζεται από νωπό, παστεριωμένο ή μη πλήρες γάλα, κρόκους αυγών, αμυλούχες ουσίες και ζάχαρη με λίπος γάλακτος 4% τουλάχιστον. Επιπλέον, θα πρέπει να εμπεριέχει 1 κρόκο αυγού ανά χιλιοστό παραγόμενου προϊόντος. Επιτρέπεται η σκόνη κανέλας επιφανειακά για τεχνητό αρωματισμό, ενώ απαγορεύεται η χρήση υλών που μπορούν να προκαλέσουν τεχνητή χρώση, με εξαίρεση, βέβαια, τον κρόκο αυγών (Άρθρο 80 του κώδικα τροφίμων και ποτών (ΚΤΠ).

3.3.1 Επιδόρπια με βάση την κρέμα

Στο Ηνωμένο Βασίλειο όσον αφορά τα επιδόρπια, δεν υπάρχει νόμιμος προσδιορισμός, εκτός από μια βολική για μας περιγραφή όπου τα συστατικά του γάλακτος ρυθμίζονται έτσι ώστε να είναι τουλάχιστον 40% ξηρής ουσίας. Τα περισσότερα επιδόρπια είναι σακχαρούχα και περιέχουν ζυμωμένα συστατικά. Τα επιδόρπια με βάση την κρέμα μπορεί να είναι πολλαπλών συστατικών ή απλής σύνθεσης. Ένα παράδειγμα απλής σύνθεσης είναι οι πουτίγκες, οι οποίες παράγονται από ένα θερμικά επεξεργασμένο μείγμα, το οποίο αποτελείται από αποβουτυρωμένο γάλα, κρέμα, ζάχαρη και πηκτικούς παράγοντες όπως το άμυλο. Επιπλέον, συστατικά που προστίθενται είναι η κερραγενάνη, κόμμι χαρουπιών και ζελατίνη με σκοπό να δημιουργηθεί ένα σταθερό προϊόν. Η θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι το ελάχιστο παστερίωση, ιδιαίτερα αν χρησιμοποιούμε φυσικά άμυλα έτσι ώστε τα μικροβιολογικά προβλήματα που πιθανόν να προκύψουν να είναι από θερμόφιλους μικροοργανισμούς, ειδικά σπορογόνους, και από μολύνσεις που θα δημιουργηθούν μετά την παστερίωση. Επιπλέον, με την προσθήκη της νισίνης έχουμε και αύξηση του χρόνου ζωής του σε κρέμες σε συντήρηση στους 7ºC (Anonymous, 1985). Τέλος, στα Επιδόρπια ένας

παράγοντας που ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών, κυρίως ζυμών μυκήτων, είναι η προσθήκη ζάχαρης.

Πίνακας 3.1: Σταθερότυποι βιώσιμων μικροοργανισμών σε Επιδόρπια (cfu/g)

	Στόχος	Αποδεκτά όρια	Αμφίβολα όρια	Απορριφθέντα
ΟΜΧ	*<1000*	1000-5000	5000-20000	>20000
Κολοβακτηρίδια	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Απουσία
Ζύμες	<10	10-50	50-100	>100
Μύκητες	<10	10-50	50-100	>100

Πηγή: **Dairy Microbiology Handbook The Microbiology of Milk and Milk Products.**

4. Μικροβιολογία στις κρέμες και στο γάλα παρασκευής τους

4.1 Τύποι μικροοργανισμών νωπού γάλακτος

4.1.1 Θερμοανθεκτική μικροχλωρίδα

Η μικροχλωρίδα του γάλακτος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μικροβιακό προφίλ της κρέμας, ενώ έχει άμεση σχέση και στον χρόνο διατήρησης της κρέμας. Μετά την παστερίωση του γάλακτος τα θερμοανθεκτικά στελέχη, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 4.1, όπως το *Microbacterium lacticum* και τα σπόρια βακτηρίων, επιβιώνουν σε μεγάλο ποσοστό. Μερικά *Micrococcus spp* είναι ελαφρώς λιγότερο ανθεκτικά στη θερμότητα και όσον αφορά τα στελέχη *Alcaligenes tolerans* μπορεί να υπάρξει επιβίωση σε ποσοστό 1-10%. Τα είδη των στρεπτόκοκκων (π.χ. *Enterobacter faecalis*), λακτοβακίλλων και ορισμένων κορυνοβακτηρίων επιβιώνουν σε θερμοκρασία 60°C/20 min, ενώ ένα μικρό ποσοστό συνήθως επιβιώνει στους 63°C για 30 min. Είδη Κολοβακτηριδίων, όπως *Escherichia coli*, που βρίσκονται στο γάλα μετά την διαδικασία της παστερίωσης, συνήθως μπορούν να αποδοθούν στη μόλυνση κατά την πλήρωση ή την αποθήκευση. Οι Olson, Macy και Hadvorson (1952) εκτίμησαν την θερμική αντίσταση του *E. coli* σε συνθήκες όπως η συλλογή και η ψύξη του νωπού γάλακτος. Επέδειξαν, μάλιστα, ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης αυτού του βακτηρίου, παρουσιάζονταν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Έτσι, εισήχθη ο όρος της Z τιμής ως

η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση/αύξηση της D-τιμής κατά ένα λογαριθμικό κύκλο, όπου έγιναν προσαρμογές στις θερμοκρασίες παστερίωσης για την καταστροφή του.

Αντιθέτως, η περιεκτικότητα του νωπού γάλακτος σε σπόρια *Bacillus* ξεπερνούν τα 5000 ml^{-1} κατά τη διάρκεια του χειμώνα, σε αντιδιαστολή με το καλοκαίρι. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα βακτηρίδια κυριαρχούν στη μικροχλωρίδα του γάλακτος κατά τη διάρκεια του χειμώνα, προερχόμενα κατά κύριο λόγο από επιφάνειες των θηλών που έρχονται σε επαφή με τα υλικά στρωμνής, και το χώμα που σχετίζεται με τη στέγαση του ζωικού κεφαλαίου γαλακτοπαραγωγής.

Ο *Bacillus licheniformis* είναι το πιο συνηθισμένο είδος που βρίσκεται στο γάλα μετά την συλλογή του, ενώ ο *Bacillus cereus* βρίσκεται σποραδικά. Τα σπόρια *Bacillus cereus* απαντώνται συχνά στα δοχεία συλλογής γάλακτος και συνεπώς στο ίδιο το γάλα. Σε αντίθεση με μικρόκοκκους και *Microbacterium spp*, τα οποία προέρχονται από τον εξοπλισμό συλλογής γάλακτος. Υπάρχουν περιπτώσεις που είναι τόσο πολύ επιφορτισμένο, όπου οι μετρήσεις συχνά υπερβαίνουν τα $5x10^4$ ml^{-1}. Οι περισσότεροι θερμοάντοχοι οργανισμοί παραμένουν σταθεροί ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι και 24 ώρες, γεγονός που αποτελεί αξιόπιστη ένδειξη μόλυνσης από τον εξοπλισμό αρμέγματος. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ως δείκτης κακώς απολυμασμένου εξοπλισμού αρμέγματος (Luck, 1972).

Όσον αφορά τα σπόρια *Clostridium spp*., ανιχνεύονται στο νωπό γάλα σε κανονικούς πληθυσμούς λόγω της θερμοανθεκτικοτητάς τους. Η απομόνωση και η ανίχνευση του *Clostridium spp*. πραγματοποιείται κάτω από αναερόβιες συνθήκες με τη χρήση κατάλληλων μέσων. Οι μετρήσεις των *Clostridium* σπορίων βρέθηκαν να είναι υψηλότερες το χειμώνα, επειδή προέρχονται κυρίως από ενσίρωμα που χρησιμοποιείται για τη χειμερινή σίτιση των ζώων και από τα υλικά της στρωμνής. Όταν οι αριθμοί σπόρων *Clostridium tyrobutyricum* υπάρχουν σε γάλα που υπερβαίνει το 1 spore ml^{-1} λόγω κακής ποιότητας ενσιρώματος, η βιομηχανία αποφεύγει να παρασκευάσει ορισμένα είδη τυριών, όπως το Gruyere και Emmental. Σε αντίθεση με τις αγελάδες που τρέφονται σε βοσκότοπο, που ο αριθμός των *Clostridium* σπορίων είναι μειωμένος συνήθως <1 ml^{-1}. Τέλος, σύμφωνα με τον (Goudkov and Sharpe, 1965, το Clostridium δεν πολλαπλασιάζεται στο νωπό γάλα.

4.1.2 Ψυχρότροφη μικροχλωρίδα

Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι που μπορούν να ευδοκιμήσουν κάτω από ψυχρές θερμοκρασίες (3-7°C) (Cousin, 1982). Στο νωπό γάλα οι Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι απαντώνται πιο συχνά, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 4.1. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη του *Pseudomonas spp*. αποτελούν το 50% των Gram αρνητικών. Τέτοιοι είναι: *Pseudomonas jluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas fragi* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τα γένη *Flavobacterium, Acinetobacter, Moraxella, Achrombacter, Alcaligenes, Chromobacterium, Aeromonas, Klebsiella* και τα κολοβακτηρίδια περιλαμβάνουν τα περισσότερα ψυχρότροφα από Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς (Witter, 1961 · Juffs, 1973, Cousin, 1982). Επιπροσθέτως, έχουν το χαρακτηριστικό ότι κάποιοι από αυτούς παράγουν εξωκυτταρικές, θερμοανθεκτικές λιπάσες που προκαλούν ταγγισμένη γεύση, καθώς και πρωτεϊνάσες που προκαλούν αποικοδόμηση της καζεΐνης.

Μερικά είδη μπορούν να παράγουν τόσο λιπολυτικά όσο και καζεϊνολυτικά ένζυμα, όπως η *Pseudomonas fluorescens*. Με την παστερίωση, όσο και να καταστρέφονται τα Gram-αρνητικά ψυχρότροφα, τα ένζυμά τους παραμένουν ενεργά. Κατά συνέπεια, οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν μεγάλη σημασία στα γαλακτοκομικά προϊόντα διότι η ύπαρξή τους μάς μαρτυρά μόλυνση μετά την παστερίωση(Phillips et al., 1981, Cousin, 1982). Τα στελέχη του *Bacillus spp*. όπως: *B. coagulans, B. circulars, B. cereus, B. pumilus* και *B. subtilis,* είναι σπορογόνα και η παραγωγή τους είναι χαμηλή στο νωπό γάλα, και πιο συγκεκριμένα μόλις $10ml^{-1}$ (Witter, 1961, Juffs, 1973, Mikolajcik 2979, Cousin 1982, McKinnon and Pettipher 1983). Το *Arthrobacter* και άλλα Gram θετικά είδη (π.χ. στρεπτόκοκκοι) είναι επίσης ψυχρότροφα.

Τα ψυχρότροφα, τα οποία κυρίως προέρχονται από την θηλή, είναι μια σχετικά ανενεργή ομάδα που περιλαμβάνει σπόρια από μικροοργανισμούς του γένους *Corynebacterium* και Gram αρνητικά ραβδοειδής μορφής. Η ελλιπής απολύμανση του εξοπλισμού αρμέγματος είναι ένας από τους κύριους λόγους ύπαρξης ψυχρότροφων Gram αρνητικών στο νωπό γάλα. Οι Panes et aL. (1979) βρήκαν συντελεστή συσχέτισης 0,66 μεταξύ των μετρήσεων σε ψυχρότροφους και Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, σε δείγματα γάλακτος που πάρθηκαν από δεξαμενή μεμονωμένων εκμεταλλεύσεων. Στη συγκεκριμένη έρευνα, ο γεωμετρικός μέσος όρος των ψυχρότροφων, σε 1305 ml^{-1}, ήταν μόνο 7% του γεωμετρικού μέσου όρου της μεθόδου αρίθμησης τρυβλίων σε ~$20,000ml^{-1}$. Όμως, το 25%

των 5000 δειγμάτων που εξετάστηκαν έδωσαν αριθμούς ψυχρότροφων σε μεγαλύτερο από 5000 ml^{-1} '. Επιπλέον, το 25% των εκμεταλλεύσεων είχε αριθμό μεγαλύτερο από 50,000 ml^{-1} κατά τη διάρκεια ενός έτους. Τα αποτελέσματα της έρευνας για παρόμοιες μελέτες αναφέρονται από τους Luck (1972) και Mikolajczyk (1979). Τέλος, οι Griffiths et al. (1984) περιγράφουν μια δοκιμασία προ επώασης, επιτρέποντας την ταχύτερη απαρίθμηση των ψυχρόφιλων εντός 26 ωρών.

Πίνακας 4.1 Θερμοανθεκτικοί και ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί στο νωπό γάλα

Ομάδες Θερμοανθεκτικών	Ομάδες ψυχρότροφων
Microbacterium	*Acinetobacter- Moraxella*
Micrococcus	*Flavobacterium*
Bacillus spores	*Enterobacter*
Clostridium spores	*Alcaligenes*
Alcaligenes	*Bacillus*
	Arthrobacter

Πηγή: (Witter, 1961 ; Juffs, 1973; Cousin, 1982)

4.1.3 Κολοβακτηρίδια

Τα κολοβακτηρίδια στο γάλα ανήκουν κυρίως στα γένη *Enterbacter* και *E. Coli*. Είναι δείκτες υγιεινής και οφείλεται εν μέρει στη σχέση τους με την μόλυνση από την περιττωματική προέλευση και τον επακόλουθο κίνδυνο εμφάνισης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Η παρουσία τους στο νωπό γάλα δεν αποτελεί ένδειξη άμεσης μόλυνσης από κοπριά και δεν πρέπει να βασίζεται μόνο στην ανίχνευση ανεπαρκούς καθαρισμού του μαστού πριν από το άρμεγμα. Τα κολοβακτηρίδια μπορούν να συσσωρευτούν γρήγορα σε υγρά, γαλακτώδη υπολείμματα μέσα στον εξοπλισμό αρμέγματος και στη συνέχεια να αποτελέσουν πηγή σοβαρής μόλυνσης του γάλακτος που συλλέγεται και κατά συνέπεια στα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται (π.χ κρέμα). Ωστόσο, σχετικά χαμηλές μετρήσεις κολοβακτηριδίων στο γάλα δεν αποδεικνύουν απαραίτητα αποτελεσματικό καθαρισμό και απολύμανση του εξοπλισμού. Σε περίπτωση που οι μετρήσεις αυτές υπερβαίνουν τακτικά τα 100ml^{-1}, θεωρούνται από ορισμένους υγειονομικούς φορείς ως αποδεικτικό μη ορθών πρακτικών στην παραγωγή. Από την άλλη πλευρά, ένας υψηλός αριθμός κολοβακτηριδίων μπορεί να σχετίζεται με μια υποκλινική μαστίτιδα των ζώων της εκμετάλλευσης.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι μετρήσεις γίνονται με διαφορετικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, αντί να γίνεται αξιολόγηση της θηλής για τον αριθμό των κολοβακτηριοειδών

πριν πραγματοποιηθεί το άρμεγμα, συλλέγεται δείγμα από την δεξαμενή γάλακτος της γεωργικής εκμετάλλευσης (USDHHS, 1999). Αξιοσημείωτο είναι ότι ορισμένα είδη των κολοβακτηριδίων είναι ψυχρότροφα και αποτελούν το 10-30% της μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος που απομονώθηκε στους 57°C. Η πλειοψηφία αυτών των κολοβακτηριδίων είναι το *Aerobacter spp*. (Thomas and Druce, 1972). Παρόλο που τα κολοβακτηρίδια είναι σχετικά παντού στο περιβάλλον, η παρουσία τους είναι χρήσιμη για τον έλεγχο της ποιότητας νερού της εκμετάλλευσης, όσο και για άλλες δραστηριότητες που εφαρμόζονται στη γαλακτοπαραγωγή. Αξιοθαύμαστο είναι το γεγονός ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες, η δημόσια υγεία υποχρεούται να ελέγχει κάθε 3 χρόνια, προκειμένου να ανιχνευθούν τυχόν κολοβακτηρίδια (USDHHS, 1999).

4.2 Τύποι μικροοργανισμών στην κρέμας

4.2.1 Μικροβιολογία επιδορπίων

Κατά την διερεύνηση των αλλαγών της μικροχλωρίδας των κρεμών εμπορίου, οι οποίες αποθηκεύτηκαν στους 5°C για 5 ημέρες, οι Tekinsen και Rothwell με μελέτη τους το 1974, διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των ψυχρότροφων βρέθηκε κοντά στους 10^2 έως πάνω από 10^7 $cfuml^{-1}$. Όσον αφορά τον πληθυσμό των μεσόφιλων, στους 30 °C κυμαίνεται από 10^3 έως 10^8 cfu/ml^{-1}. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στη φρέσκια κρέμα, οι κύριοι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν στους 5°C ήταν οι *Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter, Aeromonas* και *Achromobacter*. Αντίστοιχα, στους 30°C βρέθηκαν οι *Corynebacterium, Bacillus, Micrococcus, Lactobacillus και Staphylococcus*.

Η κατανομή των διαφόρων ειδών μικροοργανισμών ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την πηγή με την οποία παρασκευάζεται η κρέμα. Σε συντήρηση 5 ημερών και σε θερμοκρασία 5°C, οι μη φθορίζοντες, όπως είναι ο *Pseudomonas*, κυριάρχησαν. Σε αντίθεση με τα είδη των *Corynebacterium* και *Micrococcus*, τα οποία ελαχιστοποιήθηκαν σε αριθμό αν και υπήρχαν ακόμη διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Phillips et al. το 1981a, b, στην έρευνα των οποίων μελετήθηκαν οι Gram-αρνητικοί οργανισμοί μετά από θερμική επεξεργασία και διαπιστώθηκε ότι αποτέλεσε τον κύριο παράγοντα στη μείωση της διάρκειας ζωής της κρέμας. Εάν η συγκεκριμένη μόλυνση εξαλειφθεί, τότε η επιβίωση των σπόρων των βακτηρίων θα γίνει και αυτός ένας παράγοντας περιορισμού. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι με την αύξηση της

θερμοκρασίας αποθήκευσης της κρέμας από 6°C στους 10°C, μειώνεται η διάρκεια ζωής της κρέμας κατά το ήμισυ. Η μέση διάρκεια ζωής των δειγμάτων κυμαινόταν από 5 έως 23 ημέρες. Στο τέλος της διάρκειας ζωής, ο *Pseudomonas spp* και κυρίως οι μη φθορίζοντες τύποι του, ήταν η κυρίαρχη χλωρίδα της κρέμας.

Οι Colenso et al., το 1966 στη μελέτη τους για τη βακτηριακή κατάσταση σε κρέμες εμπορίου, ανακάλυψαν ότι 223 από τα 540 δείγματα απέτυχαν στη μέθοδο του κυανού του μεθυλενίου και ότι μόνο τα 181 έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά τα είδη *Coliforms* και *Bacillus* ήταν πάρα πολύ υψηλές, με 70 δείγματα να έχουν μετρήσεις της τάξεως των 2-50x$10^8$$g^{-1}$ και 137 να έχουν άνω των $10^6$$g^{-1}$. Τέλος, οι Barrow et al. (1966) ανέφεραν ότι η κρέμα θα μπορούσε να έχει αριθμό του ύψους 5 x$10^7$$g^{-'1}$ χωρίς να έχουμε αλλοίωση στην γεύση.

4.2.2 Αναερόβια σπόρια

Ιδιαίτερη είναι η σημασία της παρουσίας σπορίων στο γάλα για ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα από βακτήρια. Κυρίως, μάλιστα, για εκείνα που υπόκεινται παστερίωση με UHT διαδικασία ή αποστείρωση. Στα συγκεκριμένα προϊόντα, επειδή η κρέμα είναι χαμηλής οξύτητας, τα αναερόβια σπόρια πρέπει να καταστραφούν. Γι' αυτό, όλες οι κρέμες και γενικά όλα τα παρόμοια προϊόντα μακράς διαρκείας είναι απαραίτητο να υποβληθούν σε αυτό που λέμε "μαγείρεμα του botulinum". Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να υποστούν θερμική επεξεργασία μεγαλύτερη των 121°C για 3 min ή ισοδύναμο. Ας υποθέσουμε, λοιπόν, μία Z τιμή των 10°C. Με τη συγκεκριμένη θεραπεία, η πιθανότητα επιβίωσης του *Clostridium botulinum* από τη θερμική επεξεργασία θα πρέπει να υποστεί μία δεκαδική μείωση ίση με 12 (IFST, 1998).

4.2.3 Αερόβια σπόρια

Σοβαρή πηγή προβλήματος στις κρέμες είναι τα αερόβια σπόρια, τα οποία ταξινομούνται με βάση την αντοχή τους στην θερμότητα. Τα σπόρια του *B. Cereus* είναι τα μόνα τα οποία έχουν μέτρια αντοχή στην θερμότητα, αλλά δύναται εύκολα να επιβιώσει κατά την διαδικασία της παστερίωσης καθώς και σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, ο *B. Cereus* είναι υπεύθυνος για την γλυκιά πήξη στην κρέμα όσο και για την πρωτεόλυση. Ακόμα,

μπορεί να προκαλέσει μείωση το κυανού του μεθυλενίου και να οδηγήσει σε παραπλάνηση της επίσημης δοκιμής ανίχνευσης του PHLS (Public Health Laboratory Service) που εδρεύει στο Λονδίνο. Διαφορετικά είδη *Bacillus* μπορούν να αναπτυχθούν σε μικρότερες θερμοκρασίες (Cox.1975), όμως σε θερμοκρασίες των 5ºC διαπιστώθηκε βραδεία ανάπτυξη (Davis, 1969, 1971). Άλλα είδη, όπως ο *B. licheniformis και ο B. coagulans*, είναι εμφανείς στις κρέμες (Cox 1975, Tanzel, 1994). Σοβαρό πρόβλημα ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την δομή της κρέμας είναι ο *Bacillus subtilis*, ο οποίος προκαλεί πίκρισμα αλλά και αραίωση κατά την διαδικασίας της αποστείρωσης. Επίσης, στην κρέμα έχουμε παρουσία του *B. pumilus*, ενός δυνητικά μολυσματικού μικροοργανισμού που μεταφέρεται από το γάλα. Ορισμένα είδη *Bacillus* ανακτώνται στην UHT κρέμα, όπως είναι ο *B. sporothermodurans* (Herman et al., 2000). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει περισσότερη αντοχή στην θερμότητα από ότι ο *B. stearothermophilus* κάτω από συνθήκες με D_{140} σε 3,4 και 7,95 sec συγκρίνοντας τα 0,9 sec με Z=13,1-14,2 ºC και Z= <10 ºC αντίστοιχα (Klijn et al., 2000). Για να υπάρχουν σπόρια των μικροοργανισμών στην κρέμα υπάρχουν δύο περιπτώσεις: είτε κατά την διαδικασία να σκοτωθούν όλα τα βλαστικά κύτταρα αφήνοντας ανοιχτό το πεδίο για τα σπόρια, είτε η θέρμανση να τα σοκάρει διεγείροντας την βλάστηση (Davies, 1975).

4.2.4 Ψευδομονάδα

Το συγκεκριμένο γένος αποτελείται από Gram αρνητικές ράβδους που δεν σχηματίζουν σπόρια και που προσβάλλουν τις πρωτεΐνες και τα λίπη. Ωστόσο, έχουν ελάχιστη έως καθόλου επίδραση στα σάκχαρα. Η Ψευδομονάδα για να μπορέσει να αναπτυχθεί, είναι απαραίτητο να υπάρχει αέρας, ενώ δύναται και να συνδέεται με υδάτινα περιβάλλοντα και να αναπτύσσεται ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το γένος Pseudomonas παράγει διάφορες πρασινωπές χρωστικές και πολλά χρώματα, μπορεί, όμως, να θανατωθεί αν παστεριωθεί το προϊόν. Το πιο συνηθισμένο γένος της στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το *Pseudomonas fluorescens,* το οποίο επιτίθεται στο λίπος και παράγει τάγγιση. Ο *Pseudomonas fragi*, πάλι, αναπτύσσει μια κηλίδα εστεροειδούς εστέρας πριν την ανίχνευση της από την ταγγάδας που προκαλεί. Όσον αφορά το γένος *Putrefacien,* δημιουργεί μια σάπια μυρωδιά. Ακόμη, ο *Pseudomonas nigrifaciens* είναι ένα γένος που μπορεί να δώσει έναν μαύρο αποχρωματισμό στην επιφάνεια των γαλακτοκομικών προϊόντων. Σε γενικές γραμμές η Ψευδομονάδα είναι ακίνδυνη, αλλά το γένος *Aeruginosa* μπορεί να αναπτυχθεί στους 42°C και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στις αντιβακτηριακές χημικές ουσίες, όπως αντιβιοτικά και ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου.

4.2.5 Ζύμες

Οι ζύμες δεν είναι συνήθως η αιτία των ελαττωμάτων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις, όπως το *Kluyveronzyces lactis*, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί αργά και σταθερά ως αποτέλεσμα κακών πρακτικών υγιεινής που δεν ζυμώνει τη λακτόζη. Η παρουσία λακτοκόκκων, με την ζύμωση της λακτόζης ή με την προσθήκη ζάχαρης, λειτουργεί ευεργετικά στην γρήγορη ανάπτυξη των ζυμών. Οι ζύμες αναπτύσσονται γρήγορα και παράγουν φρουτώδης γεύση, γεγονός που μαρτυρεί την παρουσίας τους, ενώ έχουμε και παραγωγή αερίου. Ο *Torula cremoris*, Ο *Candida pseudotropicalis* και Ο *Torulopsis sphaerica* είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση αυτών των ελαττωμάτων στην κρέμα.

5. Ποιότητα κρέμας

5.1 Διατήρηση της ποιότητας ή της διάρκειας ζωής

Η εκτεταμένη διάρκεια ζωής και η σταθερότητα αποτελούν καθοριστικά πλεονεκτήματα του γαλακτοκομικού προϊόντος με θερμική επεξεργασία UHT. Ως διάρκεια ζωής ορίζεται ο χρόνος αποθήκευσης πριν η ποιότητα πέσει σε μη αποδεκτό όριο. Ο Holanowski (2008) ανέφερε ότι υποκειμενικές ιδιότητες είναι η γεύση, το χρώμα, η οσμή, η δομή, ο διαχωρισμός και το ιξώδες. Μάλιστα, τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μπορούν να λειτουργήσουν σαν δείκτης προσδιορισμού της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Επιπλέον, επηρεάζονται από την ποιότητα του ακατέργαστου προϊόντος, τον τύπο της διεργασίας, μόλυνση μετά την επεξεργασία, ασηπτική τη συσκευασία και τα πακέτα συσκευασίας.

Η διατήρηση της ποιότητας της κρέμας είναι πιο κρίσιμη από αυτή του γάλακτος επειδή, παρόλο που η κρέμα λαμβάνει συνήθως πιο ήπια θερμική επεξεργασία από ότι το γάλα, το σύστημα διανομής και ο τρόπος κατανάλωσης είναι διαφορετικοί. Έτσι, ενώ το γάλα είναι συνήθως παστεριωμένο μία ημέρα, παραδίδεται την επόμενη και καταναλώνεται μία ή δύο ημέρες αργότερα, η κρέμα πρέπει να διαχωριστεί, να τυποποιηθεί, να διανεμηθεί, συχνά μέσω μιας γαλακτοκομικής επιχείρησης, και στη συνέχεια να πωληθεί μέσω σούπερ μάρκετ ή καταστημάτων. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας, όμως, ενδέχεται να μην είναι πλήρης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διανομής και πώλησης και η θερμοκρασία είναι η μόνη άμυνα που έχει απομείνει ενάντια στους μικροοργανισμούς.

5.2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην κακή ποιότητα της κρέμας

Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα της κρέμας είναι:

1. Το επιφορτισμένο νωπό γάλα από το οποίο παράγεται η κρέμα.
2. Η κακή υγιεινή κατά την διαδικασία παραγωγής της
3. Η λάθος επιλογή θερμοκρασίας για θερμική επεξεργασία
4. Η κακή υγιεινή στη συσκευασία
5. Οι υψηλές συνθήκες συντήρησης
6. Η υψηλή θερμοκρασία αποθήκευσης και διανομής

Από αυτούς τους παράγοντες, ίσως οι πιο σημαντικοί είναι η ποιότητα του νωπού γάλακτος, ο υγιεινός χειρισμός και ο σωστός έλεγχος της θερμοκρασίας του τελικού προϊόντος.

5.3 Ποιότητα ακατέργαστου γάλακτος

Ένας σημαντικός παράγοντας για την διατήρησης της ποιότητας στην κρέμα είναι η υγιεινή κατάσταση στο νωπό γάλα. Τρεις ομάδες μικροοργανισμών που βρίσκουμε εκεί και μας δείχνουν την εικόνα της κρέμας ως προς την ποιότητά της, είναι οι εξής:

1. θερμοευαίσθητα είδη, που θανατώνονται με παστερίωση (72°C/15 sec) και είναι ο *Pseudomonas spp*., οι Λακτοκόκκοι και τα κολοβακτηρίδια
2. Είδη που δεν σχηματίζουν σπόρια αλλά επιβιώνουν της παστερίωσης, όπως είναι οι *Enterococcus faecalis* και *Micrococcus spp*.
3. Αερόβια βακτηρίδια σχηματισμού σπόρων, όπως ο *B. cereus.*

Τα υψηλά επίπεδα θερμοευαίσθητων μικροοργανισμών μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στο γάλα και στην συνέχεια να μεταφερθούν στην κρέμα. Ο *Pseudomonas spp.*, σε υψηλούς αριθμούς, είναι ανεπιθύμητος στις κρέμες με θερμική επεξεργασία UHT, καθώς οι λιπάσες και οι πρωτεάσες που παράγονται από αυτούς τους οργανισμούς είναι εξαιρετικά ανθεκτικές στη θερμότητα και θα προκαλέσουν αλλοίωση του προϊόντος κατά την αποθήκευση. Η παρουσία των *Pseudomonas* ή των κολοβακτηριδίων υποδηλώνει τη μετα-παστεριωτική μόλυνση σε μια κρέμα που έχει υποστεί επαρκή θερμική επεξεργασία.

Ο Griffiths et al. (1984) πρότεινε μια μέθοδο ταχείας ανίχνευσης για τη μετα-παστεριωτική μόλυνση της κρέμας με Gram-αρνητικά ψυχρότροφα. Με τον έλεγχο της μόλυνσης μετά την παστερίωση, τότε μόνο οι ομάδες που είναι θερμοανθεκτικές είναι υψίστης

σημασίας για την κρέμα. Brown και Prentice (1982) ανέφεραν ότι οι *Bacillus spp* είναι ψυχρότροφοι που σχηματίζουν σπόρια σε παστεριωμένη κρέμα, αποθηκευμένη στους 7°C.

Στη δεκαετία του 1960, αποδείχθηκε ότι μια αρχικά καλής ποιότητας κρέμα θα διαρκέσει για 6 ημέρες στους 5°C. Ωστόσο, επειδή αναπτύσσει υψηλό αριθμό μικροοργανισμών, αποτυγχάνει στη δοκιμασία του κυανού του μεθυλενίου (MB) μετά από 2 ημέρες στους 15°C. Μια κρέμα, με υψηλό αρχικό φορτίο και ύπαρξη κολοβακτηρίδιων έχει σαν συνέπεια το προϊόν να αποτυγχάνει στη δοκιμή MB μετά από 6 ημέρες στους 5°C. Αν έχουμε ανάπτυξη μιας ακάθαρτη οσμής και γεύσης , η κρέμα αποτυγχάνει στη δοκιμή MB μετά από 2 ημέρες στους 15°C (Davis, 1969). Οποιοσδήποτε οργανισμός είναι κατά προσέγγιση σταθερός για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλή θερμοκρασία, προϋποθέτει μία κρέμα χαμηλής μέτρησης στο τέλος της επεξεργασίας/πλήρωσης, δηλαδή κατά την έναρξη της διάρκειας ζωής της κρέμας.

6. Συντήρηση

6.1 Συντήρηση κρέμας

Η συντήρηση της κρέμας πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 2-4 ^{o}C και ο χρόνος συντήρησης κυμαίνεται 7-10 ημέρες, ανάλογα με την μέθοδο της θερμικής επεξεργασίας. Η κρέμα σε θερμοκρασία παστερίωσης στους 90°C/30sec διατηρείται πολύ περισσότερο σε σχέση με την θερμοκρασία στους 70-71°C/30 min. Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών το 1998, η θερμοκρασία συντήρησης της κρέμας στους 0-4°C διαρκεί 10 ημέρες. Τέλος, η διάρκεια συντήρησης της αποστειρωμένης κρέμας μπορεί να διαρκέσει πολύ περισσότερο σε θερμοκρασία δωματίου.

6.2 Θερμοκρασία συντήρησης

Από μικροβιολογικής άποψης, η κρέμα είναι ένα σταθερό προϊόν, όσον αφορά το pH, την ενεργότητα νερού και την περιεκτικότητα της σε θρεπτικά συστατικά . Επομένως, για ένα συγκεκριμένο βαθμό μικροβιακής μόλυνσης, ο χρόνος αποθήκευσης είναι αποκλειστικά θέμα θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών ελέγχεται κυρίως από τη θερμοκρασία. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπαίτιοι για βακτηριακές μολύνσεις στη κρέμα είναι οι ψυχρότροφοι, οι οποίοι μπορεί να αναπτύσσονται σε κλίμακα 0-45°C, οι μεσόφιλοι που αναπτύσσονται στην κλίμακα 10-45°C και οι θερμόφιλοι σε κλίμακα 35-63°C. Βέβαια, αυτά τα όρια δεν είναι πάγια, αλλά χρησιμεύουν ως πυξίδα. Επιπροσθέτως,

υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός οργανισμών που δεν μπορούν να ταξινομηθούν τόσο εύκολα. Στην κρέμα και σε άλλα γαλακτοκομικά τρόφιμα, τα οποία συντηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στην ψύξη, σημαντικό θέμα είναι να ελαχιστοποιηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των ψυχρότροφων. Για τα ψυχρότροφα βακτήρια, υπάρχουν δύο περιοχές που είναι σημαντικές, 0-4°C και 5-10°C. Ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης είναι πολύ αργός έως 4°C, αυξάνεται σταδιακά από 5°C σε 10°C, ενώ ιδιαίτερη αύξηση έχουμε πάνω από 6°C. Η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι σημαντική, καθώς οι αναφερόμενες θερμοκρασίες στη γαλακτοκομική βιομηχανία δεν είναι πάντοτε ακριβείς. Ως εκ τούτου, αν και οι θερμοκρασίες ψύξης το βράδυ δεν πρέπει να ξεπερνούν τους 4°C, κατά τη διάρκεια των ωρών εργασίας μπορούν εύκολα να φτάσουν στους 7°C ή και υψηλότερα (Airey, 1978, Jackson, 1978, Muir., 1978). Παρόλο μάλιστα, που υπάρχουν σύγχρονα όργανα ελέγχου των θερμοκρασιών, τα οποία είναι πολύ λειτουργικά.

7. Έλεγχος υγιεινής στην επεξεργασία κρέμας

Η διάρκεια ζωής της κρέμας ή η διατήρηση της ποιότητας της, όπως συμβαίνει με όλα τα τρόφιμα που αλλοιώνονται, καθορίζεται σημαντικά από την έκταση της μόλυνσης ύστερα από θερμική επεξεργασία. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος του καθαρισμού και της απολύμανσης του εξοπλισμού (ορισμένες φορές λέγεται και "απολυμαντικό", ωστόσο ο όρος αυτός δεν αναγνωρίζεται από τον IDF) είναι δευτερεύων σημασίας για τη λειτουργία οποιασδήποτε μονάδας. Ο έλεγχος μπορεί να εξεταστεί σε δύο μέρη: τις μεθόδους για τον καθαρισμό και την απολύμανση (Romney, 1990) και την εργαστηριακή εξέταση της απολυμασμένης μονάδας για να γίνεται έλεγχος της "στειρότητας".

Ο όρος "Καλή εργοστασιακή πρακτική" χρησιμοποιείται για να συμπεριλάβει όλες τις εργασίες που πραγματώνονται στην μονάδα, συμπεριλαμβανομένης και της υγιεινής, ενώ ο "ποιοτικός έλεγχος" αναφέρεται σε εργαστηριακές και βοηθητικές δοκιμές. Σύμφωνα με τη μελέτη του IFST το 1998, η καλή πρακτική παρασκευής μπορεί επίσης να θεωρηθεί ότι περιλαμβάνει όλες τις πτυχές του ελέγχου ποιότητας. Οι διαδικασίες αυτές εξασφαλίζουν στον παρασκευαστή και τον πελάτη ένα ικανοποιητικό προϊόν με διασφάλιση ποιότητας. Ιδανικά, αυτό πρέπει να εκτείνεται από την παραγωγή γάλακτος στο αγρόκτημα, έως την παράδοση στον πελάτη. Αυτό βασίζεται στην οδηγία της ΕΕ για την υγιεινή των ζώων (EEC, 1992).

Ουσιαστικά, η υγιεινή παρασκευή κρέμας προϋποθέτει την πρόληψη της μόλυνσης της κρέμας σε όλα τα στάδια. Συνήθως, ο μεγαλύτερος κίνδυνος μόλυνσης πηγάζει από τον βρώμικο εξοπλισμό. Πιο αναλυτικά, όσα αντικείμενα έρχονται σε επαφή με την κρέμα, σε

οποιοδήποτε στάδιο, με οποιοδήποτε τρόπο, πρέπει να καθαρίζονται αφαιρώντας όλες τις ακαθαρσίες, και θανατώνοντας όλους τους μικροοργανισμούς. Οι τρόποι καθαρισμού είναι δύο: είτε με χημικά απολυμαντικά, όπως ενώσεις χλωρίου, είτε με θερμότητα. Οι απαιτήσεις είναι ακριβώς ίδιες όπως και για το γάλα. Μόλις επιτευχθεί η καλή διαδικασία υγιεινής, ο δεύτερος πιο κρίσιμος παράγοντας είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η κρέμα εμπίπτει στη γενική απαίτηση να διατηρούνται αλλοιώσιμα τρόφιμα κάτω από 8°C (UK Regulations 1995c). Ωστόσο, στην πράξη είναι διαφορετικά, καθώς θα χρειαστούν θερμοκρασίες κάτω των 5°C για να μεγιστοποιηθεί ο χρόνος ζωής των παστεριωμένων κρεμών.

8. Μικροοργανισμοί που προκαλούν ελαττώματα στην κρέμα

Το γάλα και τα παράγωγα προϊόντα του, όπως η κρέμα, μολύνονται από μικροοργανισμούς από τον μαστό κατά τη διάρκεια του αρμέγματος. Η κύρια μικροχλωρίδα με αυτή την έννοια αποτελείται κυρίως από τα είδη *Lactococcus, Streptococcus, Micrococcus, Corynebacterium*, καθώς και αερόβια και αναερόβια σπορογόνα βακτήρια (Crossley, 1948, Davis, 1971, Tekinsen and Rothwell, 1974). Επομένως, εάν η κρέμα δεν έχει υποστεί την κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά της πώληση της, όλοι αυτοί οι οργανισμοί δεν θα έχουν σκοτωθεί, όπως και τα παθογόνα που προήλθαν από τις αγελάδες, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνο για την δημόσια υγεία. Είδη των *Staphylococci* και οι *Lactobacilli,* αλλά και οι Gram-αρνητικές μικροοργανισμοί που προέρχονται από το περιβάλλον είναι συνήθως εμφανείς. Ωστόσο, οι αναλογίες δεν εξαρτώνται μόνο από το επίπεδο της υγιεινής που υπάρχει, αλλά και από τη θερμοκρασία που έχει η κρέμα. Λόγου χάρη, οι *B. Cereus, Staphylococci και οι Lactobacilli* ευνοούνται από την βραδεία ψύξη της κρέμας στους 5°C και κάτω.

9. Αλλοιώσεις της κρέμας

Η παστεριωμένη κρέμα πρέπει να είναι ελεύθερη από παθογόνους μικροοργανισμούς και όλοι οι μικροβιολογικοί δείκτες θα πρέπει να βρίσκονται εντός ορίων. Εάν η διαδικασία της παστερίωσης της κρέμας πραγματοποιηθεί χωρίς μεταβολές, τότε αίτια των επιμολύνσεων είναι οι συνθήκες χειρισμού, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη υψηλού αριθμού κολοβακτηριδίων, εντερόκοκκων, ψευδομονάδων, ζυμών-μυκήτων και OMX > 30000g. (Halbiger et al.,1979, Otte et al., 1979). Κατά την συντήρηση, μικροοργανισμοί όπως οι ψυχρότροφοι, ζύμες και μύκητες αυξάνονται, έχοντας ως συνέπεια την αλλοίωση της κρέμας.

Τέτοιου είδους αλλοιώσεις είναι τα μη επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η οξίνηση και παραγωγή αερίων, καθώς και ο διαχωρισμός του ορού σε δύο φάσεις. Επιπρόσθετες αλλοιώσεις θεωρούνται η τάγγιση, η θείωση, η κολλώδης σύσταση, η βλεννώδης σύσταση, αλλά και τα ελαττώματα στην εμφάνιση εξαιτίας των ζυμών και των μυκήτων.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τα μη επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η ύπαρξη δυσάρεστων οσμών οφείλεται είτε σε οσμές του γάλακτος, οι οποίες προκαλούνται για διάφορους λόγους, όπως τα φυτοφάρμακα που περιέχονται στις ζωοτροφές, είτε σε οσμές του περιβάλλοντος, οι οποίες εισέρχονται στο προϊόν, καθώς η συσκευασία δεν μπορεί να το προστατεύσει. Η τυχόν ανεπιθύμητη γεύση της κρέμας οφείλεται στην ύπαρξη βακτηρίων (π.χ. *Bacillus subtilis*, το οποίο προκαλεί πικρή γεύση). Τέλος, έχουμε ύπαρξη καμμένης γεύσης που οφείλεται σε υψηλές θερμικές επεξεργασίες στην κρέμα και συγκεκριμένα στην αποστειρωμένηκρέμα.

Η οξίνηση οφείλεται στην ύπαρξη υψηλού αριθμού βακτηρίων όπου παράγουν οξύ, ζυμώνοντας την λακτόζη. Όσον αφορά το φούσκωμα, πάλι, είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης μικροοργανισμών που παράγουν αέρια (π.χ. κολοβακτηρίδια, κλωστρήδια, βάκιλλοι κ.α).

Όπως προαναφέρθηκε, ένα είδος αλλοίωσης είναι ο διαχωρισμός του ορού σε δύο φάσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός του ορού οφείλεται σε ελάττωμα στη υδάτινη φάση, σε περίπτωση που δεν έχουμε άλλα προβλήματα όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αυτό το ελάττωμα παρατηρείται κυρίως στην αποστειρωμένη κρέμα (Anon.,1975)

Επιπλέον, με την τάγγιση εννοούμε την η υδρόλυση του λίπους λόγω λιπολυτικών ενζύμων (λιπάσες). Όσον αφορά τη θείωση, εμφανίζεται κυρίως στην αποστειρωμένη κρέμα καθώς έχουμε δημιουργία σουλφυδρυλικών δεσμών κατά την θέρμανση.

Η πρόκληση της κολλώδους σύστασης οφείλεται κυρίως στην μη τήρηση των σωστών ποσοτήτων του αμύλου που τοποθετείται στο μείγμα. Βέβαια, μπορεί να προκληθεί και από την εισαγωγή του αμύλου στο μείγμα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από τους 80°C.

Η τυχόν αλλοίωση από βλεννώδη σύσταση, οφείλεται στη δημιουργία βλέννας στην επιφάνεια της κρέμας από βακτήρια(π.χ. *Bacillus subtilis*).

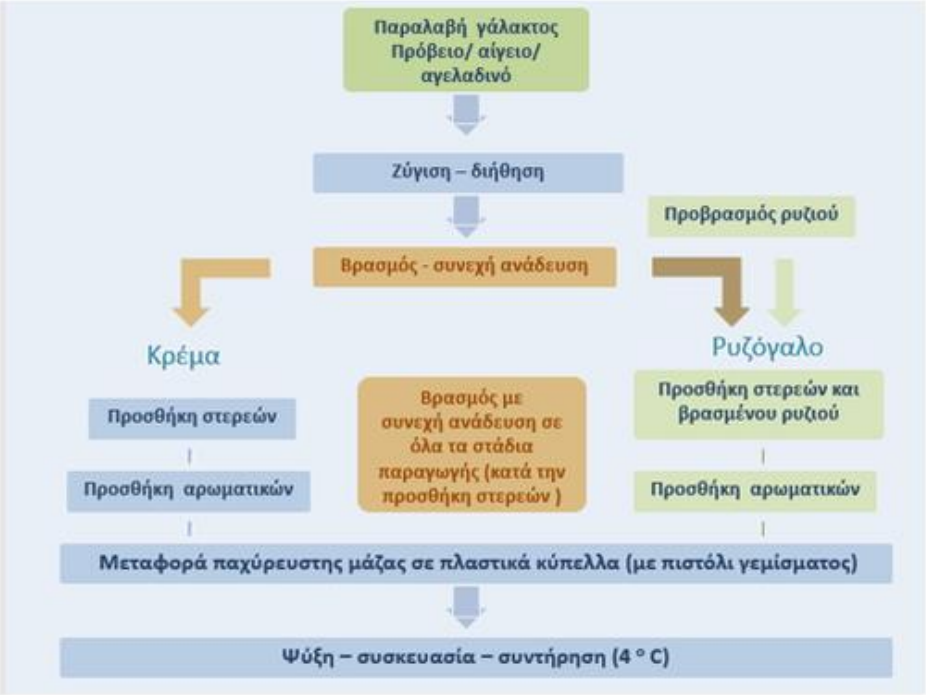
Τέλος, σχετικά με τα ελαττώματα στην εμφάνιση λόγω ζυμών & μυκήτων, παρατηρείται ανάπτυξη λευκών και έγχρωμων ζυμών (π.χ. *Torula cremoris*), ακτινομυκήτων και έγχρωμων μυκήτων, όπως ο *Geotrichum candidum* που σχηματίζει λευκόχρωμες αποικίες στην επιφάνεια της κρέμας.

10. Πικρή γεύση στην κρέμα

Μια πικρή γεύση δύναται να αναπτυχθεί στην κρέμα από έναν αριθμό μικροοργανισμών. Τις περισσότερες φορές προκύπτει από πρωτεόλυση, η οποία δημιουργεί υδρόφοβα πεπτίδια, ενώ ένας άλλος παράγοντας είναι τα γλυκερίδια που προκύπτουν από τη λιπόλυση . Εκτός από το *Proteus* και άλλες Gram αρνητικές ράβδους, ζύμες και μύκητες μπορούν εξίσου να παράγουν πικρία, αν και η μερική ανάπτυξη τους μπορεί να είναι απαραίτητη. Λόγου χάρη, η οξίνηση από μικροοργανισμούς γαλακτικού οξέος, όπως ο *Lactococcus lactis*, ίσως είναι αναγκαία για να αποτρέψει στην *Rhodotorula mucilaginosa* να παράγει μια πικρή γεύση.

11. Παραγωγική διαδικασία

Διαδικασία παραγωγής



Ενδεικτικό διάγραμμα ροής κρέμας – ρυζόγαλου

- Βρασμός - παστερίωση γάλακτος

- Προσθήκη στερεών, όπως το άμυλο και η ζάχαρη, αφού διαλυθούν σε κρύο υγρό πρώτα
- Συνεχή ανάδευση σε όλα τα στάδια
- Προσθήκη αρωματικών
- Μεταφορά παχύρευστης μάζας σε κατάλληλα κύπελλα
- Ψύξη – συσκευασία (προσθήκη διαφάνειας) – συντήρηση στους 4 ^{o}C

11.1 Βιομηχανική παραγωγή επιδορπίου «κρέμας»

Στην βιομηχανία πραγματοποιείται προσθήκη του νωπού αγελαδινού γάλακτος σε κλειστό σύστημα, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε ψυγείο στους 4°C ώστε να πραγματοποιηθεί η παστερίωση (92°C/5min). Κατά την διάρκεια της ανάδευσης και αύξησης της θερμοκρασίας, ρίχνουμε μέσα στο καζάνι τα υλικά, εκτός από το τροποποιημένο άμυλο και την βανίλια με την μορφή σκόνης. Το τροποποιημένο άμυλο ρίχνεται στο καζάνι μόλις η θερμοκρασία έχει ανέβει στους 80°C προκειμένου να αποφύγουμε την σκληρή υφή στο τελικό προϊόν. Η βανίλια ρίχνεται κατά το τέλος της παστερίωσης και όχι πριν για να μην χάσει την δυναμικότητα του αρώματος της. Έπειτα, το μείγμα ψύχεται στους 82-85°C, ανοίγονται οι βαλβίδες και πραγματοποιείται γέμισμα των περιεκτών(180g). Το προϊόν οδηγείται σε θάλαμο ελεγχόμενο μικροβιολογικά με φίλτρα για να μην υπάρχει επιμόλυνση και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, όπου πραγματοποιείται η ψύξη της κρέμας για περίπου 30 min στους 21°C για να εξομοιωθούν οι υδρατμοί (Tempering). Στην συνέχεια οδηγείται στο κλειστικό μηχάνημα όπου συσκευάζεται σε δοχεία 180g με αλουμινόφυλλο Φ95,5. Τέλος, το τελικό προϊόν αποθηκεύεται στους 4°C.

Παραλαβή νωπού αγελαδινού γάλακτος

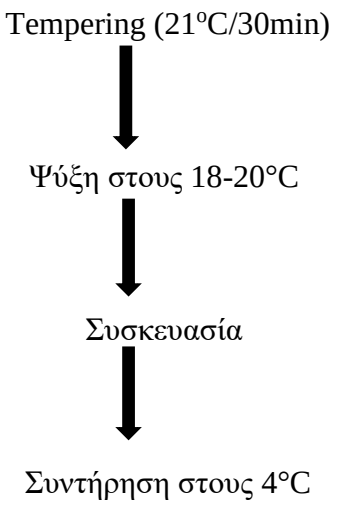
↓

Θερμική επεξεργασία στους (92°C για 5 min)

↓

Γέμισμα περιεκτών (82-85°C)

↓



Σχήμα 2: Διαδικασία που ακολουθείται στη βιομηχανία

Έτσι, η τεχνολογία επεξεργασίας κρέμας είναι πολύπλοκη και είναι συνεχώς εκτεθειμένη και μπορούν ανά πάσα στιγμή να προκύψουν προβλήματα. Για να παραχθεί η καλύτερη δυνατή κρέμα, πρέπει να γίνει καθένα από τα παραπάνω στάδια όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά κυρίως επαρκή **θερμική επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή**.

12 Κρίσιμα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας

12.1 Διαδικασία υψηλής παστερίωσης (UHT) στην κρέμα

Η θερμική επεξεργασία που ακολουθείται για την κρέμα είναι η διαδικασία της υψηλής παστερίωσης (UHT). Πραγματοποιείται στους 140°C/2 sec, στους 82-83 °C/25 sec (Lampert, 1970) ή ισοδύναμη θερμοκρασία/χρόνο για να καταστήσει την κρέμα ελεύθερη και από βιώσιμους μικροοργανισμούς και από τα σπόρια τους (κανονισμοί του Ηνωμένου Βασιλείου, 1995α). Έπειτα, πρέπει να τοποθετηθεί αμέσως σε αποστειρωμένο δοχείο με ασηπτικές προφυλάξεις. Υπάρχουν σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της διαδικασίας σε σχέση με τις

παραδοσιακές θερμικές επεξεργασίες. Πρώτον, η κρέμα αποστειρώνεται, δηλ. καταστρέφονται όλοι οι παθογόνοι, μειώνεται η μικροχλωρίδα, αδρανοποιούνται πολλά ένζυμα, κυρίως οι λιπάσες, με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερη συντήρηση της κρέμας (Alais, 1974). Δεύτερον, η διαδικασία είναι γρήγορη και αποτελεσματική και τέλος, δεν προκαλεί σοβαρή αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μόνο μια μικρή γεύση βρασμένου. Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι η διατήρηση της ποιότητας από μικροβιολογική άποψη, καθώς και η συντήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα στην ψύξη.

Όσον αφορά τη διάρκεια ζωής της κρέμας, είναι περιορισμένη από της βιοχημικές μεταβολές. Οι αλληλεπιδράσεις ασβεστίου-καζεΐνης αποσταθεροποιούν το γαλάκτωμα και οι πρωτεάσες που επιβιώνουν από τη θερμική επεξεργασία θα επιφέρουν ζελατινοποίηση. Οι συγκεκριμένες μεταβολές περιορίζουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος σε 3-6 μήνες, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Η μέθοδος UHT χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τη κρέμα, ειδικά για μικρές παραγωγικές μονάδες. Ωστόσο, η UHT επεξεργασία της κρέμας έχει αναθεωρηθεί πρόσφατα, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αποφυγή μολύνσεων στα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία με UHT(IDF, 1996, Lewis and Heppell, 2000). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η αιθανόλη και το οξείδιο του αιθυλενίου χρησιμοποιούνται εμπορικά για την αποστείρωση του χαρτιού και των πλαστικών που χρησιμοποιούνται στο ασηπτικό χαρτοκιβώτιο. Επιπλέον, η διαδικασία τριβής ATAD παρέχει μια εναλλακτική μέθοδο για την ταχεία αποστείρωση κρέμας και άλλων υγρών. Σε αυτή τη διαδικασία, το υγρό προθερμαίνεται στους 70 °C και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 140°C για 0,54~ και μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς σε κρέμες που έχουν περιεκτικότητα λίπους 12% και 33% (Alais et al., 1978).

12.2 Hot filling

Τα συστήματα ασηπτικής συσκευασίας συμπληρώνουν το αποστειρωμένο προϊόν σε αποστειρωμένες συσκευασίες εντός των ορίων της αποστειρωμένης ζώνης του πληρωτικού. Η ασηπτική ζώνη εκτείνεται από το σημείο όπου η αποστειρωμένη συσκευασία εισέρχεται στην αποστειρωμένη ζώνη μέχρι το κλείσιμο της συσκευασίας.

Κοινά χαρακτηριστικά σε όλα τα συστήματα ασηπτικής συσκευασίας αποτελούν:

1. Το αποστειρωμένο προϊόν, η αποστειρωμένη συσκευασία και η αποστειρωμένη ζώνη που εμποδίζουν τη κάθε πιθανότητα μόλυνσης μετά την θερμική επεξεργασία
2. Οι επιφάνειες και η συσκευασία, οι οποίες είναι αποστειρωμένες

3. Το προϊόν που γεμίζεται μέσα στη συσκευασία
4. Τα πακέτα, τα οποία σφραγίζονται ερμητικά κλειστά και
5. Η αυτοματοποίηση ως προς την παρακολούθηση και τον έλεγχο των κρίσιμων σημείων (Anonymous 1995).

Τα συστήματα ασηπτικής συσκευασίας γεμίζουν το προϊόν που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία σε προσαρμοσμένα αποστειρωμένα πακέτα ή χρησιμοποιεί ένα σύστημα σφράγισης (Datta and Deeth 2007). Τα συστήματα ασηπτικής συσκευασίας περιλαμβάνουν:

1. Συστήματα τυμπάνου και δοχείων
2. Θέρμανση κατά τη χύτευση με εμφύσηση
3. Μηχανές συσκευασίας χάρτινων κουτιών
4. Συστήματα συσκευασίας
5. Δεξαμενές και δοχεία χύδην
6. Πλαστικά κύπελλα/δοχεία/χαρτοκιβώτια/σακουλάκια (Holdsworth 1992)

12.3 Συσκευασία Κρέμας

Η συσκευασία οποιουδήποτε ευαίσθητου τροφίμου είναι απαιτητική και ο λόγος είναι ότι, εάν η συσκευασία του προϊόντος είναι ακατάλληλη και επιφορτισμένη, η ύψιστη αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία ακυρώνεται. Στο παρελθόν, η παστεριωμένη κρέμα τοποθετούνταν σε φιάλες ή βάζα και πωλούνταν σαν γάλα, ενώ πλέον χρησιμοποιούνται σχεδόν παγκοσμίως σε κεσεδάκια. Τα κεσεδάκια είναι κατασκευασμένα είτε από χαρτί είτε από πλαστικό και είναι πάντοτε καλής ποιότητας, όσον αφορά την υγιεινή, λόγω της μεθόδου παρασκευής τους, υπό την προϋπόθεση, βέβαια, να αποθηκεύονται σε καθαρή ατμόσφαιρα. Φυσικά, ο κατασκευαστής συσκευάζει τα χαρτοκιβώτια σε σακούλες από πολυαιθυλένιο εντός των χάρτινων κιβωτίων. Αυτό θα προστατεύσει τα κεσεδάκια από την περιβαλλοντική μόλυνση, όμως το εξωτερικό μέρος είναι εκτεθειμένο και υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης. Είναι σημαντικό να διαχωριστούν τα κεσεδάκια από το εξωτερικό κουτί υπό συνθήκες υγιεινής πριν τοποθετηθεί στο συσκευαστήριο της κρέμας. Στο συγκεκριμένο στάδιο, πρόκειται να εφαρμοστεί η διαδικασία της συσκευασίας και είναι επιτακτική ανάγκη να έχει εξαλειφθεί μικροβιακό φορτίο. Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους: με ακτινοβόληση της συσκευασίας, με υπερσύγχρονα συστήματα ή με υπεροξείδιο του υδρογόνου ή με θερμότητα στην περίπτωση συστημάτων ασηπτικής συσκευασίας. Είναι σημαντικό να αποφεύγεται η μόλυνση της συσκευασίας και του συστήματος πλήρωσης. Από βακτηριολογική άποψη, το

μόνο που απαιτείται είναι να τα αποθηκεύεται κάτω από καθαρές συνθήκες και να αποφεύγεται η μόλυνση στον χειρισμό, την πλήρωση και τη σφράγιση.

13. Έλεγχος κρέμας

13.1 Μακροσκοπικός Ποιοτικός έλεγχος κρέμας

Στον μακροσκοπικό ποιοτικό έλεγχο της κρέμας, ελέγχεται η σύσταση, το χρώμα, η γεύση, η οσμή της κρέμας. Το χρώμα θα πρέπει να είναι λευκωπό ή λευκοκίτρινο και με ευχάριστη οσμή. Η σύσταση θα πρέπει να είναι παχύρευστη με ανάλογο ιξώδες, ανάλογα με την λιποπεριεκτικότητα της και να είναι έχει απουσία πηγμάτων και διαχωρισμό ορού.

13.2 Εργαστηριακός χημικός έλεγχος κρέμας

Κατά τον εργαστηριακό χημικό έλεγχο της κρέμας, επιθεωρείται η λιποπεριεκτικότητα, η οξύτητα και η νοθεία της κρέμας. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος ορίζει ότι εκτός από την σύστασή της η κρέμα πρέπει να πληροί τους όρους περί νωπού γάλακτος, σύμφωνα με τους οποίους η οξύτητα δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 90 SH. Η νοθεία της κρέμας γίνεται με την προσθήκη λιπαρών ουσιών, διαφορετικών από το λίπος του γάλακτος. Τέλος στην κρέμα επιτρέπεται η χρήση της νισίνης σε ανώτερο όριο 10 mg/kg.

13.3 Μικροβιολογικός έλεγχος κρέμας

Στον μικροβιολογικό έλεγχο, πραγματοποιείται μέτρηση κολοβακτηριδίων, ΟΜΧ, ζυμών, μυκήτων και σταφυλόκοκκων. Σύμφωνα με την οδηγία 92/46 ΕΟΚ (ΠΔ 56/95), η παστεριωμένη κρέμα πρέπει να ανταποκρίνεται στα εξής μικροβιολογικά όρια: ΟΜΧ στους 30°C < 50000 (cfu/g) και απουσία κολοβακτηρίδιων σε 1g (m=0. M=10, n=5, c=2).

14. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

14.1 Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων εξασφαλίζεται με βάση την ορθή εφαρμογή των πρακτικών υγιεινής και στην εφαρμογή διαδικασιών που βασίζονται στις αρχές ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου (Hazard Analysis And Critical Control Points- HACCP). Η νομοθεσία θέτει μικροβιολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την επικύρωση των διαδικασιών που βασίζονται στο σύστημα HACCP και άλλων μέτρων υγιεινής. Επίσης, μάς υποδεικνύουν αν ένα τρόφιμο είναι ασφαλές προς το καταναλωτικό κοινό η μη αποδεκτό που χρειάζεται ανάκληση.

14.2 Συσκευασία

Σύμφωνα με τον Άρθρο 26 Κεφάλαιο 2 του Κ.Τ.Π η κρέμα συσκευάζεται σε κεσεδάκι από πολυπροπυλένιο κατάλληλο για τρόφιμα (PP) με αλουμινόφυλλο από κράμα αυτού περιεκτικότητας 99% αργίλιο > 0.05Mn, max 0.1% Zn, 0.05 έως 2 Cu, max 0.05% και άλλων λοιπών στοιχείων. Το βάρος της συσκευασίας θα κυμαίνεται ανάμεσα από 150-200g (ΕΛΟΤ 601/602). Θα τοποθετούνται σε χαρτοκιβώτια αντοχής 12 τεμαχίων. Η συσκευασία του προϊόντος θα πρέπει να αναγράφει κάποια στοιχεία με ανεξίτηλα γράμματα στην Ελληνική γλώσσα. Στοιχεία όπως:

1. Ονομασία πώλησης του τροφίμου
2. Συστατικά κατά σειρά ελαττωμένης περιεκτικότητας
3. Ονομαστική ποσότητα περιεχομένου που να χρησιμοποιείται μονάδες μάζα για στερεά και μονάδες όγκου για υγρά
4. Χρονολογία ανάλωσης
5. Ιδιαίτερες συνθήκες συντήρησης
6. Ιδιαίτερες συνθήκες χρήσης
7. Όνομα, εμπορική επωνυμία, διεύθυνση του παρασκευαστή ή του συσκευαστή ή του πωλητή εγκατεστημένου σε κράτος μέλος της ΕΟΚ
8. Τόπος παραγωγής ή προέλευσης
9. Οδηγίες χρήσης
10. Ένδειξη που επιτρέπει την αναγνώριση της παρτίδας στη οποία ανήκει το τρόφιμο

Σε περίπτωση που η ένδειξη της παρτίδας διακρίνεται καθαρά και από άλλες ενδείξεις είναι προαιρετικό να καταχωρηθεί το γράμμα L πριν από την ενδείξεις της παρτίδας. Επίσης, είναι προαιρετική στη περίπτωση που η χρονολογία ελάχιστης διατηρησιμότητας ή χρονολογία ανάλωσης συμπεριλαμβάνει ένδειξη σαφή και κατά σειρά σαφή της ημέρα και του μήνα (Α2-718/28-7-2014, ΦΕΚ Β 2090/31-7-2014, Κωδικοποίηση Κανόνων Διακίνησης και Εμπορίας Προϊόντων).

14.3 Πρόσθετα

Πρόσθετα τροφίμων είναι κάθε ουσία που συνήθως δεν καταναλώνεται αυτή καθ' εαυτή ως τρόφιμο και δεν χρησιμοποιείται συνήθως ως χαρακτηριστικό συστατικό τροφίμων, είτε έχει θρεπτική αξία είτε όχι. Σκόπιμη προσθήκη της στο τρόφιμο είναι για ένα τεχνολογικό σκοπό, με συνέπεια κατά την παρασκευή, τη μεταποίηση, την προετοιμασία, την επεξεργασία, τη συσκευασία, τη μεταφορά ή την αποθήκευση αυτού του τροφίμου, η ουσία ή παράγωγα αυτής να καθίστανται άμεσα ή έμμεσα συστατικό αυτών των τροφίμων.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση όλα τα πρόσθετα τροφίμων προσδιορίζονται από έναν κωδικό αριθμό με την ένδειξη "Ε". Είναι υποχρέωση κάθε παραγωγού και πωλητή να αναγράφουν τους κωδικούς στην ετικέτα του προϊόντος που φτάνει στα χέρια του καταναλωτή. Οι ετικέτες των προϊόντων πρέπει να προσδιορίζουν τόσο τη συγκεκριμένη ουσία που χρησιμοποιείται όσο και την λειτουργία της πρόσθετης ουσίας στο τελικό προϊόν (π.χ. χρώμα, συντηρητικό), είτε με άμεση αναφορά στον κατάλληλο κωδικό "Ε" ή στο όνομα του.

Χαρακτηριστικά, η νισίνη είναι ένα πρόσθετο συντηρητικό Ε234, της οποίας η χρήση επιτρέπεται στις πουτίγκες από σιμιγδάλι, παρόμοια προϊόντα σε ωριμασμένο και ακατέργαστο τυρί κ.α. Σύμφωνα με την SFC η αποδεκτή ημερήσια ποσότητα νισίνης προς κατανάλωση ανέρχεται σε τιμές ADI (Acceptable Daily Intakes) 0-13 mg/kg ανά ημέρα ζώντος οργανισμού (SCF, 1997).

Η ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων, EFSA, πραγματοποίησε επαναξιολόγηση για την νισίνη που ολοκληρώθηκε στις 26 Ιανουαρίου 2006 με αναφορά τα ανώτατα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης (Πίνακας 14.1) της σε κατηγορίες τροφίμων όπως τα επιδόρπια και οι κρέμες:

Πίνακας 14.1 Επιτρεπόμενα όρια χρήσης νισίνης/κατηγορίες/εξαιρέσεις

Κατηγορία	Ανώτατα επίπεδα (mg/l ή mg/kg	Εξαιρέσεις
Άλλες κρέμες	**10**	μόνο *clotted cream*
Επιδόρπια	**3**	**Μόνο πουτίγκες από σιμιγδάλι και ταπιόκα και παρόμοια προϊόντα**

Πηγή (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) - Europa EU)

14.4 Επιτρεπόμενα όρια μικροοργανισμών στα διαφορά είδη κρέμας-επιδορπίων

Σύμφωνα με τον Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2073/2005, μικροοργανισμοί, όπως η *Salmonella, E coli, Enterobacteriaceae,* είναι από τους παράγοντες υποβάθμισης που καθιστούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα ανασφαλή. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε τον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 14.2 Επιτρεπόμενα μικροβιολογικά κριτήρια μικροοργανισμών στα διάφορα είδη κρέμας

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
Κρέμα από νωπό γάλα ή γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη της παστερίωσης	***Salmonella***	**Απουσία σε 25 gr**	**Απουσία σε 25 gr**	**EN/ISO 6579**	**Σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησης τους**
Κρέμα από νωπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί	***E. coli***	**10 cfu/g**	**100 cfu/g**	**ISO 16649-1 ή 2**	**Τέλος της διαδικασίας παρασκευής**

επεξεργασία σε θερμοκρασία					
Επιδόρπια με βάση το γάλα	***Enterobacteriaceae***	**10 cfu/g**	**100 cfu/g**	**ISO 21528- 2**	**Τέλος της διαδικασίας παρασκευής**

Πηγή (Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2073/2005)

14.5 Επιτρεπόμενα όρια μικροοργανισμών σε νωπό αγελαδινό γάλα

Στην οδηγία 92/46/ΕΟΚ καθορίζονται τα ανώτατα όρια περιεκτικότητας σε μικρόβια στο νωπό γάλα αγελάδας που προορίζεται για την παραγωγή κρεμών και πρέπει να ανταποκρίνεται στις ακόλουθες προδιαγραφές:

- Περιεκτικότητα σε μικρόβια στους 30°C (ανά ml) ≤ 100.000, όπου εκφράζεται ο Γεωμετρικός μέσος όρος που διαπιστώνεται σε περίοδο δύο μηνών με τουλάχιστον δύο δειγματοληψίες μηνιαίως.
- Περιεκτικότητα σε σωματικά κύτταρα ανά ml ≤ 400.000, όπου δηλώνεται ο Γεωμετρικός μέσος όρος που διαπιστώνεται σε περίοδο τριών μηνών με τουλάχιστον μία δειγματοληψία μηνιαίως.

15. Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες

15.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι μια ομάδα βακτηρίων που πήραν το όνομά τους από το γαλακτικό οξύ, το κύριο προϊόν, δηλαδή, που παράγεται από την ζύμωση της λακτόζης και μπορεί να είναι L(+), D(-) ισομερή ή ρακεμικής μορφής. Επίσης, χαρακτηρίζονται ως ομοιοζυμωτικά, όσα ζυμώνουν την λακτόζη σχεδόν πλήρως σε γαλακτικό οξύ, και ως ετεροζυμωτικά όσα ζυμώνουν την λακτόζη σε μεγάλο ποσοστό προς γαλακτικό οξύ και το υπόλοιπο ποσοστό είναι αιθανόλη, οξικό και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009). Το 1988, ο Klaenhammer όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria) ως μία μεγάλη ομάδα συνήθως ωφέλιμων βακτηρίων, τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες και συμβάλλουν τόσο στη ζύμωση όσο και στη συντήρηση

των τροφίμων. Εξαιτίας της βιομηχανοποίησης που έχουν υποστεί τα τρόφιμα, η οικονομική σημασία των LAB αυξήθηκε, καθώς συμβάλλουν στην βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και στην ποιότητα όσων προϊόντων έχουν υποστεί ζύμωση (Guchte et al., 2002). Επιπλέον, με την μείωση του pH των τροφίμων (Axelsson & Ahrne, 2000) και την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (π.χ. βακτηριοσίνες), οι οποίες δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Guchte et al., 2002), καθυστερούν την αλλοίωση των τροφίμων και αυξάνουν τον χρόνο ζωής τους. Το ίδιο υποστήριξαν και οι Salminen et al. το 2004, ότι με την οξύνιση και την παραγωγή των συγκεκριμένων βακτηριοστατικών και βακτηριολυτικών ουσιών, τα τρόφιμα διατηρούνται πολύ περισσότερο, καθώς εμποδίζεται η ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ετερογενής ομάδα αναερόβιων και αερόβιων κατά Gram-θετικών βακτηρίων. Χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι η πρόκληση διάφορων ωφέλιμων ζυμώσεων και ονομάζονται διεθνώς ως Starters. Τα κυριότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκκινητές είναι τα γένη ***Streptococcus, Lactococcus*** και ***Lactobacillus***.

Πιο αναλυτικά, το γένος *Streptococcus*, και συγκεκριμένα ο *S. salivarious sub. thermophilus*, γνωστός και ως *S. thermophilus*, χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Είναι κατά Gram θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος, με διάμετρο 0,7-0,9 μm και με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40 ^{o}C μέχρι 45 ^{o}C. Επιπλέον, επιβιώνει στην παστερίωση, ενώ δεν αναπτύσσεται σε Nacl > 2%. Τέλος, λειτουργεί συνεργατικά (MUTUALISM) με τον *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* κατά την παραγωγή γιαουρτιού στον οποίο επιφέρει πιο γρήγορη πήξη, αλλά και με τον *Lactococcus helveticus* που χρησιμοποιούνται ως starters στην παραγωγή της Γραβιέρας (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Όσον αφορά το γένος *Lactococcus*, αποσπάστηκε από το γένος *Streptococcus* και αποτελεί τους στρεπτόκοκκους που βρίσκονταν στην ομάδα N κατά Lancefield. Τα είδη αυτού του γένους χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλιέργειες εκκίνησης (Bengey's Manual, 1994). Τα είδη των λακτοκόκκων που επιδρούν ευεργετικά στα ζυμωμένα προϊόντα είναι:

1. Το είδος ***Lactococcus lactis subsp. Lactis***, ο οποίος είναι μεσόφιλος, ομοιοζυμωτικός Gram θετικός κόκκος, με διάμετρο 0,5-1,5μm και με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30°C. Έχει σχήμα ωοειδές και αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις καλύτερα μέχρι και 4% Nacl (Μάντης et al. 2015). Η ικανότητα παραγωγής της βακτηριοσίνης (νισίνης) είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους ο *L. lactis* είναι ένας από τους

σημαντικότερους μικροοργανισμούς στη γαλακτοκομική βιομηχανία και με βάση το ιστορικό της στη ζύμωση των τροφίμων, ο *L. lactis* έχει αναγνωριστεί ως ασφαλή είδος (GRAS)(FDA, Wessels et al. 2004).

2. Ο ***Lactococcus lactis subs. cremoris,*** ο οποίος είναι μεσόφιλος, χρησιμοποιείται ως starter στην Γραβιέρα μαζί με τον ***Lactococcus lactis subsp. lactis*** (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009) και αναπτύσσεται μεταξύ 15ºC – 30ºC. Μερικά είδη του μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ψύξεως (Allais, 1974).
3. Ο ***Lactococcus lactis biovar diacetylactis*** έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον ***Lactococcus lactis subsp. lactis.*** Παράγει διακετύλιο από τα κιτρικά άλατα και προσδίδει ιδιαίτερο άρωμα και γεύση στο γιαούρτι, το βούτυρο και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (Harvey and Collins, 1961, Cogan, 1995, Steele, 1998)

Το γένος Lactobacillus είναι κατά Gram θετικός κόκκος, προαιρετικά αναερόβιος, με διάμετρο είτε 1-2 μm είτε 10-20 μm, έχοντας το μέγεθος μεγάλων νηματοειδών βακίλλων. Εμπεριέχει περίτριχες βλεφαρίδες, είναι ασπορογόνο και αναπτύσσεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης μέχρι το pH να φτάσει 4.2-4.4. Σύμφωνα με τους Orla-Jensen, το 1943, διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

Στην πρώτη ανήκουν οι υποχρεωτικά ομοιοζυμωτικοί και είναι:

a) Ο ***Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*** που είναι θερμόφιλος λακτοβάκιλλος και είναι γνωστός ως *L. lactis*. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 40-43ºC και συνέργεια με άλλα οξυγαλακτικά είδη που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ορισμένων τυριών (π.χ. emmental).

b) Ο ***Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus***, ο οποίος είναι θερμόφιλος, παράγει μια αντιμικροβιακή ουσία την βουλγαρικάνη και απαντάται κυρίως στα γιαούρτια και τα τυριά όπου χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους.

c) Ο ***Lactobacillus helveticus.*** Ο συγκεκριμένος είναι θερμόφιλος, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 42ºC–45ºC. Είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, του Lactocin και της Helveticin, που ασκούν καταλυτική δράση σε ορισμένους λακτοβάκιλλους και στον *S. aureus*.

d) Ο ***Lactobacillus helveticus subsp. Jugurti*** που είναι παρόμοιος με το είδος Lb. *helveticus* και χρησιμοποιείται στην παραγωγή του γιαουρτιού και

e) Ο ***Lactobacillus acidophilus***, ο οποίος είναι θερμόφιλος και χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός εκκίνησης για την παραγωγή διαφόρων ξινόγαλων (π.χ. kefir,acidophilus milk). Μαζί με τα είδη *Bifidobacterium* που χρησιμοποιούνται στην

ζύμωση διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων (π.χ. ξινόγαλο, τυρί, γιαούρτι), επιδρούν ευεργετικά στην υγεία των ανθρώπων.

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι προαιρετικώς ομοιοζυμωτικοί και κατατάσσονται στην ομάδα των στρεπτοβακτηρίων. Αυτοί είναι:

a) Το είδος ***Lactobacillus plantarum***, ο οποίος είναι μεσόφιλος με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-35 ºC. Παράγει μια αντιμικροβιακή ουσία, την Plantarin (A, B, S), η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη των κατά Gram θετικών βακτηρίων, καθώς και
b) Ο ***Lactobacillus***, ο οποίος θεωρείται μεσόφιλος μικροοργανισμός που επιδρά θετικά στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου (Perdigon και συν., 1990).

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι υποχρεωτικώς ετεροζυμωτικοί και κατατάσσονται στην ομάδα των βηταβακτηρίων. Εκτός από το *Lactobacillus brevis* που ανήκει στο γένος *Lactobacillus,* ανήκουν και τα εξής γένη :

a) Ο ***Bifidobacterium*** που είναι ακίνητος, θετικός κατά Gram βακτήρια και ανήκει στους Ακτινομύκητες. Παρόλο που με την ζύμωση παράγει γαλακτικό οξύ, δεν κατατάσσεται στα οξυγαλακτικά βακτήρια.
b) Τα ***Brevibacterium*** ανήκει στα κορυνοβακτηριοειδή. Έχουν ένα πολύ σημαντικό και αντιπροσωπευτικό είδος, το αερόβιο *Brevibacterium linens*, που είναι ακίνητο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-25ºC και χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαλακών τυριών (π.χ. Brie, Limburger κ.ά.). Χαρακτηριστικό του είναι το κιτρινωπό και πορτοκαλί επίχρισμα, αλλά και τα αρώματα που δημιουργούνται εξαιτίας της πρωτεόλυσης, καθώς αναπτύσσεται επιφανειακά.
c) Τα ***Propionibacterium*** που είναι ακίνητα, θετικά κατά Gram βακτήρια, ασπορογόνα αναερόβια ή αερόβια. Το μεταβολικό τους μονοπάτι είναι ότι ζυμώνουν τα γλυκόζη και λακτόζη προς προπιονικό, οξικό οξύ και $C0_2$ και μικροποσότητες από ισοβαλεριανικό, ηλεκτρικό και μυρμηκικό οξύ.
d) Ο ***Enterococcus***, που στελέχη του (π.χ. *E. faecalis, E. duran*) χρησιμοποιούνται για την ωρίμανση των τυριών λόγω της καλής πρωτεολυτική τους δράσης.
e) Ο ***Leuconostoc*** (Orla Jensen), του οποίου πολλά είδη χρησιμοποιούνται ως Starters και είναι ετεροζυμωτικά(Gilmour kai Rave, 1990) και είναι τα εξής:
    1) Είδος ***Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides:*** Ο συγκεκριμένος ανευρίσκεται στο γάλα και τα προϊόντα του, ενώ ζυμώνει

την λακτόζη προς γαλακτικό οξύ και CO_2, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-30ºC. Μερικά είδη του παράγουν την δεξτράνη, η οποία χρησιμοποιείται στην γιαούρτη σαν σταθεροποιητής.

2) Είδος ***Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris:*** Χρησιμοποιείται σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. τυριού κρέμας, βούτυρο, cottage), με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-30ºC.
3) Είδος ***Leuconostoc paramesenteroides:*** Χρησιμοποιείται ως μεσόφιλος μικροοργανισμός εκκίνησης σε τυριά και σε ζυμώσεις λαχανικών, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-30ºC.
4) Είδος ***Leuconostoc lactis:*** Είναι θερμοάντοχος μικροοργανισμός, ο οποίος ανευρίσκεται στο γάλα έχοντας άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-30ºC.

Επιπροσθέτως, οι οξυγαλακτικοί μικροοργανισμοί απαντώνται σε προϊόντα ζωικής ή φυτικής προέλευσης και αποτελούν την φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκονται στον κόλπο, στον εντερικό σωλήνα καθώς και στη στοματική κοιλότητα, συμβάλλοντας στην καλή κατάσταση του οργανισμού (Salminen et al., 2004). Τα LAB που βρίσκονται στα τρόφιμα ως τυχαία μικροχλωρίδα ή ως εναρκτήριες καλλιέργειες, θεωρούνται ακίνδυνα ή και ωφέλιμα κάποιες φορές για τον άνθρωπο. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζυμώσεις ζωοτροφών, τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, αλλά χρησιμοποιούνται και ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου, καθώς και ως προβιοτικά. Όσον αφορά τη βιομηχανία τροφίμων, χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες προκειμένου να προκληθεί ευνοϊκή αλλαγή στην υφή, το άρωμα, την οξύτητα και τη γεύση των τροφίμων (Harzallah & Belhadj, 2013).

Επομένως, για να υπάρξει η επιθυμητή ποιότητα στα τρόφιμα και η σωστή λειτουργικότητα των ιδιοτήτων τους, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επιλογή των κατάλληλων καλλιεργειών εκκίνησης. Ως εκ τούτου, θα πρέπει τα συγκεκριμένα τρόφιμα να φυλάσσονται από τις δύσκολες συνθήκες τόσο των βιομηχανικών διεργασιών όσο και του ανθρώπινου οργανισμού (Harzallah & Belhadj, 2013 και Guchte et al., 2002).

Το 2002, οι ζωντανοί μικροοργανισμοί ορίστηκαν από τους FAO/WHO ως προβιοτικά βακτήρια, καθώς όταν καταναλώνονται σε αρκετή ποσότητα έχουν σημαντικές ωφέλειες για την ανθρώπινη υγεία. Τα προβιοτικά σε σχέση με τα τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως «βιώσιμα σκευάσματα σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής για τη βελτίωση της υγείας ανθρώπων και ζώων». Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υποστηρίζεται πως ένας πολύ υψηλός αριθμός

μικροβιακών ειδών περιλαμβάνει προβιοτικά στελέχη (Harzallah & Belhadj, 2013). Σαν αποτέλεσμα συνειδητοποίησης του καταναλωτή για την πολύτιμη συμβολή τους στην υγεία, η ζήτησή τους στην παγκόσμια αγορά όλο και αυξάνεται. (Harzallah & Belhadj, 2013).

Στη βιομηχανία των τροφίμων, τα LAB εκτός από τη χρήση τους για τη ζύμωση των τροφίμων, συμβάλλουν και στην παραγωγή βασικών χημικών προϊόντων, όπως τα οργανικά οξέα. Τέλος, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων αλλά και στον φαρμακευτικό τομέα με τη δημιουργία ακόμα και εμβολίων (Wells et al., 1996, Wu et al., 2002 και Harzallah & Belhadj, 2013).

15.2 Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ενώσεις που βρέθηκαν πριν από 100 χρόνια περίπου από τον Γάλλο Gratia σε καλλιέργειες *Escherichia coli* (Gillor et al., 2008). Παράγονται από θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Teather et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα παράγονται από βακτήρια γαλακτικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων των *Lactococci, Lactobacillus και Pediococci* (Klaenhammer 1988, Jack et al. 1995). Επίσης, είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια όπου συντίθενται ριβοσωμικά και πολλές φορές κωδικοποιούνται από πλασμιδιακό DNA (Gillor et al., 2008).

Πολλές από αυτές έχουν συγγενικό αντιμικροβιακό φάσμα ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων, όπως τους *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*, καθώς και σπορογόνα βακτήρια (Hechard et al. 1992, Sobrino-Lopez και Martin-Belloso 2008). Επιπροσθέτως, χρησιμοποιούνται σαν φυσικό αντιμικροβιακό (Gonzalez et al. 1994). Σύμφωνα με τη μελέτη των Thomas et al. το 2000, οι βακτηριοσίνες έχουν πολλά οφέλη για τα τρόφιμα. Αρχικά, αυξάνουν τον χρόνο ζωής των προϊόντων, ενώ δημιουργούν επιπλέον προστασία σε κακές συνθήκες κατά την επεξεργασία των τροφίμων και τυχόν ελλιπών θερμοκρασιών. Μειώνουν επίσης τον κίνδυνο που προκαλούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί καθώς και τους οικονομικούς κινδύνους λόγω της βραδείας αλλοίωσης των τροφίμων. Τέλος, δεν έχουμε αυξημένο αριθμό πρόσθετων χημικών παρεμποδιστών, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες παστερίωσης μπορούν να παραμεριστούν χωρίς να διακυβεύεται η ασφάλεια των τροφίμων.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των βακτηριοσινών είναι η αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα αντιβιοτικά, καθώς έχουν σχετικά στενό φάσμα παρεμπόδισης (Teather et al., 1999). Η δράση τους περιορίζεται σε στελέχη τα οποία είναι άμεσα φυλογενετικά με το βακτήριο από το οποίο παράγεται είτε πιο ευρύ, αν και περιλαμβάνει πολλές ομάδες Gram-θετικών μικροοργανισμών (Klaenhammer, 1988). Ωστόσο, ορισμένες βακτηριοσίνες είναι πιο θερμοσταθερές από τα αντιβιοτικά και έχουν τη δυνατότητα να δράσουν σε μεγαλύτερο εύρος pH, επειδή είναι δραστικές σε πολύ μικρή κλίμακα. Είναι άχρωμες, άοσμες, άγευστες και εφαρμόζονται τόσο στον φαρμακευτικό τομέα όσο και στη βιομηχανία των τροφίμων (Perez et al., 2015).

Επιπροσθέτως, περιλαμβάνουν ποικιλία πρωτεϊνών που διαφοροποιούνται ανάλογα με το μέγεθος, τον τρόπο που δρουν, τον μικροοργανισμό στόχο, αλλά και τους μηχανισμούς ανοσίας, ενώ δύναται να χωριστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες, αυτές που παράγονται από Gram-θετικά και αυτές από Gram-αρνητικά βακτήρια (Gillor et al., 2008).

Οι βακτηριοσίνες διακρίνονται σε τρεις κλάσεις (Salminen et al., 2004). Η πρώτη είναι τα λαντιβιοτικά και περιλαμβάνει τροποποιημένες βακτηριοσίνες που περιέχουν σπάνια αμινοξέα, συντίθενται ριβοσωμικά και έχουν ως στόχο ένα μεγάλο φάσμα Gram-θετικών βακτηρίων (Salminen et al., 2004, Gillor et al., 2008, Perez et al., 2015 και Cotter et al., 2005). Τα λαντιβιοτικά χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τον τρόπο δράσης και την δομής τους. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία ανήκουν επιμήκεις πρωτεΐνες με μικρό μέγεθος, όπως η νισίνη. Δρουν προσβάλλοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη των Gram-θετικών βακτηρίων και δημιουργώντας οπές που προκαλούν τον θάνατο των κυττάρων (Salminen et al., 2004, Gillor et al., 2008). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει σφαιρικά πεπτίδια, τα οποία, όταν δρουν, παρεμποδίζουν τη λειτουργία των ενζύμων, καταστρέφοντας έτσι τα βακτήρια (Perez et al., 2015, Cotter et al., 2005 και Salminen et al., 2004).

Η δεύτερη κλάση περιέχει και αυτή θερμοσταθερά πεπτίδια μικρού μεγέθους (Perez et al., 2015 και Cotter et al., 2005). Υποδιαιρείται σε τέσσερις ομάδες και επιδρά στα βακτήρια μέσω της επιρροής της διαπερατότητας της μεμβράνης τους και της συμβολής στην εκροή μορίων από το εσωτερικό τους (Perez et al., 2015 και Cotter et al., 2005). Οι δύο συγκεκριμένες κλάσεις (πρώτη και δεύτερη) θεωρούνται οι κύριες κλάσεις των βακτηριοσινών εξαιτίας της ανοσίας τους, καθώς και της δυνητικής χρήσης τους σε εμπορικές εφαρμογές (Salminen et al., 2004).

Οι υδρολάσες αποτελούν την τρίτη κλάση των βακτηριοσινών. Είναι αντιμικροβιακές πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους, ευαίσθητες στη θερμότητα και ονομάζονται βακτηριολυσίνες.

Μέχρι σήμερα, τέσσερις μόνο που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί γενετικά και έχουν ως στόχο να καταστρέψουν τα ευαίσθητα κύτταρα, υδρολύοντας το τοίχωμα των κυττάρων (Cotter et al., 2005).

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια δεν έχουν τόσο αποτελεσματική χρήση, σύμφωνα με τα ως τώρα στοιχεία, έναντι αυτών που παράγονται από Gram-αρνητικά χωρίς τη βοήθεια κάποιας δραστικής ουσίας στην εξωτερική μεμβράνη τους (Salminen et al., 2004).

Στην βιομηχανία των τροφίμων, οι βακτηριοσίνες χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά ποικίλων τροφίμων, είτε μόνες τους είτε συνδυάζοντας τες με άλλες μεθόδους συντήρησης που είναι γνωστές ως τεχνολογία εμποδίων. Πιο αναλυτικά, έχει γίνει αρκετή διερεύνηση για τις βακτηριοσίνες που ενσωματώνονται σε φιλμ συσκευασίας τροφίμων ή στις επιφάνειες αυτών και η συγκεκριμένη ενσωμάτωση δύναται με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. με άμεσο εμβολιασμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων που παράγουν τη βακτηριοσίνη στα τρόφιμα.
2. με προσθήκη της βακτηριοσίνης στην καθαρή της μορφή, ως συντηρητικό στα τρόφιμα.
3. με τη χρήση του προϊόντος που υπέστη ζύμωση από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν την βακτηριοσίνη ως πρώτη ύλη για την επεξεργασία των τροφίμων (Perez et al., 2015).

Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον για την εφαρμογή των βακτηριοσινών στη συντήρηση των τροφίμων είναι μεγάλο, καθώς δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων (Teather et al., 1999). Ο λόγος, ότι αποδείχθηκε πως οι βακτηριοσίνες είναι αποτελεσματικές έναντι ειδών των γενών *Listeria* και *Staphylococcus*, αλλά και έναντι βακτηρίων, τα οποία σχηματίζουν σπόρια, π.χ. το *Clostridium botulinum* και στελέχη Bacillus (Harzallah & Belhadj , 2013, Salminen et al., 2004 και Gillor et al., 2008).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των βακτηριοσινών, μόνο η νισίνη επιτρέπεται σαν συντηρητικό (E234, 1983) και αναγνωρίστηκε για την ασφάλεια της χρήσης τους από τον WHO το 1969 και το αποδέχτηκε το FDA/HHS το 1998.

15.2.1 Νισίνη

Νισίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο που παράγεται από τον *Lactococcus lactis subsp. lactis* και αποτελεί μία βακτηριοσίνη με μέγεθος 3.5 kDa. Κατασκευαστικά αποτελείται από 34 κατιονικά αμινοξέα πεπτιδίων (Aly et al., 2012), εξαιτίας των συνδυαστικών υπολειμμάτων

της και ενός ή περισσότερων υπολειμμάτων της ιστιδίνης (Cleveland et al. 2001). Αποτελεί λαντιβιοτικό τύπου Α, του οποίου η σύνθεση γίνεται ριβοσωμικά και έχει σχήμα κοχλία (Shin et al., 2015). Η νισίνη είναι ένα βακτηριοκτόνο που δρα ενάντια σε gram (+) μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, έχει βακτηριοστατική δράση κατά των σπορίων. Ο αντιμικροβιακός της μηχανισμός δεσμεύει τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης ενώνοντας τους με άλλα κύτταρα (π.χ. φωσφολιπίδια) ή με τη συσσωμάτωση της με άλλες πρωτεΐνες (π.χ. γλυκοπρωτεΐνες). Ως επακόλουθο τούτου δημιουργούνται ιονικά κανάλια διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης καθιστώντας τα κύτταρα των βακτηρίων διαπερατά (Delves 1990a). Στο εμπόριο, η νισίνη είναι διαθέσιμη με τη μορφή αποξηραμένης συμπυκνωμένης σκόνης και ονομάζεται Nisaplin (Danisco A/S, Grindsted, Denmark). Είναι θερμικά σταθερή, διαλυτή στο νερό και εφαρμόζεται ιδανικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα εμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των ανεπιθύμητων βακτηρίων στα προϊόντα και ειδικά σε προϊόντα τύπου επιδόρπια, επεξεργασμένα τυριά, παστεριωμένα γάλατα, παχύρευστες κρέμες και εβαπορέ (Hurst and Hoover 1993 και Thomas et al. 2000).

Η νισίνη είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο των παθογόνων βακτηρίων διασφαλίζοντας την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς οι ελεγκτικοί μηχανισμοί και όσοι γενικά ασχολούνται με τα τρόφιμα, εξαιτίας της παγκοσμιοποίησης της αγοράς των τροφίμων, αδυνατούν να ελέγξουν τις μικροβιακές μολύνσεις στην πρώτη ύλη και να διατηρήσουν τις απαραίτητες θερμοκρασίες αποθήκευσης, μεταφοράς και παράδοσης των τελικών προϊόντων (O' Mahony et al. 2001 και Martinez Viedma et al. 2009). Επιπροσθέτως, τα θέματα ασφαλείας που σχετίζονται με τα παθογόνα των τροφίμων, με τους παρασκευαστές να έχουν το ρίσκο της οικονομικής απώλειας, εξαιτίας των μολύνσεων που προκαλούν τα μικρόβια και της διάδοσης τους από τις μη κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, καθιστούν τη νισίνη ένα αναμενόμενο εργαλείο διαφύλαξης της ασφάλειας των τροφίμων και βελτίωσης της τεχνολογίας τους.

Το 1969, εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (FAO/WHO) ως ένα πρόσθετο τροφίμων ασφαλές για τον άνθρωπο με τον κωδικό **E234** (Aly et al., 2012 και Cotter et al., 2005). Τη σήμερον ημέρα, χρησιμοποιείται σε πάνω από 40 χώρες και είναι σημαντική στη βιομηχανία των τροφίμων ως ένα φυσικό βιοσυντηρητικό, κατάλληλο για ποικίλα τρόφιμα. Επιπροσθέτως, έπειτα από μελέτες που έγιναν το 1988 από τον οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) για την τοξικότητα της, χαρακτηρίστηκε ως Gras (Generally Recognized As Safe) (Shin et al.,

2015). Σύμφωνα με την Επιστημονική Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η επιτρεπτή ημερήσια ποσότητα κατανάλωσής της θα πρέπει να είναι από 0 μέχρι 13 mg/kg ζώντος .

Ωστόσο, εφαρμόζεται σε ελάχιστες δόσεις, διότι έχει εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση (Chung et al. 1989 και Liu and Hansen 1990). Καθώς το pH αυξάνεται από 3 σε 7, η Νισίνη γίνεται ευάλωτη στη θερμότητα (Delves 1990a). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να μειωθεί από παράγοντες που σχετίζονται με τα τρόφιμα, όπως το λίπος και η πρωτεΐνη, επειδή τα δεσμεύει από την επιφάνεια, με αποτέλεσμα τη μείωση της προσβασιμότητας των βακτηρίων στα κύτταρα (Laridi et al. 2003). Η αποτελεσματικότητα της Νισίνης ως συντηρητικό πρέπει να αξιολογείται σε κάθε νέο προϊόν.

Ωστόσο, μελέτες στα επιδόρπια έδειξαν ότι, όπου χρησιμοποιήθηκε η νισίνη, έδειξαν ότι δύναται να ελέγξει τους πόρους και να αυξήσει τη ζωή σε κρέμα καραμέλα και επιδόρπια σοκολάτας (Anon 1985, Plockova et al. 1998). Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες μελέτες είναι χαμηλής δυναμικής λόγω του ότι η νισίνη δρα διαφορετικά σε κάθε προϊόν και η συγκέντρωση της δεν είναι επαρκής στις πουτίγκες. Περαιτέρω, η συγκεκριμένη βακτηριοσίνη μπορεί να μη δείχνει πρόοδο στη χρήση της στα επιδόρπια, επειδή η μετάβαση από τα εργαστήρια στην παραγωγή (από ελεγχόμενες σε εμπορικές συνθήκες) είναι σχετικά ανεπιτυχής (Jones 1974, Jung et al. 1992).

Επιπλέον, η νισίνη συμβάλλει στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης Gram-θετικών βακτηρίων, είτε αλλοιωγόνων είτε παθογόνων, όπως ο *Staphylococcus spp*., όντας αποτελεσματική ακόμα και στα σπόρια τους (Aly et al., 2012 και Shy et al., 2017). Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι είτε με την καθαρή της μορφή είτε σε συνδυασμό με διάφορα αντιβιοτικά, δύναται να είναι αποτελεσματική έναντι και των Gram-αρνητικών βακτηρίων και ότι, εφόσον γίνουν ορισμένες βιομηχανικές παραλλαγές, η δραστικότητα της μπορεί να ενισχυθεί αμφότερα και στα δύο Gram. Σε αντίθεση με τους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς, οι Gram-αρνητικοί διαθέτουν μία επιπλέον μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο δεν γίνεται να περάσει το αμφίφυλο μόριο της νισίνης, λόγω και του αρκετά μεγάλου μεγέθους του (Zhang et al., 2014), με σκοπό να προσβάλλει την ευαίσθητη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η πεπτιδογλυκάνη, ενώ η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιλαμβάνει πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Όσον αφορά την εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (Perez et al., 2015 κα Cotter et al., 2005).

Η νισίνη δρα είτε αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος είτε προκαλώντας οπές στη μεμβράνη του βακτηρίου (Aly et al., 2012 και Perez et al., 2015).

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα είναι κοινός και πρόκειται για τον δεσμό που δημιουργείται μεταξύ νισίνης και λιπιδίου (Perez et al., 2015). Μάλιστα, μελέτες in vitro έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση που έχει η νισίνη, έχει άμεση σχέση με την αλληλεπίδραση με το πρόδρομο λιπίδιο (Zhang et al., 2014). Ο τελευταίος, είναι ο βασικός μεταφορέας των υπομονάδων πεπτιδογλυκάνης από το κυτταρόπλασμα στο τοίχωμα των κυττάρων.

Όταν, λοιπόν, είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις, εμποδίζει τη λειτουργία των ενζύμων και συνεπώς τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, προκαλώντας έτσι τον θάνατο των κυττάρων. Από την άλλη όταν είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις, το μόριο νισίνης-λιπιδίου εισχωρεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργώντας οπές, με συνέπεια να καταστρέφεται έτσι η ακεραιότητα της (Perez et al., 2015). Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι η αφετηρία πολλαπλών δυσλειτουργιών, π.χ. της διατάραξης του δυναμικού που έχει η μεμβράνη και της εκροής μικρών μεταβολιτών, όπως ιόντων και αμινοξέων, και ως εκ τούτου διακόπτεται οποιαδήποτε βιοσυνθετική διεργασία (Perez et al., 2015 και Gao et al., 1991).

Επιπλέον, οι εφαρμογές της νισίνης σε συσκευασμένα τρόφιμα γίνεται με την ενσωμάτωση στα τρόφιμα είτε με την επιφανειακή απορρόφησή της στο υλικό της συσκευασίας. Οι τρόποι με τους οποίους ενσωματώνονται οι βακτηριοσίνες είναι δύο. Ο ένας τρόπος δύναται να γίνει με την παραγωγή βακτηριοσίνης και έπειτα να προστίθεται το τρόφιμο (ex situ). Ο άλλος τρόπος πραγματοποιείται με την παραγωγή της βακτηριοσίνης πραγματοποιείται μέσα στο τρόφιμο (in situ). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα βακτήρια παγιδεύονται μέσα στο τρόφιμο και δημιουργούν αποικίες. Η νισίνη για να έχει αποτέλεσμα θα πρέπει, μόλις απελευθερωθεί, να πάει στο μικροοργανισμό-στόχο (Aly et al., 2012).

Τέλος, εκτός από φυσικό συντηρητικό των τροφίμων, η νισίνη εφαρμόζεται και στην βιοϊατρική, καθώς με βάση ορισμένα στοιχεία φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των όγκων, με το να εμφανίζει άμεσα εκλεκτική κυτταροτοξικότητα προς τα καρκινικά κύτταρα (Shin et al., 2015). Ωστόσο, δεν είναι αποτελεσματική έναντι μυκήτων και ζυμών (Aly et al. 2012).

Σκοπός και αντικείμενο πτυχιακής

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση της νισίνης ως προς το χρόνο ζωής του συγκεκριμένου προϊόντος που παρασκευάστηκε με 3 διαφορετικά είδη γάλακτος. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 7°C και εξετάστηκε σε ποιες ομάδες αλλοιογόνων

μικροοργανισμών η νισίνη ασκεί βακτηριοστατική δράση σε διάστημα μεγαλύτερο από την ημερομηνία λήξης που έχει καθορίσει η βιομηχανία. Παράλληλα, τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους .

Πειραματικό μέρος

16 Υλικά και Μέθοδοι

16.1 Παραγωγή Βιομηχανικής Κρέμας βανίλιας

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε παραγωγική μονάδα γαλακτοβιομηχανίας της Αττικής, χρησιμοποιώντας την γραμμή παραγωγής κρέμας, τις πρώτες ύλες του εργοστασίου και την συνήθη παραγωγική διαδικασία του προϊόντος που περιγράφεται παρακάτω: Κατά την παρασκευή κρέμας χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 20 λίτρων νωπού γάλακτος ημερήσιας παραλαβής το οποίο επιμερίστηκε σε δύο ισόποσες ποσότητες με τις οποίες παρασκευάστηκαν 2 τύποι κρέμας με προσθήκη νισίνης (0.3%) και χωρίς (Μάρτυρας). Στους δύο τύπους κρέμας πραγματοποιήθηκε παστερίωση σε κλειστό σύστημα στους 92°C για 5 min, ενώ έγινε προσθήκη ζάχαρης σε περιεκτικότητα 1/10 από την ποσότητα του γάλακτος μέσα στο καζάνι κατά την διάρκεια της ανάδευσης. Έπειτα, μόλις η θερμοκρασία του μείγματος και των δύο ειδών ανέβηκε στους 80ºC, έγινε προσθήκη αμύλου καλαμποκιού και αμύλου ταπιόκας, ενώ στο τέλος της παστερίωσης έγινε προσθήκη βανίλιας σε σκόνη. Με το πέρας της παστερίωσης πραγματοποιήθηκε αυτόματο γέμισμα του προϊόντος σε περιέκτες των 180g και αφέθηκαν σε θερμοκρασία στους 21ºC για 30min για σκλήρυνση (tempering). Τέλος, έγινε κλείσιμο των δοχείων με αλουμινόφυλλα των Φ95,5.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης του πειράματος έγιναν 3 πιλοτικές δοκιμές με την χρήση τριών διαφορετικής ποιότητας γάλακτος. Για κάθε πειραματική δοκιμή πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικές επαναλήψεις Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο την ίδια ημέρα και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 7ºC, απ' όπου γίνονταν δειγματοληψίες με αντίστοιχες αναλύσεις μετά από 1, 7, 14, 21 και 28 ημέρες παραμονής τους στο θάλαμο.

16.2 Μέθοδος ανίχνευσης της βιοδραστικότητας της νισίνης

16.2.1 Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (Well Diffusion Assay, WDA) (S. Oshima et al., 2014)

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της νισίνης στις κρέμες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με την βοήθεια ευαίσθητου στελέχους στην νισίνη. Η συγκεκριμένη μέθοδος (Well Diffusion Assay, WDA) έχει σκοπό την ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης της νισίνης και βασίζεται στην διάμετρο των ζωνών ανάσχεσης που εμφανίζονται στο υπόστρωμα γύρω από τις οπές στις οποίες έχουμε εισάγει το διάλυμα της νισίνης. Οι ζώνες μαρτυρούν την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού-στόχου καθώς διαχέεται μέσα στο κατάλληλο υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ σε τρυβλίο, που έχει εμβολιαστεί με τον κατάλληλο ευαίσθητο μικροοργανισμό 'δείκτη', ανοίγονται τρύπες διαμέτρου (6mm) με αποστειρωμένη ανεστραμμένη πιπέτα Παστέρ. Εν συνεχεία, γίνεται έκχυση ποσότητας 50μL της νισίνης και των αντίστοιχων αραιώσεων της που έχει εκχυλιστεί από την κρέμα με νισίνη. Έπειτα, τα τρυβλία αφέθηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να επιτευχθεί η διάχυση του διαλύματος, και τέλος επωάστηκαν στην αντίστοιχη ανάπτυξης του ευαίσθητου στελέχους 'δείκτη' που χρησιμοποιήθηκε. Μετά το πέρας 24 ωρών επώασης, οι διάμετροι των ζωνών παρεμπόδισης μετρήθηκαν με υποδεκάμετρο ακριβείας. Οι ζώνες παρεμπόδισης είχαν διαφορετική ένταση και μέγεθος ανάλογα με τον βαθμό παρεμπόδισης της ανάπτυξής του.

16.2.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς συγκεντρώσεων Νισίνης (Maria papagianni et al.,2006)

Με στόχο την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης νισίνης από την διάμετρο των ζωνών ανάσχεσης, πραγματοποιήθηκε μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος νισίνης κάνοντας χρήση 3 διαφορετικών μικροοργανισμών ως στελέχη ΄δείκτες΄.

Μητρικό διάλυμα νισίνης (Stock Solution), με ενεργότητα 1000 IU/ml, που χρησιμοποιήθηκε για την καμπύλη αναφοράς στην μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, παρασκευάστηκε ως εξής: Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκε 0,01g νισίνης (Nisaplin (2,5%), Danisco, Denmark) και προστέθηκε σε 10mL διαλύματος HCL 0.02N. Το Stock Solution, με τη μέθοδο Well Diffusion Assay, χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή κατάλληλων αραιώσεων νισίνης από 1 έως 1000

IU/ml με στόχο την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για κάθε στέλεχος 'δείκτη' για την ποσοτικοποίηση της δραστικότητας της βακτηριοσίνης. Η νισίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εμπορικό σκεύασμα Nisaplin (2,5%) της εταιρίας Danisco με ενεργότητα 10^6 IU/g, τόσο για την παρασκευή των κρεμών, όσο και στην δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς στην μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (Well Diffusion Assay,WDA) για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής της δράσης. Επίσης, εξετάστηκε και η βιοενεργότητα του Stock Solution της νισίνης έναντι των ευαίσθητων στελεχών, με θερμική επεξεργασία στους 95 ^{o}C/ 5 min.

16.2.3 Επιλογή ευαίσθητων μικροοργανισμών 'Δεικτών' για την WDA

Τα στελέχη που εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους έναντι της νισίνης, για την επιλογή του κατάλληλου ευαίσθητου στελέχους 'δείκτη', ήταν τα *Lactococcus lactis spp. cremoris CNRZ 117, L. monocytogenes FMCC B-128, και Lb curvatus MG1363.* Χρησιμοποιήθηκαν ως ευαίσθητοι μικροοργανισμοί - στόχοι, στην μέθοδο διάχυσης για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης της νισίνης. Τα τρία αυτά στελέχη ανακτήθηκαν από την Συλλογή μικροοργανισμών ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ, όπου διατηρούνταν στους -80°C σε κρυοπροστατευτικά φιαλίδια cryoprotect (Microbank, ProLab Diagnostics). Τα συγκεκριμένα φιαλίδια περιέχουν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και γλυκερόλη με κρυοπροστατευτική ουσία και πορώδη πλαστικά σφαιρίδια, που επιτρέπουν την ταχεία και ασφαλή ανάκτησή τους. Σε κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ανανέωσης που στόχος της ήταν η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της βιοδραστικότητας της νισίνης. Για την ανανέωση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν οι εξής ενέργειες: Πάρθηκε υγρό υπόστρωμα που βρισκόταν σε συντήρηση στους 4°C, έγινε εμβολιασμός 100μL της καλλιέργειας στο υπόστρωμα που έχει την καλύτερη ανάπτυξη και αφέθηκε σε θερμοθάλαμο στους 30 ^{o}C overnight ώστε να γίνει η ανάπτυξή του. Τέλος, τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

16.2.3.1 Υποστρώματα για την WDA

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υγρού ανάπτυξης (MRS Broth) και στερεού (MRS soft agar)

Για τη παρασκευή συνθετικού υγρού ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα MRS broth (DE MAN, J.D., ROGOSA, M., a. SHARPE, M.E 1960) για την

ανάπτυξη και ανανέωση του *Lb. curvatus MG1363*, και το MRS soft agar (1%) με την προσθήκη άγαρ-άγαρ (1%) για την μέθοδο ανίχνευσης της δραστικότητας της νισίνης (well diffusion assay). Το προαναφερθέν παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	**gm/litre**
Πεπτόνη	(1% w/v)
Εκχύλισμα ζύμης	(0,50% w/v)
Εκχύλισμα κρέατος	(1% w/v)
Γλυκόζη	(2% w/v)
K2HPO4	(0,20% w/v)
Οξικό νάτριο	(0,50% w/v)
Κιτρικό αμμώνιο	(0,20% w/v)
Tween 80	(0,01% w/v)
MgSO4 .7H2O	(0,01% w/v)
Άγαρ	(1% w/v)

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υγρού ανάπτυξης (GM17 M17 soft agar και M17 Broth) (TERZAGHI, B.E., and SANDINE, W.E.. 1975)

Έγινε χρήση του εμπορικού υποστρώματος M17 Broth (Biokar diagnostics), για την ανάπτυξη και ανανέωση του στελέχους *Lactococcus lactis spp. cremoris CNRZ 117*, ενώ για την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (WDA) παρασκευάστηκε το M17 soft agar με την προσθήκη 1% agar.

Το προαναφερθέν παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	**gm/litre**
Tryptone	2.5
Soya peptone	5.0
Meat digest	2.5
Yeast extract	2.5
Ascorbic acid	0.5
Magnesium sulphate	0.25
Di-sodium-glycerophosphate	19.0
Agar	10

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υγρού ανάπτυξης BHI broth και BHI Soft agar.

Τέλος, για την ανάπτυξη του στελέχους ‘δείκτη’ *L. monocytogenes FMCC B-128* χρησιμοποιήθηκε το BHI Broth (Rosenow, E.C., 1919) της εταιρείας Biokar Diagnostics Zac De Ther-Allone-F60000 Beauvais και το αντίστοιχο BHI soft agar (1%) για την δοκιμή διάχυσης (WDA).

Typical Formula*	gm/litre
Pork brain heart infusion	17.5
Pancreatic digest of gelatin	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5
Glucose	2
Agar	10

.

16.3 Πρωτόκολλο εκχύλισης της νισίνης από κρέμα (GG FOWLER, B. JARVIS & TRAMER., 1975)

Με αποστειρωμένο κουτάλι πάρθηκαν 10g κρέμας που εμπεριείχε νισίνη και με ασηπτικό τρόπο εισήχθη σε αποστειρωμένη σακούλα (Stomacher). Εν συνεχεία, προστέθηκαν 40ml HCL 0.02% και έγινε ομογενοποίηση σε Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical Ltd., London, UK) για 1min. Έπειτα, έγινε ρύθμιση του pH στο 2 με 1N HCL και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 100°C για 5 min. Τέλος, πάρθηκε 1ml και τοποθετήθηκε μέσα σε eppendorf και αμέσως μετά το δείγμα μας φυγοκεντρήθηκε στους 12000 για 10min στους 24°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε σωληνάκι eppendorf και ελέγχθηκε ως προς την βιοενεργότητά του με την μέθοδο διάχυσης (WDA).

16.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις κρέμας και γάλακτος παρασκευής

16.4.1 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης

16.4.1.1 Μέθοδος δειγματοληψίας

Η παραπάνω διαδικασία δειγματοληψίας, όσον αφορά το νωπό πλήρες αγελαδινό γάλα, έγινε με την βοήθεια αποστειρωμένων δειγματοληπτών από το εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Τα δείγματα κρέμας, πάλι, με νισίνη και χωρίς νισίνη, πάρθηκαν συσκευασμένα αμέσως μετά την

παραγωγική διαδικασία. Οι αναλύσεις που έγιναν στο γάλα και στα δύο είδη κρέμας, ήταν μικροβιολογικές, έχοντας ως σκοπό τον προσδιορισμό της ποιότητας τους με γνώμονα την ασφάλεια του καταναλωτή. Τα δείγματα κρέμας με νισίνη και χωρίς νισίνη για τις παραπάνω αναλύσεις ελήφθησαν κατά την 1η, 7η ,14η,21η και 28η μέρα.

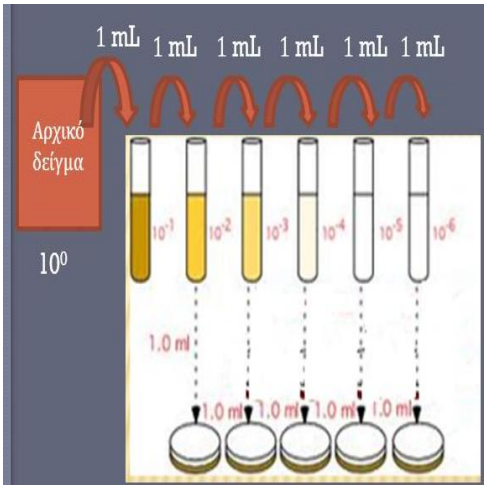
16.4.1.2 Μέθοδος Αρίθμησης ΟΜΧ

Μέθοδος των τρυβλίων (IDF: 100B, APHA,1992)

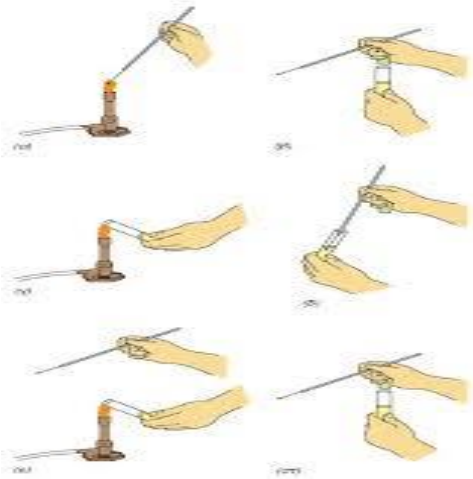
Η μέθοδος των τρυβλίων είναι η βασική μέθοδος που χρησιμοποιείται από την Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος (IDF) για την καταμέτρηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (ΟΜΧ) του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η καταμέτρηση γίνεται με τον σχηματισμό αποικιών (colony forming unit), οι οποίοι αναπτύσσονται στους 30°C σε στερεό υπόστρωμα (Standard Plate Count) μέσα σε τρυβλία. Αρχή της μεθόδου είναι η καταμέτρηση ζωντανών κυττάρων με γυμνό μάτι που έχουν επωασθεί στους 30°C για 72 ώρες σε τρυβλία petri.

Βασικό στοιχείο της μεθόδου αυτής είναι το γεγονός ότι διενεργείται κάτω από αυστηρές ασηπτικές συνθήκες. Πρώτη ενέργεια ήταν η αραίωση του δείγματος μας με δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις 1 ml σε 9 ml αραιωτικού διαλύματος (Ringer της Merck). Η μεταφορά του 1ml πραγματοποιείται με αποστειρωμένες αυτόματες πιπέτες. Πριν από κάθε μεταφορά δείγματος από μια αραίωση σε επόμενη γίνεται ισχυρή ανάδευση με την βοήθεια ειδικού κυκλομίκτη (Voltrex).

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των τρυβλίων στο κέντρο του 1ml κάθε αραίωσης και προστέθηκαν 10-15ml υγρού υποστρώματος MPCA, με θερμοκρασία ~45°C, σε κάθε τρυβλίο. Έπειτα, γίνεται ανάδευση με κυκλικές και παλινδρομικές κινήσεις ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος στο τρυβλίο. Τέλος, αφήνονται μέσα στο Laminar (εικόνα 16.3) μέχρις ότου πήξουν και τοποθετηθούν σε κλίβανο επώασης στους 30°C για 72 ώρες.



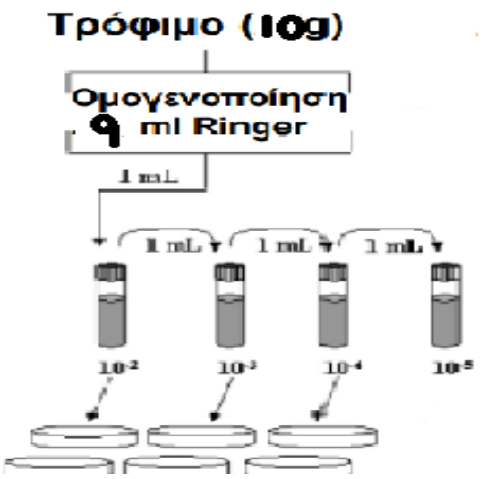
Εικόνα 16.1: Τρόπος εφαρμογής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε γάλα



Εικόνα 16.2: Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης

. **Εικόνα 16.3:** Ελεγχόμενος Χώρος εκτελέσεις μικροβιολογικών εργασιών (Laminar)

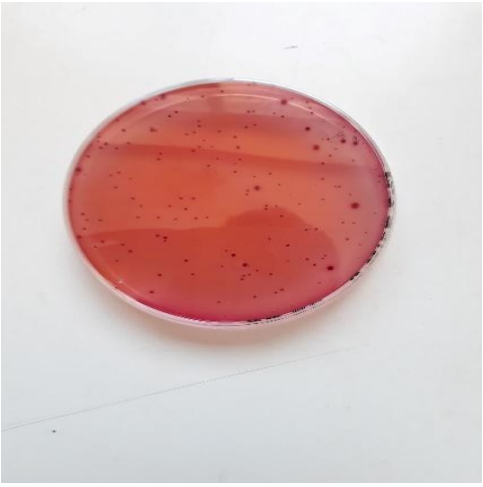
Εικόνα 16.4: Ελεγχόμενος Χώρος επώασης μικροβίων (Επωαστικός κλίβανος) (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)



Εικόνα 16.5: Τρόπος εφαρμογής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε κρέμα βανίλια

16.4.1.3 Μέθοδος Αρίθμησης κολοβακτηριδίων (MacConkeys.,1905)

Τα κολοβακτηρίδια ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae,* μιας ομάδας με αερόβια και προαιρετικά αναερόβια, gram-αρνητικά, που γίνεται ζύμωση της λακτόζης και παραγωγή αερίων. Για την μέτρηση του πληθυσμού τους ακολουθήθηκε η μέθοδος των τρυβλίων. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της παρούσας εργασίας είναι το VRBL (Violet Red Bile Agar) της εταιρείας HIMEDIA. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις 1 ml σε 9 ml αραιωτικού διαλύματος (Ringer της Merck), έγινε εμβολιασμός των τρυβλίων στο κέντρο του 1ml κάθε αραίωσης και προστέθηκε 10-15ml υγρό υπόστρωμα VRBL, με θερμοκρασία ~45°C, σε κάθε τρυβλίο. Έπειτα, έγινε ανάδευση με κυκλικές και παλινδρομικές κινήσεις ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο τρυβλίο και αφέθηκαν μέσα στο Laminar μέχρις ότου πήξουν. Εν συνεχεία, προστίθεται και 2ο στρώμα μικρής ποσότητας του υγρού θρεπτικού υλικού ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 24h. Τέλος, καταμετρήθηκαν οι ορατές Ροζ-μωβ αποικίες με μέγεθος μεγαλύτερο από 0,5mm.



Εικόνα 16.6: Τρυβλία αναπτύξεις *Coliforms* σε υπόστρωμα VRBL

(Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)

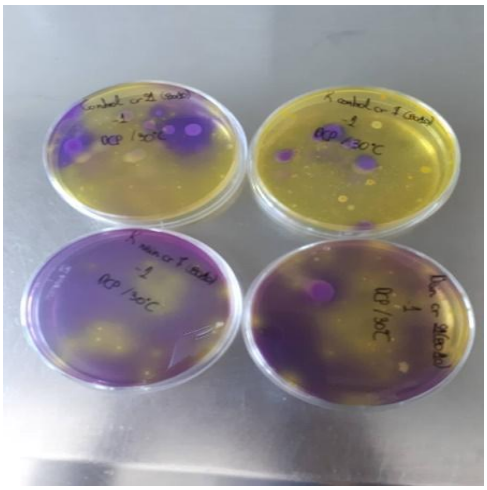
16.4.1.4 Μέθοδος Αρίθμησης ψυχρότροφων

Όσον αφορά την μέτρηση του πληθυσμού των ψυχρότροφων, ακολουθήθηκε η μέθοδος των τρυβλίων, παρόμοια με εκείνη της μέτρησης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ). Τα έτοιμα petri αφέθηκαν κάποια λεπτά για να στερεωθούν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό ψυκτικό θάλαμο των 7°C (ψυχρότροφα) για να επωαστούν σε χρόνο 7 ημερών. Τέλος, καταμετρήθηκαν οι ορατές αποικίες.

16.4.1.5 Μέθοδος Αρίθμησης αερόβιων σπόρων βακίλλων μεσόφιλων-θερμόφιλων (APHA, 1992)

Όσον αφορά την μέτρηση του πληθυσμού των αερόβιων μεσόφιλων και θερμόφιλων σπορίων βακίλλων WILLIAMS (1936), και ιδιαίτερα αυτών που προκαλούν την όξινη πήξη χωρίς παραγωγή αερίου (Flat Sour) (TANNER 1944), ακολουθήθηκε η μέθοδος επώασης σε τρυβλία. “Flat Sour” κάνουν οι βακτηριακές αποικίες μικροοργανισμών οι οποίοι μεταβολίζουν τη δεξτρόζη για να σχηματίσουν οξύ προκαλώντας κίτρινο χρώμα στο περιβάλλον του τρυβλίου που έχει μωβ χρώμα εξαιτίας της βρωμοκρεσόλης (π.χ *Bacillus stearothermophilus* και *B. coagulans*). Πιο συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DCP (Dextrose casein-peptone agar) της εταιρείας Merck.

Χρησιμοποιήθηκε και εδώ η μέθοδος της ενσωμάτωσης. Αμέσως μετά τη στερεοποίηση, τοποθετήθηκαν οι θερμόφιλοι σε επωαστικό κλίβανο στους 55ºC για 48h και οι μεσόφιλοι σε 30ºC για 72h επίσης σε επωαστικό κλίβανο. Τέλος, καταμετρήθηκαν οι αποικίες που κάνουν "Flat Sour"με διάμετρο 2-3 mm με αδιαφανές κεντρικό σημείο που περιβάλλεται από μια κίτρινη ζώνη, ενώ γειτονικές αποικίες που προκαλούν αλκαλοποίηση του υποστρώματος μπορούν να καλύψουν το κίτρινο χρώμα.



Εικόνα 16.7: Τρυβλία ανάπτυξης *αερόβιων Bacillus spores* σε υπόστρωμα DCP

(Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)

16.4.1.6 Μέθοδος Αρίθμησης αναερόβιων σπόρων κλωστριδίων μεσόφιλων-θερμόφιλων (Hirsch & Grinstead1954)

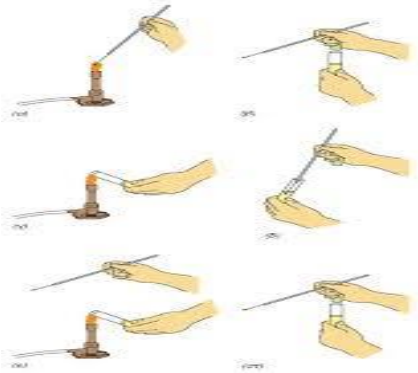
Όσον αφορά την μέτρηση του πληθυσμού των κλωστριδίων και των προαιρετικά αναερόβιων μεσόφιλων - θερμόφιλων σπορίων, ακολουθήθηκε η μέθοδος της αναερόβιας επώασης. Πιο συγκεκριμένα, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το RCM (Reinforced Clostridium Medium) της εταιρείας BIOCAR DIAGNOSTICS. Χρησιμοποιήθηκε και εδώ η μέθοδος της ενσωμάτωσης δημιουργώντας συνθήκες αναεροβίωσης αφού πρώτα το δείγμα γάλακτος ή κρέμας υπέστη θερμική επεξεργασία 80ºC για 10 min. Για την επίτευξη της αναεροβίωσης τα τρυβλία αμέσως μετά τη στερεοποίηση, αναστράφηκαν και τοποθετήθηκαν μέσα σε αεροστεγή δοχεία (Gaspack) 12 θέσεων μαζί με ειδικούς φακέλους δέσμευσης του οξυγόνου και παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου (περιέχουν sodium

bicarbonate και sodium borohydride), καθώς και παλλάδιο ως καταλύτη). Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν οι θερμόφιλοι σε επωαστικό κλίβανο στους 55ºC για 48h για του και οι μεσόφιλοι σε 30ºC για 72h σε επωαστικούς θαλάμους . Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ο κλίβανος της αναεροβίωσης στους 30ºC με συγκέντρωση CO_2 10%.

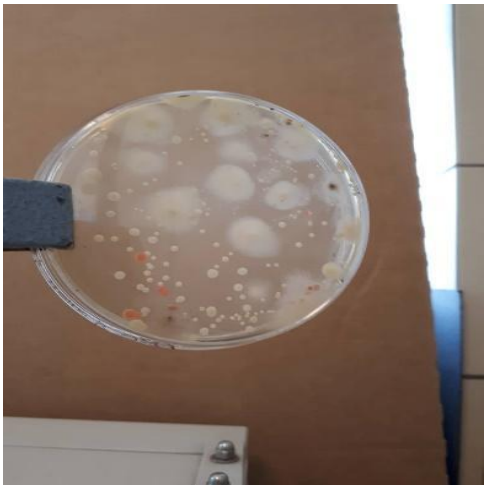
Εικόνα 16.8: Αεροστεγή δοχεία 12 θέσεων (Gaspack) & φακέλους δέσμευσης O_2 και παραγωγής CO_2 και H_2 (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)

16.4.1.7 Μέθοδος Αρίθμησης Ζυμών-Μυκήτων

Οι μύκητες και οι ζύμες αποτελούν δείκτη των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων, αφού, όταν βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό, έχουν δυσμενή επίδραση στην καλή συντήρηση τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα, για την μέτρηση του πληθυσμού των ζυμών-μυκήτων, ακολουθήθηκε η μέθοδος της επιφανειακής εξάπλωσης των τρυβλίων. Αφού παρασκευάστηκαν, λοιπόν, όλες οι δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων που κρίθηκαν απαραίτητες, ακολουθήθηκε η διαδικασία της επιφανειακής επίστρωσης 0,1 ml δείγματος στην επιφάνεια του υποστρώματος Y.G.C. (BIOKAR DIAGNOSTICS), κατάλληλο για ζύμες-μύκητες (Εικόνα 16.9.). Εν συνεχεία, επωάστηκε στους 25ºC για 7 ημέρες. Με το πέρας των ημερών, οι αποικίες ήταν εμφανείς στην επιφάνεια του τρυβλίου Εικόνα (16.10).



Εικόνα 16.9: Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης



Εικόνα 16.10: Τρυβλία ανάπτυξης *Ζυμών & Μυκήτων* σε υπόστρωμα YGC

16.4.1.8 Μέθοδος αρίθμησης αποικιών

Η μέτρηση πραγματοποιείται με τον μετρητή αποικιών και επιλέγονται τρυβλία με 10-300 αποικίες σύμφωνα με την IDF. Ο υπολογισμός των ζώντων μικροοργανισμός ανά mL γίνεται με τον τύπο:

$$\mathbf{Cfu/mL} = \frac{\Sigma\eta}{(T\alpha * 1 + T\beta * 0{,}1) * \mathbf{Z}}$$

Τα= ο αριθμός των τρυβλίων της πρώτης αραίωσης

Τβ= ο αριθμός των τρυβλίων της δεύτερης αραίωσης

Ση=σύνολο αποικιών σε όλα τα τρυβλία

Τα ή Τβ =2 αν είναι δύο τρυβλία

Τα ή Τβ= 1 αν είναι 1 τρυβλίο

Z= Η τελευταία αραίωση από την οποία μετράμε τα πρώτα τρυβλία

16.4.2 Υποστρώματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος Προσδιορισμού Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (ΟΜΧ)

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα Skim Milk PCA (HIMEDIA) για τον προσδιορισμό της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας, με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε τρυβλία petri, τα οποία επωάστηκαν στους 30˚C για 72 ώρες (IDF, 1992). Το εμπορικό παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	gm/litre
Casein enzymic hydrolysate	5.00
Yeast extract	2.50
Skim milk powder	1.00
Glucose	1.00
Agar	10.50

Για την παρασκευή του υποστρώματος MPCA έγινε διαλυτοποίηση, σε 600ml απεσταγμένο νερό, 12g του υποστρώματος. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και μετά σε θερμοαναδευτήρα μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία βρασμού. Τέλος, ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο σύστημα στους 121°C για 15 min, ψύξη στους 45°C και χρήση για την μέθοδο της μετασποράς.

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος Προσδιορισμού Κολοβακτηριδίων

Χρησιμοποιήθηκε εμπορικό παρασκεύασμα Violet Red Bile Agar(HIMEDIA) V.R.B.L., μέσω της ενσωμάτωσης με διπλό στρώμα (συνθήκες αναερόβιες), για τον προσδιορισμό των Κολοβακτηριδίων, τα οποία επωάστηκαν σε θερμοθάλαμο στους 37˚C για 24 ώρες. Το προαναφερθέν παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	gm/litre
Peptic digest of animal tissue	7.00
Yeast extract	3.00
Lactose	10.0
Bile salts mixture	1.5
Sodium chloride	5.00
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.002
Agar	15.00

Για την παρασκευή του υποστρώματος VRBL έγινε διαλυτοποίηση, σε 200ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, 8,3g του υποστρώματος. Ακολούθησε βρασμός σε θερμοαναδευτήρα και αφέθηκε σε θερμοθάλαμο για να πέσει η θερμοκρασία του ώστε να γίνει έκχυση σε τρυβλία petri.

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος Προσδιορισμού κλωστριδίων

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα Reinforced Clostridium Medium RCM AGAR (BIOKAR DIAGNOSTICS) για τον προσδιορισμό αναερόβιων μεσόφιλων και θερμόφιλων ειδών, Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε σπορογόνα *Clostridium*, τα οποία επωάστηκαν σε 30˚C και 55˚C για 72 ώρες, αφού πρώτα το δείγμα υπέστη θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 80˚C για 10 min. Το εμπορικό παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	gm/litre
Yeast extract	3.0
Meat extract	10.0
Tryptone	10.0
Glucose	1
Soluble starch	1
Sodium chloride	5.0
Sodium acetate	3.0
Cysteine hydrochloride	5.0
Agar	13.0

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος Προσδιορισμού σπορογόνων αερόβιων βακίλλων

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα DCP AGAR για τον προσδιορισμό αερόβιων μεσόφιλων και θερμόφιλων ειδών, ειδικά *Bacillus spores,* τα οποία επωάστηκαν σε 30˚C και 55˚C για 72 ώρες, αφού πρώτα το δείγμα υπέστη θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 80˚C για 10min. Το παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	gm/litre
Tryptone	10.0
D Glucose	5.0
Agar	12.0
Bromkresolpurpur	0.04

Παρασκευή συνθετικού θρεπτικού υποστρώματος Προσδιορισμού Ζυμών και Μυκήτων

Όσον αφορά τον προσδιορισμό ζυμών και μυκήτων, χρησιμοποιήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης εμπορικό παρασκεύασμα Y.G.C. (BIOKAR DIAGNOSTICS) που επωάστηκε σε 25˚C για 72 ώρες (ISO, 1992). Το εμπορικό παρασκεύασμα είχε την εξής σύσταση:

Typical Formula*	gm/litre
Agar	14.9 g/L
chloramphenicol,	0.05 g/L
D(+)-glucose,	20 g/L
yeast extract,	5 g/L

Για την παρασκευή του υποστρώματος YGC έγινε διαλυτοποίηση, σε 500ml απεσταγμένο νερό, 20g yeast extract και προστέθηκε 0,05 chloramphenicol. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121˚C για 15 min και στη συνέχεια επιστρώθηκε σε τρυβλία.

Παρασκευή αραιωτικού διαλύματος Ringer Solution

Για την παρασκευή 1L Ringer Solution, προστέθηκε 0.9g Nacl και 1L απεσταγμένο νερό. Εν συνεχεία, το παρασκεύασμα τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και μετά σε θερμοαναδευτήρα μέχρι να γίνει διάλυση του Nacl. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε 9ml σωληνάκια με την βοήθεια πιπέτας, ενώ ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο σύστημα στους 121°C για 15 min και εν συνεχεία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να πέσει η θερμοκρασία του και να γίνει έκχυση σε τρυβλία petri.

Typical Formula*	g/litre
NaCl	2.25
KCl	0.105
CaCl2	0.12
NaHCO3	0.05

16.5 Μέθοδοι Χημικών αναλύσεων κρέμας

16.5.1 Προσδιορισμός Ξηράς ουσίας

16.5.1.1Υλικά

1. Κλίβανος ξήρανσης
2. Αναλυτικός ζυγός 1mg
3. Ξηραντήριο με αφυγραντικό υλικό
4. Κάψα
5. Γυάλινη ράβδος

16.5.1.2 Μέθοδος προσδιορισμού Ξηράς ουσίας/Υγρασίας

Ο προσδιορισμός της Ξηράς ουσίας/υγρασία βάση του πρωτόκολλου της IDF 151,2005/ISO 13580. Σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο μια κάψα 20g άμμου και μια γυάλινη ράβδος τοποθετήθηκε σε ξηραντήριο ώστε να ψυχθεί και να παρθεί το ακριβές βάρος τους. Έπειτα, προστέθηκε 5 g κρέμας ζυγίστηκε με ακρίβεια και αφού αναμείχθηκε τοποθετήθηκε για 5 ώρες σε κλίβανο ξήρανσης. Με το πέρας των 5 ωρών τοποθετείτε πάλι στο ξηραντήριο ζυγίζεται και για ακόμα μια φορά και τοποθετείτε στο κλίβανο για μια ακόμη ώρα. Τέλος, με την λήξη της μια ώρας ψύχεται στο ξηραντήριο μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζυγίζεται με ακρίβεια σε αναλυτικό ζυγό. Ο υπολογισμός του ποσοστού της υγρασίας και της ξηράς ουσίας γίνεται με τους εξής τύπους.

$$\textbf{Ξηρά ουσία κρέμας } \% = \frac{(\gamma - \alpha)}{\beta - \alpha} * 100$$

Όπου:

α= βάρος κάψας, άμμου και ράβδου

β= βάρος κάψας, άμμου και ράβδου δείγματος πριν την ξήρανση

γ= βάρος κάψας, άμμου και ράβδου δείγματος μετά την ξήρανση

Υγρασία%=100-ΞΟ%

16.5.2 Μέθοδος προσδιορισμού λίπους

16.5.2.1 Υλικά

1. Βουτυρόμετρο
2. Φυγόκεντρος βουτυρομέτρων
3. Ποτήρια ζέσεως
4. Υδατόλουτρο

16.5.2.2 Αντιδραστήρια

1. Θειικό οξύ ειδικού βάρους 1,812-1,815 στους 15ºC
2. Αμυλικής αλκοόλης ειδικού βάρους 0,815 στους 15ºC

16.5.2.3 Μέθοδος Gerber-Van Gulik

Ο προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Gerber-Van Gulik (IDF/ISO3433:2008). Βάση αυτής της τεχνική σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν 11,33g κρέμας και στην συνέχεια 6ml θειικό οξύ ειδικό βάρος 1.812-1,815. Αναδεύεται με γυάλινο ραβδάκι μέχρι την διάλυση όλων των πρωτεϊνών. Έπειτα ρίχνεται στο βουτυρόμετρο το σύνολο του δείγματος και προστίθενται 4ml θειικού οξέος και 1 ml αμυλικής αλκοόλης ειδικού βάρους 0,815 και ύστερα τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 5 min στους 65ºC. Με το πέρας των 5 min φυγοκεντρείται για να γίνει διαχωρισμός του λίπους. Τέλος, έγινε μέτρηση

της λιποπεριεκτικότητας μέσω της ανάγνωσης στην ειδικά βαθμολογούμενη κλίμακα του βουτυρόμετρου.

Εικόνα 16.11: Ειδικό βουτυρόμετρο Gerber

(Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)

16.5.3 Προσδιορισμός ολικού αζώτου/πρωτεΐνης

16.5.3.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια για απόσταξη Kjeldahl

1) ***Πυκνό NaoH:***

40g pellets NAOH σε 100ml απεσταγμένο νερό ή 1 συσκευασία του 1kg στα 2,5 L απεσταγμένου νερού. Φτιάχνω 1-2 L την φορά και κρατάω ένα για stock.

2) ***Διάλυμα δείκτης:***

0,01g χρωστικής methyl red + 0,15g χρωστικής bromocresol green διαλύονται σε 100ml αιθανόλη 70%v/v

3) ***Διάλυμα Βορικού οξέος:***

40g H_3BO_3 σε 1 L ζεστό απεσταγμένο νερό το οποίο το αφήνω να κρυώσει και το τοποθετώ σε αδιαφανές μπουκάλι.

Αντιδραστήρια για Τιτλοδότηση Kjeldahl

1) ***H2SO4 0.1N:***
2) ***Αντιδραστήρια για το πρόγραμμα 1 της Kjeldahl:***

Χρησιμοποιούνται 50ml βορικό οξύ +0,2 ml δείκτη + 50ml H_20+35ml NaoH

16.5.3.2 Μέθοδος Kjeldahl

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελείται από 3 στάδια, την **καύση** του **δείγματος**, την **απόσταξη** και την **τιτλοδότηση**:

α)**Καύση δείγματος**

Συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος, 3g μετρημένη με πολύ μεγάλη ακρίβεια, θερμάνθηκε για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα με συγκεκριμένο πρόγραμμα καύσης (πίνακας 18.1) σε ειδικούς σωλήνες της συσκευής Kjeldahl με μίγμα πυκνού θειικού οξέος (οξειδωτικός παράγοντας), με θειικό κάλιο (ανύψωση σημείου ζέσεως του μείγματος, Silicon Anti- foaming (αντιαφριστικό) και με κάποιους καταλύτες, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου, του χαλκού και του τιτανίου, προκειμένου να επιταχυνθεί η οξείδωση του μείγματος. Στο συγκεκριμένο στάδιο επιτεύχθηκε η καύση των οργανικών ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα και μετετράπη το οργανικό άζωτο σε θειικό αμμώνιο και ο άνθρακας και το υδρογόνο σε CO_2 και H_2O αντίστοιχα.

H2SO4+ 2NH3→ (NH4)2SO4 θειικό αμμώνιο

Πίνακα 16.1 Προγράμματος καύσης

Θερμοκρασία	Χρόνος
100ºC	20min
150 ºC	20min
250 ºC	30min
280 ºC	15min
340 ºC	15min
380 ºC	15min
410 ºC	~45min από την στιγμή της διαύγασης (εικόνα18.1)

Εικόνα 16.12: Ειδικοί σωλήνες της συσκευής Kjeldahl

(Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ)

β) **Απόσταξη**

Κατά την απόσταξη, στους σωλήνες καύσης, που περιέχουν κρύο προϊόν του θειικού αμμωνίου, προστέθηκαν περίσσεια καυστικού νατρίου με σκοπό να απελευθερωθεί η αμμωνία. Ακολούθησε απόσταξη της αμμωνίας με ατμό σε ημιαυτόματη ή αυτόματη μονάδα απόσταξης της συσκευής Kjeldahl.

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + 2H_2O + 2NH_3\uparrow$$

Εν συνεχεία, η αμμωνία, μεταφέρθηκε, ως πτητική, μέσω των υδρατμών στον ψυκτήρα. Εκεί, υγροποιήθηκε και έπειτα έπεσε σταγόνα, σταγόνα με τη μορφή υδατικού διαλύματος, μέσα σε κωνική φιάλη(εικόνα 17.8) με περίσσεια διαλύματος βορικού οξέος, όπου δεσμεύτηκε και συλλέχθηκε ως βορικό αμμώνιο.

$$H_3BO_3 + 3NH_3 \rightarrow (NH_4)_3BO_3$$ **(βορικό αμμώνιο)**

Η αμμωνία, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της, δεν μπορεί να συλλεχθεί στο νερό χωρίς έστω και μία απώλεια. Για να αποφευχθούν, λοιπόν, οι απώλειες της, συλλέχθηκε σε διάλυμα βορικού οξέος.

Εικόνα 16.13: Κωνικές που εμπεριέχουν βορικό αμμώνιο

γ) **Τιτλοδότηση**

Το βορικό αμμώνιο που σχηματίστηκε κατά την απόσταξη, τιτλοδοτήθηκε στη συνέχεια με πρότυπο διάλυμα θειικού οξέος ή υδροχλωρικού οξέος. Για την τιτλοδότηση με θειικό οξύ η αντίδραση είναι η εξής:

$2(NH_4)_3BO_3 + 3H_2SO_4 \rightarrow 3(NH_4)_3SO_4 + H_3BO_3$

Για την τιτλοδότηση με υδροχλωρικό οξύ έχουμε την εξής αντίδραση:

$(NH_4)_3BO_3 + 2HCl \rightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$

Για την ανίχνευση του τελικού σημείου της τιτλοδότησης (εικόνα 17.8) χρησιμοποιήθηκε συσκευή pHμετρου ή αλλαγή χρώματος δείκτη ειδικών, γι αυτή την περίπτωση, χρωστικών. Ταυτόχρονα, έγινε χρήση λευκού προσδιορισμού ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και στο δείγμα, χρησιμοποιώντας όμως νερό και 0,85gr σακχαρόζης.

Υπολογισμός:

Για τον υπολογισμό του αζώτου από την ποσότητα της παραγόμενης αμμωνίας έχουμε τον εξής τύπο:

$$\mathbf{N\text{ολ.}}\,\% = \frac{\mathbf{1,4007} \times \boldsymbol{N(Vs - Vb)}}{\boldsymbol{W}}$$

Όπου:

V_S: Η κατανάλωση σε ml 0,1N HCl ή H για την τιτλοδότηση του δείγματος

V_b: Η κατανάλωση σε ml 0,1N HCl ή H για την τιτλοδότηση του λευκού

N = Η κανονικότητα του διαλύματος HCl ή H_2SO_4,το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση

W = Το βάρος σε gr του δείγματος κρέμας

Το αποτέλεσμα καταγράφεται έχοντας ακρίβεια 0,001%

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εκφράζεται ως ποσοστό % και υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το ολικό άζωτο με το συντελεστή 6,38: **Πρωτεϊνικές ολικές %= Νολ.% × 6,38**

16.5.4 Ηλεκτρομετρικός προσδιορισμός του pH

Για τη μέτρηση του **pH** χρησιμοποιήσαμε πεχάμετρο (Hanna 92240 της Hanna Instuments). Η συγκεκριμένη μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ηλεκτροδίου. Η μέθοδος αυτή έχει μεγαλύτερη ακρίβεια απ' ότι η χρωματομετρική και μας αποδίδει το pH σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Τέθηκε σε λειτουργία το όργανο και ρυθμίστηκε με τη βοήθεια των ρυθμιστικών διαλυμάτων (pH=4 και pH=7), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ρύθμιση γίνεται στους 20°C κάθε μέρα, πριν χρησιμοποιηθεί. Έπειτα, προσαρμόστηκε η θερμοκρασία του πεχάμετρου σε εκείνη του δείγματος που εξετάζεται. Εμβαπτίστηκε το ηλεκτρόδιο του στο δείγμα, μετακινήθηκε μέσα στο δείγμα δύο τρεις φορές και με αυτό τον τρόπο πάρθηκε η ένδειξη. Πριν από κάθε μέτρηση, το ηλεκτρόδιο ξεπλύθηκε προσεκτικά με απεσταγμένο νερό και καθαρίστηκε με τη βοήθεια μαλακού χαρτιού, όπως ενδείκνυται.

16.5.5 Μέθοδος οργανοληπτικής αξιολόγησης της κρέμας

Οι κρέμες αξιολογήθηκαν ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά την **1η** ημέρα της παρασκευής τους καθώς και την **7η** και **14η** ημέρα **21η** καθώς και την **28η** ημέρα διατήρησής τους στο ψυγείο. Η αξιολόγηση έγινε από μία ομάδα 6 έμπειρων δοκιμαστών από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας οι οποίοι συμπλήρωναν το φύλλο αξιολόγησης που επισυνάπτεται.

Οργανοληπτικός έλεγχος

ΈΝΤΥΠΟ

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Ονοματεπώνυμο:

Ιδιότητα:

Παρακαλούμε συμπληρώστε με το παρακάτω πίνακα, για την αξιολόγηση των επιδορπίων (κρέμα βανίλια Α και κρέμα βανίλια Β) ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με βάση την ακόλουθή κλίμακα.

5= Πολύ καλό

4= Καλό

3= Ικανοποιητικό, με λίγα ελαττώματα

2= Ικανοποιητικό, με πολλά ελαττώματα

1= Απορριπτέο

Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά	**Κρέμα Α**	**Κρέμα Β**
Γεύση		
Γλυκύτητα		
Πλούτος		
Άρωμα		
Δομή και υφή		
Εμφάνιση επίγευσης		

Σχόλια:

17 Αποτελέσματα και συζήτηση

17.1 Αποτελέσματα βιοδραστικότητας της νισίνης

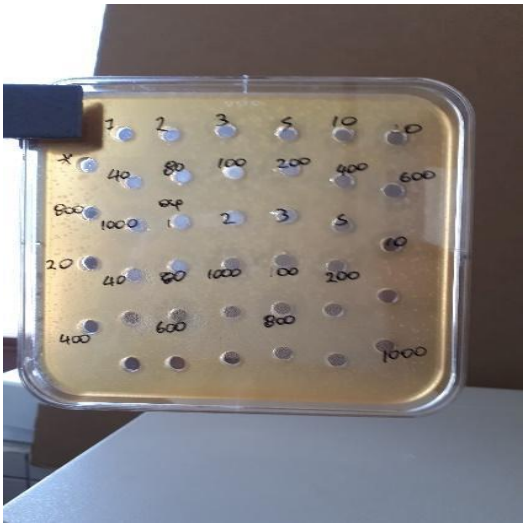
17.1.1 Επιλογή κατάλληλων στελεχών ώστε να προσδιοριστεί η βιοενεργότητα της Νισίνης σε IU με stock νισίνης

Τα αποτελέσματα παρεμπόδισης των μικροοργανισμών στόχων που επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της βιοενεργότητας στην νισίνη, σε διάφορες συγκεντρώσεις από 1 έως 1000 IU/ml, φαίνονται στον Πίνακα 17.1 Όπως φαίνεται, το στέλεχος *Lactococcus lactis spp. cremoris ACA-DC 117 έδειξε την μεγαλύτερη ευαισθησία σε όλο το φάσμα συγκεντρώσεων Νισίνης με ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) 1 IU/ml*

(Εικόνα 17.1). Αντιθέτως, το στέλεχος Lb. curvatus έδειξε πολύ μικρότερη ευαισθησία με (MIC) 40 IU/ml νισίνης, αλλά και μικρότερες ζώνες ανάσχεσης σε όλες τις συγκεντρώσεις (Εικόνα.17.2). Τέλος, το στέλεχος Listeria monocytogenes έδειξε ασαφείς ζώνες παρεμπόδισης (μη μετρήσιμες) σε περίπου όλες τις συγκεντρώσεις νισίνης (Εικόνα 17.3). Με βάση λοιπόν την ευαισθησία των στελεχών έναντι της νισίνης επιλέχθηκε ως καταλληλότερο στέλεχος για τον προσδιορισμό της βιοενεργότητας της νισίνης, με την μέθοδο διάχυσης (WDA), το στέλεχος ACA-DC 117, φτιάχνοντας ταυτόχρονα και την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις νισίνης (Διάγραμμα 1). Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει εκθετική γραμμή τάσης (βέλτιστη καμπύλη προσαρμογής) με πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης r^2= 0.98, γεγονός που μας δίνει την δυνατότητα να υπολογίσουμε με αρκετή ακρίβεια την ενεργότητα της Νισίνης από την διάμετρο της μετρούμενης ζώνης παρεμπόδισης στο άγαρ.

Εικόνα 17.1: WDA (*Lb. curvatus*)

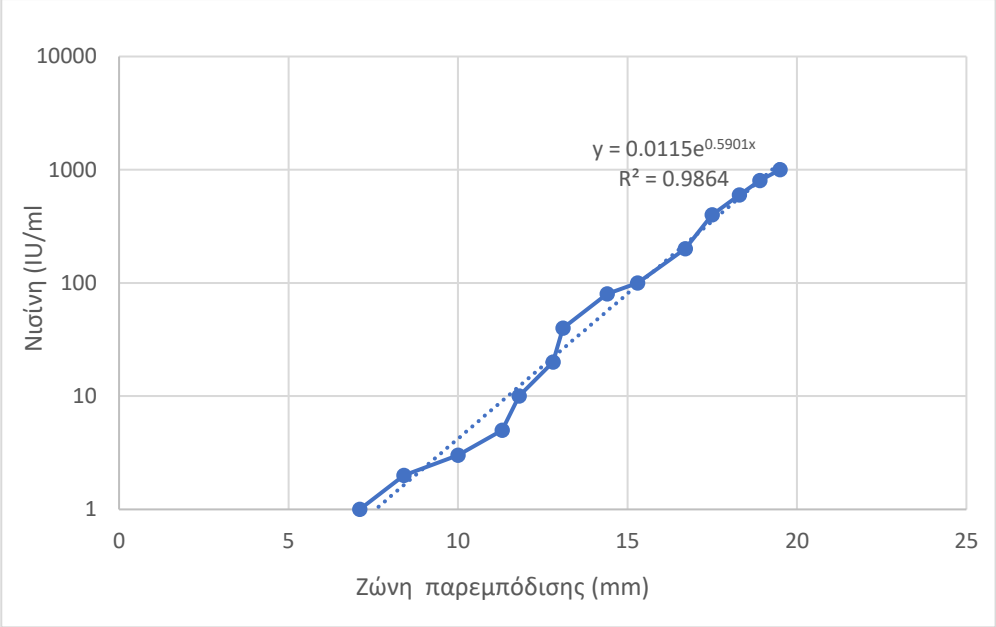
Εικόνα 17.2: WDA (*Lc. Lactis cremoris*)



Εικόνα 17.3: WDA (Listeria monocytogenes)

Πινακας 17.1 Αποτελέσματα ζωνών αναστολής (mm) διαφόρων συγκεντρώσεων Νισίνης (IU/ml) στη μέθοδο διάχυσης (WDA) με διαφορετικά ευαίσθητα στελέχη

NISIN IU/ml	*(L. lactis)* (mm)	*(Lb. curvatus)* (mm)	*(L. monocytogenes)* (mm)
1	7.3 ± 0.2	-	-
2	8.4 ± 0.15	-	-
3	10.1 ± 0.1	-	~
5	10.7 ± 0.2	-	~
10	11.5 ± 0.25	-	~
20	13.1 ± 0.1	-	~
40	13.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1	~
80	14.2 ± 0.3	8.4 ± 0.3	~
100	15.1 ± 0.15	9.1 ± 0.2	±
200	16.2 ± 0.2	10.3 ± 0.1	±
400	17.3 ± 0.3	10.6 ± 0.2	±
600	18.4 ± 0.2	11.5 ± 0.3	±
800	19.2 ± 0.1	12.2 ± 0.2	-
1000	20 ± 0.3	12.1 ± 0.1	-

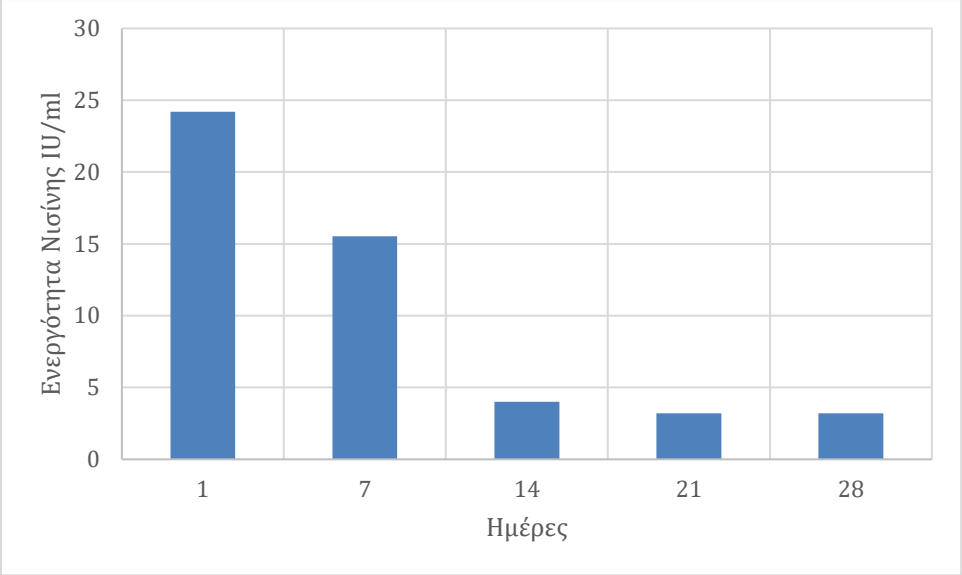


Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της Νισίνης με την μέθοδο (WDA) με ευαίσθητο στέλεχος το *L. lactis ssp. cremoris CNRZ 117*.

17.1.2 Προσδιορισμός της ενεργότητας της Νισίνης στην Κρέμα κατά την συντήρησή της στους 7 ºC.

Κατά την διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων Κρέμας στην ψύξη, παράλληλα με τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις γινόταν και προσδιορισμός της ενεργότητας της νισίνης στο προϊόν με σκοπό να συσχετιστεί με την μικροβιολογική κατάσταση αυτών. Έτσι, μετά την διαδικασία εκχύλισης της νισίνης από τα δείγματα, προσδιορίστηκε η ενεργότητα με την WDA με χρήση του ευαίσθητου στελέχους *L. lactis* CNRZ 117. Τα αποτελέσματα φαίνονται από την καμπύλη Διάγραμμα 2, όπου φαίνεται μια συνεχής μείωση της ενεργότητας της Νισίνης στο προϊόν σε σχέση με τον χρόνο συντήρησης. Η αρχική ενεργότητα της νισίνης στο εκχύλισμα της 1ης ημέρας μετρήθηκε 24,2 IU/g. Μετά από 1 εβδομάδα μειώθηκε κατά 35%, δηλαδή στις 15,5 IU/gr, και έφτασε μετά από 28 ημέρες στις 3,2 IU/gr.

Η αρχική προστιθέμενη Νισίνη στο γάλα κατά την παρασκευή των κρεμών (0.3%) ισοδυναμούσε σε ενεργότητα 30 IU/gr προϊόντος. Κατά την εκχύλιση όμως του δείγματος η προσδιορισθείσα ενεργότητα έφτασε τα 24,2 IU/gr, γεγονός που κυρίως οφείλεται είτε στην μερική απενεργοποίηση της κατά την θερμική επεξεργασία, λόγω του υψηλού pH των κρεμών (6,65) όπως αναφέρεται και από τον Delves et. al (1990a), είτε στην ισχυρή προσρόφηση της από το λίπος κυρίως (Laridi et. al, 2003) και δευτερευόντως τις πρωτεΐνες και τα υδροκολλοειδή που περιέχονταν στο μείγμα.



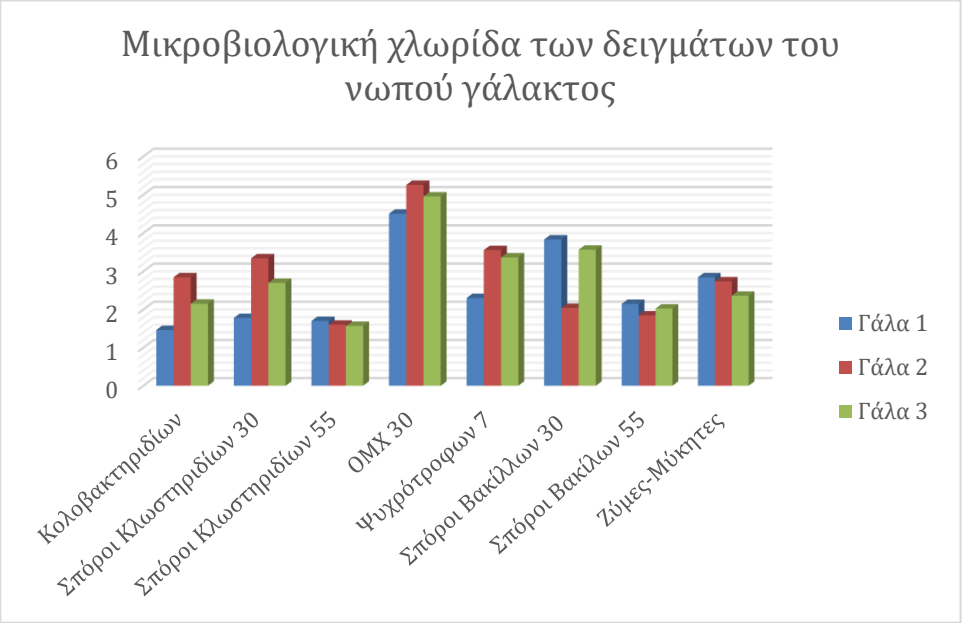
Διάγραμμα 2: Εξέλιξη της ενεργότητας της Νισίνης στα δείγματα κρέμας κατά την συντήρησή τους στους 7 ^{o}C

17.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

17.2.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων στο γάλα

Πάρθηκε γάλα από τρεις διαφορετικούς παραγωγούς για να ελεγχθεί η μικροβιολογική ποιότητα της πρώτης ύλης και κατά προέκταση η επίδρασή της στο τελικό προϊόν ή την διαφοροποίηση του τελικού προϊόντος. Από το Διάγραμμα 3 φαίνεται ότι η ποιότητα των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων γάλακτος διέφερε σημαντικά και ως προς την ΟΜΧ αλλά και ως προς τις επιμέρους μικροβιακές ομάδες που καταμετρήθηκαν. Το δείγμα 1 βρέθηκε σε χαμηλό αποδεκτό επίπεδο (4.5 λογαριθμικές μονάδες) ενώ το δείγμα 2 να ξεπερνά το αποδεκτό όριο και να φτάνει στις 5.2 λογαριθμικές μονάδες. Τέλος το δείγμα 3 ήταν οριακά στα αποδεκτά όρια της νομοθεσίας όσον αφορά την Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (ΟΜΧ) (5 λογαριθμικές μονάδες). Επίσης, υπήρξε σημαντική ετερογένεια της μικροχλωρίδας και των τριών δειγμάτων γάλακτος. Το εργοστάσιο δεν μπορούσε να έχει σταθερή πρώτη ύλη γιατί είναι μικρής κλίμακας. Σε σύγκριση των τριών δειγμάτων γάλακτος, το Δείγμα 1 ήταν καλής ποιότητας με ΟΜΧ $3.1x10^4$ cfu/ml, το 3 με ποιότητα στα όρια της νομοθεσίας, με ΟΜΧ $7.9x10^4$ cfu/ml και το 2 δείγμα με ΟΜΧ $1.58x10^5$ cfu/ml όπου ήταν πάνω από το όριο. Στα δείγματα γάλακτος 2 και 3, με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο (ΟΜΧ), καταμετρήθηκαν σχετικά αυξημένοι πληθυσμοί όσον αφορά τα ψυχρότροφα και τους σπόρους των μεσόφιλων

κλωστριδίων και προαιρετικά ανερόβιων βακίλλων και κολοβακτηριδίων που θεωρητικά αποτελεί την πλέον υπεύθυνη κατηγορία αερογόνων μικροοργανισμών για το φούσκωμα των περιεκτών με το επιδόρπιο προϊόν τύπου΄Κρέμας'.



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα μικροχλωρίδας νωπού αγελαδινού γάλακτος

17.2.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων στην κρέμας

17.2.2.1 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (ΟΜΧ)

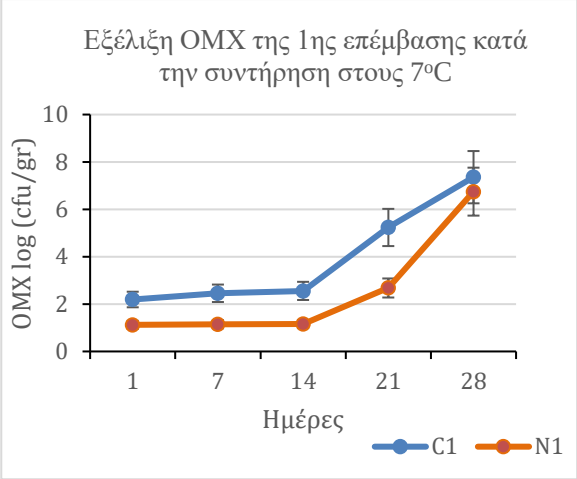
Στο διάγραμμα 4 απεικονίζεται η πορεία εξέλιξης της ΟΜΧ και στις 3 επεμβάσεις παρασκευής κρέμας βανίλιας, από διαφορετικής ποιότητας γάλα, με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7°C (1η, 7^{η}, 14^{η}, 21^{η} 28^{η} μέρα). Παρατηρείται ότι και στις τρεις επεμβάσεις είχαμε παρεμπόδιση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας από την Νισίνη. Πιο συγκεκριμένα:

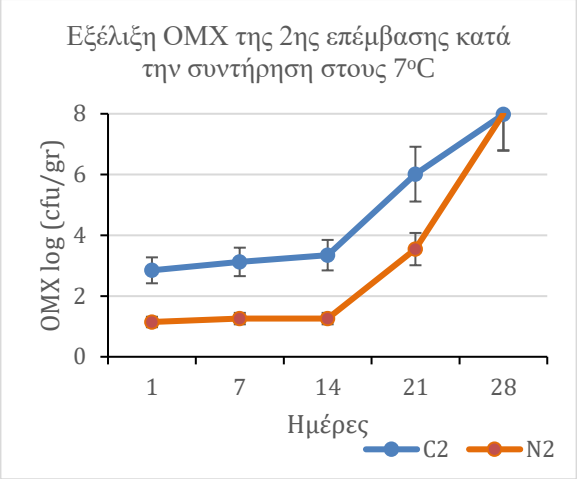
Στα δείγματα μάρτυρα C1 της 1ης επέμβασης με το γάλα 1^{ης} ποιότητας, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ανιχνεύθηκε από την πρώτη κιόλας μέρα και μάλιστα στο επίπεδο των 2.1 λογαριθμικών κύκλων και έμεινε σχετικά σταθερή μέχρι την 14^{η} μέρα όπου αυξήθηκε στο επίπεδο των 5.2 λογαριθμικών κύκλων την 21^{η} μέρα το οποίο ήταν εκτός ορίων νομοθεσίας. Την 28^{η} μέρα η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα είχε φτάσει το επίπεδο των 7.3 λογαριθμικών

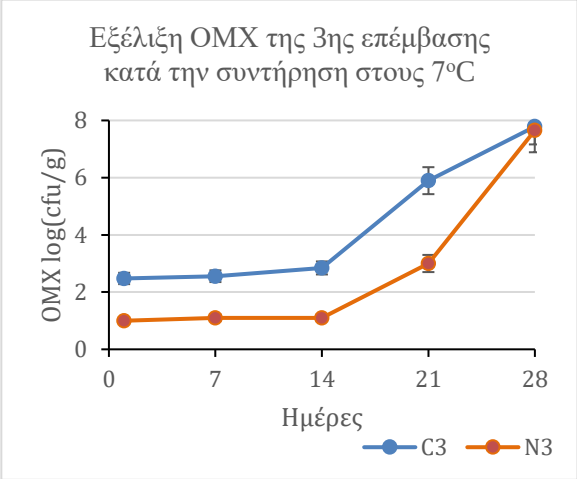
μονάδων. Αντίθετα, στα δείγματα με νισίνη N1, παρατηρήθηκε από την πρώτη μέρα, χαμηλότερο επίπεδο της τάξεως του 1.1 λογαριθμικών κύκλων κατά Μ.Ο, το οποίο διατηρήθηκε σταθερό μέχρι και την 14η μέρα. Από την 14η και μετά παρατηρήθηκε ανοδική πορεία εξέλιξης της ΟΜΧ όπου την 21η μέρα ανιχνεύτηκαν στους $2.6x10^3$ cfu/ml. Τέλος κατά την την 28η μέρα ο πληθυσμός αυξήθηκε στο επίπεδο των $5x10^6$ cfu/ml το οποίο είναι εκτός αποδεκτών ορίων γεγονός που οδηγεί στην αλλοίωση του προϊόντος .

Στα δείγματα C2 της 2ης επέμβασης, ο Μ.Ο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας ανιχνεύθηκε σε επίπεδο 2,8 λογαρίθμων, το οποίο αυξήθηκε με ανοδική πορεία μετά το πέρας της 14ης μέρας και την 21η μέρα έφτασε στις 6.0 λογαριθμικές μονάδες. Τέλος, την 28η μέρα έφτασε στους 8 λογαρίθμους. Αντίθετα, η ανίχνευση της ΟΜΧ στα δείγματα με Νισίνη (N2), που και σε αυτήν την μέτρηση ανιχνεύτηκε από την πρώτη μέρα, το επίπεδο κυμαίνονταν στις 1.1 λογαριθμικών μονάδων κατά Μ.Ο, είχε σταθερή αύξηση μέχρι το τέλος, όπου την 21η μέρα έφτασε στο επίπεδο των 3.5 λογαρίθμων ενώ την 28η στις 8 λογαριθμικές μονάδες.

Κατά την τρίτη επέμβαση, στα δείγματα C3 ανιχνεύθηκε από την πρώτη μέρα ο Μ.Ο της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο επίπεδο των 1.2 λογαρίθμων. Έμεινε σχετικά σταθερό μέχρι την 21η μέρα όπου έφτασε στο επίπεδο των 5.8 λογαριθμικών μονάδων, ενώ στο τέλος αυξήθηκε άλλες 2 μονάδες. Από την άλλη, στα δείγματα N3 η ανίχνευση της (σε επίπεδο 1,1 λογαρίθμων) έμεινε μέχρι την 14η μέρα. Την 21η μέρα συντήρησης διαμορφώθηκε στις 3 λογαριθμικές μονάδες ενώ την 28η μέρα το επίπεδο της έφτασε τους 7.6 λογαριθμικούς κύκλους κατά Μ.Ο.



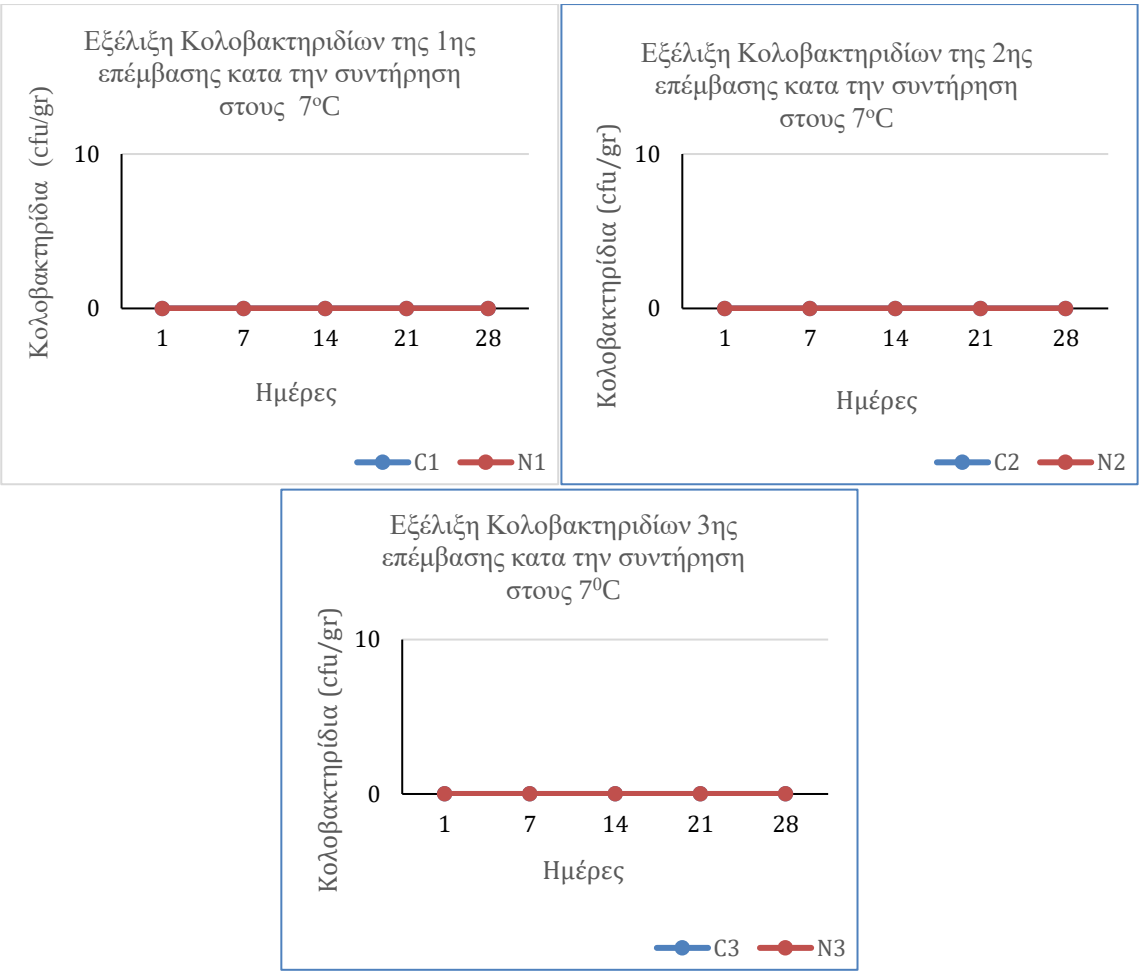




Διάγραμμα 4: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των ΟΜΧ και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο της κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

17.2.2.2 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των κολοβακτηριδίων (coliforms)

Σε όλα τα δείγματα και των 3 επεμβάσεων με προσθήκη νισίνης και χωρίς δεν ανιχνεύτηκαν κολοβακτηρίδια σε όλη την διάρκεια συντήρησης (Διάγραμμα 5), γεγονός που αποδίδεται στην καλή υγιεινή πρακτική της παραγωγικής διαδικασίας.



Διάγραμμα 5: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των *Κολοβακτηριδίων* και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

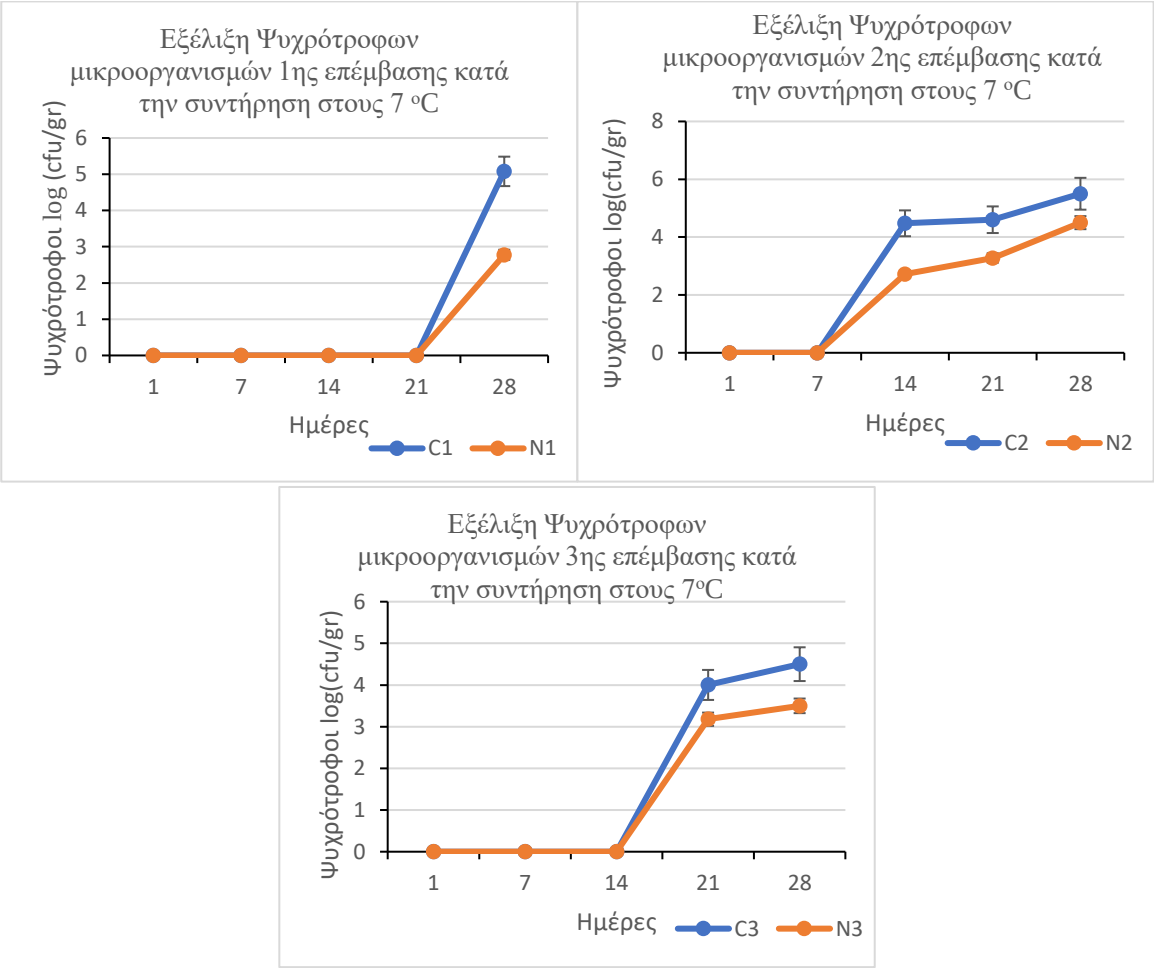
17.2.2.3 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Ψυχρότροφων

Στα δείγματα C1 και N1 της 1ης επέμβασης η ανίχνευση των ψυχρότροφων έγινε την 28η μέρα με το Μ.Ο να φτάνει στο επίπεδο των 5 και 2.7 λογάριθμων αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε μάλιστα μια σημαντική δράση της νισίνης στην ανάπτυξή τους σε όλη την διάρκεια συντήρησης (Διάγραμμα. 6)

Στα δείγματα C2 και N2 της 2ης επέμβασης, με το γάλα με τον μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό ψυχρότροφων, η ανίχνευση των ψυχρότροφων έγινε από την 14η μέρα, με το επίπεδο

τους να φτάνει περίπου στους 4.4 και 2.7 λογάριθμους αντίστοιχα κατά Μ.Ο, ενώ αυξήθηκε σταδιακά και στα δύο, μέχρι το τέλος της συντήρησης φτάνοντας σε πληθυσμούς 5.5 και 4.5 λογαρίθμους αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε ότι η χρονική περίοδος ανάπτυξης των ψυχρότροφων στα δείγματα με νισίνη ήταν μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την σημαντική μείωση της δραστικότητας της νισίνης στην κρέμα (σε επίπεδα 80-85% της αρχικής) μετά τις 14 ημέρες.

Στα δείγματα της 3ης επέμβασης η εμφάνιση των ψυχρότροφων έγινε μετά από την 21^{η} μέρα συντήρησης, όπου ο Μ.Ο των μαρτύρων C3 ανιχνεύτηκε σε επίπεδο 4 λογαρίθμων και των N3 στις 3.1 λογαριθμικές μονάδες. Στο τέλος της συντήρησης το επίπεδο της ανίχνευσης τους αυξήθηκε ελάχιστα φτάνοντας στις 4.5 και 3.5 λογαριθμικές μονάδες, για τα C3 και N3 αντίστοιχα, παρατηρώντας και εδώ την έντονη παρεμποδιστική δράση της νισίνης στην εξέλιξη της ψυχρότροφης χλωρίδας.



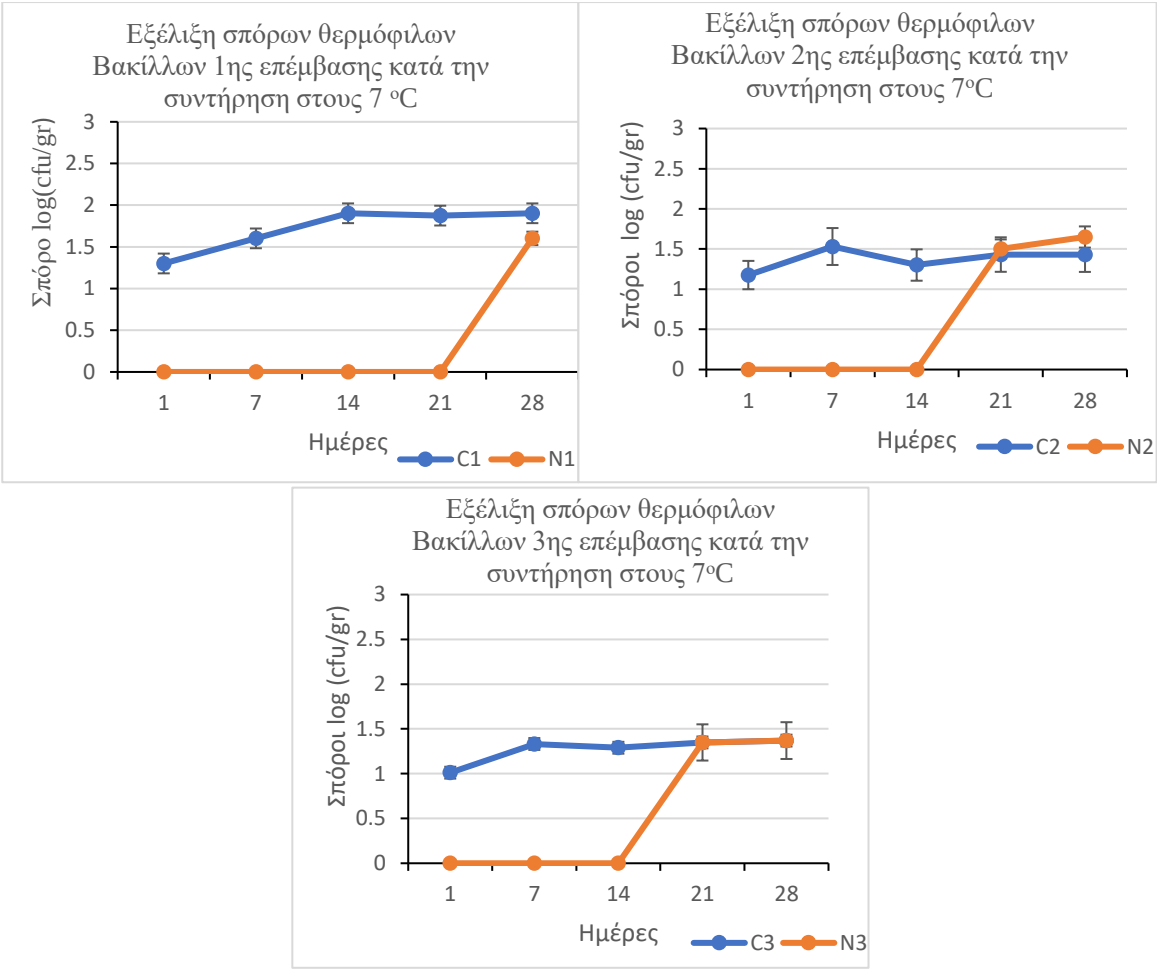
Διάγραμμα 6: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των Ψυχρότροφων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7°C (1η, 7^{η}, 14^{η}, 21^{η} 28^{η} μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

17.2.2.4 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Σπορογόνων Βακίλλων

Κατά τη συντήρηση των δειγμάτων κρέμας στους 7°C έγινε έλεγχος για την ύπαρξη σπόρων Θερμόφιλων Βακίλλων και την εξέλιξή τους, ως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 7. Σε όλα τα δείγματα του μάρτυρα και των 3 επεμβάσεων η αρχική παρουσία σπόρων ήταν εμφανής από την 1^{η} μέρα συντήρησης με Μ.Ο 1 λογαρίθμου που διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης, ενώ στα δείγματα με Νισίνη υπήρξε εμφανής παρεμπόδιση μέχρι τις 14 ημέρες για τις δοκιμές 2 & 3, και μέχρι τις 21 ημέρες στην δοκιμή 1, που συγκριτικά χρησιμοποιήθηκε το γάλα καλύτερης ποιότητας. Πιο αναλυτικά, στα δείγματα Μάρτυρα C1 ο λογαριθμικός κύκλος των Σπόρων Βακίλλων ήταν 1 log ήδη από την πρώτη μέρα. Η αύξηση του ήταν σταδιακή και την 14η μέρα όπου ανιχνεύτηκε στο επίπεδο των 2 λογαριθμικών κύκλων και μέχρι το τέλος της συντήρησης ο αριθμός των σπόρων παρέμεινε σταθερός. Αντίθετα, η ανίχνευση τους στα δείγματα με τη Νισίνη έγινε στο τέλος της συντήρησης στις 28 ημέρες και σε χαμηλότερο επίπεδο στους 1.60 log κατά Μ.Ο.

Στη δεύτερη επέμβαση, τα δείγματα Μάρτυρα (C2) είχαν περίπου 1 λογαριθμικό κύκλο Σπόρων Βακίλλων και παρέμεινε σταθερό καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ στο N2 ανιχνεύθηκαν την 21^{η} μέρα στους 1.5 λογάριθμους φτάνοντας στους 1.65 την 28^{η} ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα C3 της 3^{ης} επέμβασης, οι σπόροι Βακίλλων ανιχνεύτηκαν από την πρώτη μέρα και παρέμειναν σταθερά μέχρι την 28^{η} μέρα, ενώ αντίθετα στα δείγματα με νισίνη C3 οι σπόροι ανιχνεύθηκαν την 21^{η} μέρα και παρέμειναν σταθερά μέχρι την 28^{η} μέρα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερή η παρεμποδιστική δράση της νισίνης στην εκβλάστηση των σπόρων θερμόφιλων βακίλλων που γίνεται εμφανής στο διάστημα 21-28 ημερών. Η μεγαλύτερη καθυστέρηση 28 ημερών εμφανίζεται στα δείγματα κρέμας της 1^{ης} επέμβασης με την καλύτερη ποιότητα γάλακτος .



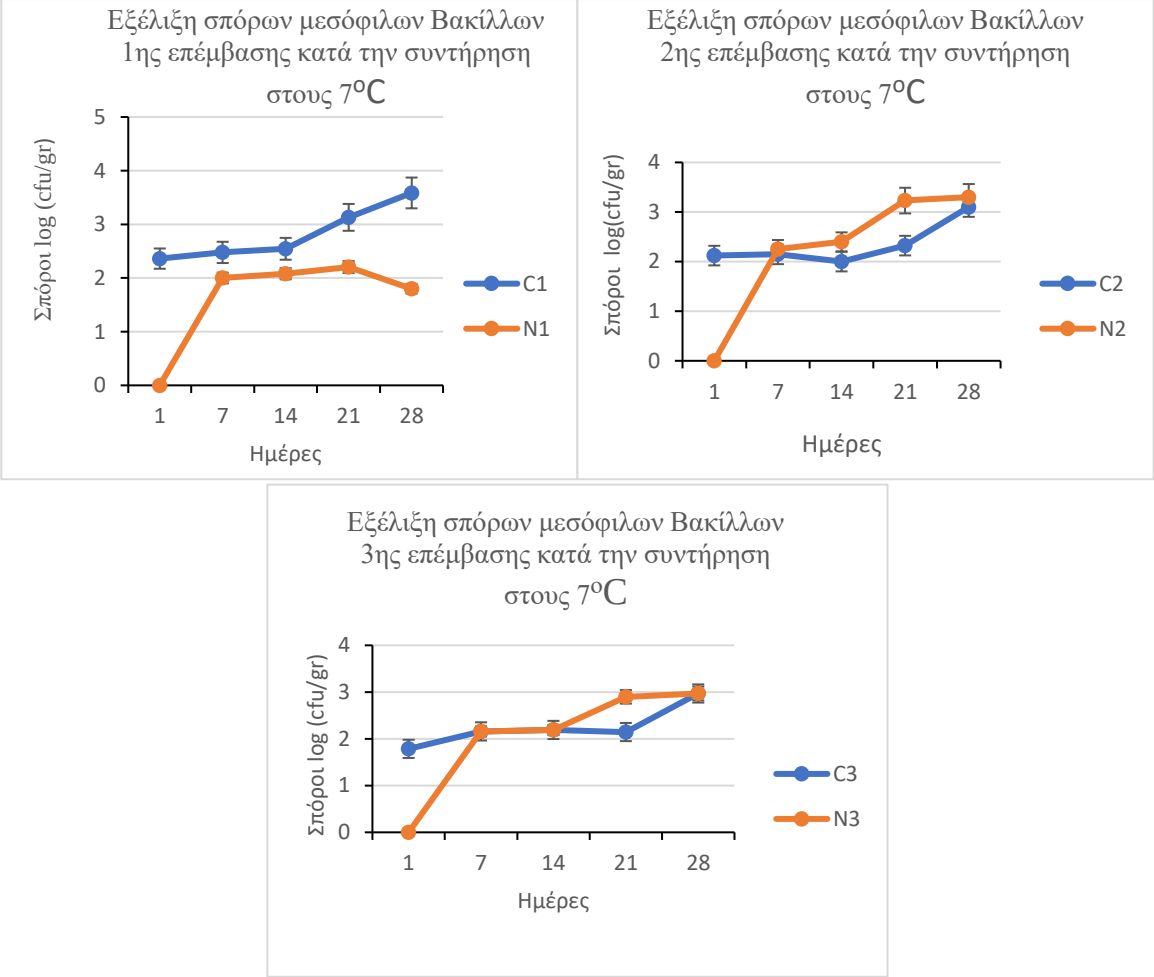
Διάγραμμα 7: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των σπόρων θερμόφιλων βακίλλων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

Από το Διάγραμμα. 8 κατά τον έλεγχο ύπαρξης σπόρων μεσόφιλων Βακίλλων στα δείγματα κρέμας με συντήρηση στους 7ºC, παρατηρήθηκε ότι στους Μάρτυρες (C1) της 1ης επέμβασης οι σπόροι μεσόφιλων βακίλλων ανιχνεύθηκαν από την πρώτη κιόλας μέρα και είχαν σταθερό λογαριθμικό κύκλο 2 μέχρι την 14η μέρα. Την 21η μέρα έφτασαν τους 3 ενώ στο τέλος της συντήρησης ο αριθμός αυξήθηκε ελάχιστα. Στο αντίστοιχο δείγμα με Νισίνη (N1) η ανίχνευση τους έγινε κατά την 7η μέρα στους 2 λογαριθμικούς κύκλους, όπου διατηρήθηκε σταθερή μέχρι την 21η μέρα , και στην συνέχεια μειώθηκε ο Μ.Ο σε μικρό βαθμό (1,8 λογαρίθμους) στο τέλος της συντήρησης.

Στα δείγματα Μάρτυρα της 2ης επέμβασης ο αριθμός των σπόρων μεσόφιλων Βακίλλων ανιχνεύτηκε στους 2 λογαρίθμους από την πρώτη μέρα ενώ παρέμεινε στο ίδιο περίπου επίπεδο μέχρι την 21η μέρα, ενώ την 28η μέρα ο αριθμός τους έφτασε στο επίπεδο των 3 λογαρίθμων. Σε αυτή τη δοκιμή τα δείγματα N2 εμφάνισαν 2 λογαριθμικούς κύκλους σπόρων μεσόφιλων Βακίλλων κατά την 7η μέρα, διατηρώντας τους σταθερούς μέχρι και την 21η μέρα όπου ο αριθμός έφτασε στο επίπεδο των 3 λογαρίθμων, το οποίο έμεινε σταθερό μέχρι το τέλος.

Κατά την τρίτη επέμβαση τα δείγματα μάρτυρα είχαν σταθερό λογαριθμικό κύκλο σπόρων (2 μονάδες) καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, με εξαίρεση την τελευταία μέρα που παρατηρήθηκε αύξηση μιας μονάδας. Στα δείγματα N3, οι σπόροι βακίλλων είχαν την ίδια πορεία εξέλιξης που είχαν και στα δείγματα N2 της δεύτερης επέμβασης.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η βακτηριοστατική δράση της Νισίνης έναντι των σπόρων των μεσόφιλων βακίλλων παραμένει για 1 εβδομάδα και μόνο στην περίπτωση της 1ης επέμβασης με το ποιοτικότερο γάλα έχουμε μια περαιτέρω μείωση του πληθυσμού κατά τον χρόνο συντήρησης, ενώ στις άλλες περιπτώσεις υπάρχει περαιτέρω αύξηση αυτού.



Διάγραμμα 8: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των σπόρων μεσόφιλων βακίλλων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο της κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

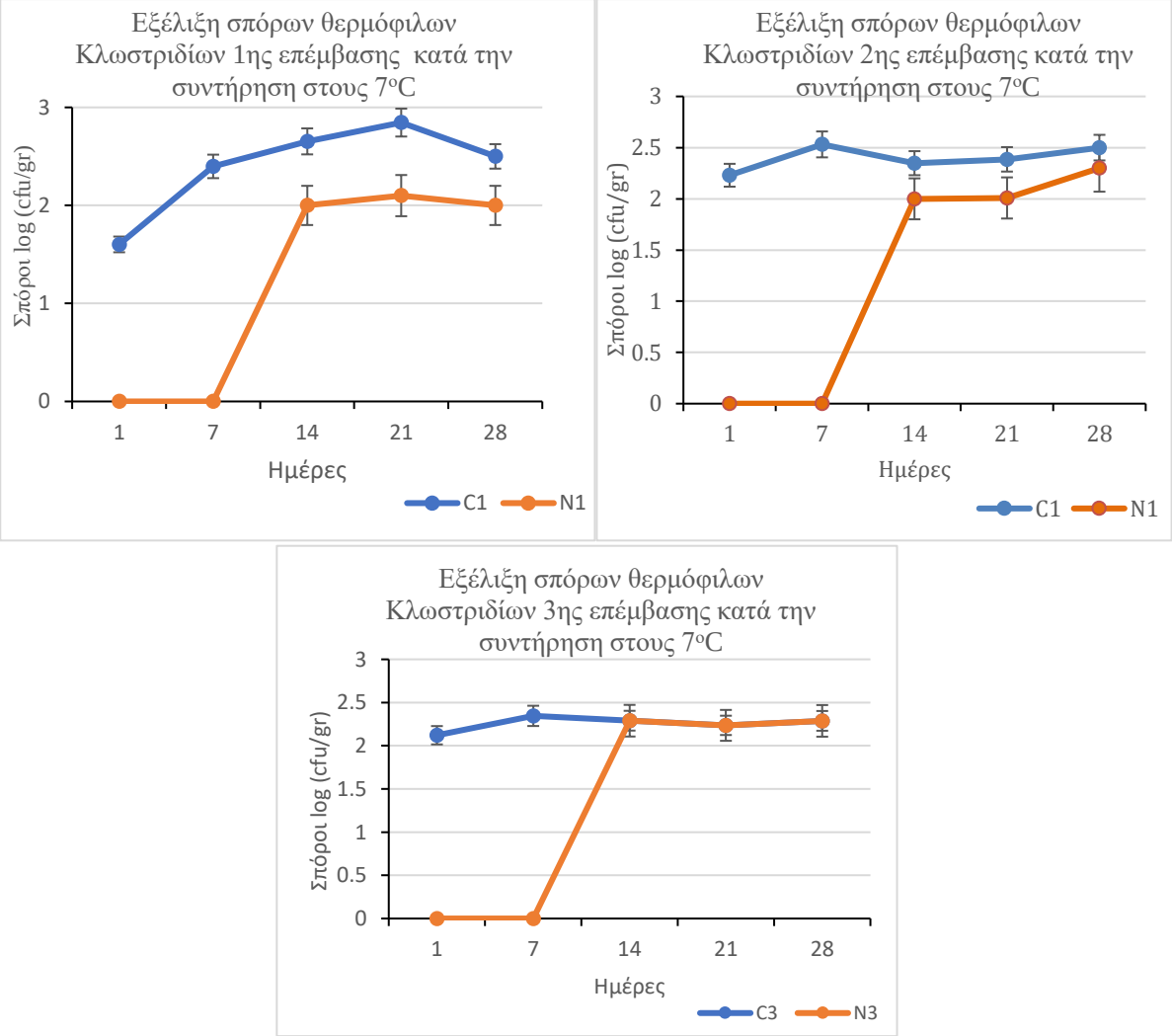
17.2.2.5 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Σπορογόνων Κλωστριδίων

Στα δείγματα C1 στης πρώτης επέμβασης έχουμε εμφάνιση των σπόρων από την πρώτη κιόλας μέρα, ενώ αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι και τους 3 περίπου λογαριθμικούς κύκλους κατά Μ.Ο την 21η μέρα. Ωστόσο, μέχρι το τέλος του χρόνου συντήρησης εντοπίστηκε μια μικρή μείωση. Αντίθετα, στα αντίστοιχα δείγματα κρέμας με Νισίνη (N1) εντοπίστηκαν κατά την 14η μέρα οι πρώτοι σπόροι Κλωστριδίων, οι οποίοι παρέμειναν σταθεροί μέχρι το τέλος (28 μέρες).

Κατά τη δεύτερη επέμβαση, στα δείγματα μάρτυρα C2 έγινε και πάλι ανίχνευση των σπόρων από την πρώτη μέρα, σε σχετικά μεγαλύτερο αριθμό, τα οποία και παρέμειναν σταθερά

μέχρι το τέλος της συντήρησης με μία μικρή αύξηση κατά την έβδομη ημέρα. Τα δείγματα με τη Νισίνη είχαν τους ίδιους λογαριθμικούς κύκλους σπόρων με μία μικρή αύξηση την 28η μέρα.

Τα δείγματα C3 και N3 της 3ης επέμβασης είχαν τους ίδιους λογαριθμικούς κύκλους Σπόρων Κλωστριδίων με αυτά της 2ης επέμβασης αντιστοίχως. Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν η μικρή αύξηση των Σπόρων στα δείγματα N3 κατά την 14η μέρα, αντί την 28η, τα οποία παρέμειναν σχετικά σταθερά.



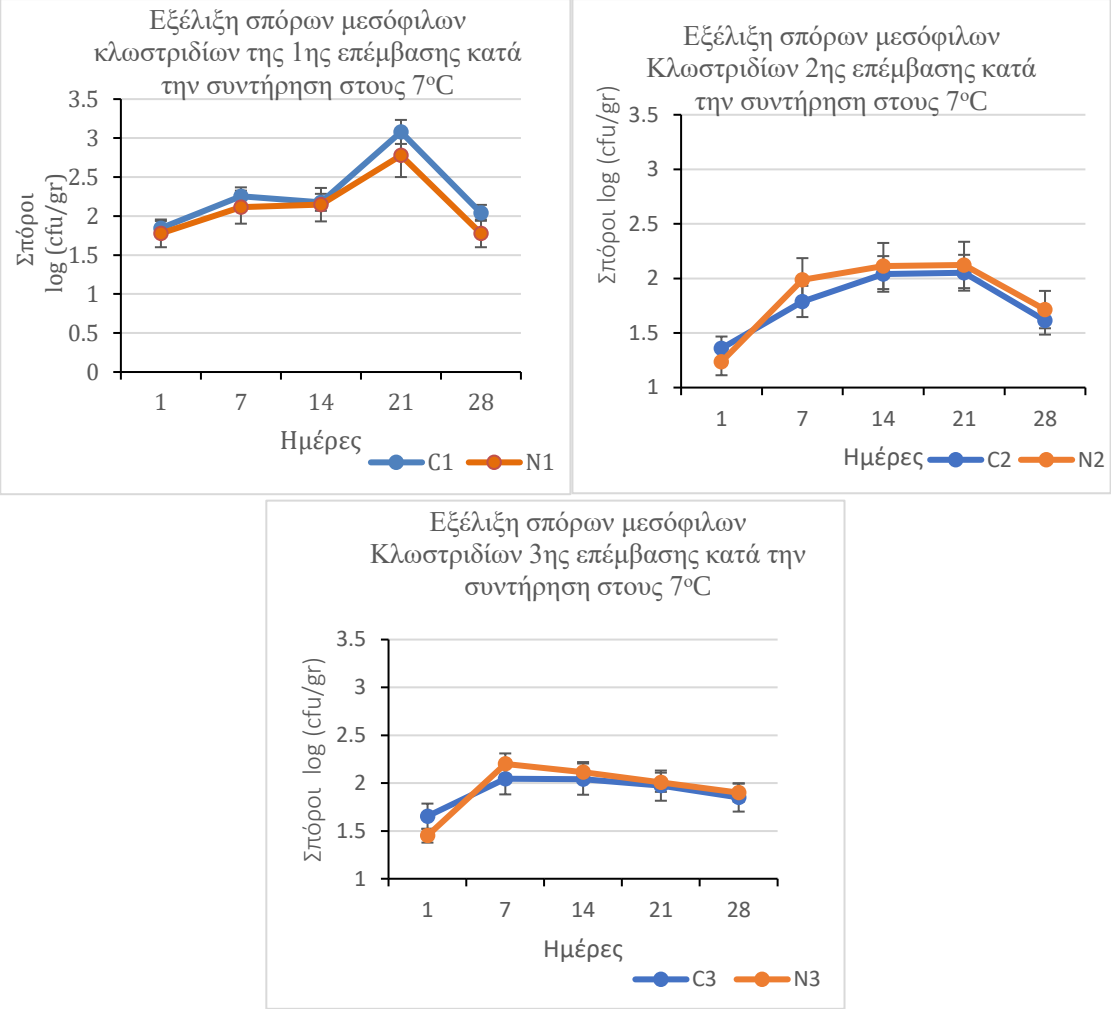
Διάγραμμα 9: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των σπόρων θερμόφιλων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η,

21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο της κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

Κατά την πρώτη επέμβαση στα δείγματα C1 και N1 έγινε ανίχνευση μεσόφιλων Σπόρων Κλωστριδίων σε επίπεδο 2 λογαρίθμων κατά Μ.Ο. Την 7η μέρα το επίπεδο λογαρίθμων τους έφτασε στα 2,2 και κράτησε σχετικά σταθερή πορεία μέχρι την 21η μέρα, κατά την οποία έφτασε στο επίπεδο των 3 λογαρίθμων στα δείγματα μάρτυρα C1 και λίγο πιο κάτω στα δείγματα N1. Στο τέλος της συντήρησης παρατηρήθηκε μείωση των σπόρων στο επίπεδο 2 στα C1 και 1,7 στα N1.

Στα δείγματα C2 και N2 της 2ης παραγωγής, από τη πρώτη μέρα, το επίπεδο λογαρίθμου των Σπόρων έφτασε περίπου το 1.5 κατά Μ.Ο. Την 7η μέρα αυξήθηκε στους 2 λογαριθμικούς κύκλους και είχε σταθερή πορεία μέχρι την 28η μέρα, όπου έφτασαν πάλι στο αρχικό τους επίπεδο.

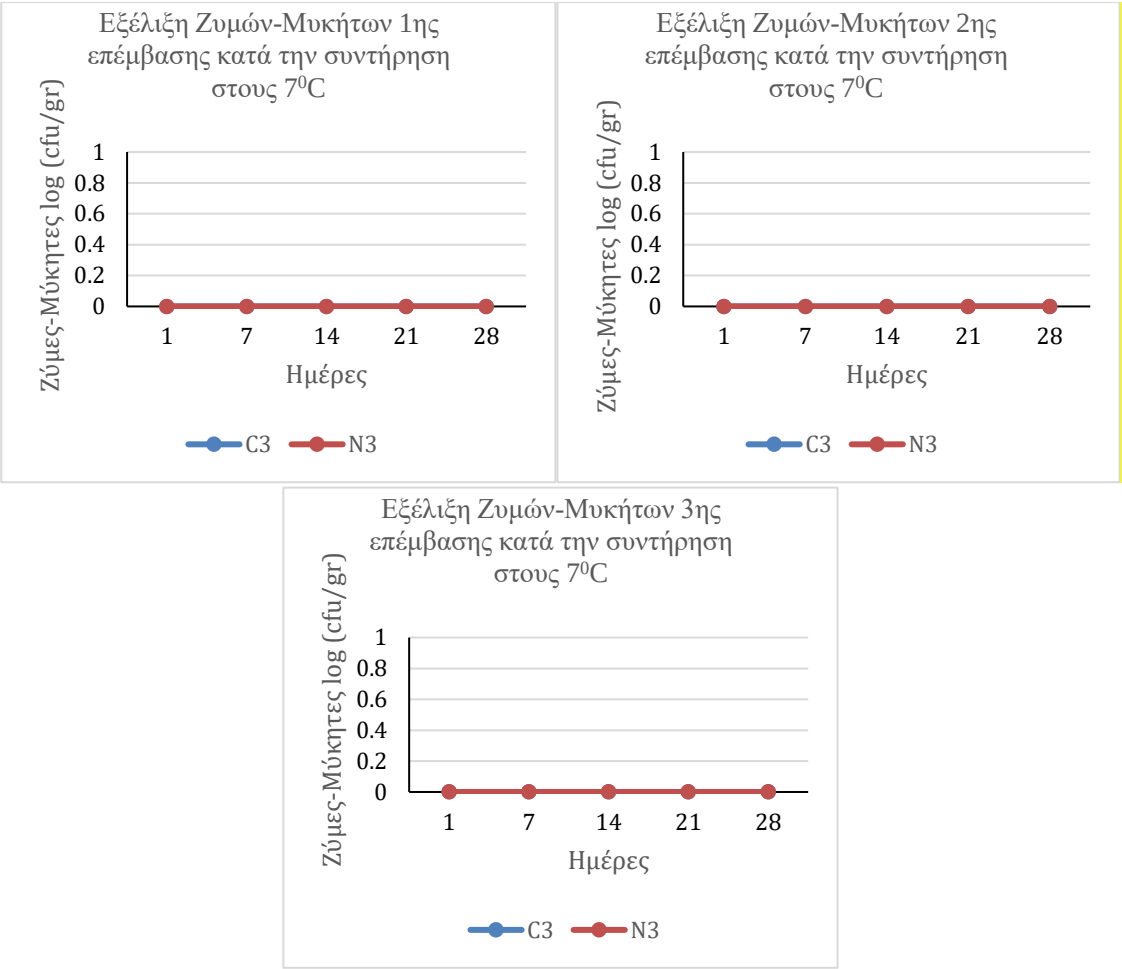
Κατά την τρίτη επέμβαση οι μεσόφιλοι Σπόροι των Κλωστριδίων ξεκίνησαν στο ίδιο επίπεδο με αυτό της 2ης επέμβασης, ενώ κατά την 7η μέρα ο Μ.Ο αυξήθηκε στο επίπεδο των 2 λογαριθμικών κύκλων και μέχρι το τέλος της συντήρησης έφτασαν το αρχικό επίπεδο.



Διάγραμμα 10: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης των μεσόφιλων σπόρων Κλωστριδίων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

17.2.2.6 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης των Ζυμών- Μυκήτων

Σε όλα τα δείγματα και των 3 επεμβάσεων με προσθήκη νισίνης και χωρίς δεν ανιχνεύτηκαν Ζύμες- Μύκητες σε όλη την διάρκεια συντήρησης (Διάγραμμα 11), γεγονός που αποδίδεται στην καλή πρακτική και μη επιμόλυνση κατά την παραγωγική διαδικασία.



Διάγραμμα 11: Γραφική απεικόνισης της πορείας εξέλιξης των Ζυμών-Μυκήτων και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7°C (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο κάθε επέμβασης με διαφορετική ποότητα γάλακτος.

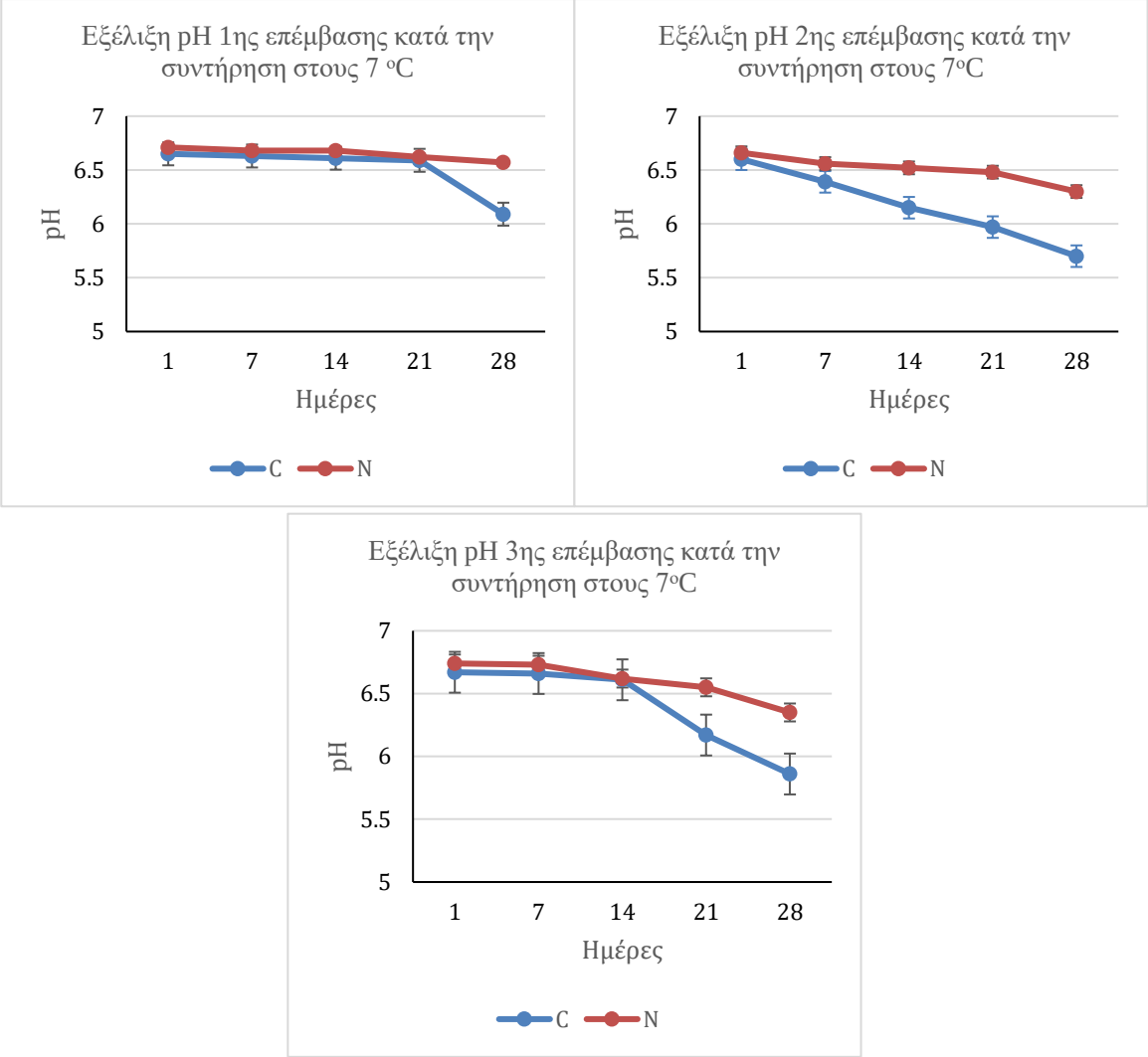
17.3 Αποτελέσματα φυσικοχημικών αναλύσεων

17.3.1 Αποτελέσματα πορείας εξέλιξης του pH

Τα αποτελέσματα στην εξέλιξη του pH στα δείγματα κρέμας κατά την συντήρηση συσχετίζονται άμεσα με την αρχική μικροβιακή ποιότητα του γάλακτος από το οποίο παρασκευάσθηκαν. Η εξέλιξη του pH των δειγμάτων κρέμας της 1ης επέμβασης, με το γάλα καλής ποιότητας, δείχνει να είναι σταθερή μέχρι τις 21 ημέρες συντήρησης και μετά να

μειώνεται σημαντικά στο 6.09 μετά από 28 ημέρες μόνο στα δείγματα χωρίς νισίνη, ενώ σε αυτά με νισίνη παρατηρήθηκε ανεπαίσθητη μείωση στο 6,57 κατά Μ.Ο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον μικρό αριθμό θερμόφιλων οξυγαλακτικών και μικρόκοκκων στην αρχική πρώτη ύλη. Αντιθέτως, στα δείγματα (C2) της 2 επέμβασης με το πιο υποβαθμισμένο γάλα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του pH από τη 7η ημέρα συντήρησης με συνεχή πτώση στο 5,2 στις 28 ημέρες, με τα αντίστοιχα δείγματα N να δείχνουν σημαντική αντίσταση στην πτώση του pH μέχρι τις 21 ημέρες και μετά να πέφτει στο 6,3 στις 28 ημέρες (Διάγραμμα. 12). Το γεγονός σχετίζεται άμεσα και με την εξέλιξη της ΟΜΧ και των επιμέρους μικροβιακών ομάδων στο διάστημα αυτό. Ανάλογη εξέλιξη του pH εμφάνισαν και τα δείγματα της επέμβασης 3, με τα αντίστοιχα δείγματα N να εμφανίζουν και εδώ αντίσταση στην μείωση του pH.

Από την παραπάνω εξέλιξη του pH στις κρέμες φαίνεται καθαρά το πόσο πολύ επηρεάζεται ο χρόνος ζωής του προϊόντος από τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό του γάλακτος και κυρίως σε θερμοάντοχα οξυγαλακτικά στελέχη. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις ήταν εμφανής η παρεμποδιστική επίδραση της Νισίνης έναντι Θερμοανθεκτικών ψυχρόφιλων στελεχών και οξυγαλακτικών μικροοργανισμών που επέζησαν της επεξεργασίας, όσο και πιθανής επιμόλυνσης κατά την διαδικασία της πήξης (tempering) και κλεισίματος.



Διάγραμμα 12: Γραφική απεικόνιση της πορείας εξέλιξης του pH και στις 3 επεμβάσεις (Γάλα 1, Γάλα 2, Γάλα 3) στην παρασκευή κρέμας βανίλιας με Νισίνη (N1, N2, N3) και χωρίς νισίνη (C1, C2, C3) κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στους 7ºC (1η, 7η, 14η, 21η 28η μέρα). Κάθε επέμβαση αποτελείται από 2 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αποτελούν τους Μ.Ο της κάθε επέμβασης με διαφορετική ποιότητα γάλακτος.

17.3.2 Αποτελέσματα λιποπεριεκτικότητας, ολικού αζώτου/πρωτεΐνης, ξηράς ουσίας και υγρασίας

Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων όσων αφορά την συγκέντρωση του λίπους, των πρωτεϊνών και των ολικών στερεών των δειγμάτων κρέμας φαίνονται στο πίνακα 17.2 ως Μ.Ο των 2 επαναλήψεων της 1η επέμβαση με το γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1).

Πίνακας 17.2 Αποτελέσματα λιποπεριεκτικότητας, ολικού αζώτου/πρωτεΐνης, ξηράς ουσίας και υγρασίας κρέμας

Χαρακτηριστικά	Τιμές
Λίπος %	3,7%± 0,2
Ολική πρωτεΐνη %	3%± 0,1
Ξηρά ουσία%	27%± 0,2
Υγρασία%	73%± 0,3

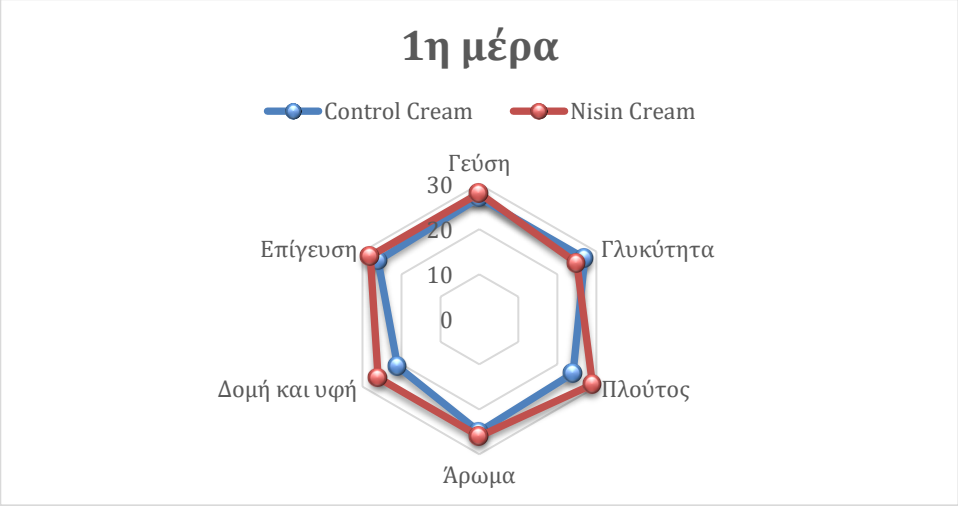
Οι παραπάνω τιμές ήταν εντός των ορίων της νομοθεσίας και επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν αποκλείσεις από τις αναγεγραμμένες τιμές στους περιέκτες των προϊόντων.

17.4 Αποτελέσματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

17.4.1 Διαχρονική σύγκριση αποτελεσμάτων οργανοληπτικού ελέγχου

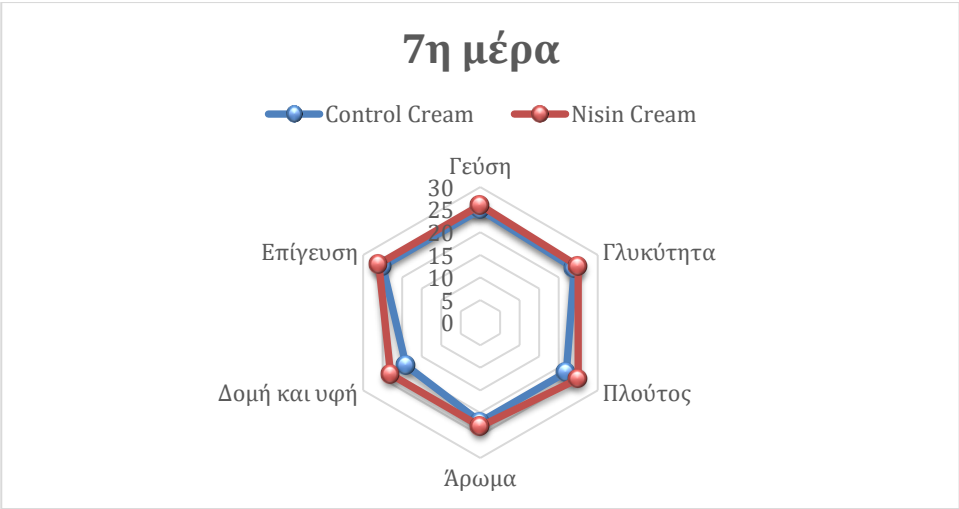
Ο οργανοληπτικός έλεγχος διεξήχθη εντός του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας. Στην διαδικασία συμμετείχαν 6 έμπειροι δοκιμαστές, μέλη του εργαστηρίου. Η εξέταση έγινε με βάση τα εξής οργανοληπτικά χαρακτηριστικά: γεύση, γλυκύτητα, πλούτος, άρωμα, δομή, υφή και εμφάνιση επίγευσης. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στα Διαγράμματα (13-17) και αποτελούν τον Μ.Ο των δειγμάτων της 1ης επεμβάσης για κάθε μέρα στο χρόνο συντήρησης. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα κατά την 1η μέρα του οργανοληπτικού ελέγχου έδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές και στα δύο είδη κρέμας, γεγονός που έχει αναφερθεί ομοίως από τους Oshima et al. (2014) σε πουτίγκες με περιεκτικότητα σε Νισίνη >80 IU/ml. Επίσης, οι Heinemann et. αl (1965) έχουν αναφέρει ότι η προσθήκη Νισίνης στα διάφορα τρόφιμα δεν προσδίδει ανεπιθύμητες γεύσεις, τουλάχιστον βελτιώνει την γεύση

παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη ανεπιθύμητων αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Παρόλ' αυτά υπήρχαν μικρές διαφορές κυρίως στα δομοαισθητικά χαρακτηριστικά λόγω μεγαλύτερου χρόνου ανάδευσης της κρέμας που εμπεριείχε νισίνη. Η νισίνη έμπαινε κατά το τέλος της παστερίωσης σε καζάνι με αυτόματο αναδευτήρα. Η ενέργεια αυτή έγινε με γνώμονα ότι με την θέρμανση της νισίνης θα πετυχαίναμε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την δραστικότητά της.



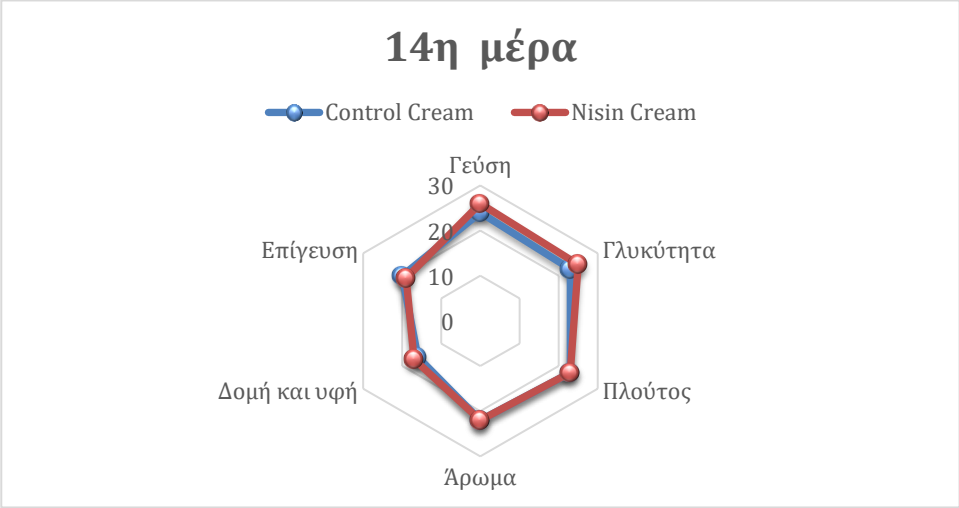
Διάγραμμα 13: Γραφική απεικόνιση του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την 1η επέμβαση, με γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1), παρασκευής κρέμας βανίλιας κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 7°C (1η μέρα). Τα αποτελέσματα είναι ο Μ.Ο των 2 επαναλήψεων στη συγκεκριμένη επέμβαση.

Την 7η μέρα σε σύγκριση με την 1η μέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και στα δύο είδη κρέμας ούτε μεταξύ των δύο προϊόντων.



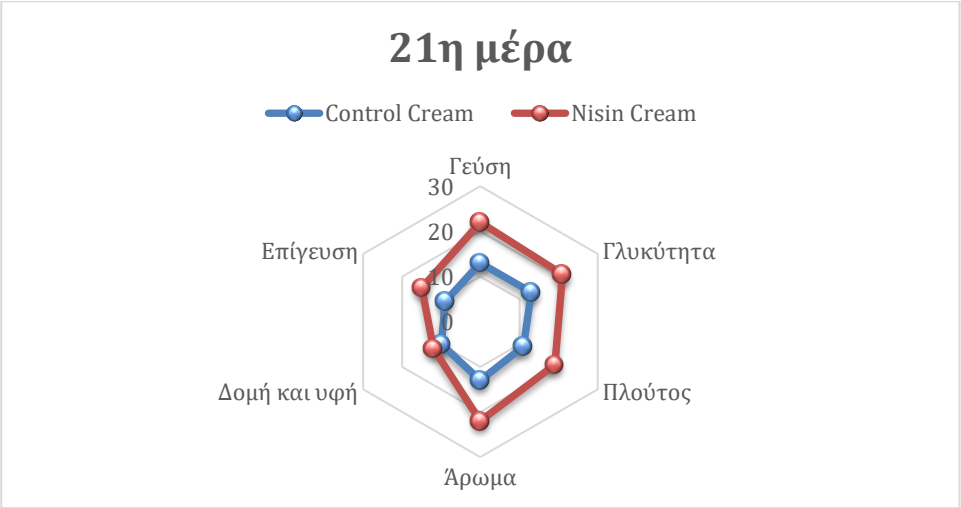
Διάγραμμα 14: Γραφική απεικόνιση του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την 1η επέμβαση, με γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1), παρασκευής κρέμας βανίλιας κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 7°C (7η μέρα). Τα αποτελέσματα είναι ο Μ.Ο των 2 επαναλήψεων στη συγκεκριμένη επέμβαση.

Την 14η μέρα υπήρχαν χαμηλότερα ποσοστά των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε σχέση με την 1η μέρα και 7η μέρα. Όσον αφορά την σύγκριση των δύο προϊόντων την 14η μέρα, η κρέμα χωρίς νισίνη είχε λίγο πιο χαμηλά ποσοστά σε σχέση με την κρέμα με νισίνη. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την πτώση του pH στο 6.2 στο δείγμα χωρίς νισίνη στην 2η δοκιμή.



Διάγραμμα 15: Γραφική απεικόνιση του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την 1η επέμβαση, με γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1), παρασκευής κρέμας βανίλιας κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 7°C (14η μέρα). Τα αποτελέσματα είναι ο Μ.Ο των 2 επαναλήψεων στη συγκεκριμένη επέμβαση.

Την 21η μέρα φαίνεται ξεκάθαρη διαφορά μεταξύ των δύο ειδών κρέμας.



Διάγραμμα 16: Γραφική απεικόνιση του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την 1η επέμβαση, με γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1), παρασκευής κρέμας βανίλιας κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 7°C (21η μέρα). Τα αποτελέσματα είναι ο Μ.Ο των 2 επαναλήψεων στη συγκεκριμένη επέμβαση.

Την 28η μέρα και τα δύο είδη κρέμας είναι απορριπτέα και ακατάλληλα για κατανάλωση.

Διάγραμμα 17: Γραφική απεικόνιση του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την 1η επέμβαση, με γάλα καλής ποιότητας (Γάλα 1), παρασκευής κρέμας βανίλιας κατά τη διάρκεια συντήρησής του στους 7ºC (28η μέρα). Τα αποτελέσματα είναι ο Μ.Ο των 2 επαναλήψεων στη συγκεκριμένη επέμβαση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, μετά το πέρας αυτής της μελέτης, διαπιστώθηκε ότι οι Κρέμες Βανίλιας που παρασκευάστηκαν στις 3 επεμβάσεις, με διαφορετική ποιότητα γάλακτος, είχαν ετερογένεια ως προς την μικροβιακή τους χλωρίδα, αφενός λόγω εποχικότητας και αφετέρου λόγω μικρής συγκομιζόμενης ποσότητας γάλακτος διαφορετικούς μεμονωμένους παραγωγούς . Παρόλ' αυτά είχαμε ξεκάθαρα αποτελέσματα όσον αφορά την δραστικότητα της νισίνης σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών.

Αρχίζοντας με την πρώτη ύλη, παρατηρείται ότι το δείγμα γάλακτος της 1ης επέμβασης ήταν συγκριτικά καλύτερο ποιοτικά από τα δείγματα γάλακτος των 2 άλλων επεμβάσεων με ΟΜΧ $3.1x10^4$ cfu/ml. Το δείγμα γάλακτος 3 ήταν οριακά σύμφωνα με την νομοθεσία (5 λογαριθμικές μονάδες) με ΟΜΧ $7.9x10^4$ cfu/ml, ενώ το δείγμα γάλακτος 2 το ξεπερνά με ΟΜΧ $1.58x10^5$ cfu/ml .

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της επίδρασης της νισίνης στην ΟΜΧ, και στις 3 επεμβάσεις παρατηρείται ότι οι C (μάρτυρες), καθόλη την διάρκεια της συντήρησης, ήταν κατά 2 log υψηλότερα από τα δείγματα με την νισίνη. Αυτό μας μαρτυρά ότι η νισίνη δρα

παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη της ΟΜΧ των δειγμάτων και των 3 επεμβάσεων, τουλάχιστον μέχρι και την 14η μέρα, γιατί μετά πέφτει η ενεργότητα της σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο, και για τις 3 επεμβάσεις η νισίνη δρα θετικά όσον αφορά την ανάπτυξη των ΟΜΧ μέχρι την 21η μέρα όπου ο πληθυσμός παραμένει στα όρια, πολύ χαμηλότερα από τα νομοθετικά αποδεκτά. Γεγονός που υποδηλώνει την επιμήκυνση του προϊόντος κατά 1 εβδομάδα σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς την προσθήκη νισίνης.

Η βιοενεργότητα της νισίνης στα κολοβακτηρίδια δεν μπορούσε να διαγνωστεί λόγω της απουσίας τους από όλα τα δείγματα κρέμας βανίλια. Η μη ύπαρξη κολοβακτηριοειδών είναι αποτέλεσμα της σωστής διαχείρισης της υγιεινής στην παραγωγική διαδικασία και της υψηλής θερμικής κατεργασίας των προϊόντων.

Από τα αποτελέσματα της ψυχρότροφης ομάδας μικροβίων, φαίνεται η σημαντική βακτηριοστατική επίδραση της νισίνης στην ανάπτυξη της, η οποία θεωρείται σημαντική για την αλλοίωση του προϊόντος της κρέμας λόγω των παραγόμενων εξωκυτταρικών πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων κατά την ανάπτυξή τους. Επίσης, φαίνεται και εδώ ότι όσο μικρότερος είναι ο αρχικός πληθυσμός των ψυχρότροφων στο γάλα τόσο μεγαλύτερη είναι η επίδραση της νισίνης στην ανάπτυξη αυτών, όπως φαίνεται στην επέμβαση 1, όπου ο αρχικός πληθυσμός στο γάλα ήταν στο επίπεδο των 2 λογαρίθμων κατά Μ.Ο, ενώ στο γάλα των άλλων δοκιμών ήταν στο επίπεδο των 4 λογαρίθμων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η ανάπτυξή τους να εμφανίζεται στο προϊόν μετά από την 3η εβδομάδα, σε αντίθεση με τα δείγματα των επεμβάσεων 2 και 3 όπου καταμετρούνται από την 3η και 2η αντιστοίχως. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις είναι φανερή η παρεμποδιστική επίδραση της νισίνης περιορίζοντας την εξέλιξη της ψυχρότροφης χλωρίδας στα δείγματα από 1 έως και 2 λογαριθμικούς κύκλους σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες.

Ως προς την βιοδραστικότητα της νισίνης στους θερμόφιλους σπόρους Βακίλλων, παρατηρείται σε όλα τα δείγματα όλων των επεμβάσεων. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι στην επέμβαση 1, που έχει και καλύτερη ποιότητα γάλακτος, η βακτηριοστατική δράση της νισίνης κρατάει μέχρι και την 21η μέρα, ενώ στις άλλες 2 επεμβάσεις η δράση της σταματάει 1 εβδομάδα νωρίτερα.

Όσον αφορά τους σπόρους μεσόφιλων Βακίλλων, η παρουσία τους ήταν εμφανής μετά από μία εβδομάδα στις κρέμες με την Νισίνη, σε αντίθεση με αυτές χωρίς νισίνη, όπου η παρουσία των σπόρων ήταν ανιχνεύσιμη από την 1η ημέρα σε όλες τις επεμβάσεις. Αυτό αποτελεί ένδειξη της βακτηριοστατικής δράσης της νισίνης στην ανάπτυξή τους. Η μετέπειτα εξέλιξή τους ήταν παρόμοια με αυτή του Μάρτυρα, με εξαίρεση την 1η επέμβαση όπου η

παρουσία τους παρέμεινε στο επίπεδο των 2 log, σε αντίθεση με τις άλλες όπου έφτασαν στα 3 log κατά Μ.Ο.

Κατά την καταμέτρηση θερμόφιλων σπόρων Κλωστριδίων στα δείγματα κρέμας, κατά την διάρκεια συντήρησης τους στους 7°C, παρατηρήθηκε εμφανής δράση της νισίνης στην ανάπτυξή τους μέχρι την 14^{η} ημέρα σε όλα τα δείγματα. Σε αντίθεση με τα δείγματα χωρίς νισίνη, στα οποία η παρουσία των Κλωστριδίων ήταν εμφανής από την 1^{η} ημέρα αναλύσεων σε επίπεδα από 1.65- 2.8 cfu/ml.

Τα αποτελέσματα των θερμόφιλων σπόρων Κλωστριδίων στα δείγματα των 3 επεμβάσεων, μάς έδειξαν ότι υπήρξε σαφής βακτηριοστατική δράση από την νισίνη τις πρώτες 2 εβδομάδες, καθώς μετά η καταμέτρησή τους ήταν σε μικρότερα επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα της επέμβασης 1, όπου ο αρχικός αριθμός των σπορίων υπήρξε σε πολύ μικρότερο ποσοστό έναντι των άλλων 2 επεμβάσεων (1.6, 2,2 και 2.1 cfu/ml αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η βακτηριοστατική δράση της νισίνης είναι αντιστρόφως ανάλογη του αρχικού πληθυσμού των Κλωστριδίων.

Κατά τον έλεγχο ύπαρξης μεσόφιλων σπόρων Κλωστριδίων στα δείγματα κρέμας με συντήρηση στους 7°C, παρατηρήθηκε η ίδια περίπου πορεία εξέλιξης των σπόρων και στα δύο δείγματα (C1 και N1), δηλαδή καμία ένδειξη βακτηριοστατικής δράσης από την νισίνη.

Ζύμες- Μύκητες μέχρι τις 28 ημέρες δεν καταμετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα, γεγονός που οφείλεται στη πλήρη καταστροφή τους κατά την θερμική επεξεργασία και στην μη επιμόλυνση τους κατά την συσκευασία.

Η νισίνη λειτουργεί παρεμποδιστικά ως προς την πτώση του pH εμποδίζοντας τους οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς. Γι' αυτό στην επέμβαση 1 έχουμε μικρότερο ρυθμό στην πτώση του pH σε σχέση με τις άλλες 2 επεμβάσεις.

Επιπροσθέτως, η κρέμα χωρίς νισίνη την 21η μέρα έχει αλλοιωθεί ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της σε βαθμό που δεν είναι επιθυμητή η κατανάλωση της. Αντίθετα, η κρέμα με νισίνη έχει κρατήσει σε κάποιο επίπεδο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της δίνοντας της 1 εβδομάδα ζωής ακόμα.

Τέλος, ως προς την (%) σύσταση λίπους, πρωτεϊνών, υγρασίας και ξηράς ουσίας, οι μετρήσεις έδειξαν ότι τα αποτελέσματα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια.

Το γενικό συμπέρασμα που εξάγεται από την παρούσα μελέτη είναι ότι με μια καλή πρώτη ύλη, καλές συνθήκες υγιεινής κατά την παραλαβή της μέχρι και την μεταποίησή της και η χρήση νισίνης στην επιτρεπόμενη συγκέντρωση, προσδίδει στο προϊόν επιπλέον 1 εβδομάδα ζωής και συμβάλλει επιπρόσθετα στην ασφάλεια του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκε κρέμα βανίλια σε παραγωγική μονάδα γαλακτοβιομηχανίας της Αττικής, χρησιμοποιώντας την γραμμή παραγωγής κρέμας και τις πρώτες ύλες του εργοστασίου. Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις τόσο στην πρώτη ύλη όσο και στο παραγόμενο προϊόν. Εξετάστηκε η βιοδραστικότητα της νισίνης στην πορεία εξέλιξης των διαφόρων μικροβιολογικών ομάδων. Επίσης, επιλέχθηκε ως κατάλληλο ευαίσθητο στέλεχος ο *L. lactis ssp. cremoris CNRZ 117* για τον προσδιορισμό της βιοενεργότητας της νισίνης με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (WDA) και για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της Νισίνης στα δείγματα κρέμας κατά την συντήρησή της στους 7°C. Τέλος, η κρέμα βανίλια εξετάστηκε ως προς τη χημική της σύσταση (προσδιορισμός υγρασίας, λίπους, ξηρά ουσίας , πρωτεϊνών, pH) και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η χρήση νισίνης στα επιτρεπτά όρια 3mg/l(ppm) σε συνδυασμό με καλή πρώτη ύλη 4.5log και καλές συνθήκες υγιεινής κατά την παρασκευή του προϊόντος αύξησέ τον χρόνο ζωής του κατά 1 εβδομάδα και συνέβαλλε επιπρόσθετα στην ασφάλεια του.

Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

1) Alais, C., Lorient, D., and Humbert, G. (1978) Ann. Nutr. Aliment., 32,511.
2) Alais, C.1974. Science du lait. Principes des techniques laitieres. 3me edit.
3) ALPHA(1992). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14th
4) Aly S., Floury J., Piot M., Lortal S., Jeanson S. ,(2012), The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses, Food Microbiology, Volume 32, pp.185-190.and Container Closure Evaluation. The Food Processors Institute. Washington, D.C.
5) Anon (1985) Nisin preservation of chilled desserts. Dairy Ind Int 50, 41 –43
6) Anon. (2015). Γαλακτοκομικά προιόντα. Retrieved September 2, 2015,
7) Anonymous. 1995. Canned Foods: Principles of Thermal Process Control, Acidification
8) Axelsson L. & Ahrne S.,(2000), Food and medicine: Lactic acod bacteria(13),F. G. Priest and M G oodfellow (eds), Applied Microbial Systematics, 13, 367-388, 2000 Kluwer Academic Publishers.
9) Barrow, G. I., Milier, D. C., and Johnson, D. L. (1966) Lancet, 2,802.
10) Beard, B.M., Sheldom, B.W. and Foegeding, P.M. (1999) Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverage supplemented with nisin. J Food Prot 62, 484–491.
11) Bergey”s Manual of Determinative Bacteriology.1994, 9th Edit.
12) Bhatti, M., Veeramachaneni, A. and Shelef, L.A. (2004) Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. Int J Food Microbiol 97, 215–219.
13) Chung, K.T., Dickson, J.S. and Crouse, J.D. (1989) Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. Appl Environ Microbiol 55, 1329–1333
14) Cleveland, J., Montville, T., Nes, I. and Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol 71,1 –20.
15) Colenso, R., Court, G., and Henderson, R. J. (1966) Monthly Bull. Min. Health Public Health Lab. Service, 25,153.

16) Council Directive 92/65/EEC laying down animal health requirements governing trade in and imports into the Community of animals, semen, ova and embryos not subject to animal health requirements laid down in specific Community rules referred to in Annex A (I) to Directive 90/425/EEC.
17) Cousin, M. A. (1982) J. Food Prot., 45,172-207.
18) Cox 1975, D.P., & R.A. Conway. Microbial degradation of some polyethylene glycols. In Proc. III in Biodegradation Symp. (J.M. Sharpley & A.M. Kaplan, eds.), Applied Science Publishers, London, 1976 pp 835-841, 673, 681, 886.
19) Datta, N. and Deeth, H.C. 2007. Advances in Thermal and Non-Thermal Food
20) Davies, F. L., and Wilkinson, G. (1973) In The Microbiological Safety of Foods. B. C. Hobbs and J. H. B. Christian, eds., Academic Press, London.
21) DE MAN, J.D., ROGOSA, M., a. SHARPE, M.E.: A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. – J. Appl. Bact., 23; 130-135 (1960).
22) Delves, B.J. (1990a) Nisin and its application as a food preservative. J Soc Dairy Technol 43, 73 –76.Edn., American Public Health Association, Washigton DC, (Marshall R.T.,ed).
23) EEC (1992) Council Directive 92/46/EEC of 16 July I992 laying down the health rules for the production of raw milk, heat treated milk and milk-based products. Council of the European Communities, Brussels. Eibel H., and Kessler H. G. (1984) Milschwissenschaft, 39(11), 648-651.
24) Encyclopedia of American Food and Drink, John F. Mariani [Lebhar-Freidman:New York] 1999 (p. 356).
25) FAO (Food & Agricultural Organization), 2012.
26) FDA (Food & Drug Organization), 1988.
27) FDA. "History of the GRAS List and SCOGS Reviews". FDA. Retrieved 11 May 2012.
28) FDA/HHS (1998) Direct food substances affirmed as generally recognized as safe: nisin preparation. Fed Reg 53, 11247– 11251.
29) G.G FOWLER, B. JANIS & TRAMER.(1975). British food manufacturing. Industries Research Association, England
30) Gao F.H., Abee T., Konigs W.N., (1991), Mechanism of Action of the Peptide Antibiotic Nisin in Liposomes and Cytochrome c Oxidase- Containing Proteoliposomes, American Society for Microbiology, 57,2164-2170.

31) Gillor O., Etzion A Riley M.A(2008), The dual role of bacteriocins as anti and probiotics, Apple Microbiol Biotechnol, 81, 591-606.
32) Gillor O., Etzion A., Riley M.A., (2008). The dual role od bacteriocins as anti- and probiotics, Appl Microbiol Biotechnol, 81 591-606.
33) Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, N. and Suarez, J.E. (1994) Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriosin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin. Appl Environ Microbiol 61, 2873–2878.
34) Goudkov, A. V., and Sharpe, M. E. (1965) J. Appl. Bacteriol., 28,63.
35) Griffiths, M. W., Phillips, J. D., and Muir, D. D. (1984) J. Soc. Dairy Technol., 37,22.
36) Guchte M., Serror P.,Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maquin E.,(2002), Stress responses in lactic acid bacteria , Antonie van Leewenhoek, 82, 187-216.
37) Halbiger, R.E., F.C. Gonzolz, J. Mussini and R. Veille.1979. Microbiological testing of market cream. Industrial Lanchera 58: 663(Dairy Sci. Abstr. 42 1454, 1980).
38) Harmon, L. G., and Nelson, F. E. (1955) J. Dairy Sci., 38,1189.
39) HARVEY, R. J., COLLINS, E. B. (1961.): Roles of citrate and acetoin in the metabolism of Streptococcus diacetylactis. J. Bact. 86: 1301-1306.
40) Harzallah D.& Belhadj H., (2013), Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodalation of Humanm GI Muccosal Barrier, Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes, Genetics and Molecular Biology, Biochemistry, 8, 197-213.
41) Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, G. and Cenatiempo, Y. (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from Leuconostoc mesenteroides. J Gen Microbiol 138, 2725–2731.
42) Henning, S., Metz, R. and Hammes, W.P. (1986) New aspects for the application of nisin to foods based on its mode of action. Int J Food Microbiol 3, 135–141.
43) HIRSCH, A., a. GRINSTED, E.: Methods for the growth and enumeration of anaerobic sporeformers from cheese, with observations on the effect of nisin. ñ J. Dairy Res., 21; 101-110 (1954).

44) Holanowski, A. Tetra Pak UHT Technology Seminar LTH. Available from: http://www.foodandnutrition.lth.se/fileadmin/livsmedelsteknik/images/BLT0100303/UHT_theor y_LTH.pdf. Accessed February 9, 2008.
45) Holdsworth, S.D. 1992. Aseptic Processing and Packaging of Food Products. New York, New York. Elsevier Science Publishing Co., Inc.
46) Hurst, A. and Hoover, D.G. (1993) Nisin. In Antimicrobials in Foods ed. Davidson, P.M. and Branen, A.L. pp. 369. New York: M. Dekker.
47) IDF (1996) Bulletin 315: UHT Cream, International Dairy Federation, Brussels.
48) IDF(1991). Milk and Milk products, Enumeration of microorganisms, Standard 100B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
49) IFST (1998) Microbiological Food Safety for Children AND Vulnerable Groups. Institute of Food Science and Technology, London.
50) International Dairy Federation (1, 2) and the DIN Norm 10192 (3) for the examination of milk and dairy products.
51) International Organization for Standardization (ISO), Milk and milk products, Enumeration of yeast and moulds, Colony count technique at 25 °C, International Standard ISO/DIS 6611 (1992)
52) Internationaler Milchwirtschaftsverband: Flüssige Milch. Zählung von psychotrophen Mikroorganismen (Koloniezählung bei 6,5°C). - Internationaler Standard 101 (1991).
53) Internationaler Milchwirtschaftsverband: Milch u. Milchprodukte, Zählung von Mikroorganismen (Koloniezählung bei 30 °C) - Internationaler Standard 100 (1991).
54) Jenson, I., Baird, L. and Delves-Broughton, J. (1994) The use of nisin as a preservative in crumpets. J Food Prot 57, 874–877
55) Jones, L.W. (1974) Effect of butterfat on inhibition of Staphylococcus aureus by nisin. Can J Microbiol 20, 1257–1260.
56) Juffs, H. S. (1973) J. Appl. Bacteriol., 36,585.
57) Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. and Daeschel, M.A. (1992) Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting Listeria monocytogenes in fluid milk. J Dairy Sci 75, 387–393.
58) K. N. Novak, E. Davis, C. A. Wehnes, D. R. Shields, T. G. Rehberger. Effect of supplementation with an electrolyte containing a Bacillus-based direct-fed

microbial on immune development in dairy calves. Research in Veterinary Science, Volume 92, Issue 3, June 2012, Pages 427-434.

59) Klaenhammer Todd R.,(1988), Bacteriosins of lactic acid bacteria, Biochimie, Volume 70, 337-349.

60) Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337–349.

61) Klaenhammer.,(1988) Bacteriosins of lactic acid bacteria, Biochimie, Volume 70,337-349

62) Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A.A., Huemer, I. and Weerkamp, A.H. (1997) Genotypical and phenotypical characterization of Bacillus sporothermodurans strains, surviving UHT sterilisation. Int Dairy J 7, 421–428.

63) Lampert, L.M. 1970. Modern dairy products. Chemical Publ. Co .New York.

64) Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.-O., Vuillemard, J.C., Lacroic, C. and Fliss, I. (2003) Liposome encapsulated nisin Z: optimisation, stability and release during milk fermentation. Int Dairy J 13, 325–336.

65) LJSDHHS (1999) Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Washington, D.C., USA.

66) Luck, H. (1 972) Dairy Sci. Abstr., 34, 101

67) MacConkey A., 1905, J. Hyg., 5, 333-379

68) Maria Papagianni et al.,(2006). Determinationof bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the facto'' indicator microgranism. Mocrobial cell Factories.

69) McGibbon, A.H.K., Taylor, M.W.2006. Composition and structures of bovine milk lipids. Advanced dairy chemistry. 1-42

70) Mikolajcik, E. M. (1979) CuI. Dairy Prod. J., 14,6.

71) Muir, D. D. (1996) J. Soc. Dairy Technol., 49(1), 24-32.

72) O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C. and Fitzgerald, G.F. (2001) The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by Kocuria varians, to control the growth of Bacillus cereus in chilled dairy products. J Appl Microbiol 90, 106–114.

73) Olson, J. C.. Jr., Macy, H., and Halverson, H. 0. (1952) Agric Exp. Station BL~II., 202, University of Minnesota

74) Olver, Lynne (2000). "The Food Timeline: pudding". Retrieved 2007-05-03.

75) Orla- Jensen S. 1943. The lactic acid bacteria. Copenhagen.

76) Otte l., G. Suhsen, W. Heeschen und A.Tolle. 1979. Zur microflora von buttermilch, saurer share und speisenquark. Milchwissenschaft .34:669.

77) Oxford Companion to Food, Alan Davidson [Oxford University Press:Oxford] 1999 (p. 225).

78) Oxford Companion to Food, Alan Davidson [Oxford University Press:Oxford] 1999 (p. 782).

79) P. Scheldeman1 , L. Herman1 , S. Foster2 and M. Heyndrickx Bacillus sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk, Journal of Applied Microbiology.

80) Panes, J. J., Parry, D. R., and Leech, F. B. (1979) Report ofa Siuvey of the Quality of Farm Ilk an England and Wales in Relation to EEC Proposals, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.

81) Perez R.H., Perez M.T.M., Elegado F.B.,(2015), Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Rewie of Biosynthesis, Mode of Actionn, Fermentative Production, Uses and Prospects, International Journal of Philippine Scince and Technology, 8, 61-67.

82) Perez R.H., Perez M.T.M., Elegado F.B.,(2015). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action Fermentative Production, Uses and Prospects, International Journey of Philippines Science and Technology, 8, 61-67

83) Pettipher, G. L., Mansell, R., McKinnon, C. H., and Cousins, C. M. (1980) Appl. Environ. Microbiol., 38,423

84) Phillips, J. D., Griffiths, M. W., and Muir, D. D. (1981a) J. Soc. Dairy Technol., 34(3), 109-113.

85) Phillips, J. D., Griffiths, M. W., and Muir, D. D. (1981b) J. Soc. Dairy Technol., 34(3), 113-118.

Preservation. Ames, Iowa. Blackwell Publishing. 63-90.

86) Romney, 1990 CIP: Cleaning in Place. 2nd edition. Edited by A J D Romney First published: May 1990.

87) Rosenow, E.C. 1919. Studies on elective localization. Focal infection with special reference to oral sepsis. Jour. Dent. Res., 1: 205-249.

88) S. Oshima et al.(2013). (Nisin A expends the shelf life of high-fat Chilled dairy dessert,a milk based pudding. Journal Applied Microbiol, Japan

89) Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A., (2004), Lactic Acid Bacteria:Microbiological and Functional Aspects, 3d Edition, Revised and Expanded, Food Science and Technology.

90) Salminen S., Von Wright., Ouwehand A.(2004). Lactic Acid Bacteria:Microbiological and Fuctional Aspects.3d Edition. Revised and Expanded, Food Science and Technology.

91) Shi C., Zhang X., Zhao X., Meng R., Liu Z., Chen X., Guo N.,(2017), Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against Staphylococcus aureus in pasteurized milk, Food Control, 71, 10-16.

92) Shin J.M., Gwak J.W., Kamarajan P., Fenno J.C., Rickard A.H., Kapila Y.L.,(2015), Review Article: Biomedical applications of nisin , journal of Applied Microbiology.

93) Shruti Puri, Bhavnita Dhillon*and Sidhant Banura., (2015). To Formulate and Analyze Brown Rice Puddings for its PhysicoChemical and Sensory Attributes, Department of Food Science and Technology, Guru Nanak Dev University

94) Somers, E.B. and Taylor, S.L. (1987) Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. J Food Prot 50, 842–848.

95) TANNER, F.W.: "The Microbiology of Foods." Champaign III., Gerard Press, 2 nd ed. 1944, 693-722; 762-763; 1127-1128.

96) Teather R. M., Kalmoloff M.L., Whitford M.F.,(1999) The role of bacteriocins in Rumen Microbial Ecology, The Rumen Microbial Biosystems: New Fontiers.

97) Teather R..M., Kalmokoff M.L., Whitford M.F.,(1991), The Role of Bacteriocins in Rumen Microbial Ecology, *The Rumen Microbial Ecosystem Microbial Biosystems*: New Frontiers.

98) Tekinsen, 0. C., and Rothwell, J. (1974) J. Soc. Dairy Technol., 27,57. 203.

99) TERZAGHI, B.E., and SANDINE, W.E.. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology, 29 : 807-813.

100) The National Health Service (General Medical Services) Amendment (No. 2) Regulations 1997, england and wales

101) Thomas, L., Clarlkson, M. and Delves-Broughton, J. (2000) Nisin. In Natural Food Antimicrobial Systems ed. Naidu, A.S. pp. 463–524. Boca Raton, FL: CRC Press.

102) Thomas, S. B., and Druce, R. G. (1972) Dairy Znd., 37,593.

103) UK Regulations (1995a) The Dairy Products (Hygiene) Regulations 1995, SI 1995, No. 1086, HMSO, London.

104) Wells J.M., Robinson K., Chamberlain L.M., Schofield K.M., Le Page R.W.,(1996), Lactic acid bacteria vaccine delivery vehicles, Antonie Van Leewenhoek, 70, 317-330.

105) Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S.; et al. (November 2004). "The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation". Trends in Food Science & Technology. 15 (10): 498–505.

106) WHO (1969) Specifications for identity and purity of some antibiotics. WHO/Food Addit 69, 53

107) WHO (World Health Organization), 1997.

108) WILLIAMS, O.B.: Tryptone medium for the detection of flat sour spores. - Food Research, I (3), 217-221 (1936).

109) Wirjantoro, T. and Jewis, M.J. (1996) Effect of nisin and high temperature pasteurization on the shelf-life of whole milk. Int J Dairy Technol 49, 99 –102.

110) Witter, L. D. (1961) J. Dairy Sci., 44, 983.

111) Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H., (2014), Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion, Food Chemistry, 150, 307-312.

112) Alais, C . 1974. Science du lait. Principles des techniques laitiares. 3º edit. Sep. Paris.

Ελληνική βιβλιογραφία

1) Ανυφαντάκης Ε. (1992): Μέθοδοι εξετάσεως του γάλακτος και των προϊόντων του (Εκδόσεις Σταμούλης).

2) Αποφ. ΑΧΣ 1256/90, ΦΕΚ 630/Β/3.10.90 << Συμπλήρωση της παρ. 1 του άρθρου 84 του Κώδικα Τροφίμων>>.

3) Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης, (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη 2001.
4) Κ.Τ. Π Άρθρο 84,85
5) Κ.Τ.Π 1998 Κώδικα Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων κοινής χρήσεως. Εθνικό Τυπογραφείο. Αθήνα 1998.
6) Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009). Βασικά Γαλακτοκομικά Προϊόντα. Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο.
7) Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσης (2003). Μέρος Α΄: Τρόφιμα και Ποτά, Κεφάλαιο 1. Ελληνική Δημοκρατία. Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών. Γενικό Χημείο του Κράτους.
8) Λιτοπούλου- Τζανετάκη Ευανθία, 2010. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ. Εκδόσεις Αιβάζη. Σελ 351-358.
9) Μπεζιρτζόγλου Ε. Μικροβιολογία τροφίμων, Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2004.
10) Προεδρικό Διάταγμα αρ. 56/1995. Συμμόρφωση της Ελληνικής νομοθεσίας προς τις οδηγίες 92/46 και 92/47 ΕΟΚ του Συμβουλίου περί των υγειονομικών κανόνων που δίεπουν την παραγωγή και εμπορία του γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα. ΦΕΚ45/27-2-95.